

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 500**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2013 PCT/US2013/024395**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13119468**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2013 E 13705655 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2811844**

54 Título: **Método para la mejora de la estabilidad de fitasa con ácido fítico, y composiciones que comprenden fitasa y ácido fítico**

30 Prioridad:

07.02.2012 US 201261595923 P

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

18.12.2020

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US**

72 Inventor/es:

GEBERT, MARK S.

74 Agente/Representante:

FLORES DREOSTI, Lucas

ES 2 799 500 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

Método para la mejora de la estabilidad de fitasa con ácido fítico, y composiciones que comprenden fitasa y ácido fítico

CAMPO TÉCNICO

5 **[0001]** La presente información dada a conocer también se refiere a métodos para la estabilización de fitasa con ácido fítico. La presente información dada a conocer también se refiere a composiciones, gránulos, pellets y soluciones enzimáticas que comprenden fitasa y ácido fítico. Asimismo, la presente información dada a conocer se refiere a métodos de fabricación de composiciones que comprenden fitasa y ácido fítico; métodos de mejora de la estabilidad, incluida la termoestabilidad, de fitasa; métodos de mejora de la actividad recuperada de fitasa; y métodos para la producción de pellets de pienso para animales o alimentos tratados térmicamente. La presente información dada a
10 conocer también se refiere a métodos de utilización de composiciones, gránulos, pellets, composiciones de mejora de pellets y soluciones enzimáticas de la presente información dada a conocer para producir pellets de pienso para animales o alimentos tratados térmicamente.

ANTECEDENTES

15 **[0002]** El uso de agentes activos, como enzimas, en alimentos y pienso para animales es común. Se sabe que las enzimas mejoran la digestibilidad del alimento o pienso para animales, reducen los factores antinutricionales en el alimento y el pienso para animales, y mejoran la productividad animal.

[0003] Al compararse con las mezclas de pienso seco, los pellets de pienso tienen propiedades preferidas por la industria, como mejor calidad del pienso, disminución de patógenos, niveles más bajos de polvo durante la fabricación, buena manipulación y dosificación de ingredientes más uniforme.

20 **[0004]** La inactivación de enzimas puede producirse durante los procesos industriales de alimentos y pienso (como peletización), mediante, por ejemplo, tratamiento térmico, alta presión, tensión de cizalladura y tratamiento químico (como pH, tensioactivo y solventes). La inactivación es al menos parcialmente reversible si la enzima se reactiva después del procesamiento, por ejemplo, al enfriarse después del tratamiento a vapor y la peletización; la inactivación es irreversible si la actividad catalítica no se reanuda después del procesamiento, por ejemplo, al enfriarse después del
25 tratamiento a vapor y la peletización. En general, la inactivación irreversible y la actividad reducida de una enzima no son deseables en procesos como la peletización.

[0005] Los 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 de pienso calentados a vapor, o pulpa acondicionada, a través de una matriz. Las temperaturas del
30 proceso de peletización pueden ir de aproximadamente 70 °C a 95 °C, o superior.

[0006] 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 a menudo se reduce considerablemente durante el procesamiento y el posterior almacenamiento. Este problema se ilustra mediante el hecho de que las enzimas del pienso se proporcionan a menudo en la industria como productos líquidos estabilizados que se pulverizan sobre pellets de pienso después del proceso de peletización para evitar la inactivación enzimática. Es difícil conseguir una dosificación homogénea cuando la enzima se aplica después de la peletización, por ejemplo, pulverizando la enzima sobre los pellets, y el coste del equipo para añadir enzimas después de la peletización es elevado. De manera alternativa, se pueden añadir formulaciones enzimáticas líquidas, o formulaciones enzimáticas de mezcla seca, al mezclador antes de la peletización. En algunos casos, se pueden añadir niveles de enzimas más altos de lo necesario
40 para compensar las pérdidas durante la peletización.

[0007] En las industrias de alimentación y piensos se necesitan gránulos enzimáticos estables y duraderos que sirvan como componentes en las formulaciones que se someten a procesos de peletización por tratamiento a vapor sin una pérdida apreciable de actividad enzimática.

45 **[0008]** Los enfoques para evitar el problema de la inactivación de las enzimas de forma irreversible o la reducción de 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 enzimas conocidas.

[0009] Klibanov, 1983, (Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation, Advances in Applied Microbiology, volumen 29, página 1-28) da a conocer que existen tres medios básicos para la estabilización de enzimas: (1) inmovilización, (2) modificación química y (3) inclusión de aditivos. Sin embargo, Klibanov (1983) da a conocer además que cualquiera de estos métodos podría dar lugar a la estabilización o desestabilización, o no tener ningún efecto.
50

[0010] 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 cambia el equilibrio de despliegue y disminuye la concentración de los estados desplegados de la enzima.

- [0011] EP0969089 da a conocer que las sustituciones de aminoácidos pueden afectar a la estabilidad de la fitasa, teniendo algunas un efecto estabilizador y otras un efecto desestabilizador, y algunas sustituciones de aminoácidos no tienen ningún efecto.
- 5 [0012] El ácido fítico (o fitato cuando se encuentra en forma de sal) se encuentra en muchos tejidos vegetales, especialmente salvado, semillas y cereales. Los animales monogástricos, como cerdos, aves de corral, peces y el ser humano, digieren mal el fósforo fitato debido a que carecen, o tienen niveles bajos de, enzima digestiva fitasa en el intestino.
- [0013] EP0619369 y US5554399 dan a conocer composiciones enzimáticas que comprenden una fitasa y una fosfatasa ácida y el uso de la composición enzimática en alimentos, piensos peletizados y forraje.
- 10 [0014] WO2004071218 da a conocer un aumento en la cantidad de minerales en un alimento. WO2004071218 da a conocer una preparación que comprende una fitasa activa, un fitato y un catión esencial. WO2004071218 da a conocer que la preparación puede añadirse a cualquier producto alimenticio o de bebida para el consumo humano o a condimentos como el curry en polvo.
- 15 [0015] WO03/037102 da a conocer métodos para mejorar el valor nutricional de los alimentos que contienen mio-inositol hexakisfosfato proporcionando el alimento en combinación con una fitasa expresada en levadura.
- [0016] EP0420428 da a conocer un método para el tratamiento de la artritis reumatoide mediante el uso de una mezcla de ácido fítico, una sal de 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 de fitato puede adsorberse sobre un portador sólido para su administración. Para la administración oral, la composición comprende además una enzima desfosforilante como una fitasa.
- 20 [0017] US4952396 da a conocer un método para la inhibición del crecimiento tumoral mediante la administración de un compuesto seleccionado de entre el grupo consistente en un ácido fítico, una sal de fitato, un isómero o hidrolizado de ácido fítico (incluyendo inositol) o una sal de fitato, o una mezcla de cualquier combinación de estos. El ácido fítico o la sal de fitato puede adsorberse sobre un portador sólido para su administración. Para la administración oral, la composición comprende además una enzima desfosforilante como una fitasa.
- 25 [0018] US5112814 da a conocer un método para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson mediante la administración de un compuesto seleccionado de entre el grupo consistente en un ácido fítico, una sal de fitato, un isómero o hidrolizado de ácido fítico (incluyendo inositol) o una sal de fitato, o una mezcla de cualquier combinación de estos. El ácido fítico o la sal de fitato puede adsorberse sobre un portador sólido para su administración. Para la administración oral, la composición puede coadministrarse con una enzima que hidroliza grupos fosfato como fitasa.
- 30 [0019] US4758430 da a conocer un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un compuesto seleccionado de entre el grupo consistente en un ácido fítico, una sal de fitato, un isómero o hidrolizado de ácido fítico o una sal de fitato, o una mezcla de cualquier combinación de estos. El ácido fítico o la sal de fitato puede adsorberse sobre un portador sólido para su administración. Para la administración oral, la composición comprende además una enzima desfosforilante como una fitasa.
- 35 [0020] EP0969089 da a conocer una formulación de enzima estabilizante que comprende fitasa y uno o más agentes estabilizantes seleccionados de entre el grupo 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, EP0969089 da a conocer que esa fitasa puede estabilizarse mediante reticulación con glutaraldehído o mediante oxidación con peryodato sódico y reacción con ácido adípico dihidrazida.
- 40 [0021] 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.
- [0022] WO9316175 da a conocer una formulación de fitasa líquida estabilizada mediante la adición de urea y/o un poliol como sorbitol y glicerol, y aplicada a un producto de peso peletizado. Las formulaciones líquidas estabilizadas de WO9316175 son más resistentes a la inactivación por calor de la actividad enzimática y pueden almacenarse durante periodos de tiempo más largos con una mejor retención de la actividad fitasa.
- 45 [0023] Casey, A y Walsh, G (Biochem. Soc. Trans. (2000) Vol. 28, parte I, página A42, resumen 73) describe un efecto estabilizador aparente del ácido fítico en la fitasa en el pienso para animales.
- [0024] Singh y Satyanarayana (Bioresource Technology, 2009; 100: 2046-2051) da a conocer la purificación y la caracterización de una fitasa de fosfatasa ácida de histidina (HAP) a partir del moho termófilo de *Sporotrichum thermophile*. Singh y Satyanarayana (2009) determinaron la termoestabilidad de la fitasa incubando la enzima a 60 °C y 80 °C a tampones de pH 3.0, 5.0 y 7.0. Singh y Satyanarayana (2009) determinaron el efecto de los estabilizantes glicerol, trehalosa, sorbitol y ácido fítico en la actividad enzimática a 80 °C.
- 50

[0025] WO 2006/043178 describe un polipéptido de fitasa obtenido de *Buttiauxella sp.*, p. ej., cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.*

5 [0026] La presente información dada a conocer pretende superar algunos de estos problemas. Por ejemplo, la presente información dada a conocer puede solucionar los problemas asociados al efecto de los procesos industriales de los alimentos y los piensos para animales en la fitasa.

SUMARIO

[0027] La invención proporciona un método para aumentar la estabilidad de fitasa en una composición de gránulos, comprendiendo el método la introducción de al menos 10 milimolal de ácido fítico a dicha composición, donde

(a) el gránulo comprende fitasa y ácido fítico pulverizados sobre un soporte sólido; y/o

10 (b) el gránulo es un gránulo multicapa y la fitasa y el ácido fítico se incorporan a la misma capa de dicho gránulo multicapa;

comprendiendo además el método la mezcla del gránulo con al menos un ingrediente alimentario o de pienso para animales y la peletización la mezcla resultante con tratamiento a vapor;

15 donde dicho ácido fítico se selecciona de entre inositol hexafosfato, inositol pentafosfato, inositol tetrafosfato, inositol trifosfato, inositol difosfato e inositol monofosfato, o sales o mezclas de estos; y

donde la actividad recuperada de la fitasa después de la peletización a vapor es al menos 15 %, al menos 17 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 23 %, al menos 25 %, al menos 27 %, al menos 30 %, al menos 32 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 42 %, o al menos 45 % superior a la actividad recuperada de una fitasa control no estabilizada por ácido fítico a una concentración de al menos 10 milimolal.

20 [0028] En algunos modos de realización, la fitasa es;

(a) fitasa BP17, opcionalmente fitasa BP17 producida en una célula huésped de *Trichoderma* que comprende una delección del gen de endo-N-acetilglucosaminidasa; o

(b) Ronozyme P-(CT).

[0029] En algunos modos de realización, el ácido fítico y la fitasa están en el núcleo de dicho gránulo multicapa.

25 [0030] En algunos modos de realización, el ácido fítico y la fitasa están en la misma capa de recubrimiento de dicho gránulo multicapa.

[0031] También se proporciona una composición de pellets producida por un método de la invención.

30 [0032] En la composición, el gránulo puede comprender un núcleo de sulfato sódico, donde el ácido fítico y la fitasa están incluidos en una capa que rodea el núcleo de sulfato sódico, donde la capa de ácido fítico y fitasa comprende almidón, sacarosa y aceite de colza, comprendiendo la composición además:

(a) un primer recubrimiento externo que comprende sulfato sódico y un segundo recubrimiento externo que comprende PVA y talco, o

(b) un primer recubrimiento externo que comprende PVA y talco, un segundo recubrimiento externo que comprende sacarosa y almidón, y un tercer recubrimiento externo que contiene PVA y talco.

35 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0033] La presente información dada a conocer se describirá por referencia a las siguientes figuras:

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

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

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

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

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

SECUENCIAS**[0034]**

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

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

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

10 SEQ ID NO: 4 = fitasa natural codificada por cepa P 1-29 de *Buttiauxella sp.* 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 aminoácidos adicional E121T.

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 12 = secuencia señal para la natural (SEQ ID NO: 4).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 **[0035]** La práctica de la presente información dada a conocer empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica y peletización de pienso para animales, que están dentro de la técnica. Estas técnicas se explican por completo en la literatura, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989);
25 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. In Feed Manufacturing Technology IV. (McElhiney, editor), American Feed Industry Association, Arlington, Va., pp. 110-139.

30 **[0036]** A menos que se definan de otra forma en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la materia a la que pertenece la presente información dada a conocer. Singleton, *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a un experto en la materia un diccionario general de muchos de los términos utilizados en la presente exposición. En la práctica o las pruebas de la presente información dada a conocer puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento.

35 **[0037]** Los intervalos numéricos proporcionados en el presente documento incluyen los números que definen el intervalo.

[0038] Salvo que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos están escritos de izquierda a derecha en una orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en una orientación de amino a carboxi, respectivamente.

40 Definiciones

[0039] Como se utiliza en el presente documento, el término «ácido fítico» se refiere a inositol hexafosfato (IP6), pero como el IP6 generalmente no existe en la forma pura, el término también abarca inositol fosfatos que son catabolitos de IP6, incluidos inositol pentafofosfato (IP5), inositol tetrafosfato (IP4), inositol trifosfato (IP3), inositol difosfato (IP2) e inositol monofosfato (IP1), sales de estos y mezclas de estos. El término «ácido fítico» no se refiere al inositol, el
45 producto completamente hidrolizado del ácido fítico (IP0). Por lo tanto, el término «ácido fítico» abarca catabolitos, producto de hidrólisis, sales y análogos (p. ej., ésteres y sales). Como se utiliza en el presente documento, los términos IP6, IP5, IP4, IP3, IP2, IP1, y sales de estos, se refieren a cualquier isómero de ese inositol fosfato concreto.

[0040] Aunque IP6, IP5, IP4, IP3, IP2, e IP1 en forma de sal, se denominan habitualmente «fitatos», como se utiliza en el presente documento, el término «ácido fítico» también incluye dichos fitatos. El contraión del fitato es normalmente sodio (como fitato sódico). Sin embargo, el contraión puede ser, por ejemplo, calcio, magnesio, hierro o zinc.

5 **[0041]** Por consiguiente, el término «ácido fítico» como se utiliza en el presente documento incluye referencias a la forma de ácido y la forma de sal del ácido fítico. En determinados modos de realización, el ácido fítico es la forma de ácido o combinaciones de formas de ácido. En determinados modos de realización, el ácido fítico es la forma de sal o combinaciones de formas de sal. En determinados modos de realización, el ácido fítico es una combinación de la forma de ácido (o combinaciones de formas de ácido) y la forma de sal (o combinaciones de formas de sal).

[0042] Como se utiliza en el presente documento, el término «milimolal» se utiliza tanto para líquidos como para sólidos.

10 **[0043]** El término «milimolal» para soluciones (líquidos) se utiliza en el presente documento según se define en la literatura científica, es decir, la molalidad de una solución se define como la cantidad de moles de un constituyente (que en el presente documento es ácido fítico) dividida por la masa del solvente en kilogramos (que en el presente documento es todo en la solución que no sea ácido fítico). Por lo tanto, 1 000 milimolal es equivalente a 1 molal.

15 **[0044]** El término «milimolal» para sólidos en el presente contexto se define como la cantidad de ácido fítico (en milimoles) dividida por la masa de solvente del sólido (p. ej., la capa enzimática de un gránulo), donde el solvente se define como los sólidos diferentes de ácido fítico (como en la capa enzimática de un gránulo que comprende fitasa y ácido fítico).

20 **[0045]** Un «pienso» y un «alimento», respectivamente, se refieren a cualquier dieta, comida o similar, natural o artificial, o componentes de dichas comidas, destinados o adecuados para que los coma, ingiera o digiera un animal no humano y un ser humano, respectivamente.

[0046] Como se utiliza en el presente documento, el término «alimento» se utiliza en un sentido amplio, y cubre alimentos y productos alimenticios para humanos, así como alimentos para animales no humanos (es decir, un pienso).

25 **[0047]** El término «pienso» se utiliza con referencia a los productos con los que se alimenta a los animales en la cría de ganado. Los términos «pienso» y «pienso para animales» se utilizan indistintamente. En un modo de realización, el alimento o pienso es para el consumo de no rumiantes y rumiantes. Algunos ejemplos de rumiantes incluyen vacas, ovejas, cabras y caballos. Algunos ejemplos de animales no rumiantes incluyen animales monogástricos como cerdos, aves de corral (como pollos y pavos), peces (como el salmón), perros, gatos y humanos.

30 **[0048]** El alimento o pienso puede encontrarse en forma de solución o como un sólido, en función del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración. En algunos modos de realización, las enzimas mencionadas en el presente documento pueden utilizarse como, o en la preparación o producción de, una sustancia de pienso o alimento.

35 **[0049]** Como se utiliza en el presente documento, el término «ingrediente alimentario o de pienso» incluye una formulación, que se añade o puede añadirse a alimentos o productos alimenticios e incluye formulaciones que pueden utilizarse a niveles bajos en una amplia variedad de productos. El ingrediente alimentario puede encontrarse en forma de solución o como un sólido, dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración. Las enzimas descritas en el presente documento pueden utilizarse como un ingrediente alimentario o de pienso o en la preparación o producción. Las enzimas pueden ser suplementos alimenticios, o pueden añadirse a estos.

40 **[0050]** Las composiciones para pienso para animales monogástricos incluyen normalmente una composición que comprende productos vegetales que contienen fitato. Dichas composiciones 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 el presente documento pueden ser, o pueden añadirse a, alimentos o sustancias y composiciones para piensos.

45 **[0051]** Como se utiliza en el presente documento, el término «secuencia de aminoácidos» es sinónimo de los términos «polipéptido», «proteína» y «péptido», y se utilizan indistintamente. En los casos en los que dichas secuencias de aminoácidos muestran actividad, se puede hacer referencia a estas como una «enzima». Se emplean los códigos convencionales de una letra o de tres letras para los residuos de aminoácidos, estando presentes las secuencias de aminoácidos en la orientación habitual amino-carboxi terminal (es decir, N→C).

50 **[0052]** El término «ácido nucleico» abarca ADN, ARN, heterodúplex, y moléculas sintéticas capaces de codificar un polipéptido. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y pueden ser modificaciones químicas. Los términos «ácido nucleico» y «polinucleótido» se utilizan indistintamente. Dado que el código genético está degenerado, se puede utilizar más de un codón para codificar un aminoácido concreto, y las presentes composiciones y métodos abarcan secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos concreta. A no ser que se indique lo contrario, las secuencias de ácidos nucleicos se presentan en orientación 5' a 3'.

[0053] Por «homólogo» se entenderá una entidad que tenga un grado especificado de identidad con las secuencias de aminoácidos objeto y las secuencias de nucleótidos objeto. Una secuencia homóloga ha de incluir una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un

92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o incluso un 99 % idéntica a la secuencia objeto, utilizando la herramienta de alineamiento de secuencias convencional Clustal V con parámetros por defecto. Normalmente, los homólogos incluirán los mismos residuos de sitio activo que la secuencia de aminoácidos objeto, aunque puede incluir cualquier número de sustituciones conservadoras de aminoácidos. En la siguiente tabla de sustituciones conservadoras de aminoácidos se enumeran sustituciones conservadoras de aminoácidos de ejemplo.

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Para el aminoácido	Código	Reemplazar por cualquiera de entre
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-fenilprolina
Prolina	P	D-Pro, L-l-tioazolidina-4-ácido carboxílico, D-o L-1-oxazolidina-4-ácido carboxílico
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-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

- [0054]** Como se utiliza en el presente documento, el término «fitasa» se refiere a una proteína o polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico, incluido el fitato/ácido fítico, y de liberar fosfato inorgánico. Se analizan fitasas ilustrativas y se hace referencia a ellas a lo largo de la presente información dada a conocer, e incluye fitasa de *E. Coli* (Patente estadounidense 6,110,719), y las obtenidas de cualquiera de una variedad de fuentes, incluyendo *Ascomycetes*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces*, *Humicola*, *Basidiomycetes*, *Bacillus subtilis*, y *Schwanniomycetes occidentalis*. Además del fitato, algunas fitasas pueden hidrolizar al menos algunos de los inositol fosfatos de grados de fosforilación intermedios. En un modo de realización, la enzima activa producida o modificada en la presente información dada a conocer es una 6-fitasa. La 6-fitasa también se denomina «4-fitasa» o «fitato 6-fosfatasa». Fitasas adicionales incluyen fitasas ácidas de histidina (HAP), que es un grupo que comprende elementos encontrados de entre procariotas (p. ej. appA fitasa de *Escherichia coli*) y eucariotas (phyA y B de *Aspergillus* sp., fitasas de HAP de levadura y plantas. Las fitasas de HAP comparten un motivo de sitio activo común RHGXRP, en el extremo N-terminal y un motivo de HD en el extremo C-terminal en sus secuencias de ADN.
- [0055]** Las presentes fitasas 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. Por lo general, las formas maduras de los polipéptidos son las más útiles. A menos que se indique lo contrario, la numeración de residuos de aminoácidos empleada en el presente documento se refiere a las formas maduras de los respectivos polipéptidos de fitasa. Los presentes polipéptidos de amilasa también pueden truncarse para eliminar los N o C-terminales, siempre que los polipéptidos resultantes retengan la actividad de la fitasa.

[0056] Los términos «natural», «parental» o «de referencia», con respecto a un polipéptido, se refieren a un polipéptido de origen natural que no incluye una sustitución, inserción o delección sintética en una o más posiciones de aminoácidos. De forma similar, los términos «natural», «parental» o «de referencia», con respecto a un polinucleótido, se refieren a un polinucleótido de origen natural que no incluye un cambio de nucleósidos sintético. No obstante, nótese que un polinucleótido que codifica un polipéptido natural, parental o de referencia no está limitado a un polinucleótido de origen natural, y abarca cualquier polinucleótido que codifique el polipéptido natural, parental o de referencia.

[0057] El término «variante», con respecto a un polipéptido, se refiere a un polipéptido que difiere de un polipéptido específico natural, parental o de referencia en cuanto a que este incluye una sustitución, inserción o delección sintética en una o más posiciones de aminoácidos. Del mismo modo, el término «variante», con respecto a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que difiere en cuanto a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido específico natural, parental o de referencia. La identidad del polipéptido o polinucleótido natural, parental o de referencia resultará evidente a partir del contexto.

[0058] Un «vector» se refiere a una secuencia de polinucleótidos diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos de células. Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera, plásmidos, partículas de fago, casetes y similares.

[0059] Un «vector de expresión» se refiere a un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés, cuya secuencia de codificación está ligada de forma operativa a una secuencia control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en un huésped adecuado. Dichas secuencias control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifique sitios de unión del ribosoma adecuados en el ARNm, potenciadores y secuencias que controlen la terminación de la transcripción y la traducción.

[0060] Como se utiliza en el presente documento, el término «expresión» se refiere al proceso por el cual se produce un polipéptido en función de una secuencia de ácido nucleico. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

[0061] Un «promotor» se refiere a una secuencia reguladora que interviene 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 limitativo de un promotor inducible que se puede utilizar es *cbh1* de *Trichoderma reesei*, que es un promotor inducible.

[0062] El término «ligado/a(s) de forma operativa» significa que los componentes específicos se encuentran relacionados (incluyendo, sin carácter limitativo, mediante yuxtaposición), permitiéndoles funcionar de una forma prevista. Por ejemplo, una secuencia reguladora está ligada de forma operativa a una secuencia de codificación si la expresión de la secuencia de codificación está controlada por las secuencias reguladoras.

[0063] Una «cepa huésped» o «célula huésped» es un organismo en el que se ha introducido un vector de expresión, fago, virus, u otro constructo de ADN, entre los que se incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una fitasa). Algunas cepas huésped de ejemplo son *Trichoderma sp.* El término «célula huésped» incluye los protoplastos creados a partir de células.

[0064] El término «recombinante», cuando se utiliza con referencia a una célula, ácido nucleico, proteína, o vector objeto, indica que el sujeto se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula se deriva de una célula modificada de dicha forma. En consecuencia, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos a distintos niveles o en condiciones distintas de las que se hallan en la naturaleza.

[0065] Una «secuencia señal» (también denominada «presecuencia», «péptido señal», «secuencia líder» o «péptido líder», se refiere a una secuencia de aminoácidos unida en la parte 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 dirige al 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 escinde durante el proceso de secreción.

[0066] Un «marcador selectivo» o «marcador de selección» se refiere a un gen capaz de ser expresado en un huésped para facilitar la selección de células huésped portadoras del gen. Entre los ejemplos de marcadores de selección se incluyen, sin carácter limitativo, sustancias antimicrobianas (p. ej., higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, como una ventaja nutricional, en la célula huésped. El término «derivado/a/os/as de» abarca los términos «originado/a/os/as de», «obtenido/a/os/as de», «que se puede(n) obtener de», «aislado/a/os/as de» y «creado/a/os/as a partir de».

[0067] El término «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 la presente información dada a conocer son distintos morfológica, fisiológica y genéticamente de las levaduras. El crecimiento vegetativo por hongos filamentosos se realiza mediante elongación de las hifas y el catabolismo de carbono es aeróbico obligatoriamente. En la presente información dada a conocer, la célula parental de hongo filamentoso puede ser una célula de una especie de *Trichoderma*, p. ej., *Trichoderma reesei* (anteriormente clasificada como *T. longibrachiatum* y conocida también actualmente como *Hypocrea jecorina*), *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, o *Trichoderma harzianum*. Algunos hongos filamentosos adicionales incluyen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Chryso sporium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Neurospora*, *Myceliophthora*, o formas sexuales alternativas de estos como *Emericella*, *Hypocrea*.
- [0068]** El término «cultivo» se refiere al crecimiento de una población de células microbianas en condiciones adecuadas para el crecimiento, en un medio líquido o sólido.
- [0069]** El término «heterólogo/a(s)», en referencia a un polinucleótido o proteína, se refiere a un polinucleótido o proteína que no está presente de forma natural en una célula huésped.
- [0070]** El término «endógeno/a(s)», en referencia a un polinucleótido o proteína, se refiere a un polinucleótido o proteína que está presente de forma natural en la célula huésped.
- [0071]** Como se utiliza en el presente documento, los términos «transformado/a(s)», «transformado/a(s) de forma estable» y «transgénico/a(s)», utilizados en referencia a una célula significan que la célula contiene una secuencia de ácido nucleico no nativa (p. ej., heteróloga) integrada en su genoma o portada como un episoma que se mantiene a través de múltiples generaciones.
- [0072]** El término «introducido/a(s)» en el contexto de la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula significa «transfección», «transformación» o «transducción», como se conoce en la técnica.
- [0073]** Los términos «aislado/a(s)» y «separado/a(s)» se refieren a un compuesto, proteína (polipéptidos), célula, ácido nucleico, aminoácido u otro material o componente especificado que se elimina de al menos un otro material o componente al que se asocia de forma natural como se halla en la naturaleza.
- [0074]** Como se utiliza en el presente documento, el término «purificado/a(s)» se refiere al material (p. ej., un polipéptido o polinucleótido aislado) que se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 90 % puro, al menos aproximadamente 95 % puro, al menos aproximadamente 98 % puro, o incluso al menos aproximadamente 99 % puro.
- [0075]** Como se utiliza en el presente documento, los términos «modificación» y «alteración» se utilizan indistintamente y significan cambiar o variar. En el contexto de la modificación o alteración de un polipéptido, estos términos pueden significar cambiar la secuencia de aminoácidos, ya sea de forma directa o al cambiar el ácido nucleico codificante, o cambiar la estructura del polipéptido, por ejemplo, al glicosilar la enzima.
- [0076]** El término «glicosilación» como se utiliza en el presente documento se refiere a la unión de glicanos a moléculas, por ejemplo, a proteínas. La glicosilación puede ser una reacción enzimática. La unión formada puede ser a través de enlaces covalentes. La expresión «altamente glicosilado/a(s)» se refiere a una molécula, como una enzima, que está glicosilada en todos, o prácticamente todos, los sitios de glicosilación disponibles, por ejemplo, sitios de glicosilación enlazados a N.
- [0077]** El término «glicano» como se utiliza en el presente documento se refiere a un polisacárido u oligosacárido, o la sección de carbohidratos de un glicoconjugado, como una glicoproteína. Los glicanos pueden ser homo o heteropolímeros de residuos de monosacáridos, Pueden ser moléculas lineales o ramificadas.
- [0078]** Como se utiliza en el presente documento, el término «soporte sólido» se refiere a un material sólido inerte sobre el que se pulveriza la fitasa y el ácido fítico. De manera opcional, también se pueden pulverizar sobre el soporte sólido otros materiales, como enzimas, agentes solubles en agua, agentes dispersables y otros componentes adecuados para gránulos. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, sin carácter limitativo, sulfato sódico, sulfato de magnesio, sacarosa granulada, *nonpareils* de almidón-sacarosa (ASNP) y maltodextrina.
- [0079]** Como se utiliza en el presente documento, el término «gránulo» se refiere a un núcleo que puede tener o no capa(s) de recubrimiento.
- [0080]** Como se utiliza en el presente documento, el término «gránulo multicapa» se refiere a una composición que comprende un núcleo y al menos una capa de recubrimiento.
- [0081]** El término «núcleo» como se utiliza en el presente documento es intercambiable con el término «semilla».
- [0082]** El término «capa de recubrimiento» y «capa» como se utilizan en el presente documento son intercambiables. La(s) capa(s) de recubrimiento generalmente encapsulan el núcleo para formar una capa sustancialmente continua de manera que la superficie del núcleo presente pocas zonas sin recubrir o ninguna. Los materiales (p. ej., los agentes,

componentes y enzimas detallados en el presente documento) utilizados en el gránulo y/o el gránulo multicapa son adecuados para su uso en alimentos y/o piensos para animales. Los materiales pueden ser de uso alimentario o de uso para pienso de animales.

5 **[0083]** El término «capa de recubrimiento externa» como se utiliza en el presente documento se refiere a la capa de recubrimiento del gránulo multicapa más alejada del núcleo (es decir, la última capa de recubrimiento que se aplica).

[0084] Como se utiliza en el presente documento, el término «capa de recubrimiento enzimática» se refiere a una capa enzimática que comprende al menos una enzima. En algunos modos de realización, la capa enzimática comprende al menos dos enzimas. En algunos modos de realización, la capa enzimática comprende al menos tres enzimas.

10 **[0085]** «NCIMB» es el nombre de un depósito de organismos ubicado en Aberdeen, Escocia, llamado The National Collection of Industrial, food, and Marine Bacteria (Colección nacional de bacterias industriales, alimentarias y marinas).

15 **[0086]** Como se utiliza en el presente documento, los términos «pellets» y «peletización» se refieren a comprimidos o pellets sólidos, redondos, esféricos y cilíndricos y los procesos para formar dichas formas sólidas, en concreto pellets para pienso y pienso para animales sólido extrudido. Los procesos conocidos de fabricación de pellets de alimentos y piensos para animales incluyen en general mezclar ingredientes alimentarios o de piensos para animales desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente, transferir la mezcla resultante a un recipiente de descarga, transportar la mezcla a un acondicionador de vapor, transferir opcionalmente la mezcla acondicionada con vapor a un expansor, transferir la mezcla al molino de pellets o extrusora, y transferir finalmente los pellets a un refrigerador de pellets. Fairfield, D. 1994. Capítulo 10, Pelleting Cost Center. In Feed Manufacturing Technology IV. (McElhiney, editor), American Feed Industry Association, Arlington, Va., pp. 110-139.

20 **[0087]** Como se utiliza en el presente documento, el término «pellets de alimentos o pienso para animales tratado térmicamente» se refiere a mezclas no peletizadas que se someten a un tratamiento térmico (como acondicionamiento con vapor), normalmente a una temperatura de al menos 90 °C durante al menos 30 segundos (como, por ejemplo, 30 segundos a 90 °C y/o 30 segundos a 95 °C). La mezcla puede extrudirse entonces para formar los pellets de pienso para animales.

25 **[0088]** Como se utiliza en el presente documento, el término «estabilidad» se refiere a cualquiera de una variedad de efectos en los que se mantiene o se mejora de forma beneficiosa la actividad enzimática u otra propiedad funcional de una enzima de fitasa. Una fitasa puede exhibir estabilidad al mostrar cualquiera de entre «actividad recuperada», «termoestabilidad» y/o «reversibilidad de inactividad».

30 **[0089]** Como se utiliza en el presente documento, el término «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 solvente(s) y tensión mecánica), con respecto a (ii) la actividad de la fitasa antes del tratamiento. La actividad recuperada puede expresarse como un porcentaje.

[0090] El porcentaje de actividad recuperada se calcula de la siguiente manera:

$$35 \quad \% \text{ actividad recuperada} = \left(\frac{\text{actividad después tratamiento}}{\text{actividad antes tratamiento}} \right) \times 100 \%$$

40 **[0091]** En el contexto de los experimentos de peletización, la «actividad antes del tratamiento» puede aproximarse al medir la actividad de fitasa presente en la pulpa que no se somete a tratamiento de una forma que se corresponde de otra manera con la fitasa que se somete a tratamiento. Por ejemplo, la fitasa en la pulpa sin tratar se manipula y se almacena durante un tiempo similar y en unas condiciones similares a la fitasa en la pulpa tratada, para controlar las posibles interacciones u otros efectos fuera del tratamiento especificado *per se*.

45 **[0092]** Como se utiliza en el presente documento, el término «fitasa control» junto con una fitasa se refiere al mismo tipo de molécula de fitasa (p. ej., fitasa BP17) que a la que se le añade un agente estabilizante (p. ej., está presente ácido fítico), excepto que carece de agente estabilizante. Por ejemplo, en una muestra la fitasa BP17 se estabiliza con ácido fítico y en la muestra de fitasa control comparativa la única diferencia es que la fitasa BP17 no se ha estabilizado con ácido fítico, siendo dicha fitasa una «fitasa control».

50 **[0093]** Como se utiliza en el presente documento, una «unidad de actividad de fitasa» es la cantidad de enzima que puede liberar 1 μmol de fosfato por minuto. La actividad de fitasa se analiza según el método oficial 2000.12 de la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos), según 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. 2001 mayo-junio; 84(3):629-33. En resumen, las muestras trituradas se extraen en 220 mM de acetato de sodio trihidratado, 68,4 mM de cloruro cálcico dihidratado, Tween 20 al 0,01 %, pH 5,5. A continuación, se analiza el sobrenadante. El ensayo mide la liberación de fosfato inorgánico de la fitasa de arroz, a pH

5,5, durante 60 minutos a 37 °C. El ensayo se detiene con reactivo de molibdato/vanadato ácido, y se cuantifica el fosfato por la intensidad del complejo de color amarillo del vanadomolibodofósforo.

5 **[0094]** Como se utiliza en el presente documento, la temperatura de fusión (Tm) de la enzima puede medirse mediante técnicas conocidas en la técnica. Una técnica adecuada es la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Otras técnicas adecuadas para determinar temperaturas de fusión incluyen dispersión de luz, dicroísmo circular y experimentos de enzimología. La DSC es una técnica termoanalítica. Se utiliza para medir la cantidad de energía requerida para mantener la temperatura de una muestra a cualquier temperatura en un rango de temperatura. Conforme aumenta la temperatura probada, una muestra alcanza finalmente su temperatura de fusión. La temperatura de fusión Tm se observa como un pico endotérmico en el gráfico de DSC. Como se utiliza en el presente documento, el término «Tm de DSC» se refiere a la temperatura de fusión de la enzima medida por DSC a una frecuencia de barrido 90 °C/min y un pH de solución de 5,5.

15 **[0095]** El siguiente experimento hipotético se proporciona para ilustrar y explicar de manera adicional la terminología de la presente información dada a conocer. En el presente documento, las unidades de la tabla se representan por conveniencia 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 como BP17 carente 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 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 superior al 60 % ($80-50=30$; $30/50=0,6=60\%$) en comparación con la «fitasa control», es decir, la fitasa que no fue estabilizada por el ácido fítico. En algunos modos de realización, estas mejoras pueden acompañarse de mejoras en la termoestabilidad, por ejemplo, Tm medido por Tm de DSC. En algunos modos de realización, estas mejoras pueden acompañarse de mejoras en la reversibilidad de la inactividad (es decir, la capacidad de recuperar la actividad perdida después de un periodo de tiempo).

	Prepeletización	Pospeletización
Fitasa control (sin ácido fítico)	100 unidades de actividad de fitasa	50 unidades de actividad de fitasa
Fitasa estabilizada (con ácido fítico)	100 unidades de actividad de fitasa	80 unidades de actividad de fitasa

25 EJEMPLOS DE MODOS DE REALIZACIÓN

30 **[0096]** La presente información dada a conocer se refiere a la sorprendente observación de que la estabilización térmica de una enzima de fitasa después de la preincubación con exceso molar de su sustrato o su análogo de sustrato potencial da como resultado la estabilidad de la enzima. De forma más específica, la presente información dada a conocer establece que la estabilidad de la fitasa puede mejorarse al incluir ácido fítico en proximidad funcional a la fitasa. Asimismo, la presente información dada a conocer establece que un exceso de ácido fítico puede mejorar la estabilidad de la fitasa durante el procesamiento de alimentos y piensos para animales y puede dar lugar a pellets de alimentos y piensos para animales tratados térmicamente que presentan una actividad de fitasa mejorada.

Ácido fítico

35 **[0097]** En algunos modos de realización, el ácido fítico comprende el inositol fosfato no hidrolizado, IP6. Normalmente, las fuentes comerciales del ácido fítico no son IP6 puro. En algunos modos de realización, el ácido fítico es una mezcla de inositol fosfatos parcialmente hidrolizados (p. ej., IP6, IP5, IP4, IP3, IP2 e IP1). Por lo tanto, los tipos útiles de ácido fítico son catabolitos de ácido fítico, producto de hidrólisis, sales y análogos (p. ej., ésteres y sales). El inositol (el producto de ácido fítico totalmente hidrolizado - IPO) puede estar presente en la fuente de ácido fítico para utilizarse en la presente información dada a conocer, pero hemos descubierto que, bajo algunas condiciones, el inositol por sí mismo no estabiliza la fitasa. Por lo tanto, según la presente información dada a conocer, los inositol fosfatos son útiles para la estabilización de la fitasa en la composición de pienso o alimentos.

45 **[0098]** El ácido fítico para su utilización en la presente información dada a conocer puede sintetizarse químicamente. De forma adicional o alternativa, el ácido fítico para su utilización en la presente información dada a conocer puede estar presente en, o derivarse de, un alimento, pienso para animales o ingredientes de estos. El ácido fítico se encuentra en las cáscaras de frutos secos, semillas y granos. Las fuentes de ácido fítico incluyen, sin carácter limitativo, semillas de lino, semillas de sésamo, almendras, nueces de Brasil, cocos, cacahuets, nueces, maíz, avena, harina de avena, arroz, trigo, alubias, garbanzos, soja, tofu y patatas. Normalmente, el ácido fítico se obtiene de granos (como maíz, trigo o arroz) a través de extracción en agua.

50 **[0099]** El ácido fítico que se utiliza para estabilizar la fitasa es en adición a la cantidad de ácido fítico que puede estar presente de forma inherente en los ingredientes de un alimento o pienso para animales con el que se mezcla la fitasa (como en forma de un gránulo multicapa) antes de la peletización. En otras palabras, el ácido fítico que se utiliza para la

estabilización de la fitasa es una fitasa exógena; el ácido fítico presente en los ingredientes de un alimento o pienso para animales es un ácido fítico endógeno. Por consiguiente, la cantidad calculada superior a 10 milimolal de ácido fítico proporcionada por la presente información dada a conocer, y otros niveles de milimolal establecidos para la estabilización de la fitasa proporcionada por la presente información dada a conocer, no incluye trazas de ácido fítico endógeno.

Fitasa

[0100] Como se utiliza en el presente documento, el término «fitasa» significa una proteína o polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico, incluido el fitato y el ácido fítico, y de liberar fosfato inorgánico. Algunas fitasas además del fitato son capaces de hidrolizar al menos parte de los inositol fosfatos de grados de fosforilación intermedios.

[0101] El término «fitasa» puede ser una fitasa o una combinación de fitasas a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0102] Las enzimas de fitasa, como, por ejemplo, la 6-fitasa BP17 derivada de *Buttiauxella sp.*, se añaden a los alimentos y los piensos para animales para aumentar la disponibilidad del fosfato aumentando de esta manera el valor nutricional del producto. El procesamiento del alimento o pienso para animales, por ejemplo, con calor y presión alta, puede desnaturalizar la fitasa y reducir su actividad.

[0103] La fitasa utilizada en la presente información dada a conocer puede ser cualquier fitasa que sea adecuada para su utilización en alimentos o piensos para animales.

[0104] La enzima activa producida o modificada en la descripción actual es una fitasa, más en concreto, una 6-fitasa.

[0105] La 6-fitasa también se denomina «4-fitasa» o «fitato 6-fosfatasa». Fitasas adicionales incluyen fitasas ácidas de histidina (HAP), que es un grupo que comprende elementos encontrados de entre procariotas (p. ej. appA fitasa de *Escherichia coli*) y eucariotas (phyA y B de *Aspergillus sp.*, fitasas de HAP de levadura y plantas. Las fitasas de HAP comparten un motivo de sitio activo común, RHGXRX, en el extremo N-terminal y un motivo de HD en el extremo C-terminal en sus secuencias de ADN. Esto permite un mecanismo de dos etapas en la hidrólisis de los fosfomonoésteres. La phyA y la phyB de *A. niger* y la appA de *E. coli* son los representantes más caracterizados.

[0106] En un modo de realización, la fitasa es 6-fitasa, una fitasa de *E. coli*, una fitasa de *Aspergillus*, o una fitasa de Ronozyme (DSM Corporation).

[0107] En un modo de realización altamente preferido, la enzima activa que se ha de producir o modificar es BP17. BP17 es una variante de enzima de una fitasa de *Buttiauxella sp.* La secuencia para BP17 (excluyendo el péptido señal), que se utiliza como referencia para la numeración de la posición de los aminoácidos en todo el documento, se muestra como SEQ ID No. 1.

[0108] En otro modo de realización, la enzima activa que se ha de producir o modificar es BP11. BP11 es una variante de enzima de una fitasa de *Buttiauxella sp.* La secuencia para BP11 (excluyendo el péptido señal) se muestra como SEQ ID No. 2.

[0109] En otro modo de realización, la enzima activa que se ha de producir o modificar es BP111. BP111 es una variante de enzima de una fitasa de *Buttiauxella sp.* La secuencia para BP111 (excluyendo el péptido señal) se muestra como SEQ ID No. 3.

[0110] Todas estas fitasas son variantes de la secuencia natural, como la derivada de la cepa P 1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248, con la secuencia mostrada como SEQ ID No. 4.

[0111] Las enzimas de fitasa detalladas anteriormente son proteínas maduras que carecen de una secuencia señal. La secuencia señal adecuada derivada de la cepa P 1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248, se muestra como SEQ ID No. 12.

[0112] En un modo de realización, la fitasa se produce en una célula huésped de *Trichoderma*. En algunos modos de realización, la fitasa se produce en una célula huésped de *Trichoderma* que comprende una delección del gen de endo-N-acetilglucosaminidasa. El gen de endo-N-acetilglucosaminidasa codifica la enzima endo-N-acetilglucosaminidasa que elimina la glicosilación enlazada a N de otras proteínas, como las fitasas. En algunos modos de realización, la fitasa es fitasa BP17 producida en una célula huésped de *Trichoderma* que comprende una delección del gen de endo-N-acetilglucosaminidasa. Se enseñan cepas de ejemplo, por ejemplo, en WO 09/114380, véase por ejemplo el ejemplo 5.

[0113] La cantidad de unidades de fitasa añadidas al alimento o pienso para animales dependerá de la composición del propio alimento o pienso para animales. Los alimentos o piensos para animales que contienen cantidades menores de fósforo disponible requerirán en general cantidades más grandes de actividad de fitasa. La cantidad de fitasa requerida la puede determinar el experto en la materia.

[0114] En un modo de realización, la cantidad de fitasa incorporada a un alimento o pienso para animales puede estar entre 0,1 a 20 unidades de actividad de fitasa por gramo del alimento o pienso para animales. Normalmente, 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 pienso para animales; esto es equivalente a 0,6 unidades de fitasa por gramo de alimento o pienso para animales.

5 **Fitasa y ácido fítico**

[0115] En algunos modos de realización, la fitasa y/o el ácido fítico se pulverizan sobre un soporte sólido. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, sin carácter limitativo, sulfato sódico, sulfato de magnesio, sacarosa granulada, *nonpareils* de almidón-sacarosa (ASNP) y maltodextrina.

[0116] En otros modos de realización, la fitasa y el ácido fítico se incorporan a la misma capa de un gránulo multicapa.

10 [0117] En un modo de realización de la presente información dada a conocer, hay al menos 3 moles de ácido fítico por cada mol de fitasa.

Fitasa estabilizada

[0118] La estabilidad de una fitasa puede mejorarse en el estado líquido y/o en el estado sólido en comparación con la de la fitasa control que no se ha estabilizado mediante el uso de ácido fítico.

15 [0119] La fitasa se estabiliza mediante al menos 10 milimolal de ácido fítico. En algunos modos de realización, la fitasa se estabiliza mediante al menos 20, al menos 50, al menos 100 milimolal, o al menos 150 milimolal de ácido fítico.

[0120] En otro modo de realización, la fitasa se estabiliza mediante ácido fítico en el intervalo de 10 milimolal a 150 milimolal. En otros modos de realización, la fitasa se estabiliza mediante ácido fítico en el intervalo de 10 milimolal a 100 milimolal. En algunos modos de realización, la fitasa se estabiliza mediante ácido fítico en el intervalo de 20 milimolal a 150 milimolal. En otros modos de realización, la fitasa se estabiliza mediante ácido fítico en el intervalo de 20 milimolal a 100 milimolal. En algunos modos de realización, la fitasa se estabiliza mediante ácido fítico en el intervalo de 50 milimolal a 150 milimolal. En otros modos de realización, la fitasa se estabiliza mediante ácido fítico en el intervalo de 50 milimolal a 100 milimolal. En algunos modos de realización, la fitasa se estabiliza mediante ácido fítico en el intervalo de 100 milimolal a 150 milimolal.

25 [0121] En algunos modos de realización, el ácido fítico está presente en menos del 5 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,001 % peso/peso, expresado como peso de ácido fítico con respecto a peso en un gránulo entero en el que reside el ácido fítico, incluidas las capas, si están presentes, que carecen de ácido fítico.

[0122] En modos de realización adicionales, la relación molar del ácido fítico y la fitasa en proximidad funcional es de 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 10:1, 20:1, 25:1 o 50:1.

30 [0123] La actividad recuperada de una fitasa estabilizada mediante ácido fítico después de la peletización a vapor se mejora en al menos 15 %, al menos 17 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 23 %, al menos 25 %, al menos 27 %, al menos 30 %, al menos 32 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 42 %, o al menos 45 % en comparación con la fitasa control no estabilizada mediante ácido fítico. Por ejemplo, la actividad recuperada de una fitasa estabilizada mediante ácido fítico se mejora en al menos 23 % en comparación con la fitasa control no estabilizada mediante ácido fítico.

[0124] En un modo de realización, la actividad recuperada de una fitasa estabilizada mediante ácido fítico en el estado sólido (como un gránulo multicapa) se mejora en al menos 15 %, al menos 17 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 23 %, al menos 25 %, al menos 27 %, al menos 30 %, al menos 32 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 42 %, o al menos 45 % en comparación con la fitasa control no estabilizada mediante al menos 10 milimolal de ácido fítico en las mismas condiciones. Por ejemplo, la actividad recuperada de una fitasa estabilizada mediante ácido fítico en el estado sólido (como un gránulo multicapa) se mejora en al menos un 32 % en comparación con la fitasa control no estabilizada mediante al menos 10 milimolal de ácido fítico en las mismas condiciones.

Temperatura de fusión (T_m)

45 [0125] Una forma de determinar la estabilidad térmica de una enzima es determinar la temperatura de fusión (T_m) de la enzima.

[0126] La temperatura de fusión (T_m) de la enzima puede medirse mediante técnicas conocidas en la técnica. Una técnica adecuada es la calorimetría diferencial de barrido. Otras técnicas adecuadas para determinar temperaturas de fusión incluyen dispersión de luz, dicroísmo circular y experimentos de enzimología.

50 [0127] En un modo de realización, la T_m (como la T_m de DSC) de una fitasa (estabilizada mediante al menos 10 milimolal de ácido fítico) 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 control.

5 **[0128]** En un modo de realización, la T_m (como la T_m de DSC) de una fitasa estabilizada mediante al menos 15 milimolal de ácido fólico aumenta en al menos 1 °C, al menos 1,3 °C, o al menos 1,4 °C, en comparación con una fitasa control no estabilizada mediante al menos 10 milimolal de ácido fólico. Por ejemplo, la T_m (como la T_m de DSC) de una fitasa estabilizada mediante al menos 15 milimoles de ácido fólico aumenta en al menos 1,4 °C, en comparación con una fitasa control no estabilizada mediante al menos 10 milimolal de ácido fólico.

10 **[0129]** En un modo de realización, la T_m (como la T_m de DSC) de una fitasa estabilizada mediante al menos 10 milimolal de ácido fólico aumenta en al menos 4 °C, al menos 6 °C, o al menos 7 °C, al menos 7,5 °C, al menos 7,6 °C, o al menos 8 °C, en comparación con una fitasa control no estabilizada mediante al menos 10 milimolal de ácido fólico. Por ejemplo, la T_m (como la T_m de DSC) de una fitasa estabilizada mediante al menos 10 milimolal de ácido fólico aumenta en al menos al menos 7,6 °C, en comparación con una fitasa control no estabilizada mediante al menos 10 milimolal de ácido fólico.

15 **[0130]** En un modo de realización, la T_m (como la T_m de DSC) de una fitasa (estabilizada mediante ácido fólico 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 control no estabilizada mediante ácido fólico en el intervalo entre 10 milimolal y 150 milimolal.

Gránulo y gránulo multicapa

20 **[0131]** Los núcleos, gránulos y gránulos multicapa pueden producirse mediante una variedad de técnicas de fabricación, incluidas: atomización rotativa, granulación en húmedo, granulación en seco, secado por pulverización, granulación de disco, extrusión, recubrimiento en tolva, esferonización, granulación en tambor, aglomeración de lecho fluidizado, granulación de cizalladura alta, recubrimiento por pulverización de lecho fluidizado, cristalización, precipitación, gelificación en emulsión, atomización de disco giratorio y otros enfoques de moldeado, y procesos de granulado. Dichos
25 procesos se conocen en la técnica y se describen en la patente estadounidense n.º 4689297 y la patente estadounidense n.º 5324649 (procesamiento de lecho fluidizado); EP656058B1 y la patente estadounidense n.º 454332 (proceso de extrusión); la patente estadounidense n.º 6248706 (granulación, cizalladura alta); y EP804532B1 y la patente estadounidense n.º 6534466 (procesos combinados que utilizan un núcleo de lecho fluidizado y un mezclador de recubrimiento).

30 **[0132]** El núcleo es el centro interno del gránulo multicapa o es el gránulo. Los materiales utilizados en el núcleo pueden ser adecuados para su utilización en alimentos y/o piensos para animales. US20100124586, WO9932595 y US5324649 detallan los materiales adecuados para el núcleo.

35 **[0133]** En un modo de realización, el núcleo comprende uno o más agente(s) dispersable(s) o soluble(s) en agua. Los agentes solubles en agua adecuados incluyen, sin carácter limitativo, sales inorgánicas (p. ej., sulfato sódico, 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, dibutilftalato y dimetilftalato), material fibroso (p. ej., celulosa y derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa), ácido fólico y combinaciones de estos. Los agentes dispersables adecuados incluyen, sin carácter
40 limitativo, arcillas, *nonpareils* (combinaciones de azúcar y almidón; p. ej., *nonpareils* de almidón-sacarosa - ASNP), talco, silicatos, carboximetilcelulosa, almidón, y combinaciones de estos.

[0134] En un modo de realización, el núcleo comprende sulfato sódico. En otro modo de realización, el núcleo consta de sulfato sódico. En algunos modos de realización, el núcleo puede comprender una fitasa y/o un ácido fólico. En algunos modos de realización, el núcleo no comprende fitasa.

45 **[0135]** En algunos modos de realización, el núcleo está recubierto de al menos una capa de recubrimiento. En algunos modos de realización, el núcleo está recubierto de al menos una capa de recubrimiento. En otro modo de realización, el núcleo está recubierto de al menos tres capas de recubrimiento. En un modo de realización adicional, el núcleo está recubierto de al menos cuatro capas de recubrimiento.

50 **[0136]** Los materiales utilizados en la(s) capa(s) de recubrimiento pueden ser adecuados para su utilización en alimentos y/o piensos para animales. US20100124586, WO9932595 y US5324649 detallan los materiales adecuados para la capa de recubrimiento.

[0137] En algunos modos de realización, el proceso de granulación de lecho fluidizado se emplea tradicionalmente dirigiendo y pulverizando de forma continua una capa sobre la siguiente capa con solo una breve descarga de las líneas y boquillas de pulverización de agua para fines de limpieza, sin cesar la pulverización. En algunos modos de realización, los gránulos pueden realizarse dejando que se sequen (fluidificar sin pulverización) durante un periodo de tiempo

adicional (p. ej., 5 minutos) después de la finalización de cada pulverización intermedia (por ejemplo, a 70 °C), y se puede llevar a cabo un secado adicional opcional después de la pulverización final (por ejemplo, 20 minutos a 70 °C).

5 **[0138]** En algunos modos de realización, el periodo de tiempo adicional después de la finalización 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 algunos modos de realización, el periodo de tiempo adicional después de la finalización de la pulverización intermedia es de 2-8, 3-7 o 4-6 minutos. En algunos modos de realización, la temperatura del periodo de tiempo adicional después de la finalización de la pulverización intermedia es de al menos 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C u 80 °C. En algunos modos de realización, la temperatura del periodo de tiempo adicional después de la finalización de la etapa intermedia es de 60 °C-80 °C o 65 °C-75 °C. En algunos modos de realización, después de la finalización de la pulverización intermedia se lleva a cabo una etapa de secado durante 4-6 minutos a 65 °C-75 °C.

10 **[0139]** En algunos modos de realización, el secado opcional después de la pulverización final puede ser de al menos 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos. En algunos modos de realización, el secado opcional después de la pulverización final puede ser de 5-30 o 10-25 minutos. En algunos modos de realización, la temperatura del secado opcional después de la pulverización final es de al menos 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C u 80 °C. En algunos modos de realización, la temperatura del secado opcional después de la pulverización final es de 60 °C-80 °C o 65 °C-75 °C. En algunos modos de realización, el secado opcional después de la pulverización final es de 15-25 minutos a 65 °C-75 °C.

15 **[0140]** En un modo de realización, una capa de recubrimiento comprende uno o más de los siguientes materiales: una sal inorgánica (p. ej., sulfato sódico, 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, dibutilftalato y dimetilftalato), material fibroso (p. ej., celulosa y derivados de celulosa como hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa e hidroxiletilcelulosa), arcilla, *nonpareil* (una combinación de azúcar y almidón), silicato, carboximetilcelulosa, 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, alcohol polivinílico (PVA), plastificantes (p. ej., polioles, urea, dibutilftalato, dimetilftalato y agua), agentes antiaglomerantes (p. ej., talco, arcillas, sílice amorfa y dióxido de titanio), agentes antiespumantes (como Foamblast 882® y Erol 6000K®) y talco. US20100124586, WO9932595 y US5324649 detallan los componentes adecuados para las capas de recubrimiento.

20 **[0141]** En un modo de realización, la capa de recubrimiento comprende azúcares, como sacarosa.

[0142] En un modo de realización, la capa de recubrimiento comprende un polímero como alcohol polivinílico (PVA).

25 **[0143]** El PVA adecuado para su incorporación a la(s) capa(s) de recubrimiento del gránulo multicapa incluye PVA parcialmente hidrolizado, totalmente hidrolizado e hidrolizado de forma intermedia con grados de viscosidad de bajo a alto.

[0144] En otro modo de realización, la capa de recubrimiento comprende una sal inorgánica, como sulfato sódico.

30 **[0145]** En un modo de realización, al menos una capa de recubrimiento es una capa de recubrimiento enzimática. En algunos modos de realización, el núcleo está recubierto de al menos dos capas enzimáticas. En otro modo de realización, el núcleo está recubierto de al menos tres capas enzimáticas.

35 **[0146]** En algunos modos de realización, los gránulos de la presente información dada a conocer comprenden una capa de recubrimiento enzimática. En algunos modos de realización, la capa enzimática comprende al menos una enzima. En algunos modos de realización, la capa enzimática comprende al menos dos enzimas. En algunos modos de realización, la capa enzimática comprende al menos tres enzimas. En algunos modos de realización, la enzima se selecciona de entre el grupo consistente en fitasas, xilanasas, fosfatasas, amilasas, esterases, enzimas redox, lipasas, transferasas, celulasas, hemicelulasas, betaglucanasas, oxidasas (p. ej., hexosa oxidasas y maltosa oxidorreductasas), proteasas y mezclas de estas. En general, al menos una capa de recubrimiento enzimática comprende al menos una fitasa y ácido fítico.

40 **[0147]** En un modo de realización, la capa de recubrimiento enzimática comprende al menos una fitasa y al menos una enzima adicional seleccionada de entre el grupo consiste en fitasas, xilanasas, fosfatasas, amilasas, esterases, enzimas redox, lipasas, transferasas, celulasas, hemicelulasas, betaglucanasas, oxidasas (p. ej., hexosa oxidasas y maltosa oxidorreductasas) y proteasas.

45 **[0148]** Las listas de enzimas anteriores son solo ejemplos y no pretenden ser exclusivas. Se puede utilizar cualquier enzima en los gránulos descrita en el presente documento, incluidas las enzimas naturales, recombinantes y variantes de enzimas de fuentes bacterianas, fúngicas, de levadura, vegetales, de insectos y animales, y enzimas ácidas, neutras o alcalinas.

50 **[0149]** En algunos modos de realización, la capa de recubrimiento enzimática puede comprender además uno o más materiales adicionales seleccionados de entre el grupo consistente en: ácido fítico, 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,

5 copolímeros de vinilo, alcohol polivinílico (PVA), plastificantes (p. ej., polioles, urea, dibutilftalato, dimetilftalato y agua), agentes antiaglomerantes (p. ej., talco, arcillas, sílice amorfa y dióxido de titanio), agentes antiespumantes (como Foamblast 882® y Erol 6000K® disponibles en Ouvre PMC, Lesquin, Francia) y talco. US20100124586, WO9932595 y US5324649 detallan los componentes adecuados para los gránulos. Foamblast 882® está disponible en Emerald Foam Control, LLC. Foamblast 882® es un antiespumante que se fabrica con ingredientes de uso alimentario.

[0150] En un modo de realización, la capa de recubrimiento enzimática comprende ácido fítico y al menos una fitasa. En otras palabras, la fitasa y el ácido fítico se incorporan a la misma capa de un gránulo multicapa.

10 [0151] En un modo de realización, la capa de recubrimiento externa de un gránulo multicapa comprende uno o más de los siguientes materiales de recubrimiento: polímeros (p. ej. polímeros vinílicos, alcohol polivinílico y copolímeros vinílicos), gomas, ceras, grasas, aceites, lípidos, lecitina, pigmentos, lubricantes, *nonpareils*, sales inorgánicas (p. ej. sulfato sódico, cloruro sódico, sulfato de magnesio, sulfato de zinc y sulfato de amonio), talco y plastificantes (p. ej. azúcares, azúcares alcohólicos y polietilenglicol).

15 [0152] En un modo de realización, la capa de recubrimiento externa de un gránulo multicapa comprende una sal inorgánica (p. ej., sulfato sódico), alcohol polivinílico (PVA), talco o combinaciones de estos. En un modo de realización, la capa de recubrimiento externa comprende alcohol polivinílico (PVA) y/o talco.

[0153] En un modo de realización, la capa de recubrimiento externa evita o reduce la tasa o el grado de migración de agua, humedad o vapor hacia la capa enzimática.

20 [0154] Los gránulos multicapa descritos en el presente documento pueden producirse mediante una variedad de técnicas que incluyen: recubrimiento por pulverización de lecho fluidizado, recubrimiento en tolva y otras técnicas para desarrollar un gránulo multicapa mediante la adición de capas consecutivas en la parte superior del material del núcleo inicial (la semilla). Véase, por ejemplo, US 5324649 y US20100124586. En un modo de realización, los gránulos multicapa se producen utilizando un proceso de recubrimiento de pulverización de lecho fluidizado.

25 [0155] En un modo de realización, los gránulos multicapa comprenden o constan de un núcleo que comprende sulfato sódico; una primera capa de recubrimiento que comprende o consta de fitasa, sacarosa, almidón, ácido fítico y aceite de colza; una segunda capa de recubrimiento que comprende o consta de sulfato sódico; y una tercera capa de recubrimiento que comprende o consta de talco y PVA. La primera capa de recubrimiento se aplica al núcleo, a continuación, la segunda capa de recubrimiento se aplica a la primera capa de recubrimiento y, después, la tercera capa de recubrimiento se aplica a la segunda capa de recubrimiento.

30 [0156] En otro modo de realización, los gránulos multicapa comprenden o constan de un núcleo que comprende sulfato sódico; una primera capa de recubrimiento que comprende o consta de fitasa, sacarosa, almidón, ácido fítico y un agente antiespumante (como Foamblast 882®); una segunda capa de recubrimiento que comprende o consta de sulfato sódico; y una tercera capa de recubrimiento que comprende o consta de talco y PVA. La primera capa de recubrimiento se aplica al núcleo, a continuación, la segunda capa de recubrimiento se aplica a la primera capa de recubrimiento y, después, la tercera capa de recubrimiento se aplica a la segunda capa de recubrimiento.

35 Pellets y peletización

[0157] Los pellets pueden comprender gránulos y/o gránulos multicapa según se han descrito en el presente documento de conformidad con cualquiera de entre una variedad de métodos de peletización conocidos, ejemplos de los cuales se describen a continuación.

40 [0158] En un modo de realización, el pellet comprende ácido fítico, fitasa y al menos un ingrediente alimentario o de pienso para animales, donde la concentración del ácido fítico es de al menos 10 milimolal. En un modo de realización, el pellet comprende al menos un ingrediente alimentario o de pienso para animales y un gránulo que comprende ácido fítico y fitasa, donde la concentración del ácido fítico en el gránulo es de al menos 10 milimolal.

45 [0159] Los pellets de la presente información dada a conocer se producen mediante un método en el que la temperatura de una mezcla de pienso se eleva a un nivel alto mediante tratamiento a vapor antes de la peletización, un proceso conocido como acondicionamiento. Posteriormente, la mezcla de pienso acondicionada puede pasarse por una matriz para producir pellets de un tamaño concreto. La mezcla de pienso puede prepararse mezclando gránulos y/o gránulos multicapa descritos en el presente documento con alimentos o pienso para animales como se ha descrito en el presente documento.

50 [0160] En general, el acondicionador a vapor trata la mezcla durante aproximadamente 20 a aproximadamente 90 segundos, y hasta varios minutos, a aproximadamente 85 °C hasta 95 °C. La cantidad de vapor puede variar según la cantidad de humedad y la temperatura inicial de la mezcla de alimento o pienso para animales. Se ha informado de aproximadamente un 4 % hasta aproximadamente un 6 % de vapor agregado en los procesos de peletización, y la cantidad se selecciona para producir menos de aproximadamente un 18 % de humedad en la pulpa antes de la peletización, o hasta aproximadamente un 28 % de humedad en la pulpa destinada a la extrusión.

[0161] Se puede producir un proceso de expansor opcional durante aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10 segundos a un intervalo de temperatura de aproximadamente 100 °C hasta 140 °C. La parte de molienda de pellets del proceso de fabricación opera normalmente durante aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5 segundos a una temperatura de aproximadamente 85 °C hasta aproximadamente 95 °C.

5 **[0162]** Antes de la peletización, las mezclas no peletizadas (denominadas premezclas o precursores, mezclas base, pulpa y diluyentes para pellets) contienen normalmente vitaminas y minerales traza. Las mezclas base contienen normalmente ingredientes alimentarios y de pienso para animales como fosfato dicálcico, piedra caliza, sal y una premezcla de vitaminas y minerales, pero no ingredientes de proteínas y granos. Los diluyentes incluyen, sin carácter limitativo, granos (por ejemplo, harinillas de trigo y salvado de arroz) y arcillas, como los filosilicatos (el silicato de magnesio sepiolita, bentonita, caolín, montmorillonita, hectorita, saponita, beidellita, atapulgita y estevensita). Las arcillas también funcionan como portadores y agente fluidizante, o diluyentes, para premezclas de alimentos y piensos para animales. La pulpa comprende normalmente una dieta animal completa. Por ejemplo, la pulpa comprende o consta de maíz, harina de soja, aceite de soja, sal, DL metionina, piedra caliza, fosfato dicálcico y vitaminas y minerales. En un ejemplo, la pulpa consta de 61,10 % de maíz, 31,43 % de harina de soja, 48,4 % 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.

[0163] En un modo de realización, un alimento o pienso para animales se produce mezclando al menos un ingrediente alimentario o de pienso para animales (como una pulpa) con una fitasa y un ácido fítico en una forma granulada (como un gránulo multicapa), acondicionando a vapor la mezcla resultante, seguido de la peletización de la mezcla.

20 **[0164]** Por ejemplo, una mezcla no peletizada de harina de maíz y harina de soja (como 60 % de harina de maíz y 40 % de harina de soja) puede mezclarse con gránulos multicapa que comprenden fitasa y ácido fítico y someterse después a acondicionamiento a vapor a 90 °C durante 30 segundos. La mezcla se extrude entonces para formar los pellets de pienso para animales.

Alimentos y piensos para animales

25 **[0165]** En un modo de realización, el alimento o pienso para animales es un líquido como un pienso líquido. En otro modo de realización, el alimento o pienso para animales es un sólido. Como se utiliza en el presente documento, el término animal incluye todos los animales, ejemplos de los cuales incluyen no rumiantes y rumiantes (como vacas, ovejas, cabras y caballos). Algunos ejemplos de animales no rumiantes incluyen animales monogástricos como cerdos, aves de corral (como pollos y pavos), peces (como el salmón), perros, gatos y humanos. En un modo de realización, el pienso para animales es pienso para pollos. En un modo de realización, el pienso para animales es pienso para cerdos.

30 **[0166]** El alimento o pienso para animales puede comprender proteínas vegetales. Las proteínas vegetales pueden derivarse de legumbres, semillas oleaginosas, frutos secos y cereales. Los ejemplos de fuentes de proteínas vegetales incluyen plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Poaceae*, *Cruciferaeae* y *Chenopodiaceae*.

35 **[0167]** Las fuentes adecuadas de proteínas vegetales son soja, harina de soja, cereales (como maíz, trigo, avena, cebada, centeno y sorgo), harinas de cereales (como harina de maíz, harina de trigo, harina de avena, harina de cebada, harina de centeno, harina de sorgo y harina de canola), salvados (como salvado de trigo y salvado de avena), semillas oleaginosas (como semillas de colza y girasol), harinas de semillas oleaginosas (como harina de colza), harina de semillas de algodón, repollo, remolacha y remolacha azucarera. Estas proteínas vegetales son ejemplos de ingredientes alimentarios e ingredientes para piensos de animales.

40 **[0168]** El alimento o pienso para animales puede comprender proteínas animales. Las proteínas animales adecuadas incluyen harina de pescado y suero de leche. El alimento o pienso para animales puede comprender aditivos. Los aditivos adecuados incluyen inhibidores enzimáticos, vitaminas, minerales traza, macrominerales, agentes colorantes, compuestos aromáticos, péptidos antimicrobianos (como Leucocina A, Tanatina y Tritrpticina) y enzimas.

[0169] El alimento o pienso para animales o los ingredientes de estos pueden ser un líquido. El alimento o pienso para animales o los ingredientes de estos pueden ser un sólido. Los ejemplos incluyen harina de soja, trigo o maíz.

45 Modos de realización de modificación de enzimas

[0170] La presente información dada a conocer proporciona fitasas con diversas modificaciones, por ejemplo, mediante glicosilación. En particular, la presente descripción se refiere a la glicosilación de la fitasa. En algunos modos de realización, 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 al polipéptido o al ácido nucleico codificante. En algunos modos de realización, la enzima modificada es una fitasa y en algunos modos de realización la enzima es fitasa BP17. La secuencia de aminoácidos de fitasa BP17 (SEQ ID NO: 1) contiene tres sitios potenciales de glicosilación enlazados a N según el análisis realizado por el algoritmo de predicción NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Los residuos de asparagina que se predice que se glicosilan son residuos N169, N173 y N285 de la secuencia de fitasa BP17 madura (carente de secuencia señal), como se indica en la SEQ ID NO: 1 a continuación en negrita y subrayada.

SEQ ID NO: 1

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLG YITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQR TLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
 LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPI DNLNQHYIPSLALM**N**TTL**N**FSKSPWCQKHSADKS
 CDLGLSMP SKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
 HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNP**N**ATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
 MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
 KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

5 **[0171]** Un modo de 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 esta. En algunos modos de realización, la enzima producida y/o utilizada presenta más del 75 %, por ejemplo más del 80 %, por ejemplo más del 90 % y, para mayor ejemplo, más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con BP17.

10 **[0172]** Algunos modos de realización de la descripción implican la introducción de sitios de glicosilación adicionales en BP17. De manera específica, se puede introducir una o más o todas las siguientes sustituciones en BP17 (con referencia a la numeración de la posición de la SEQ ID NO: 1, carente de secuencia señal) para introducir sitios de glicosilación: E121T, P394N, D386N, K202N, N204T, Q151N y P153S, P373T y Q76N.

[0173] En particular, una secuencia de la descripción puede comprender K202N y N204T en la misma secuencia. En un modo de realización adicional de la descripción, una secuencia de la descripción puede comprender Q151N y P153S en la misma secuencia.

15 **[0174]** Las SEQ IN Nos: 5 a 11 presentan variantes de secuencias que pueden utilizarse en la presente información dada a conocer (en cada caso los cambios aminoacídicos en relación con la BP17 se muestran en negrita y subrayados) donde las sustituciones de aminoácidos se han introducido a BP17 (SEQ ID NO: 1) para aumentar el número de sitios de glicosilación.

20 **[0175]** El grado de glicosilación de una enzima puede aumentar la estabilidad de la enzima modificada. Por lo tanto, algunos modos de realización de la descripción proporcionan más enzimas termoestables, por ejemplo, enzimas que son más termoestables que las enzimas naturales o enzimas producidas utilizando diferentes métodos.

[0176] La presente descripción también proporciona ácidos nucleicos codificantes y capaces de codificar los polipéptidos de la SEQ ID NO 1 y homólogos, variantes o derivados de estos.

25 **[0177]** La presente invención puede referirse también a la enzima de la SEQ ID NO 1 o a un polipéptido derivado de la enzima parental mediante sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que posee la actividad de la proteína parental. En algunos modos de realización, esta enzima se glicosila y en algunos modos de realización dicha enzima presenta estabilidad mejorada.

30 **[0178]** Un modo de realización adicional de la presente descripción proporciona un método para la producción de una enzima de la descripción, por ejemplo, una enzima donde se aumenta la glicosilación o la enzima está altamente glicosilada. Este método implica la alteración de la secuencia de aminoácidos de la enzima, o la alteración del ácido nucleico que codifica la enzima, para aumentar el número de sitios de glicosilación. En algunos modos de realización, esta alteración implica el aumento del número de sitios de glicosilación enlazados a N. En algunos modos de realización, esto implica la introducción del motivo Asn-Xaa-Ser/Thr en la enzima o la introducción de la secuencia que codifica este sitio en el ácido nucleico. En algunos modos de realización, se introducen uno, o dos, o tres, o más sitios de glicosilación en una enzima.

40 **[0179]** En algunos modos de realización, el método de la descripción se lleva a cabo en una fitasa, por ejemplo BP17 (SEQ ID NO: 1). En algunos modos de realización, el método de la descripción introduce una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos para aumentar el número de sitios de glicosilación en una fitasa (con referencia a la numeración de la posición de la SEQ ID NO: 1):-E121T, P394N, D386N, K202N, N204T, Q151N, P153S, P373T y Q76N.

Métodos de producción

[0180] En modos de realización adicionales, la presente descripción se refiere también a un aumento de la glicosilación de una enzima a través de métodos de producción. En algunos modos de realización, 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 de manera concreta, por ejemplo, en *T. reesei*.

5 [0181] La presente descripción se refiere también a la expresión de una enzima en un huésped alterado, donde la alteración ha delecionado la función de uno o más genes y, en algunos modos de realización, ha delecionado la función del gen de endo glucosaminidasa endógeno.

[0182] En un modo de realización particular, la presente descripción se refiere a la expresión y la producción de una enzima, por ejemplo, una fitasa, y en algunos modos de realización fitasa BP17, que puede modificarse o no, en hongos de la especie *Trichoderma*, por ejemplo en *T. reesei*, donde el gen de endo glucosaminidasa endógeno se ha delecionado.

10 [0183] En algunos modos de realización, la presente descripción se refiere a la producción y/o al uso de enzimas, como fitasa, con glicosilación aumentada. En modos de realización adicionales, se potencia la glicosilación aumentada mediante el uso de un huésped con un gen de endo T delecionado. En algunos modos de realización, la enzima producida tiene estabilidad aumentada en comparación con una enzima producida utilizando diferentes métodos, especialmente métodos que utilizan una especie huésped diferente y/o un huésped donde no se deleciona el gen de endoglucosaminidasa endógeno.

15 [0184] La endo glucosaminidasa endógena es una enzima secretada que elimina la glicosilación enlazada a N de otras proteínas, como las fitasas. El grado de glicosilación de una proteína, como una enzima, es mayor si se produce en un huésped endo T delecionado. Según la descripción, el gen endo T puede delecionarse mediante eliminación, alteración, interferencia o cualquier método que impida o reduzca la expresión y la producción de endo T en el huésped. Se enseñan cepas de ejemplo, por ejemplo, en WO 09/114380, véase por ejemplo el ejemplo 5.

20 [0185] En algunos modos de realización, la presente descripción se refiere a la expresión y la producción de una fitasa en un huésped endo T delecionado. En modos de realización adicionales, la fitasa es BP17 o un homólogo, variante o derivado de esta, por ejemplo, que tenga más del 75 %, por ejemplo más del 80 %, por ejemplo más del 90 % y para mayor ejemplo más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con BP17 (SEQ ID NO: 1). En algunos modos de realización, el huésped es un huésped de hongos filamentosos, por ejemplo, un hongo de la especie *Trichoderma* y, para mayor ejemplo, *T. reesei*. En algunos modos de realización, la fitasa presenta estabilidad aumentada, por ejemplo, la termoestabilidad aumenta en comparación con una fitasa producida por otros métodos de producción, o una fitasa que no está glicosilada o no está muy glicosilada. El grado de glicosilación puede determinarse mediante espectrometría de masas.

25 [0186] En algunos modos de realización, los métodos de producción de la presente descripción proporcionan una fitasa más termoestable, lo que, por lo tanto, aumenta los niveles de la actividad de fitasa presentes en el pienso después del procesamiento. En algunos modos de realización, el procesamiento del pienso para animales implica la formación de pellets. En modos de realización adicionales, los pellets que comprenden la fitasa de la descripción actual tienen niveles aumentados de la actividad de fitasa después del procesamiento. En modos de realización adicionales, la fitasa de la descripción actual es más capaz de sobrevivir al proceso de peletización y de retener los niveles de la actividad de fitasa después del procesamiento.

Combinaciones de modos de realización

30 [0187] En un modo de 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 donde se ha delecionado el gen de endo T. Esto maximiza el grado de glicosilación de la enzima. En algunos modos de realización, el huésped es un hongo de la especie *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*.

35 [0188] En algunos modos de realización, 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 esta, por ejemplo, que tenga más del 75 %, por ejemplo más del 80 %, por ejemplo más del 90 % y para mayor ejemplo más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con BP17 (SEQ ID NO: 1), o el Ronozyme P-(CT) comercialmente disponible, respectivamente.

[0189] En algunos modos de realización, la fitasa, de la manera en que se haya producido o con la secuencia que sea, se encuentra en proximidad funcional con el ácido fítico, donde la fitasa y el ácido fítico se encuentran en cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento.

50 EJEMPLOS

[0190] Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar algunos modos de realización de la presente información dada a conocer. La fitasa utilizada en el ejemplo 1 y el ejemplo 2 es la fitasa BP17 con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, realizada en el huésped de EDT-*Trichoderma reesei*. La fitasa utilizada en el ejemplo 3 es

la fitasa Ronozyme P-(CT) disponible comercialmente de DSM. El cálculo de los porcentajes de actividad recuperada, actividad de fitasa y DSC se llevó a cabo como se describe en las definiciones.

Ejemplo 1 - Ensayos de peletización y granulación de lecho fluidizado

5 **[0191]** Se incorporó ácido fítico (Sigma) a gránulos multicapa que comprendían fitasa para evaluar si se podía conseguir la protección de la fitasa contra el posterior tratamiento a vapor. A continuación, se mezclaron los gránulos que contenían fitasa con pienso para animales y se hicieron pasar por un peletizador de pienso para animales que incorporaba un tratamiento a vapor.

Granulación de lecho fluidizado

10 **[0192]** Se pueden producir gránulos de enzimas utilizando un proceso de pulverización de lecho fluidizado descrito en la patente estadounidense n.º 5324649. Se utilizó un recubridor por pulverización de lecho fluidizado Vector FL-1. Se añadió fitasa a 12 000 unidades/gramo (en función del peso total del gránulo seco). Se añadió ácido fítico en una relación de 0,10 % a 0,40 % en peso del gránulo total o a una concentración de 15 a 60 mM en la capa enzimática. Se cargaron semillas de sulfato sódico (también denominadas el núcleo) en una cámara de lecho fluidizado. La solución «pulverización 1» se preparó disolviendo o dispersando sacarosa, almidón de maíz, ácido fítico y aceite de parafina o
15 aceite de colza o el antiespumante Foamblast 882® en un concentrado de fitasa ultrafiltrado (UFC). Se añadió agua adicional a esta mezcla para mantener la concentración total de sólidos alrededor del 40 %. Se requirió una agitación constante para mantener el almidón de maíz y el aceite de parafina o el aceite de colza o el antiespumante bien dispersado en el UFC enzimático.

20 **[0193]** La pulverización 1 se aplicó al núcleo de sulfato sódico ya cargado en el granulador de lecho fluidizado utilizando un proceso de pulverización superior. La pulverización 1 se aplicó a una relación de pulverización inicial de 6,3 g/min aumentando hasta una relación de pulverización final de 11 g/min durante 30 minutos. La presión del aire de atomización se mantuvo entre 35 y 40 psi y la temperatura del lecho se mantuvo entre 43 °C y 45 °C.

25 **[0194]** Se prepararon pulverizaciones posteriores (pulverización 2, pulverización 3, etc.) disolviendo y/o dispersando todos los componentes de esta solución de pulverización en agua para formar una solución con un contenido de sólidos de aproximadamente del 18 % al 40 %. Las pulverizaciones que contenían aceite no soluble en agua, antiespumante o almidón de maíz requirieron agitación continua para mantener estos materiales bien dispersados. La pulverización 2 se acolicó a una relación de pulverización constante de 23,9 g/min. La presión del aire de atomización se mantuvo entre 34 y 36 psi y la temperatura del lecho se mantuvo entre 45 °C y 47 °C. La pulverización 3 se aplicó a una relación de pulverización inicial de 7.2 g/min aumentando hasta una relación de pulverización final de 9,2 g/min durante 15 minutos.
30 La presión del aire de atomización fue de 40 psi y la temperatura del lecho se mantuvo entre 49 °C y 50 °C.

[0195] Se recogieron gránulos multicapa después de la pulverización final y se determinó la actividad de fitasa utilizando el ensayo de fitasa mencionado anteriormente.

Peletización

35 **[0196]** Después, los gránulos multicapa se combinaron con una mezcla de harina de maíz al 60 % y harina de soja al 40 % (es decir, la pulpa) a una proporción de 60 gramos de gránulos hasta 120 kilogramos de harina de maíz-soja de manera que la actividad final de la fitasa en la mezcla antes de la peletización fue de aproximadamente 5 unidades/gramo.

40 **[0197]** Esta mezcla se peletizó después en un peletizador de pienso para animales. Los gránulos y la harina de maíz-soja se mezclaron en una mezcladora de cinta horizontal, durante aproximadamente 15 minutos. La prensa de pellets era una Simon Heesen, de tipo monorodillo, configurada a una matriz de 17,3 cm de diámetro interior, con un diámetro de orificio de pellet de 3 mm. La velocidad de la matriz era de 500 rpm y se accionó mediante un motor de 7,5 kW. La velocidad normal de alimentación era de 300 kg por hora. La temperatura en el acondicionador se mantuvo a +/- 0,1 grados Celsius, medida a la salida del pienso del acondicionador. El acondicionador tenía un sistema de mezclado de tipo cascada. Se utilizaron dos temperaturas de acondicionamiento: 90 °C y 95 °C. La presión de entrada del 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
45 30 segundos. Cuando se alcanzó la temperatura objetivo, el sistema se llevó a cabo durante aproximadamente 5 a 10 minutos antes de que tuviera lugar el muestreo. Se tomaron muestras durante periodos de 1-1,5 minutos, correspondientes a 5-7,5 kg de pienso peletizado, y se colocaron inmediatamente en un recipiente de refrigeración con un fondo perforado y un flujo de aire de 1 500 metros cúbicos por hora. Después de refrigerarse durante 15 minutos, se redujo el tamaño de las muestras dos veces utilizando un divisor de muestras, y se tomó 1 kg para pruebas de laboratorio.

50 **[0198]** Después de la peletización y la refrigeración, los pellets se trituraron y se analizaron para determinar la actividad de la fitasa. La mezcla no peletizada de harina de maíz-soja y gránulos de fitasa se denomina la «pulpa» control y se analizó también para determinar la actividad de la fitasa. La proporción de actividad recuperada en el gránulo enzimático
55

peletizado a 90 °C o 95 °C con respecto a la actividad control de la pulpa se denomina el porcentaje de actividad recuperada, como se describe en las definiciones.

Estequiometría

5 [0199] En los siguientes cálculos de 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 de 10,19 milimoles por kilogramo de sólidos de capa enzimática o 10,19 milimolal. Se han observado mejoras en el rendimiento de la peletización como se muestra en la tabla 3 cuando se ha utilizado ácido fítico en gránulos de 0,1 % p/p a 1,0 % p/p (10,19 - 101,9 milimolal).

10 [0200] Por lo tanto, a 0,10 % p/p de ácido fítico, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 10,19 mM, a 0,20 % p/p de ácido fítico, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 20,38 mM, a 0,4 % p/p de ácido fítico, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 40,76 mM, a 0,19 % p/p, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 19,361 mM, a 0,37 % p/p, la concentración de ácido fítico en la capa enzimática es de 37,703 mM, a 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 IP6 superior al 70 % según lo determinado mediante 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 pulverización 1; SP2 se refiere a pulverización 2; y SP3 se refiere a pulverización 3. Cada «pulverización» es una solución o suspensión acuosa que contiene los sólidos de los componentes específicos, que se pulveriza sobre los núcleos dentro del recubridor de lecho fluidizado).

Tabla 1.1

	Fórmula del gránulo	L10263	Base de 6,7 Kg					
	Componente	Carga del componente	Masa (g)		Ácido fítico MW			
SP1	Sólidos enzimáticos	4,62 %	310,69		660,04	Daltons		
	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	Na2SO4	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	Na2SO4	36,03 %	2423,00					
			6724,95					

20 **Formulaciones de los gránulos**

[0201] La tabla 1.2 resume las formulaciones de los gránulos realizados y analizados en los ensayos de peletización.

Tabla 1.2

Componente de la formulación 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 la formulación 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%

Componente de la formulación 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		
Talc	6.00%	6.00%
PVA	3.00%	3.00%
Núcleo		
Na ₂ SO ₄	36.31%	35.31%

[0202] La figura 1 muestra la actividad recuperada obtenida después de la peletización de estas formulaciones de la tabla 1.2. La peletización se llevó a cabo a 90 °C y 95 °C. A partir de la figura 1 se puede observar que cuando el ácido fítico al 0,1 % a 0,4 % está presente en la capa enzimática del gránulo, se observa una mejora de la actividad recuperada de entre el 19 % y el 27 % a 90 °C y una mejora de la actividad recuperada de entre el 17 % y el 42 % a 95 °C al compararse con el gránulo control hecho sin ácido fítico en la capa enzimática, es decir, la fitasa control. V-10-153 y V-11-144 son las muestras 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 el 19 % y el 27 % a 90 °C y una mejora de la actividad recuperada de entre el 17 % y el 42 % a 95 °C. (La variabilidad en la mejora no parece correlacionarse con el nivel de ácido fítico utilizado en estas muestras, potencialmente debido a la presencia de un probable exceso al nivel del 0,10 %).

[0203] La tabla 1.3 muestra el efecto del tiempo de incubación del ácido fítico con el UFC de fitasa antes de la pulverización sobre el gránulo en la actividad de la fitasa después de la peletización a 90 °C y 95 °C. Cabe señalar 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 de L-11-095 mostrada en la tabla 1.2. La única diferencia entre estas formulaciones fue el tiempo de incubación antes de pulverizarlas sobre el gránulo. Se puede observar que para tiempos de incubación de entre 30 minutos y 6 horas, no hay cambio en la actividad de la fitasa después de la peletización. Después de 24 horas de incubación, se observó una disminución considerable en la actividad de la fitasa después de la peletización a 90 °C y 95 °C, pero este periodo temporal es inusualmente largo y no se encontraría en general al fabricar estos gránulos enzimáticos en un ámbito comercial.

Tabla 1.3 - Actividad de la fitasa pospeletización a 90 °C y 95 °C con tiempos de incubación variables

Formulación	Tiempo de incubación (hr)	Actividad recuperada 90 °C	Desviación estándar	Actividad recuperada 95 °C	Desviación estándar
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 la fitasa BP17

[0204] Se llevó a cabo la DSC en un MicroCal VP-DSC utilizando una velocidad de escaneo de 90C por hora con una concentración de fitasa BP17 de 0,5 mg/ml (0,01 mM) en un tampón de acetato de sodio 0,25 M pH 5,5 con 20 mM de cloruro cálcico. Todas las muestras de ácido fítico se ajustaron a un pH de 5,5 con hidróxido sódico antes de la adición al tampón de acetato y fitasa para asegurar que todas las muestras se encontraban al mismo pH de 5,5. El tampón de acetato se llevó a cabo en la célula de referencia de la DSC para todas las muestras.

[0205] La figura 2 muestra el gráfico de DSC para 0,5 mg/ml (0,01mM) de fitasa BP17 con y sin 15 mM de sustrato de ácido fítico añadido. El punto de fusión (Tm) se indica para cada muestra y puede observarse que la adición de 15 mM de ácido fítico aumenta la Tm desde 72,4 °C hasta 73,8 °C (un aumento de 1,4 °C), lo que indica una estabilización del estado nativo de la fitasa.

5 [0206] La figura 3 muestra el gráfico de DSC para 15 mM de inositol (el producto de ácido fítico completamente hidrolizado que reacciona con fitasa) y fitasa, en comparación con la fitasa sola sin inositol. Se puede observar que el inositol no aumenta la Tm de la fitasa. Esto respalda una hipótesis en la que la entidad estabilizadora no es el producto completamente hidrolizado de la hidrólisis de fitasa del ácido fítico, sino el ácido fítico parcialmente hidrolizado como inositol hexafosfato, inositol pentafofosfato, inositol tetrafosfato, inositol trifosfato, inositol difosfato e inositol monofosfato.
10 (La ligera variación de altura de las curvas se refiere probablemente a la cantidad total de enzima que experimenta una transición de fusión. Esto puede variar debido a un error experimental durante la preparación de las muestras).

[0207] Las muestras de gránulos fabricadas según la tabla 1.2 se analizaron para determinar la distribución de residuos de inositol fosfato (IP6, IP5, IP4, etc.) utilizando un método analítico basado en HPLC. El método de HPLC se basa en el intercambio iónico utilizando una columna CarboPac 100 en un sistema de HPLC de Dionex. Se administra un gradiente de agua y HCl 1 N y el material de elución se derivatiza después de la columna con un reactivo de color, Fe(NO3)3 al 0,1 %, 9H2O, formando complejos de InsP-Fe detectables con UV a 290 nm. Este método solo es capaz de cuantificar desde IP6 hasta IP2 eluyendo IP1 e IP0 junto con el pico del solvente. Como se muestra en la tabla 2.1 a continuación, no fue posible detectar fitato (IP6) en ninguna de las muestras. Para las muestras de gránulos de ácido fítico al 0,1 % y 0,5 mg/ml de fitasa había una pequeña cantidad de IP3. Las muestras líquidas no dieron lugar a ningún pico aparte del «frente del solvente». Este pico fue bastante grande para las muestras más concentradas, lo que sugiere una degradación total a IP1, IP0 y fosfato inorgánico.
15
20

[0208] La tabla 2.1 muestra que en el gránulo el ácido fítico se ha hidrolizado a IP3, IP2, IP1 e IP0, y que no hay IP6. Esto respalda la hipótesis de que la entidad estabilizadora es IP3, IP2, IP1 (IP0 se eliminó en función de los datos de DSC; no es probable que IP0 sea la entidad estabilizadora debido a que cuando se probó IP0 (inositol) con fitasa utilizando DSC, como se muestra en la figura 3, no se observó aumento en la Tm).
25

[0209] La capa enzimática contiene 12 000 U/g de fitasa. Las unidades en la tabla son áreas del pico de HPLC. Un guión (-) indica que no se determinó el valor.

<u>Muestra</u>	<u>IP6</u>	<u>IP5</u>	<u>IP4</u>	<u>IP3</u>	<u>IP2</u>	<u>IP1</u>	<u>IP0</u>
L-11-087	0	0	0	0,0241	0,0004	-	-
L-11-087	0	0	0	0,0315	0	-	-
L-11-087	0	0	0	0,0359	0	-	-
L-11-087	0	0	0	0,0343	0	-	-
L-11-088	0	0	0	0,0288	0	-	-
L-11-088	0	0	0	0,0209	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	-	-

[0210] La figura 4 muestra un gráfico de la Tm de DSC determinada para la fitasa en presencia del ácido fítico a una concentración de entre 0 y 150 mM. Puede observarse que la Tm de la fitasa aumenta de 72,4 °C a 80 °C a 150 mM de ácido fítico, mostrando un aumento de 7,6 °C en la Tm sobre la fitasa sin ácido fítico añadido. Esto indica un efecto estabilizante muy fuerte del ácido fítico. No fue posible determinar la Tm de la fitasa cuando el ácido fítico era superior a 150 mM debido a que esta concentración de ácido fítico interfería con la medición de DSC de la fitasa.

Ejemplo 3 - Calorimetría diferencial de barrido de Ronozyme P-CT

35 [0211] Para explorar la generalizabilidad de la estabilización del ácido fítico en otras fitasas, se llevó a cabo un experimento de DSC utilizando fitasa extraída del producto de Ronozyme P-(CT) granular de DSM.

[0212] Se extrajo la enzima de fitasa del gránulo disolviéndola en un tampón de acetato de sodio pH 5,5 a una concentración de 10 gramos de sólidos de gránulos por 100 gramos de tampón durante 1 hora. A continuación, este material se filtró a través de un filtro de 0,20 micras y después se cambió el tampón 5 veces utilizando tampón de acetato de sodio pH 5,5 y un tubo Centricon® de corte de 10 K de peso molecular. Se midió la concentración total de proteínas utilizando un ensayo de tipo Lowry en un analizador químico automatizado Konelab®.
40

[0213] En la figura 5, se puede observar un tipo de estabilización similar (aumento de Tm) en presencia de ácido fítico como se observó previamente con BP17.

[0214] La Tm más alta se debe probablemente a que esta fitasa es una secuencia enzimática diferente a la BP17 de los ejemplos anteriores. El efecto del ácido fítico en la Tm es similar a la fitasa BP17 y las pendientes parecen similares.

- 5 [0215] Los documentos citados en el presente texto no han de interpretarse como una admisión de que dicho documento es «técnica anterior» a la presente solicitud.

SECUENCIAS

[0216]

SEQ ID NO: 1

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
 YVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE
 KEAQTPIIDNLNQHYIPSLALMNT
 TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMP
 QAAWGNHSEQEWALLLKLHNV
 YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRW
 TLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRV
 SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 2

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
 YVWTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE
 KEAQTPIIDNLNQHYIPSLALMNT
 TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMP
 QAAWGNHSEQEWALLLKLHNV
 YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRW
 TLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRV
 SQSVEPGCQLQ

10

SEQ ID NO: 3

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILPRGSCPTPNSI
 YVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE
 KEAQTPIIDNLNQRYIPELALMNT
 ILNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQ
 VAWGNHSEQEWALLLKLHNV
 YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRW
 TLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRV
 SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 4

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
 YVWADVDQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE
 KEAQTPIIDNLNQHYIPFLALMNT
 TLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNKVALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQ
 AAWGNHSEQEWASLLKLHNV
 QFDLMARTPYIARHNGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMR
 WTLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRV
 SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 5 (E121T)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLT**K**ADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 6 (P394N)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYC**N**LSTFTRVVSQSVVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 7 (D386N)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCN**N**QTAEGYCPLSTFTRVVSQSVVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 8 (K202N and N204T)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKD**N**IGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 9 (Q151N and P153S)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEA**N**T**S**IDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 10 (P373T)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLN**Q**TAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 11 (Q76N)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGIL**S**NGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLLKL
HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 12
 MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYA

SECUENCIAS

[0217]

SEQ ID NO: 1
 NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
 YVWTDVAQR TLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE
 KEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNT
 TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMP
 QAAWGNHSEQEWALLLKLHNV
 YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRW
 TLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRV
 SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 2
 NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
 YVWTDVDQR TLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE
 KEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNT
 TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMP
 QAAWGNHSEQEWALLLKLHNV
 YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRW
 TLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRV
 SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 3
 NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILPRGSCPTPNSI
 YVWTDVAQR TLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE
 KEAQTPIDNLNQRYIPELALMNT
 ILNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQ
 VAWGNHSEQEWALLLKLHNV
 YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRW
 TLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRV
 SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 4
 NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
 YVWADVDQR TLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE
 KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNT
 TLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNKVALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQ
 AAWGNHSEQEWASLLKLHNV
 QFDLMARTPYIARHNGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMR
 WTLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRV
 SQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 5 (E121T)
 NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGG
 FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQR TLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLTAKADP
 LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
 CDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLLKL
 HNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLN
 MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
 KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 6 (P394N)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIIDLNLQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
HNVEFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCNLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 7 (D386N)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIIDLNLQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
HNVEFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNNTQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 8 (K202N and N204T)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIIDLNLQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
HNVEFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 9 (Q151N and P153S)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEANTSIDNQLNLQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
HNVEFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 10 (P373T)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIIDLNLQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
HNVEFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQTAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 11 (Q76N)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWVPVKLGYITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSNQSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADP
LFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIIDLNLQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKS
CDLGLSMPKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKL
HNVEFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNANIAGMLN
MRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQL
KIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 12

MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYA

REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar la estabilidad de fitasa en una composición de gránulos, comprendiendo el método la introducción de al menos 10 milimolal de ácido fítico a dicha composición, donde
- (a) el gránulo comprende fitasa y ácido fítico pulverizados sobre un soporte sólido; y/o
- 5 (b) el gránulo es un gránulo multicapa y la fitasa y el ácido fítico se incorporan a la misma capa de dicho gránulo multicapa;
- comprendiendo además el método la mezcla del gránulo con al menos un ingrediente alimentario o de pienso para animales y la peletización la mezcla resultante con tratamiento a vapor;
- 10 donde dicho ácido fítico se selecciona de entre inositol hexafosfato, inositol pentafosfato, inositol tetrafosfato, inositol trifosfato, inositol difosfato e inositol monofosfato, o sales o mezclas de estos; y
- donde la actividad recuperada de la fitasa después de la peletización a vapor es al menos 15 %, al menos 17 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 23 %, al menos 25 %, al menos 27 %, al menos 30 %, al menos 32 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 42 %, o al menos 45 % superior a la actividad recuperada de una fitasa control no estabilizada por ácido fítico a una concentración de al menos 10 milimolal.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde la fitasa es:
- (a) fitasa BP17, opcionalmente fitasa BP17 producida en una célula huésped de *Trichoderma* que comprende una delección del gen de endo-N-acetilglucosaminidasa; o
 - (b) Ronozyme P-(CT).
3. Método según la reivindicación 1, donde el ácido fítico y la fitasa están en el núcleo de dicho gránulo multicapa.
- 20 4. Método según la reivindicación 1, donde el ácido fítico y la fitasa están en la misma capa de recubrimiento de dicho gránulo multicapa.
5. Composición de pellet obtenible mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Composición según la reivindicación 5, donde el gránulo comprende un núcleo de sulfato sódico, donde el ácido fítico y la fitasa están incluidos en una capa que rodea el núcleo de sulfato sódico, donde la capa de ácido fítico y fitasa
- 25 comprende almidón, sacarosa y aceite de colza, comprendiendo la composición además:
- (a) un primer recubrimiento externo que comprende sulfato sódico, y un segundo recubrimiento externo que comprende PVA y talco, o
 - (b) un primer recubrimiento externo que comprende PVA y talco, un segundo recubrimiento externo que comprende sacarosa y almidón, y un tercer recubrimiento externo que contiene PVA y talco.

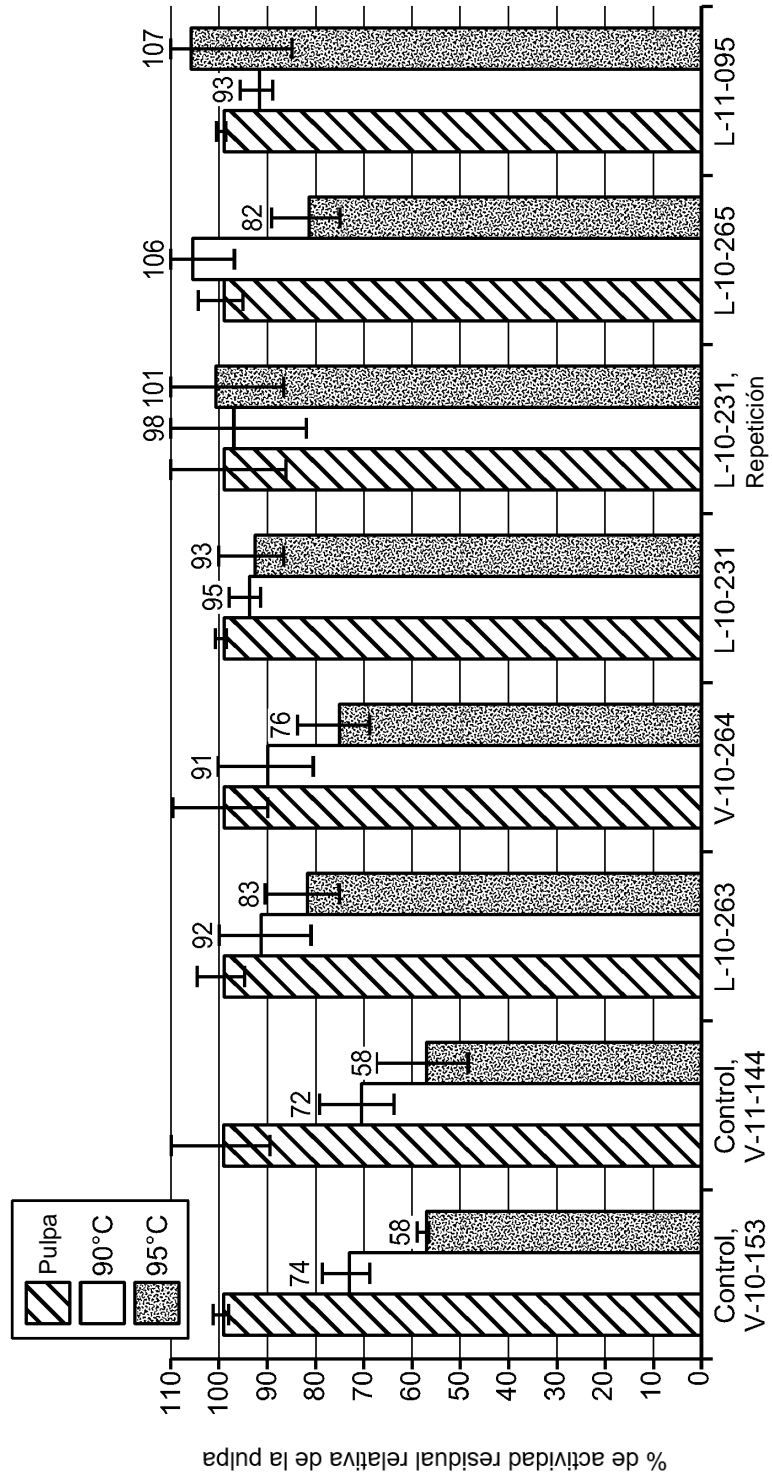


FIG. 1

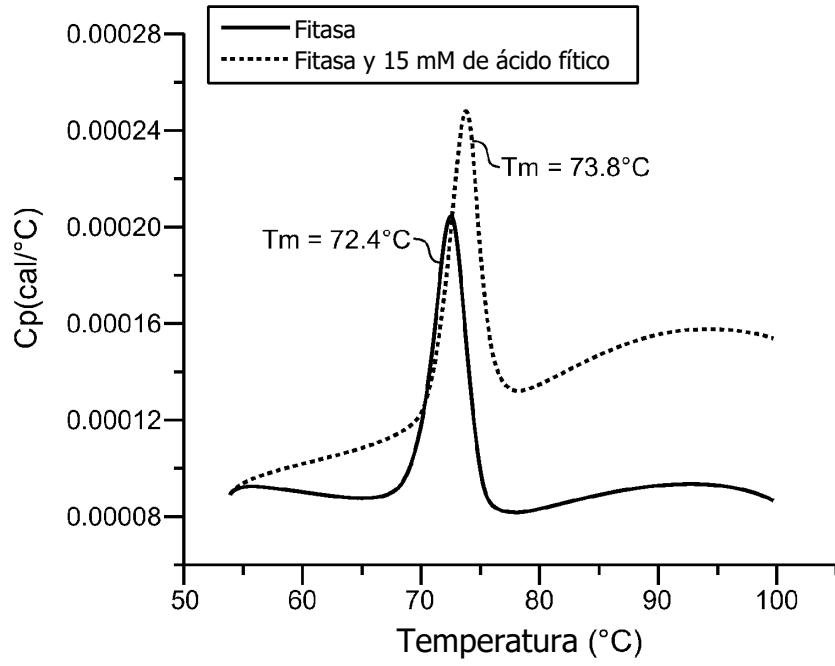


FIG. 2

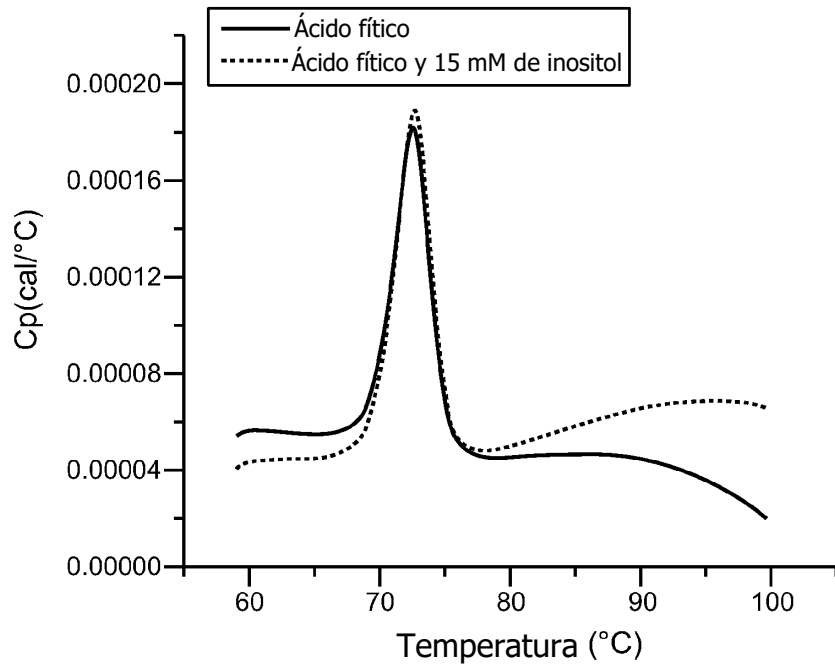


FIG. 3

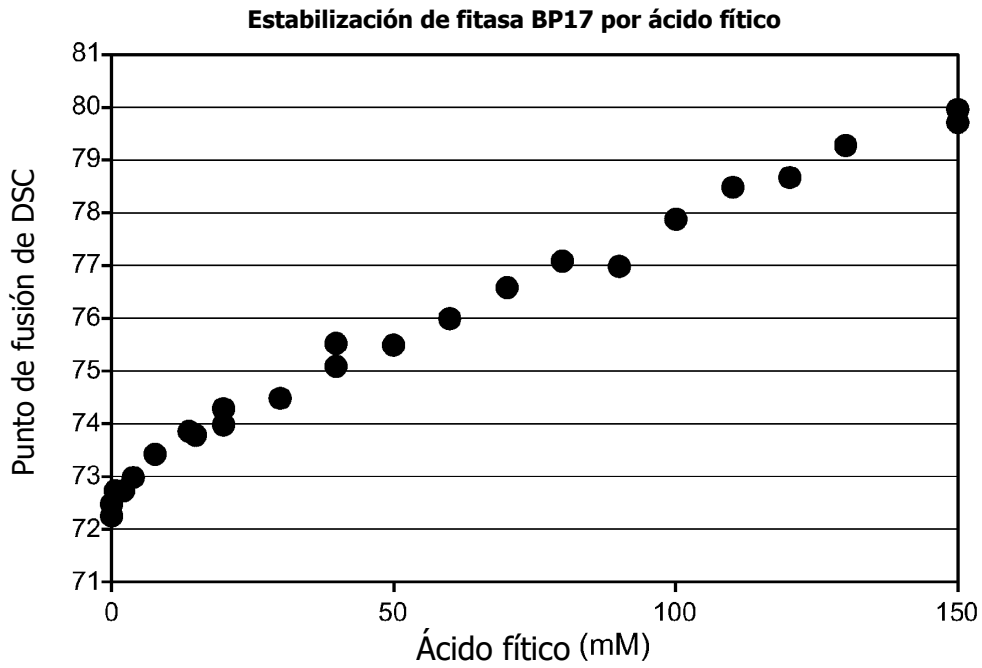


FIG. 4

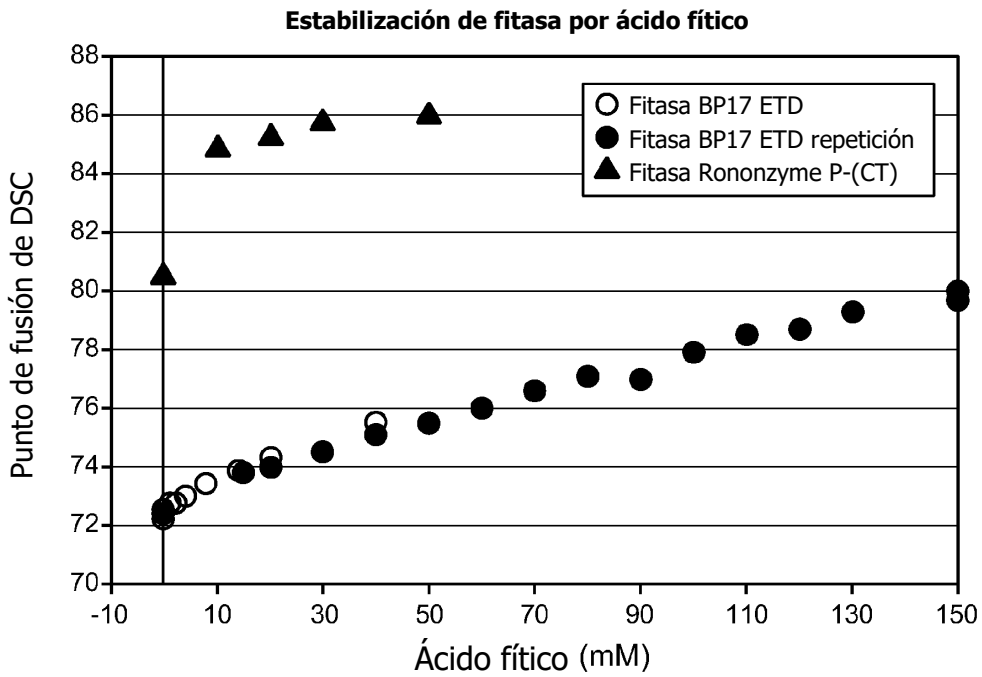


FIG. 5