

# CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI  
CARRERA 4 No. 72 - 35  
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

www.cavelier.com  
cavelier@cavelier.com

Teléfono: (57-1) 347 3611  
Telefax: (57-1) 211 8650  
(57-1) 700 4814  
Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743

Señor Director  
**DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES**  
Superintendencia de Industria y Comercio  
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-012275- -00006-0000  
Fecha: 2012-08-30 16:40:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI  
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 33

Trámite : 011  
Evento : 379  
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. **08.012.275**  
Asunto : Solicitud de patente para: **EFFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE FITASAS COBRE LA HIDRÓLISIS DE ÁCIDO FÍTICO**  
Solicitante : ADISSEO FRANCE SAS  
Fecha solicitud : 07 de febrero 2008

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, de conformidad con la sustitución de poder otorgada a mí por el doctor Emilio FERRERO, me refiero al oficio No. **9209** notificado por fijación en lista del 01 de junio de 2012.

2. Mediante oficio No. **9209** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio son las siguientes:

## 2.1 Reivindicaciones relativas a un uso

Se objetan las reivindicaciones 11 y 12, por cuanto hacen referencia a un uso.

## 2.2 No es una invención

El Examinador considera que las reivindicaciones 13 a 21 no constituyen una invención según el artículo 15 de la Decisión 486 y argumenta que estas reivindicaciones hacen referencia a la interacción natural de una enzima con su sustrato, lo cual es un proceso esencialmente biológico excluido de patentabilidad de acuerdo con el artículo mencionado.

### **2.3 De la solicitud de patente**

#### **2.3.1 Reivindicaciones**

De manera resumida, el Examinador expone lo siguiente:

- Reivindicación 1: la composición debe caracterizarse a partir de los elementos y las proporciones de los mismos
- Reivindicaciones 1 y 13: las expresiones “por lo menos dos fitasas” y “por lo menos 80% de identidad” afectan la claridad de estas reivindicaciones
- Reivindicaciones 2 y 6: hacen referencia a la actividad natural de la enzima y no a sus características técnicas
- Reivindicaciones 3 a 9: se sugiere hacerlas dependientes de la reivindicación 1
- Reivindicación 10: hace referencia al uso de la composición
- Reivindicación 22: divulga un kit pero no se diferencia de la composición reivindicada

#### **2.3.2 Descripción**

El Examinador solicita corregir los términos “capas” y “taza”, los cuales no corresponden a la traducción del término original.

### **2.4 Análisis de patentabilidad**

#### **2.4.1 Nivel inventivo**

Para la evaluación de este requerimiento se han citado los documentos D1: WO 9830681 y D2: US 5830732. Según los argumentos expuestos, una persona medianamente versada en la materia estaría motivada a realizar una combinación de dos 3-fitasas con la expectativa razonable de obtener el mismo efecto sinérgico que con las combinaciones del arte previo. Adicionalmente se señala que D2 revela una 3-fitasa de *Schwanniomyces occidentalis* de secuencia idéntica a la SEQ ID NO. 1 de la presente solicitud.

### **3. Respuesta a las objeciones**

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se desea presentar las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

### **3.1 Modificación de una solicitud en trámite y novedad de la solicitud**

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar una nueva memoria descriptiva, así como un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 5 reivindicaciones.

Así, siguiendo las amables sugerencias del Examinador se han realizado las siguientes modificaciones:

- Se ha reemplazado el término “capas” por “capaz” y el término “taza” por “velocidad” a lo largo de toda la descripción. Estos términos corresponden a una traducción más fiel del texto original en inglés
- Se ha modificado la reivindicación 1 para definir de manera inequívoca los componentes de la misma
- Se han eliminado las reivindicaciones 2, 5, 6 y 9 a 22
- Las reivindicaciones restantes, así como sus dependencias han sido reenumeradas correspondientemente

Estas modificaciones permiten presentar la materia de manera más clara. Adicionalmente, no se reclaman usos o procesos biológicos, por lo que las objeciones formuladas por el Examinador en cuanto a la claridad, concisión o inclusión de materia no patentable se ven superadas. Solicitamos atentamente tener en cuenta este nuevo pliego reivindicatorio para el análisis de patentabilidad.

### **3.2 Argumentos a favor del nivel inventivo de la solicitud**

Así entonces, el artículo 18 de la Decisión 486 señala lo siguiente:

**Artículo 18.-** Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.

Consecuentemente, una invención se considerará inventiva si la misma no hubiese resultado obvia a partir del arte previo, para una persona del oficio normalmente versada en la materia. Esto a su vez implica que el Examinador a cargo de esta evaluación debe colocarse en el momento exacto en el que el inventor buscaba resolver el problema técnico contemplado en la solicitud y para el cual poseía la literatura y el conocimiento disponibles en dicho momento.

Siguiendo entonces los lineamientos de la Jurisprudencia aplicable al análisis del nivel inventivo de una solicitud de patente, se considera que una anterioridad o una combinación de dos anterioridades puede afectar dicho requerimiento de patentabilidad, si una persona medianamente versada en la materia encuentra enseñanzas o sugerencias claras que, a partir de un conocimiento medio en dicho campo, le permitan llegar de manera obvia a la invención reivindicada. Adicionalmente se considera que una mejora sustancial, un efecto inesperado o una ventaja con respecto al arte previo es un indicio de nivel inventivo, por cuanto aporta un salto tecnológico en la regla técnica.

Respecto a lo anterior, el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina ha expuesto en la Interpretación Prejudicial del proceso 13-IP-2010:

*“En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no es consecuencia clara y directa de dicho estado”.*

[señalado fuera del texto]

Por lo anterior, se entiende que para que una persona medianamente versada en la materia pudiera derivar de manera obvia una invención, requeriría simplemente aplicar sus conocimientos técnicos. En contraste, todo aquello que va más allá de la simple aplicación de los conocimientos técnicos y que no ha sido revelado en el estado de la técnica, debe ser considerado inventivo.

A este respecto, respetuosamente manifestamos nuestro desacuerdo con el análisis llevado a cabo por el Examinador y con las conclusiones del mismo y solicitamos atentamente la reconsideración de las razones por las cuales se decidió objetar el nivel inventivo de la solicitud, con base en la siguiente información:

El documento D1 revela que un efecto sinérgico es observado cuando se emplean fitas de diferentes especificidades. Esta enseñanza no llevaría a una persona medianamente

versada en la materia a obtener de manera obvia la composición reivindicada, toda vez que aunque D1 revela la combinación de dos 3-fitasas, ésta se encuentra dentro de una larga lista de otras posibles combinaciones. D1 además no provee ejemplo alguno que muestre resultados de dicha combinación relativos a una completa hidrólisis de la fitasa. De hecho la combinación descrita en D1 no logra una hidrólisis completa de la fitasa (ver página 38).

Tal como se indica en la descripción de la presente solicitud, D1 revela una combinación específica de fitasas la cual no sólo se diferencia de la composición de la presente solicitud, sino que también, como demuestran los inventores, tienen propiedades inferiores comparadas con la combinación de la primera y la segunda fitasa de la presente solicitud. Con el fin de demostrar esto, la descripción incluye resultados experimentales que comparan varias combinaciones de fitasas, incluyendo la combinación revelada por D1 con la combinación específica de la presente solicitud. Los resultados se resumen por ejemplo, en la figura 2.

A partir de lo anterior y tal como enseña D1, se puede concluir que ciertas fitasas en combinación exhiben resultados sinérgicos con respecto a la hidrólisis del ácido fítico. Sin embargo, la combinación ejemplificada y enseñada por D1 corresponde a una AN (3-fitasa) con una PL (6-fitasa). La persona medianamente versada en la materia sabe que una AN y una PL, cada una, hidrolizan solamente 5 enlaces (es decir, el 83% del fósforo potencial).

El documento D1 está dirigido al efecto sinérgico logrado por esta combinación ejemplificada de AN con PL, es decir una 3-fitasa con una 6-fitasa, ambas con diferentes especificidades de posición. El efecto mejorado de sinergia respecto a la hidrólisis del ácido fítico puede ser visto en la figura 2 de la presente solicitud, ya que la combinación de la presente solicitud tiene un efecto mejorado sobre la hidrólisis del ácido fítico respecto a la fitasa por sí sola.

Sin embargo, los inventores de la presente solicitud han encontrado de manera inesperada que la combinación de dos 3-fitasas que tienen la misma especificidad de posición, y aún más, la combinación de dos 3-fitasas SC/AN o DC/AC exhiben un sinergismo superior y tienen sinergismo sobre todos los rangos de pH. Tal como se evidencia en la figura 2 de la presente solicitud, las combinaciones recitadas de SC/AN y DC/AN hidrolizaron del 80% al 100% de los enlaces fosfato en todos los pH probados.

Adicionalmente, los resultados experimentales demuestran que la combinación de una 3-fitasa (AN, DC, PF), 4-fitasa (B) o una 6-fitasa (PL) una con otra, no provee ningún mejoramiento notable (ver descripción).

Los extensivos resultados experimentales presentados junto con la descripción demuestran que el efecto sinérgico logrado por las combinaciones reivindicadas es superior con respecto a las combinaciones de D1. Además, D1 no reconoce los resultados inesperados de la presente solicitud, por cuanto D1 enseña una combinación de dos fitasas con especificidades de posición diferentes con el fin de lograr el efecto sinérgico.

De otro lado, la combinación de D1 con el documento D2 no afecta el nivel inventivo de la composición reivindicada, ya que D2 no resulta un documento que sería considerado por una persona medianamente versada en la materia en el momento de solucionar el problema técnico de la presente solicitud. Tal como demuestra el examen llevado a cabo por el Examinador, D2 solamente revela la secuencia de la fitasa de *Schwanniomyces occidentales* y la persona medianamente versada en la materia no encuentra enseñanzas allí que le lleven a considerar que la combinación específica de la presente solicitud podría tener un efecto sinérgico mejorado.

Por lo anterior ni D1 ni D2 resultan anterioridades válidas capaces de afectar el nivel inventivo de la emulsión de la presente solicitud, ya que no solucionaban el problema técnico de la presente solicitud y no sugerían las características técnicas que ofrecen un efecto técnico inesperado.

4. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por el Examinador, se solicita atentamente proceder al otorgamiento de la solicitud de patente. En este sentido, respetuosamente recordamos al Examinador que la patente no podrá ser negada con base en objeciones diferentes a las expuestas en la acción oficial No. 9209oda vez que al no haber sido trasladadas a mi representada, dicha decisión violaría tanto el tenor literal del artículo 45 de la Decisión 486 como el derecho constitucional al debido proceso. En este evento, y con base en el inciso 2 del artículo 45, respetuosamente solicitamos al Examinador expedir una nueva acción oficial que permita a mi representada contra argumentar las mismas o modificar la solicitud con el fin de cumplir los requisitos de patentabilidad.

#### **5. Anexos**

- Nueva memoria descriptiva
- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 5 reivindicaciones
- Formulario de modificaciones en solicitud pendiente

**CAVELIER**  
ABOGADOS

- Copia simple de la sustitución del poder otorgado por el Doctor EMILIO FERRERO, a mi favor, para lo cual solicito me sea reconocida personería y así continuar con el trámite de este asunto en favor de la sociedad solicitante

Señor Director,

*LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ*

**LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ**

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-13300-841-001-0  
JMS\JMS\ID-224478\WPC13300  
No. M-2012-224478\JMS

|                                                                                                                                      |                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA | Espacio reservado para el adhesivo de radicación |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|

**DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES**

**1. Identificación del Trámite**

- ☐ Error material ☒ Modificación a una Solicitud en trámite
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

**2. Datos del solicitante**

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

**ADISSEO FRANCE S.A.S.**

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa      Micro ☐      Pequeña ☐      Mediana ☐      Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C.      ☐ C.E.      ☐ NIT      ☐ Otro Número \_\_\_\_\_

| Nacionalidad/País de constitución | Dirección y domicilio del titular       | Ciudad            |
|-----------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|
| Francia                           | 42 avenue Aristide Briand, 92160 Antony | Antony            |
| Dirección electrónica             |                                         | No. Fax           |
| clientes@cavelier.com             |                                         | 2 11 86 50        |
|                                   |                                         | Número telefónico |
|                                   |                                         | 3 47 36 11        |

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

**3. Datos del apoderado:**

Apellidos y Nombre  
De Páez Luz Clemencia

Documento de identificación  
C.C. 35.456.344

Tarjeta profesional  
T.P.A. 23.555

| Dirección y domicilio                                                                                                                                                                       |  | Ciudad            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------|
| Carrera 4ª No. 72 -35                                                                                                                                                                       |  | Bogotá            |
| Dirección electrónica                                                                                                                                                                       |  | No. Fax           |
| cavelier@cavelier.com                                                                                                                                                                       |  | 2 11 86 50        |
|                                                                                                                                                                                             |  | Número telefónico |
|                                                                                                                                                                                             |  | 3 47 36 11        |
| En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general |  |                   |

## 4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 08.012.275

Aparece

Debe ser

## Modificación:

**Modificación al capítulo reivindicatorio.**

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 5 reivindicaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.

Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

**Modificación al capítulo descriptivo.**

Presento nuevo capítulo descriptivo, el cual solicito que sea tenido en cuenta al realizar del examen de patentabilidad

**Modificación al resumen.****Modificación a los dibujos.****Modificación al solicitante.**

## 5. Anexos



Poder, si fuere el caso.



Documento que contiene las modificaciones o correcciones.



Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.



Copia simple de la sustitución que del poder otorgado por la Sociedad Solicitante hizo el Doctor EMILIO FERRERO a mi favor, y para lo cual solicito me sea reconocida personería para continuar con el trámite del asunto de la referencia.

|                            |                                                   |
|----------------------------|---------------------------------------------------|
| 6. Firma                   |                                                   |
| Nombre y apellidos         | Firma                                             |
| LUZ CLEMENCIA DE PAEZ      | <i>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</i>                      |
| C.C. 35.456.344 DE Usaquén | Tarjeta Profesional 23.555<br><i>TP #23555CSJ</i> |

 IMSINCA\WPC13300\ID-224487

11

# CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com  
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI  
CARRERA 4 No. 72 - 35  
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611  
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

E. S. D.

Poderdante : **ADISSEO FRANCE SAS**

Poder conferido el : 04/11/2004

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

**NOTARIA SEXTA DE BOGOTA**  
 RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL  
 Bogotá, D.C. **22 OCT 2009**  
 Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,  
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE  
 BOGOTÁ, D.C.  
 Compareció(eron) *Emilio Ferrero*  
*Williamson y Luz Mercedes*  
*Juarez de Pérez*  
 Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.  
*CC 438019 TP 31929*  
*N.E 35456344 TP 13555*  
 Y declaró(aron) que la(s) firme(s) que aparece(n)  
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y  
 que el contenido del mismo es cierto.  
 En constancia se firma esta diligencia.

*Emilio Ferrero*  
*Luz Mercedes Juárez de Pérez*



## **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  
( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) 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,  
 $\text{InsP}_6$ ) a monofosfatos inorgánicos y a fosfatos mio-inositol con un grado mas bajo  
de fosforilación ( $\text{InsP}_5$  a  $\text{InsP}_1$ ) y a mio- inositol libre en ciertos casos.

30 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.

35 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.

- 5 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.
- 10

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.*, *Esqueriquia coli*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus Subtilis*

15 y levaduras: *Saccaromices cerevisiae*, *candida tropicales*, *Torulopsis candida*, *Debariomices castellii*, *Debariomices occidentalis* (sinónimo *Schwanniomices castelli*), *Kluiveromices fragilis*.

Numerosas fitasas de microorganismos ya han sido estudiados y se utilizan en

20 varias aplicaciones agroindustriales. La efectividad de estas enzimas en el alimento y en el curso de la digestión en el animal depende 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

25 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.

La mayoría de las fitasas descritas hasta la fecha solo hidrolizan parcialmente el

30 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.

Hasta la fecha, entre la levadura, solamente la fitasa de la levadura *Schwanniomices occidentalis* se ha descrito por ser capaz de hidrolizar todos los

35 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).

5 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 combinar varias fitasas.

10 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 Novo<sup>TM</sup>).

15 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.

20

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

25 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  
30 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.

35

**Descripción de la secuencia**

SEQ ID No. 1: fitasa de *Schwanniomices castellii*

SEQ ID No. 2: fitasa de *Debariomices castellii*

5 SEQ ID No. 3: fitasa de *Aspergillus Níger*

SEQ ID No. 4: fitasa de *Penicilium funiculosum*

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*).

10

**Descripción de la invención**

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),  
15 que comprende:

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

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

25

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

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

30

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

35

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*.

5

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.

10

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.

15 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 animales.

La presente invención también se relaciona con un método de hidrólisis de ácido  
20 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:

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

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

35 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.

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

5 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.

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

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

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

20

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

25 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 segunda fitasa que exhibe por lo menos 80% de identidad con la fitasa de la SEQ ID No. 3.

30

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

35

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,  $\text{InsP}_6$ ) a monofosfatos inorgánicos y a mio-inositol fosfato con un grado inferior de fosforilación ( $\text{InsP}_5$  a  $\text{InsP}_1$ ) 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 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 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.

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.

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<sub>6</sub>) a monofosfatos inorgánicos y a mio-inositol libre.

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.

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 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.

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

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.

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

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.

10

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.

15

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.

20

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.

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 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.

30

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

35

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

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 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 fólico 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://.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 estas 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.

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.

- 5 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.

10 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.

15 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 significar cualquier cosa que se pueda utilizar para alimentar animales. Para la crianza intensiva de animales, los alimentos de los animales usualmente  
20 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.

25 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  
30 ya contener aditivos nutricionales tales como vitaminas, sales minerales y amino ácidos.

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

comprenden en particular cerdos en crecimiento y en terminado y también lechones.

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.

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.

## 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.

**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.

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

## Ejemplos

### Materiales y métodos

#### 1. Orígenes de la fitasa.

- *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 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 después de varios tiempos de incubación.

Una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgánico en un minuto.

### 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 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.

### 4. Ensayo de fosfato

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.

## Resultados

### 1. Fitasas probadas

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**).

5

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

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

Bran of *Triticum aestivum* L. cv Nourin#61. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 995-1003

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

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

10

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  
15 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.

20

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.

25

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  
30 pH 6.5. La fitasa AN es la menos sensible a las variaciones en el pH; sin embargo, ésta libera solamente 60 a 70% de los fosfatos, es decir, valores 10 a 20% inferiores que aquellos esperados (Figura 2A).

30

La comparación de las velocidades iniciales de liberación de fosfato muestran mucha heterogeneidad entre las fitasas (Figura 3A). La fitasa mas eficiente a pH ácido es aquella de *Schwanniomyces castellii*, mientras que aquella de *A. niger* es

35

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.

### **3. Influencia del pH sobre la velocidad 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 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 velocidades 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 velocidad 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).

**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.

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

|      | PL/DC<br>(0.08U) | PL/DC<br>(0.04U) | AN/PL<br>(0.08U) | AN/PL<br>(0.04U) |
|------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| pH 3 | 94               | 70<br>(74%)      | 79               | 56<br>(72%)      |
| pH 4 | 100              | 93<br>(94%)      | 86               | 76<br>(89%)      |

|        |    |       |    |       |
|--------|----|-------|----|-------|
| pH 5.5 | 85 | 71    | 70 | 66    |
|        |    | (84%) |    | (94%) |
| pH 6   | 85 | 47    | 74 | 67    |
|        |    | (56%) |    | (90%) |
| pH 6.5 | 35 | 10    | 61 | 52    |
|        |    | (30%) |    | (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.

5 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 varía de 3 a 6. La mezcla AN/PL no incrementa significativamente la hidrólisis porcentual observada para cada fitasa tomada  
10 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).

15

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

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

|        | AN      | DC      | PL      | AN/DC   | AN/DC   |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
|        | (0.08U) | (0.08U) | (0.08U) | (0.08U) | (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   | PL/DC   | AN/PL   | AN/PL   |
|        | (0.08U) | (0.04U) | (0.08U) | (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 velocidades 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 velocidades 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

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 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<br>de fitasas | AN | DC | AN/DC<br>(1/1) | AN/DC<br>(1/2) | AN/DC<br>(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 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.

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.

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 fítico en el alimento también se incrementaría, mejorando el valor del alimento y así haciendo posible disminuir la toma de fosfato inorgánico. La contaminación causada por el desperdicio de fosfato no disponible disminuye así.

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que combina dos 3-fitasas para la hidrólisis de ácido fítico (mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisfosfato), caracterizada porque comprende:
- (a) una primera fitasa de SEQ. ID No. 1 ó SEQ. ID No. 2;
- (b) una segunda fitasa de SEQ. ID No. 3.
- 10 2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, 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.
- 15 3. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la primera fitasa es una fitasa de levadura *Schwanniomices castellii* o una fitasa de la levadura *Debariomices castellii*.
- 20 4. 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.
- 25 5. Composición de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda fitasa es una fitasa de *Aspergillus niger*.