

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 286**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|--------------------|-----------|-------------------|-----------|
| C12N 9/16 | (2006.01) | A23K 40/25 | (2006.01) |
| C12N 9/96 | (2006.01) | | |
| A23K 10/14 | (2006.01) | | |
| A23K 20/10 | (2006.01) | | |
| A23K 20/189 | (2006.01) | | |
| A23K 20/26 | (2006.01) | | |
| A23K 40/10 | (2006.01) | | |
| A23K 40/20 | (2006.01) | | |
| A23K 40/30 | (2006.01) | | |
| A23L 29/00 | (2006.01) | | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2013** **E 20152501 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024** **EP 3699271**

54 Título: **Composiciones de gránulos y pélets que comprenden fitasa y ácido fítico y método de preparación**

30 Prioridad:

07.02.2012 US 201261595923 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2025

73 Titular/es:

DANISCO US INC. (100.00%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US

72 Inventor/es:

MARK, GEBERT

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 998 286 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de gránulos y pélets que comprenden fitasa y ácido fítico y método de preparación

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a una composición de gránulos que comprende ácido fítico y fitasa, a una composición de pélets que comprende esta composición de gránulos y a un método para producir un pélet de alimentos o alimentos para animales tratado térmicamente.

10 ANTECEDENTES

El uso de agentes activos, tales como enzimas, en alimentos y alimentos para animales es común. Se sabe que las enzimas mejoran la digestibilidad de los alimentos o alimentos para animales, reducen los factores anti-nutricionales en los alimentos y alimentos para animales y mejoran la productividad animal.

Cuando se comparan con las mezclas de alimentos secos, los pélets de alimentos tienen propiedades que son favorecidas por la industria, tal como una mejor calidad del alimento, menos patógenos, menores niveles de polvo durante la fabricación, buena manipulación y una dosificación más uniforme de los ingredientes.

La inactivación de enzimas puede ocurrir durante procesos industriales de alimentos y piensos (tales como la peletización), por ejemplo, mediante tratamiento térmico, alta presión, esfuerzo de cizallamiento y tratamiento químico (tal como pH, tensioactivos y disolventes). La inactivación es al menos parcialmente reversible si la enzima se reactiva después del procesamiento, por ejemplo, al enfriarse después del tratamiento con vapor y la peletización; la inactivación es irreversible si la actividad catalítica no se reanuda después del procesamiento, por ejemplo, al enfriarse después del tratamiento con vapor y la peletización. La inactivación irreversible y la actividad reducida de una enzima no son generalmente deseables en procesos tales como la peletización.

Procesos de peletización industrial preferidos utilizan inyección de vapor, en un proceso conocido como acondicionamiento, que añade humedad y eleva la temperatura antes de la etapa de peletización que fuerza los ingredientes del alimento calentados con vapor, o puré acondicionado, a pasar a través de una matriz. Las temperaturas del proceso de peletización pueden estar entre 70 °C y 95 °C, o más.

Debido al vapor, las temperaturas, las fuerzas de compresión y los productos químicos utilizados en los procesos de peletización, la actividad o potencia de las enzimas se reducen a menudo significativamente durante el procesamiento y el almacenamiento posterior. Este problema se ilustra por el hecho de que las enzimas alimentarias a menudo se suministran a la industria como productos líquidos estabilizados que se rocían sobre los pélets de pienso después del proceso de peletización para evitar la inactivación de las enzimas. Es difícil lograr una dosificación homogénea cuando la enzima se aplica después de la peletización, por ejemplo, rociándola sobre los pélets, y el costo del equipo para añadir la enzima después de la peletización es alto. Alternativamente, se pueden añadir al mezclador antes formulaciones enzimáticas líquidas o formulaciones enzimáticas de mezcla seca de la peletización. En determinados casos, se pueden añadir concentraciones de enzimas más elevadas que las necesarias con el fin de compensar las pérdidas durante la peletización.

Existe una necesidad en las industrias de alimentos y piensos de gránulos de enzimas estables y duraderos que sirvan como componentes en formulaciones que se someten a procesos de peletización por tratamiento con vapor sin una pérdida apreciable de la actividad enzimática.

Los enfoques para evitar el problema de inactivar irreversiblemente las enzimas o reducir la actividad de la enzima en procesos industriales incluyen la identificación de nuevas fuentes de una enzima (p. ej., la identificación de una enzima conocida en un microorganismo termófilo extremo) o la identificación de medios para estabilizar las enzimas conocidas.

Klibanov, 1983, (Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation, *Advances in Applied Microbiology*, volumen 29, página 1-28) describe que existen tres medios básicos para estabilizar enzimas: (1) inmovilización, (2) modificación química y (3) inclusión de aditivos. Sin embargo, Klibanov (1983) describe, además, que uno cualquiera de estos métodos podría conducir a la estabilización o desestabilización, o no tener efecto alguno.

Pace y Grath (*J Biol Chem* 255:3862, 1980) afirman que una mayor estabilidad de una enzima en presencia de su sustrato, coenzima o cualquier molécula pequeña a la que se une específicamente resulta porque la unión al estado nativo desplaza el equilibrio de desplegado y disminuye la concentración de estados desplegados de la enzima.

El documento EP0969089 describe que las sustituciones de aminoácidos pueden afectar a la estabilidad de fitasa, y algunas tienen un efecto estabilizador y otras un efecto desestabilizador, y algunas sustituciones de aminoácidos no tienen efecto alguno.

El ácido fítico (o fitato cuando está en forma de sal) se encuentra en muchos tejidos vegetales, especialmente en el salvado,

las semillas y los cereales. El fósforo fitato es mal digerido por animales monogástricos, tales como cerdos, aves de corral, peces y el hombre porque carecen o tienen niveles bajos de la enzima digestiva fitasa en el intestino.

Los documentos EP0619369 y US5554399 describen composiciones enzimáticas que comprenden una fitasa y una fosfatasa ácida y el uso de la composición enzimática en alimentos, piensos peletizados y forrajes.

El documento WO2004071218 describe el aumento de la cantidad de minerales en un alimento. El documento WO2004071218 describe una preparación que comprende una fitasa activa, un fitato y un catión esencial. El documento WO2004071218 describe que la preparación se puede añadir a cualquier producto alimenticio o bebida para consumo humano o a condimentos tales como el curry en polvo.

El documento WO03/037102 describe métodos para mejorar el valor nutricional de productos alimenticios que contienen hexakisfosfato de mioinositol proporcionando el producto alimenticio en combinación con una fitasa expresada en levadura.

El documento EP0420428 describe un método para tratar la artritis reumatoide mediante el uso de una mezcla de ácido fítico, una sal fitato o un isómero o hidrolizado de ácido fítico (incluyendo inositol) o una sal de fitato en combinación con una enzima desfosforilante. El ácido fítico o la sal fitato se pueden adsorber en un soporte sólido para su administración. Para la administración oral, la composición comprende, además, una enzima desfosforilante tal como una fitasa.

El documento US4952396 describe un método para inhibir el crecimiento de tumores mediante la administración de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido fítico, una sal fitato, un isómero o hidrolizado de ácido fítico (incluyendo inositol) o una sal fitato, o una mezcla de cualquier combinación de estos. El ácido fítico o la sal fitato se pueden adsorber en un soporte sólido para su administración. Para la administración oral, la composición comprende, además, una enzima desfosforilante tal como una fitasa.

El documento US5112814 describe un método para tratar la enfermedad de Parkinson mediante la administración de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido fítico, una sal fitato, un isómero o hidrolizado de ácido fítico (incluyendo inositol) o una sal fitato, o una mezcla de cualquier combinación de estos. El ácido fítico o la sal fitato se pueden adsorber en un soporte sólido para su administración. Para la administración oral, la composición puede co-administrarse con una enzima que hidroliza grupos fosfato tales como una fitasa.

El documento US4758430 describe un método para tratar la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido fítico, una sal fitato, un isómero o hidrolizado de ácido fítico o una sal fitato, o una mezcla de cualquier combinación de estos. El ácido fítico o la sal fitato se pueden adsorber en un soporte sólido para su administración. Para la administración oral, la composición comprende, además, una enzima desfosforilante tal como una fitasa.

El documento EP0969089 describe una formulación enzimática estabilizadora que comprende fitasa y uno o más agentes estabilizadores seleccionados del grupo que consiste en: azúcares C₅; polietilenglicoles con un peso molecular de 600 a 4000 Da; sales disódicas de ácido malónico, glutárico y succínico; carboximetilcelulosa; y alginato. Como alternativa, el documento EP0969089 describe que la fitasa se puede estabilizar mediante reticulación con glutaldehído o mediante oxidación con peryodato de sodio y reacción con dihidrazina de ácido adípico.

El documento US 2010/0004170 describe el aumento de la estabilidad de materiales que contienen proteínas mediante la aplicación de una capa de recubrimiento que comprende un producto micronizado de plantas leguminosas.

El documento WO9316175 describe una formulación de fitasa líquida estabilizada mediante la adición de urea y/o un poliol como sorbitol y glicerol, y aplicada a materia de pienso peletizada. Las formulaciones líquidas estabilizadas del documento WO9316175 son más resistentes a la inactivación térmica de la actividad enzimática y pueden almacenarse durante períodos de tiempo más prolongados con una mejor retención de la actividad de fitasa.

Singh y Satyanarayana (Bioresource Technology, 2009; 100: 2046-2051) describen la purificación y caracterización de una fitasa de fosfatasa ácida de histidina (HAP, por sus siglas en inglés) del moho termófilo *Sporotrichum thermophile*. Singh y Satyanarayana (2009) determinaron la termoestabilidad de la fitasa incubando la enzima a 60 °C y 80 °C con tampones de pH 3,0, 5,0 y 7,0. Singh y Satyanarayana (2009) determinaron el efecto de los estabilizadores glicerol, trehalosa, sorbitol y ácido fítico sobre la actividad enzimática a 80 °C.

El documento WO 2006/043178 describe un polipéptido de fitasa obtenido de *Buttiauxella* sp., p. ej., *Buttiauxella* cepa P1-29.

Las presentes enseñanzas buscan superar algunos de estos problemas. Por ejemplo, las presentes enseñanzas pueden abordar problemas asociados con el efecto de los procesos industriales de alimentos y alimento para animales sobre la fitasa.

SUMARIO

El alcance de protección está estrictamente definido por el juego de reivindicaciones adjunto.

La invención proporciona una composición de gránulos que comprende ácido fítico y fitasa, en donde la fitasa y el ácido fítico están en capas de recubrimiento adyacentes de un gránulo multicapa, o la fitasa está en el núcleo del gránulo y el ácido fítico está en la capa de recubrimiento adyacente, en donde el ácido fítico es al menos 10 milimolal en dicha composición, y en donde el ácido fítico se selecciona de hexafosfato de inositol, pentafofosfato de inositol, tetrafosfato de inositol, trifosfato de inositol, difosfato de inositol y monofosfato de inositol, o sales o mezclas de los mismos.

El ácido fítico puede ser al menos 20 milimolal, al menos 30 milimolal, al menos 50 milimolal, al menos 80 milimolal o al menos 100 milimolal, y puede, por ejemplo, estar presente en no más de 500 milimolal, 400 milimolal, 300 milimolal, 200 milimolal, 150 milimolal o 100 milimolal.

En algunas realizaciones, el ácido fítico es 10-100 milimolal, 20-90 milimolal, 30-80 milimolal o 40-70 milimolal.

En algunas realizaciones, la actividad recuperada de la fitasa es al menos 15 %, al menos 17 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 23 %, al menos 25 %, al menos 27 % o al menos 30 % mayor, después de mezclar el gránulo con al menos un ingrediente de alimento o alimento para animales y peletizar la mezcla resultante con tratamiento con vapor, en comparación con una fitasa de control no estabilizada por ácido fítico.

La fitasa puede ser fitasa BP17, p. ej., fitasa BP17 producida en una célula huésped de *Trichoderma* que comprende una delección del gen de endo-N-acetil glucosaminidasa.

La invención proporciona, además, una composición de pélet que comprende una composición de gránulos como la descrita.

La invención proporciona, además, un método para producir un pélet de alimento o alimento para animales tratado térmicamente, que comprende las etapas de: mezclar una composición granulada como se describe con al menos un ingrediente de alimento o alimento para animales; y peletizar la mezcla resultante con vapor.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las presentes enseñanzas se describirán con referencia a las siguientes Figuras:

La Fig. 1 muestra la actividad de fitasa recuperada obtenida después de la peletización a 90 °C o 95 °C en relación con la actividad de fitasa del puré antes de la peletización.

La Fig. 2 muestra un gráfico de calorimetría diferencial de barrido de DSC Tm para 0,5 mg/ml de fitasa con y sin ácido fítico 15 mM.

La Fig. 3 muestra un gráfico de calorimetría diferencial de barrido de DSC Tm para 0,5 mg/ml de fitasa con y sin inositol 15 mM.

La Fig. 4 muestra un gráfico de DSC Tm frente a la concentración de ácido fítico. (0,5 mg/ml de fitasa).

La Fig. 5 muestra un gráfico de DSC Tm frente a la concentración de ácido fítico, comparando BP17 EDT con Ronozyme P-(CT), una fitasa disponible comercialmente de DSM.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 = BP17, una fitasa variante de *Buttiauxella* sp. que comprende 12 sustituciones de aminoácidos en comparación con el tipo salvaje (SEQ ID NO: 4), que carece de la secuencia señal (SEQ ID NO: 12)

SEQ ID NO: 2 = BP11, una fitasa variante de *Buttiauxella* sp. que comprende 11 sustituciones de aminoácidos en comparación con el tipo salvaje (SEQ ID NO: 4), que carece de la secuencia señal (SEQ ID NO: 12).

SEQ ID NO: 3 = BP111, una fitasa variante de *Buttiauxella* sp. que comprende 21 sustituciones de aminoácidos en comparación con el tipo salvaje (SEQ ID NO: 4), que carece de la secuencia señal (SEQ ID NO: 12).

SEQ ID NO: 4 = fitasa de tipo salvaje codificada por *Buttiauxella* sp. cepa P 1-29 depositada con el número de acceso NCIMB 41248, que carece de la secuencia señal (SEQ ID NO: 12).

SEQ ID NO: 5 = BP17 con una sustitución de aminoácido adicional E121T.

SEQ ID NO: 6 = BP17 con una sustitución de aminoácido adicional P394N.

SEQ ID NO: 7 = BP17 con una sustitución de aminoácido adicional D386N.

SEQ ID NO: 8 = BP17 con sustituciones de aminoácidos adicionales K202N y N204T.

SEQ ID NO: 9 = BP17 con sustituciones de aminoácidos adicionales Q151N y P153S.

SEQ ID NO: 10 = BP17 con una sustitución de aminoácido adicional P373T.

SEQ ID NO: 11 = BP17 con una sustitución de aminoácido adicional Q76N.

SEQ ID NO: 12 = secuencia señal para tipo salvaje (SEQ ID NO: 4).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La práctica de las presentes enseñanzas empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica y peletización de alimento para animales, que están dentro del conocimiento de la técnica. Técnicas de este tipo se explican detalladamente en la bibliografía, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook et al., 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds., 1994); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis et al., eds., 1994); *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (Kriegler, 1990) y Fairfield, D. 1994. Capítulo 10, Pelleting Cost Center. En *Feed Manufacturing Technology IV*. (McElhiney, editor), American Feed Industry Association, Arlington, Va., pp. 110-139.

A menos que se defina lo contrario en esta memoria, todas las expresiones y términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenecen las presentes enseñanzas. Singleton, et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, segunda ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994) y Hale & Markham, *The Harper Collins Dictionary of Biology*, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a una persona experta un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta invención. En la práctica o ensayos de las presentes enseñanzas se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria.

Los intervalos numéricos proporcionados en esta memoria incluyen los números que definen el intervalo.

A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi, respectivamente.

Definiciones

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "ácido fítico" se refiere a hexafosfato de inositol (IP6), pero como el IP6 no existe generalmente en forma pura, el término también abarca fosfatos de inositol que son catabolitos de IP6, incluyendo pentafofato de inositol (IP5), tetrafofato de inositol (IP4), trifosfato de inositol (IP3), difosfato de inositol (IP2) y monofosfato de inositol (IP1), sales de los mismos y mezclas de los mismos. La expresión "ácido fítico" no se refiere al inositol, el producto totalmente hidrolizado del ácido fítico (IP0). Por lo tanto, la expresión "ácido fítico" engloba catabolitos, productos de hidrólisis, sales y análogos (p. ej., ésteres y sales). Tal como se utilizan en esta memoria, los términos IP6, IP5, IP4, IP3, IP2, IP1 y sales de los mismos se refieren a cualquier isómero de ese fosfato de inositol en particular.

Si bien IP6, IP5, IP4, IP3, IP2 e IP1 en forma de sal se denominan típicamente "fitatos", como se utiliza en esta memoria, la expresión "ácido fítico" también incluye fitatos de este tipo. El contraión fitato es típicamente sodio (tal como fitato de sodio). Sin embargo, el contraión puede ser, por ejemplo, calcio, magnesio, hierro o zinc.

Por lo tanto, la expresión "ácido fítico" tal como se utiliza en esta memoria incluye referencias a la forma ácida y a la forma de sal del ácido fítico. En determinadas realizaciones, el ácido fítico es la forma ácida o combinaciones de formas ácidas. En determinadas realizaciones el ácido fítico es la forma de sal o combinaciones de formas de sal. En determinadas realizaciones, el ácido fítico es una combinación de la forma ácida (o combinaciones de formas ácidas) y la forma de sal (o combinaciones de formas de sal).

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "milimolal" se utiliza tanto para líquidos como para sólidos.

El término "milimolal" para soluciones (líquidos) se utiliza en esta memoria como se define en la bibliografía científica - es decir, la molalidad de una solución se define como la cantidad en moles de un constituyente (que aquí es ácido fítico) dividida por la masa del disolvente en kilogramos (que aquí es todo en la solución excepto ácido fítico). Por lo tanto, 1.000 milimolal equivalen a 1 molal.

El término "milimolal" para sólidos en el presente contexto se define como la cantidad de ácido fítico (en milimoles) dividida por la masa de disolvente del sólido (p. ej., la capa enzimática de un gránulo), en donde el disolvente se define como los sólidos que no son ácido fítico (tales como en la capa enzimática de un gránulo que comprende fitasa y ácido fítico).

Un "pienso" y un "alimento", respectivamente, significan cualquier dieta, comida o similar natural o artificial o componentes de comidas de este tipo destinados o adecuados para ser consumidos, ingeridos o digeridos por un animal no humano y un ser humano, respectivamente.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "alimento" se utiliza en un sentido amplio - y cubre alimentos y productos alimenticios para seres humanos, así como alimentos para animales no humanos (es decir, un pienso).

10 El término "pienso" se utiliza con referencia a productos que se suministran a los animales durante la cría de ganado. El término "pienso" y la expresión "alimento para animales" se utilizan indistintamente. En una realización preferida, el alimento o pienso para animales es para consumo de no rumiantes y rumiantes. Ejemplos de rumiantes incluyen vacas, ovejas, cabras y caballos. Ejemplos de animales no rumiantes incluyen los animales monogástricos tales como cerdos, aves de corral (tales como pollos y pavos), peces (tales como salmón), perros, gatos y seres humanos.

15 El alimento o pienso puede estar en forma de una solución o de un sólido - dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración. En algunas realizaciones, las enzimas mencionadas en esta memoria pueden utilizarse como - o en la preparación o producción de - una sustancia alimenticia o forrajera.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "ingrediente alimenticio o para piensos" incluye una formulación que se añade o puede añadirse a alimentos o productos alimenticios e incluye formulaciones que se pueden utilizar en niveles bajos en una amplia diversidad de productos. El ingrediente de alimento puede estar en forma de una solución o de un sólido - dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración. Las enzimas descritas en esta memoria pueden utilizarse como ingrediente de alimentos o piensos o en la preparación o producción. Las enzimas pueden ser complementos alimenticios - o pueden añadirse a ellos.

25 Las composiciones de piensos para animales monogástricos incluyen típicamente composiciones que comprenden productos vegetales que contienen fitato. Composiciones de este tipo incluyen harina de maíz, harina de soja, harina de colza, harina de semilla de algodón, maíz, trigo, cebada y piensos a base de sorgo. Las enzimas descritas en esta memoria pueden ser - o pueden añadirse a - alimentos o sustancias y composiciones de piensos.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo de los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido", y se utilizan indistintamente. Cuando secuencias de aminoácidos de este tipo muestran actividad, pueden denominarse "enzima". Se utilizan los códigos convencionales de una letra o tres letras para los residuos de aminoácidos, y las secuencias de aminoácidos se presentan en la orientación terminal amino a carboxi estándar (*es decir*, N→C).

35 La expresión "ácido nucleico" abarca ADN, ARN, heterodúplex y moléculas sintéticas capaces de codificar un polipéptido. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena y pueden ser modificaciones químicas. La expresión "ácido nucleico" y el término "polinucleótido" se utilizan indistintamente. Dado que el código genético está degenerado, se puede utilizar más de un codón para codificar un aminoácido particular, y las presentes composiciones y procedimientos abarcan secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos particular. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de ácidos nucleicos se presentan en orientación 5' a 3'.

40 Por "homólogo" se entenderá una entidad que tiene un grado específico de identidad con las secuencias de aminoácidos en cuestión y las secuencias de nucleótidos en cuestión. Se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o incluso 99 % idéntica a la secuencia objeto, utilizando la herramienta de alineamiento de secuencias convencional Clustal V con parámetros predeterminados. Típicamente, los homólogos incluirán los mismos residuos del sitio activo que la secuencia de aminoácidos en cuestión, aunque pueden incluir cualquier número de sustituciones de aminoácidos conservadoras. En la siguiente Tabla de Sustituciones de Aminoácidos Conservadoras se enumeran ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

| Para el aminoácido | Código | Reemplazar por cualquiera de |
|--------------------|--------|---|
| Alanina | A | D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys |
| Arginina | R | D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn |
| Asparagina | N | D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln |
| Ácido aspártico | D | D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln |
| Cisteína | C | D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr |
| Glutamina | Q | D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp |
| Ácido glutámico | E | D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln |
| Glicina | G | Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, b-Ala, Acp |
| Isoleucina | I | D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met |
| Leucina | L | D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met |

| | | |
|--------------|---|---|
| Lisina | K | D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn |
| Metionina | M | D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val |
| Fenilalanina | F | D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, cis-3, 4, o 5-fenilprol |
| Prolina | P | D-Pro, ácido L-1-tioazolidina-4-carboxílico, ácido D- o L-1-oxazolidina-4-carboxílico |
| Serina | S | D-Ser, Thr, D-Thr, alo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys |
| Treonina | T | D-Thr, Ser, D-Ser, alo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val |
| Tirosina | Y | D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His |
| Valina | V | D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met |

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "fitasa" significa una proteína o un polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico, incluyendo el fitato/ácido fítico, y liberar fosfato inorgánico. Fitassas ilustrativas se comentan y se hace referencia a lo largo de las presentes enseñanzas, e incluyen la fitasa de *E. coli* (patente de EE.UU. 6.110.719) y las obtenidas de una diversidad de fuentes, incluyendo *Ascomycetes*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces*, *Humicola*, *Basidiomycetes*, *Bacillus subtilis* y *Schwannniomyces occidentalis*. Algunas fitassas además del fitato son capaces de hidrolizar al menos algunos de los inositol-fosfatos de grados intermedios de fosforilación. En una realización, la enzima activa producida o modificada en las presentes enseñanzas es una 6-fitasa. La 6-fitasa también se denomina "4-fitasa" o "fitato 6-fosfatasa". Otras fitassas incluyen las fitassas ácidas de histidina (HAP), que es un grupo que comprende miembros que se encuentran entre procariotas (p. ej., la fitasa appA de *Escherichia coli*) y eucariotas (phyA y B de *Aspergillus* sp.), fitassas HAP de levaduras y plantas. Las fitassas HAP comparten un motivo de sitio activo común, RHGXRPX, en el extremo N-terminal y un motivo HD en el extremo C-terminal en sus secuencias de ADN.

Las presentes fitassas pueden ser "precursoras", "inmaduras" o "de longitud completa", en cuyo caso incluyen una secuencia señal, o "maduras", en cuyo caso carecen de una secuencia señal. Las formas maduras de los polipéptidos son generalmente las más útiles. A menos que se indique lo contrario, la numeración de residuos de aminoácidos utilizada en esta memoria se refiere a las formas maduras de los respectivos polipéptidos de fitasa. Los presentes polipéptidos de amilasa también pueden truncarse para eliminar los extremos N o C, siempre que los polipéptidos resultantes conserven la actividad fitasa.

La expresión "tipo salvaje" y el término "parental" o "referencia", con respecto a un polipéptido, se refieren a un polipéptido que se produce de forma natural que no incluye una sustitución, inserción o delección hecha por el hombre en una o más posiciones de aminoácidos. De forma similar, la expresión "de tipo salvaje", el término "parental" o "referencia" con respecto a un polinucleótido, se refieren a un polinucleótido de origen natural que no incluye cambio de nucleósido hecho por el hombre alguno. No obstante, cabe señalar que un polinucleótido que codifica un polipéptido de tipo salvaje, parental o de referencia no se limita a un polinucleótido que se produce de forma natural y abarca cualquier polinucleótido que codifica el polipéptido de tipo salvaje, parental o de referencia.

El término "variante", con respecto a un polipéptido, se refiere a un polipéptido que difiere de un polipéptido de tipo salvaje, parental o de referencia especificado en que incluye una sustitución, inserción o delección hecha por el hombre en una o más posiciones de aminoácidos. De forma similar, el término "variante", con respecto a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que difiere en la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de tipo salvaje, parental o de referencia específico. La identidad del polipéptido o polinucleótido de tipo salvaje, parental o de referencia será evidente a partir del contexto.

Un "vector" se refiere a una secuencia de polinucleótidos diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos de células. Vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera, plásmidos, partículas de fagos, casetes y similares.

Un "vector de expresión" se refiere a una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés, secuencia codificante que está enlazada operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en un huésped adecuado. Secuencias de control de este tipo pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia de operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión de ribosomas adecuados en el ARNm, potenciadores y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido basándose en una secuencia de ácido nucleico. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.

Un "promotor" se refiere a una secuencia reguladora que está implicada en la unión de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. El promotor puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivo. Un ejemplo no limitante de un promotor inducible que puede utilizarse es *Trichoderma reesei* cbh1, que es un promotor inducible.

La expresión "enlazado operativamente" significa que los componentes especificados están en una relación (incluyendo pero no limitado a la yuxtaposición) que les permite funcionar de una manera pretendida. Por ejemplo, una secuencia

reguladora está enlazada operativamente a una secuencia codificante si la expresión de la secuencia codificante está bajo el control de las secuencias reguladoras.

5 Una "cepa huésped" o "célula huésped" es un organismo en el que se ha introducido un vector de expresión, un fago, un virus u otra construcción de ADN, incluyendo un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una fitasa). Cepas huésped ejemplares son *Trichoderma* sp. La expresión "célula huésped" incluye protoplastos creados a partir de células.

10 El término "recombinante", cuando se utiliza en referencia a una célula objeto, ácido nucleico, proteína o vector, indica que el sujeto ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos en niveles diferentes o en condiciones diferentes a las que se encuentran en la naturaleza.

15 Una "secuencia señal" (también denominada "presecuencia", "péptido señal", "secuencia conductora" o "péptido conductor") se refiere a una secuencia de aminoácidos unida a la porción N-terminal de una proteína que facilita la secreción de la forma madura de la proteína de la célula (p. ej., SEQ ID NO: 12). La secuencia señal fija como objetivo el polipéptido a la vía secretora y se escinde del polipéptido naciente una vez que se transloca en la membrana del retículo endoplásmico. La forma madura de la proteína extracelular (p. ej., SEQ ID NO: 1) carece de la secuencia señal que se separa por escisión durante el proceso de secreción.

20 Un "marcador selectivo" o "marcador seleccionable" se refiere a un gen capaz de expresarse en un huésped para facilitar la selección de células huésped que portan el gen. Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a agentes antimicrobianos (p. ej., higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica tal como una ventaja nutricional, a la célula huésped. La expresión "derivado de" abarca las expresiones "originado de", "obtenido de", "obtenible de", "aislado de" y "creado de".

30 "Hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina y Oomycota (véase, Alexopoulos, C. J. (1962), *Introductory Mycology*, Wiley, Nueva York). Estos hongos se caracterizan por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta de quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos de las presentes enseñanzas son morfológica, fisiológica y genéticamente distintos de las levaduras. El crecimiento vegetativo de los hongos filamentosos se realiza por elongación de hifas y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aerobio. En las presentes enseñanzas, la célula madre del hongo filamentoso puede ser una célula de una especie de *Trichoderma*, p. ej., *Trichoderma reesei* (previamente clasificada como *T. longibrachiatum* y actualmente también conocida como *Hypocrea jecorina*), *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii* o *Trichoderma harzianum*. Otros hongos filamentosos incluyen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Neurospora*, *Myceliophthora* o formas sexuales alternativas de los mismos tales como *Emericella*, *Hypocrea*.

40 El término "cultivar" se refiere al crecimiento de una población de células microbianas en condiciones adecuadas para el crecimiento, en un medio líquido o sólido.

El término "heterólogo" con referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que no se produce de forma natural en una célula huésped.

45 El término "endógeno" con referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que se produce de forma natural en la célula huésped.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "transformado", "transgénico" y la expresión "transformado de manera estable" utilizados con referencia a una célula, significan que la célula contiene una secuencia de ácido nucleico no nativa (p. ej., heteróloga) integrada en su genoma o transportada como un episoma que se mantiene a través de múltiples generaciones.

55 El término "introducido/a" en el contexto de insertar una secuencia de ácido nucleico en una célula, significa "transfección", "transformación" o "transducción", como se conoce en la técnica.

Los términos "aislado" y "separado" se refieren a un compuesto, proteína (polipéptidos), célula, ácido nucleico, aminoácido u otro material o componente especificado que se elimina de al menos otro material o componente con el que está asociado de forma natural tal como se encuentra en la naturaleza.

60 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "purificado" se refiere a material (p. ej., un polipéptido o polinucleótido aislado) que está en un estado relativamente puro, p. ej., al menos aproximadamente 90 % puro, al menos aproximadamente 95 % puro, al menos aproximadamente 98 % puro, o incluso al menos aproximadamente 99 % puro.

65 Tal como se utilizan en esta memoria, los términos "modificación" y "alteración" se utilizan indistintamente y significan cambiar o variar. En el contexto de modificar o alterar un polipéptido, estos términos pueden significar cambiar la secuencia

de aminoácidos, ya sea directamente o cambiando el ácido nucleico codificante, o cambiar la estructura del polipéptido tal como mediante la glicosilación de la enzima.

5 El término "glicosilación", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la unión de glicanos a moléculas, por ejemplo a proteínas. La glicosilación puede ser una reacción enzimática. La fijación formada puede ser a través de enlaces covalentes. La expresión "altamente glicosilada" se refiere a una molécula tal como una enzima que está glicosilada en todos o casi todos los sitios de glicosilación disponibles, por ejemplo, los sitios de glicosilación enlazados a N.

10 El término "glicano", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un polisacárido u oligosacárido, o la sección de hidrato de carbono de un glicoconjugado tal como una glicoproteína. Los glicanos pueden ser homopolímeros o heteropolímeros de residuos de monosacáridos. Pueden ser moléculas lineales o ramificadas.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "soporte sólido" se refiere a un material sólido inerte sobre el cual se pulveriza la fitasa y el ácido fítico. Opcionalmente, también se pueden pulverizar sobre el soporte sólido otros materiales - tales como enzimas, agentes hidrosolubles, agentes dispersables y otros componentes adecuados para gránulos -. Ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sacarosa granulada, granulados de almidón y sacarosa (ASNP, por sus siglas en inglés) y maltodextrina.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "gránulo" se refiere a un núcleo que puede tener o no una o más capas de recubrimiento.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "gránulo multicapa" se refiere a una composición que comprende un núcleo y al menos una capa de recubrimiento.

25 El término "núcleo", tal como se utiliza en esta memoria, es intercambiable con el término "semilla".

30 La expresión "capa de revestimiento" y el término "capa", tal como se utilizan en esta memoria, son intercambiables. La o las capas de recubrimiento generalmente encapsulan el núcleo con el fin de formar una capa sustancialmente continua de modo que la superficie del núcleo tenga pocas o ningún área sin recubrimiento. Los materiales (p. ej., los agentes, componentes y enzimas detallados en esta memoria) utilizados en el gránulo y/o gránulo multicapa son adecuados para su uso en alimentos y/o piensos para animales. Los materiales pueden ser de calidad de alimento o de calidad de pienso.

35 La expresión "capa de recubrimiento exterior", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la capa de recubrimiento del gránulo multicapa que está más alejada del núcleo (es decir, la última capa de recubrimiento que se aplica).

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "capa de recubrimiento enzimático" se refiere a una capa enzimática que comprende al menos una enzima. En algunas realizaciones, la capa enzimática comprende al menos dos enzimas. En algunas realizaciones, la capa enzimática comprende al menos tres enzimas.

40 "NCIMB" es el nombre de un depósito de organismos ubicado en Aberdeen, Escocia, llamado The National Collection of Industrial, food, and Marine Bacteria.

45 Tal como se utilizan en esta memoria, los términos "pélets" y "peletizar" se refieren a tabletas o pélets sólidos, redondeados, esféricos y cilíndricos y a los procedimientos para formar formas sólidas de este tipo, en particular pélets de pienso y alimentos para animales sólidos extrudidos. Procedimientos conocidos de fabricación de granulado de alimentos y alimentos para animales incluyen generalmente mezclar juntos los ingredientes de los alimentos o piensos durante aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente, transferir la mezcla resultante a un recipiente de compensación, transportar la mezcla a un acondicionador de vapor, transferir opcionalmente la mezcla acondicionada con vapor a un expansor, transferir la mezcla al molino de pélets o extrusora y, finalmente, transferir los pélets a un enfriador de pélets. Fairfield, D. 1994. Capítulo 10, Pelleting Cost Center. En Feed Manufacturing Technology IV. (McElhiney, editor), American Feed Industry Association, Arlington, Va., pp. 110-139.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "pélets de alimentos o alimento para animales tratados térmicamente" se refiere a mezclas no granuladas que se someten a un tratamiento térmico (tal como acondicionamiento con vapor), típicamente a una temperatura de al menos 90 °C durante al menos 30 segundos (tal como, por ejemplo, 30 segundos a 90 °C y/o 30 segundos a 95 °C). La mezcla puede luego extrudirse para formar pélets de alimento para animales.

55 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "estabilidad" se refiere a cualquiera de una diversidad de efectos en los que la actividad enzimática u otra propiedad funcional de una enzima fitasa se mantiene o mejora de manera beneficiosa. Una fitasa puede exhibir estabilidad al mostrar cualquiera de las siguientes características: "actividad recuperada", "termoestabilidad" y/o "reversibilidad de la inactividad" mejoradas.

60 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "actividad recuperada" se refiere a la relación de (i) la actividad de una fitasa después de un tratamiento que implica uno o más de los siguientes factores estresantes: calentamiento, aumento de presión, aumento de pH, disminución de pH, almacenamiento, secado, exposición a tensioactivo(s), exposición a

disolvente(s) y estrés mecánico) a (ii) la actividad de la fitasa antes del tratamiento. La actividad recuperada puede expresarse como un porcentaje.

El porcentaje de actividad recuperada se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ actividad recuperada} = \left(\frac{\text{actividad tras tratamiento}}{\text{actividad antes de tratamiento}} \right) \times 100 \%$$

En el contexto de experimentos de peletización, la "actividad antes de tratamiento" se puede aproximar midiendo la actividad de fitasa presente en el puré que no se somete a tratamiento de una manera que coincida con la fitasa que sí se somete a tratamiento. Por ejemplo, la fitasa del puré sin tratar se manipula y almacena durante un tiempo similar y en condiciones similares a la fitasa del puré tratado, para controlar posibles interacciones u otros efectos fuera del tratamiento especificado per se.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "fitasa de control" junto con una fitasa, se refiere al mismo tipo de molécula de fitasa (p. ej., fitasa BP17) que aquella a la que se le ha añadido un agente estabilizador (p. ej., está presente ácido fítico), excepto que faltaba el agente estabilizador. Por ejemplo, en una muestra la fitasa BP17 está estabilizada por ácido fítico y en la muestra de fitasa de control comparativa la única diferencia es que la fitasa BP17 no ha sido estabilizada por ácido fítico, siendo una fitasa de este tipo una "fitasa de control".

Tal como se utiliza en esta memoria, una "unidad de actividad de fitasa" es la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μmol de fosfato por minuto. La actividad de fitasa se ensaya de acuerdo con el método oficial 2000.12 de la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos), como se describe en "Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: collaborative interlaboratory study" Engelen A J, van der Heeft F C, Randsdorp P H, Somers W A, Schaefer J, van der Vat B J. J AOAC Int. Mayo-junio de 2001; 84(3):629-33. En resumen, las muestras molidas se extraen en acetato de sodio trihidrato 220 mM, cloruro de calcio deshidratado 68,4 mM, Tween 20 al 0,01 %, pH 5,5. A continuación se ensaya el sobrenadante. El ensayo mide la liberación de fosfato inorgánico de la fitasa de arroz, a pH 5,5, durante 60 min a 37 °C. El ensayo se detiene con el reactivo ácido de molibdato/vanadato y el fosfato se cuantifica por la intensidad del complejo de color amarillo del vanadomolibdofosfórico.

Tal como se utiliza en esta memoria, la temperatura de fusión (T_m) de la enzima se puede medir mediante técnicas conocidas en la técnica. Una técnica adecuada es la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Otras técnicas adecuadas para determinar las temperaturas de fusión incluyen la dispersión de la luz, el dicroísmo circular y los experimentos de enzimología. DSC es una técnica termoanalítica. Se utiliza para medir la cantidad de energía necesaria para mantener la temperatura de una muestra a cualquier temperatura en un intervalo de temperaturas. A medida que aumenta la temperatura testada, la muestra alcanza finalmente su temperatura de fusión. La temperatura de fusión T_m se observa como un pico endotérmico en el gráfico DSC. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "DSC T_m " se refiere a la temperatura de fusión de la enzima medida por DSC a una velocidad de barrido de 90 °C/min y a un pH de solución de 5,5.

Se proporciona el siguiente experimento hipotético para ilustrar y explicar adicionalmente la terminología de las presentes enseñanzas. Aquí, las unidades de la tabla se representan para mayor comodidad comenzando con 100 unidades arbitrarias de actividad de fitasa antes de la peletización. En primer lugar, mirando la fila superior de datos, para una composición de fitasa dada, tal como BP17 que carece de ácido fítico, el "porcentaje de actividad recuperada" es del 50 % después del tratamiento de peletización. En segundo lugar, mirando la fila inferior de datos, para una composición de fitasa dada, tal como BP17 con ácido fítico, el "porcentaje de actividad recuperada" de la fitasa después del tratamiento de peletización es del 80%. En tercer lugar, mirando la columna más a la derecha, la fitasa BP con ácido fítico tiene una actividad de fitasa que es 60 % mayor ($80-50=30$; $30/50=0.6=60\%$) en comparación con la "fitasa de control", es decir, la fitasa que no fue estabilizada por el ácido fítico. En algunas realizaciones, estas mejoras pueden ir acompañadas de mejoras en la termoestabilidad, por ejemplo, T_m medida mediante DSC T_m . En algunas realizaciones, estas mejoras pueden ir acompañadas de mejoras en la reversibilidad de la inactividad (es decir, la capacidad de recuperar la actividad perdida después de un período de tiempo).

| | Pre-peletización | Post-peletización |
|--|-------------------------------------|---------------------------------|
| Control de fitasa (Sin Ácido Fítico) | 100 unidades de actividad de fitasa | 50 unidades actividad de fitasa |
| Fitasa estabilizada (Con Ácido Fítico) | 100 unidades de actividad de fitasa | 80 unidades actividad de fitasa |

REALIZACIONES EJEMPLARES

Las presentes enseñanzas se refieren a la sorprendente observación de que la estabilización térmica de una enzima fitasa después de la pre-incubación con un exceso molar de su sustrato o su análogo de sustrato potencial da como resultado la estabilidad de la enzima. Más específicamente, las presentes enseñanzas establecen que la estabilidad de fitasa se puede mejorar incluyendo ácido fítico en proximidad funcional a la fitasa. Además, las presentes enseñanzas proporcionan un exceso de ácido fítico que puede mejorar la estabilidad de la fitasa durante el procesamiento de alimentos y alimento para

animales y puede dar como resultado pélets de alimentos y alimento para animales tratados térmicamente que tienen una actividad de fitasa mejorada.

Ácido fítico

En algunas realizaciones, el ácido fítico comprende el fosfato de inositol no hidrolizado, IP6. Normalmente, las fuentes comerciales de ácido fítico no son IP6 puro. En algunas realizaciones, el ácido fítico es una mezcla de fosfatos de inositol parcialmente hidrolizados (p. ej., IP6, IP5, IP4, IP3, IP2 e IP1). Por lo tanto, tipos útiles de ácido fítico son los catabolitos del ácido fítico, los productos de hidrólisis, las sales y los análogos (p. ej., ésteres y sales). El inositol (el producto completamente hidrolizado del ácido fítico - IP0) puede estar presente en la fuente de ácido fítico para su uso en las presentes enseñanzas, pero los autores de la invención han descubierto que, bajo algunas condiciones, el inositol por sí solo no estabiliza la fitasa. Por lo tanto, de acuerdo con las presentes enseñanzas, los fosfatos de inositol son útiles para la estabilización de la fitasa en la composición de piensos o alimentos.

El ácido fítico para uso en las presentes enseñanzas puede sintetizarse químicamente. Además o alternativamente, el ácido fítico para uso en las presentes enseñanzas puede estar presente en un alimento, alimento para animales o ingredientes del mismo, o derivarse de ellos. El ácido fítico se encuentra en las cáscaras de nueces, semillas y granos. Las fuentes de ácido fítico incluyen, pero no se limitan a semillas de lino, semillas de sésamo, almendras, nueces de Brasil, cocos, cacahuètes, nueces, maíz, avena, avena molida, arroz, trigo, judías, garbanzos, soja, tofu y patatas. Típicamente, el ácido fítico se obtiene de granos (tal como el maíz, el trigo o el arroz) mediante extracción en agua.

El ácido fítico que se utiliza para estabilizar la fitasa se suma a la cantidad de ácido fítico que puede estar presente inherentemente en los ingredientes de un alimento o alimento para animales con el que se mezcla la fitasa (tal como en forma de un gránulo multicapa) antes de la peletización. En otras palabras, el ácido fítico que se utiliza para estabilizar la fitasa es una fitasa exógena; el ácido fítico presente en los ingredientes de un alimento o alimento para animales es un ácido fítico endógeno. Por consiguiente, el ácido fítico calculado mayor que 10 milimolal proporcionado por las presentes enseñanzas, y otras concentraciones milimolales establecidas para estabilizar la fitasa proporcionados por las presentes enseñanzas, no incluyen cantidades traza de ácido fítico endógeno.

Fitasa

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "fitasa" significa una proteína o un polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico, incluyendo fitato y ácido fítico, y liberar fosfato inorgánico. Algunas fitasas además de fitato son capaces de hidrolizar al menos algunos de los inositol-fosfatos de grados intermedios de fosforilación.

El término "fitasa" puede ser una fitasa o una combinación de fitasas, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Enzimas fitasas tales como, p. ej., la 6-fitasa BP17 derivada de *Buttiauxella* sp., se añaden a los alimentos y alimentos para animales para aumentar la disponibilidad de fosfato, aumentando así el valor nutricional del producto. El procesamiento de los alimentos o alimentos para animales, por ejemplo bajo calor y alta presión, puede desnaturalizar la fitasa y reducir su actividad.

La fitasa utilizada en las presentes enseñanzas puede ser cualquier fitasa que sea adecuada para su uso en alimentos o alimentos para animales.

En una realización, la enzima activa producida o modificada en la descripción actual es una fitasa, más en particular una 6-fitasa.

La 6-fitasa también se denomina "4-fitasa" o "fitato 6-fosfatasa". Otras fitasas incluyen las fitasas ácidas de histidina (HAP), que es un grupo que comprende miembros que se encuentran entre procariotas (p. ej., la fitasa appA de *Escherichia coli*) y eucariotas (phyA y B de *Aspergillus* sp.), fitasas HAP de levaduras y plantas. Las fitasas HAP comparten un motivo de sitio activo común, RHGXRXR, en el extremo N-terminal y un motivo HD en el extremo C-terminal en sus secuencias de ADN. Esto permite un mecanismo de dos etapas en la hidrólisis de fosfomonoésteres. Las phyA y phyB de *A. niger* y la appA de *E. coli* son los representantes que han sido más caracterizados.

En una realización, la fitasa es 6-fitasa, una fitasa de *E. coli*, una fitasa de *Aspergillus* o una fitasa de Ronozyme (DSM Corporation).

En una realización altamente preferida, la enzima activa que se ha de producir o modificar es BP17. BP17 es una variante enzimática de una fitasa de *Buttiauxella* sp. La secuencia de BP17 (excluyendo el péptido señal), que se utiliza como referencia para la numeración de posiciones de los aminoácidos, se muestra como SEQ ID N° 1.

En otra realización, la enzima activa que se ha de producir o modificar es BP11. BP11 es una variante enzimática de una fitasa de *Buttiauxella* sp. La secuencia para BP11 (excluyendo el péptido señal) se muestra como SEQ ID N° 2.

En otra realización, la enzima activa que se ha de producir o modificar es BP111. BP111 es una variante enzimática de una fitasa de *Buttiauxella sp.* La secuencia para BP111 (excluyendo el péptido señal) se muestra como SEQ ID N° 3.

- 5 Todas estas fitasas son variantes de la secuencia de tipo salvaje tal como la derivada de la cepa P 1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada bajo el número de acceso NCIMB 41248, cuya secuencia se muestra como SEQ ID N° 4.

10 Las enzimas fitasas arriba detalladas son proteínas maduras que carecen de una secuencia señal. La secuencia señal apropiada derivada de la cepa P 1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada bajo el número de acceso NCIMB 41248, se muestra como SEQ ID N° 12.

15 En una realización, la fitasa se produce en una célula huésped de *Trichoderma*. En algunas realizaciones, la fitasa se produce en una célula huésped de *Trichoderma* que comprende una delección del gen de endo-N-acetil glucosaminidasa. El gen de la endo-N-acetil glucosaminidasa codifica la enzima endo-N-acetil glucosaminidasa que elimina la glicosilación enlazada a N de otras proteínas tales como las fitasas. En algunas realizaciones, la fitasa es fitasa BP17 producida en una célula huésped de *Trichoderma* que comprende una delección del gen de endo-N-acetil glucosaminidasa. Se enseñan cepas ejemplares, por ejemplo, en el documento WO 09/114380, véase por ejemplo el Ejemplo 5.

20 La cantidad de Unidades Fitasa añadidas al alimento o alimento para animales dependerá de la composición del alimento o pienso en sí. Los alimentos y piensos que contienen menores cantidades de fósforo disponible requerirán generalmente mayores cantidades de actividad de fitasa. La cantidad de fitasa requerida podrá ser determinada por el experto.

25 En una realización, la cantidad de fitasa incorporada en un alimento o alimento para animales puede estar entre 0,1 y 20 Unidades de actividad de Fitasa por gramo del alimento o alimento para animales. Típicamente, la cantidad de fitasa es de aproximadamente 50 gramos (12.000 U/g de gránulo de fitasa) por tonelada (1.000 kg) de alimento o alimento para animales; esto equivale a 0,6 unidades de fitasa por gramo de alimento o alimento para animales.

Fitasa y Ácido fítico

30 La fitasa y/o el ácido fítico están en una composición granular, tal como un gránulo multicapa. La fitasa y el ácido fítico se encuentran en capas de recubrimiento adyacentes de un gránulo multicapa, o la fitasa está en el núcleo del gránulo y el ácido fítico está en la capa de recubrimiento adyacente.

35 En una realización de las presentes enseñanzas, hay al menos 3 moles de ácido fítico por cada mol de fitasa.

Fitasa estabilizada

40 La estabilidad de una fitasa se puede mejorar en el estado líquido y/o en el estado sólido en comparación con la de la fitasa de control que no ha sido estabilizada mediante el uso de ácido fítico.

La fitasa se estabiliza con al menos 10 milimolal de ácido fítico. En algunas realizaciones, la fitasa se estabiliza con al menos 20, al menos 50, al menos 100 milimolal o al menos 150 milimolal de ácido fítico.

45 En otra realización, la fitasa se estabiliza con ácido fítico en el intervalo de 10 milimolal a 150 milimolal. En otras realizaciones, la fitasa se estabiliza con ácido fítico en el intervalo de 10 milimolal a 100 milimolal. En algunas realizaciones, la fitasa se estabiliza con ácido fítico en el intervalo de 20 milimolal a 150 milimolal. En otras realizaciones, la fitasa se estabiliza con ácido fítico en el intervalo de 20 milimolal a 100 milimolal. En algunas realizaciones, la fitasa se estabiliza con ácido fítico en el intervalo de 50 milimolal a 150 milimolal. En otras realizaciones, la fitasa se estabiliza con ácido fítico en el intervalo de 50 milimolal a 100 milimolal. En algunas realizaciones, la fitasa se estabiliza con ácido fítico en el intervalo de 100 milimolal a 150 milimolal.

50 En algunas realizaciones, el ácido fítico está presente en menos de 5 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,001 % peso/peso, expresado como peso de ácido fítico a peso en un gránulo entero en el que reside el ácido fítico, incluidas las capas, si están presentes, que carecen de ácido fítico.

55 En otras realizaciones, la relación molar de ácido fítico y fitasa es 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 10:1, 20:1, 25:1 o 50:1.

60 En una realización, después del tratamiento (p. ej., calentamiento, aumento de presión, aumento de pH, disminución de pH, almacenamiento, secado, exposición a tensioactivo(s), exposición a disolvente(s) y/o estrés mecánico), la fitasa estabilizada tiene una actividad de fitasa que es al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 % o al menos 60 % mayor que la de la fitasa de control que no se ha estabilizado mediante el uso de ácido fítico. En una realización, después del tratamiento (p. ej., calentamiento, aumento de presión, aumento de pH, disminución de pH, almacenamiento, secado, exposición a tensioactivo(s), exposición a disolvente(s) y/o estrés mecánico), la fitasa estabilizada tiene una actividad de fitasa que es 10 %-60 % mayor que la de la fitasa de control que no se ha estabilizado mediante el ácido fítico.

- 5 En una realización, la actividad enzimática de una fitasa estabilizada después del tratamiento (p. ej., calentamiento, aumento de presión, aumento de pH, disminución de pH, almacenamiento, exposición a tensioactivo(s), exposición a disolvente(s) y/o estrés mecánico) es al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % mayor que la de la fitasa estabilizada antes del tratamiento.
- 10 En una realización, se recupera al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de la actividad de fitasa.
En una realización, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de la actividad de fitasa se recupera en estado sólido durante la peletización de alimentos o alimentos para animales.
- 15 En una realización, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de la actividad de la fitasa se recupera después del tratamiento (p. ej., calentamiento, aumento de la presión, aumento del pH, disminución del pH, almacenamiento, exposición a tensioactivo(s), exposición a disolvente(s) y/o estrés mecánico). Por ejemplo, al menos el 80 % de la actividad de fitasa se recupera después del tratamiento
- 20 En una realización, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de la actividad de fitasa se recupera después de la peletización de alimentos o alimentos para animales. Por ejemplo, al menos el 80 % de la actividad de fitasa se recupera después de la peletización de alimentos o alimentos para animales.
- 25 En algunas realizaciones, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de la actividad de fitasa se recupera en estado sólido después de la peletización de alimentos o alimentos para animales. Por ejemplo, al menos el 80 % de la actividad de fitasa se recupera en estado sólido después de la peletización de alimentos o alimentos para animales.
- 30 En una realización, la actividad recuperada de una fitasa estabilizada por ácido fítico se mejora en al menos un 15 %, al menos un 17 %, al menos un 19 %, al menos un 20 %, al menos un 23 %, al menos un 25 %, al menos un 27 %, al menos un 30 %, al menos un 32 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 42 % o al menos un 45 % en comparación con la fitasa de control no estabilizada por ácido fítico. Por ejemplo, la actividad recuperada de una fitasa estabilizada por ácido fítico mejora al menos en un 23 % en comparación con la fitasa de control no estabilizada por ácido fítico.
- 35 En una realización, la actividad recuperada de una fitasa estabilizada por ácido fítico en estado sólido (tal como un gránulo multicapa) se mejora en al menos un 15 %, al menos un 17 %, al menos un 19 %, al menos un 20 %, al menos un 23 %, al menos un 25 %, al menos un 27 %, al menos un 30 %, al menos un 32 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 42 % o al menos un 45 % en comparación con la fitasa de control con ácido fítico al menos 10 milimolal en las mismas condiciones. Por ejemplo, la actividad recuperada de una fitasa estabilizada por ácido fítico en estado sólido (tal como un gránulo multicapa) mejora al menos en un 32 % en comparación con la fitasa de control no estabilizada por ácido fítico al menos 10 milimolal en las mismas condiciones.
- 40 En una realización, la actividad recuperada de una fitasa estabilizada por ácido fítico en estado sólido (tal como un gránulo multicapa) se mejora en al menos un 15 %, al menos un 17 %, al menos un 19 %, al menos un 20 %, al menos un 23 %, al menos un 25 %, al menos un 27 %, al menos un 30 %, al menos un 32 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 42 % o al menos un 45 % en comparación con la fitasa de control no estabilizada por ácido fítico en el intervalo entre 10 milimolal y 150 milimolal.
- 45 En una realización, la actividad recuperada de la fitasa estabilizada se mejora en al menos un 15 %, al menos un 17 %, al menos un 19 %, al menos un 20 %, al menos un 23 %, al menos un 25 %, al menos un 27 %, al menos un 30 %, al menos un 32 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 42 % o al menos un 45 % después de mezclar dicha fitasa estabilizada con al menos un ingrediente de alimento o alimento para animales y tratar la mezcla resultante con, por ejemplo, calor (tal como vapor), aumento de presión, aumento de pH, disminución de pH, almacenamiento, exposición a tensioactivo(s), exposición a disolvente(s) y/o estrés mecánico, en comparación con la actividad recuperada de la fitasa de control no estabilizada por ácido fítico a una concentración de al menos 10 milimolal en las mismas condiciones. Por ejemplo, la actividad recuperada de la fitasa estabilizada se mejora en al menos un 32 % después de mezclar dicha fitasa estabilizada con al menos un ingrediente de alimento o alimento para animales y tratar la mezcla resultante con, por ejemplo, calor (tal como vapor), aumento de presión, aumento de pH, disminución de pH, almacenamiento, exposición a tensioactivo(s), exposición a disolvente(s) y/o estrés mecánico, en comparación con la actividad recuperada de una fitasa de control no estabilizada por ácido fítico a una concentración de al menos 10 milimolal en las mismas condiciones.
- 50 En otra realización, la actividad recuperada de la fitasa estabilizada se mejora en al menos un 15 %, al menos un 17 %, al menos un 19 %, al menos un 20 %, al menos un 23 %, al menos un 25 %, al menos un 27 %, al menos un 30 %, al menos un 32 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 42 %, al menos un 45 % después de mezclar dicha fitasa estabilizada con al menos un ingrediente de alimento o alimento para animales y tratar la mezcla resultante con, por ejemplo, calor (tal como vapor), aumento de presión, aumento de pH, disminución de pH, almacenamiento, exposición a
- 55
- 60
- 65

tensioactivo(s), exposición a disolvente(s) y/o estrés mecánico, en comparación con la actividad recuperada de una fitasa de control no estabilizada por ácido fítico a una concentración en el intervalo entre 10 milimolal y 150 milimolal en las mismas condiciones.

- 5 En una realización, se utiliza ácido fítico al menos 10 milimolal para estabilizar la fitasa en un pélet de alimento o pienso que está sujeto o ha estado sujeto a uno o más de los siguientes tratamientos: calentamiento, aumento de presión, aumento de pH, disminución de pH, almacenamiento, exposición a tensioactivo(s), exposición a disolvente(s) y estrés mecánico.

Temperatura de fusión (T_m)

- 10 Una forma de determinar la estabilidad térmica de una enzima es determinar la temperatura de fusión (T_m) de la enzima.

La temperatura de fusión (T_m) de la enzima se puede medir mediante técnicas conocidas en la técnica. Una técnica adecuada es la calorimetría diferencial de barrido. Otras técnicas adecuadas para determinar las temperaturas de fusión incluyen la dispersión de la luz, el dicroísmo circular y los experimentos de enzimología.

- 15 En una realización, la T_m (tal como la DSC T_m) de una fitasa (estabilizada por ácido fítico al menos 10 milimolal) aumenta en al menos 1 °C, al menos 1,3 °C, al menos 1,4 °C, al menos 1,5 °C, al menos 2 °C, al menos 4 °C, al menos 6 °C, al menos 7 °C, al menos 7,5 °C, al menos 7,6 °C o al menos 8 °C, en comparación con una fitasa de control.

- 20 En una realización, la T_m (tal como la DSC T_m) de una fitasa estabilizada por ácido fítico al menos 15 milimolal aumenta en al menos 1 °C, al menos 1,3 °C o al menos 1,4 °C, en comparación con una fitasa de control que no está estabilizada por ácido fítico al menos 10 milimolal. Por ejemplo, la T_m (tal como la DSC T_m) de una fitasa estabilizada por ácido fítico al menos 15 milimolal aumenta en al menos 1,4 °C, en comparación con una fitasa de control que no está estabilizada por ácido fítico al menos 10 milimolal.

- 25 En una realización, la T_m (tal como la DSC T_m) de una fitasa estabilizada por ácido fítico al menos 10 milimolal aumenta en al menos 4 °C, al menos 6 °C, al menos 7 °C, al menos 7,5 °C, al menos 7,6 °C o al menos 8 °C, en comparación con una fitasa de control que no está estabilizada por ácido fítico al menos 10 milimolal. Por ejemplo, la T_m (tal como la DSC T_m) de una fitasa estabilizada por ácido fítico al menos 10 milimolal aumenta en al menos 7,6 °C en comparación con una fitasa de control que no está estabilizada por ácido fítico al menos 10 milimolal.

- 30 En una realización, la T_m (tal como la DSC T_m) de una fitasa (estabilizada por ácido fítico en el intervalo entre 10 milimolal y 150 milimolal) aumenta en al menos 1 °C, al menos 1,3 °C, al menos 1,4 °C, al menos 1,5 °C, al menos 2 °C, al menos 4 °C, al menos 6 °C, al menos 7 °C, al menos 7,5 °C, al menos 7,6 °C o al menos 8 °C, en comparación con una fitasa de control que no está estabilizada por ácido fítico en el intervalo entre 10 milimolal y 150 milimolal.

Granulado y granulado multicapa

- 40 Los núcleos, gránulos y gránulos multicapa se pueden producir mediante una diversidad de técnicas de fabricación que incluyen: atomización rotatoria, granulación en húmedo, granulación en seco, secado por pulverización, granulación por disco, extrusión, recubrimiento en bandeja, esferonización, granulación en tambor, aglomeración en lecho fluido, granulación de alto cizallamiento, recubrimiento por pulverización en lecho fluido, cristalización, precipitación, gelificación en emulsión, atomización por disco giratorio y otros enfoques de fundición, y procesos de granulación. Procedimientos de este tipo son conocidos en la técnica y se describen en la pat. de EE.UU. N° 4689297 y en la pat. de EE.UU. N° 5324649 (procesamiento en lecho fluido); documento EP656058B1 y pat. de EE.UU. N° 454332 (proceso de extrusión); pat. de EE.UU. N° 6248706 (granulación, alto cizallamiento); y documento EP804532B1 y pat. de EE.UU. N° 6534466 (procesos combinados que utilizan un núcleo de lecho fluido y un recubrimiento por mezclador).

- 50 El núcleo es el núcleo interno del gránulo multicapa o es el gránulo. Los materiales utilizados en el núcleo pueden ser adecuados para el uso en alimentos y/o piensos para animales. Los documentos US20100124586, WO9932595 y US5324649 detallan materiales adecuados para el núcleo.

- 55 En una realización, el núcleo comprende uno o más agentes hidrosolubles o dispersables en agua. Agentes hidrosolubles adecuados incluyen, pero no se limitan a sales inorgánicas (p. ej., sulfato de sodio, cloruro sódico, sulfato de magnesio, sulfato de zinc y sulfato de amonio), ácido cítrico, azúcares (p. ej., sacarosa, lactosa, glucosa, sacarosa granulada, maltodextrina y fructosa), plastificantes (p. ej., polioles, urea, ftalato de dibutilo y ftalato de dimetilo), material fibroso (p. ej., celulosa y derivados de celulosa tales como hidroxipropil-metil-celulosa, carboxi-metil-celulosa e hidroxietil-celulosa), ácido fítico y combinaciones de los mismos. Agentes dispersables adecuados incluyen, pero no se limitan a, arcillas, nonpareils (combinaciones de azúcar y almidón; por ejemplo, granulados de almidón-sacarosa - ASNP), talco, silicatos, carboximetilcelulosa, almidón y combinaciones de los mismos.

- 60 En una realización, el núcleo comprende sulfato de sodio. En otra realización, el núcleo consiste en sulfato de sodio. En algunas realizaciones, el núcleo puede comprender una fitasa y/o ácido fítico. En algunas realizaciones, el núcleo no comprende fitasa.

- 65 En algunas realizaciones, el núcleo está recubierto con al menos una capa de recubrimiento. En una realización, el núcleo

está recubierto con al menos dos capas de recubrimiento. En otra realización, el núcleo está recubierto con al menos tres capas de recubrimiento. En una realización adicional, el núcleo está recubierto con al menos cuatro capas de recubrimiento.

5 Los materiales utilizados en la o las capas de recubrimiento pueden ser adecuados para el uso en alimentos y/o piensos para animales. Los documentos US20100124586, WO9932595 y US5324649 detallan materiales adecuados para la capa de recubrimiento.

10 En algunas realizaciones, el proceso de granulación en lecho fluido se emplea tradicionalmente ejecutando y pulverizando continuamente una capa sobre la capa siguiente con solo un breve enjuague de las tuberías y boquillas de pulverización con agua para fines de limpieza, sin cesar en la pulverización. En algunas realizaciones, los gránulos se pueden preparar dejándolos secar (fluidizar sin pulverización) durante un período de tiempo adicional (p. ej., 5 minutos) después del final de cada una de las pulverizaciones intermedias (por ejemplo, a 70 °C), y se puede realizar un secado adicional opcional después de la pulverización final (por ejemplo, 20 minutos a 70 °C).

15 En algunas realizaciones, el período de tiempo adicional después del final de la pulverización intermedia es de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20 o 25 minutos. En algunas realizaciones, el período de tiempo adicional después del final de la pulverización intermedia es de 2-8, 3-7 o 4-6 minutos. En algunas realizaciones, la temperatura del período de tiempo adicional después del final de la pulverización intermedia es de al menos 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C u 80 °C. En algunas realizaciones, la temperatura del período de tiempo adicional después del final de la etapa intermedia es de 60C-80C o 65C-75C. En algunas realizaciones, después del final de la pulverización intermedia se realiza una etapa de secado durante 4-6 minutos a 65-75 °C.

25 En algunas realizaciones, el secado opcional después de la pulverización final puede ser de al menos 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos. En algunas realizaciones, el secado opcional después de la pulverización final puede ser de 5-30 o 10-25 minutos. En algunas realizaciones, la temperatura del secado opcional después del final de la pulverización final es de al menos 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C u 80 °C. En algunas realizaciones, la temperatura del período de secado opcional después del final de la pulverización final es de 60 °C-80 °C o 65 °C-75 °C. En algunas realizaciones, el secado opcional después de la pulverización final es de 15-25 minutos a 65 °C-75 °C.

30 En una realización, una capa de recubrimiento comprende uno o más de los siguientes materiales: una sal inorgánica (p. ej., sulfato de sodio, cloruro sódico, sulfato de magnesio, sulfato de zinc y sulfato de amonio), ácido cítrico, un azúcar (p. ej., sacarosa, lactosa, glucosa y fructosa), un plastificante (p. ej., polioles, urea, ftalato de dibutilo y ftalato de dimetilo), material fibroso (p. ej., celulosa y derivados de celulosa tales como hidroxi-propil-metilcelulosa, carboxi-metil-celulosa e hidroxi-etil-celulosa), arcilla, granulado (una combinación de azúcar y almidón), silicato, carboximetil-celulosa, ácido fítico, almidón (p. ej., almidón de maíz), grasas, aceites (p. ej., aceite de colza y aceite de parafina), lípidos, polímeros de vinilo, copolímeros de vinilo, poli(alcohol vinílico) (PVA), plastificantes (p. ej., polioles, urea, ftalato de dibutilo, ftalato de dimetilo y agua), agentes antiaglomerantes (p. ej., talco, arcillas, sílice amorfa y dióxido de titanio), agentes antiespumantes (tales como Foamblast 882® y Erol 6000K®) y talco. Los documentos US20100124586, WO9932595 y US5324649 detallan componentes adecuados para las capas de recubrimiento.

40 En una realización, la capa de recubrimiento comprende azúcares, tales como sacarosa.

En una realización, la capa de recubrimiento comprende un polímero tal como poli(alcohol vinílico) (PVA).

45 PVA adecuados para su incorporación en la o las capas de recubrimiento del gránulo multicapa incluyen PVA parcialmente hidrolizado, totalmente hidrolizado e hidrolizado de manera intermedia que tienen grados de viscosidad bajos a altos.

En otra realización, la capa de recubrimiento comprende una sal inorgánica, tal como sulfato de sodio.

50 En una realización, al menos una capa de recubrimiento es una capa de recubrimiento enzimática. En algunas realizaciones, el núcleo está recubierto con al menos dos capas enzimáticas. En otra realización, el núcleo está recubierto con al menos tres capas enzimáticas.

55 En algunas realizaciones, los gránulos de las presentes enseñanzas comprenden una capa de recubrimiento enzimática. En algunas realizaciones, la capa enzimática comprende al menos una enzima. En algunas realizaciones, la capa enzimática comprende al menos dos enzimas. En algunas realizaciones, la capa enzimática comprende al menos tres enzimas. En algunas realizaciones, la enzima se selecciona del grupo que consiste en fitasas, xilanasas, fosfatasas, amilasas, esterasas, enzimas redox, lipasas, transferasas, celulasas, hemicelulasas, beta-glucanasas, oxidasas (p. ej., hexosa oxidasas y maltosa oxidoreductasas), proteasas y mezclas de las mismas. Generalmente, al menos una capa de recubrimiento enzimática comprende al menos una fitasa y ácido fítico.

60 En una realización, la capa de recubrimiento enzimática comprende al menos una fitasa y al menos una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en fitasas, xilanasas, fosfatasas, amilasas, esterasas, enzimas redox, lipasas, transferasas, celulasas, hemicelulasas, beta-glucanasas, oxidasas (p. ej., hexosa oxidasas y maltosa oxidoreductasas) y proteasas.

Las listas de enzimas anteriores son solo ejemplos y no pretenden ser exclusivas. Se puede utilizar cualquier enzima en los gránulos descritos en esta memoria, incluyendo enzimas de tipo salvaje, recombinantes y variantes de fuentes bacterianas, fúngicas, de levaduras, vegetales, de insectos y animales, y enzimas ácidas, neutras o alcalinas.

En algunas realizaciones, la capa de recubrimiento enzimática puede comprender, además, uno o más materiales adicionales seleccionados del grupo que consiste en: ácido fólico, azúcares (p. ej., sacarosa), almidón (p. ej., almidón de maíz), grasas, aceites (p. ej., aceite de colza y aceite de parafina), lípidos, polímeros de vinilo, copolímeros de vinilo, poli(alcohol vinílico) (PVA), plastificantes (p. ej., polioles, urea, ftalato de dibutilo, ftalato de dimetilo y agua), agentes anti-aglomerantes (p. ej., talco, arcillas, sílice amorfa y dióxido de titanio), agentes anti-espumantes (tales como Foamblast 882® y Erol 6000K® disponibles de Ouvre PMC, Lesquin, Francia) y talco. Los documentos US20100124586, WO9932595 y US5324649 detallan componentes adecuados para gránulos. Foamblast 882® está disponible de Emerald Foam Control, LLC. Foamblast 882® es un antiespumante elaborado con ingredientes de calidad alimentaria.

En una realización, el gránulo multicapa comprende una capa de recubrimiento enzimática que comprende una fitasa y una capa de recubrimiento que comprende ácido fólico que es funcionalmente adyacente a la capa enzimática.

En una realización, la capa de recubrimiento comprende ácido fólico, en donde dicha capa de recubrimiento es funcionalmente adyacente a un núcleo que comprende fitasa y/o una capa de recubrimiento enzimático que comprende fitasa.

En una realización, la capa de recubrimiento exterior de un gránulo multicapa comprende uno o más de los siguientes materiales de recubrimiento: polímeros (p. ej., polímeros de vinilo, poli(alcohol vinílico) y copolímeros de vinilo), gomas, ceras, grasas, aceites, lípidos, lecitina, pigmentos, lubricantes, granulados, sales inorgánicas (p. ej., sulfato de sodio, cloruro sódico, sulfato de magnesio, sulfato de zinc y sulfato de amonio), talco y plastificantes (p. ej., azúcares, alcoholes de azúcar y polietilenglicol).

En una realización, la capa de recubrimiento exterior de un gránulo multicapa comprende una sal inorgánica (p. ej., sulfato de sodio), poli(alcohol vinílico) (PVA), talco o combinaciones de los mismos. En una realización, la capa de recubrimiento exterior comprende poli(alcohol vinílico) (PVA) y/o talco.

En una realización, la capa de recubrimiento exterior evita o reduce la velocidad o el grado de migración de agua, humedad o vapor hacia la capa enzimática.

Los gránulos multicapa descritos en esta memoria se pueden producir mediante una diversidad de técnicas que incluyen: recubrimiento por pulverización en lecho fluido, recubrimiento en bandeja y otras técnicas para construir un gránulo multicapa añadiendo capas consecutivas sobre el material del núcleo de partida (la semilla). Véanse, por ejemplo, los documentos US 5324649 y US20100124586. En una realización, los gránulos multicapa se producen utilizando un proceso de recubrimiento por pulverización en lecho fluido.

En una realización, los gránulos multicapa comprenden o consisten en un núcleo que comprende sulfato de sodio; una primera capa de recubrimiento que comprende o consiste en fitasa, sacarosa, almidón, ácido fólico y aceite de colza; una segunda capa de recubrimiento que comprende o consiste en sulfato de sodio; y una tercera capa de recubrimiento que comprende o consiste en talco y PVA. La primera capa de recubrimiento se aplica al núcleo, luego la segunda capa de recubrimiento se aplica a la primera capa de recubrimiento y luego la tercera capa de recubrimiento se aplica a la segunda capa de recubrimiento.

En otra realización, los gránulos multicapa comprenden o consisten en un núcleo que comprende sulfato de sodio; una primera capa de recubrimiento que comprende o consiste en fitasa, sacarosa, almidón, ácido fólico y un agente antiespumante (tal como Foamblast 882®); una segunda capa de recubrimiento que comprende o consiste en sulfato de sodio; y una tercera capa de recubrimiento que comprende o consiste en talco y PVA. La primera capa de recubrimiento se aplica al núcleo, luego la segunda capa de recubrimiento se aplica a la primera capa de recubrimiento y luego la tercera capa de recubrimiento se aplica a la segunda capa de recubrimiento.

Pélets y Peletización

Los pélets pueden comprender gránulos y/o gránulos multicapa como se describe en esta memoria de acuerdo con cualquiera de una diversidad de métodos de peletización conocidos, ejemplos de los cuales se describen más adelante.

En una realización, el pélet comprende ácido fólico, fitasa y al menos un ingrediente alimenticio o de pienso, en donde la concentración del ácido fólico es al menos 10 milimolal. En una realización, el pélet comprende al menos un ingrediente alimenticio o de pienso y un gránulo que comprende ácido fólico y fitasa, en donde la concentración del ácido fólico en el gránulo es al menos 10 milimolal.

Los pélets de las presentes enseñanzas se producen mediante un método en el que la temperatura de una mezcla de piensos se eleva a un nivel alto mediante un tratamiento con vapor antes de la peletización, un proceso conocido como

acondicionamiento. Posteriormente, la mezcla de piensos acondicionados se puede hacer pasar a través de una matriz para producir pélets de un tamaño particular. La mezcla de piensos se puede preparar mezclando gránulos y/o gránulos multicapa descritos en esta memoria con alimentos o piensos para animales como se describe en esta memoria.

Generalmente, el acondicionador de vapor trata la mezcla durante aproximadamente 20 a aproximadamente 90 segundos, y hasta varios minutos, a aproximadamente 85 °C a aproximadamente 95 °C. La cantidad de vapor puede variar de acuerdo con la cantidad de humedad y la temperatura inicial del alimento o mezcla de alimentos para animales. Se ha informado que se añade aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de vapor en los procesos de peletización, y la cantidad se selecciona para producir menos de aproximadamente un 18 % de humedad en el puré antes de la peletización, o hasta aproximadamente un 28 % de humedad en el puré destinado a la extrusión.

Un proceso de expansión opcional puede ocurrir durante aproximadamente 4 a aproximadamente 10 segundos en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 140 °C. La parte del proceso de fabricación que consiste en moler pélets funciona típicamente durante aproximadamente 3 a 5 segundos a una temperatura de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 95 °C.

Antes de la peletización, las mezclas no peletizadas (las denominadas premezclas o precursores, mezclas base, puré y diluyentes para pélets) contienen típicamente vitaminas y oligoelementos. Las mezclas base contienen típicamente ingredientes para alimentos y alimentos para animales, tales como fosfato dicálcico, piedra caliza, sal y una premezcla de vitaminas y minerales, pero no granos ni ingredientes proteicos. Los diluyentes incluyen, pero no se limitan a granos (por ejemplo, salvado de trigo y salvado de arroz) y arcillas tales como filosilicatos (silicato de magnesio, sepiolita, bentonita, caolín, montmorillonita, hectorita, saponita, beidellita, atapulgita y estevensita). Las arcillas también funcionan como soportes y agentes fluidificantes o diluyentes para premezclas de alimentos y piensos para animales. El puré comprende típicamente una dieta animal completa. Por ejemplo, el puré está compuesto o consiste en maíz, harina de soja, aceite de soja, sal, DL-metionina, piedra caliza, fosfato dicálcico y vitaminas y minerales. En un ejemplo, el puré consiste en 61,10 % de maíz, 31,43 % de harina de soja, 4,4 % de aceite de soja, 0,40 % de sal, 0,20 % de DL-metionina, 1,16 % de piedra caliza, 1,46 % de fosfato dicálcico y 0,25 % de vitaminas y minerales.

En una realización, se produce un alimento o un alimento para animales mezclando al menos un ingrediente de alimento o alimento para animales (tal como un puré) con una fitasa y ácido fítico en forma de un gránulo como se describe, acondicionando con vapor la mezcla resultante, seguido de la peletización de la mezcla.

Por ejemplo, una mezcla no peletizada de harina de maíz y harina de soja (tal como 60 % de harina de maíz y 40 % de harina de soja) se puede mezclar con gránulos multicapa que comprenden fitasa y ácido fítico y luego someterlos a acondicionamiento con vapor a 90 °C durante 30 segundos. La mezcla se extrude luego para formar pélets de alimento para animales.

En algunas realizaciones, las composiciones de las presentes enseñanzas pueden residir en pélets de alimentos o alimento para animales tratados térmicamente. Pélets de alimentos o alimento para animales tratados térmicamente de este tipo pueden someterse a un tratamiento térmico (tal como acondicionamiento con vapor) a una temperatura de al menos 90 °C durante al menos 30 segundos (tal como 30 segundos a 90 °C y/o 30 segundos a 95 °C). La mezcla puede luego extrudirse para formar pélets de alimento para animales.

Alimentos y alimentos para animales

En una realización, el alimento o alimento para animales es un líquido tal como un pienso líquido. En otra realización, el alimento o alimento para animales es un sólido. Tal como se utiliza en esta memoria, el término animal incluye todos los animales, ejemplos de los cuales incluyen no rumiantes y rumiantes (tales como vacas, ovejas, cabras y caballos). Ejemplos de animales no rumiantes incluyen los animales monogástricos tales como cerdos, aves de corral (tales como pollos y pavos), peces (tales como salmón), perros, gatos y seres humanos. En una realización, el alimento para animales es pienso para pollos (pienso para pollo). En una realización, el alimento para animales es pienso para cerdos (cerdo).

El alimento o alimento para animales puede comprender proteínas vegetales. Las proteínas vegetales pueden derivar de legumbres, semillas oleaginosas, frutos secos y cereales. Ejemplos de fuentes de proteínas vegetales se incluyen plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Poaceae*, *Cruciferaeae*, y *Chenopodiaceae*.

Fuentes adecuadas de proteínas vegetales son soja, harina de soja, cereales (tales como maíz, trigo, avena, cebada, centeno y sorgo), harinas de cereales (tales como harina de maíz, harina de trigo, harina de avena, harina de cebada, harina de centeno, harina de sorgo y harina de canola), salvados (tales como salvado de trigo y salvado de avena), semillas oleaginosas (tales como semillas de colza y de girasol), harinas de semillas oleaginosas (tales como harina de colza), harina de semilla de algodón, repollo, remolacha y remolacha azucarera. Estas proteínas vegetales son ejemplos de ingredientes alimentarios e ingredientes de alimentos para animales.

El alimento o alimento para animales puede comprender proteínas animales. Proteínas animales adecuadas incluyen harina de pescado y suero de leche. El alimento o alimento para animales puede comprender aditivos. Aditivos adecuados

incluyen inhibidores de enzimas, vitaminas, oligoelementos, macrominerales, agentes colorantes, compuestos aromáticos, péptidos antimicrobianos (tales como leucocina A, tanatina y tritripticina) y enzimas.

- 5 El alimento o alimento para animales o ingredientes de los mismos pueden ser un líquido. El alimento o alimento para animales o ingredientes de los mismos pueden ser un sólido. Ejemplos incluyen harina de maíz, de trigo o de soja.

Realizaciones de Modificaciones de Enzimas

- 10 Las presentes enseñanzas proporcionan fitasas con diversas modificaciones, por ejemplo mediante glicosilación. En particular, la presente descripción se refiere a la glicosilación de fitasa. En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere a la modificación o alteración de enzimas para introducir o aumentar el número de sitios de glicosilación. Esta modificación puede realizarse en el polipéptido o en el ácido nucleico codificante. En algunas realizaciones, la enzima modificada es una fitasa y en algunas realizaciones la enzima es fitasa BP17. La secuencia de aminoácidos de la fitasa BP17 (SEQ ID NO: 1) contiene tres sitios potenciales de glicosilación enlazados a N de acuerdo con el análisis del algoritmo de predicción NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Los residuos de asparagina que se predice que estarán glicosilados son los residuos N169, N173 y N285 de la secuencia de la fitasa madura BP17 (que carece de una secuencia señal), como se indica en la SEQ ID NO: 1 abajo en negrita y subrayado.

SEQ ID NO: 1

NDTPASGYQVEKVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNWPEWVPVKLG YITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQR TLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSM DKTQVQQAVEKEA QTPIDNLNQHYIPSLALM NTTL NFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMP SKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
HN VYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IAN IAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

- 20 Una realización de la descripción implica la producción y el uso de una fitasa que está altamente glicosilada, por ejemplo BP17 altamente glicosilada, o un homólogo, variante o derivado de la misma. En algunas realizaciones, la enzima producida y/o utilizada tiene más del 75 %, por ejemplo, más del 80 %, por ejemplo, más del 90 % y, por ejemplo, más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con BP17.

- 25 Algunas realizaciones de la descripción implican introducir sitios de glicosilación adicionales en BP17. Específicamente, se pueden introducir una o más o todas las siguientes sustituciones en BP17 (con referencia a la numeración de posición de SEQ ID NO: 1, que carece de una secuencia señal) con el fin de introducir sitios de glicosilación: -E121T, P394N, D386N, K202N, N204T, Q151N y P153S, P373T y Q76N.

- 30 En particular, una secuencia de la descripción puede comprender K202N y N204T en la misma secuencia. En una realización adicional de la descripción, una secuencia de la descripción puede comprender Q151N y P153S en la misma secuencia.

- 35 SEQ ID N°s: 5 a 11 presentan secuencias variantes que pueden utilizarse en las presentes enseñanzas (en cada caso, los cambios de aminoácidos relativos a BP17 se muestran en negrita y subrayados) en donde se han introducido sustituciones de aminoácidos en BP17 (SEQ ID NO: 1) para aumentar el número de sitios de glicosilación.

El grado de glicosilación de una enzima puede aumentar la estabilidad de la enzima modificada. Por lo tanto, algunas realizaciones de la descripción proporcionan enzimas más termoestables, por ejemplo, enzimas que son más termoestables que las enzimas de tipo salvaje o enzimas producidas utilizando métodos diferentes.

- 40 La presente descripción proporciona también ácidos nucleicos que codifican y son capaces de codificar los polipéptidos de SEQ ID NO 1 y homólogos, variantes o derivados de los mismos.

- 45 La presente descripción también puede referirse a la enzima de SEQ ID NO 1 o a un polipéptido derivado de la enzima parental por sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, tales como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que tiene la actividad de la proteína parental. En algunas realizaciones, esta enzima está glicosilada y en algunas realizaciones una enzima de este tipo tiene una estabilidad incrementada.

- 50 Una realización adicional de la presente descripción proporciona un método para producir una enzima de la descripción, por ejemplo una enzima en la que la glicosilación aumenta o la enzima está altamente glicosilada. Este método implica alterar la secuencia de aminoácidos de la enzima, o alterar el ácido nucleico que codifica la enzima, para aumentar el número de sitios de glicosilación. En algunas realizaciones, esta alteración implica aumentar el número de sitios de

glicosilación enlazados a N. En algunas realizaciones, esto implica introducir el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr en la enzima o introducir la secuencia que codifica este sitio en el ácido nucleico. En algunas realizaciones, se introducen uno, dos, tres o más sitios de glicosilación en una enzima.

- 5 En algunas realizaciones, el método de la descripción se lleva a cabo en una fitasa, por ejemplo BP17 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el método de la descripción introduce una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos con el fin de aumentar el número de sitios de glicosilación en una fitasa (con referencia a la numeración de posición de SEQ ID NO: 1):-E121T, P394N, D386N, K202N, N204T, Q151N, P153S, P373T y Q76N.

10 Métodos de producción

En realizaciones adicionales, la presente descripción se refiere también al aumento de la glicosilación de una enzima a través de métodos de producción. En algunas realizaciones, el método de producción utilizado es la expresión en un huésped de hongos filamentosos, por ejemplo, la expresión en hongos de la especie *Trichoderma* y específicamente, por

- 15 ejemplo, en *T. reesei*.

La presente descripción también se refiere a la expresión de una enzima en un huésped alterado, en donde la alteración ha eliminado la función de uno o más genes, y en algunas realizaciones ha eliminado la función del gen de endo glucosaminidasa endógena.

- 20

En una realización particular, la presente descripción se refiere a la expresión y producción de una enzima, por ejemplo una fitasa, y en algunas realizaciones la fitasa BP17, que puede o no estar modificada, en hongos de especies de *Trichoderma*, por ejemplo en *T. reesei*, en donde el gen de endo glucosamina endógeno ha sido eliminado.

- 25 En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere a la producción y/o al uso de enzimas, tales como fitasa, con glicosilación incrementada. En realizaciones adicionales, se fomenta una glicosilación incrementada mediante el uso de un huésped con un gen endoT eliminado. En algunas realizaciones, la enzima producida tiene una estabilidad incrementada en comparación con una enzima producida utilizando métodos diferentes, especialmente métodos que utilizan una especie huésped diferente y/o un huésped en los que no se elimina el gen de endoglucosamina endógeno.

- 30

La endoglucosaminasa endógena es una enzima secretada que elimina la glicosilación enlazada a N de otras proteínas tales como las fitasas. El grado de glicosilación de una proteína, tal como una enzima, es mayor si se produce en un huésped con endoT eliminado. Según la descripción, el gen endoT puede eliminarse mediante eliminación, interrupción, interferencia o cualquier método que impida o reduzca la expresión y producción de EndoT en el huésped. Se enseñan cepas ejemplares, por ejemplo, en el documento WO 09/114380, véase por ejemplo el Ejemplo 5.

- 35

En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere a la expresión y producción de una fitasa en un huésped con endoT eliminado. En realizaciones adicionales, la fitasa es BP17 o un homólogo, variante o derivado de la misma, por ejemplo que tiene más del 75 %, por ejemplo más del 80 %, por ejemplo más del 90 % y, por ejemplo, más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con BP17 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el huésped es un huésped de hongos filamentosos, por ejemplo, hongos de una especie *Trichoderma* y más, por ejemplo, en *T. reesei*. En algunas realizaciones, la fitasa tiene una estabilidad incrementada, por ejemplo, la termoestabilidad se incrementa en comparación con una fitasa producida por otros métodos de producción, o una fitasa que no está glicosilada o no está altamente glicosilada. El grado de glicosilación se puede determinar mediante espectrometría de masas.

- 45

En algunas realizaciones, los métodos de producción de la presente descripción proporcionan una fitasa más termoestable, lo que por lo tanto aumenta los niveles de actividad de fitasa posteriores al procesamiento presentes en el pienso. En algunas realizaciones, el procesamiento del pienso implica la formación de pélets. En realizaciones adicionales, los pélets que comprenden la fitasa de la presente descripción tienen niveles incrementados de actividad de fitasa después del procesamiento. En aún realizaciones adicionales, la fitasa de la presente descripción tiene mayor capacidad de sobrevivir al proceso de peletización y conservar niveles de actividad de fitasa posteriores al procesamiento.

- 50

Combinaciones de realizaciones

- 55 En una realización adicional, se pueden combinar facetas de la descripción actual. En otras palabras, una enzima de la descripción que ha sido modificada para aumentar el número de sitios de glicosilación alterando la secuencia de aminoácidos, puede producirse en un huésped alterado, por ejemplo un huésped en el que se ha eliminado el gen endoT. Esto maximiza el grado de glicosilación de la enzima. En algunas realizaciones, el huésped es un hongo de la especie *Trichoderma*, por ejemplo *T. reesei*.

- 60

En algunas realizaciones, la enzima expresada en el huésped alterado es una fitasa, por ejemplo BP17 (SEQ ID NO: 1), o Ronozyme P-(CT), o un homólogo, variante o derivado de la misma, por ejemplo que tiene más del 75 %, por ejemplo más del 80 %, por ejemplo más del 90 % y, por ejemplo, más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con BP17 (SEQ ID NO: 1) o Ronozyme P-(CT) disponible comercialmente, respectivamente.

- 65

En algunas realizaciones, la fitasa, independientemente de cómo se produzca o con cualquier secuencia, está en

proximidad funcional con el ácido fítico, en donde la fitasa y el ácido fítico están en cualquiera de las composiciones descritas en esta memoria.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar algunas realizaciones de las presentes enseñanzas. La fitasa utilizada en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 es la fitasa BP17 que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1, hecha en el huésped EDT-Trichoderma reesei. La fitasa utilizada en el Ejemplo 3 es la fitasa disponible comercialmente Ronozyme P-(CT) de DSM. El cálculo del porcentaje de actividad recuperada, la actividad de fitasa y la DSC se realizaron como se describe en las definiciones.

Ejemplo 1 - Ensayos de Granulación y Peletización en Lecho Fluido

Se incorporó ácido fítico (Sigma) en gránulos multicapa que comprendían fitasa para evaluar si se podía lograr una protección a la fitasa contra el tratamiento con vapor posterior. Estos gránulos que contenían fitasa se mezclaron luego con alimento para animales y se hicieron pasar a través de un peletizador de alimento para animales que incorporaba un tratamiento con vapor.

Granulación en Lecho Fluido

Gránulos de enzima se pueden producir utilizando un proceso de pulverización en lecho fluido descrito en la pat. de EE.UU. N° 5324649. En este caso se utilizó un pulverizador de lecho fluidizado Vector FL-1. Se añadió fitasa a razón de 12.000 unidades/gramo (basado en el peso total del gránulo seco). Se añadió ácido fítico al 0,10 % a 0,40 % en peso del gránulo total o a una concentración 15 a 60 mM en la capa enzimática. Semillas de sulfato de sodio (a las que también se alude como el núcleo) se cargaron en una cámara de lecho fluido. La solución "pulverización 1" se preparó disolviendo o dispersando sacarosa, almidón de maíz, ácido fítico y aceite de parafina o aceite de colza o antiespumante Foamblast 882® en un concentrado de fitasa ultrafiltrado (UFC, por sus siglas en inglés). Se añadió agua adicional a esta mezcla con el fin de mantener la concentración total de sólidos en aproximadamente el 40 %. Se requirió una agitación constante con el fin de mantener el almidón de maíz y el aceite de parafina o aceite de colza o antiespumante bien dispersos en el UFC enzimático.

La pulverización 1 se aplicó al núcleo de sulfato de sodio ya cargado en el granulador de lecho fluido utilizando un proceso de pulverización por la parte superior. La pulverización 1 se aplicó con una tasa de pulverización inicial de 6,3 g/min que aumentó gradualmente hasta una tasa de pulverización final de 11 g/min a lo largo de 30 minutos. La presión del aire de atomización se mantuvo entre 35 y 40 psi (2,4 y 2,8 bares) y la temperatura del lecho se mantuvo entre 43 y 45 °C.

Las pulverizaciones posteriores (Pulverización 2, Pulverización 3, etc.) se prepararon disolviendo y/o dispersando todos los componentes de esta solución de pulverización en agua para formar una solución que contenía aproximadamente 18 a 40 % de sólidos. Las pulverizaciones que contenían aceite insoluble en agua, antiespumante o almidón de maíz requirieron una agitación continua con el fin de mantener estos materiales bien dispersos. La pulverización 2 se aplicó con una tasa de pulverización constante de 23,9 g/min. La presión del aire de atomización se mantuvo entre 34 y 36 psi (2,3 y 2,4 bares) y la temperatura del lecho se mantuvo entre 45 y 47 °C. La pulverización 3 se aplicó con una tasa de pulverización inicial de 7,2 g/min que aumentó gradualmente hasta una tasa de pulverización final de 9,2 g/min a lo largo de 15 minutos. La presión del aire de atomización se mantuvo en 40 psi (2,8 bares) y la temperatura del lecho se mantuvo entre 49 °C y 50 °C.

Los gránulos multicapa se recolectaron después de la pulverización final y se determinó la actividad de fitasa utilizando el ensayo de fitasa arriba mencionado.

Peletización

Luego, los gránulos multicapa se combinaron con una mezcla de 60 % de harina de maíz y 40 % de harina de soja (es decir, el puré) en una relación de 60 gramos de gránulos por 120 kilogramos de harina de maíz y soja, de modo que la actividad final de la fitasa en la mezcla antes de la peletización fue de aproximadamente 5 unidades/gramo.

Esta mezcla se peletizó luego en un peletizador de alimento para animales. Los gránulos y la harina de maíz y soja se mezclaron en un mezclador de cinta horizontal, durante aproximadamente 15 minutos. El molino de peletización era una Simon Heesen, de tipo monorrodillo, equipado con una matriz de 17,3 cm de diámetro interior y un orificio para pélets de 3 mm de diámetro. La velocidad de la matriz era de 500 rpm y estaba accionada por un motor de 7,5 kW. La tasa de alimentación típica fue de 300 kg por hora. La temperatura en el acondicionador se mantuvo a +/- 0,1 grados Celsius, medida en la salida de alimentación del acondicionador. El acondicionador tenía un sistema mezclador tipo cascada. Se utilizaron dos temperaturas de acondicionamiento: 90 °C y 95 °C. La presión de entrada de vapor era de 2 atm y la temperatura en el acondicionador se controló mediante el ajuste manual de tres válvulas que regulaban el suministro de vapor. El tiempo de permanencia en el acondicionador fue de aproximadamente 30 segundos. Cuando se alcanzó la temperatura objetivo, el sistema funcionó durante aproximadamente 5 a 10 minutos antes de realizar el muestreo. Las muestras se tomaron durante períodos de 1-1,5 minutos, correspondientes a 5-7,5 kg de alimento peletizado, y se colocaron inmediatamente en una caja de enfriamiento con fondo perforado y flujo de aire de 1500 metros cúbicos por

hora. Después de enfriar durante 15 minutos, las muestras se redujeron a dos veces utilizando un divisor de muestras y se tomó 1 kg para pruebas de laboratorio.

Después de la peletización y el enfriamiento, los pélets se trituraron y se analizaron para determinar la actividad de fitasa. La mezcla no peletizada de harina de maíz y soja y gránulos de fitasa se denomina el control de "puré" y también se analizó para determinar la actividad de fitasa. La relación de actividad recuperada en el gránulo de enzima peletizado a 90 °C o 95 °C a la actividad de control de puré se denomina el porcentaje de actividad recuperada, como se describe en las definiciones.

Estequiometría

En los cálculos que figuran más adelante en la Tabla 1.1, se puede observar que para un gránulo cargado con ácido fítico al 0,1 % p/p, el nivel de ácido fítico en la capa enzimática es 10,19 milimoles por kilogramo de sólidos de la capa enzimática o 10,19 milimolal. Se han observado mejoras en el rendimiento de peletización como se muestra en la Tabla 3 cuando se ha utilizado ácido fítico en gránulos al 0,1 % p/p a 1,0 % p/p (10,19 - 101,9 milimolal).

Por lo tanto, ácido fítico al 0,10 % p/p, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 10,19 mM, ácido fítico al 0,20 % p/p, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 20,38 mM, ácido fítico al 0,4 % p/p, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 40,76 mM, al 0,19 % p/p, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 19,361 mM, al 0,37 % p/p, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 37,703 mM, al 1 % p/p, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 101,9 mM. El ácido fítico se obtuvo de Sigma y originalmente era mayor que el 70 % de IP6 según se determina por HPLC, siendo el resto IP5, IP4, IP3, IP2 e IP1. (En esta Tabla 1.1, L10263 es L-10-263, que se describe a continuación en la Tabla 1.2; SP1 se refiere a la pulverización 1; SP2 se refiere a la pulverización 2; y SP3 se refiere a la pulverización 3. Cada una de las "pulverizaciones" es una solución o suspensión acuosa que contiene los componentes sólidos especificados y que se pulveriza sobre los núcleos dentro del recubridor de lecho fluido.

Tabla 1.1

| Receta del Gránulo | | L10263 | | | | | | |
|--------------------|---------------------------------|---------------------------|----------|---|--------|--|--|--|
| | Componente | Carga Útil del Componente | Masa (g) | PM Ácido Fítico | | | | |
| SP1 | Sólidos enzimáticos | 4,62 % | 310,69 | 660,04 | Dalton | | | |
| | Sacarosa | 3,00 % | 201,75 | | | | | |
| | Almidón | 6,50 % | 437,12 | Base de Masa de Gránulos Enteros | | | | |
| | Ácido Fítico | 0,10 % | 6,72 | 6724,95 | gramos | | | |
| | Aceite de parafina | 0,75 % | 50,44 | | | | | |
| | | | | Masa de la Capa Enzimática (menos ácido fítico) | | | | |
| SP2 | Na ₂ SO ₄ | 40,00 % | 2689,98 | 1000,00 | gramos | | | |
| SP3 | Talco | 6,00 % | 403,50 | Milimoles de Ácido Fítico | | | | |
| | PVA | 3,00 % | 201,75 | 10,19 | mM | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| Núcleo | Na ₂ SO ₄ | 36,03 % | 2423,00 | | | | | |
| | | | 6724,95 | | | | | |

Formulaciones de Gránulos

La Tabla 1.2 resume las formulaciones de gránulos elaboradas y testadas en ensayos de peletización.

Tabla 1.2

| Componente de Receta del Gránulo | V-10-153 | L-10-263 | V-10-264 | L-10-265 |
|----------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Pulverización 1 | | | | |
| Sólidos Enzimáticos | 4,78 % | 4,62 % | 4,62 % | 4,62 % |
| Sacarosa | 6,50 % | 3,00 % | 3,00 % | 3,00 % |
| Almidón | 6,50 % | 6,50 % | 6,50 % | 6,50 % |
| Ácido Fítico | 0,00 % | 0,10 % | 0,20 % | 0,40 % |
| Aceite de Parafina | 1,00 % | 0,75 % | 0,75 % | 0,75 % |
| Pulverización 2 | | | | |
| Na ₂ SO ₄ | 40,00 % | 40,00 % | 40,00 % | 40,00 % |
| Pulverización 3 | | | | |
| Talco | 6,00 % | 6,00 % | 6,00 % | 6,00 % |
| PVA | 3,00 % | 3,00 % | 3,00 % | 3,00 % |
| Núcleo | | | | |
| Na ₂ SO ₄ | 32,22 % | 36,03 % | 35,93 % | 35,73 % |

| Componente de Receta del Gránulo | L-10-231 | V-10-231 |
|----------------------------------|----------|----------|
| Pulverización 1 | | |
| Sólidos Enzimáticos | 3,74 % | 3,74 % |
| Sacarosa | 3,00 % | 3,00 % |
| Almidón | 6,50 % | 6,50 % |
| Ácido Fítico | 0,19 % | 0,37 % |
| Antiespumante | 1,00 % | 1,00 % |
| Pulverización 2 | | |
| Na ₂ SO ₄ | 40,00 % | 40,00 % |
| Pulverización 3 | | |
| Talco | 6,00 % | 6,00 % |
| PVA | 3,00 % | 3,00 % |
| Núcleo | | |
| Na ₂ SO ₄ | 36,57 % | 36,39 % |

5

| Componente de Receta del Gránulo | V-11-144 | L-11-095 |
|----------------------------------|----------|----------|
| Pulverización 1 | | |
| Sólidos Enzimáticos | 4,44 % | 4,44 % |
| Sacarosa | 3,00 % | 3,00 % |
| Almidón | 6,50 % | 6,50 % |
| Ácido Fítico | 0,00 % | 1,00 % |
| Aceite de colza | 0,75 % | 0,75 % |
| Pulverización 2 | | |
| Na ₂ SO ₄ | 40,00 % | 40,00 % |
| Pulverización 3 | | |
| Talco | 6,00 % | 6,00 % |
| PVA | 3,00 % | 3,00 % |
| Núcleo | | |
| Na ₂ SO ₄ | 36,31 % | 35,31 % |

10 La Figura 1 muestra la actividad recuperada obtenida después de peletizar estas formulaciones de la Tabla 1.2. La peletización se realizó tanto a 90 °C como a 95 °C. Se puede ver en la Figura 1 que cuando hay ácido fólico al 0,1 a 0,4 % presente en la capa enzimática del gránulo, se observa una mejora de la actividad recuperada de entre 19 y 27 % a 90 °C y una mejora de la actividad recuperada de entre 17 y 42 % a 95 °C en comparación con el gránulo de control elaborado sin ácido fólico alguno en la capa enzimática, es decir, la fitasa de control. V-10-153 y V-11-144 son las muestras de control

que no contienen ácido fítico. Todas las demás muestras (L-10-263, V-10-264, L-10-231, L-10-265 y L-11-095) contienen entre 0,10 % y 0,40 % de ácido fítico y muestran una mejora de la actividad recuperada de entre 19 y 27 % a 90 °C y una mejora de la actividad recuperada de entre 17 y 42 % a 95 °C. (La variabilidad en la mejora no parece correlacionarse con el nivel de ácido fítico utilizado en estas muestras, en potencia debido a la presencia de un probable exceso en el nivel de 0,10 %).

La Tabla 1.3 muestra el efecto del tiempo de incubación del ácido fítico con la fitasa UFC antes de pulverizarlo sobre el gránulo en la actividad de fitasa después de la peletización tanto a 90 °C como a 95 °C.

Obsérvese que las formulaciones L-11-087, V-11-090, V-11-088 y L-11-088 tienen todas la misma composición, que es idéntica a la L-11-095 mostrada en la Tabla 1.2. La única diferencia entre estas formulaciones fue el tiempo que se dejaron incubar antes de pulverizarlas sobre el gránulo. Se puede observar que para tiempos de incubación entre 30 minutos y 6 horas no hay cambios en la actividad de fitasa después de la peletización. Después de 24 horas de incubación, se observa una disminución significativa en la actividad de fitasa posterior a la peletización tanto a 90 °C como a 95 °C, pero este período de tiempo es inusualmente largo y generalmente no se encontraría al fabricar estos gránulos de enzimas en un entorno comercial.

Tabla 1.3 - Actividad de fitasa después de la peletización a 90 °C y 95 °C con Tiempos de Incubación Variables

| <u>Formulación</u> | <u>Tiempo de Incubación (h)</u> | <u>Actividad Recuperada a 90 °C</u> | <u>Desviación Estándar</u> | <u>Actividad Recuperada a 95 °C</u> | <u>Desviación Estándar</u> |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| L-11-087 | 0,5 | 116 % | 18 % | 95 % | 1 % |
| V-11-090 | 3 | 96 % | 14 % | 63 % | 1 % |
| V-11-088 | 6 | 95 % | 5 % | 95 % | 1 % |
| L-11-088 | 24 | 87 % | 1 % | 51 % | 5 % |

Ejemplo 2: Calorimetría Diferencial de Barrido de Fitasa BP17

La DSC se realizó en un MicroCal VP-DSC utilizando una tasa de barrido de 90 °C por hora con una concentración de fitasa BP17 de 0,5 mg/ml (0,01 mM) en un tampón acetato de sodio 0,25 M a pH 5,5 con cloruro de calcio 20 mM. Todas las muestras de ácido fítico se ajustaron a un pH de 5,5 con hidróxido de sodio antes de la adición al tampón acetato y la fitasa para garantizar que todas las muestras tuvieran el mismo pH de 5,5. El tampón acetato se ejecutó en la celda de referencia de la DSC para todas las muestras.

La Figura 2 muestra el gráfico DSC para 0,5 mg/ml (0,01 mM) de fitasa BP17 con y sin sustrato de ácido fítico 15 mM añadido. Se indica el punto de fusión (T_m) para cada una de las muestras y se puede observar que la adición de ácido fítico 15 mM aumenta la T_m de 72,4 °C a 73,8 °C (un incremento de 1,4 °C), lo que indica una estabilización del estado nativo de la fitasa.

La Figura 3 muestra el gráfico DSC para inositol 15 mM (el producto completamente hidrolizado del ácido fítico que reacciona con fitasa) y fitasa, en comparación con la fitasa sola sin inositol. Se puede observar que el inositol no aumenta la T_m de fitasa. Esto apoya una hipótesis en la que la entidad estabilizadora no es el producto totalmente hidrolizado de la hidrólisis del ácido fítico por la fitasa, sino el ácido fítico parcialmente hidrolizado tal como hexafosfato de inositol, pentafofoato de inositol, tetrafofoato de inositol, trifosfato de inositol, difosfato de inositol y monofosfato de inositol. (La ligera variación de altura de las curvas probablemente se refiere a la cantidad total de enzima que experimenta una transición de fusión. Esto puede variar debido a un error experimental durante la preparación de la muestra).

Las muestras de gránulos preparadas de acuerdo con la Tabla 1.2 se analizaron para determinar la distribución de residuos de fosfato de inositol (IP6, IP5, IP4, etc.) utilizando un método analítico basado en HPLC. El método HPLC se basa en el intercambio de iones utilizando una columna CarboPac 100 en un sistema HPLC Dionex. Se ejecuta un gradiente de agua y HCl 1 N y el material eluyente se derivatiza post-columna con un reactivo de color, 0,1 % de Fe(NO₃)₃·9H₂O, formando complejos InsP-Fe detectables con UV a 290 nm. Este método solo puede cuantificar desde IP6 hasta IP2, con IP1 e IP0 eluyendo junto con el pico de disolvente. Como se muestra en la siguiente Tabla 2.1, no fue posible detectar fitato (IP6) alguno en cualquiera de las muestras. Para el ácido fítico al 0,1 % y 0,5 mg/ml de muestras de gránulos de fitasa estaba presente una pequeña cantidad de IP3. Las muestras líquidas no dieron lugar a picos alguno aparte del "frente de disolvente". Este pico fue bastante grande para la más concentrada de las muestras, lo que sugiere una degradación total a IP1, IP0 y fosfato inorgánico.

La Tabla 2.1 muestra que en el gránulo el ácido fítico se ha hidrolizado a IP3, IP2, IP1 e IP0, y que no está presente IP6. Esto apoya la hipótesis de que la entidad estabilizadora es IP3, IP2, IP1 (IP0 se eliminó en base a los datos de DSC; es poco probable que IP0 sea la entidad estabilizadora porque cuando se testó IP0 (inositol) con fitasa utilizando DSC como se muestra en la Figura 3, no se observó aumento alguna en la T_m).

La capa enzimática contiene 12.000 U/g de fitasa. Las unidades en la tabla son áreas de picos de HPLC. Un guión (-) indica que el valor no fue determinado.

| Muestra | IP6 | IP5 | IP4 | IP3 | IP2 | IP1 | IP0 |
|---|-----|-----|-----|------------|------------|-----|-----|
| L-11-087 | 0 | 0 | 0 | 0,02 41 | 0,00 04 | - | - |
| L-11-087 | 0 | 0 | 0 | 0,03 51 | 0 | - | - |
| L-11-087 | 0 | 0 | 0 | 0,03 59 | 0 | - | - |
| L-11-087 | 0 | 0 | 0 | 0,03 43 | 0 | - | - |
| L-11-088 | 0 | 0 | 0 | 0,02 88 | 0 | - | - |
| L-11-088 | 0 | 0 | 0 | 0,02 09 | 0 | - | - |
| 100 mg/ml de ácido fítico y 0,5 mg/ml de fitasa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| 100 mg/ml de ácido fítico y 0,5 mg/ml de fitasa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - |

La Figura 4 muestra una gráfica de la DSC T_m determinada para la fitasa en presencia de ácido fítico a una concentración entre 0 y 150 mM. Se puede observar que la T_m de la fitasa aumenta de 72,4 °C a 80 °C con ácido fítico 150 mM, lo que muestra un incremento de 7,6 °C en la T_m con respecto a la fitasa sin ácido fítico añadido. Esto es indicativo de un efecto estabilizador muy fuerte del ácido fítico. No fue posible determinar la T_m de la fitasa cuando el ácido fítico fue mayor que 150 mM, porque a esta concentración el ácido fítico interfería con la medición DSC de la fitasa.

Ejemplo 3: Calorimetría Diferencial de Barrido de Ronozyme P-CT

Para explorar la generalización de la estabilización del ácido fítico en otras fiasas, se realizó un experimento de DSC utilizando fitasa extraída del producto granular Ronozyme P-(CT) de DSM.

La enzima fitasa se extrajo del gránulo disolviéndolo en un tampón acetato de sodio de pH 5,5 a una concentración de 10 gramos de sólidos de gránulo por 100 gramos de tampón durante 1 hora. Luego, este material se filtró a través de un filtro de 0,20 micras y luego se intercambié el tampón 5 veces utilizando un tampón acetato de sodio pH 5,5 y un tubo Centricon® con un límite de peso molecular de 10 K. La concentración de proteína total se midió utilizando un ensayo tipo Lowry en un analizador químico automatizado Konelab®.

En la Figura 5 se observa un tipo similar de estabilización (aumento de la T_m) en presencia de ácido fítico al que se observó anteriormente con BP17.

La T_m más alta probablemente se debe a que esta fitasa es una secuencia enzimática diferente a la BP17 de los ejemplos anteriores. El efecto del ácido fítico sobre la T_m es similar al de la fitasa BP17 y las pendientes parecen similares.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLG YITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
YVWTDVAQR TLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSM DKTQVQQAVE
KEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNT
TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMP
QAAWGNHSEQE WALLKLHNV
YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNP NATESKLDPISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRW
TLPGQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVV
SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 2

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLG YITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
YVWTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE
KEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNT
TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMP
QAAWGNHSEQEWALLKLHNV
YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRW
TLPQQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVV
SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 3

5

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLG YITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILPRGSCPTPNSI
YVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE
KEAQTPIDNLNQRYIPELALMNT
ILNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQ
VAWGNHSEQEWALLKLHNV
YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRW
TLPQQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSGVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVV
SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 4

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLG YITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
YVWADVDQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE
KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNT
TLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNKVALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQ
AAWGNHSEQEWASLLKLHNV
QFDLMARTPYIARHNGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMR
WTLPQQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVV
SQSVEPGCQLQ

10

15

SEQ ID NO: 5 (E121T)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLG YITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLT KADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

20

SEQ ID NO: 6 (P394N)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLG YITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYC NLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 7 (D386N)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLGYYTPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMCKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEGEWALLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

5 SEQ ID NO: 8 K202N y N204T)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLGYYTPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMCKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPSKLSINDTIGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEGEWALLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

10 SEQ ID NO: 9 (Q151N y P153S)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLGYYTPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMCKTQVQQAVEKEANTSIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEGEWALLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 10 (P373T)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLGYYTPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMCKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEGEWALLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVMVYQTLEQLRSQTPLSLNQTAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

20 SEQ ID NO: 11 (Q76N)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWVPVKLGYYTPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSNIGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMCKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEGEWALLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

25 SEQ ID NO: 12

MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYA

REIVINDICACIONES

1. Una composición de gránulos que comprende ácido fítico y fitasa, en donde la fitasa y el ácido fítico están en capas de recubrimiento adyacentes de un gránulo multicapa, o la fitasa está en el núcleo del gránulo y el ácido fítico está en la capa de recubrimiento adyacente, en donde el ácido fítico es al menos 10 milimolal en dicha composición, y en donde el ácido fítico se selecciona de hexafosfato de inositol, pentafofosfato de inositol, tetrafosfato de inositol, trifosfato de inositol, difosfato de inositol y monofosfato de inositol, o sales o mezclas de los mismos.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido fítico puede ser al menos 20 milimolal, al menos 30 milimolal, al menos 50 milimolal, al menos 80 milimolal o al menos 100 milimolal, y puede, por ejemplo, estar presente en no más de 500 milimolal, 400 milimolal, 300 milimolal, 200 milimolal, 150 milimolal o 100 milimolal.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el ácido fítico es 10-100 milimolal, 20-90 milimolal, 30-80 milimolal o 40-70 milimolal.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la actividad recuperada de la fitasa es al menos 15 %, al menos 17 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 23 %, al menos 25 %, al menos 27 % o al menos 30 % mayor, después de mezclar el gránulo con al menos un ingrediente de alimento o alimento para animales y peletizar la mezcla resultante con tratamiento con vapor, en comparación con una fitasa de control no estabilizada por ácido fítico.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la fitasa es fitasa BP17.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la fitasa es fitasa BP17 producida en una célula huésped de *Trichoderma* que comprende una delección del gen de endo-N-acetil glucosaminidasa.
7. Una composición de pélet que comprende una composición de gránulos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un método para producir un alimento o alimento para animales tratado térmicamente, que comprende las etapas de:
mezclar una composición de gránulos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con al menos un ingrediente alimentario o de alimento para animales; y
peletizar la mezcla resultante con vapor.

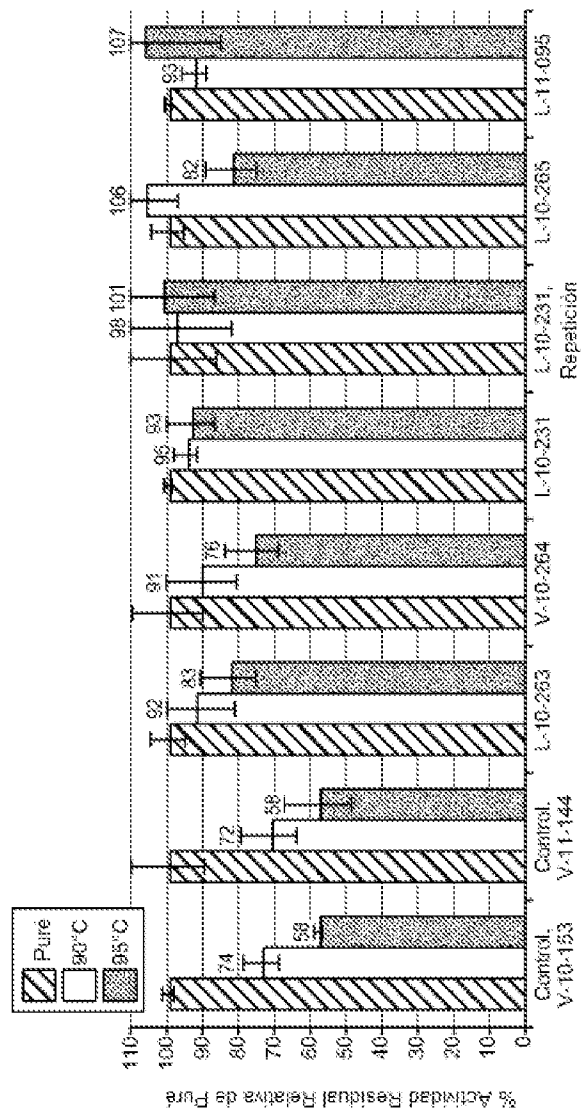
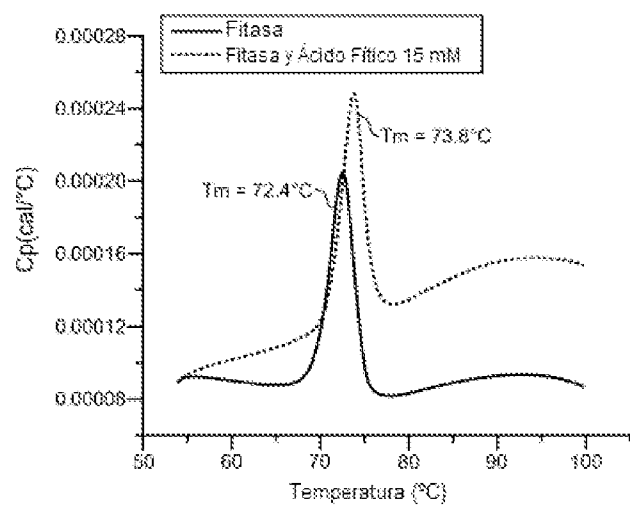
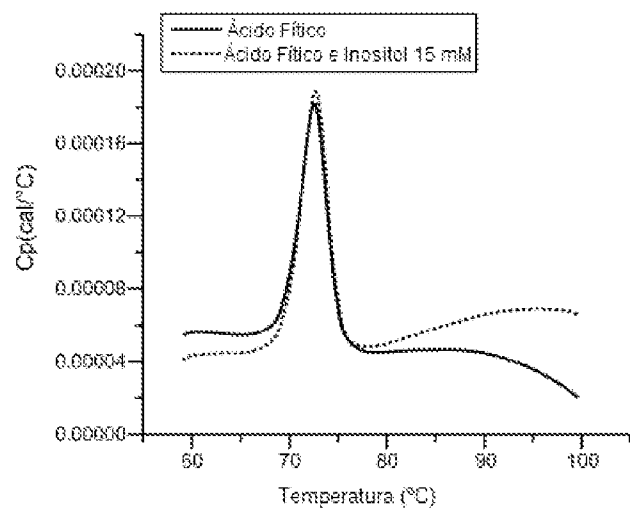


FIG. 1

**FIG. 2****FIG. 3**

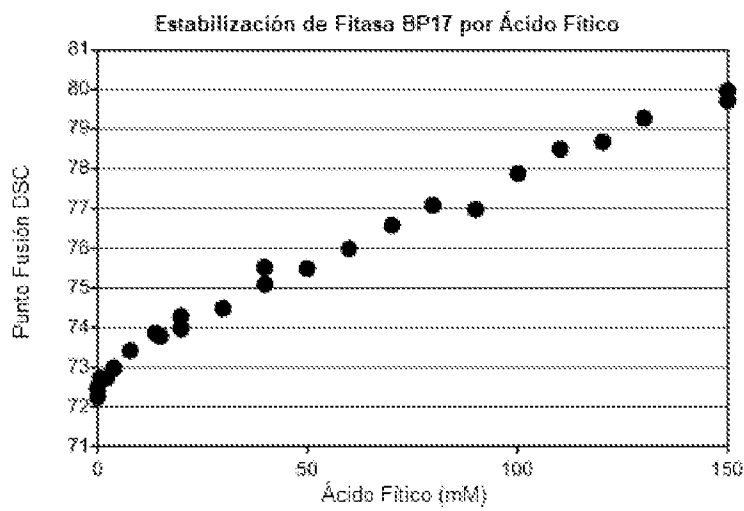


FIG. 4

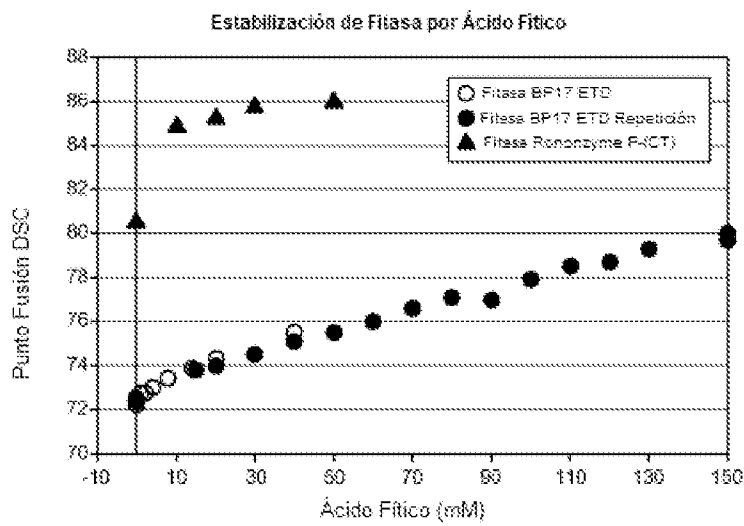


FIG. 5