

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 059**

51 Int. Cl.:

A23K 1/165 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2007 E 07820635 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2073642**

54 Título: **Xilanasas para pienso animal**

30 Prioridad:

29.09.2006 DK 200601262

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

10.02.2016

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (50.0%)

Krogshøjvej 36

2880 Bagsværd, DK y

DSM IP ASSETS B.V. (50.0%)

72 Inventor/es:

FISCHER, MORTEN y

PETTERSSON, DAN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 559 059 T3

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

DESCRIPCIÓN

Xilanasas para pienso animal

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0001] Esta invención se refiere al campo de pienso para animales.

10 [0002] Los granos de cereal son un componente importante del pienso para animales. Ellos contienen, entre otros, polisacáridos vegetales que pueden funcionar como componente nutricional principal en la dieta (por ejemplo, almidón), pero también varios polisacáridos no amiláceos (NSP) incluyendo, entre otros, arabinoxilanos.

15 En animales de granja mayor como aves y cerdos faltan las enzimas pertinentes en sus tractos digestivos para la digestión del NSP. Se conoce en la técnica el uso de xilanasas en el pienso para animales para mejorar la utilización del pienso.

20 [0003] La presente invención se refiere al uso en el pienso para animales de una xilanasas con un porcentaje de identidad a una xilanasas de *Paenibacillus* (aminoácidos 1-182 de SEQ ID n°: 2) de al menos el 90%. La invención se define por las reivindicaciones.

Descripción de las técnicas relacionadas

25 [0004] WO 2006/083240 divulga en el ejemplo 6 el uso en el pienso de pollos de una xilanasas designada como XylA1A.

La secuencia de aminoácidos de XylA1A corresponde a SEQ ID n°: 2 en WO 2006/083240, que es idéntico a la parte madura de UNIPROT:Q6TLP3 que se incluye en el presente listado de secuencias como SEQ ID n°: 9.

30 Según la entrada de la base de datos UniProt esta secuencia se deriva de una bacteria aislada de una muestra medioambiental.

El porcentaje de identidad de la xilanasas de SEQ ID n°: 9 a los aminoácidos 1-184 de SEQ ID n°: 4 está por debajo de 82,7%.

35 [0005] La xilanasas RONOZYME WX es una xilanasas conocida como monocomponente de pienso para animales derivada de *Thermomyces lanuginosus* y disponible comercialmente en DSM Nutritional Products, Wurmisweg 576, CH-4303 Kaiseraugst, Suiza.

Esta xilanasas y su uso en el pienso para animales se describen también en WO 96/23062.

Esta xilanasas no tiene un peso molecular por debajo de 24 kDa.

40 [0006] Una xilanasas de *Paenibacillus pabuli* con la aminosecuencia de los aminoácidos 1- 182 de SEQ ID n°: 2 aquí, y su uso en un proceso para preparar un producto a base de masa, se describen en WO 2005/079585.

[0007] La secuencia de aminoácidos de una xilanasas de *Paenibacillus* sp.

45 KCTC 8848P se entregó a la base de datos de Uniprot público con número de acceso UNIPROT:Q9F9B9, y se incluye en el presente listado de secuencias como SEQ ID n°: 4.

[0008] WO 97/13853 divulga (SEQ ID n°: 6) una xilanasas de *Aspergillus niger* que es idéntica excepto por un aminoácido a la secuencia de aminoácidos 1-188 de SEQ ID n°: 6 presente ("xyl II" de *Aspergillus niger*).

50 [0009] WO 2004/018662 divulga (como SEQ ID n°: 9 en WO 2004/018662) otra xilanasas de *Aspergillus niger* que es idéntica a SEQ ID n°: 8 aquí ("xyl III" de *Aspergillus niger*).

[0010] Chesson et al, en J. Sci. Food Agric. 1997, 75, 289-295, informa de estudios de porosidad de la pared celular y del área de superficie disponible en paja de trigo y fracciones de grano de trigo.

55 [0011] Es objeto de la presente invención mejorar la solubilización y/o degradación de polisacáridos no amiláceos insolubles (NSP) tales como arabinoxilanos, con el propósito de mejorar el valor nutricional del pienso para animales, por ejemplo mediante la mejora del índice de transformación de alimento (FCR), el índice de crecimiento, y/o el aumento de peso.

60 Resumen de la invención

[0012] La presente invención se refiere al uso en el pienso para animales de una xilanasas con un porcentaje de identidad a los aminoácidos 1-182 de SEQ ID n°: 2 de al menos el 90%, siendo el porcentaje de identidad determinado por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos que se utilizan el programa Needle, con el la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de abertura del espacio de 10, y una penalización por extensión

de espacio de 0,5; ii) contar el número de coincidencias exactas en el alineamiento; iii) dividir el número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, e iv) convertir el resultado de la división de iii) en un porcentaje.

5 [0013] La invención también se refiere al uso de tal xilanasa en la preparación de una composición para usar en el pienso para animales.

[0014] La invención además se refiere a una composición de pienso para animales que comprende tal xilanasa y (a) al menos una vitamina soluble de grasa; (b) al menos una vitamina soluble en agua; y/o (c) al menos un oligoelemento.

10 [0015] Además, la invención se refiere a tal composición de pienso para animales con un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y que comprende tal xilanasa, al igual que un método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde tal xilanasa se añade al pienso.

15 [0016] Finalmente, la invención se refiere al uso de tal xilanasa para la solubilización y/o degradación de polisacáridos no amiláceos durante la digestión gástrica e intestinal; y para pretratamiento de pienso para animales o componentes de pienso para animales.

20 Descripción detallada de la invención

[0017] De aquí en adelante, la expresión "xilanasa de la invención" se refiere a una xilanasa para su uso según la invención, como se describe en este caso.

25 Clases de enzimas EC - Familias de glicósido de hidrolasa de las familias Bernardo Henrissat

[0018] Las enzimas se pueden clasificar basándose en el manual Enzyme Nomenclature de NC-IUBBM, 1992), ver también el sitio ENZYME en Internet: <http://www.expasy.ch/enzyme/>.

ENZYME es un repositorio de información relativa a la nomenclatura de enzimas.

30 Es principalmente basado en las recomendaciones del Comité de Nomenclaturas (Nomenclature Comitee) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (International Union of Biochemistry and Molecular Biology o IUB-MB) y esta describe cada tipo de enzima caracterizada para que se les proporcione un número EC (Comisión Enzimática o Enzyme Commission) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305). Esta nomenclatura enzimática IUB-MB se basa en su especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular; tal clasificación no refleja las características estructurales de estas enzimas.

[0019] Otra clasificación de determinadas enzimas de glicósido de hidrolasa, tal como endoglucanasa, xilanasa, galactanasa, mananasa, dextranasa y alfa-galactosidasa, han sido propuestas en familias basadas en similitudes de secuencias de aminoácidos hace años.

40 Ellos actualmente encajan en 90 familias diferentes: ver la página web CAZi(ModO) (Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate- Active Enzymes server en: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/-cazy/CAZY/index.html> (papeles correspondientes: Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12 ; Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation"., K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita and T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15-23).

Xilanasa

50 [0020] Para los fines presentes, la xilanasa significa una proteína, o un polipéptido, con actividad de xilanasa.

[0021] La actividad de xilanasa se puede medir utilizando cualquier ensayo, donde se emplee un sustrato que incluya endo-enlaces 1,4-beta-D-xilosidicos en xilanos.

55 El PH y la temperatura de ensayo se deben adaptar a la xilanasa en cuestión.

Ejemplos de valores de PH de ensayo son 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 11.

Ejemplos de temperatura de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65,70 o 80°C.

60 [0022] Los diferentes tipos de sustratos están disponibles para determinar la actividad de xilanasa por ejemplo tabletas Xylazyme de arabinoxilano reticulado (de MegaZyme), o dispersiones de polvo insoluble y soluciones de arabinoxilano teñido de azo.

[0023] Para evaluar la xilanasa en el pienso, premezclas y muestras similares, la enzima es extraída a temperaturas que varían de 50°C hasta 70°C (con las temperaturas más altas usadas para las enzimas más termoestables) en un medio de extracción típicamente consistente en un tampón fosfato (0,1 M y un pH ajustado al pH óptimo de la enzima en cuestión) durante un período de tiempo de 30 a 60 min. Un ensayo preferido de xilanasa es descrito en

65

ejemplo 4.

[0024] Todas mediciones se basan en principios de determinación espectrofotométrica a aproximadamente 590-600 nm.

5 La enzima o enzima extraída aplicable se incuba con una cantidad conocida de sustrato y la liberación de color se mide con respecto a una curva estándar obtenida añadiendo cantidades conocidas de un estándar enzimático a una dieta de control similar sin enzima.

10 Cuando no se dispone de un control del pienso, se añade una cantidad conocida de enzima a la muestra (enriquecimiento) y pueden calcularse la cantidad añadida de enzima a partir de las diferencias en la respuesta entre muestra enriquecida y no enriquecida.

[0025] En una forma de realización particular, la xilanasa es una enzima clasificada como EC 3.2.1.8 (ver el sitio ENZYME referido anteriormente).

El nombre oficial es endo-1,4-beta-xilanasa.

15 El nombre sistemático es 1,4-beta-D-xilan xilanhidrolasa.

Pueden utilizarse otros nombres, como endo-(1-4)-beta-xilanasa; (1-4)-beta-xilan 4-xilanhidrolasa; endo-1,4-xilanasa; xilanasa; beta-1,4-xilanasa; endo-1,4-xilanasa; endo-beta-1,4-xilanasa; endo-1,4-beta-D-xilanasa; 1,4-beta-xilan xilanhidrolasa; beta-xilanasa; beta-1,4-xilan xilanhidrolasa; endo-1,4-beta-xilanasa; beta-D-xilanasa.

20 La reacción catalizada es la endohidrólisis de enlaces en xitanos 1,4-beta-D-xilosídicos.

[0026] De acuerdo con el sitio web CAZy(ModO) referido anteriormente, las xilanastas actualmente se clasifican en cualquiera de las siguientes familias de hidrolasas de glicósido: 5, 8, 10, 11, 16, 43, o 62.

Por ejemplo, la familia GH 11 de glicósido de hidrolasa puede estar caracterizada de la siguiente manera:

Familia CAZy:	familia 11 de glicósido de hidrolasa
Actividades conocidas:	xilanasa (EC 3.2.1.8)
Mecanismo:	retención
Nucleófilo/base catalítico/a:	Glu (experimental)
Donante de protón catalítico:	Glu (experimental)
Estado de estructura 3D:	disponible (ver PDB)
Pliegue:	barril tipo remolino beta
Clan:	GH-C

25 [0027] En particular, la xilanasa es i) una xilanasa de la familia glicósido de hidrolasa (GH) 5, 8, 10, 11, 16, 43, o 62, preferiblemente de la familia GH 10 u 11, más preferiblemente de la familia GH 11.

30 La expresión "de la familia glicósido hidrolasa NN" significa que la xilanasa en cuestión es o se puede clasificar en la familia GH "NN" (por ejemplo 10 u 11).

[0028] En otra forma de realización particular, la xilanasa de la invención se deriva de una xilanasa bacteriana, preferiblemente de una bacteria de (i) tipo de Firmicutes; (ii) la clase de Bacilli; (iii) orden de Bacillales; (iv) la familia de Paenibacillaceae; o (v) el género de Paenibacillus; incluso de forma más preferible de una bacteria de (vi) las especies de Paenibacillus pabuli, Paenibacillus polymyxa, o Paenibacillus sp.; de la forma más preferible de (vii) cepas de Paenibacillus pabuli, o Paenibacillus polymyxa.

[0029] La expresión "xilanasa derivada de una xilanasa bacterial (o Firmicutes, ..., o Paenibacillus pabuli)" como se ha usado anteriormente incluye cualquier xilanasa de tipo salvaje aislada de la bacteria en cuestión, al igual que variantes o fragmentos de las mismas que retienen actividad de xilanasa.

[0030] El término "variante" se refiere a una xilanasa que comprende una sustitución, eliminación, y/o inserción de uno o varios aminoácidos en comparación con la xilanasa específica.

45 La variante puede ser una variante natural (variante alélica), o preparada sintéticamente. Preferiblemente los cambios aminoácidos son de naturaleza menor, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadores que significativamente no afectan al plegado y/o a la actividad de la proteína; pequeñas supresiones; pequeñas extensiones terminales de aminos o carboxil, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido enlazador; o una pequeña extensión que facilita la purificación por carga de cambio de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

50 [0031] Un "fragmento" de una xilanasa específica tiene uno o varios aminoácidos eliminados del terminal amino y/o carboxilo de la secuencia de aminoácidos de la xilanasa.

[0032] Para fines de las definiciones anteriores de variante y fragmento, el término "pequeño" al igual que el término "uno o más" se refieren a un máximo de 30 cambios en comparación con la xilanasa específica.

55 En formas de realización preferidas de cualquiera de estas definiciones, el número de cambios es menor de 30, 25, 20, 15, 10, o menor de 5.

[0033] Ejemplos de sustituciones conservadoras son el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina),

aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

5 Los intercambios que ocurren con mayor frecuencia son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly al igual a la inversa.

[0034] Además de 20 aminoácidos estándar, aminoácidos no estándar (tal como 4- hidroxiprolina, lisina de 6-n- metilo, ácido de 2-aminoisobutírico, isovalina, y serina de alfa-metilo) se pueden sustituir por residuos de aminoácidos de un polipéptido tipo salvaje.

10 Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no se codifican por el código genético, y aminoácidos no naturales se pueden sustituir para residuos de aminoácidos. "Aminoácidos no naturales" han sido modificados tras la síntesis de proteína, y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferente(s) de los aminoácidos estándar.

15 Aminoácidos no naturales pueden sintetizarse químicamente, y preferiblemente, están disponibles comercialmente, e incluyen ácido pipecólico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina, y 3,3-dimetilprolina.

[0035] Alternativamente, los cambios aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se alteran.

20 Por ejemplo, los cambios aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

[0036] Los aminoácidos esenciales se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como una mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085).

25 En la última técnica, se introducen mutaciones únicas de alanina en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad biológica (es decir, actividad de xilanasas) para identificar residuos de aminoácido que son críticos a la actividad de la molécula.

30 Ver también, Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica pueden también determinarse por análisis físico de estructura, como determinado por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo.

35 Ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312 ; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904 ; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309:59-64. Las identidades en aminoácidos esenciales también pueden ser inferidas de análisis de identidades con polipéptidos que se relacionan con un polipéptido según la invención.

[0037] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples pueden realizarse y evaluarse usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguidas de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57 ; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156 ; WO 95/17413 ; o WO 95/22625. Otros métodos que pueden usarse incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochem. 30: 10832-10837 patente estadounidense n.º. 5,223,409 ; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire et al., 1986, Gene 46:145 ; Ner et al., 1988, DNA 7:127).

[0038] Los métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de selección automatizados para detectar actividad de polipéptidos clonados mutagenizados expresados por células huésped.

45 Se pueden recuperar moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos de las células huésped y rápidamente secuenciadas según métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

[0039] En otra forma de realización particular, la xilanasas de la invención se deriva de una xilanasas fúngica. La definición anterior de "derivada de" (en el contexto de xilanasas bacterianas) es aplicable por analogía también a xilanasas fúngicas.

Las xilanasas fúngicas incluyen levadura y xilanasas fúngicas filamentosas.

55 En formas de realización preferidas, la xilanasas se deriva de un hongo de (i) tipo Ascomycota; (ii) la clase Pezizomycotina; (iii) la orden Eurotiomycetes; (iv) el suborden Eurotiales; (v) la familia Trichocomaceae, preferiblemente el mitospórico Trichocomaceae; incluso de forma más preferible de un hongo de (vi) género Aspergillus; de la forma más preferible de (VII) cepas de Aspergillus niger.

60 Se entiende que la definición de las especies anteriormente mencionadas incluye los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especies por el que son conocidas.

Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

[0040] Las cepas de las bacterias y hongos anteriormente mencionados son fácilmente accesibles al público en varias colecciones de cultivo, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural

Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0041] Las preguntas acerca de la taxonomía pueden ser resueltas consultando una base de datos de taxonómica, tal como NCBI Taxonomy Browser que está disponible en la siguiente página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>.

No obstante, preferiblemente se hace referencia a los siguientes manuales: Dictionary of the Fungi, novena edición, editado por Kirk, P.M., P.F. Cannon, J.C. David & J.A. Stalpers, CAB Publishing, 2001 ; y Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, segunda edición (2005).

[0042] El término "una" como se utiliza en este caso en cualquier contexto significa "una o más", preferiblemente "al menos una".

Este es el caso, por ejemplo, en su uso en la reivindicación 1 de "una" xilanasa como se especifica, que se considera equivalente a reivindicar el uso de "al menos una" o "una o más" de tales xilanasas.

[0043] El término polipéptido "maduro" o secuencia de aminoácidos madura se refiere a la parte de una secuencia de aminoácidos que permanece tras cortar una parte de señal potencial de péptido y una parte de propéptido potencial.

Se puede observar alguna variación en las partes maduras de las enzimas, dependiendo de, entre otros, los huéspedes de expresión y las condiciones de fermentación.

Por ejemplo, la experiencia muestra que también pueden ocurrir truncamientos menores del terminal C durante el proceso de secreción.

El término parte madura como se utiliza en este caso también se tiene en cuenta en tales truncamientos del terminal C, si los hay.

Mientras la parte de péptido maduro se puede identificar por programas informáticos conocidos en la técnica (por ejemplo SignalP 3.0, ver J. D. Bendtsen et al, J. Mol. Biol., 340:783-795,2004), preferiblemente se identifica por determinación del terminal N, y preferiblemente también el terminal C, de la enzima de xilanasa expresada y segregada, si es pertinente.

Por ejemplo, según nuestras observaciones, la parte madura de la xilanasa de SEQ ID nº: 2 son aminoácidos los 1-182 de la misma, y la parte madura de la xilanasa de SEQ ID nº: 4 son los aminoácidos 1-184 de la misma.

[0044] En una forma de realización particular, la xilanasa de la invención es aislada, es decir, queda esencialmente libre de otros polipéptidos de actividad enzimática, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente 40% puro, de forma más preferible aproximadamente 60%, puro incluso de forma más preferible aproximadamente 80% puro, de la forma más preferible aproximadamente 90% puro, e incluso de la forma más preferible aproximadamente 95% puro, como se determina en SDS-PAGE.

Como es generalmente conocido en la técnica, para usos de detección del gel se puede manchar el gel SDS con coloración Coomassie o plata.

Debe asegurarse que la sobrecarga no ocurre, por ejemplo, al comprobar la linealidad aplicando varias concentraciones en diferentes líneas del gel.

Tales preparaciones de polipéptidos son en particular obtenibles por métodos recombinantes de producción, mientras que estos no se obtienen fácilmente y también están sujetos a una variación entre lotes mucho más alta cuando el polipéptido se produce por métodos de fermentación tradicional.

[0045] Los polipéptidos comprendidos en la composición de la invención también se purifican preferiblemente.

El término purificado se refiere a una preparación enriquecida con proteínas, donde una cantidad sustancial de bajos componentes moleculares, nutrientes residuales típicos y minerales originados de la fermentación han sido quitados. Tal purificación puede por ejemplo producirse por métodos cromatográficos convencionales tal como cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de exclusión por tamaño (ver por ejemplo Protein Purification, Principles, High Resolution Methods, and Applications. Editores: Jan-Christer Janson, Lars Rydén, VCH Publishers, 1989). El ejemplo 2 de WO 2005/079585 describe un procedimiento adecuado para la purificación de Paenibacillus pabuli xilanasa, expresado a partir de Bacillus subtilis.

[0046] El uso de un polipéptido aislado y/o purificado según la invención es ventajoso.

Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente las enzimas que son esencialmente libres de interferencias o contaminantes otras enzimas.

Los términos dosificar correctamente se refieren en particular al objetivo de obtener resultados de pienso de animal consistente y constantemente, y la capacidad de optimizar la dosificación basada en el efecto deseado.

Identidad

[0047] La relación entre dos secuencias de aminoácidos es descrita por el parámetro "identidad".

[0048] En formas de realización particulares, el grado de identidad es al menos 90%, 95%, 97%, o al menos 99%.

En aún más formas de realización, el grado de identidad es al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, o al menos 98%.

[0049] La invención en particular se refiere al uso en el pienso para animales de una xilanasa con un porcentaje de

[0061] La xilanasa de la invención puede alimentar al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta. Lo último es preferido.

5 [0062] El término pienso, composición alimentaria, o dieta significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinado para su toma por un animal. Más información acerca de composiciones de pienso para animales es descubierta más abajo.

[0063] Los granos de cereal son componentes importantes de pienso para animales.

10 Los granos de cereal contienen polisacáridos vegetales, algunos de los cuales, por ejemplo el almidón, pueden funcionar como componentes nutricionales principales de la dieta. Pero los granos de cereal también contienen varios tipos de polisacáridos no amiláceos (NSP), que no se pueden utilizar en animales no rumiantes como aves y cerdos.

15 [0064] Ejemplos de NSP son xilanas, arabinosilanos, beta-glucanos, y celulosa. El tipo y cantidad de NSP varían de cereal a cereal.

Los siguientes son ejemplos de contenido NSP aproximado (% p/p, sustancia seca) de granos de cereal varios: arroz perlado 1%, sorgo 5%, maíz 8%, trigo 11%, centeno 13%, triticale 16%, y cebada 17%.

20 Para trigo, triticale y maíz, los arabinosilanos tiene un contenido mayor al 50% del NSP, mientras que para cebada, sorgo, centeno y arroz, los arabinosilanos contienen aproximadamente un 25-45% del NSP, es decir todavía una cantidad sustancial.

[0065] Se hace una distinción entre polisacáridos solubles e insolubles en arabinosilanos y beta-glucanos.

25 Los términos soluble e insoluble se conocen en la técnica y se refieren a solubilidad/insolubilidad en agua, en particular a la forma (soluble/insoluble) de estos polisacáridos a) bajo condiciones digestivas, b) bajo condiciones intestinales (en el intestino delgado), o preferiblemente c) después de un procedimiento in vitro como se perfila en el ejemplo 1 (es decir, 1.5 horas a pH 3.0 y 40°C en presencia de pepsina, y 4.5 horas a pH 6.8 y 40°C en presencia de pancreatina).

30 [0066] Los arabinosilanos insolubles se asocian con la encapsulación de nutrientes como almidón y proteínas.

Esta encapsulación permite pasar nutrientes valiosos de la digestión.

Cuando los arabinosilanos insolubles también son digeridas o solubilizadas, ocurre una exposición mejorada de los nutrientes.

35 [0067] En una forma de realización particular, la xilanasa de la invención es capaz de solubilizar polisacáridos de fibra como NSP.

Por consiguiente, la invención se refiere al uso de una xilanasa de la invención para la solubilización de (de otra manera insoluble) polisacáridos no amiláceos durante la digestión gástrica e intestinal.

Los polisacáridos no amiláceos preferidos son los arabinosilanos (polisacáridos arabinosilanos).

40 [0068] El término polisacárido se conoce en la técnica para designar los sacáridos con 10 o más monosacáridos (ver por ejemplo Food Chemistry, tercera edición, Springer Verlag, ISBN 3-540-40817-7, Belitz, Grosch, Schieberle (editores), sección 4.3.1 en p. 294), en otras palabras, con un grado de polimerización (DP) de al menos 10.

45 [0069] Los polisacáridos con un DP de al menos 10 se pueden distinguir de los oligosacáridos con un DP por debajo de 10 como se conoce en la técnica, por ejemplo por filtración de gel en Biogel P-2 en sobrenadantes obtenidos después de precipitación de etanol al 80% (ver "The Uppsala method for rapid analysis of total dietary fiber" por Theander et al, en particular la fig. 2 en p. 277, en New Developments in Dietary Fiber, Furda and Brine (editores), Plenum Press, 1990, p. 273-281).

50 [0070] En particular, la xilanasa de la invención es capaz de reducir la cantidad de xilanas insolubles y arabinosilanos en un modelo in vitro que imita los pasos de digestión intestinal gástrica y pequeñas etapas en la digestión monogastrica, como se describe en los ejemplos 1, 2, y 5 aquí.

55 Preferiblemente, la cantidad de residual (es decir, tras la incubación con xilanasa) de arabinosilanos insolubles no es más alta que 85% (p/p), de forma más preferible no mayor que 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, o 70% (p/p) con respecto a un control sin añadir enzima de xilanasa (100%).

Este corresponde a una reducción de la cantidad de arabinosilanos insolubles de al menos 15%, preferiblemente al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o al menos 30% (p/p) con respecto a un control sin añadir enzima de xilanasa (0%).

60 [0071] En todavía otras formas de realización particulares, las condiciones del modelo in vitro son: sustrato (i) (dieta): 0,35 g de trigo, 0,21 g de cebada, 0,13 g de harina de soja, y 0,11 g de salvado de trigo, proporcionado como una dieta premezclada, molido para pasar un tamiz de 0,5 mm; (ii) una fase de incubación gástrica en la que la dieta se incubaba con 0,1 ml de la xilanasa a evaluar junto con 4,1 ml 0,072 M HCl durante 1,5 horas y con 0,5 ml 0,072 M HCl/pepsina (Sigma P-7000,3000 U/g dieta) durante 1 hora (es decir 30 min premezcla de sustrato HCl) a pH 3,0 y 40°C; (iii) una fase de incubación intestinal posterior con 0,9 ml 0,215M NaOH más 0,4 ml 1M NaHCO₃ y

pancreatina 8 mg/g dieta durante 4 horas (Sigma P-7545) a pH 6,8-7,0 y 40°C; seguida por (iv) una determinación de la cantidad de arabinoxilano insoluble residual, por ejemplo utilizando el método de Uppsala, como se describe en los ejemplos 1 y 5.

5 [0072] La invención también se refiere al uso de una xilanasa de la invención para la degradación de polisacáridos no amiláceos durante la digestión gástrica e intestinal.

Los polisacáridos no amiláceos preferidos son polisacáridos de fibra, en particular arabinoxilanos (polisacáridos arabinoxilanos).

10 [0073] En particular, la xilanasa de la invención esta capaz de degradar polisacáridos xilanos y arabinoxilanos en un modelo in vitro que imita las fases de digestión gástrica e intestinal en digestión monogástrica, como se describe en el ejemplo 5 aquí.

Preferiblemente, la cantidad arabinoxilanos totales residuales (es decir, tras la incubación con xilanasa) no es más alta que 94% (p/p), de forma más preferible no mayor que 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, o 80% (p/p) con respecto a un control sin añadir enzima de xilanasa (100%).

15 [0074] En todavía otras formas de realización particulares, las condiciones del modelo in vitro son: sustrato (i) (dieta): 0,35 g de trigo, 0,21 g de cebada, 0,13 g de harina de soja, y 0,11 g de salvado de trigo, proporcionado como una dieta premezclada, molido para a pasar por un tamiz de 0,5 mm; (ii) una fase de incubación gástrica en que la dieta que se incuba con 0,1 ml de la xilanasa a evaluar junto con 4,1 ml 0,072 M HCl durante 1,5 horas y con 0,5 ml 0,072 M HCl/pepsina (Sigma P-7000,3000 U/g dieta) durante 1 hora (es decir 30 min premezcla de sustrato HCl) a pH 3,0 y 40°C; (iii) una fase de incubación intestinal posterior con 0,9 ml 0,215M NaOH más 0,4 ml 1M NaHCO₃ y pancreatina 8 mg/g dieta durante 4 horas (Sigma P-7545) a pH 6,8-7,0 y 40°C; seguida por (iv) una determinación de la cantidad de arabinoxilano total residual, por ejemplo utilizando el método de Uppsala, como se describe en el ejemplo 5.

[0075] La dosificación de la xilanasa de la invención se puede optimizar utilizando simple métodos de ensayo-error como se conoce en la técnica. Las diferentes xilanasas pueden tener rangos de dosificación óptima diferente.

30 Ejemplos de rangos de dosificación adecuada son: 0,1-500 mg proteína enzimática (EP)/kg dieta (sustrato); preferiblemente 0,2-400, 0,3-300, 0,4-200, o 0,5-100 mg EP/kg dieta.

Otros rangos de dosificación preferida son 0,6-90, 0,7-80, 0,7-70, 1-70, 2-70, 3-70, 4-70, 5-70, 6-70, o 7-70, todo en mg EP/kg dieta.

Todavía otras dosificaciones de enzima preferida son de 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-90, 10-80, o 10-70, todo en mg EP/kg dieta.

35 La cantidad de proteína enzimática (EP) de xilanasa se puede determinar como se describe en el ejemplo 1.

[0076] Para determinar los mg de proteína enzimática de xilanasa por kg de pienso, la xilanasa se purifica de la composición alimentaria, y la actividad específica de la xilanasa purificada se determina usando un ensayo pertinente.

40 La actividad de xilanasa de la composición alimentaria como se determina también usando el mismo ensayo, y basada en estas dos determinaciones, se calcula la dosificación en mg de la proteína enzimática de xilanasa por kg de pienso.

[0077] Los mismos principios pueden determinar los mg de proteína enzimática de xilanasa en aditivos alimenticios.

45 Por supuesto, si una muestra de la xilanasa usada para preparar el aditivo de pienso o el pienso están disponibles, la actividad específica se determina con esta muestra (no se necesita purificar la xilanasa de la composición alimentaria o del aditivo).

[0078] El término mejorar el valor nutricional del pienso para animales significa la mejora de la disponibilidad de nutrientes, por lo cual el índice de crecimiento, aumento de peso, y/o conversión de pienso (es decir el peso del pienso ingerida con respecto al aumento de peso) del animal es/son mejorada/s.

50 [0079] La xilanasa se puede añadir al pienso en cualquier forma, siendo esta como una xilanasa purificada y/o aislada, o en la mezcla con otros componentes destinados a añadirse al pienso para animales, es decir en forma de aditivos de pienso, tal como las premezclas denominadas como pienso para animales.

[0080] En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para usar en pienso para animales, tal como pienso para animales, y aditivos de pienso para animales, por ejemplo premezclas.

60 [0081] Además de la xilanasa de la invención, los aditivos de pienso de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un oligoelemento.

Los macrominerales normalmente también se incluyen en aditivos alimenticios.

65 [0082] Además, los ingredientes opcionales de aditivo alimenticio son agentes colorantes, por ejemplo carotenoides tal como beta-caroteno, astaxantina, y luteína; compuestos de aroma; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies generadoras de oxígeno reactivo; y/o a mínimo otra enzima seleccionada de

entre otra xilanasa (EC 3,2,1,8); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

[0083] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMPs) son CAP18, Leucocina A, Tritrpticina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina, y Ovispirina tal como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas, y Estatinas, incluyendo los compuestos y polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, al igual que variantes o fragmentos de las anteriores que retienen actividad antimicrobiana.

[0084] Ejemplos de polipéptidos fungicidas (AFPs) son el Aspergillus giganteus, y péptidos de Aspergillus niger, al igual que variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad fúngica, como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

[0085] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18; C20 y C22, tal como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.

[0086] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

[0087] Por lo general las grasas y las vitaminas hidrosolubles, al igual que los oligoelementos forman parte de una premezcla así llamada para ser añadida al pienso, mientras que los macrominerales normalmente se añaden al pienso.

Una premezcla enriquecida con una xilanasa de la invención es un ejemplo de un aditivo de pienso de la invención.

[0088] En un particular, el aditivo de pienso está pensado para incluirse (o prescrito para ser incluido) en dietas o pienso de animales a niveles de 0,01 a 10,0%; más particularmente 0,05 a 5,0%; o 0,2 a 1,0% (% significa g de aditivo por 100 g de pienso).

Esto es así en particular para premezclas.

[0089] Los siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, por ejemplo vitamina K3.

Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo Ca-D-pantotenato.

Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto.

Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

[0090] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla de WO 01/58275.

El requisito nutricional significa que estos componentes deberían ser proporcionados en la dieta en las concentraciones indicadas.

[0091] En la alternativa, el aditivo de pienso de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A de WO 01/58275.

Al menos uno significa cualquiera de, uno o varios de, uno, o dos, o tres, o cuatro etcétera hasta trece, o hasta quince componentes individuales.

Más específicamente, al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en tal cantidad para proporcionar una concentración en pienso en la gama indicada en la columna cuatro, o en la columna cinco, o en la columna seis de Tabla A.

[0092] La presente invención también se refiere a composiciones de pienso para animales.

Las composiciones de pienso para animales o dietas tienen un contenido relativamente alto de proteína.

Dietas de aves o cerdos se pueden caracterizar como se indica en la Tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3.

Dietas de pescado se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta Tabla B. Además tales dietas de pescado normalmente tienen un contenido de grasa cruda de 200-310 g/kg.

[0093] WO 01/58275 corresponde a patente estadounidense nº 6,960,462.

[0094] Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido bruto de proteína de 50- 800 g/kg (preferiblemente 50-600 g/kg, de forma más preferible 60-500 g/kg, incluso de forma más preferible 70-500, y de la forma más preferible 80-400 g/kg) y comprende además al menos una xilanasa como se reivindica aquí.

En formas de realización preferidas adicionales, el contenido bruto de proteína es 150-800, 160-800, 170-800, 180-800, 190-800, o 200-800 - todo en g/kg (material seco).

[0095] Además, o en alternativa (al contenido bruto de proteína indicado anteriormente), la composición de pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1- 150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

[0096] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína, y/o lisina es dentro de cualquiera de los rangos 2, 3,4 o 5 en la Tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

[0097] La proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir, proteína cruda (g/kg) = N (g/kg) x 6,25.

El contenido de nitrógeno se determina por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14 edición, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

[0098] La energía metabolizable se puede calcular basándose en la publicación NRC Nutrient requirements in swine, novena edición revisada 1988, subcomité de nutrición porcina, comité de nutrición animal, junta de agricultura, consejo de investigación nacional. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6 , y la European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

[0099] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas completas para animales se calcula basándose en tablas de alimentación tal como Veevoedertabel 1997, gegevens sobre chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde camioneta voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6,8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

[0100] En formas de realización particulares, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80% de maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-40% de harina de soja; y/o 0-25% de harina de pescado; y/o 0-25% de harina de carne y hueso; y/o 0-20% de suero de leche.

[0101] Las dietas para animales pueden por ejemplo ser fabricadas como pienso en puré (no granulado) o pienso granulado.

Típicamente, los materiales de pienso molidos se mezclan y se añaden cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales según las especificaciones para las especies en cuestión.

Se pueden adicionar enzimas como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas.

Por ejemplo, una formulación enzimática sólida normalmente se añade antes o durante el paso de mezcla; y una preparación enzimática líquida se añade normalmente después del paso de granulación.

La enzima también se puede incorporar en un aditivo de pienso o premezcla, como se ha descrito anteriormente.

Formas de realización particulares adicionales

[0102] Estas son formas de realización particulares adicionales de la invención:

El uso en el pienso para animales de una xilanasa con un peso molecular SDS-PAGE por debajo de 24 kDa, donde la xilanasa tiene un grado de identidad a los aminoácidos 1-182 de SEQ ID n°: 2 de al menos 90%.

La xilanasa también puede tener un porcentaje de identidad a cualquiera de los aminoácidos 1-182 de SEQ ID n°: 2.

En formas de realización particulares, el grado de identidad es al menos 90%, 95%, 97%, o al menos 99%.

La xilanasa puede ser una xilanasa bacteriana, preferiblemente obtenible de una cepa bacteriana del género Paenibacillus, o una variante, o fragmento de lo mismo.

[0103] La invención además se refiere al uso de tal xilanasa en la preparación de una composición para usar en pienso para animales, al igual que composiciones que comprenden tal xilanasa y (a) al menos una vitamina soluble de grasa, (b) al menos una vitamina soluble en agua, y/o (c) al menos un oligoelemento.

[0104] La invención también se refiere a una composición de pienso para animales con un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y que comprende tal xilanasa, al igual que un método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde tal xilanasa se añade al pienso.

[0105] La invención también se refiere al uso de una xilanasa tal y como se ha definido anteriormente en la preparación de una composición para usar en el pienso para animales.

[0106] La invención también se refiere a una composición que comprende una xilanasa tal y como se ha definido anteriormente, y (a) al menos una vitamina soluble de grasa; (b) al menos una vitamina soluble en agua; y/o (c) al menos un oligoelemento.

La composición preferiblemente comprende además al menos una enzima seleccionada del siguiente grupo de enzimas: otra xilanasa, y/o beta-glucanasa.

La composición es preferiblemente un aditivo de pienso.

[0107] La invención también se refiere a una composición de pienso para animales con un contenido bruto de

proteína de 50 a 800 g/kg y que comprende una xilanasa tal y como se ha definido anteriormente.

5 [0108] La invención también se refiere a un método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde una xilanasa tal y como se ha definido anteriormente, o una composición tal y como se ha definido anteriormente, se añade al pienso.

[0109] La invención también se refiere al uso de una xilanasa tal y como se ha definido anteriormente para pretratar el pienso para animales o componentes de pienso para animales.

10 Peso molecular

[0110] La xilanasa puede tener un PM por debajo de 24 kDa.

En formas de realización particulares, el PM está por debajo de 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, o por debajo de 10 kDa.

15 En formas de realización alternativas, el PM está por debajo de 30, 29, 28, 27, 26, o 25 kDa.

[0111] La xilanasa también puede tener un PM por debajo de 24000 Da.

En formas de realización particulares, el PM está por debajo de 23000, 22000, 21000, 20000, 19000, 18000, 17000, 16000, 15000, 14000, 13000, 12000, 11000, o por debajo de 10000 Da.

20 En formas de realización alternativas, el PM está por debajo de 30000, 29000, 28000, 27000, 26000, o 25000 Da.

[0112] En una forma de realización particular, el PM indicado de la xilanasa incluye glicosilación, si lo hay.

En la alternativa, el PM de la xilanasa excluye glicosilación.

25 [0113] El PM se puede determinar por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacríamida con dodecilsulfato sódico), que es un método útil, bien conocido en la técnica, de un peso molecular (MW) determinado de proteínas.

[0114] Un protocolo adecuado para determinar el peso molecular por SDS-PAGE es descubierto en el ejemplo 3.

30 En formas de realización alternativas, el experimento de ejemplo 3 es realizado: (i) con un 10% gel Bis-Tris gel con tampón de desplazamiento MOPS; (ii) utilizando la escalera BenchMark Ladder (catálogo. nº 10747-012) comercialmente disponible en Invitrogen/Novex y que incluye proteínas a 20,25 y 30kDa; y/o (iii) con tricina y geles de trisglicina también disponibles en Invitrogen/Novex.

Ejemplo 3 es un SDS-PAGE de un sobrenadante de fermentación, y no hay duda de que la banda representa la xilanasa (sólo una banda mayor; del tamaño previsto).

35 Pero en caso de duda, la xilanasa puede deber ser purificada a una extensión más alta, o, si se tiene un anticuerpo se podría hacer un western blot, o se podrían cortar las bandas en cuestión y tener una secuencia terminal N determinada y estas podrían identificar la xilanasa.

[0115] En la alternativa, el peso molecular de la xilanasa se puede calcular como la suma de las masas atómicas de todos los átomos de una molécula de la xilanasa.

40 Con este fin se usan las masas isotópicas medias de aminoácidos en la proteína madura y la masa isotópica media de una molécula de agua.

Los pesos moleculares se pueden derivar del 1997 IUPAC standard atomic weights.

45 Están disponibles programas para calcular el PM de las proteínas, por ejemplo, en el siguiente sitio web: http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html (véase también Gasteiger et al, in John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), pp. 571-607).

[0116] En otra alternativa más, el PM de la xilanasa se puede medir usando una espectrometría de masas, por ejemplo Maldi-TOF, que también es bien conocida en la técnica.

50 [0117] La glicosilación es un fenómeno donde los sacáridos se fijan a las proteínas. La glicosilación solo se observa cuando expresa proteínas en eucariotas tales como hongos y plantas transgénicas, pero no en procariontes tales como bacterias.

Hay varios tipos de glicosilación: glicosilación N-enlazada al nitrógeno amídico de cadenas laterales de asparagina, y la glicosilación O-enlazada al oxígeno de hidroxil de serina y cadenas laterales de treonina.

55 Por ejemplo, las glicoproteínas maduras pueden contener una variedad de oligosacáridos N-enlazados de oligomanosa que contienen entre 5 y 9 residuos de manosa.

[0118] Obviamente, cuando un peso molecular es calculado basándose en la secuencia de proteína, no responde a los efectos de modificaciones postraduccionales tal como glicosilación.

60 [0119] Pero la glicosilación produce la migración de proteínas en un gel SDS-PAGE, y es también observada por espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Por lo tanto, si se quiere excluir el efecto de glicosilación en estos métodos, la xilanasa puede ser primero deglicosilada.

65 Equipos de desglicosilación se conocen bien en la técnica y son útiles para este propósito, por ejemplo Enzymatic

CarboRelease™ Kit (catálogo nº. KE-DG01, que está disponible comercialmente en QA-Bio, LLC, 73 Sutton Place West, Palm Desert, CA 92211, Estados Unidos).

Este equipo incluye las enzimas, controles, y reactivos requeridos para eliminar todos oligosacáridos N-enlazados y muchos azúcares O-enlazados.

- 5 Las siguientes enzimas de desglicosilación se incluyen en el equipo: PNGase F (*Chryseobacterium meningosepticum*), O-Glycosidase (*Streptococcus pneumoniae*), Sialidase (*Arthrobacter ureafaciens*), beta-Galactosidase (*Streptococcus pneumoniae*), Glucosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*).

10 [0120] El peso molecular de una proteína por supuesto depende del número al igual que la composición de sustancia química exacta de sus aminoácidos constituyentes.

Como una aproximación del PM, uno puede elegir referirse solo al número de aminoácidos.

En consecuencia, la xilanasas en lugar de tener una limitación de su peso molecular puede tener una secuencia de aminoácidos madura que consiste en menos de 220 residuos aminoácidos.

- 15 En formas de realización particulares de este aspecto, el número de aminoácidos es menor de 215, 210, 200, o menor de 195; preferiblemente menor de 194, 193, 192, 191, o menor de 190; incluso de forma más preferible menor de 189, 188, 187, 186, 185, 184, o menor de 183.

- 20 [0121] En formas de realización particulares, (i) la xilanasas de la invención se usa como única xilanasas; (ii) la xilanasas no es un 23 kDa GH11 *xynA* de *Bacillus subtilis*; (iii) la xilanasas no es una parte madura de la xilanasas con secuencia SWISSPROT:P18429; (iv) la xilanasas no es una xilanasas contenida en el producto Belfeed B 1100 Pf o ML (disponible comercialmente en BelFeed, Bélgica, ver: <http://www.agrimex.be>).

Ejemplos

- 25 [0122] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

Ejemplo 1: prueba in vitro de xilanasas - solubilización de NSP

- 30 [0123] El propósito del corriente estudio fue comprobar la eficacia de varias xilanasas en lo que respecta a su solubilidad de polisacáridos no amiláceos (NSP).

Xilanasas

- 35 [0124] Las siguientes xilanasas fueron evaluadas:

La xilanasas RONOZYME WX, una xilanasas de pienso para animales de monocomponente conocido derivada de *Thermomyces lanuginosus* y disponible comercialmente en DSM Nutritional Products, Wurmisweg 576; CH-4303 Kaiseraugst, Suiza (esta xilanasas es también descrita en WO 96/23062);

- 40 Una xilanasas de *Paenibacillus pabuli* con la aminosecuencia de aminoácidos 1-182 de SEQ ID nº: 2 y descrita en WO 2005/079585;

Una xilanasas de *Paenibacillus sp. (polymyxa)* con la aminosecuencia de aminoácidos 1- 184 de SEQ ID nº: 4 (UNIPROT:Q9F9B9);

- 45 Una xilanasas ("xyl II") de *Aspergillus niger* con la aminosecuencia de aminoácidos 1-188 de SEQ ID nº: 6 (muy similar a la xilanasas con SEQ ID nº: 6 en WO 97/13853); y

La parte madura (excluyendo el péptido de señal y el polipéptido, si los hay) de otra xilanasas ("xyl III") de *Aspergillus niger*, la secuencia de aminoácidos completa de estos es SEQ ID nº: 8 aquí (idéntica a la xilanasas con SEQ ID nº: 9 en WO 2004/018662).

- 50 [0125] Las dos xilanasas bacterianas fueron expresadas en el *Bacillus subtilis*, y las dos xilanasas de *Aspergillus* fueron expresadas en el *Aspergillus oryzae* como se conoce en el la técnica. Las cepas de expresión fueron fermentadas y los sobrenadantes que contienen xilanasas usados en los siguientes experimentos, salvo la xilanasas *Paenibacillus pabuli* que ha sido además purificada usando procedimientos estándar.

- 55 El contenido de proteína enzimática de los sobrenadantes de xilanasas fue estimada basándose en geles SDS, mientras que el contenido de proteína enzimática de la xilanasas purificada *Paenibacillus pabuli* fue determinada como se describe abajo.

[0126] El estudio fue focalizado en la cuantificación del contenido de arabinoxilano insoluble después de la incubación in vitro en un procedimiento que imita los pasos de digestión gástrica y pequeñas fases de digestión intestinal en la digestión monogástrica.

- 60 En el sistema in vitro se incubaron hasta 60 tubos de ensayo con HCl/pepsina en un sustrato de interés (simulando la digestión gástrica), y posteriormente con pancreatina (simulando digestión intestinal).

Tres tubos de ensayo fueron usados para cada tratamiento incluido.

Al final de la fase de incubación intestinal las muestras de la digestión in vitro se quitaron y analizaron por NSP insoluble.

- 65 [0127] Un perfil del procedimiento in vitro se muestra en el siguiente diagrama donde pH y temperatura indican los

puntos establecidos respectivamente (valores objetivo).

Perfil de procedimiento de digestión in vitro

5 [0128]

	pH	Temperatura	Tiempo	Fase de digestión simulada
0.8 g sustrato, 4.1 ml HCl (0.072 M)	3.0	40°C	t=0 minutos	Mezclado
0.5 ml HCl (0.072 M) / pepsina (3000 U/g sustrato), 0.1 ml solución enzimática	3.0	40°C	t=30 minutos	Digestión gástrica
0.5 ml HCl (0.072 M) / pepsina (3000 U/g sustrato), 0.1 ml solución enzimática	6.8	40°C	t=1,5 horas	Digestión intestinal
0.4 ml NaHCO ₃ (1M) / pancreatina (8 mg/g dieta)	6.8	40°C	t=2,0 horas	Digestión intestinal
Terminar incubación	6.8	40°C	t=6,0 horas	

Condiciones

10 [0129]

Sustrato: 0.35 g trigo, 0.21 g cebada, 0.13 g harina de soja, y 0.11 de salvado de trigo, proporcionado como una dieta premezclada, que ha sido molida para pasar por un tamiz de 0.5 mm
 pH: fase estomacal = pH 3.0 / fase intestinal = pH 6.8-7.0
 HCl: .072 M durante 1.5 horas (es decir 30 minutos premezclando el sustrato de HCl)
 Pepsina: 3000 U /g dieta durante 1 hora (Sigma P-7000)
 Pancreatina: 8 mg/g dieta durante 4 horas (Sigma P-7545)
 Temperatura: 40°C
 Réplicas: 3

Soluciones

15 [0130]

0.215 M NaOH
 0.072 M HCl
 0.072 M HCl que contiene 6000 U de pepsina por 5 ml
 1 M NaHCO₃ que contiene 16 mg de pancreatina por ml
 100 mM tampón NaAc, pH 5.0

20

Determinaciones de proteína enzimática

[0131] La cantidad de proteína enzimática de xilanas (EP) se calcula basándose en valores A280 y las secuencias de aminoácidos (composiciones de aminoácido) utilizando los principios perfilados en S.C.Gill & P.H. von Hippel, Analytical Biochemistry 182,319-326; (1989).

25

Procedimiento experimental para modelo in vitro

[0132] El procedimiento experimental se realizó de acuerdo con el anterior perfil. El pH fue medido en un tiempo entre 1, 2,5, y 5,5 horas.

30

Las incubaciones se terminaron después de 6 horas y las muestras fueron quitadas y colocadas en el hielo antes de la centrifugación (10000 x g, 10 min, 4°C).

Los sobrenadantes fueron descartados y el residuo granulado lavado una vez con 100 mM de tampón acetato (pH 5,0).

35

Análisis

[0133] El análisis de los residuos NSP se realizó de acuerdo a Theander et al (1995): Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin (the Uppsala method): Collaborative study, in J. AOAC Int. vol. 78, nº 4, págs. 1030-1044, excepto que la celulosa no fue analizada en el presente ejemplo.

40

En resumen, el almidón en la muestra se quita por un procedimiento de digestión enzimática con alfa-amilasa y amiloglucosidasa.

Los polisacáridos no amiláceos son luego precipitados con 80% etanol e hidrolizados a 125°C en 0,4 M de ácido sulfúrico.

45

Los azúcares neutros liberados se cuantifican por cromatografía de gas-líquido como acetatos de alditol, y su contenido se calcula con respecto a un estándar interno y teniendo en cuenta el peso de la muestra original.

[0134] La Tabla 1 inferior muestra el contenido (% de sustancia seca) de residuos de arabinosa, xilosa y

arabinoxilano (suma de arabinosa y xilosa) en el pienso después de la incubación in vitro con las xilanasas varias. El control se realiza sin añadir xilanasas.

Tabla 1

Muestra de xilanasas	Dosificación enzimática (mg EP/kg dieta)					
	0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	Control	RONOZYME WX	P. pabuli	P. polymyxa	A. niger xyl II	A. niger xyl III
Residuos de arabinosa	2.67 ^a	2.32 ^{bd}	2.11 ^{bc}	2.18 ^{bcd}	2.35 ^d	2.68 ^a
Desviación típica	0.20	0,11	1,04	0,11	0,15	0,08
Reducción relativa	100	87	79	82	88	100
Residuos de xilosa	4,54 ^a	3,48 ^b	2,93 ^c	2,98 ^c	3,82 ^d	4,56 ^a
Desviación típica	0,27	0,16	0,05	0,14	0,22	0,20
Reducción relativa	100	77	65	66	84	100
Arabinoxilano insoluble	7,21 ^a	5,80 ^b	5,04 ^c	5,16 ^c	1,16 ^{bd}	7,25 ^a
Desviación típica	0,46	0,27	0,09	0,25	0,38	0,28
Reducción relativa	100	80	70	72	85	100

abcd: significa dentro de una fila que no comparte un superíndice de letra común difiriendo de la significación estadística (P<0,05).

[0135] En la Tabla 1 parece que, sorprendentemente, las xilanasas P. pabuli y P. polymyxa son, según las estadísticas, significativamente mejores en lo que se refiere a la solubilización de polisacáridos de fibra insoluble (NSP) en comparación con 1) el control sin añadir xilanasas, 2) la xilanasas de pienso para animales conocida como RONOZYME WX, al igual que 3) las dos xilanasas A. niger.

Ejemplo 2: efecto de respuesta de dosis

[0136] La xilanasas Paenibacillus pabuli fue evaluada en dosificaciones varias en un experimento in vitro como se describe en el ejemplo 1.

[0137] La Tabla 2 inferior muestra el contenido (% de peso fresco) de los residuos de arabinosa, xilosa y arabinoxilano (suma de arabinosa y xilosa) insolubles en el pienso después de la incubación in vitro con esta xilanasas en varias dosificaciones.

El control se realiza sin añadir xilanasas.

Tabla 2

Muestra	Control	Xilanasas P. pabuli		
	0	0,7	7,0	70
Dosificación enzimática (mg EP/kg dieta)				
Residuos de arabinosa	1,99 ^a	1,91 ^{ab}	1,82 ^b	1,68 ^c
Desviación típica	0,018	0,043	0,084	0,053
Reducción relativa	100	96	91	84
Residuos de xilosa	3,26 ^a	3,00 ^b	2,64 ^c	2,05 ^d
Desviación típica	0,065	0,062	0,144	0,066
Reducción relativa	100	92	81	63
Arabinoxilano	5,25 ^a	4,91 ^b	4,46 ^c	3,73 ^d
Desviación típica	0,082	0,104	0,228	0,119
Reducción relativa	100	94	85	71

abcd: significa dentro de una fila que no comparte un superíndice de letra común difiriendo de la significación estadística (P<0,05).

[0138] En la Tabla 2 parece que hay un efecto respuesta a la dosis claro y estadísticamente significativo de la xilanasas Paenibacillus pabuli en la solubilización de polisacáridos de fibra insoluble (NSP).

Ejemplo 3: determinación del peso molecular

[0139] Un huésped transformado de Aspergillus oryzae que expresa la xilanasas de aminoácidos 1-188 de SEQ ID n°: 6 fue fermentado durante cuatro días en matraces de agitación de 500 ml disipados con 100 ml YP+2%G medio (10g de extracto de levadura, 20g de peptona, agua hasta 1L, autoclave a 121°C, 20 minutos, añadir 100ml de solución de glucosa estéril al 20%) a 30°C y 200 r.p.m.

La solución de fermentación fue filtrada a través de un filtro unitario de 0.22 um (micrómetro) que proporciona un sobrenadante.

[0140] 10 ul (microlitros) del sobrenadante fueron mezclados con 10ul NuPAGE® LDS del tampón de muestra (4X)

(disponible en Invitrogen, catálogo n°. NP0007), 2ul 1% EDTA, 2ul 6% PMSF, 4ul 0.5M DTT, y 2 ul H₂O, a un volumen total de 20ul.

[0141] La muestra de 20 ul fue calentada a 99°C durante 3 minutos y se le aplicó un gel SDS-PAGE de tipo NuPAGE® Novex 10 % Bis-Tris 1 mm en geles, disponibles en Invitrogen (catálogo n°. NP0301 BOX).

Tampón de desplazamiento: cámara de tampón superior, 200ml 1 X tampón de desplazamiento NuPAGE® MES SDS (catálogo n°. NP0002) que contiene 500ul de antioxidante NuPAGE® (catálogo n°. NP0005).

Cámara de tampón inferior, 600ml 1 X tampón de desplazamiento NuPAGE® MES SDS.

Condiciones de operación: dos fases, concretamente 30 minutos 50mAmp, y 20 minutos 100mAmp.

Colorante: Simply Blue Stain™ de Invitrogen (catálogo n°. LC6065).

Enjuague: 3 veces durante 5 minutos en agua desionizada, aproximadamente 100ml cada vez.

Colorante: cubrir el gel con solución colorante Simply Blue.

Colorar durante al menos una hora a temperatura ambiente.

Decolorar: descartar el colorante y lavar el gel en agua desionizada.

Marcador PM: Amersham's Low Molecular Weight Calibration Kit de SDS Electrophoresis (código de producto 17-0446-01).

[0142] Se juzga el peso molecular de xyl II, xilanasa de *Aspergillus niger* por debajo de 24 kDa, a partir del gel SDS-PAGE.

Ejemplo 4: determinación de actividad de xilanasa

[0143] Este ensayo es un ejemplo de un ensayo de xilanasa.

Es especialmente adecuado para la determinación de la actividad de xilanasas *Paenibacillus* de la presente invención.

Sustrato: 0.2% de arabinoxilano AZCL de trigo (Megazyme) en 0.2 M tampón de Na-fosfato pH 6.0 + 0.01% Triton-x-100.

Estándar: estándar de Bio-Feed Wheat FXU (como el lote 43-1195, que está disponible por solicitud en Novozymes A/S, Krogshøjvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca).

Dilución: en 0.01% Triton-x-100.

FXU/ml: 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40.

Método: se precalientan 900 ul (microlitros) de sustrato a 37°C en un termomezclador. Se añaden 100 ul de muestra.

Incubar durante 15 minutos a 37°C a velocidad máxima.

Enfriar en hielo durante 2 minutos. Girar 1 minuto a 20000 x G. 2 x 200 ul de sobrenadante se transfieren a una micro placa de laboratorio.

Se mide el extremo OD 590 nm.

Ejemplo 5: solubilización y degradación total de NSP in vitro

[0144] El propósito del corriente estudio era comparar de la eficacia de una xilanasa de la invención con una xilanasa homóloga conocida en el pienso animal, referente a la solubilización y degradación total de la xilanasa de polisacáridos no amiláceos (NSP).

Xilanasas

[0145] Las siguientes xilanasas fueron evaluadas:

La xilanasa RONOZYME WX y una xilanasa de la invención de *Paenibacillus pabuli* (ambas descritas en el ejemplo 1), y una xilanasa comparativa con la secuencia de aminoácidos 1-185 de SEQ ID n°. 9 (Swissprot Q6TLP3).

[0146] La xilanasa comparativa se expresó a partir de un gen sintético en una cepa débil de proteasa de *Bacillus subtilis*.

Un caldo de cultivo que contiene xilanasa se preparó por fermentación de la misma, y la xilanasa fue purificada utilizando procedimientos estándar.

Para inactivar posibles proteasas, el caldo de cultivo filtrado, añadido el mismo volumen de 50mM de ácido acético pH 4.0 y ajustado al pH 4.0 con 50% de ácido acético, fue incubado durante 30 minutos a 37°C en matraces de agitado de 500 mL con 250 mL en un baño maría.

La solución fue mezclada suavemente con un agitador magnético durante la incubación.

Tras la incubación, la solución fue centrifugada durante 30 minutos a 12,000 g y el sobrenadante fue separado del granulado.

La actividad de proteasa fue medida de la siguiente manera: sustrato N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNitroanilid (Sigma; S7388), tampón de ensayo: 100mM HEPES pH7.5 (0.01% Tritón X-100), diluciones enzimáticas en 0.01% Tritón X-100, y lectura OD405 después de 10 minutos a 25°C.

[0147] La xilanasa resultante era sustancialmente pura (una banda en un gel SDS) y tienen un peso molecular de aproximadamente 22kDa (por SDS-PAGE).

[0148] El contenido de proteína enzimática de la xilanasa comercial se estimó en base a geles SDS, mientras que el contenido de proteína enzimática de la xilanasa purificada *Paenibacillus pabuli* y la xilanasa comparativa se determinó como se describe en el ejemplo 1.

5 Procedimiento experimental para modelo in vitro

[0149] El estudio fue focalizado en la cuantificación de insoluble al igual que el contenido de arabinoxilano total después de la incubación in vitro en un procedimiento de digestión monogástrica como se describe en el ejemplo 1 (ver: perfil de procedimiento de digestión in vitro, condiciones, soluciones, y determinaciones de proteína enzimática).

[0150] Para determinar los arabinoxilanos insolubles, el pH fue medido durante 1, 2,5, y 5,5 horas. Se terminaron las incubaciones después de 6 horas y las muestras fueron quitadas y colocadas en hielo antes del centrifugado (10000 x g, 10 minutos, 4°C). Los sobrenadantes fueron descartados y el residuo granulado insoluble fue lavado una vez con un tampón de acetato (pH 5.0 y 100 mM).

[0151] Para determinar el total de arabinoxilanos se midió el pH durante 1, 2,5, y 5,5 horas. Las incubaciones terminaron después de 6 horas. Se añadió etanol absoluto para obtener una concentración de 80% de etanol en la muestra para precipitar todos los polisacáridos de un grado de polimerización (DP) mayor de 10 (DP>10). Las muestras fueron luego enfriadas (4°C) en hielo antes del centrifugado (10000 x g, 10 minutos, 4°C). Los sobrenadantes fueron descartados y el residuo granulado lavado una vez con 80% de etanol.

25 Análisis

[0152] El análisis de arabinoxilano NSPen el residuo granulado fue realizado de acuerdo con Theander et al, como se describe en el ejemplo 1. Los polisacáridos (DP>10) se hidrolizan en ácido sulfúrico junto con un estándar interno (mioinositol) y azúcares neutros liberados (arabinosa+xilosa) cuantificados.

Resultados

[0153] La Tabla 3 muestra el contenido de sustancia seca (%) de residuos de arabinosa+xilosa insolubles (arabinoxilano) en el pienso, es decir, arabinoxilano NSP que es insoluble después de la incubación in vitro con las xilanasas.

[0154] La Tabla 4 muestra el contenido de sustancia en seco (%) de los residuos totales de arabinosa+xilosa (arabinoxilano) en el pienso, es decir, la suma de arabinoxilano NSP insoluble y soluble.

[0155] En ambas Tablas el control se realiza sin añadir xilanasa.

Tabla 3
Dosificación de enzima (mg EP/kg dieta)

Muestra de xilanasa	0	5	5	20	5	20
	Control	RONOZYME WX	P. pabuli	P. pabuli	Q6TLP3	Q6TLP 3
Arabinoxilano total	7,34 ^a	6,89 ^b	5,78 ^{de}	5,51 ^e	6,36 ^c	6,00 ^{cd}
Desviación típica	0,42	0,076	0,22	0,20	0,05	0,14
Reducción relativa	100	94	79	75	87	82

abcde: significa dentro de una fila que no comparte un superíndice de letra común difiriendo de la significación estadística (P<0.05).

45

Tabla 4
Dosificación de enzima (mg EP/kg dieta)

Muestra de xilanasa	0	5	5	20	5	20
	Control	RONOZYME WX	P. pabuli	P. pabuli	Q6TLP3	Q6TLP 3
Arabinoxilano total	7,94 ^a	8,17 ^a	7,48 ^{cd}	7,32 ^d	7,82 ^{abc}	7,57 ^{bcd}
Desviación típica	0,16	0,26	0,072	0,25	0,31	0,11
Reducción relativa	100	103	99	92	98	95

abcd: significa dentro de una fila que no comparte un superíndice de letra común difiriendo de la significación estadística (P<0.05).

[0156] En la Tabla 3 parece que, sorprendentemente, la xilanasa *P. pabuli* es, según las estadísticas, significativamente mejor con respecto a la capacidad para solubilizar la fracción de arabinoxilano en comparación

con 1) el control sin añadir xilanasas, 2) la xilanasas de pienso para animales comercializada por RONOZYME WX, al igual que 3) la xilanasas comparativa Q6TLP3.

5 [0157] El contenido de arabinosilanos solubles irán al sobrenadante después de centrifugar las mezclas de incubación in vitro, y no se incluirán por lo tanto en la determinación de arabinosilanos insolubles.

[0158] El contenido total de arabinosilano (Tabla 4) incluye el contenido de arabinosilanos insolubles al igual que el contenido de arabinosilanos solubles.

10 [0159] Las diferencias entre los valores correspondientes a las Tablas 3 y 4 son indicativos de la cantidad de NSP que ha sido degradada a oligómeros menores que DP 10 por las xilanasas durante la incubación in vitro.

[0160] Claramente, las xilanasas investigadas son más eficaces en la solubilización de la fracción de arabinosilano (Tabla 3) que las que están en degradación total (Tabla 4).

15 Este es una característica típica de xilanasas de la familia 11.

En la Tabla 4 todavía parece que la xilanasas P. pabuli a 5 mg EP/kg dieta es también significativamente mejor con respecto a la capacidad para degradar la fracción de arabinosilano en comparación con 1) el control sin añadir xilanasas, y 2) la xilanasas de pienso para animales conocida como RONOZYME WX, y es 3) numéricamente más eficaz (4%) que la xilanasas comparativa Q6TLP3.

20 Ejemplo 6: pienso para animales y composiciones de aditivo de pienso

[0161] Una formulación de la xilanasas Paenibacillus pabuli de SEQ ID n°: 2 que contiene 0,050 g de proteína enzimática de xilanasas se añade a la premezcla siguiente (por kilo de premezcla):

25

500000	IE	Vitamina A
1000000	IE	Vitamina D3
13333	mg	Vitamina E
1000	mg	Vitamina K3
750	mg	Vitamina B1
2500	mg	Vitamina B2
1500	mg	Vitamina B6
7666	mcg	Vitamina B12
12333	mg	Niacina
33333	mcg	Biotina
300	mg	Ácido fólico
3000	mg	Ca-D-pantotenato
1666	mg	Cu
16666	mg	Fe
16666	mg	Zn
23333	mg	Mn
133	mg	Co
66	mg	I
66	mg	Se
5,8	%	Calcio
25	%	Sodio

Pienso para animales

30 [0162] Este es un ejemplo de un pienso para animales (pienso de engorde) comprendiendo 0,5 mg/kg (0,5 ppm) de la xilanasas Paenibacillus pabuli de SEQ ID n°: 2 (calculado como proteína de enzima de xilanasas):

- 65. 00 % trigo
- 32. 35% harina de soja (50% proteína cruda, CP)
- 1.0% aceite de soja
- 0.2 %DL-Metionina
- 35 0.22% DCP (fosfato dicálcico)
- 0.76% CaCO3 (carbonato cálcico)
- 0.32% arena
- 0.15% NaCl (cloruro sódico)
- 40 1 % de la premezcla anterior

[0163] Los ingredientes son mezclados, y el pienso se granula en la temperatura deseada, por ejemplo 70°C.

Listado de secuencias

[0164]

5 <110> Novozymes A/S
<120> xilanasas para pienso para animales
<130> 10987.204-WO
10 <160> 9
<170> Versión de patente 3.4
15 <210> 1
<211> 630
<212> ADN
<213> Paenibacillus pabuli DSM 16232
20 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(630)
<220>
25 <221> sig_peptide
<222> (1)..(84)
<220>
<221> mat_peptide
30 <222> (85)..(630)
<400> 1

ES 2 559 059 T3

atg ttt aaa ttc gga aaa aaa ttg tta act gtt gtc ctt gcc gct tcc	48
Met Phe Lys Phe Gly Lys Lys Leu Leu Thr Val Val Leu Ala Ala Ser	
-25 -20 -15	
atg agt ttt ggt gta ttc gcc gct acg aca ggt gct aca gat tac tgg	96
Met Ser Phe Gly Val Phe Ala Ala Thr Thr Gly Ala Thr Asp Tyr Trp	
-10 -5 -1 1	
cag aac tgg aca gat ggc ggg ggt act gtt aat gcc gtg aac ggt tcg	144
Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Thr Val Asn Ala Val Asn Gly Ser	
5 10 15 20	
gga gga aac tac agt gta aac tgg cag aac acg ggg aac ttt gtt gtc	192
Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Gln Asn Thr Gly Asn Phe Val Val	
25 30 35	
ggt aaa ggg tgg act tac ggt aca cct aat cgt gta gtg aat tac aat	240
Gly Lys Gly Trp Thr Tyr Gly Thr Pro Asn Arg Val Val Asn Tyr Asn	
40 45 50	
gcg ggt gta ttc tct cca tcc ggc aac gga tat ttg acg ttt tac ggg	288
Ala Gly Val Phe Ser Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Phe Tyr Gly	
55 60 65	
tgg aca cgg aat gca ctt att gaa tac tac gtg gtg gat aac tgg gga	336
Trp Thr Arg Asn Ala Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Asn Trp Gly	
70 75 80	
aca tac cgg cca acc gga aca tac aaa ggc aca gta acc agt gat ggt	384
Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly	
85 90 95 100	
ggc aca tat gac atc tat act acg atg aga tac aat cag cca tcc att	432
Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asn Gln Pro Ser Ile	
105 110 115	
gac ggg tat tca aca ttc ccg caa tac tgg agt gtt aga caa tcc aaa	480
Asp Gly Tyr Ser Thr Phe Pro Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys	
120 125 130	
cgt cca atc ggt gta aat tcc caa att acg ttc cag aat cac gta aat	528
Arg Pro Ile Gly Val Asn Ser Gln Ile Thr Phe Gln Asn His Val Asn	
135 140 145	
gcg tgg gcg agc aag ggc atg tac ttg ggt aac agc tgg tcc tat caa	576
Ala Trp Ala Ser Lys Gly Met Tyr Leu Gly Asn Ser Trp Ser Tyr Gln	
150 155 160	
gtg atg gcc acc gaa gga tat caa agt agc ggt agt tcg aat gtg act	624
Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr	
165 170 175 180	
ggt tgg	630
Val Trp	

<210> 2
 5 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Paenibacillus pabuli DSM 16232

<400> 2

10

Met Phe Lys Phe Gly Lys Lys Leu Leu Thr Val Val Leu Ala Ala Ser
 -25 -20 -15

Met Ser Phe Gly Val Phe Ala Ala Thr Thr Gly Ala Thr Asp Tyr Trp
 -10 -5 -1 1

Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Thr Val Asn Ala Val Asn Gly Ser
 5 10 15 20

Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Gln Asn Thr Gly Asn Phe Val Val
 25 30 35

Gly Lys Gly Trp Thr Tyr Gly Thr Pro Asn Arg Val Val Asn Tyr Asn
 40 45 50

Ala Gly Val Phe Ser Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Phe Tyr Gly
 55 60 65

Trp Thr Arg Asn Ala Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Asn Trp Gly
 70 75 80

Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly
 85 90 95 100

Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asn Gln Pro Ser Ile
 105 110 115

Asp Gly Tyr Ser Thr Phe Pro Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys
 120 125 130

Arg Pro Ile Gly Val Asn Ser Gln Ile Thr Phe Gln Asn His Val Asn
 135 140 145

Ala Trp Ala Ser Lys Gly Met Tyr Leu Gly Asn Ser Trp Ser Tyr Gln
 150 155 160

Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr
 165 170 175 180

Val Trp

- 5 <210> 3
- <211> 1409
- <212> ADN
- <213> Paenibacillus sp. KCTC 8848P

- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (725)..(1360)

<220>
 <221> sig_peptide

ES 2 559 059 T3

<222> (725)..(808)

<220>

<221> mat_peptide

5 <222> (809)..(1360)

<400> 3

```

attaccgta ataaaatggt aatccagtaa tatcagtcca gttggccgag ctcatcttga      60
ttcaatttta actaattggc aagcattgag tgacacatga aatccgggta ttttgtcttc      120
agattctctc tcattttcta tctctttcga acaataacac ttttgttgat ccagttaact      180
gtgtcttcat gaaacgtgtg atagcacctg tacctgacct gagctctgcg acggccttta      240
cctcacccca gggtacagat tcaaccacct tagctgccag aaatcgagaa ctaggcataa      300
cgctccccac tcgttgtgga ttggtgagga atccttgcaa aaaaagtagg tattctttga      360
aattcaaccg tttatcccc atgacttatt ttcttccttt tgttttttgt tcatataaaa      420
aacagcagcg aaaaaatcta aggattttac gaggatatat ctaaagaaaa tctgaagaac      480
tctaaagaag aaactcaata aactccccgac ggatatatat aacttaggga aatctaaaca      540
tagtaaagtg taatatttaa tttgcaaagt ggttatgtgc tcgttattat tatataattt      600
tacatataaa ggaggtgaaa gtaagaaaac acgggatatg gttcacatga gtgatgact      660
gcaacggaga atcttccgac aagcaggtgt agaacgaaaa tcacaaaatt ttaggaggca      720
aatt atg ttt aaa agt agt aag aaa ctg tta acg gta gtt ctt gca gct      769
      Met Phe Lys Ser Ser Lys Lys Leu Leu Thr Val Val Leu Ala Ala
      -25                               -20                               -15

tcc atg agt ttt ggt ttt ttt gca tca acc tca aat gca gcg acg gac      817
Ser Met Ser Phe Gly Phe Phe Ala Ser Thr Ser Asn Ala Ala Thr Asp
      -10                               -5                               -1 1

tac tgg caa aat tgg acc gat ggc ggt ggg acg gtt aat gct gtt aat      865
Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Thr Val Asn Ala Val Asn
      5                               10                               15

ggg tcc ggc ggc aat tac agc gta aca tgg aaa aat agc ggg aat ttt      913

```

10

ES 2 559 059 T3

Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Thr Trp Lys Asn Ser Gly Asn Phe
 20 25 30 35
 gtt gtc ggc aaa ggc tgg act act gga tgc cca gac aga acg att aat 961
 Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Asp Arg Thr Ile Asn 50
 40
 tac aat gcc ggt gtc tgg gcg ccg tcc ggt aat gga tat ttg gcc ctc 1009
 Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ala Leu 65
 55 60 65
 tac ggg tgg acg aga aac tca ctc atc gaa tat tac gtt gtt gat agc 1057
 Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Ser Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser 70 75 80
 tgg ggg act tat cga cct acc gga acg tat aaa ggt acg gtg acc agt 1105
 Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser 85 90 95
 gat ggg ggt aca tat gac atc tac aca aca atg cga tac gac gca cct 1153
 Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asp Ala Pro 100 105 110 115
 tcc att gaa ggc caa aaa acg aca ttt atc cag tac tgg agt gtt cga 1201
 Ser Ile Glu Gly Gln Lys Thr Thr Phe Ile Gln Tyr Trp Ser Val Arg 120 125 130
 cag acg aag aga ccg acc ggg ggc aac tcc acg atc act ttc agc aat 1249
 Gln Thr Lys Arg Pro Thr Gly Gly Asn Ser Thr Ile Thr Phe Ser Asn 135 140 145
 cac gtg aag gct tgg gcg agg caa gga atg cat ctg ggg aac aac tgg 1297
 His Val Lys Ala Trp Ala Arg Gln Gly Met His Leu Gly Asn Asn Trp 150 155 160
 tct tac cag gtg tta gcg aca gag ggg tat cag agt agc ggg agc tct 1345
 Ser Tyr Gln Val Leu Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser 165 170 175
 aac gta acg gtg tgg taaccatgaa ggcttaaagc cgtattacaa catagataag 1400
 Asn Val Thr Val Trp 180
 gaaaagaaa 1409

<210> 4
 <211> 212
 5 <212> PRT
 <213> Paenibacillus sp. KCTC 8848P

<400> 4

Met Phe Lys Ser Ser Lys Lys Leu Leu Thr Val Val Leu Ala Ala Ser
 -25 -20 -15

Met Ser Phe Gly Phe Phe Ala Ser Thr Ser Asn Ala Ala Thr Asp Tyr
 -10 -5 -1 1

Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Thr Val Asn Ala Val Asn Gly
 5 10 15 20

Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Thr Trp Lys Asn Ser Gly Asn Phe Val
 25 30 35

10

ES 2 559 059 T3

Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Asp Arg Thr Ile Asn Tyr
 40 45 50
 Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ala Leu Tyr
 55 60 65
 Gly Trp Thr Arg Asn Ser Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser Trp
 70 75 80
 Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp
 85 90 95 100
 Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asp Ala Pro Ser
 105 110 115
 Ile Glu Gly Gln Lys Thr Thr Phe Ile Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln
 120 125 130
 Thr Lys Arg Pro Thr Gly Gly Asn Ser Thr Ile Thr Phe Ser Asn His
 135 140 145
 Val Lys Ala Trp Ala Arg Gln Gly Met His Leu Gly Asn Asn Trp Ser
 150 155 160
 Tyr Gln Val Leu Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn
 165 170 175 180
 Val Thr Val Trp

- 5 <210> 5
- <211> 786
- <212> ADN
- <213> Aspergillus niger DSM 12665
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (6)..(680)
- 15 <220>
- <221> sig_peptide
- <222> (6)..(116)
- 20 <220>
- <221> mat_peptide
- <222> (117)..(680)
- <400> 5

ES 2 559 059 T3

caatc atg ctc acc aag aac ctt ctc ctc tgc ttt gcc gcg gct aag gct 50
 Met Leu Thr Lys Asn Leu Leu Leu Cys Phe Ala Ala Ala Lys Ala
 -35 -30 -25

gct ctg gct gtt ccc cac gac tct gtc gcc cag cgt tcg gat gcc ttg 98
 Ala Leu Ala Val Pro His Asp Ser Val Ala Gln Arg Ser Asp Ala Leu
 -20 -15 -10

cac atg ctc tct gag cgc tcg acc ccg agc tcg acc ggc gag aac aac 146
 His Met Leu Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ser Ser Thr Gly Glu Asn Asn
 -5 -1 1 5 10

ggc ttc tac tac tcc ttc tgg acc gac ggc ggt ggc gac gtg acc tac 194
 Gly Phe Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Asp Val Thr Tyr
 15 20 25

acc aac gga gat gct ggt gcc tac act gtt gag tgg tcc aac gtg ggc 242
 Thr Asn Gly Asp Ala Gly Ala Tyr Thr Val Glu Trp Ser Asn Val Gly
 30 35 40

aac ttt gtc ggt gga aag ggc tgg aac ccc gga agt gcg cag gac atc 290
 Asn Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Gln Asp Ile
 45 50 55

acc tac agc ggc acc ttc acc cct agc ggc aac ggc tat ctc tcc gtc 338
 Thr Tyr Ser Gly Thr Phe Thr Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ser Val
 60 65 70

tat ggc tgg acc act gac ccc ctg atc gag tac tac atc gtc gag tcc 386
 Tyr Gly Trp Thr Thr Asp Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser
 75 80 85 90

tac ggc gac tac aac ccc ggc agt gga ggc aca tac aag ggc acc gtc 434
 Tyr Gly Asp Tyr Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val
 95 100 105

acc tcg gac gga tcc gtt tac gat atc tac acg gct acc cgt acc aat 482
 Thr Ser Asp Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Thr Asn
 110 115 120

gct gct tcc att cag gga acc gct acc ttc act cag tac tgg tcc gtc 530
 Ala Ala Ser Ile Gln Gly Thr Ala Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val
 125 130 135

cgc cag aac aag aga gtt ggc gga act gtt acc acc tcc aac cac ttc 578
 Arg Gln Asn Lys Arg Val Gly Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn His Phe
 140 145 150

aat gct tgg gct aag ctg gga atg aac ctg ggt act cac aac tac cag 626
 Asn Ala Trp Ala Lys Leu Gly Met Asn Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln
 155 160 165 170

atc gtg gct acc gag ggt tac cag agc agt gga tct tcg tcc atc act 674
 Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Thr
 175 180 185

ggt cag taagcgggtgg atgtgtggat tgaacgattg tgcattgaaa tactgagcag 730
 Val Gln

tcgtatgata tgtgaaacag gtagttgttt ggtaccaatg tactggtcat ttggag 786

5 <210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Aspergillus niger DSM 12665

10 <400> 6

ES 2 559 059 T3

Met Leu Thr Lys Asn Leu Leu Leu Cys Phe Ala Ala Ala Lys Ala Ala
 -35 -30 -25

Leu Ala Val Pro His Asp Ser Val Ala Gln Arg Ser Asp Ala Leu His
 -20 -15 -10

Met Leu Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ser Ser Thr Gly Glu Asn Asn Gly
 -5 -1 1 5 10

Phe Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Asp Val Thr Tyr Thr
 15 20 25

Asn Gly Asp Ala Gly Ala Tyr Thr Val Glu Trp Ser Asn Val Gly Asn
 30 35 40

Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Gln Asp Ile Thr
 45 50 55

Tyr Ser Gly Thr Phe Thr Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ser Val Tyr
 60 65 70 75

Gly Trp Thr Thr Asp Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Tyr
 80 85 90

Gly Asp Tyr Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr
 95 100 105

Ser Asp Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Thr Asn Ala
 110 115 120

Ala Ser Ile Gln Gly Thr Ala Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg
 125 130 135

Gln Asn Lys Arg Val Gly Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn His Phe Asn
 140 145 150 155

Ala Trp Ala Lys Leu Gly Met Asn Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln Ile
 160 165 170

Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Thr Val
 175 180 185

Gln

<210> 7

<211> 1086

<212> ADN

<213> Aspergillus niger DSM 12665

5

<220>
<221> CDS
<222> (65)..(832)

5 <220>
<221> sig_peptide
<222> (65) .. (148)

10 <220>
<221> mat_peptide
<222> (149)..(832)

<400> 7

ES 2 559 059 T3

caccctcaac tttcaagtca cagttgtacc cttctacttg gatataattct ttcttatcat 60

catc atg gtg tct ttc ctt ggc caa gca cgc ctg gcc gtg cca atc ctg 109
 Met Val Ser Phe Leu Gly Gln Ala Arg Leu Ala Val Pro Ile Leu
 -25 -20 -15

tca gct ttt gcg tgc atg ctt gcg gca agt tcc gcc atc ccc cca cca 157
 Ser Ala Phe Ala Cys Met Leu Ala Ala Ser Ser Ala Ile Pro Pro Pro
 -10 -5 -1 1

ccg cgt gga gct ctt tca ccc gaa cgt cta caa tgg att aga gag gtg 205
 Pro Arg Gly Ala Leu Ser Pro Glu Arg Leu Gln Trp Ile Arg Glu Val
 5 10 15

atc ggc aat cag act gag aac gac agc gtt tcg gac ctt gct aag cgg 253
 Ile Gly Asn Gln Thr Glu Asn Asp Ser Val Ser Asp Leu Ala Lys Arg
 20 25 30 35

agc act atc ctg cat acc agc caa gac gga gtt gac agc gcc gga ttc 301
 Ser Thr Ile Leu His Thr Ser Gln Asp Gly Val Asp Ser Ala Gly Phe
 40 45 50

tac tac tca gta tac aat gac aac ggg gcc gat gtt gga tac acc gaa 349
 Tyr Tyr Ser Val Tyr Asn Asp Asn Gly Ala Asp Val Gly Tyr Thr Glu
 55 60 65

tac ccc acg acc ggc cag ttc gaa ctt ggc tgg agt gct gag gcg gaa 397
 Tyr Pro Thr Thr Gly Gln Phe Glu Leu Gly Trp Ser Ala Glu Ala Glu
 70 75 80

ttc ctc gct gga aag ggc ttc aag ggc ggc aac cca cgc tcc ttg acc 445
 Phe Leu Ala Gly Lys Gly Phe Lys Gly Gly Asn Pro Arg Ser Leu Thr
 85 90 95

tgg gac ggt tat ttc acc gcc gaa ggg gac tgg act ttg gcc att tat 493
 Trp Asp Gly Tyr Phe Thr Ala Glu Gly Asp Trp Thr Leu Ala Ile Tyr
 100 105 110 115

ggc tgg acc aca aac ccc gtc acc gag tgg tat att gtg gag tcg cat 541
 Gly Trp Thr Thr Asn Pro Val Thr Glu Trp Tyr Ile Val Glu Ser His
 120 125 130

gga agt gga acc cca ggc aac ggg aac atc ctc ggc cag gtt gat agt 589
 Gly Ser Gly Thr Pro Gly Asn Gly Asn Ile Leu Gly Gln Val Asp Ser
 135 140 145

gat ggc ggc gtc tac gat gtc tat aat ctc ccc tat aga aat gtt ccg 637
 Asp Gly Gly Val Tyr Asp Val Tyr Asn Leu Pro Tyr Arg Asn Val Pro
 150 155 160

gag atc tac ggt gtc acc aac ttc gac cag cac tgg tcg gtg cgt cgc 685
 Glu Ile Tyr Gly Val Thr Asn Phe Asp Gln His Trp Ser Val Arg Arg
 165 170 175

tcc cac cgc tct act ggc acc gtc gac gtg agc gcc cat ttc cag cgc 733
 Ser His Arg Ser Thr Gly Thr Val Asp Val Ser Ala His Phe Gln Arg
 180 185 190 195

tgg aag gaa ttg ggt ctc acc cct ggc tcc cca gtc ttc cag atg gtt 781
 Trp Lys Glu Leu Gly Leu Thr Pro Gly Ser Pro Val Phe Gln Met Val
 200 205 210

acc ctg gaa ggc ttt tcc ggc cag ggg tac ctg gac ttc acc gtt agt 829
 Thr Leu Glu Gly Phe Ser Gly Gln Gly Tyr Leu Asp Phe Thr Val Ser
 215 220 225

gca tagaaagggt cagggacctc gtggctcag ctggcggcga gcacttactt 882
 Ala

ES 2 559 059 T3

gaggccagat cccctccacg tgtatctttt tttctagggc aaagaatggg gacttcggtt 942
caagaaacag aagccccctt tcccttctt ttttgtttct tcttctctta gagcctgctc 1002
tttaacaact tgttcgcttc tttccagtt accaattatt ttttgacctt caaagatatt 1062
tactatcgaa ctaatttggt tatc 1086

<210> 8

<211> 256

5 <212> PRT

<213> *Aspergillus niger* DSM 12665

<400> 8

ES 2 559 059 T3

Met Val Ser Phe Leu Gly Gln Ala Arg Leu Ala Val Pro Ile Leu Ser
 -25 -20 -15

Ala Phe Ala Cys Met Leu Ala Ala Ser Ser Ala Ile Pro Pro Pro Pro
 -10 -5 -1 1

Arg Gly Ala Leu Ser Pro Glu Arg Leu Gln Trp Ile Arg Glu Val Ile
 5 10 15 20

Gly Asn Gln Thr Glu Asn Asp Ser Val Ser Asp Leu Ala Lys Arg Ser
 25 30 35

Thr Ile Leu His Thr Ser Gln Asp Gly Val Asp Ser Ala Gly Phe Tyr
 40 45 50

Tyr Ser Val Tyr Asn Asp Asn Gly Ala Asp Val Gly Tyr Thr Glu Tyr
 55 60 65

Pro Thr Thr Gly Gln Phe Glu Leu Gly Trp Ser Ala Glu Ala Glu Phe
 70 75 80

Leu Ala Gly Lys Gly Phe Lys Gly Gly Asn Pro Arg Ser Leu Thr Trp
 85 90 95 100

Asp Gly Tyr Phe Thr Ala Glu Gly Asp Trp Thr Leu Ala Ile Tyr Gly
 105 110 115

Trp Thr Thr Asn Pro Val Thr Glu Trp Tyr Ile Val Glu Ser His Gly
 120 125 130

Ser Gly Thr Pro Gly Asn Gly Asn Ile Leu Gly Gln Val Asp Ser Asp
 135 140 145

Gly Gly Val Tyr Asp Val Tyr Asn Leu Pro Tyr Arg Asn Val Pro Glu
 150 155 160

Ile Tyr Gly Val Thr Asn Phe Asp Gln His Trp Ser Val Arg Arg Ser
 165 170 175 180

His Arg Ser Thr Gly Thr Val Asp Val Ser Ala His Phe Gln Arg Trp
 185 190 195

Lys Glu Leu Gly Leu Thr Pro Gly Ser Pro Val Phe Gln Met Val Thr
 200 205 210

Leu Glu Gly Phe Ser Gly Gln Gly Tyr Leu Asp Phe Thr Val Ser Ala
 215 220 225

<210> 9
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> bacteria de muestra medioambiental

10

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(29)

15

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (30) .. (214)

<400> 9

Met Phe Lys Leu Ser Lys Lys Ile Leu Met Val Leu Leu Thr Ile Ser
 -25 -20 -15

Met Ser Phe Ile Ser Leu Phe Thr Val Thr Ala Tyr Ala Ala Ser Thr
 -10 -5 -1 1

Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Thr Val Asn Ala Thr
 5 10 15

Asn Gly Ser Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ser Trp Ser Asn Cys Gly Asn
 20 25 30 35

Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Ala Thr Arg Val Ile
 40 45 50

Asn Tyr Asn Ala Gly Ala Phe Ser Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ala
 55 60 65

Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Ser Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp
 70 75 80

Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr
 85 90 95

Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg Thr Asn Ala
 100 105 110 115

Pro Ser Ile Asp Gly Asn Asn Thr Thr Phe Thr Gln Phe Trp Ser Val

20

ES 2 559 059 T3

				120						125						130
Arg	Gln	Ser	Lys	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr	Asn	Asn	Thr	Ile	Thr	Phe	Ser	
			135					140					145			
Asn	His	Val	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Lys	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Ser	Ser	
		150					155					160				
Trp	Ser	Tyr	Gln	Val	Leu	Ala	Thr	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Tyr	
	165					170					175					
Ser	Asn	Val	Thr	Val	Trp											
180					185											

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso en pienso para animales de una xilanasa con un porcentaje de identidad a los aminoácidos 1-182 de SEQ ID n°: 2 de al menos el 90%, siendo determinado el porcentaje de identidad por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos usando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de abertura del espacio de 10, y una penalización por extensión de espacio de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en el alineamiento; iii) división del número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, e iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1 de una xilanasa tal y como se define en la reivindicación 1 en la preparación de una composición para usar en pienso para animales.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 de una xilanasa tal y como se define en la reivindicación 1 para la solubilización de polisacáridos no amiláceos durante la digestión gástrica e intestinal.
4. Uso según la reivindicación 1 de una xilanasa tal y como se define en la reivindicación 1 para la degradación de polisacáridos no amiláceos durante la digestión gástrica e intestinal.
- 20 5. Uso según la reivindicación 1 de una xilanasa tal y como se define en la reivindicación 1 para el pretratamiento de pienso para animales o de los componentes de pienso para animales.
- 25 6. Composición de pienso para animales que comprende una xilanasa tal y como se define en la reivindicación 1, y
(a) al menos una vitamina soluble en grasa;
(b) al menos una vitamina soluble en agua; y/o
(c) al menos un oligoelemento.
7. Composición de pienso de la reivindicación 6 que comprende además al menos una enzima seleccionada entre el siguiente grupo de enzimas: otra xilanasa, y/o beta-glucanasa.
- 30 8. Composición de pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 6-7 que es un aditivo de pienso.
9. Composición de pienso para animales de las reivindicaciones 6 a 8 con un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y que comprende una xilanasa tal y como se define en la reivindicación 1.
- 35 10. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde se añade al pienso una xilanasa tal y como se define en la reivindicación 1, o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 6-8.