



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA/ Ma

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

08-12275

54. TÍTULO

EFECTO SINERGICO DE LA COMBINACION DE FITASAS SOBRE LA

HIDROLISIS DE ACIDO FITICO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

ADISSEO FRANCE S.A.S.

DOMICILIO

ANTHONY, FRANCIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438,019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,



PETITORIO



FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

08 Feb. 2008

SOLICITUD DE:			
1 ☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I. (Ver folio 114).		☒ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: ADISSEO FRANCE S.A.S. sociedad constituida y existente bajo las leyes de Francia. Dirección: 42 avenue Aristide Briand, 92160 Antony, Francia Domicilio: Antony, Francia	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>438.019</u> T.P <u>31.929</u>	
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Helene BOZE 420 avenue du Docteur Jacques Fourcade, 34070 Montpellier, Francia 2. Guy MOULIN 130 chemin de la Draille, 34980 Montferrier-sur-lez, Francia		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/FR2006/001652</u> Fecha: <u>7 de julio de 2006</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2007/006952 A1</u> Fecha: <u>18 de enero de 2007</u>			
6 Título (54) <u>EFFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE FITASAS SOBRE LA HIDRÓLISIS DE ÁCIDO FÍTICO</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>C12N 009/016</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>FR</u>	(32) Fecha <u>08 de julio de 2005</u>	(31) Número de Solicitud <u>0507335</u>
9 Comprobante de pago No.: <u>08-9.463</u> Fecha: <u>4 de febrero de 2008</u>			

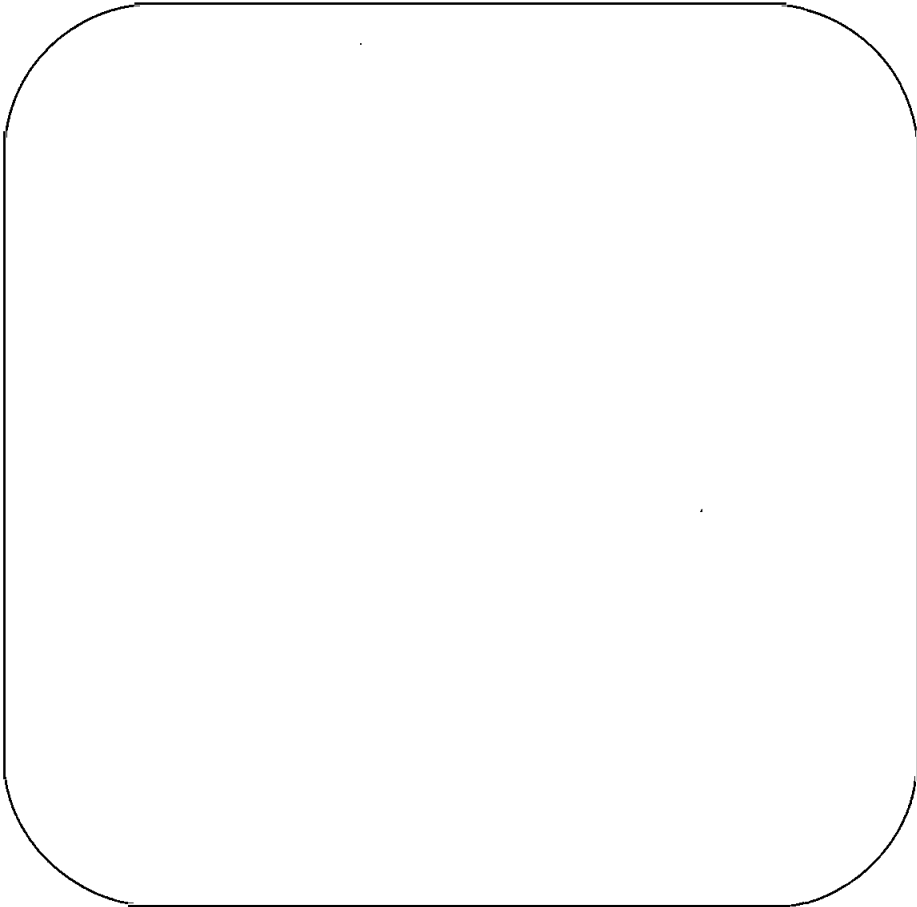
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

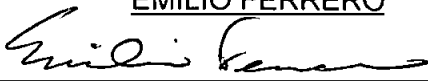
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/006952 A1

Descripción:

Páginas 25 en el idioma original

Páginas 28 en español

Reivindicaciones: Número (s) 22

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION ET POUVOIR

13300
6352

Yo (nosotros), abajo firmado(s) / Je (nous) soussigné (s)

ADISSEO FRANCE S.A.S.domiciliado (s) en/résidant (s) 42, Avenue Aristide Briand,92160 Antony, France

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª

72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el párrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla; cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposición, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o

par cet instrument désigne (désignent) EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 et GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliés à Bogota, Colombie, Carrera 4ª N° 72-35, conformément au paragraphe 1 de l'Article 543 du Code de Commerce, le premier comme principal et les autres comme suppléants, dans leur ordre, comme (mes) (nos) représentants dans toutes les affaires concernant la propriété industrielle ayant la faculté de recevoir les notifications et de nommer des mandataires judiciaires ou extrajudiciaires. Le premier représentant suppléant remplacera le principal en cas d'absence ou d'empêchement temporaire ou définitif de celui-ci. La même règle sera appliquée quand il faudra que le deuxième représentant suppléant remplace le premier, ou le troisième au deuxième. Dans ces cas, le représentant principal, ou le premier ou le deuxième suppléant dans leur cas, ou les deux, déclareront leur intention de ne pas exercer la représentation moyennant déclaration par devant Notaire Public en Colombie, ou par devant Notaire ou tout autre Fonctionnaire Public ou Consul de Colombie à l'étranger; et s'il s'agissait d'empêchement, avec le certificat respectif. Si l'un des nommés venait à manquer définitivement, le suivant prendrait sa place. Quand l'absence ou l'empêchement du représentant principal, ou de son premier ou second suppléant dans leur cas, aura cessé, ils pourront exercer leur représentation dans leur ordre, l'un ou les autres, suivant le cas, l'assumant par le seul fait de l'exercer, cessant à ce moment-là l'exercice de la représentation par le premier, deuxième ou troisième suppléant dans leur cas.

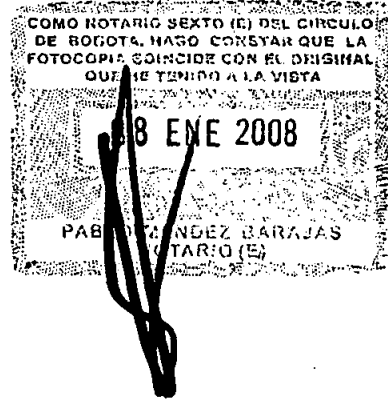
Par ailleurs j'accorde (nous octroyons) pouvoir aux avocats ci-dessus mentionnés pour obtenir la protection de ma (notre) propriété industrielle et contre la concurrence déloyale, à cet effet j'autorise (nous autorisons) lesdits fondés de pouvoir à me (nous) représenter devant toute entité ou personne, avec ou sans juridiction, notamment devant celles d'ordre administratif, contentieux-administratif et judiciaire, ainsi que devant les Tribunaux d'Arbitrage, pour tout ce qui concerne les affaires suivantes: a) l'obtention de brevets d'invention, modèles d'utilité, de dessins industriels; le dépôt de marques de fabrique, collectives, defensives, de services, de slogans, de noms commerciaux, d'enseignes, noms du domaine, de variétés végétales d'appellations d'origine; leur renouvellement, transfert, changement de nom ou de domicile, radiation volontaire, et l'enregistrement des contrats de licence; b) les actions de concurrence déloyale, de protection du consommateur, d'opposition, de radiation administrative ou judiciaire, d'annulation, de contrefaçon, de licences, de tutelle, de protection des secrets industriels, et les procès civils, pénaux, administratifs ou contentieux-administratifs ayant trait à

5

contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.

ces droits; les actions et les procès établis par moi (nous) ou contre moi (nous); et c) afin que pour toutes les questions mentionnées ci-dessus, ils puissent substituer ce pouvoir, transiger, concilier, admettre les faits du procès, se désister, annuler, recevoir, renoncer et ratifier les actes des agents officieux ou des personnes sans mandat.

Dado y firmado hoy / Signé le 04 novembre 2004
en/à Paris X
Por/par Gerard Wolff Directeur Industriel et Qualité
Adideo France SAS X [Signature]
Firma Signature



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de _____
es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de _____
de la compañía ADISSEO FRANCE S.A.S.

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de Francia

que la dirección de dicha compañía es 42, Avenue Aristide Briand, 92160 Antony, Francia

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en _____

El _____

ATTESTATION NOTARIÉE (SOCIÉTÉS)

Je, soussigné Maître Notaire, certifie conforme la signature de Monsieur Jean WOLFF

Par ailleurs, je certifie également que la signataire exerce actuellement la fonction de Directeur Industriel
et qualité de la
société ADISSEO FRANCE S.A.S.

une société légalement constituée et existant selon les lois de France

domiciliée 42, Avenue Aristide Briand, 92160 Antony, France

et que celui-ci est dûment autorisé à concéder le présent document.

Tous les faits précédemment mentionnés ont pu être constatés (au vu des documents dont j'ai pris personnellement connaissance et dont je fais foi.

Fait et signé à PARIS

le 04 Novembre 2004



[Handwritten signature]

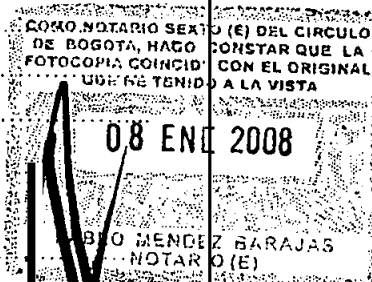
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays: _____
Le present acte public
2. a été signé par _____
3. agissant en qualité de _____
4. est revêtu du sceau/timbre de _____

Attesté

5. à _____
6. le _____
7. par _____
8. sous No. _____
9. Sceau/timbre _____
10. Signature _____

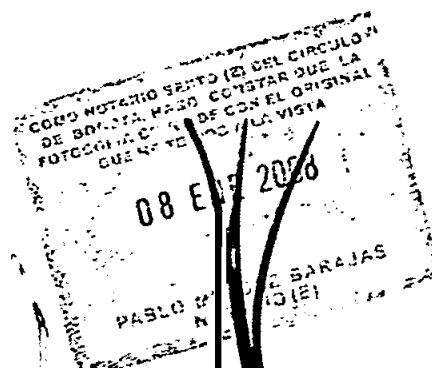
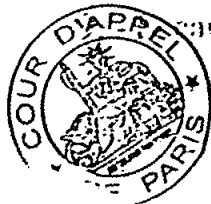


AFOS
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française
- Le présent acte public
2. - a été signé par*Amey*.....
3. - agissant en qualité de*CL*.....
4. - est revêtu du sceau de*Pd*.....

ATTESTE

5. - à Paris *10/11/06*
7. - Par le Procureur
8. - Sous N° *150771*



7

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 433/04 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCÉS, EL CUAL PARA SU IDENTIFICACIÓN SE SELLA CON EL SELLO DEL TRADUCTOR. ESTA ES UNA TRADUCCIÓN OFICIAL EFECTUADA EL DIA 20 DE DICIEMBRE DE 2004 POR JEAN-JACQUES TURPIN, C.E.: 193849 DE BOGOTÁ, TRADUCTOR OFICIAL SEGÚN RESOLUCIÓN No. 2680/91 DEL 19 DE DICIEMBRE DE 1991, EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA.

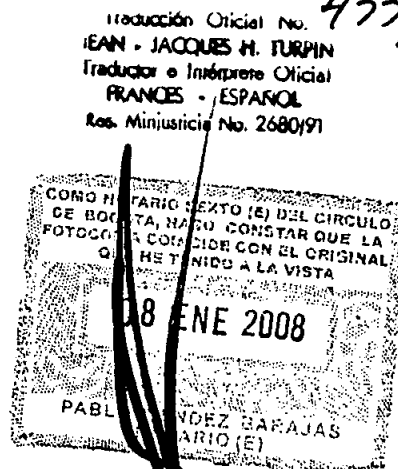
Autenticaciones que se hallan a continuación de un documento de representación y poder conferido en francés y español por **ADISSEO FRANCE S.A.S.** domiciliada en 42, Avenue Aristide Briand, 92160 Antony, Francia y otorgado a los Doctores Emilio Ferrero TPA 31929, Gonzalo Perdomo TPA 831, Luz Clemencia de Paez TPA 23555 y Germán Cavelier TPA 832, todos domiciliados en Bogotá, Colombia, Carrera 4 No. 72-35.

Dado en Paris, el 04 de noviembre de 2004. Firma ilegible del Señor Gérard WOLFF, Director Industrial y Calidad de Adisseo France S.A.S.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDADES) - Legalización, por parte del Notario Pommery, de la firma de **Gérard WOLFF** quien desempeña el cargo de Director Industrial y Calidad de la compañía **ADISSEO FRANCE S.A.S.**, una sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de **Francia**, domiciliada en 42, Avenue Aristide Briand, 92160 Antony, Francia Además, dicho Notario certifica que el signatario tiene facultad para otorgar el presente documento. Los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado en Paris, el 04 de noviembre de 2004. Firma ilegible.

Sello: Bailly – Pommery – Gauro – Notarios Asociados de una SCP - 30, rue de la Boétie, Paris 8°.



8

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. - República Francesa
El presente documento público
2. - ha sido firmado por el Señor Pommery
3. - obrando en calidad de Notario
4. - con sello de su Notaría

CERTIFICADO

5. - En Paris
6. - El 16 de noviembre de 2004
7. - Por el Procurador General ante el Tribunal Superior
8. - Bajo el número 136777
9. - Sello: Tribunal Superior de Paris – República Francesa.
10. - Firma ilegible.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para confrontación y a la cual me remito.

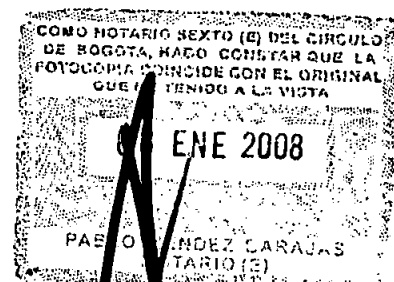
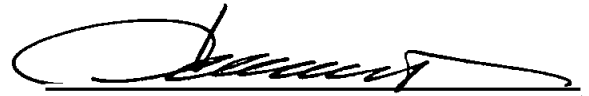
Traducción oficial No. 433/04

Colo: 14605-803-001-7

Traductor: Jean-Jacques Turpin.

Bogotá, D.C., 20 de diciembre de 2004.

Traducción Oficial No. 433/04
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Intérprete Oficial
FRANCOES - ESPAÑOL
Res. Minjusticia No. 2680/91



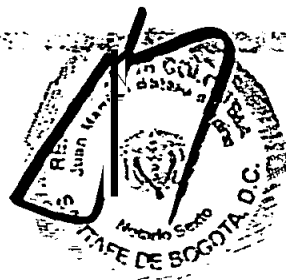
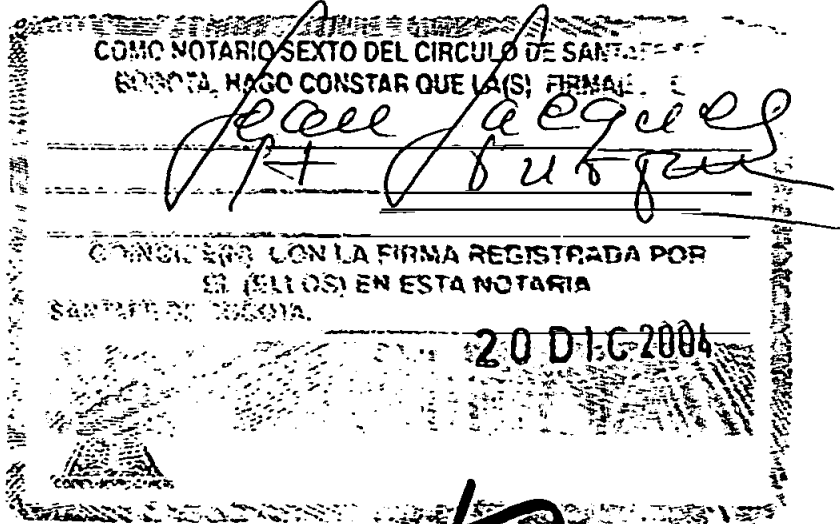
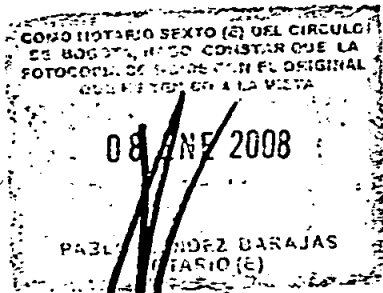
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

072641
Jean Jaquez
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO RESERVENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 DEC 21 A 1:27

ucos
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 janvier 2007 (18.01.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/006952 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 9/16 (2005.01) C12P 3/00 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01) A23K 1/165 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/001652

(22) Date de dépôt international : 7 juillet 2006 (07.07.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0507335 8 juillet 2005 (08.07.2005) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : ADIS-
SEO FRANCE S.A.S. [FR/FR]; 42, avenue Aristide
Briand, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BOZE,
Hélène [FR/FR]; 420, avenue du Docteur Jacques Four-
cade, F-34070 Montpellier (FR). MOULIN, Guy [FR/FR];
130, chemin de la Draille, F-34980 Montferrier-sur-Lez
(FR).

(74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU;
B.P. 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LI, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: SYNERGISTIC EFFECT OF THE COMBINATION OF PHYTASES ON HYDROLYSIS OF PHYTIC ACID

(54) Titre : EFFET SYNERGIQUE DE L'ASSOCIATION DE PHYTASES SUR L'HYDROLYSE DE L'ACIDE PHYTIQUE

(57) Abstract: The invention concerns compositions and methods combining at least two phytases for hydrolyzing phytic acid (myo-inositol hexakis phosphate) into inorganic monophosphates, into myo-inositols with lower degree of phosphorylation and into free myo-inositol. Said compositions and methods are of particular interest for animal feeding.

(57) Abrégé : Compositions et procédés associant au moins deux phytases pour l'hydrolyse de l'acide phytique (myo-inositol hexakis phosphate) en monophosphates inorganiques, en myo-inositols de degré de phosphorylation inférieur et en myo-inositol libre. Ces compositions et procédés présentent en particulier un intérêt pour l'alimentation animale.



WO 2007/006952 A1

**Synergistic effect of the combination of phytases on
hydrolysis of phytic acid**

The invention relates to the synergistic effect of the
5 combination of phytases on phytic acid hydrolysis.

Phytic acid salts (myo-inositol hexakisphosphate) or
phytates (myo-inositol hexakis dihydrogen phosphate)
are the major storage form of phosphorus in cereals,
10 leguminous plants and oil-yielding plants. They thus
constitute the main source of phosphorus in plant-based
animal feeds, the main components in the diets of
monogastric animals (poultry and pigs). However, the
bioavailability of this phosphorus in feeds is limited
15 for these animals. This is because they do not possess
the intestinal enzymes that degrade phytates in
sufficient amount to allow phytate hydrolysis and thus
provide the amounts of inorganic phosphate that they
require. In addition, phytic acid is an antinutritional
20 factor, which forms complexes with proteins and ions
(Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) and thus decreases the
availability of these elements.

The feed intake of poultry and pigs must therefore be
25 supplemented with inorganic phosphate, while the
phosphorus of the phytates is excreted and contributes
to the eutrophication of surface water in areas where
there is intensive rearing of monogastric animals.

30 Phytases (myo-inositol hexakisphosphate 3- and 6-
phosphohydrolases EC 3.1.3.8 and 3.1.3.26) are part of
the family of histidine acid phosphatases. Phytases are
hexakisphosphohydrolases which hydrolyse the
phosphoester bonds in phytic acid or phytate. Thus,
35 they catalyse the hydrolysis of myo-inositol
hexakisphosphate (phytic acid, InsP_6) to inorganic
monophosphates and to myo-inositol phosphates with a

lower degree of phosphorylation (InsP₅ to InsP₁) and to free myo-inositol in certain cases.

- Two classes of phytase exist, differentiated only by the position of the first phosphate hydrolysed. 3-Phytases (EC 3.1.3.8) hydrolyse the phosphate in the 3-position and 6-phytases (EC 3.1.3.26) hydrolyse the phosphate in the 6-position.
- 10 These enzymes, used as an additive in animal nutrition, make it possible, firstly, to increase the availability of the phytic phosphorus and, secondly, to improve the digestibility of the feeds. In addition, the release of phytic phosphate considerably decreases the costs due
- 15 to supplementation with phosphate, and also the pollution caused by an excess of excreted phosphates.

- Phytases are produced by a large variety of organisms: plants, animals and especially microorganisms. These
- 20 phytases have very different biochemical characteristics, in particular their activity as a function of pH and their temperature stability. In addition, these enzymes exhibit differences in terms:
- 25 (a) of their effectiveness in hydrolysing all the phosphates, (b) of their stereospecificity and (c) of their affinity with respect to inositol phosphates.

- Among phytase-producing microorganisms, mention will in particular be made of: fungi of the genera *Aspergillus*,
- 30 *Penicillium*, *Mucor* and *Rhizopus*, bacteria: *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Bacillus subtilis* and yeast: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Torulopsis candida*, *Debaryomyces castellii*, *Debaryomyces occidentalis*
- 35 (synonym *Schwanniomyces castellii*), *Kluyveromyces fragilis*.

Numerous microorganism phytases have already been studied and used in various agro-industrial applications. The effectiveness of these enzymes in the feed and in the course of digestion in the animal depend on their ability to maintain their potential, irrespective of the various conditions encountered during the feed preparation steps and in the digestive tract. Preparation of the feeds requires thermoresistant enzymes, whereas the pH values range, for example, between 5.02, 2.75, 6.28, 6.63 and 5.98 during passage through the various crop, stomach, duodenum, jejunum and ileum compartments of poultry.

Most of the phytases described to date only partially hydrolyse phytic acid and some with very slow kinetics. Thus, numerous phytases hydrolyse only 5 phosphate bonds of phytic acid, i.e. 83% of the potential phosphorus.

To date, among yeast, only the phytase of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* has been described as being capable of hydrolysing all the phosphate bonds of phytate (EP 0 699 762 and Segueilha L., Lambrechts C., Boze H., Moulin G., Galzy P., (1992) Purification and properties of a phytase from *Schwanniomyces castellii*, J. Ferm. Bioeng., 74, 7-11).

Under experimental conditions, complete hydrolysis of phytate or of phytic acid is not, however, obtained.

In order to obtain a more effective hydrolysis of phytic acid, it has thus been proposed to combine various phytases.

WO 98/30681 describes the combination of phytases having various stereospecificities, and in particular the combination of 3-phytase and of 6-phytase. This document describes in particular the combination of a

13

Peniophora lycii 6-phytase and an *Aspergillus niger* 3-phytase (phytase NovoTM).

US 6,183,740 also describes the combination of phytases
5 of various specificities and also the combination with other acid phosphatases.

Complete hydrolysis of phytic acid to phosphate and to inositol is not, however, observed.

10

The problem that the present invention is intended to solve consists in improving the rate and the effectiveness of hydrolysis of phytic acid in order to obtain complete hydrolysis of phytic acid in various
15 agro-industrial applications.

This problem is solved by the compositions and the methods of the present invention in which at least two specific phytases are combined. Advantageously, the
20 compositions of the present invention allow complete hydrolysis of all the phosphate groups of phytic acid by virtue of the synergistic effect observed. Advantageously, the compositions of the present invention are active in a wide pH range suitable for
25 agro-industrial applications of phytases, and in particular for applications in the animal nutrition field. Another advantage of the present invention is that the phytases used are thermostable.

30 Sequence description

- SEQ ID No. 1: *Schwanniomyces castellii* phytase.
- SEQ ID No. 2: *Debaryomyces castellii* phytase.
- SEQ ID No. 3: *Aspergillus niger* phytase.
- 35 SEQ ID No. 4: *Penicillium funiculosum* phytase.
- SEQ ID No. 5: *Peniophora lycii* phytase.
- SEQ ID No. 6: Sequence encoding wheat phytase.
- SEQ ID No. 7: Wheat (*Triticum aestivum*) phytase.

14

Description of the invention

A subject of the invention is a composition combining
5 at least two phytases for the hydrolysis of phytic acid
(myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate),
comprising:

- a first phytase exhibiting at least 80% identity
with the phytase of SEQ ID No. 1 or exhibiting at
10 least 80% identity with the phytase of SEQ ID
No. 2;
- a second phytase exhibiting at least 80% identity
with the phytase of SEQ ID No. 3.

15 Preferably, the first phytase is a 3-phytase which
catalyses the hydrolysis of the six phosphate bonds of
phytic acid.

Preferably, the first phytase has an optimum
20 temperature of between 55°C and 80°C and an optimum pH
of between pH 3.5 and pH 5.

In a preferred embodiment, the first phytase is a
phytase of the yeast *Schwanniomyces castellii* or a
25 phytase of the yeast *Debaryomyces castellii*.

In another preferred embodiment, the first phytase is
the phytase of SEQ ID No. 1 or the phytase of SEQ ID
No. 2.

30 Preferably, the second phytase is a 3-phytase which
catalyses the hydrolysis of at least five phosphate
bonds of phytic acid.

35 Preferably, the second phytase has an optimum
temperature of between 50°C and 60°C and an optimum pH
of between pH 2 and pH 6.

15

In a preferred embodiment, the second phytase is an *Aspergillus niger* phytase.

5 In another preferred embodiment, the second phytase is the phytase of SEQ ID No. 3.

Preferably, the compositions according to the invention consist of a nutritional additive for animals or of an animal feed.

10

A subject of the invention is also the use of a composition according to the invention, for the manufacture of a nutritional additive for animals or of an animal feed.

15

A subject of the invention is also the use of a composition according to the invention, for increasing the availability of phytic phosphorus and improving the digestibility of animal feeds.

20

The present invention also relates to a method of hydrolysis of phytic acid (myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate) to inorganic monophosphates, to myo-inositols with a lower degree of phosphorylation and to free myo-inositol, comprising the following steps:

25

- a first phytase exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 1 or exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 2 is provided;
- 30 - a second phytase exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 3 is provided;
- the phytic acid is simultaneously brought into contact with the first phytase and the second phytase.

35

Preferably, the first phytase is a 3-phytase which catalyses the hydrolysis of the six phosphate bonds of phytic acid.

16

Preferably, the first phytase has an optimum temperature of between 55°C and 80°C and an optimum pH of between pH 3.5 and pH 5.

5

In a preferred embodiment, the first phytase is a phytase of the yeast *Schwanniomyces castellii* or a phytase of the yeast *Debaryomyces castellii*.

- 10 In a particularly advantageous embodiment, the first phytase is the phytase of SEQ ID No. 1 or the phytase of SEQ ID No. 2.

- 15 Preferably, the second phytase is a 3-phytase which catalyses the hydrolysis of at least five phosphate bonds of phytic acid.

- 20 Preferably, the second phytase has an optimum temperature of between 50°C and 60°C and an optimum pH of between pH 2 and pH 6.

In an advantageous embodiment, the second phytase is an *Aspergillus niger* phytase.

- 25 In a particularly advantageous embodiment, the second phytase is the phytase of SEQ ID No. 3.

A subject of the invention is also a kit or assembly for feeding animals, comprising:

- 30 - the *Schwanniomyces castellii* phytase of SEQ ID No. 1 or the *Debaryomyces castellii* phytase of SEQ ID No. 2;
- the *Aspergillus niger* phytase of SEQ ID No. 3.

- 35 The compositions according to the invention combine a first phytase exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 1 or exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 2; and a second

77

phytase exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 3.

Surprisingly, this specific combination of phytases makes it possible to obtain a synergistic effect on the hydrolysis of phytic acid. The compositions according to the invention thus catalyse a rapid and complete hydrolysis of phytic acid in a wide pH range.

10 The term "phytase" is intended to mean myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (EC 3.1.3.8 and 3.1.3.26). These enzymes catalyse the hydrolysis of myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (phytic acid, InsP_6) to inorganic monophosphates and to myo-inositol
15 phosphate with a lower degree of phosphorylation (InsP_5 to InsP_1) and to free myo-inositol for certain phytases.

The compositions according to the invention comprise a
20 first phytase exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 1 or exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 2.

The phytase of SEQ ID No. 1 is a phytase of the yeast
25 *Schwanniomyces castellii*, while the phytase of SEQ ID No. 2 is a phytase of the yeast *Debaryomyces castellii*.

These phytases have very similar catalytic properties and are therefore interchangeable in the phytase
30 combinations according to the invention.

Preferably, the first phytase exhibits at least 80%, 90%, 95%, 98%, and preferably at least 99%, of amino acids that are identical with the phytase of SEQ ID
35 No. 1 or exhibit at least 80%, 90%, 95%, 98%, and preferably at least 99%, of amino acids identical with the phytase of SEQ ID No. 2.

18

- Preferably, the first phytase has the same properties and in particular the same catalytic properties as the phytases of SEQ ID No. 1 and of SEQ ID No. 2. Preferably, the first phytase is isolated from other strains of *Schwanniomyces castellii* or of *Debaryomyces castellii* or from other yeast. Alternatively, the first phytase can be obtained by site-directed mutagenesis techniques, for example.
- 10 The expression "amino acids that are identical" is intended to mean amino acids which do not vary between two sequences. The first phytase can exhibit a deletion, an addition or a substitution of at least one amino acid with respect to the phytases of SEQ ID No. 1 or of SEQ ID No. 2.

The phytases of SEQ ID No. 1 and of SEQ ID No. 2 have common catalytic properties. According to the invention, the first phytase used in the compositions and the methods according to the invention exhibit a degree of identity with the phytase of SEQ ID No. 1 or of SEQ ID No. 2 and conserve these common catalytic properties.

- 25 Preferably, the first phytase has 3-phytase activity. Preferably, the first phytase catalyses the hydrolysis of the six phosphate bonds of phytic acid.

The 3-phytases (EC 3.1.3.8) hydrolyse firstly the phosphate in the 3-position.

- A phytase capable of hydrolysing all the phosphate bonds of phytic acid (1-, 2-, 3-, 4-, 5- and 6-positions) catalyses the hydrolysis of myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (phytic acid, InsP_6) to inorganic monophosphates and to free myo-inositol.

19

Many phytases hydrolyse only 5 phosphate bonds of phytic acid, i.e. 83% of the potential phosphorus. These enzymes hydrolyse phytic acid to myo-inositol monophosphate but not to free myo-inositol.

5

The expression "activity of the phytase" is intended to mean the enzymatic activity of the phytase. This activity is expressed in International Units (I.U.) per milligram of protein. One I.U. of enzymatic activity is the catalytic ability to convert one micromole of substrate per unit of time, at a given pH and at a given temperature.

Preferably, the first phytase has an optimum temperature of between 55°C and 80°C and an optimum pH of between pH 3.5 and pH 5.

In a preferred embodiment, the first phytase is a phytase of the yeast *Schwanniomyces castellii* or a phytase of the yeast *Debaryomyces castellii*.

In another particularly advantageous embodiment, the first phytase is the phytase of SEQ ID No. 1 or the phytase of SEQ ID No. 2.

25

The compositions according to the invention comprise at least a second phytase exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 3.

The phytase of SEQ ID No. 3 is a phytase of the filamentous fungus *Aspergillus niger*.

Preferably, the second phytase exhibits at least 80%, 90%, 95%, 98%, and preferably at least 99%, of amino acids that are identical with the phytase of SEQ ID No. 3.

35

20

Preferably, the second phytase conserves the properties and in particular the catalytic properties of the phytase of SEQ ID No. 3. Preferably, this phytase is isolated from other strains of *Aspergillus niger* or
5 from other filamentous fungi. Alternatively, this phytase can be obtained by site-directed mutagenesis techniques, for example.

The expression "amino acids that are identical" is
10 intended to mean amino acids which do not vary between two sequences. The second phytase can exhibit a deletion, an addition or a substitution of at least one amino acid with respect to the phytase of SEQ ID No. 3.

15 According to the invention, the second phytase used in the compositions and the methods of the invention therefore exhibits a degree of identity with the phytase of SEQ ID No. 3 and conserves the catalytic properties of the latter.

20 Preferably, the second phytase is a 3-phytase which catalyses the hydrolysis of at least five phosphate bonds of phytic acid.

25 Preferably, the second phytase has an optimum temperature of between 50°C and 60°C and an optimum pH of between pH 2 and pH 6. Even more preferably, the second phytase has a first optimum pH of between pH 2.5 and 3.5 and a second optimum pH of between pH 4.5 and
30 5.5.

In a preferred embodiment, the second phytase is an *Aspergillus niger* phytase.

35 In an advantageous embodiment, the second phytase is the phytase of SEQ ID No. 3.

21

The enzymatic activity of a phytase varies in particular as a function of the pH. Phytases thus have pH ranges (or spheres) in which their enzymatic activity is higher or optimal. The term "range" is intended to mean a given pH sphere or interval. Two phytases have enzymatic activities in complementary pH ranges when these phytases have an activity in different pH ranges. Preferably, these ranges overlap or partially superimpose. Typically, the phytases have a higher enzymatic activity at an acidic pH. Two phytases having complementary pH ranges have thus, for example, a maximum enzymatic activity between pH 2 and pH 4 for the first phytase and a maximum enzymatic activity between pH 4 and pH 6 for the second phytase. In the compositions and the methods of the present invention, the first and the second phytase preferably have complementary pH ranges or complementary optimum pHs. The compositions and the methods according to the invention thus allow hydrolysis of phytic acid in a wide pH range.

The methods of measuring and of identifying the degree of identity between polypeptides are known to those skilled in the art. Use may, for example, be made of Vector NTi 9.1.0, alignment program AlignX (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>). Preferably, the default parameters are used.

The phytases of the compositions and methods according to the invention are isolated or purified from their natural environment. The phytases can be prepared by means of various methods. These methods are in particular purification from natural sources such as cells naturally expressing these phytases, production of recombinant phytases by appropriate host cells and subsequent purification thereof, production by chemical synthesis or, finally, a combination of these various

22

approaches. These various methods of production are well known to those skilled in the art. Thus, the phytases used in the compositions and the methods of the present invention can be isolated from
5 *Schwanniomyces castellii*, from *Debaryomyces castellii* or from *Aspergillus niger*. In another embodiment, the phytases of the present invention are isolated from recombinant host organisms.

10 Preferably, the compositions according to the invention consist of a nutritional additive for animals or of animal feed.

A subject of the invention is also the use of a
15 composition according to the invention, for the manufacture of a nutritional additive for animals or of an animal feed.

The present invention therefore also relates to feed
20 additives that provide a phytase activity. The provision of this type of enzymatic activity makes it possible to improve the digestibility of the feed and to improve its nutritional value.

25 The term "nutritional additive" is intended to mean a substance intentionally added to a feed, generally in small amounts, so as to improve its nutritional characteristics or its digestibility. The nutritional additives for animals can, for example, contain
30 vitamins, mineral salts, amino acids and enzymes.

The present invention also relates to the animal feeds. These feeds are usually in the form of meals or of granules into which the additives according to the
35 invention are incorporated. The term "feed" is intended to mean anything that can be used for feeding animals. For the intensive rearing of animals, the animal feeds usually comprise a nutritional base and nutritional

23

additives. The term "nutritional base" is intended to mean that which constitutes most of the animal's food intake, consisting, by way of example, of a mixture of cereals, of proteins and of fats of animal and/or plant
5 origin.

The nutritional bases for animals are suitable for the diet of these animals and are well known to those skilled in the art. Usually, these nutritional bases
10 comprise, for example, maize, wheat, pea and soybean. These nutritional bases are suited to the needs of the various animal species for which they are intended. These nutritional bases may already contain nutritional additives such as vitamins, mineral salts and amino
15 acids.

In a preferred embodiment, the invention relates to feeds for monogastric animals, and in particular for poultry and pigs. The poultry comprise in particular
20 laying hens, chickens for meat, turkeys and ducks. The pigs comprise in particular growing and finishing pigs and also piglets.

A subject of the invention is also the use of a
25 composition according to the invention, for increasing the availability of phytic phosphorus and improving the digestibility of animal feeds.

The compositions and the methods according to the
30 invention combine a first phytase capable of hydrolysing all the phosphate bonds of phytic acid, chosen from *Schwanniomyces castellii* phytases and *Debaryomyces castellii* phytases, and a second phytase capable of hydrolysing at least five phosphate bonds of
35 phytic acid and having an enzyme activity in a pH range complementary to the pH range of the first phytase.

Figures

24

Figure 1: Comparison of the kinetics of hydrolysis of phytic acid at various pHs for the 6 phytases alone or combined in pairs. The results are expressed as % of theoretical phosphates released.

Figure 2: Percentage hydrolysis of phytic acid by the various phytases after reaction for 120 minutes. (A) phytases alone, (B) combined phytases. The dotted lines correspond to the hydrolysis of 5 phosphate bonds.

Figure 3: Comparison of the initial rates of hydrolysis of phytic acid ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) for 6 phytases at various pHs. (A) phytases alone, (B) combined phytases. The rates are calculated during the first 10 minutes of the reaction.

Examples

Materials and methods

1. Phytase origins

■ *Aspergillus niger* Natuphos (AN): batch R2503 or batch 057NPHO2

Wim van Hartingsveldt, Cora M. J. van Zeijl, G. Marian Hartevelde, Robin J. Gouka, Marjon E.G. Suykerbuyk, Ruud G. M. Luiten, Peter A. van Paridon, Gerard C. M. Selten, Annemarie E. Veenstra, Robert F. M. van Gorcom and Cees A. M. J. van den Hondel; Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. Gene, 127, (1) 87-94 (1993)

■ *Peniophora lycii* (PL): batch 172NHSO2
Lassens, S.F., Breinholt, J., Ostergaard, P.R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M. and Fuglsang, C.C.; Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp.,

and *Trametes pubescens*. Appl. Environ. Microbiol. 67 (10), 4701-4707 (2001)

▪ *Penicillium funiculosum* (PF): Godo A1346 batch 1301

5 WO 03054199

▪ Wheat (B): Sigma reference P1259.

WO 0183763

▪ *Schwanniomyces castellii* (SC): produced in *Candida boidinii* batch 10059 CN 25

10 EP 0931837

▪ *Debaryomyces castellii* strain CBS 2923 (DC).

2. Enzymatic method

The phytase activity is measured by following the
15 release of inorganic phosphate over time.

The activity is measured in the presence of 8 mM of sodium phytate (Sigma) dissolved in a 200 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, at 37°C (5 volumes). The
20 reaction is triggered by the addition of the enzymatic extract (1 volume). The reaction is stopped by acidification of the medium with 20% trichloroacetic acid (1 volume of reaction medium + 1 volume of acid). The amount of phosphate released is determined after
25 various incubation times.

One enzymatic unit (U) is defined as the amount of enzyme which releases one μ mole of inorganic phosphate in one minute.

30

3. Conditions for hydrolysis of phytates at various pHs

The hydrolysis is carried out at 40°C in 10 ml of 250 mM acetate buffer for pHs 4 to 6.5 or of 200 mM glycine buffer at pH 3, containing: 0.340 mM of sodium
35 phytate, 0.04 or 0.08 U/ml of phytase. Samples are taken at various times for 120 minutes. The reaction is stopped by the addition of trichloroacetic acid.

26

The phosphates are assayed directly without dilution.

4. Phosphate assay

The amount of phosphate released is visualized by colorimetry. The visualizing solution, prepared extemporaneously, contains iron sulphate (380 mM, 1 volume) and ammonium heptamolybdate (12 mM, 4 volumes). The absorbance is measured at 700 nm after visualization for 30 minutes at ambient temperature (1 volume of reaction medium + 1 volume of visualizing solution), using a UV/visible spectrophotometer (Beckman DU 530).

A calibration line is established beforehand with potassium dihydrogen phosphate.

Results

1. Phytases tested

The phytases tested differ from one another according to various criteria: (1) biochemical characteristics (optimum pH, stereospecificity: 3, 4, or 6 phytases), (2) number of phosphate bonds hydrolysed.

All these phytases have an optimum hydrolysis pH close to 5; however, the AN and PL phytases have a second optimum pH at 2.5. Three completely hydrolyse the phosphates (SC, DC, wheat). The position hydrolysed first is either the 3-position (AN, PL, DC) or the 6-position (PL), or the 4-position (wheat) (Table 1).

Table 1: Comparison of the biochemical characteristics of the phytases

Origin	Km (µM)	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Number of phosphate bonds hydrolysed	Stereospecificity (order of hydrolysis of phosphate bonds)
<i>Aspergillus niger</i> ⁽¹⁾	40/27	2.5-5.5	55/58	5	3/4/5/6/1

2A

<i>Peniophora lycii</i> ⁽¹⁾	33	2.5-5.5	58	5	6/3 (pH5.5) 3.6 (pH3 and 5.5)
<i>Penicillium funiculosum</i> ⁽²⁾	550	4-5	50	5 or 6	3/4
Wheat ⁽³⁾	22	5-7	55	6	4/3/5/6/1/2
<i>Schwanniomyces castellii</i> ⁽⁴⁾	38	4.4	77	6	?
<i>Debaryomyces castellii</i>	236	4-4.5	60	6	3/4/5/6/1-2

(1) Ullah, A.H.J. and Sethumadhavan, K., (2003) PhyA gene product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. Biochemical and Biophysical Research Communications 303: 463-468

5 (2) WO 03054199 filed June 13, 2003 Bohlmann, R., Moussu, F., Nore, O., Pierrard, J., Saunier, D., Testeniere, O., New polynucleotide encoding fungal phytase, useful as feed additive to improve phosphate assimilation, also new strain of *Penicillium*.

10 (3) Nakano, T., Joh, T., Narita, K., Hayakawa, T. (2000) The pathway of dephosphorylation of myo-Inositol Hexakisphosphate by Phytases from Wheat Bran of *Triticum aestivum* L. cv Nourin#61. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64:995-1003

15 (4) Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G. and Galzy, P. (1992) Purification and Properties of the Phytase from *Schwanniomyces castellii*. J. Ferment. Bioeng. 74(1):7-11.

20 2. Comparison of the effectiveness of phytic acid hydrolysis by 6 phytases at various pHs

The study is carried out in the presence of 0.340 mM of phytate. The amount of enzyme introduced corresponds to
 25 0.08 U/ml of phytase, measured under standard conditions at pH 5.5. The pH values tested are 3, 4, 5.5, 6, 6.5. The reaction is followed for 120 minutes. Samples are taken over time, the reaction is stopped by

28

acidification, and the phosphates are assayed by colorimetry.

5 The comparison of the various phytases is carried out as a function of the hydrolysis efficiency, i.e. the percentage of phosphate released relative to the theoretical percentage. The results are expressed in Figure 1A.

10 According to the literature, 4 phytases (PF, SC, DC, B) are capable of completely hydrolysing phytic acid to inositol and phosphate; 2 phytases (AN and PL) hydrolyse only 5 bonds, i.e. 83% of the potential phosphorus.

15 Under the conditions tested at pH 3 and pH 4, 4 phytases (SC, PF, DC and PL) hydrolyse at least 80% of the phytic acid. The wheat phytase is not very active at pH 3 and pH 4. For pH values above pH 5.5, no
20 phytase hydrolyses more than 70% of the phytic acid. The PF and DC phytases are not very active at pH 6.5. The AN phytase is the least sensitive to variations in pH; however, it releases only 60 to 70% of the phosphates, i.e. values 10 to 20% lower than those
25 expected (Fig. 2A).

The comparison of the initial rates of phosphate release show a great deal of heterogeneity between the phytases (Fig. 3A). The most efficient phytase at
30 acidic pH is that of *Schwanniomyces castellii*, whereas that of *A. niger* is the most efficient at pH values above 5.5. The wheat phytase is the least efficient irrespective of the conditions tested.

35 **3. Influence of pH on the rate of phosphate release in the presence of combined phytases**

29

In order to improve the efficiency of phytic acid hydrolysis, several combinations of two phytases are tested. Each phytase is introduced at 0.04 U/ml, i.e. a total value of 0.08 U/ml in the reaction tube. The DC
5 phytase, which hydrolyses 6 phosphate bonds, is systematically tested in combination with the other phytases, which hydrolyse 5 or 6 phosphate bonds. Two other combinations are also used to compare, firstly, another combination of phytases able to release 6 and 5
10 phosphates (SC/AN) and, secondly, two phytases, PL/AN, having very similar biochemical characteristics (Fig. 1B).

An overall analysis makes it possible to show that the
15 combination of 2 phytases mostly promotes the efficiency of phytic acid hydrolysis. Although, under the same conditions, no phytase completely hydrolyses phytic acid, for 2 mixtures (DC/AN and SC/AN), 100% to 85% of the phosphate bonds are hydrolysed whatever the
20 pH. For the DC/PL combination, a gain of approximately 20% at acidic pHs is also observed. The PL/AN, DC/PL and DC/SC combinations provide little improvement (Fig. 2B).

25 The comparison of the initial hydrolysis rates shows that a strong synergistic effect exists for the SC/AN combination and for the DC/AN combination compared with the phytases alone and compared with the other phytase combinations. The pH-related differences in hydrolysis
30 rate are minimized when the combination is used. The other combinations are less efficient, the synergistic effect is visible only for certain pHs, for example for DC/PL at pH 3 and pH 4 (Fig. 3).

35 The synergistic effect appears to be due, to a large extent, to the ability of the phytases to hydrolyse all the phosphates. In addition, the best combinations concern phytases having complementary optimum pHs for

activity (2.5-4.5). It should, however, be noted that there is little synergistic effect for the phytases that are the least effective in terms of hydrolysis efficiency, such as that of wheat and of *Penicillium*
5 *funiculosum*.

4. Influence of the concentrations and of the proportion of phytases on the efficiency of phytic acid hydrolysis

10

We compared the influence of the amount of phytase (dose effects) and of the proportion of the mixture of phytases on phytic acid hydrolysis. Three combinations were used, DC/AN, DC/PL and AN/PL, and 2 phytase
15 concentrations (0.04 and 0.08 U/ml) were tested (Tables 2 and 3).

Table 2: Comparison of the percentage phytic acid hydrolysis for the various combinations, tested at two
20 final concentrations, 0.04 and 0.08 U/ml. The first three columns give the values for the three phytases alone at the concentration 0.08 U/ml.

31

	AN (0.08U)	DC (0.08U)	PL (0.08U)	AN/DC (0.08U)	AN/DC (0.04U)
pH 3	66	82	80	92	67 (73%)
pH 4	69	85	83	95	96 (101%)
pH 5.5	55	63	67	92	81 (87%)
pH 6	72	42	64	94	78 (83%)
pH 6.5	63	6	34	75	42 (56%)

	PL/DC (0.08U)	PL/DC (0.04U)	AN/PL (0.08U)	AN/PL (0.04U)
pH 3	94	70 (74%)	79	56 (72%)
pH 4	100	93 (94%)	86	76 (89%)
pH 5.5	85	71 (84%)	70	66 (94%)
pH 6	85	47 (56%)	74	67 (90%)
pH 6.5	35	10 (30%)	61	52 (86%)

The values between parentheses represent the ratio of the values obtained with 0.04 U/ml to those in the presence of 0.08 U/ml.

5

The percentages of hydrolysis during the study with the mixture of enzymes (overall concentration 0.08 U/ml) are higher than those determined with the enzymes alone (0.08 U/ml) and close to 100% for the AN/DC and PL/DC mixtures, in a pH range varying from 3 to 6. The AN/PL mixture does not significantly increase the percentage hydrolysis observed with each phytase taken separately. The 2-fold reduction of the overall amount provided (0.04 U/ml) does not induce a 2-fold decrease in released phosphates. In certain cases, AN/DC and PL/DC at pH 4 and pH 5.5, and AN/PL at pHs 4 to 6, the percentages of hydrolysis are equivalent to those observed in the presence of 0.08 U/ml (Table 3).

15

32

Table 3: Comparison of the initial rates of hydrolysis ($\mu\text{mol/ml/min}$) of phytic acid for the various combinations, tested at two final concentrations 0.04 and 0.08 U/ml.

- 5 The first three columns give the values for the three phytases alone at the concentration 0.08 U/ml.

	AN (0.08U)	DC (0.08U)	PL (0.08U)	AN/DC (0.08U)	AN/DC (0.04U)
pH 3	2.04	1.78	2.52	4.00	1.70 (42%)
pH 4	4.98	3.96	5.36	6.49	2.85 (44%)
pH 5.5	7.76	1.56	4.00	7.26	1.86 (26%)
pH 6	7.91	0.39	2.87	7.53	1.04 (14%)
pH 6.5	5.09	0.00	0.85	3.71	0.26 (7%)

	PL/DC (0.08U)	PL/DC (0.04U)	AN/PL (0.08U)	AN/PL (0.04U)
pH 3	3.88	1.45 (37%)	2.18	1.60 (73%)
pH 4	8.61	3.33 (39%)	4.29	2.73 (63%)
pH 5.5	3.79	0.85 (22%)	4.56	2.82 (62%)
pH 6	2.10	0.04 (2%)	3.96	2.60 (66%)
pH 6.5	0.22	0.00 (0%)	1.89	0.74 (39%)

- 10 The values between parentheses represent the ratio of the rates obtained with 0.04 U/ml to those in the presence of 0.08 U/ml.

- 15 The combination of phytase therefore makes it possible to decrease the amount of phytase in the reaction medium by a factor two, while maintaining an identical hydrolysis efficiency, within a broad pH range. There is a clear dose effect on the release of phosphate.

- 20 On the other hand, the initial rates of phytic acid hydrolysis are at least two times lower in the presence

33

of 0.04 U/ml of phytase than in the presence of 0.08 U/ml (Table 3). These results support the hypothesis that the synergy between the phytases essentially allows complete hydrolysis of the phosphates present.

The proportion of each phytase in the reaction medium does not appear to have a great deal of influence on the hydrolysis efficiency (Table 4). In all the cases, an increase in the amount of phosphate released is observed, with a slight advantage for a combination containing 50% of each phytase, mainly for pHs above 5.5.

Table 4: Comparison of the percentage phytic acid hydrolysis as a function of the proportion of each phytase in the mixture. In all cases, the overall amount remains 0.08 U/ml.

Proportion of phytases	AN	DC	AN/DC (1/1)	AN/DC (1/2)	AN/DC (2/1)
pH 3	66	82	92	90	88
pH 4	69	85	95	93	93
pH 5.5	55	63	92	79	79
pH 6	72	42	94	87	86
pH 6.5	63	6	75	52	64

Under our experimental conditions, no phytase completely hydrolyses phytic acid to inositol and phosphates, although 4 of them are capable of releasing all the phosphates according to the literature. Four phytases SC, PF, DC and PL, hydrolyse 80% of the phosphate bonds at pH values of 3 and 4. Two mixtures, DC/AN and SC/AN, hydrolyse from 80% to 100% of the phosphate bonds at all the pHs tested.

34

The combination of phytase of 3-phytase (AN, DC, PF), 4-phytase (B) or 6-phytase (PL) type, with one another, does not provide any notable improvement.

- 5 The complementation and the synergy between phytases appears to depend on 2 criteria specific to each phytase: (1) on their profile of activity as a function of pH, (2) on their ability to hydrolyse, or not, all the phosphates.

10

- The use of such combinations in animal nutrition could make it possible to decrease the amounts of phytases used by at least 20% and therefore to reduce costs. The content of phosphate of phytic origin in the feed would
15 also be increased, improving the food value and thus making it possible to decrease the intake of inorganic phosphate. The pollution caused by unavailable phosphate waste would thus be decreased.

38

CLAIMS

1. Composition combining at least two phytases for
the hydrolysis of phytic acid (myo-inositol
5 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate), characterized in
that it comprises:
 - a) a first phytase exhibiting at least 80%
identity with the phytase of SEQ ID No. 1 or
exhibiting at least 80% identity with the
10 phytase of SEQ ID No. 2;
 - b) a second phytase exhibiting at least 80%
identity with the phytase of SEQ ID No. 3.
2. Composition according to Claim 1, characterized in
15 that the first phytase is a 3-phytase which
catalyses the hydrolysis of the six phosphate
bonds of phytic acid.
3. Composition according to one of the preceding
20 claims, characterized in that the first phytase
has an optimum temperature of between 55°C and
80°C and an optimum pH of between pH 3.5 and pH 5.
4. Composition according to one of the preceding
25 claims, characterized in that the first phytase is
a phytase of the yeast *Schwanniomyces castellii* or
a phytase of the yeast *Debaryomyces castellii*.
5. Composition according to one of the preceding
30 claims, characterized in that the first phytase is
the phytase of SEQ ID No. 1 or the phytase of SEQ
ID No. 2.
6. Composition according to one of the preceding
35 claims, characterized in that the second phytase
is a 3-phytase which catalyses the hydrolysis of
at least five phosphate bonds of phytic acid.

36

7. Composition according to one of the preceding claims, characterized in that the second phytase has an optimum temperature of between 50°C and 60°C and an optimum pH of between pH 2 and pH 6.
- 5
8. Composition according to one of the preceding claims, characterized in that the second phytase is an *Aspergillus niger* phytase.
- 10
9. Composition according to one of the preceding claims, characterized in that the second phytase is the phytase of SEQ ID No. 3.
- 15
10. Composition according to one of the preceding claims, characterized in that it consists of a nutritional additive for animals or of an animal feed.
- 20
11. Use of a composition according to one of Claims 1 to 9, for the manufacture of a nutritional additive for animals or of an animal feed.
- 25
12. Use of a composition according to one of Claims 1 to 10, for increasing the availability of phytic phosphorus and improving the digestibility of animal feeds.
- 30
13. Method of hydrolysis of phytic acid (myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate) to inorganic monophosphates, to myo-inositols with a lower degree of phosphorylation and to free myo-inositol, characterized in that it comprises the following steps:
- 35
- a) a first phytase exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 1 or exhibiting at least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 2 is provided;

37

- b) a second phytase exhibiting a least 80% identity with the phytase of SEQ ID No. 3 is provided;
- c) the phytic acid is simultaneously brought into contact with the first phytase and the second phytase.
14. Method according to Claim 13, characterized in that the first phytase is a 3-phytase which catalyses the hydrolysis of the six phosphate bonds of phytic acid.
15. Method according to either of Claims 13 and 14, characterized in that the first phytase has an optimum temperature of between 55°C and 80°C and an optimum pH of between pH 3.5 and pH 5.
16. Method according to one of Claims 13 to 15, characterized in that the first phytase is a phytase of the yeast *Schwanniomyces castellii* or a phytase of the yeast *Debaryomyces castellii*.
17. Method according to one of Claims 13 to 16, characterized in that the first phytase is the phytase of SEQ ID No. 1 or the phytase of SEQ ID No. 2.
18. Method according to one of Claims 13 to 17, characterized in that the second phytase is a 3-phytase which catalyses the hydrolysis of at least five phosphate bonds of phytic acids.
19. Method according to one of Claims 13 to 18, characterized in that the second phytase has an optimum temperature of between 50°C and 60°C and an optimum pH of between pH 2 and pH 6.

38

20. Method according to one of Claims 13 to 19, characterized in that the second phytase is an *Aspergillus niger* phytase.
- 5 21. Method according to one of Claims 13 to 20, characterized in that the second phytase is the phytase of SEQ ID No. 3.
- 10 22. Kit or assembly for feeding animals, characterized in that it comprises:
- a) the *Schwanniomyces castellii* phytase of SEQ ID No. 1 or the *Debaryomyces castellii* phytase of SEQ ID No. 2;
 - b) the *Aspergillus niger* phytase of SEQ ID No. 3.

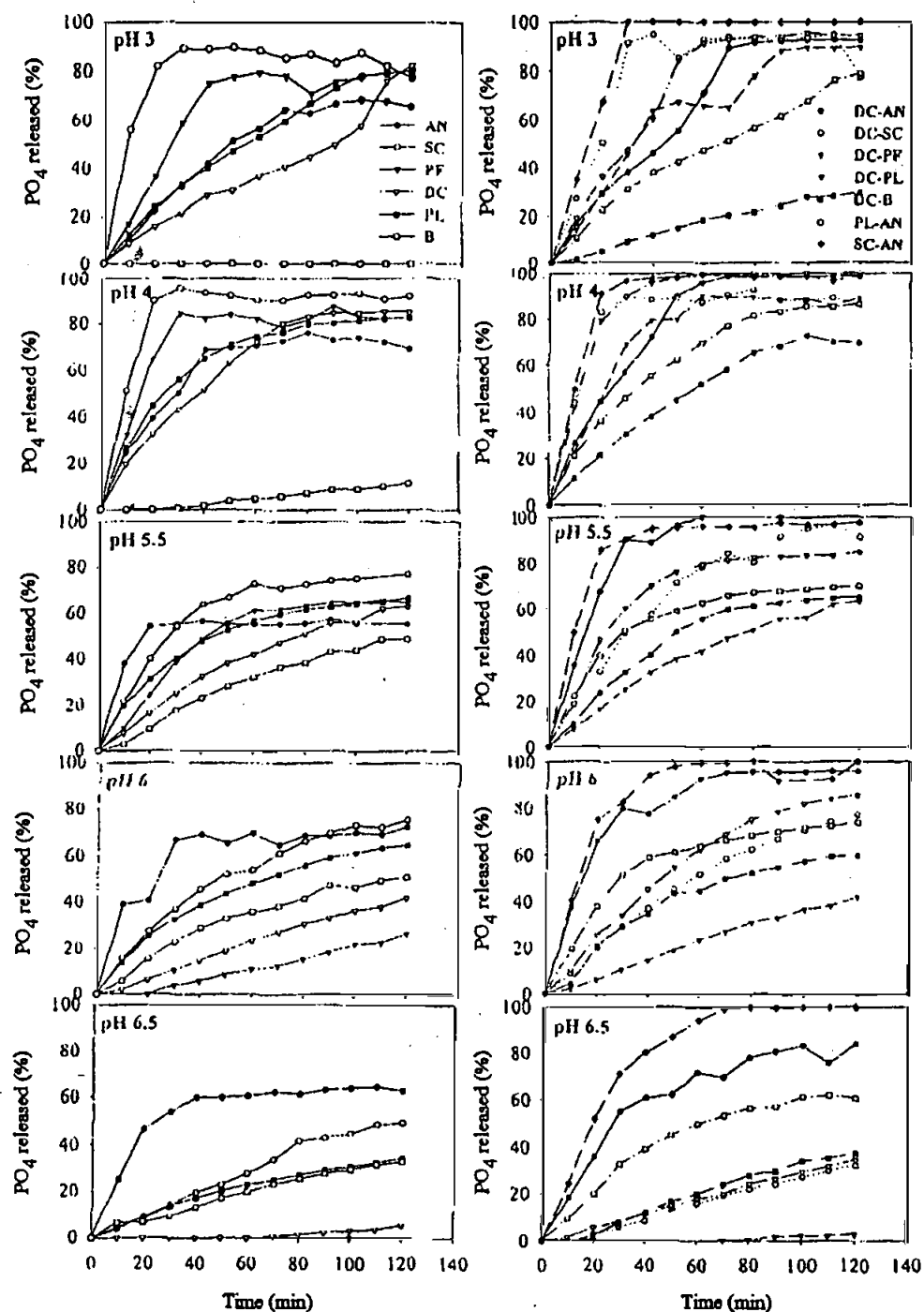


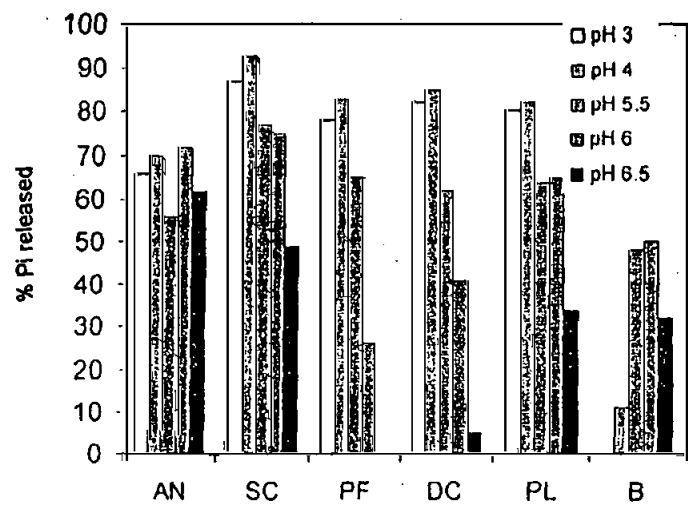
Fig.1

A)

B)

40

A)



B)

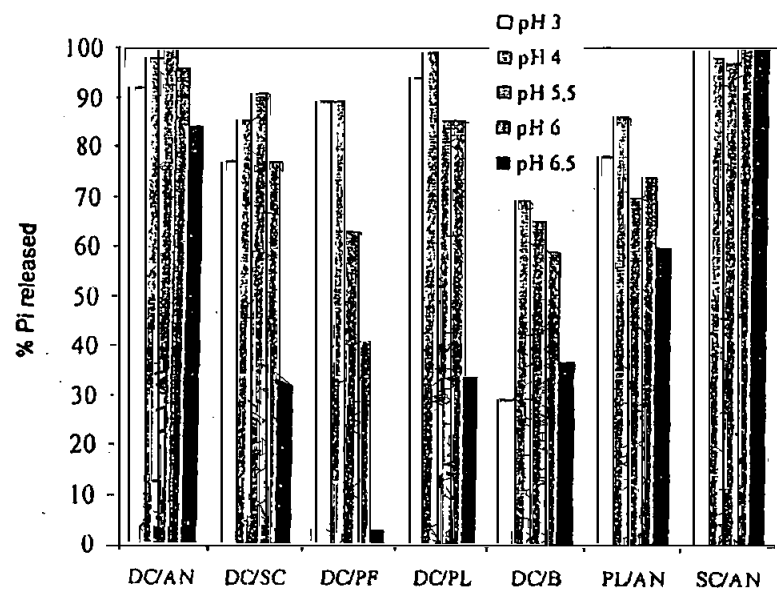


Fig. 2

41

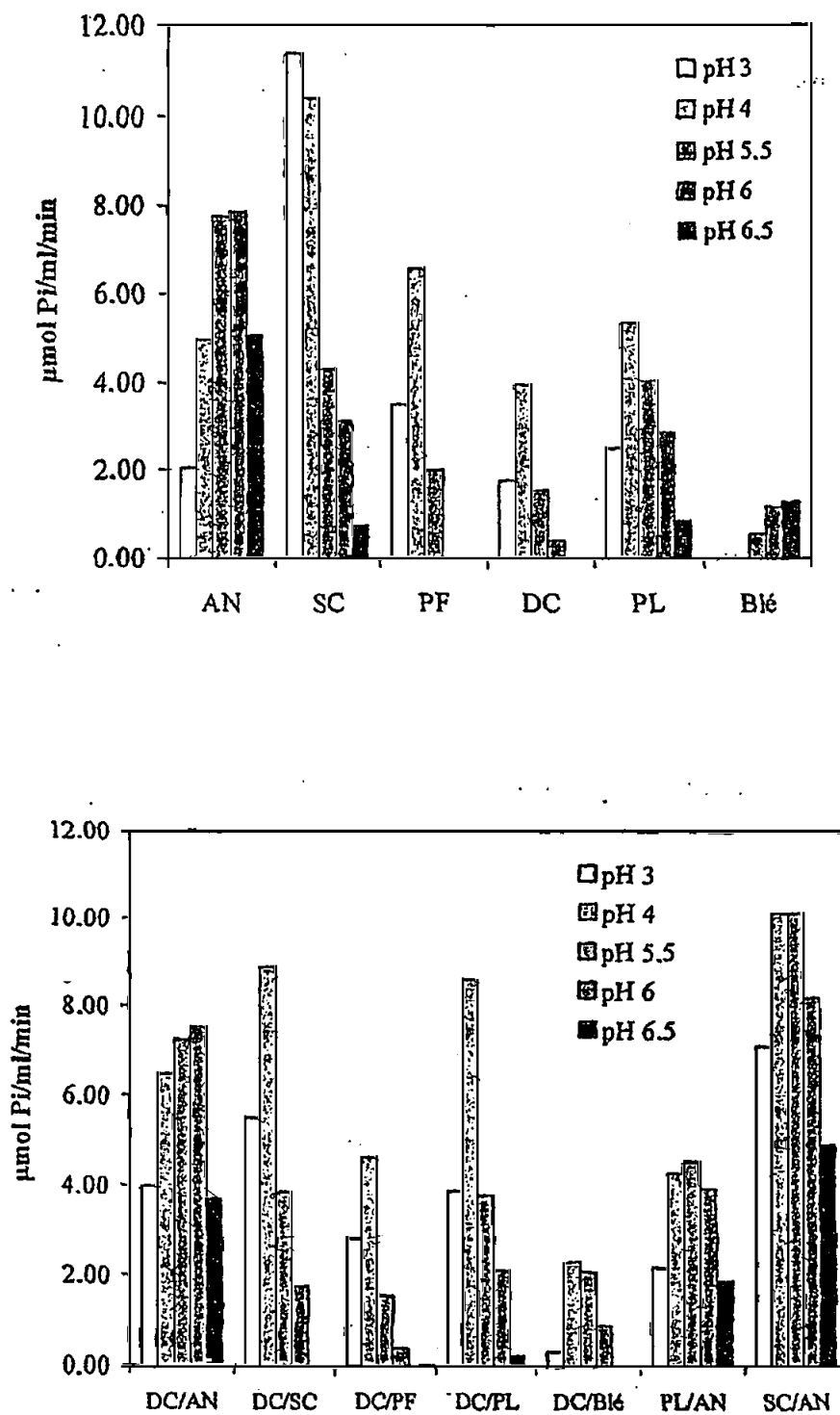


Fig. 3

43

Val Asn Gln Tyr Ser Thr Asp Tyr Leu Asp Glu Ala Leu Lys Arg Phe
225 230 235 240

Gln Ser Ser Asn Pro Gly Leu Asn Leu Thr Ser Glu Asp Val Tyr Gln
245 250 255

Leu Phe Ala Tyr Cys Ala Tyr Glu Thr Asn Val Lys Gly Ala Ser Pro
260 265 270

Phe Cys Asp Leu Phe Thr Asn Glu Glu Tyr Ile Gln Tyr Ser Tyr Ser
275 280 285

Val Asp Leu Ser Asn Tyr Tyr Ser His Gly Ala Gly His Asn Leu Thr
290 295 300

Lys Thr Ile Gly Ser Thr Leu Leu Asn Ala Ser Leu Thr Leu Leu Lys
305 310 315 320

Asp Gly Thr Asn Asp Asn Lys Ile Trp Leu Ser Phe Ser His Asp Thr
325 330 335

Asp Leu Glu Ile Phe His Ser Ala Leu Gly Ile Val Glu Pro Ala Glu
340 345 350

Asp Leu Pro Val Asp Tyr Ile Pro Phe Pro Ser Pro Tyr Ile His Ser
355 360 365

Gln Ile Val Pro Gln Gly Ala Arg Ile Tyr Thr Glu Lys Tyr Ser Cys
370 375 380

Gly Asn Glu Thr Tyr Val Arg Tyr Ile Leu Asn Asp Ala Val Val Pro
385 390 395 400

Ile Pro Lys Cys Ser Ser Gly Pro Gly Phe Ser Cys Glu Leu Ser Lys
405 410 415

Phe Glu Glu Tyr Ile Asn Lys Arg Leu Arg Asp Val Asp Phe Val Glu
420 425 430

Gln Cys Asp Leu Lys Asp Ala Pro Thr Glu Val Thr Phe Tyr Trp Asp
435 440 445

Tyr Thr Ser Val Asn Tyr Ser Ala Ser Leu Ile Asn Gly
450 455 460

<210> 2
<211> 461
<212> PRT
<213> Debaryomyces castellii

<400> 2
Met Val Ser Val Ser Lys Leu Ile Asn Asn Gly Leu Leu Leu Val Gly
1 5 10 15

Gln Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Pro Gln Gln Ala Ser Val Glu
20 25 30

Gln Tyr Asn Ile Ile Arg Phe Leu Gly Gly Ala Ala Pro Tyr Ile Gln
35 40 45

Asn Lys Gly Phe Gly Ile Ser Thr Asp Ile Pro Asp Gln Cys Thr Leu
 50 55 60
 Glu Gln Val Gln Leu Phe Ser Arg His Gly Glu Arg Tyr Pro Ser Thr
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Lys Lys Tyr Lys Ala Val Tyr Glu Lys Leu Met Ser Tyr
 85 90 95
 Asn Gly Thr Phe Lys Gly Glu Leu Ala Phe Leu Asn Asp Asp Tyr Glu
 100 105 110
 Tyr Phe Val Pro Asp Ser Val Tyr Leu Glu Lys Glu Thr Ser Pro Lys
 115 120 125
 Asn Ser Asp Ser Ile Tyr Ala Gly Thr Thr Asp Ala Met Lys His Gly
 130 135 140
 Ile Ala Phe Arg Thr Lys Tyr Gly Glu Leu Phe Asp Thr Asn Asp Thr
 145 150 155 160
 Leu Pro Val Phe Thr Ser Asn Ser Gly Arg Val Tyr Gln Thr Ser Gln
 165 170 175
 Tyr Phe Ala Arg Gly Phe Met Gly Asp Asp Phe Ser Asn Asp Thr Val
 180 185 190
 Lys Thr Asn Ile Ile Ser Glu Asp Ala Asp Met Gly Ala Asn Ser Leu
 195 200 205
 Thr Pro Arg Asp Gly Cys Phe Asn Tyr Asn Glu Asn Ala Asn Thr Ala
 210 215 220
 Ile Val Asp Glu Tyr Thr Thr Glu Tyr Leu Thr Lys Ala Leu Asn Arg
 225 230 235 240
 Phe Lys Ala Ser Asn Pro Gly Leu Asn Ile Thr Glu Asp Asp Val Ser
 245 250 255
 Asn Leu Phe Gly Tyr Cys Ala Tyr Glu Leu Asn Val Lys Gly Ala Ser
 260 265 270
 Pro Met Cys Asp Ile Phe Thr Asn Glu Glu Phe Ile Gln Tyr Ser Tyr
 275 280 285
 Ser Val Asp Leu Asp Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Ala Gly Asn Asn Met
 290 295 300
 Thr Arg Val Ile Gly Ser Thr Leu Leu Asn Ala Ser Leu Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 Asn His Asp Lys Asn Glu Asn Lys Ile Trp Leu Ser Phe Thr His Asp
 325 330 335
 Thr Asp Ile Glu Ile Phe His Ser Ala Ile Gly Ile Leu Ile Pro Asp
 340 345 350
 Glu Asp Leu Pro Val Asp Tyr Thr Pro Phe Pro Ser Pro Tyr Ser His
 355 360 365
 Val Gly Ile Thr Pro Gln Gly Ala Arg Thr Ile Ile Glu Lys Tyr Ala
 370 375 380

Cys Gly Asn Glu Ser Tyr Val Arg Tyr Val Ile Asn Asp Ala Val Ile
385 390 395 400

Pro Ile Lys Lys Cys Ser Ser Gly Pro Gly Phe Ser Cys Asn Leu Asn
405 410 415

Asp Tyr Asn Asp Tyr Val Ala Glu Arg Val Ala Gly Thr Asn Tyr Val
420 425 430

Glu Gln Cys Gly Asn Asn Asn Ala Ser Ala Val Thr Phe Tyr Trp Asp
435 440 445

Tyr Glu Thr Thr Asn Tyr Thr Ala Ser Leu Ile Asn Ser
450 455 460

<210> 3
<211> 467
<212> PRT
<213> Aspergillus niger

<400> 3
Met Gly Val Ser Ala Val Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Ser Gly Val
1 5 10 15

Thr Ser Gly Leu Ala Val Pro Ala Ser Arg Asn Gln Ser Ser Cys Asp
20 25 30

Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp
35 40 45

Gly Gln Tyr Ala Pro Phe Phe Ser Leu Ala Asn Glu Ser Val Ile Ser
50 55 60

Pro Glu Val Pro Ala Gly Cys Arg Val Thr Phe Ala Gln Val Leu Ser
65 70 75 80

Arg His Gly Ala Arg Tyr Pro Thr Asp Ser Lys Gly Lys Lys Tyr Ser
85 90 95

Ala Leu Ile Glu Glu Ile Gln Gln Asn Ala Thr Thr Phe Asp Gly Lys
100 105 110

Tyr Ala Phe Leu Lys Thr Tyr Asn Tyr Ser Leu Gly Ala Asp Asp Leu
115 120 125

Thr Pro Phe Gly Glu Gln Glu Leu Val Asn Ser Gly Ile Lys Phe Tyr
130 135 140

Gln Arg Tyr Glu Ser Leu Thr Arg Asn Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser
145 150 155 160

Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala Ser Gly Lys Lys Phe Ile Glu Gly
165 170 175

Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser
180 185 190

Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Ser Asn Asn
195 200 205

Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala

46

210	215	220
Asp Thr Val Glu Ala Asn Phe Thr Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg		
225	230	235 240
Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser Gly Val Thr Leu Thr Asp Thr Glu		
	245	250 255
Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser		
	260	265 270
Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Asp		
	275	280 285
Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu Gln Ser Leu Lys Lys Tyr Tyr Gly		
	290	295 300
His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala		
	305	310 315 320
Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr His Ser Pro Val His Asp Asp Thr		
	325	330 335
Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn		
	340	345 350
Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile		
	355	360 365
Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn Gly Thr Lys Pro Leu Ser Thr Thr		
	370	375 380
Thr Val Glu Asn Ile Thr Gln Thr Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr		
	385	390 395 400
Val Pro Phe Ala Ser Arg Leu Tyr Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ala		
	405	410 415
Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro		
	420	425 430
Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser		
	435	440 445
Phe Val Arg Gly Leu Ser Phe Ala Arg Ser Gly Gly Asp Trp Ala Glu		
	450	455 460
Cys Phe Ala		
465		

<210> 4
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Penicillium funiculosum

<400> 4
 Met Leu Lys Leu Tyr Val Ala Ala Cys Leu Val Val Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15
 Ile Pro Thr Asp Pro Thr Val Thr Gln Val Pro Asp Tyr Phe Gln Thr
 20 25 30

Ser Tyr Gly Pro Tyr Ala Gly Ala Thr Lys Ala Gly Gly Ala Pro Phe
35 40 45

Leu Ala Gln Thr Asn Pro Ile Tyr Ser Gln Pro Thr Tyr Val Ala Asn
50 55 60

Thr Pro Leu Val Thr Thr Leu Pro Ile Ser Gly Glu Pro His Asp Gly
65 70 75 80

Asn Ile Phe Gly Trp Met Gly Thr Leu Ser Pro Tyr Gln Pro Ser Pro
85 90 95

Asp Gly Phe Gly Val Asp Glu Tyr Pro Leu Pro Pro Gly Ala Asn Ile
100 105 110

Thr Gln Ile His Met Val His Arg His Gly Ser Arg Tyr Pro Thr Ser
115 120 125

Asn Ser Ala Ile Ser Asp Trp Ala Lys Lys Ile Met Gln Tyr Arg Ser
130 135 140

Asn Gly Thr Val Phe Ser Gly Glu Leu Glu Phe Leu Asn Ala Trp Asn
145 150 155 160

Tyr Gln Leu Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Arg Gly Arg Gln Glu Leu
165 170 175

Phe Asp Ser Gly Ile Leu His Trp Phe Asn Tyr Gly Lys Leu Tyr Asp
180 185 190

Pro Ala Ser Lys Ile Ile Ala Arg Thr Thr Thr Met Val Arg Met Leu
195 200 205

Gln Ser Ala Glu Asn Phe Leu Asn Gly Phe Phe Gly Pro Asn Trp Thr
210 215 220

Asn Asn Ala Thr Leu Glu Val Ile Ile Glu Ser Thr Gly Phe Asn Asn
225 230 235 240

Ser Leu Ala Gly Asn Asp Met Cys Arg Asn Ala Lys Asn Thr Ser Gly
245 250 255

Gly Asp Ala Val Asn Glu Trp Thr Ala Leu Tyr Leu Gln Lys Ala Thr
260 265 270

Asn Arg Phe Arg Ser Glu Ile Ser Gly Ser Leu Asn Trp Thr Val Asp
275 280 285

Asp Thr Tyr Asn Ala Gln Ser Met Cys Pro Tyr Glu Thr Val Ala Leu
290 295 300

Gly Tyr Ser Pro Phe Cys Thr Leu Phe Ser Trp Glu Glu Trp Gln Gly
305 310 315 320

Phe Gln Tyr Val Asn Asp Leu Asn Leu Tyr Gly Asn Tyr Gly Met Gly
325 330 335

Ser Pro Val Gly Arg Ala Ile Gly Leu Gly Phe Val Glu Glu Leu Ile
340 345 350

Ala Arg Leu Gln Gly Gln Ile Pro Asn Pro Pro Glu Asp Ser Ile Gly
355 360 365

48

Phe Asn Gln Ser Leu Asp Asp Ser Ala Ala Thr Phe Pro Leu Asn Gln
370 375 380

Thr Ile Tyr Phe Asp Phe Ser His Asp Asn Glu Met Phe Ser Met Leu
385 390 395 400

Thr Ala Leu Gly Leu Thr Gln Phe Gly Asp Tyr Leu Ser Pro Thr Lys
405 410 415

Pro Ser Ala Asp Arg Ser Leu Ile Gly Ser His Ile Val Pro Phe Ser
420 425 430

Ala Thr Phe Val Phe Glu Ile Ile Lys Ala Pro Gly Leu Val Arg Glu
435 440 445

Asn Arg Ser Lys Tyr Cys Gly Glu Ser Val Tyr Glu Asn Thr Ser Glu
450 455 460

Glu Thr Thr Tyr Ile His Leu Val Ile Asn Gln Arg Thr Val Pro Leu
465 470 475 480

Gly Gln Ser Ile Ser Ala Cys Gly Gln Arg Asp Asp Gly Trp Cys Glu
485 490 495

Ile Ser Ala Phe Ile Gln Ala Gln Lys Glu Asn Ile Val Lys Ala Asn
500 505 510

Tyr Glu Glu Ser Cys Phe Gly Asn Trp Ser Ile Pro Ala Tyr Gly Glu
515 520 525

Ile Arg Asp Gly Ala Ile Pro Lys Asn Ala Thr Ser
530 535 540

<210> 5
<211> 439
<212> PRT
<213> Peniophora lycii

<400> 5
Met Val Ser Ser Ala Phe Ala Pro Ser Ile Leu Leu Ser Leu Met Ser
1 5 10 15

Ser Leu Ala Leu Ser Thr Gln Phe Ser Phe Val Ala Ala Gln Leu Pro
20 25 30

Ile Pro Ala Gln Asn Thr Ser Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Pro Phe Phe
35 40 45

Pro Val Glu Pro Tyr Ala Ala Pro Pro Glu Gly Cys Thr Val Thr Gln
50 55 60

Val Asn Leu Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Trp Pro Thr Ser Gly Ala
65 70 75 80

Arg Ser Arg Gln Val Ala Ala Val Ala Lys Ile Gln Met Ala Arg Pro
85 90 95

Phe Thr Asp Pro Lys Tyr Glu Phe Leu Asn Asp Phe Val Tyr Lys Phe
100 105 110

Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Phe Gly Ala Asn Gln Ser His Gln Thr

49

115	120	125
Gly Thr Asp Met Tyr Thr Arg Tyr Ser Thr Leu Phe Glu Gly Gly Asp		
130	135	140
Val Pro Phe Val Arg Ala Ala Gly Asp Gln Arg Val Val Asp Ser Ser		
145	150	155 160
Thr Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Asp Ala Ser Gly Glu Thr Val Leu		
	165 170	175
Pro Thr Leu Gln Val Val Leu Gln Glu Glu Gly Asn Cys Thr Leu Cys		
	180 185	190
Asn Asn Met Cys Pro Asn Glu Val Asp Gly Asp Glu Ser Thr Thr Trp		
	195 200	205
Leu Gly Val Phe Ala Pro Asn Ile Thr Ala Arg Leu Asn Ala Ala Ala		
	210 215	220
Pro Ser Ala Asn Leu Ser Asp Ser Asp Ala Leu Thr Leu Met Asp Met		
	225 230	235 240
Cys Pro Phe Asp Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ala Ser Pro Phe Cys Asp		
	245 250	255
Leu Phe Thr Ala Glu Glu Tyr Val Ser Tyr Glu Tyr Tyr Tyr Asp Leu		
	260 265	270
Asp Lys Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Gly Asn Ala Leu Gly Pro Val Gln		
	275 280	285
Gly Val Gly Tyr Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Leu Thr Gly Gln Ala		
	290 295	300
Val Arg Asp Glu Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp Ser Asp Pro Ala		
	305 310	315 320
Thr Phe Pro Leu Asn Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn		
	325 330	335
Thr Met Val Pro Ile Phe Ala Ala Leu Gly Leu Phe Asn Ala Thr Ala		
	340 345	350
Leu Asp Pro Leu Lys Pro Asp Glu Asn Arg Leu Trp Val Asp Ser Lys		
	355 360	365
Leu Val Pro Phe Ser Gly His Met Thr Val Glu Lys Leu Ala Cys Ser		
	370 375	380
Gly Lys Glu Ala Val Arg Val Leu Val Asn Asp Ala Val Gln Pro Leu		
	385 390	395 400
Glu Phe Cys Gly Gly Val Asp Gly Val Cys Glu Leu Ser Ala Phe Val		
	405 410	415
Glu Ser Gln Thr Tyr Ala Arg Glu Asn Gly Gln Gly Asp Phe Ala Lys		
	420 425	430
Cys Gly Phe Val Pro Ser Glu		
	435	

50

<210> 6
<211> 1623
<212> DNA
<213> Triticum aestivum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1623)

<400> 6
atg tgg atg tgg agg ggg tgg ctg ccg ctg ctt ctg ctc gcc gcg gcg 48
Met Trp Met Trp Arg Gly Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ala
1 5 10 15
gtg qcg gcg gcg gct gag ccg gcg tgg acg ctg gag gga ccg tgg cgg 96
Val Ala Ala Ala Glu Pro Ala Ser Thr Leu Glu Gly Pro Ser Arg
20 25 30
ccg gtg acg gtg ccg ctg ccg gaa gac agg ggc cac gcg gtg gac ctg 144
Pro Val Thr Val Pro Leu Arg Glu Asp Arg Gly His Ala Val Asp Leu
35 40 45
ccg gac acg gac ccc ccg gtg cag cgc ccg gtc aca ggc tgg gct ccc 192
Pro Asp Thr Asp Pro Arg Val Gln Arg Arg Val Thr Gly Trp Ala Pro
50 55 60
gag cag atc gcc gtc gcg ctc tcc gcc gct ccc acc tcc gcc tgg gtc 240
Glu Gln Ile Ala Val Ala Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Ala Trp Val
65 70 75 80
tcc tgg atc aca ggg gat ttc cag atg ggc ggc gcc gtc aag ccg ctg 288
Ser Trp Ile Thr Gly Asp Phe Gln Met Gly Gly Ala Val Lys Pro Leu
85 90 95
gac ccc ggc acg gtc ggc agc gtc gtg cgc tac ggc ctc gcc gcc gat 336
Asp Pro Gly Thr Val Gly Ser Val Val Arg Tyr Gly Leu Ala Ala Asp
100 105 110
tcc tgg gtc cgc gag gcc acc ggc gac gcg ctc gtg tac agc cag ctc 384
Ser Leu Val Arg Glu Ala Thr Gly Asp Ala Leu Val Tyr Ser Gln Leu
115 120 125
tac ccc ttc gag ggc ctc cag aac tcc acc tcc ggc atc atc cac cac 432
Tyr Pro Phe Glu Gly Leu Gln Asn Tyr Thr Ser Gly Ile Ile His His
130 135 140
gtc cgc ctc caa ggg ctt gag cct ggg acg aag tac tac tac cag tgc 480
Val Arg Leu Gln Gly Leu Glu Pro Gly Thr Lys Tyr Tyr Tyr Gln Cys
145 150 155 160
ggc gac ccg gcc atc ccg ggg gcg atg agc gcc gtc cac gcg ttc ccg 528
Gly Asp Pro Ala Ile Pro Gly Ala Met Ser Ala Val His Ala Phe Arg
165 170 175
acg atg ccg gcg gtc ggg ccg ccg agc tac ccg ggg agg atc gcc gtg 576
Thr Met Pro Ala Val Gly Pro Arg Ser Tyr Pro Gly Arg Ile Ala Val
180 185 190
gtg ggg gac ctc ggg ctc acg tac aac acc acc tgg acc gtg gac cac 624
Val Gly Asp Leu Gly Leu Thr Tyr Asn Thr Thr Ser Thr Val Asp His
195 200 205
atg gcg agc aac ccg ccg gac ctg gtc ctc ctc gtc ggc gac gtg tgc 672

51

ggc ccg gcc gcc ggc agg ttc tgc tgg gac cgg cag ccg gac tac agc 1440
 Gly Pro Ala Ala Gly Arg Phe Cys Trp Asp Arg Gln Pro Asp Tyr Ser
 465 470 475 480

gcc tac cgg gag agc agc ttc ggc cac ggc atc ctc gag gtg aag aac 1488
 Ala Tyr Arg Glu Ser Ser Phe Gly His Gly Ile Leu Glu Val Lys Asn
 485 490 495

gag acg cac gct ctg tgg aga tgg cac agg aac cag gac atg tac ggg 1536
 Glu Thr His Ala Leu Trp Arg Trp His Arg Asn Gln Asp Met Tyr Gly
 500 505 510

agc gcc gga gat gag att tac att gtc cgg gag ccg cac agg tgc ttg 1584
 Ser Ala Gly Asp Glu Ile Tyr Ile Val Arg Glu Pro His Arg Cys Leu
 515 520 525

cac aaa cac aac tgg acc agg ccc gca cac ggt ccg taa 1623
 His Lys His Asn Trp Thr Arg Pro Ala His Gly Pro
 530 535 540

<210> 7
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 7
 Met Trp Met Trp Arg Gly Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Ala Ala Ala Glu Pro Ala Ser Thr Leu Glu Gly Pro Ser Arg
 20 25 30
 Pro Val Thr Val Pro Leu Arg Glu Asp Arg Gly His Ala Val Asp Leu
 35 40 45
 Pro Asp Thr Asp Pro Arg Val Gln Arg Arg Val Thr Gly Trp Ala Pro
 50 55 60
 Glu Gln Ile Ala Val Ala Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Ala Trp Val
 65 70 75 80
 Ser Trp Ile Thr Gly Asp Phe Gln Met Gly Gly Ala Val Lys Pro Leu
 85 90 95
 Asp Pro Gly Thr Val Gly Ser Val Val Arg Tyr Gly Leu Ala Ala Asp
 100 105 110
 Ser Leu Val Arg Glu Ala Thr Gly Asp Ala Leu Val Tyr Ser Gln Leu
 115 120 125
 Tyr Pro Phe Glu Gly Leu Gln Asn Tyr Thr Ser Gly Ile Ile His His
 130 135 140
 Val Arg Leu Gln Gly Leu Glu Pro Gly Thr Lys Tyr Tyr Tyr Gln Cys
 145 150 155 160
 Gly Asp Pro Ala Ile Pro Gly Ala Met Ser Ala Val His Ala Phe Arg
 165 170 175
 Thr Met Pro Ala Val Gly Pro Arg Ser Tyr Pro Gly Arg Ile Ala Val
 180 185 190
 Val Gly Asp Leu Gly Leu Thr Tyr Asn Thr Thr Ser Thr Val Asp His
 195 200 205
 Met Ala Ser Asn Arg Pro Asp Leu Val Leu Leu Val Gly Asp Val Cys
 210 215 220
 Tyr Ala Asn Met Tyr Leu Thr Asn Gly Thr Gly Ala Asp Cys Tyr Ser
 225 230 235 240
 Cys Ala Phe Gly Lys Ser Thr Pro Ile His Glu Thr Tyr Gln Pro Arg
 245 250 255
 Trp Asp Tyr Trp Gly Arg Tyr Met Glu Ala Val Thr Ser Gly Thr Pro
 260 265 270
 Met Met Val Val Glu Gly Asn His Glu Ile Glu Glu Gln Ile Gly Asn
 275 280 285

22

Lys Thr Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ala Phe Pro Ser Thr Glu
 290 295 300
 Ser Gly Ser Phe Ser Pro Phe Tyr Tyr Ser Phe Asp Ala Gly Gly Ile
 305 310 315 320
 His Phe Leu Met Leu Gly Ala Tyr Ala Asp Tyr Gly Arg Ser Gly Glu
 325 330 335
 Gln Tyr Arg Trp Leu Glu Lys Asp Leu Ala Lys Val Asp Arg Ser Val
 340 345 350
 Thr Pro Trp Leu Val Ala Gly Trp His Ala Pro Trp Tyr Thr Thr Tyr
 355 360 365
 Lys Ala His Tyr Arg Glu Val Glu Cys Met Arg Val Ala Met Glu Glu
 370 375 380
 Leu Leu Tyr Ser His Gly Leu Asp Ile Ala Phe Thr Gly His Val His
 385 390 395 400
 Ala Tyr Glu Arg Ser Asn Arg Val Phe Asn Tyr Thr Leu Asp Pro Cys
 405 410 415
 Gly Ala Val His Ile Ser Val Gly Asp Gly Gly Asn Arg Glu Lys Met
 420 425 430
 Ala Thr Thr His Ala Asp Glu Pro Gly His Cys Pro Asp Pro Arg Pro
 435 440 445
 Lys Pro Asn Ala Phe Ile Gly Gly Phe Cys Ala Phe Asn Phe Thr Ser
 450 455 460
 Gly Pro Ala Ala Gly Arg Phe Cys Trp Asp Arg Gln Pro Asp Tyr Ser
 465 470 475 480
 Ala Tyr Arg Glu Ser Ser Phe Gly His Gly Ile Leu Glu Val Lys Asn
 485 490 495
 Glu Thr His Ala Leu Trp Arg Trp His Arg Asn Gln Asp Met Tyr Gly
 500 505 510
 Ser Ala Gly Asp Glu Ile Tyr Ile Val Arg Glu Pro His Arg Cys Leu
 515 520 525
 His Lys His Asn Trp Thr Arg Pro Ala His Gly Pro
 530 535 540

EFFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE FITASAS SOBRE LA
HIDRÓLISIS DE ÁCIDO FÍTICO

La invención se relaciona con el efecto sinérgico de la combinación de fitasas
5 sobre las hidrólisis de ácido fítico.

Las sales de ácido fítico (mio-inositol hexakisfosfato) o fitatos (mio inositol hexakis
dihidrogen fosfato) son la principal forma de almacenamiento de fósforo en
cereales, plantas leguminosas y plantas que producen aceite. Ellas constituyen así
10 la principal fuente de fósforo en alimentos animales basados en plantas, los
principales componentes en las dietas de animales monogástricos (pollo y cerdos).
Sin embargo, la biodisponibilidad de éste fósforo en los alimentos es limitada para
éstos animales. Esto es porque ellos no poseen las enzimas intestinales que
degradan los fitatos en cantidad suficiente para permitir la hidrólisis del fitato y así
15 suministrar las cantidades de fosfato inorgánico que ellos requieren. Además, el
ácido fítico es un factor antinutricional que forman complejos con proteínas y iones
(Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) y así disminuye la biodisponibilidad de éstos elementos.

La toma de alimento del pollo y los cerdos se debe por lo tanto suplementar con
20 fosfato inorgánico, aunque el fósforo y los fitatos se excretan y contribuyen a la
eutoficación del agua superficial en áreas donde existe crianza intensiva de
animales monogástricos.

Las fitasas (mio- inositol hexakisfosfato 3- y 6- fosfohidrolasas EC 3.1.3.8 y
25 3.1.3.26) son parte de la familia de las fosfatasas de ácido histidina. Las fitasas
son hexakisfosfohidrolasas que hidrolizan los enlaces fosfoéster en ácido fítico o
fitato. Así, ellos catalizan la hidrólisis de mio- inositol hexakisfosfato (ácido fítico,

54

InsP₆) a monofosfatos inorgánicos y a fosfatos mio-inositol con un grado mas bajo de fosforilación (InsP₅ a InsP₁) y a mio- inositol libre en ciertos casos.

Existen dos clases de fitasa, diferenciado solo por la posición del primer fosfato hidrolizado. 3-fitasas (EC 3.1.3.8) hidroliza el fosfato en la posición 3 y las 6-fitasas (EC 3.1.3.26) hidroliza el fosfato en la posición 6.

Estas enzimas, utilizadas como un aditivo en nutrición animal, hacen posible, primero, incrementar la disponibilidad del fósforo fítico y, segundo, mejorar la digestibilidad de los alimentos. Además, la liberación de fosfato fítico disminuye considerablemente los costos debido al suplemento con fosfato, y también la contaminación causada por un exceso en fosfatos excretados.

Las fitasas son producidas por una gran variedad de organismos: plantas, animales y especialmente microorganismos. Estas fitasas tienen diferentes características bioquímicas, en particular su actividad como una función del pH y su estabilidad a la temperatura. Además, estas enzimas exhiben diferencias en términos: (a) su efectividad para hidrolizar todos los fosfatos, (b) estéreo-especificidad y (c) su afinidad con respecto a los fosfatos inositol.

Entre los microorganismos que producen fitasa, se hará mención en particular de: hongos del genero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* y *Rhizopus*, bacterias: *seudomonas sp.*, *klebsiella sp.*, *Escheriquia coli*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus Subtilis* y levaduras: *Saccaromices cerevisiae*, *candida tropicales*, *Torulopsis candida*, *Debariomices castelli*, *Debariomices occidentalis* (sinónimo *Schwanniomices castelli*), *Kluiveromices fragilis*.

SS

Numerosas fitasas de microorganismos ya han sido estudiados y se utilizan en varias aplicaciones agroindustriales. La efectividad de estas enzimas en el alimento y en el curso de la digestión en el animal dependen de su capacidad de mantener su potencial, sin importar las varias condiciones encontradas durante las etapas de preparación del alimento y en el tracto digestivo. La preparación de éstos alimentos requiere enzimas termo resistentes, mientras que el rango de valores de pH, por ejemplo, entre 5.02, 2.75, 6.28, 6.63 y 5.98 durante el paso a través de los varios cultivos, por los compartimentos del estomago, duodeno, yeyuno e íleo del pollo.

10

La mayoría de las fitasas descritas hasta la fecha solo hidrolizan parcialmente el ácido fítico y algunas con muy lentas cinéticas. Así, numerosas fitasas hidrolizan solamente 5 enlaces fosfato de ácido fítico, es decir, 83% del fósforo potencial.

15

Hasta la fecha, entre la levadura, solamente la fitasa de la levadura *Schwanniomices occidentalis* se ha descrito por ser capaz de hidrolizar todos los enlaces fosfato del fitato (EP 0 699 762 and Segueilha L., Lambrechts C., Boze H., Moulin G., Galzy P., (1992) Purification and properties of a phytase from *Schwanniomyces castellii*, J. Ferm. Bioeng., 74, 7-11).

20

Bajo condiciones experimentales, la hidrólisis completa del fitato o del ácido fítico, sin embargo, no se obtiene.

Con el fin de obtener una hidrólisis más efectiva del ácido fítico, se ha propuesto

25

combinar varias fitasas.



La WO 98/30681 describe la combinación de fitasas que tiene varios estereoespecificidades, y en particular la combinación de 3-fitasa y de 6-fitasa. Este documento describe en particular la combinación de una 6-fitasa de *Peniofora licii* y una 3- fitasa de *Aspergillus niger* (fitasa NovoTM).

5

La US 6.183.740 también describe la combinación de fitasa de varios especificidades y también la combinación con otras fosfatas acidas.

La hidrólisis completa de ácido fítico fosfato y a inositol sin embargo, no se observa.

10

El problema que la presente invención pretende resolver consiste en mejorar la taza y la efectividad de la hidrólisis de ácido fítico con el fin de obtener la hidrólisis completa de ácido fítico en varias aplicaciones agroindustriales.

15

Este problema se resuelve mediante las composiciones y los métodos de la presente invención en los cuales por lo menos dos fitasas específicas se combinan. De manera ventajosa, las composiciones de la presente invención permite la hidrólisis completa de todos los grupos fosfato de ácido fítico en virtud del efecto sinérgico observado. De manera ventajosa, las composiciones de la presente invención son activas en un rango de pH amplio adecuadamente para las aplicaciones agroindustriales de las fitasas, y en particular para las aplicaciones en el campo de nutrición animal. Otras ventajas de la presente invención son que las fitasas utilizadas son termoestables.

20

Descripción de la secuencia

25

SEQ ID No. 1: fitasa de Schwanniomices castellii

SEQ ID No. 2: fitasa de Debariomices castellii

SEQ ID No. 3: fitasa de Aspergillus Niger

SEQ ID No. 4: fitasa de Penicilium funiculosum

5 SEQ ID No. 5: fitasa de Peniofora licii

SEQ ID No. 6: secuencia que codifica la fitasa de trigo.

SEQ ID No. 7: fitasa de trigo (Triticum aestivum).

Descripción de la invención

10

Un objeto de la invención es una composición que combina por lo menos dos fitasas para la hidrólisis de ácido fítico (mio- inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisfosfato), que comprende:

15

- una primer fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa SEQ ID No 1 o que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ ID No. 2;
- una segunda fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ ID No. 3.

20

Preferiblemente, la primera fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de seis enlaces fosfato de ácido fítico.

Preferiblemente, la primer fitasa tiene una temperatura óptima de entre 55°C y

25

80°C y un pH óptimo de entre pH 3.5 y pH 5.

58

En una modalidad preferida, la primer fitasa es una fitasa de la levadura *Schwanniomices castellii* o una fitasa de la levadura *Debariomices castellii*.

En otra modalidad preferida, la primer fitasa es la fitasa de la SEQ ID No. 1 o la
5 fitasa de la SEQ ID No. 2.

Preferiblemente, la segunda fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de por lo menos cinco enlaces fosfato de ácido fítico.

10 Preferiblemente, la segunda fitasa tiene una temperatura óptima de entre 50°C y 60°C y un pH óptimo de entre pH 2 y pH 6.

En una modalidad preferida, la segunda fitasa es una fitasa de *Aspergillus niger*.

15 En otra modalidad preferida, la segunda fitasa es la fitasa de la SEQ ID No. 3.

Preferiblemente, las composiciones de acuerdo con la invención consisten de un aditivo nutricional para animales o de un alimento animal.

20 Un sujeto de la invención es también el uso de una composición de acuerdo con la invención, para la elaboración de un aditivo nutricional para animales o para un alimento animal.

Un objeto de la invención también es el uso de una composición de acuerdo con la
25 invención, para incrementar la disponibilidad de fósforo fítico y mejorar la digestibilidad de los alimentos animales.

69

La presente invención también se relaciona con un método de hidrólisis de ácido fítico (mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisfosfato) a monofosfatos inorgánicos, a mio-inositoles con un grado mas bajo de fosforilación y a mio-inositol libre, que comprende las siguientes etapas:

5

- se suministra una primera fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ ID No. 1 o que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ ID No. 2;
- se suministra una segunda fitasa que exhibe por lo menos 80% de
- 10 identidad con la fitasa de la SEQ ID No. 3;
- el ácido fítico es simultáneamente puesto en contacto con la primera fitasa y la segunda fitasa.

15

Preferiblemente, la primera fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de seis enlaces fosfato de ácido fítico.

Preferiblemente, la primera fitasa tiene una temperatura óptima de entre 55°C y 80°C y un pH óptimo de entre pH 3.5 y pH 5.

20

En una primera modalidad, la primer fitasa no es una fitasa de la levadura *Schwanniomices castellii* o una fitasa de la levadura *Debariomices castellii*.

En una modalidad particularmente ventajosa, la primer fitasa es la fitasa a la SEQ ID No. 1 o la fitasa de la SEQ ID No. 2.

25

Preferiblemente, la segunda fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de por lo menos cinco enlaces fosfato de ácido fítico.



Preferiblemente, la segunda fitasa tiene una temperatura óptima de entre 50°C y 60°C y un pH óptimo de entre pH 2 y pH 6.

5 En una modalidad ventajosa, la segunda fitasa es una fitasa de *Aspergillus niger*.

En una modalidad particularmente ventajosa, como la segunda fitasa es la fitasa de la SEQ ID No. 3.

10 Un objeto de la invención también es un kit o agrupamiento para alimentar animales, que comprende:

- la fitasa de *Schwanniomices castellii* de la SEQ ID No. 1 o la fitasa de la *Debariomices castellii* de la SEQ ID No. 2;
- 15 - la fitasa de *Aspergillus niger* de la SEQ ID No. 3.

Las composiciones de acuerdo con la invención combinan una primera fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ ID No. 1 o que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ ID No. 2; y una
20 segunda fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ ID No. 3.

De manera sorprendente, ésta combinación específica de fitasas hacen posible obtener un efecto sinérgico sobre la hidrólisis de ácido fítico. Las composiciones
25 de acuerdo con la invención catalizan así una rápida y completa hidrólisis del ácido fítico en un rango de pH amplio.

El termino "fitasa" pretende significar mio-inositol hexakisfosfato fosfohidrolasas (EC 3.1.3.8 y 3.1.3.26). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisfosfato (ácido fítico, InsP_6) a monofosfatos inorgánicos y a mio-inositol fosfato con un grado inferior de fosforilación (InsP_5 a InsP_1) y a mio-inositol libre para ciertas fitasas.

Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden una primera fitasa que exhiben por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 2.

La fitasa de la SEQ. ID No. 1 es una fitasa de la levadura *Schwanniomices castellii*, mientras que la fitasa de la SEQ. ID No. 2 es una fitasa de la levadura *Debariomices castellii*.

Estas fitasas tiene propiedades catalíticas muy similares y son por lo tanto intercambiables en las combinaciones fitasa de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, la primera fitasa exhibe por lo menos 80%, 90%, 95%, 98%, y preferiblemente por lo menos 99% de amino ácidos que son idénticos con la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o exhiben por lo menos 80%, 90%, 95%, 98%, y preferiblemente por lo menos 99%, de amino ácidos idénticos con la fitasa de la SEQ. ID No. 2.

Preferiblemente, la primera fitasa tiene las mismas propiedades y en particular las mismas propiedades catalíticas que la fitasa de la SEQ. ID No. 1 y de la SEQ. ID No. 2. Preferiblemente, la primera fitasa se aísla de otras sepas de *Schwanniomices castellii* y de *Debariomices castellii* o de otras levaduras.

Alternativamente, la primera fitasa se puede obtener mediante técnicas de mutagénesis dirigida de sitio, por ejemplo.

La expresión "amino ácidos que son idénticos" pretenden significar amino ácidos
5 que no varían entre dos secuencias. La primera fitasa puede exhibir una supresión, adición o sustitución de por lo menos un amino ácido con respecto a las fitasas de la SEQ. ID No. 1 o de la SEQ. ID No. 2.

Las fitasas de la SEQ. ID No. 1 y de la SEQ. ID No. 2 tienen propiedades
10 catalíticas comunes. De acuerdo con la invención, la primera fitasa utilizada en las composiciones y métodos de acuerdo con la invención exhibe un grado de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o la SEQ. ID No. 2 y conservan éstas propiedades catalíticas comunes.

15 Preferiblemente, la primera fitasa tiene actividad de 3-fitasa. Preferiblemente, la primera fitasa cataliza la hidrólisis de los seis enlaces fosfato de ácido fítico.

Las 3-fitasas (EC 3.1.3.8) hidrolizan primeramente el fosfato en la posición 3.

20 La fitasa capaz de hidrolizar todos los enlaces fosfato del ácido fítico (posiciones 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, y 6-) catalizan la hidrólisis del mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisfosfato (ácido fítico, InsP_6) a monofosfatos inorgánicos y a mio-inositol libre.

25 Muchas fitasas hidrolizan solamente 5 enlaces fosfato del ácido fítico, es decir, el 83% del fósforo potencial. Estas enzimas hidrolizan el ácido fítico a mio-inositol monofosfato pero no a mio-inositol libre.

63

La expresión "actividad de la fitasa" pretende significar la actividad enzimática de la fitasa. Esta actividad se expresa en unidades internacionales (I.U.) por miligramo de proteína. Un I.U. de la actividad enzimática es la capacidad catalítica de
5 convertir una micromol de sustrato por unidad de tiempo, en un pH dado y a una temperatura dada.

Preferiblemente, la primera fitasa tiene una temperatura óptima de entre 55°C y 80°C y un pH óptimo de entre pH 3.5 y pH 5.

10

En una modalidad preferida, la primera fitasa es una fitasa de la levadura *Schwanniomices castellii*, o la fitasa de la levadura *Debariomices castellii*.

15

En otra modalidad particularmente ventajosa, la primera fitasa es la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o la fitasa de la SEQ. ID No. 2.

Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden por lo menos una segunda fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 3.

20

La fitasa de la SEQ. ID No. 3 es una fitasa del hongo filamentoso *Aspergillus niger*.

25

Preferiblemente, la segunda fitasa exhibe por lo menos 80%, 90%, 95%, 98%, y preferiblemente por lo menos 99%, de amino ácidos que son idénticos con la fitasa de la SEQ. ID No. 3.

64

Preferiblemente, la segunda fitasa conserva las propiedades y en particular las propiedades catalíticas de la fitasa de la SEQ. ID No. 3. Preferiblemente, ésta fitasa se aísla de otras sepas de *Aspergillus niger* o de otros hongos filamentosos. Alternativamente, ésta fitasa se puede obtener mediante técnicas de mutagénesis dirigida de sitio, por ejemplo.

La expresión "amino ácidos que son idénticos" pretende significar amino ácidos que no varían entre las dos secuencias. La segunda fitasa puede exhibir una supresión, una adición o una sustitución de por lo menos un amino ácido con respecto a la fitasa de la SEQ. ID No. 3.

De acuerdo con la invención, la segunda fitasa utilizada en las composiciones y los métodos de la invención exhiben por lo tanto un grado de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 3 y conserva las propiedades catalíticas del último.

Preferiblemente, la segunda fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de por lo menos cinco enlaces fosfato de ácido fítico.

Preferiblemente, la segunda fitasa tiene una temperatura óptima entre 50°C y 60°C y un pH óptimo de entre pH 2 y pH 6. A un mas preferiblemente, la segunda fitasa tiene un primer pH óptimo de entre pH 2.5 y 3.5 y un segundo pH óptimo entre pH 4.5 y 5.5.

En una modalidad preferida, la segunda fitasa es una fitasa de *Aspergillus niger*.

En una modalidad ventajosa, la segunda fitasa es la fitasa de la SEQ. ID No. 3.

ES

La actividad enzimática de la fitasa varía en particular como una función del pH. Las fitasas tienen así rangos de pH (o esferas) en las cuales su actividad enzimática es mayor u óptima. El término "rango" pretende significar una esfera o intervalo de pH dado. Dos fitasas tienen actividades enzimáticas en rangos de pH complementarios cuando estas fitasas tienen una actividad en diferentes rangos de pH. Preferiblemente, estos rangos se traslapan o se superponen parcialmente. Típicamente, las fitasas tienen una actividad enzimática mayor a un pH ácido. Dos fitasas que tienen rangos de pH complementarios tienen así, por ejemplo, una actividad enzimática máxima entre pH 2 y pH 4 para la primera fitasa y una actividad enzimática máxima entre pH 4 y pH 6 para la segunda fitasa. En las composiciones y los métodos de la presente invención, la primera y segunda fitasa tienen preferiblemente rangos de pH complementarios o pH óptimos complementarios. Las composiciones y los métodos de acuerdo con la invención permiten así la hidrólisis de ácido fítico en un rango de pH amplio.

Los métodos para medir y de identificar el grado de identidad entre los polipéptidos son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Se puede hacer, por ejemplo, uso del vector NTi 9.1.0, programa de alineamiento Alignx (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>). Preferiblemente, se utilizan parámetros por defecto.

Las fitasas de las composiciones y los métodos de acuerdo con la invención se aíslan o se purifican de su ambiente natural. Las fitasas se pueden preparar por medio de varios métodos. Estos métodos son en particular la purificación de fuentes naturales tales como células que expresan naturalmente estas fitasas, la producción de fitasa recombinantes mediante las células huéspedes apropiadas y la purificación subsecuente de estas, la producción mediante la síntesis química o,

finalmente, la combinación de éstas varias aproximaciones. Estos varios métodos de producción son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Así, las fitasas utilizadas en las composiciones y los métodos de la presente invención se pueden aislar de *Schwanniomices castellii*, de *Debariomices castellii* o de *Aspergillus niger*. En otra modalidad, las fitasas de la presente invención se aíslan de organismos huéspedes recombinantes.

Preferiblemente, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden un aditivo nutricional para animales o de alimento para animal.

10

Un objeto de la invención también es el uso de una composición de acuerdo con la invención, para la elaboración de un aditivo nutricional para animales o de un alimento para animal.

15 La presente invención por lo tanto también relaciona los aditivos de alimento que suministran una actividad fitasa. El suministro de éste tipo de actividad enzimática hace posible mejorar la digestibilidad del alimentos y mejorar su valor nutricional.

El termino "aditivo nutricional" pretende significar una sustancia agregada intencionalmente a un alimento, generalmente en cantidades pequeñas, con el fin de mejorar sus características nutricionales o su digestibilidad. Los aditivos nutricionales para animales pueden, por ejemplo, contener vitaminas sales minerales, amino ácidos y enzimas.

25 La presente invención también se relaciona con los alimentos animales. Estos alimentos están usualmente en la forma de harinas o de gránulos en los cuales los aditivos de acuerdo con la invención se incorporan. El termino "alimento" pretende

67

significar cualquier cosa que se pueda utilizar para alimentar animales. Para la crianza intensiva de animales, los alimentos de los animales usualmente comprenden una base nutricional y aditivos nutricionales. El termino "base nutricional" pretende significar aquello que constituye la mayor parte de la toma de alimento del animal, que consiste, por vía de ejemplo, de una mezcla de cereales, de proteínas de grasa de origen animal y/o vegetal.

Las bases nutricionales para los animales son adecuadas para la dieta de éstos animales y bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Usualmente, éstas bases nutricionales comprende, por ejemplo, maíz, trigo, guisantes y frijol de soya. Estas bases nutricionales son adecuadas para las necesidades de varias especies animales para las cuales ellas están destinadas. Estas bases nutricionales pueden ya contener aditivos nutricionales tales como vitaminas, sales minerales y amino ácidos.

15

En una modalidad preferida, la invención relaciona los alimentos para animales monogástricos, y en particular para pollos y cerdos. El pollo comprende en particular gallinas ponedoras, pollos para carne, pavos y patos. Los cerdos comprenden en particular cerdos en crecimiento y en terminado y también lechones.

20

Un objeto de la invención también es el uso de una composición de acuerdo con la invención para incrementar la disponibilidad de fósforo fítico y mejorar la digestibilidad de los alimentos para animal.

25

Las composiciones y los métodos de acuerdo con la invención combinan una primera fitasa capaz de hidrolizar todos los enlaces fosfato de ácido fítico,

escogidos de las fitasas de *Schwanniomices castellii* y las fitasas de *Debariomices castellii*, y una segunda fitasa capaz de hidrolizar por lo menos cinco enlaces fosfato de ácido fítico y que tiene una actividad de enzima de un rango de pH complementario al rango de pH de la primera fitasa.

5

Figuras

Figura 1: Comparación de las cinéticas de hidrólisis de ácido fítico a varios pH para las seis fitasas solas o combinadas en pares. Los resultados se expresan como porcentaje de los fosfatos teóricos liberados.

10

Figura 2: Hidrólisis porcentual del ácido fítico mediante las varias fitasas después de reacción durante 120 minutos. (A) fitasas solas, (B) fitasas combinadas. Las líneas punteadas corresponden a la hidrólisis de 5 enlaces fosfato.

15

Figura 3: Comparación de las tasas iniciales de hidrólisis de ácido fítico ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) para las 6 fitasas a varios pH. (A) fitasas solas, (B) fitasas combinadas. Las tasas son calculadas durante los primeros 10 minutos de la reacción.

20 **Ejemplos**

Materiales y métodos

1. Orígenes de la fitasa.

25

- *Aspergillus niger* Natufos (AN): tanda R2503 o tanda 057NPH02

Wim van Hartingsveldt, Cora M. J. van Zeijl, G. Marian Harteveld, Robin J. Gouka, Marjon E.G. Suykerbuyk, Ruud G. M. Luiten, Peter A. van Paridon, Gerard C. M. Selten, Annemarie E. Veenstra, Robert F. M. van Gorcom and Cees A. M. J. van den Hondel; Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. *Gene*, 127, (1) 87-94 (1993)

- *Peniophora lycii* (PL): tanda 172NHS02

Lassens, S.F., Breinholt, J., Ostergaard, P.R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M. and Fuglsang, C.C.; Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4701-4707 (2001)

- *Penicillium funiculosum* (PF): Godo A1346 tanda 1301

WO 03054199

- Trigo (B): Referencia sigma P1259.

WO 0183763

- *Schwanniomices castellii* (SC): producida en la tanda de candida boidinii 10059 CN 25

EP 0931837.

- *Sepa Debariomices castellii* CBS 2923 (DC).

2. Método enzimático

La actividad fitasa se mide al seguir la liberación de fosfato inorgánico durante el tiempo.

La actividad se mide en la presencia de 8mM de fitato de sodio (sigma) disuelto en
5 un amortiguador de acetato de sodio de 200mM de amortiguador de acetato de sodio, pH 5.5, a 37°C (5 volúmenes). La reacción se dispara mediante la adición de extracto enzimático (1 volumen). La reacción se detiene mediante la acidificación del medio con 20% de ácido tricloroacético (1 volumen de medio de reacción + 1 volumen de ácido). La cantidad de fosfato liberado se determina
10 después de varios tiempos de incubación.

Una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de fosfato inorgánico en un minuto.

15 3. Condiciones para la hidrólisis de fitato a varios pHs

La hidrólisis se lleva a cabo a 40°C en 10ml de 250mM de amortiguador de acetato para los pHs 4 a 6.5 o de 200 mM de amortiguador de glicina a pH 3, que contiene: 0.340 mM de fitato de sodio, 0.04 o 0.08 U/ml de fitasa. Las muestras
20 son tomadas en varios momentos durante 120 minutos. La reacción se detiene mediante la adición de ácido tricloroacético.

Los fosfatos se ensayan directamente sin dilución.

25 4. Ensayo de fosfato

71

La cantidad de fosfato liberado se visualiza mediante colorimetría. La solución de visualización, preparada extemporáneamente, contiene sulfato de hierro (380 mM, 1 volumen) y heptamolibdato de amonio (12 mM, 4 volúmenes). La absorbancia se mide a 700 nm después de la visualización durante 30 minutos a temperatura ambiente (1 volumen de medio de reacción + 1 volumen de solución de visualización), utilizando un espectrofotómetro UV/visible (Beckman DU 530).

Se establece una línea de calibración de antemano con dihidrogen fosfato de potasio.

10

R sultados

1. Fitasas probadas

- 15 Las fitasas probadas difieren una de la otra de acuerdo a varios criterio: (1) características bioquímicas (pH óptimo, estereoespecificidad: 3, 4, o 6 fitasas), (2) el número de enlaces fosfato hidrolizados.

Todas éstas fitasas tiene un pH de hidrólisis óptimo cercano a 5; sin embargo, las fitasas AN y PL tienen un segundo pH óptimo en 2.5. Tres hidrolizan completamente los fosfatos (SC, DC, trigo). La posición hidrolizada primero es la posición tres (AN, PL, DC) o la posición 6 (PL), o la posición 4 (trigo) (Tabla 1).

25

Tabla 1: Comparación de las características bioquímicas de las fitasas.

Origen	Km (μM)	pH óptim o	Tempera- tura óptima (°C)	Número de enlaces fosfato hidrolizado s	Estereoespecifici dad (orden de hidrólisis de los enlaces fosfato)
Apergillus niger ⁽¹⁾	40/2 7	2.5- 5.5	55/58	5	3/4/5/6/1
Peniofora licii ⁽¹⁾	33	2.5- 5.5	58	5	6/3 (pHs.5) 3.6 (pH3 y 5.5)
Penicillium funiculosum ⁽²⁾	550	4-5	50	5 o 6	3/4
Trigo ⁽³⁾	22	5-7	55	6	4/3/5/6/1/2
Schwanniomic es castellii ⁽⁴⁾	38	4.4	77	6	
Debariomic es castellii	236	4-4.5	60	6	3/4/5/6/1-2

(1) Ullah, A. H. J. and Sethumadhavan, K., (2003) PhyA gene product of
5 *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. Biochemical
and Biophysical Research Communications 303: 463-468

(2) WO 03054199 filed June 13, 2003 Bohlmann, R., Moussu, F., Nore, O.,
Pierrard, J., Saunier, D., Testeniere, O., New polynucleotide encoding fungal
10 phytase, useful as feed additive to improve phosphate assimilation, also new strain
of *Penicillium*.

(3) Nakano, T., Joh, T., Narita, K., Hayakawa, T. (2000) The pathway of
dephosphorylation of myo-Inositol Hexakisphosphate by Phytases from Wheat
15 Bran of *Tricicum aestivum* L. cv Nourin#61. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64: 995-
1003

73

(4) Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G. and Galzy, P. (1992) Purification and Properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. J. Ferment. Bioeng. 74 (1) : 7-11.

5 **2. Comparación de la efectividad de la hidrólisis de ácido fítico mediante 6 fitasas a varios pHs**

El estudio se lleva a cabo en la presencia de 0.340 mM de fitato. La cantidad de la enzima introducida corresponde a 0.08 U/ml de fitasa, medida bajo condiciones estándar a pH 5.5. Los valores de pH probados son 3, 4, 5.5, 6, 6.5. La reacción es seguida durante 120 minutos. Las muestras son tomadas durante el tiempo, la reacción se detiene mediante la acidificación, y los fosfatos se ensayan mediante calorimetría.

15 La comparación de varias fitasas se lleva a cabo como una función de la eficiencia de la hidrólisis, es decir, el porcentaje de fosfato liberado con relación al porcentaje teórico. Los resultados se expresan en la Figura 1A.

De acuerdo con la literatura, 4 fitasas (PF, SC, DC, B) son capaces de hidrolizar completamente el ácido fítico a inositol y fosfato; 2 fitasas (AN y PL) hidrolizan solamente 5 enlaces, es decir, 83% del fósforo potencial.

Bajo las condiciones probadas a pH 3 y pH 4, 4 fitasas (SC, PF, DC y PL) hidrolizan por lo menos 80% del ácido fítico. La fitasa de trigo no es muy activa a pH 3 y pH 4. Para los valores de pH por encima del pH 5.5, ninguna fitasa se hidroliza más del 70% del ácido fítico. Las fitasas PF y DC no son muy activas a pH 6.5. La fitasa AN es la menos sensible a las variaciones en el pH; sin embargo,

78

ésta libera solamente 60 a 70% de los fosfatos, es decir, valores 10 a 20% inferiores que aquellos esperados (Figura 2A).

La comparación de las tasas iniciales de liberación de fosfato muestran mucha heterogeneidad entre las fitasas (Figura 3A). La fitasa mas eficiente a pH ácido es aquella de *Schwanniomices castellii*, mientras que aquella de *A. niger* es la mas eficiente a valores de pH por encima de 5.5. La fitasa de trigo es la menos eficiente sin importar la condición probada.

10 **3. Influencia del pH sobre la tasa de liberación de fosfato en la presencia de fitasas combinadas.**

Con el fin de mejorar la eficiencia de la hidrólisis de ácido fítico, se probaron varias combinaciones de dos fitasas. Cada fitasa se introduce a 0.04 U/ml, es decir un valor total de 0.08 U/ml en el tubo de reacción. La fitasa DC que hidroliza 6 enlaces fosfato, se probó sistemáticamente en combinación con otras fitasas, que hidrolizan 5 o 6 enlaces fosfato. Otras dos combinaciones también se utilizan para comparar, primeramente otras combinaciones de fitasas capaces de liberar 6 y 5 fosfatos (SC/AN) y, segundo, dos fitasas, PL/AN, que tiene características bioquímicas muy similares (Figura 1B).

Un análisis total hace posible mostrar que la combinación de 2 fitasas promueve principalmente la eficiencia de la hidrólisis de ácido fítico. Aunque, bajo las mismas condiciones, ninguna fitasa hidroliza completamente el ácido fítico, para 2 mezclas (DC/AN y SC/AN), 100% a 85% de los enlaces fosfato son hidrolizados cualquiera que sea el pH. Para la combinación de DC/PL, una ganancia de aproximadamente

75

20% a pHs ácidos también se observa. Las combinaciones PL/AN, DC/PF y DC/SC suministran poca mejora (Figura 2B).

La comparación de las tasas de hidrólisis iniciales muestran que existe un fuerte efecto sinérgico para la combinación SC/AN y para la combinación DC/AN comparadas con las fitasas solas y comparadas con otras combinaciones de fitasa. Las diferencias relacionadas con el pH en la tasa de hidrólisis se minimiza cuando se utiliza la combinación. Las otras combinaciones son menos eficientes, el efecto sinérgico es visible solamente para ciertos pHs, por ejemplo, DC/PL a pH 3 y pH 4 (Figura 3).

El efecto sinérgico parece ser debido, a en gran proporción, a la capacidad de las fitasas a hidrolizar todos los fosfatos. Además, las mejores combinaciones se relacionan con las fitasas que tiene pHs complementarios óptimos para la actividad (2.5-4.5). Se debe, sin embargo, notar que existe poco efecto sinérgico para las fitasas que son menos efectivas en términos de eficiencia de hidrólisis, tales como aquellas del trigo y de *Penicillium funiculosum*.

4. Influencia de las concentraciones de las proporciones de fitasa sobre la eficiencia de la hidrólisis de ácido fítico.

Comparamos la influencia de la cantidad de fitasa (efectos de dosis) de las proporciones de la mezclas de fitasas sobre la hidrólisis de ácido fítico. Se utilizaron tres combinaciones, DC/AN, DC/PL y AN/PL, y 2 concentraciones de fitasa (0.04 y 0.08 U/ml) se probaron (Tablas 2 y 3).

76

Tabla 2: Comparación del porcentaje de hidrólisis de ácido fítico para varias combinaciones, probadas en dos concentraciones finales, 0.04 y 0.08 U/ml. Las primeras tres columnas dan los valores para las tres fitasas solas a la concertación 0.08 U/ml.

5

	AN (0.08U)	DC (0.08U)	PL (0.08U)	AN/DC (0.08U)	AN/DC (0.04U)
pH 3	66	82	80	92	67 (73%)
pH 4	69	85	83	95	96 (101%)
pH 5.5	55	63	67	92	81 (87%)
pH 6	72	42	64	94	78 (83%)
pH 6.5	63	6	34	75	42 (56%)

	PL/DC (0.08U)	PL/DC (0.04U)	AN/PL (0.08U)	AN/PL (0.04U)
pH 3	94	70 (74%)	79	56 (72%)
pH 4	100	93 (94%)	86	76 (89%)
pH 5.5	85	71 (84%)	70	66 (94%)
pH 6	85	47 (56%)	74	67 (90%)
pH 6.5	35	10 (30%)	61	52 (86%)

Los valores entre paréntesis representan la proporción de los valores obtenidos con 0.04 U/ml a aquellos en la presencia de 0.08 U/ml.

10

27

Los porcentajes de hidrólisis durante el estudio con la mezcla de enzimas (concentración total 0.08 U/ml) son mayores que aquellos determinados con las enzimas solas (0.08 U/ml) y cerca al 100% para las mezclas AN/DC y PL/DC, en un rango de pH que varia de 3 a 6. La mezcla AN/PL no incrementa significativamente la hidrólisis porcentual observada para cada fitasa tomada separadamente. La reducción de 2 veces de la cantidad total suministrada (0.04 U/ml) no induce una disminución de dos veces en los fosfatos liberados. En ciertos casos, AN/DC y PL/DC a pH 4 y pH 5.5, y AN/PL a pHs 4 a 6, los porcentajes de hidrólisis son equivalentes aquellos observados en la presencia de 0.08 U/ml (Tabla 3).

Tabla 3: Comparación de las tasas iniciales de hidrólisis (μmol/ml/min) de ácido fítico para las varias combinaciones probadas a dos concentraciones finales 0.04 y 0.08 U/ml.

Las primeras tres columnas dan los valores para las tres fitasas solas a la concentración 0.08 U/ml.

	AN (0.08U)	DC (0.08U)	PL (0.08U)	AN/DC (0.08U)	AN/DC (0.04U)
pH 3	2.04	1.78	2.52	4.00	1.70 (42%)
pH 4	4.98	3.96	5.36	6.49	2.85 (44%)
pH 5.5	7.76	1.56	4.00	7.26	1.86 (26%)
pH 6	7.91	0.39	2.87	7.53	1.04

70

					(14%)
pH 6.5	5.09	0.00	0.85	3.71	0.26
					(7%)
	PL/DC (0.08U)	PL/DC (0.04U)	AN/PL (0.08U)	AN/PL (0.04U)	
pH 3	3.88	1.45	2.18	1.60	
		(37%)		(73%)	
pH 4	8.61	3.33	4.29	2.73	
		(39%)		(63%)	
pH 5.5	3.79	0.85	4.56	2.82	
		(22%)		(62%)	
pH 6	2.10	0.04	3.96	2.60	
		(2%)		(66%)	
pH 6.5	0.22	0.00	1.89	0.74	
		(0%)		(39%)	

Los valores entre paréntesis representa la proporción de las tazas obtenidas con 0.04 U/ml a aquellas en la presencia de 0.08 U/ml.

5

La combinación de las fitasas por lo tanto hace posible disminuir la cantidad de fitasa en el medio de reacción por un factor dos, aunque manteniendo una eficiencia de hidrólisis dentro de un rango de pH amplio. Existe un claro efecto de dosis sobre la liberación del fosfato.

10

De otra parte, las tazas iniciales de hidrólisis de ácido fítico son por lo menos dos veces inferiores en la presencia de 0.04 U/ml de fitasa que en la presencia de 0.08 U/ml (Tabla 3). Estos resultados sostienen la hipótesis de que la sinergia entre las fitasas permite esencialmente completar la hidrólisis de los fosfatos presentes.

15

79

La proporción de cada fitasa en el medio de reacción no parece tener mucha influencia sobre la eficiencia de la hidrólisis (Tabla 4). En todos los casos, se observa un incremento en la cantidad de fosfato liberado, con una ligera ventaja para una combinación que contiene el 50% de cada fitasa, principalmente para

5 pHs por encima de 5.5.

Tabla 4: Comparación de la hidrólisis porcentual de ácido fítico como función de la proporción de cada fitasa en la mezcla. En todos los casos, la cantidad total permanece 0.08 U/ml.

Proporción de fitasas	AN	DC	AN/DC (1/1)	AN/DC (1/2)	AN/DC (2/1)
pH 3	66	82	92	90	88
pH 4	69	85	95	93	93
pH 5.5	55	63	92	79	79
pH 6	72	42	94	87	86
pH 6.5	63	6	75	52	64

Bajo nuestras condiciones experimentales, ninguna fitasa hidrolizó completamente el ácido fítico a inositol y fosfatos, aunque 4 de ellas son capaces de liberar todos los fosfatos de acuerdo con la literatura. Cuatro fitasas SC, PF, DC y PL, hidrolizan

15 el 80% de los enlaces fosfato a valores de pH de 3 y 4. Dos mezclas DC/AN y SC/AN, hidrolizan del 80% al 100% de los enlaces fosfatos y todos los pHs probados.

La combinación de las fitasas de los tipos 3- fitasa (AN, DC, PF), 4- fitasa (B) o 6- fitasa (PL), una con la otra, no suministra ninguna mejora notable.

20



La complementación de la sinergia entre las fitasas parece depender de dos criterios específicos a cada fitasa: (1) su perfil de actividad como una función del pH, (2) su capacidad ha hidrolizar, o no, todas las fosfatas.

5

El uso de tales combinaciones en nutrición animal podría hacer posible disminuir las cantidades de fitasas utilizadas mediante por lo menos 20% y por lo tanto reducir los costos. El contenido de fosfato de origen fitico en el alimento también se incrementaría, mejorando el valor del alimento y así haciendo posible disminuir

10 la toma de fosfato inorgánico. La contaminación causada por el desperdicio de fosfato no disponible disminuye así.

81

REIVINDICACIONES

1. Composición que combina por lo menos dos fitasas para la hidrólisis de ácido fítico (mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisfosfato), caracterizado por que ésta comprende:

(a) una primera fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 2;

(b) una segunda fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 3.

2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la primera fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de seis enlaces fosfato de ácido fítico.

3. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la primera fitasa tiene una temperatura óptima de entre 55°C y 80°C y un pH óptimo de entre pH 3.5 y pH 5.

4. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizadas porque la primera fitasa es una fitasa de levadura *Schwanniomices castellii* o una fitasa de la levadura *Debariomices castellii*.

5. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la primera fitasa es la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o la fitasa de la SEQ. ID No. 2.

82

6. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de por lo menos cinco enlaces fosfato de ácido fítico.
- 5 7. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda fitasa tiene una temperatura óptima de entre 50°C y 60°C y un pH óptimo de entre pH 2 y pH 6.
- 10 8. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda fitasa es una fitasa de *Aspergillus niger*.
9. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda fitasa es la fitasa de la SEQ. ID No. 3.
- 15 10. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque ésta consiste de un aditivo nutricional para animales o de un alimento animal.
- 20 11. Uso de una composición de acuerdo a una de las reivindicaciones 1 a 9, para la elaboración de un aditivo nutricional para animales o de un alimento animal.
- 25 12. Uso de una composición de acuerdo a una de las reivindicaciones 1 a 10 para incrementar la disponibilidad de fósforo fítico y mejorar la digestibilidad de alimentos animales.

83

13. Método de hidrólisis de ácido fítico (mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisfosfato) a monofosfatos inorgánicos, a mio-inositol con un grado inferior de fosforilación y a mio-inositol libre, caracterizado porque éste comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) se suministra una primera fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 2;
- (b) se suministra una segunda fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 3;
- 10 (c) el ácido fítico es puesto simultáneamente en contacto con la primera fitasa y la segunda fitasa.

14. Método de acuerdo a la reivindicación 13, caracterizado porque la primera fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de 6 enlaces fosfato de ácido

15 fítico.

15. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, caracterizado porque la primera fitasa tiene una temperatura óptima de entre 55°C y 80°C y un pH óptimo de entre pH 3.5 y pH 5.

20

16. Método de acuerdo a una de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado porque la primera fitasa es una fitasa de levadura *Schwanniomices castellii* o una fitasa de la levadura *Debariomices castellii*.

25

17. Método de acuerdo a una de las reivindicaciones 13 a 16, caracterizado porque la primera fitasa es la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o la fitasa de la SEQ. ID No. 2.

18. Método de acuerdo a una de las reivindicaciones 13 a 17, caracterizada porque la segunda fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de por lo menos cinco enlaces fosfato de ácidos fíticos.

5

19. Método de acuerdo a una de las reivindicaciones 13 a 18, caracterizada porque la segunda fitasa tiene una temperatura óptima de entre 50°C y 60°C y un pH óptimo de entre pH 2 y pH 6.

10

20. Método de acuerdo a una de las reivindicaciones 13 a 19, caracterizada porque la segunda fitasa es una fitasa de *Aspergillus niger*.

21. Método de acuerdo a una de las reivindicaciones 13 a 20, caracterizado porque la segunda fitasa es la fitasa de la SEQ. ID No. 3.

15

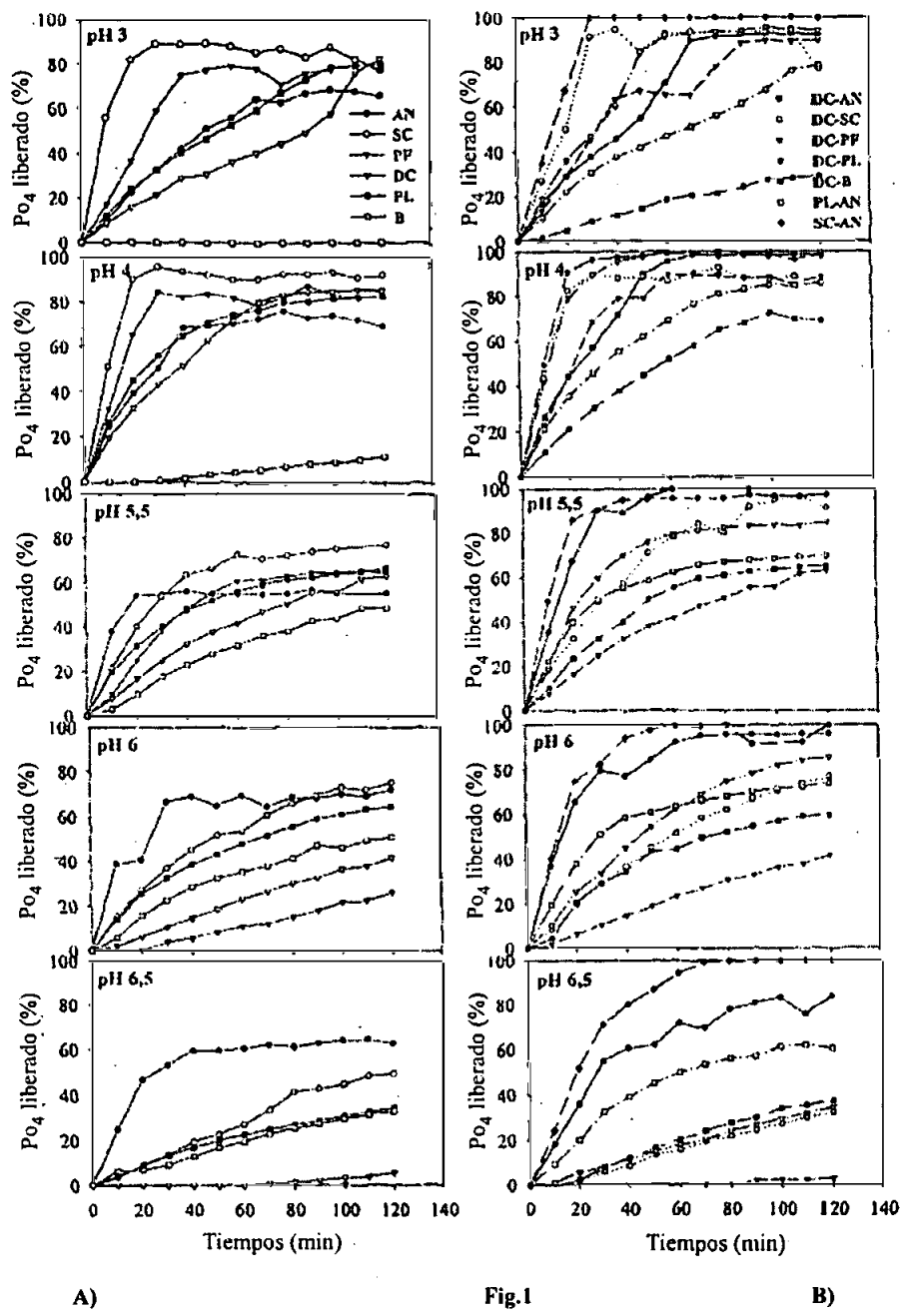
22. Kit o agrupamiento para alimentar animales, caracterizado porque éste comprende:

(a) la fitasa de *Schwanniomices castellii* de la SEQ. ID No. 1 o la fitasa de *Debariomices castellii* de la SEQ. ID No. 2;

20

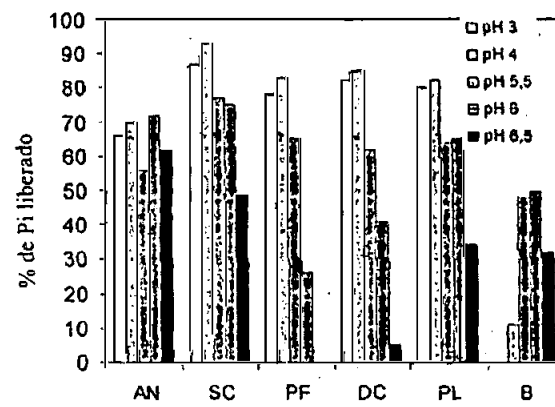
(b) la fitasa de *Aspergillus niger* de la SEQ. ID No. 3.

21



2/3

A)



B)

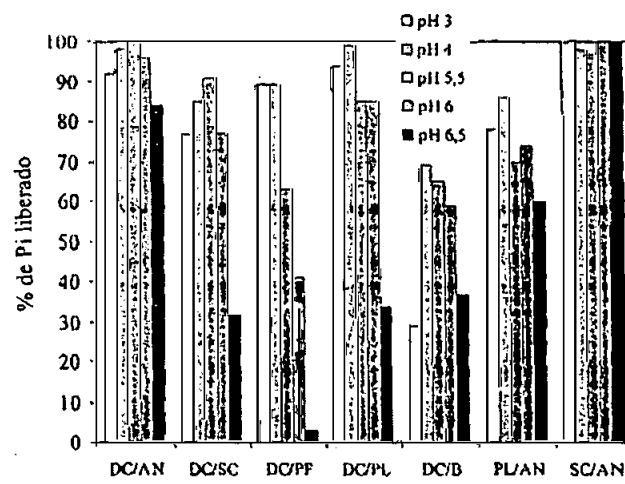


Fig. 2

3/3

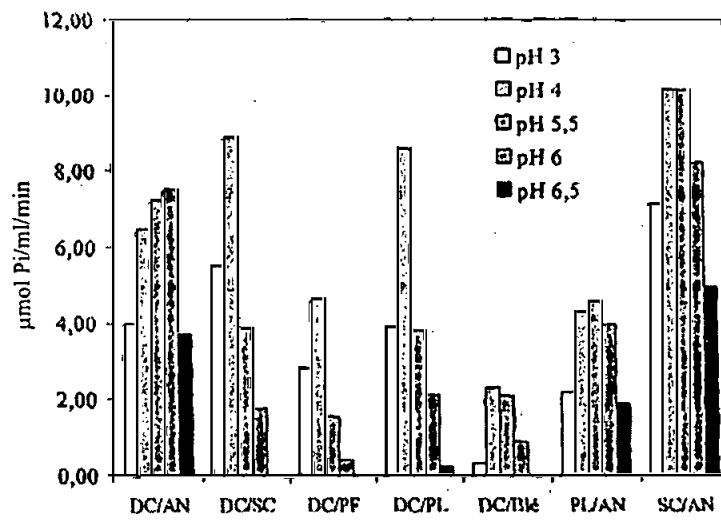
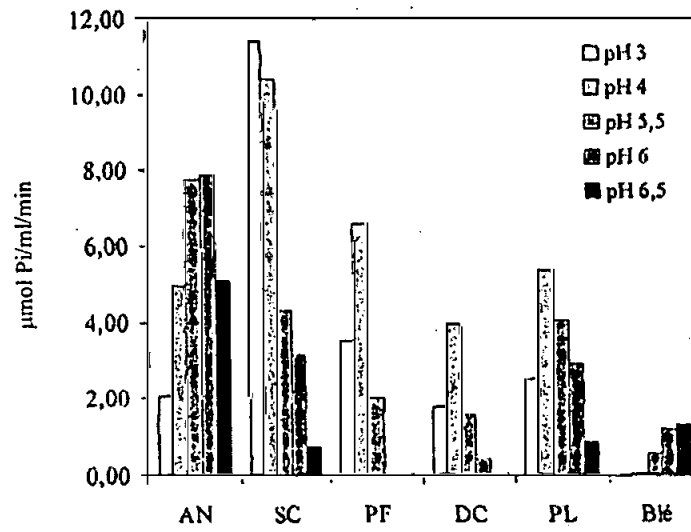


Fig. 3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ADISSEO FRANCE SAS

<120> Asociación de fitasas

<130> HL/SG/EP-50016

<150> FR05.07335

<151> 2005-C8-07

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 461

<212> PRT

<213> Schwanniomyces castellii (Debaryomyces occidentalis)

<400> 1

Met Val Ser Ile Ser Lys Leu Ile Asn Asn Gly Leu Leu Leu Ala Gly
1 5 10 15

Gln Ser Val Tyr Gln Asp Leu Ala Thr Pro Gln Gln Ser Ser Val Glu
20 25 30

Gln Tyr Asn Ile Ile Arg Phe Leu Gly Gly Ser Gly Pro Tyr Ile Gln
35 40 45

Arg Ser Gly Tyr Gly Ile Ser Thr Asp Ile Pro Asp Gln Cys Thr Ile
50 55 60

Lys Gln Val Gln Leu Met Ser Arg His Gly Glu Arg Tyr Pro Ser Lys
65 70 75 80

Asn Ser Gly Lys Lys Leu Lys Thr Ile Tyr Gly Lys Leu Lys Ser Tyr
85 90 95

Asn Gly Thr Phe Thr Gly Ser Leu Ala Phe Leu Asn Asp Tyr Glu Tyr
100 105 110

Phe Val Pro Asp Asp Ser Leu Tyr Glu Lys Glu Thr Ser Ala Leu Asn
115 120 125

Ser Gln Gly Leu Phe Ala Gly Thr Thr Asp Ala Leu Arg His Gly Ala
130 135 140

Ala Phe Arg Ala Lys Tyr Gly Ser Leu Tyr Lys Gln Asn Ser Thr Leu

145 150 155 160
 Pro Val Phe Thr Ser Asn Ser Asn Arg Val Tyr Gln Thr Ser Glu Tyr
 165 170 175
 Phe Ala Arg Gly Phe Leu Gly Asp Glu Phe Ser Asp Ala Thr Val His
 180 185 190
 Phe Ala Ile Ile Asp Glu Asp Pro Lys Met Gly Val Asn Ser Leu Thr
 195 200 205
 Pro Arg Ala Ala Cys Asp Asn Tyr Asn Glu Asp Val Asn Asp Gly Ile
 210 215 220
 Val Asn Gln Tyr Ser Thr Asp Tyr Leu Asp Glu Ala Leu Lys Arg Phe
 225 230 235 240
 Gln Ser Ser Asn Pro Gly Leu Asn Leu Thr Ser Glu Asp Val Tyr Gln
 245 250 255
 Leu Phe Ala Tyr Cys Ala Tyr Glu Thr Asn Val Lys Gly Ala Ser Pro
 260 265 270
 Phe Cys Asp Leu Phe Thr Asn Glu Glu Tyr Ile Gln Tyr Ser Tyr Ser
 275 280 285
 Val Asp Leu Ser Asn Tyr Tyr Ser His Gly Ala Gly His Asn Leu Thr
 290 295 300
 Lys Thr Ile Gly Ser Thr Leu Leu Asn Ala Ser Leu Thr Leu Leu Lys
 305 310 315 320
 Asp Gly Thr Asn Asp Asn Lys Ile Trp Leu Ser Phe Ser His Asp Thr
 325 330 335
 Asp Leu Glu Ile Phe His Ser Ala Leu Gly Ile Val Glu Pro Ala Glu
 340 345 350
 Asp Leu Pro Val Asp Tyr Ile Pro Phe Pro Ser Pro Tyr Ile His Ser
 355 360 365
 Gln Ile Val Pro Gln Gly Ala Arg Ile Tyr Thr Glu Lys Tyr Ser Cys
 370 375 380

Gly Asn Glu Thr Tyr Val Arg Tyr Ile Leu Asn Asp Ala Val Val Pro
385 390 395 400

Ile Pro Lys Cys Ser Ser Gly Pro Gly Phe Ser Cys Glu Leu Ser Lys
405 410 415

Phe Glu Glu Tyr Ile Asn Lys Arg Leu Arg Asp Val Asp Phe Val Glu
420 425 430

Gln Cys Asp Leu Lys Asp Ala Pro Thr Glu Val Thr Phe Tyr Trp Asp
435 440 445

Tyr Thr Ser Val Asn Tyr Ser Ala Ser Leu Ile Asn Gly
450 455 460

<210> 2
<211> 461
<212> PRT
<213> Debaryomyces castellii

<400> 2

Met Val Ser Val Ser Lys Leu Ile Asn Asn Gly Leu Leu Leu Val Gly
1 5 10 15

Gln Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Pro Gln Gln Ala Ser Val Glu
20 25 30

Gln Tyr Asn Ile Ile Arg Phe Leu Gly Gly Ala Ala Pro Tyr Ile Gln
35 40 45

Asn Lys Gly Phe Gly Ile Ser Thr Asp Ile Pro Asp Gln Cys Thr Leu
50 55 60

Glu Gln Val Gln Leu Phe Ser Arg His Gly Glu Arg Tyr Pro Ser Thr
65 70 75 80

Gly Ser Gly Lys Lys Tyr Lys Ala Val Tyr Glu Lys Leu Met Ser Tyr
85 90 95

Asn Gly Thr Phe Lys Gly Glu Leu Ala Phe Leu Asn Asp Asp Tyr Glu
100 105 110

Tyr Phe Val Pro Asp Ser Val Tyr Leu Glu Lys Glu Thr Ser Pro Lys
115 120 125

91

Asn Ser Asp Ser Ile Tyr Ala Gly Thr Thr Asp Ala Met Lys His Gly
130 135 140

Ile Ala Phe Arg Thr Lys Tyr Gly Glu Leu Phe Asp Thr Asn Asp Thr
145 150 155 160

Leu Pro Val Phe Thr Ser Asn Ser Gly Arg Val Tyr Gln Thr Ser Gln
165 170 175

Tyr Phe Ala Arg Gly Phe Met Gly Asp Asp Phe Ser Asn Asp Thr Val
180 185 190

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

Thr Pro Arg Asp Gly Cys Phe Asn Tyr Asn Glu Asn Ala Asn Thr Ala
210 215 220

Ile Val Asp Glu Tyr Thr Thr Glu Tyr Leu Thr Lys Ala Leu Asn Arg
225 230 235 240

Phe Lys Ala Ser Asn Pro Gly Leu Asn Ile Thr Glu Asp Asp Val Ser
245 250 255

Asn Leu Phe Gly Tyr Cys Ala Tyr Glu Leu Asn Val Lys Gly Ala Ser
260 265 270

Pro Met Cys Asp Ile Phe Thr Asn Glu Glu Phe Ile Gln Tyr Ser Tyr
275 280 285

Ser Val Asp Leu Asp Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Ala Gly Asn Asn Met
290 295 300

Thr Arg Val Ile Gly Ser Thr Leu Leu Asn Ala Ser Leu Glu Leu Leu
305 310 315 320

Asn His Asp Lys Asn Glu Asn Lys Ile Trp Leu Ser Phe Thr His Asp
325 330 335

Thr Asp Ile Glu Ile Phe His Ser Ala Ile Gly Ile Leu Ile Pro Asp
340 345 350

Glu Asp Leu Pro Val Asp Tyr Thr Pro Phe Pro Ser Pro Tyr Ser His
355 360 365

Val Gly Ile Thr Pro Gln Gly Ala Arg Thr Ile Ile Glu Lys Tyr Ala
370 375 380

Cys Gly Asn Glu Ser Tyr Val Arg Tyr Val Ile Asn Asp Ala Val Ile
385 390 395 400

Pro Ile Lys Lys Cys Ser Ser Gly Pro Gly Phe Ser Cys Asn Leu Asn
405 410 415

Asp Tyr Asn Asp Tyr Val Ala Glu Arg Val Ala Gly Thr Asn Tyr Val
420 425 430

Glu Gln Cys Gly Asn Asn Asn Ala Ser Ala Val Thr Phe Tyr Trp Asp
435 440 445

Tyr Glu Thr Thr Asn Tyr Thr Ala Ser Leu Ile Asn Ser
450 455 460

<210> 3
<211> 467
<212> PRT
<213> Aspergillus niger

<400> 3

Met Gly Val Ser Ala Val Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Ser Gly Val
1 5 10 15

Thr Ser Gly Leu Ala Val Pro Ala Ser Arg Asn Gln Ser Ser Cys Asp
20 25 30

Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp
35 40 45

Gly Gln Tyr Ala Pro Phe Phe Ser Leu Ala Asn Glu Ser Val Ile Ser
50 55 60

Pro Glu Val Pro Ala Gly Cys Arg Val Thr Phe Ala Gln Val Leu Ser
65 70 75 80

Arg His Gly Ala Arg Tyr Pro Thr Asp Ser Lys Gly Lys Lys Tyr Ser
85 90 95

Ala Leu Ile Glu Glu Ile Gln Gln Asn Ala Thr Thr Phe Asp Gly Lys
100 105 110

43

Tyr Ala Phe Leu Lys Thr Tyr Asn Tyr Ser Leu Gly Ala Asp Asp Leu
115 120 125

Thr Pro Phe Gly Glu Gln Glu Leu Val Asn Ser Gly Ile Lys Phe Tyr
130 135 140

Gln Arg Tyr Glu Ser Leu Thr Arg Asn Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser
145 150 155 160

Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala Ser Gly Lys Lys Phe Ile Glu Gly
165 170 175

Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser
180 185 190

Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Ser Asn Asn
195 200 205

Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala
210 215 220

Asp Thr Val Glu Ala Asn Phe Thr Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg
225 230 235 240

Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser Gly Val Thr Leu Thr Asp Thr Glu
245 250 255

Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser
260 265 270

Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Asp
275 280 285

Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu Gln Ser Leu Lys Lys Tyr Tyr Gly
290 295 300

His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala
305 310 315 320

Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr His Ser Pro Val His Asp Asp Thr
325 330 335

Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn
340 345 350

Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile
355 360 365

Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn Gly Thr Lys Pro Leu Ser Thr Thr
370 375 380

Thr Val Glu Asn Ile Thr Gln Thr Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr
385 390 395 400

Val Pro Phe Ala Ser Arg Leu Tyr Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ala
405 410 415

Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro
420 425 430

Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser
435 440 445

Phe Val Arg Gly Leu Ser Phe Ala Arg Ser Gly Gly Asp Trp Ala Glu
450 455 460

Cys Phe Ala
465

<210> 4
<211> 540
<212> PRT
<213> *Penicillium funiculosum*
<400> 4

Met Leu Lys Leu Tyr Val Ala Ala Cys Leu Val Val Ala Gly Val Ser
1 5 10 15

Ile Pro Thr Asp Pro Thr Val Thr Gln Val Pro Asp Tyr Phe Gln Thr
20 25 30

Ser Tyr Gly Pro Tyr Ala Gly Ala Thr Lys Ala Gly Gly Ala Pro Phe
35 40 45

Leu Ala Gln Thr Asn Pro Ile Tyr Ser Gln Pro Thr Tyr Val Ala Asn
50 55 60

Thr Pro Leu Val Thr Thr Leu Pro Ile Ser Gly Glu Pro His Asp Gly
65 70 75 80

Asn Ile Phe Gly Trp Met Gly Thr Leu Ser Pro Tyr Gln Pro Ser Pro
 85 90 95
 Asp Gly Phe Gly Val Asp Glu Tyr Pro Leu Pro Pro Gly Ala Asn Ile
 100 105 110
 Thr Gln Ile His Met Val His Arg His Gly Ser Arg Tyr Pro Thr Ser
 115 120 125
 Asn Ser Ala Ile Ser Asp Trp Ala Lys Lys Ile Met Gln Tyr Arg Ser
 130 135 140
 Asn Gly Thr Val Phe Ser Gly Glu Leu Glu Phe Leu Asn Ala Trp Asn
 145 150 155 160
 Tyr Gln Leu Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Arg Gly Arg Gln Glu Leu
 165 170 175
 Phe Asp Ser Gly Ile Leu His Trp Phe Asn Tyr Gly Lys Leu Tyr Asp
 180 185 190
 Pro Ala Ser Lys Ile Ile Ala Arg Thr Thr Thr Met Val Arg Met Leu
 195 200 205
 Gln Ser Ala Glu Asn Phe Leu Asn Gly Phe Phe Gly Pro Asn Trp Thr
 210 215 220
 Asn Asn Ala Thr Leu Glu Val Ile Ile Glu Ser Thr Gly Phe Asn Asn
 225 230 235 240
 Ser Leu Ala Gly Asn Asp Met Cys Arg Asn Ala Lys Asn Thr Ser Gly
 245 250 255
 Gly Asp Ala Val Asn Glu Trp Thr Ala Leu Tyr Leu Gln Lys Ala Thr
 260 265 270
 Asn Arg Phe Arg Ser Glu Ile Ser Gly Ser Leu Asn Trp Thr Val Asp
 275 280 285
 Asp Thr Tyr Asn Ala Gln Ser Met Cys Pro Tyr Glu Thr Val Ala Leu
 290 295 300
 Gly Tyr Ser Pro Phe Cys Thr Leu Phe Ser Trp Glu Glu Trp Gln Gly

96

305 310 315 320
 Phe Gln Tyr Val Asn Asp Leu Asn Leu Tyr Gly Asn Tyr Gly Met Gly
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly Arg Ala Ile Gly Leu Gly Phe Val Glu Glu Leu Ile
 340 345 350
 Ala Arg Leu Gln Gly Gln Ile Pro Asn Pro Pro Glu Asp Ser Ile Gly
 355 360 365
 Phe Asn Gln Ser Leu Asp Asp Ser Ala Ala Thr Phe Pro Leu Asn Gln
 370 375 380
 Thr Ile Tyr Phe Asp Phe Ser His Asp Asn Glu Met Phe Ser Met Leu
 385 390 395 400
 Thr Ala Leu Gly Leu Thr Gln Phe Gly Asp Tyr Leu Ser Pro Thr Lys
 405 410 415
 Pro Ser Ala Asp Arg Ser Leu Ile Gly Ser His Ile Val Pro Phe Ser
 420 425 430
 Ala Thr Phe Val Phe Glu Ile Ile Lys Ala Pro Gly Leu Val Arg Glu
 435 440 445
 Asn Arg Ser Lys Tyr Cys Gly Glu Ser Val Tyr Glu Asn Thr Ser Glu
 450 455 460
 Glu Thr Thr Tyr Ile His Leu Val Ile Asn Gln Arg Thr Val Pro Leu
 465 470 475 480
 Gly Gln Ser Ile Ser Ala Cys Gly Gln Arg Asp Asp Gly Trp Cys Glu
 485 490 495
 Ile Ser Ala Phe Ile Gln Ala Gln Lys Glu Asn Ile Val Lys Ala Asn
 500 505 510
 Tyr Glu Glu Ser Cys Phe Gly Asn Trp Ser Ile Pro Ala Tyr Gly Glu
 515 520 525
 Ile Arg Asp Gly Ala Ile Pro Lys Asn Ala Thr Ser
 530 535 540

CP7

<210> 5
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Peniophora lycii

<400> 5

Met Val Ser Ser Ala Phe Ala Pro Ser Ile Leu Leu Ser Leu Met Ser
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Leu Ser Thr Gln Phe Ser Phe Val Ala Ala Gln Leu Pro
 20 25 30

Ile Pro Ala Gln Asn Thr Ser Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Pro Phe Phe
 35 40 45

Pro Val Glu Pro Tyr Ala Ala Pro Pro Glu Gly Cys Thr Val Thr Gln
 50 55 60

Val Asn Leu Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Trp Pro Thr Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Arg Ser Arg Gln Val Ala Ala Val Ala Lys Ile Gln Met Ala Arg Pro
 85 90 95

Phe Thr Asp Pro Lys Tyr Glu Phe Leu Asn Asp Phe Val Tyr Lys Phe
 100 105 110

Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Phe Gly Ala Asn Gln Ser His Gln Thr
 115 120 125

Gly Thr Asp Met Tyr Thr Arg Tyr Ser Thr Leu Phe Glu Gly Gly Asp
 130 135 140

Val Pro Phe Val Arg Ala Ala Gly Asp Gln Arg Val Val Asp Ser Ser
 145 150 155 160

Thr Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Asp Ala Ser Gly Glu Thr Val Leu
 165 170 175

Pro Thr Leu Gln Val Val Leu Gln Glu Gly Asn Cys Thr Leu Cys
 180 185 190

Asn Asn Met Cys Pro Asn Glu Val Asp Gly Asp Glu Ser Thr Thr Trp
 195 200 205

98

Leu Gly Val Phe Ala Pro Asn Ile Thr Ala Arg Leu Asn Ala Ala Ala
210 215 220

Pro Ser Ala Asn Leu Ser Asp Ser Asp Ala Leu Thr Leu Met Asp Met
225 230 235 240

Cys Pro Phe Asp Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ala Ser Pro Phe Cys Asp
245 250 255

Leu Phe Thr Ala Glu Glu Tyr Val Ser Tyr Glu Tyr Tyr Tyr Asp Leu
260 265 270

Asp Lys Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Gly Asn Ala Leu Gly Pro Val Gln
275 280 285

Gly Val Gly Tyr Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Leu Thr Gly Gln Ala
290 295 300

Val Arg Asp Glu Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp Ser Asp Pro Ala
305 310 315 320

Thr Phe Pro Leu Asn Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn
325 330 335

Thr Met Val Pro Ile Phe Ala Ala Leu Gly Leu Phe Asn Ala Thr Ala
340 345 350

Leu Asp Pro Leu Lys Pro Asp Glu Asn Arg Leu Trp Val Asp Ser Lys
355 360 365

Leu Val Pro Phe Ser Gly His Met Thr Val Glu Lys Leu Ala Cys Ser
370 375 380

Gly Lys Glu Ala Val Arg Val Leu Val Asn Asp Ala Val Gln Pro Leu
385 390 395 400

Glu Phe Cys Gly Gly Val Asp Gly Val Cys Glu Leu Ser Ala Phe Val
405 410 415

Glu Ser Gln Thr Tyr Ala Arg Glu Asn Gly Gln Gly Asp Phe Ala Lys
420 425 430

Cys Gly Phe Val Pro Ser Glu
435

<210> 6
 <211> 1623
 <212> ADN
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1623)

<400> 6
 atg tgg atg tgg agg ggg tgg ctg ccg ctg ctt ctg ctc gcc gcg gcg
 Met Trp Met Trp Arg Gly Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 gtg gcg gcg gcg gct gag ccg gcg tgg acg ctg gag gga ccg tgg ccg
 Val Ala Ala Ala Ala Glu Pro Ala Ser Thr Leu Glu Gly Pro Ser Arg
 20 25 30
 ccg gtg acg gtg ccg ctg ccg gaa gac agg ggc cac gcg gtg gac ctg
 Pro Val Thr Val Pro Leu Arg Glu Asp Arg Gly His Ala Val Asp Leu
 35 40 45
 ccg gac acg gac ccc ccg gtg cag cgc ccg gtc acc ggc tgg gct ccc
 Pro Asp Thr Asp Pro Arg Val Gln Arg Arg Val Thr Gly Trp Ala Pro
 50 55 60
 gag cag atc gcc gtc gcg ctc tcc gcc gct ccc acc tcc gcc tgg gtc
 Glu Gln Ile Ala Val Ala Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Ala Trp Val
 65 70 75 80
 tcc tgg atc acc ggg gat ttc cag atg ggc ggc gcc gtc aag ccg ctg
 Ser Trp Ile Thr Gly Asp Phe Gln Met Gly Gly Ala Val Lys Pro Leu
 85 90 95
 gac ccc ggc acg gtc ggc agc gtc gtg cgc tac ggc ctc gcc gcc gat
 Asp Pro Gly Thr Val Gly Ser Val Val Arg Tyr Gly Leu Ala Ala Asp
 100 105 110
 tct ttg gtc ccg gag gcc acc ggc gac gcg ctc gtg tac agc cag ctc
 Ser Leu Val Arg Glu Ala Thr Gly Asp Ala Leu Val Tyr Ser Gln Leu
 115 120 125
 tac ccc ttc gag ggc ctc cag aac tac acc tcc ggc atc atc cac cac
 Tyr Pro Phe Glu Gly Leu Gln Asn Tyr Thr Ser Gly Ile Ile His His
 130 135 140
 gtc cgc ctc caa ggg ctt gag cct ggg acg aag tac tac tac cag tgc
 Val Arg Leu Gln Gly Leu Glu Pro Gly Thr Lys Tyr Tyr Tyr Gln Cys
 145 150 155 160
 ggc gac ccg gcc atc ccg ggg gcg atg agc gcc gtc cac gcg ttc ccg
 Gly Asp Pro Ala Ile Pro Gly Ala Met Ser Ala Val His Ala Phe Arg
 165 170 175
 acg atg ccg gcg gtc ggg ccg ccg agc tac ccg ggg agg atc gcc gtg
 Thr Met Pro Ala Val Gly Pro Arg Ser Tyr Pro Gly Arg Ile Ala Val
 180 185 190

(100)

gtg ggg gac ctc ggg ctc acg tac aac acc acc tcg acc gtg gac cac
 Val Gly Asp Leu Gly Leu Thr Tyr Asn Thr Thr Ser Thr Val Asp His
 195 200 205
 atg gcg agc aac cgg ccg gac ctg gtc ctc ctc gtc ggc gac gtg tgc
 Met Ala Ser Asn Arg Pro Asp Leu Val Leu Leu Val Gly Asp Val Cys
 210 215 220
 tac gcc aac atg tac ctc acc aac ggc acc gga gcg gac tgc tac tcg
 Tyr Ala Asn Met Tyr Leu Thr Asn Gly Thr Gly Ala Asp Cys Tyr Ser
 225 230 235 240
 tgc gcg ttc ggc aag tcg acg ccc atc cac gag acg tac cag ccg cgc
 Cys Ala Phe Gly Lys Ser Thr Pro Ile His Glu Thr Tyr Gln Pro Arg
 245 250 255
 tgg gac tac tgg gga agg tac atg gag cgc gtg acg tcg ggg acg ccg
 Trp Asp Tyr Trp Gly Arg Tyr Met Glu Ala Val Thr Ser Gly Thr Pro
 260 265 270
 atg atg gtg gtg gaa ggg aac cat gag ata gag gag cag atc ggg aac
 Met Met Val Val Glu Gly Asn His Glu Ile Glu Glu Gln Ile Gly Asn
 275 280 285
 aag acg ttc gcg gcc tac cgc tcc cgg ttc ggc tcc ccg tcg acg gag
 Lys Thr Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ala Phe Pro Ser Thr Glu
 290 295 300
 agc ggg tcc ttc tcc ccc ttc tac tac tcg ttc gac gcc ggc ggg atc
 Ser Gly Ser Phe Ser Pro Phe Tyr Tyr Ser Phe Asp Ala Gly Gly Ile
 305 310 315 320
 cat ttc ctc atg ctc ggc gcc tac gcc gac tac ggc agc tca ggg gag
 His Phe Leu Met Leu Gly Ala Tyr Ala Asp Tyr Gly Arg Ser Gly Glu
 325 330 335
 cag tac aga tgg ctg gag aag gac ctg gcg aag gtg gac agg tcg gtg
 Gln Tyr Arg Trp Leu Glu Lys Asp Leu Ala Lys Val Asp Arg Ser Val
 340 345 350
 acg ccg tgg ctg gtc gcc ggc tgg cac gcg cca tgg tac acc acc tac
 Thr Pro Trp Leu Val Ala Gly Trp His Ala Pro Trp Tyr Thr Thr Tyr
 355 360 365
 aag gct cac tac agc gag gtg gag tgc atg aga gtg gcc atg gag gag
 Lys Ala His Tyr Arg Glu Val Glu Cys Met Arg Val Ala Met Glu Glu
 370 375 380
 ctg ctc tac tcc ctc ggc ctc gac atc gcc ttc acc ggc cat gtg cac
 Leu Leu Tyr Ser His Gly Leu Asp Ile Ala Phe Thr Gly His Val His
 385 390 395 400
 gcg tat gag cgc tcc aac cgg gtg ttc aac tac acg ctg gac ccg tgc
 Ala Tyr Glu Arg Ser Asn Arg Val Phe Asn Tyr Thr Leu Asp Pro Cys
 405 410 415
 ggc gcc gtg cac atc tcg gtg ggc gac ggc ggg aac cgc gag aag atg
 Gly Ala Val His Ile Ser Val Gly Asp Gly Gly Asn Arg Glu Lys Met

101

gcc acc acc cac gcc gac gag cca ggg cac tgc ccg gac ccg cgg ccc
Ala Thr Thr His Ala Asp Glu Pro Gly His Cys Pro Asp Pro Arg Pro
435 440 445

aag ccc aac gcc ttc atc gcc ggc ttc tgc gcc ttt aac ttc acg tcc
Lys Pro Asn Ala Phe Ile Gly Gly Phe Cys Ala Phe Asn Phe Thr Ser
450 455 460

ggc ccg gcc gcc ggc agg ttc tgc tgg gac ccg cag ccg gac tac agc
Gly Pro Ala Ala Gly Arg Phe Cys Trp Asp Arg Gln Pro Asp Tyr Ser
465 470 475 480

gcc tac ccg gag agc agc ttc ggc cac ggc atc ctc gag gtg aag aac
Ala Tyr Arg Glu Ser Ser Phe Gly His Gly Ile Leu Glu Val Lys Asn
485 490 495

gag acg cac gct ctg tgg aga tgg cac agg aac cag gac atg tac cgg
Glu Thr His Ala Leu Trp Arg Trp His Arg Asn Gln Asp Met Tyr Gly
500 505 510

agc gcc gga gac gag att tac att gtc cgg gag ccg cac agg tgc ttg
Ser Ala Gly Asp Glu Ile Tyr Ile Val Arg Glu Pro His Arg Cys Leu
515 520 525

cac aaa cac aac tgg acc agc ccc gca cac ggt ccg taa
His Lys His Asn Trp Thr Arg Pro Ala His Gly Pro
530 535 540

<210> 7
<211> 540
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 7

Met Trp Met Trp Arg Gly Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala
1- 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Glu Pro Ala Ser Thr Leu Glu Gly Pro Ser Arg
20 25 30

Pro Val Thr Val Pro Leu Arg Glu Asp Arg Gly His Ala Val Asp Leu
35 40 45

Pro Asp Thr Asp Pro Arg Val Gln Arg Arg Val Thr Gly Trp Ala Pro
50 55 60

Glu Gln Ile Ala Val Ala Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Ala Trp Val
65 70 75 80

Ser Trp Ile Thr Gly Asp Phe Gln Met Gly Gly Ala Val Lys Pro Leu

702

Asp Pro Gly Thr Val Gly Ser Val Val Arg Tyr Gly Leu Ala Ala Asp
100 105 110

Ser Leu Val Arg Glu Ala Thr Gly Asp Ala Leu Val Tyr Ser Gln Leu
115 120 125

Tyr Pro Phe Glu Gly Leu Gln Asn Tyr Thr Ser Gly Ile Ile His His
130 135 140

Val Arg Leu Gln Gly Leu Glu Pro Gly Thr Lys Tyr Tyr Tyr Gln Cys
145 150 155 160

Gly Asp Pro Ala Ile Pro Gly Ala Met Ser Ala Val His Ala Phe Arg
165 170 175

Thr Met Pro Ala Val Gly Pro Arg Ser Tyr Pro Gly Arg Ile Ala Val
180 185 190

Val Gly Asp Leu Gly Leu Thr Tyr Asn Thr Thr Ser Thr Val Asp His
195 200 205

Met Ala Ser Asn Arg Pro Asp Leu Val Leu Leu Val Gly Asp Val Cys
210 215 220

Tyr Ala Asn Met Tyr Leu Thr Asn Gly Thr Gly Ala Asp Cys Tyr Ser
225 230 235 240

Cys Ala Phe Gly Lys Ser Thr Pro Ile His Glu Thr Tyr Gln Pro Arg
245 250 255

Trp Asp Tyr Trp Gly Arg Tyr Met Glu Ala Val Thr Ser Gly Thr Pro
260 265 270

Met Met Val Val Glu Gly Asn His Glu Ile Glu Glu Gln Ile Gly Asn
275 280 285

Lys Thr Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ala Phe Pro Ser Thr Glu
290 295 300

Ser Gly Ser Phe Ser Pro Phe Tyr Tyr Ser Phe Asp Ala Gly Gly Ile
305 310 315 320

His Phe Leu Met Leu Gly Ala Tyr Ala Asp Tyr Gly Arg Ser Gly Glu
325 330 335

Gln Tyr Arg Trp Leu Glu Lys Asp Leu Ala Lys Val Asp Arg Ser Val
340 345 350

Thr Pro Trp Leu Val Ala Gly Trp His Ala Pro Trp Tyr Thr Thr Tyr
355 360 365

Lys Ala His Tyr Arg Glu Val Glu Cys Met Arg Val Ala Met Glu Glu
370 375 380

Leu Leu Tyr Ser His Gly Leu Asp Ile Ala Phe Thr Gly His Val His
385 390 395 400

Ala Tyr Glu Arg Ser Asn Arg Val Phe Asn Tyr Thr Leu Asp Pro Cys
405 410 415

Gly Ala Val His Ile Ser Val Gly Asp Gly Gly Asn Arg Glu Lys Met
420 425 430

Ala Thr Thr His Ala Asp Glu Pro Gly His Cys Pro Asp Pro Arg Pro
435 440 445

Lys Pro Asn Ala Phe Ile Gly Gly Phe Cys Ala Phe Asn Phe Thr Ser
450 455 460

Gly Pro Ala Ala Gly Arg Phe Cys Trp Asp Arg Gln Pro Asp Tyr Ser
465 470 475 480

Ala Tyr Arg Glu Ser Ser Phe Gly His Gly Ile Leu Glu Val Lys Asn
485 490 495

Glu Thr His Ala Leu Trp Arg Trp His Arg Asn Gln Asp Met Tyr Gly
500 505 510

Ser Ala Gly Asp Glu Ile Tyr Ile Val Arg Glu Pro His Arg Cys Leu
515 520 525

His Lys His Asn Trp Thr Arg Pro Ala His Gly Pro
530 535 540

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/001652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/16 C12P7/18 C12P3/00 A23K1/165

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C12P A23K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/30681 A (NOVO NORDISK A/S; OHMANN, ANDERS; KNAP, INGE, HELMER) 16 July 1998 (1998-07-16) the whole document	1-22
A	WO 00/71728 A (DIVERSA CORPORATION) 30 November 2000 (2000-11-30) pages 79,80	1-22
A	FUJITA JIN ET AL: "Critical importance of phytase for yeast growth and alcohol fermentation in Japanese sake brewing" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 23, no. 11, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 867-871, XP002369734 ISSN: 0141-5492 the whole document	1-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 2006

Date of mailing of the international search report

29/11/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2006/001652

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/098442 A (KRUEGER GMBH & CO KG; SCHWEREN, ROLF, H) 12 December 2002 (2002-12-12) the whole document	1-22
A	NASI M ET AL: "COMPARISON OF ASPERGILLUS NIGER PHYTASE AND TRICHODERMA REESEI PHYTASE AND ACID PHOSPHATASE ON PHYTATE PHOSPHORUS AVAILABILITY IN PIGS FED ON MAIZE-SOYBEAN MEAL OR BARLEY-SOYBEAN MEAL DIETS" ARCHIV FUER TIERERNAEHRUNG - ARCHIVES OF ANIMAL NUTRITION, AKADEMIE VERLAG, BERLIN, DE, vol. 52, no. 1, 1999, pages 15-27, XP008045959 ISSN: 0003-942X the whole document	1-22
A	EP 0 619 369 A (AVEVE N.V) 12 October 1994 (1994-10-12) the whole document	1-22
A	ZYTA K: "THE ROLE OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY DURING ENZYMIC DEPHOSPHORYLATION OF PHYTATES BY ASPERGILLUS NIGER PHYTASE" WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, RAPID COMMUNICATIONS OF OXFORD, OXFORD, GB, vol. 9, no. 1, 1993, pages 117-119, XP000614876 ISSN: 0959-3993 the whole document	1-22
A	WYSS MARKUS ET AL: "Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 367-373, XP002369735 ISSN: 0099-2240 page 371, left-hand column	1-22
A	DVORAKOVA J: "PHYTASE: SOURCES, PREPARATION AND EXPLOITATION" FOLIA MICROBIOLOGICA, PRAQUE, CZ, vol. 43, no. 4, 1998, pages 323-338, XP001080605 ISSN: 0015-5632	

-/--

106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/001652

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VOHRA A ET AL: "PHYTASES: MICROBIAL SOURCES, PRODUCTION, PURIFICATION, AND POTENTIAL BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS" CRC CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY, CRC PRESS, BOCA RATON, FL, US, vol. 23, no. 1, 2003, pages 29-60, XP008060235 ISSN: 0738-8551 -----	

107

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2006/001652

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9830681	A	16-07-1998	AU	5477898 A		03-08-1998
WO 0071728	A	30-11-2000	AU	783041 B2		15-09-2005
			AU	5304400 A		12-12-2000
			BR	0010946 A		16-04-2002
			CA	2374532 A1		30-11-2000
			CN	1351666 A		29-05-2002
			EP	1180152 A1		20-02-2002
			JP	2003500057 T		07-01-2003
			ZA	200109428 A		17-03-2003
WO 02098442	A	12-12-2002	AU	2002316927 A1		16-12-2002
			DE	10126970 A1		05-12-2002
			EP	1392353 A2		03-03-2004
EP 0619369	A	12-10-1994	AT	244302 T		15-07-2003
			CA	2120265 A1		06-10-1994
			DE	69333071 D1		07-08-2003
			DE	69333071 T2		06-05-2004
			DK	619369 T3		06-10-2003
			ES	2202305 T3		01-04-2004
			FI	941545 A		06-10-1994
			JP	3587876 B2		10-11-2004
			JP	6319539 A		22-11-1994
			NO	941183 A		06-10-1994
			PT	619369 T		28-11-2003
			US	5443979 A		22-08-1995

1. Composición que combina por lo menos dos fitasas para la hidrólisis de ácido fítico (mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisfosfato), caracterizado por que ésta comprende:
 - (a) una primera fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 2;
 - (b) una segunda fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ. ID No. 3.
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la primera fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de seis enlaces fosfato de ácido fítico.
3. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la primera fitasa tiene una temperatura óptima de entre 55°C y 80°C y un pH óptimo de entre pH 3.5 y pH 5.
4. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizadas porque la primera fitasa es una fitasa de levadura *Schwanniomices castellii* o una fitasa de la levadura *Debariomices castellii*.
5. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la primera fitasa es la fitasa de la SEQ. ID No. 1 o la fitasa de la SEQ. ID No. 2.
6. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda fitasa es una 3-fitasa que cataliza la hidrólisis de por lo menos cinco enlaces fosfato de ácido fítico.
7. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda fitasa tiene una temperatura óptima de entre 50°C y 60°C y un pH óptimo de entre pH 2 y pH 6.
8. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda fitasa es una fitasa de *Aspergillus niger*.
9. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda fitasa es la fitasa de la SEQ. ID No. 3.
10. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque ésta consiste de un aditivo nutricional para animales o de un alimento animal.

108

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 9,463
FECHA : FEBRERO 4 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-012275- -00000-0000

Fecha: 2008-02-07 16:50:11 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIYH Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 108

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2678327	04/02/2008	51,244,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
	TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Culo 13300-841-001-0

110

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-012275-00000-0000

Fecha: 2008-02-07 16:50:11
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONI
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 108



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- ◆ Descripción de la invención [✓]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia M. Nava Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

111

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
ADISSEO FRANCE SAS

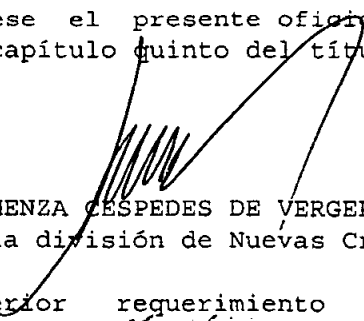
REFERENCIA	Radicación No.	8 12275
	Solicitud internacional	PCT/FR2006/001652
	Fecha inicio fase nacional	08/02/2008
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	2724

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
2. El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al capítulo I o II del PCT por que la indicación en el petitorio no corresponde a los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos que corresponden.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 22 FEB. 2008
jfernand