

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 506**

51 Int. Cl.:

**A23K 10/30** (2006.01)

**A23K 20/189** (2006.01)

**A23K 50/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2007 E 07787460 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2043454**

54 Título: **Uso de amilasas bacterianas en pienso para animales bovinos**

30 Prioridad:

**13.07.2006 DK 200600974**

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

**28.09.2016**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (50.0%)  
Het Overloon 1  
6411 TE Heerlen, NL y  
NOVOZYMES A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**STEINBERG, WOLFGANG;  
IMMIG, IRMGARD;  
GLITSOE, VIBE y  
FISCHER, MORTEN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 584 506 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

Uso de amilasas bacterianas en pienso para animales bovinos

## 5 Campo de la invención

[0001] Las vacas de alto rendimiento de los sistemas de ganadería modernos viven en condiciones que se caracterizan por una producción de leche (vacas lecheras) o un índice de crecimiento (ganado bovino para carne) muy altos, que van seguidos de una necesidad de energía igualmente alta.

10 La utilización del pienso se reduce marcadamente cuando la toma se aumenta más allá de los niveles de mantenimiento.

En parte para responder a esto, cada vez se incluye más pienso fácilmente degradable en el pienso de los rumiantes, por ejemplo materias primas que contienen almidón, tales como concentrados a base de cereales y forrajes conservados en silos.

15 El material amiláceo es frecuentemente recuperado de las heces, implicando que la utilización de tales ingredientes del pienso podrían ser mejorada todavía más.

[0002] La presente invención se refiere al uso de una amilasa bacteriana en pienso para animales bovinos tales como vacas lecheras y ganado bovino para carne, en particular para mejorar la producción de leche, el aumento de peso, la digestibilidad aparente, la desaparición de materia seca de pienso utilizando el método de la bolsa de nylon, y/o la conversión del alimento.

20 La invención también se refiere a composiciones tales como pienso y aditivos alimenticios que comprenden la amilasa bacteriana, así como métodos de preparación de tales composiciones.

## 25 Descripción de la técnica relacionada

[0003] WO 03/068256 A1 describe un suplemento de pienso de amilasa para una nutrición de rumiantes mejorada. La amilasa usada es una amilasa fúngica producida por *Aspergillus oryzae*.

30 Tricarico et al, en *Animal Science* 2005,81: 365-374, describen los efectos del extracto de *Aspergillus oryzae* que contiene actividad de alfa-amilasa en la fermentación ruminal y la producción de leche en vacas Holstein lactantes.

[0004] La patente de EE.UU. n° 3,250,622 divulga el uso de un aditivo específico que contiene enzimas proteolíticas y amilolíticas al igual que gumasa, estrechamente asociado a un portador de malta molida, para estimular la producción de leche en vacas lecheras.

35 La fuente enzimática no se especifica.

[0005] Mora-Jaimes et al (*Agrociencia* 36(1) (2002); 31-39) estudiaron el rendimiento y la fermentación ruminal en corderos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasas.

40 [0006] Rojo et al (*Animal Feed Science and Technology*, 123-124 (2005); 655-665) estudió los efectos de amilasas exógenas de *Bacillus licheniformis* y *Aspergillus niger* en la digestión ruminal de almidón y el rendimiento de los corderos.

[0007] WO 01/41795 A1 se refiere al uso de una combinación de una proteasa y una sal interna de un ácido carboxílico de amina cuaternaria en el tratamiento y/o la profilaxis de coccidiosis e infecciones bacterianas.

45 También se reivindica un aumento de peso mejorado de los animales en general.

Una xilanasa y/o una amilasa puede ser incluida.

Se afirma que esta combinación es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de coccidiosis e infecciones bacterianas tales como la enteritis necrótica.

50 Una presión de infección reducida puede actuar para mejorar el índice de aumento de peso, ya que los agentes infecciosos actúan invadiendo las células epiteliales del intestino, que se necesitan para la degradación y la absorción de nutrientes.

Se menciona una alfa-amilasa de *Bacillus subtilis*.

También se menciona a los rumiantes (como animales), pero todos los ejemplos se refieren a pollos broiler.

55 [0008] La publicación DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1992, INOUE NAOTO ETAL: "Variation in digestibility of corn grain (*Zea mays* L): Relationships among degradability by alpha-amylase, ruminal dry matter disappearance and chemical composition" XP002457018 N° acceso base de datos PREV199395023440D3 compara la degradabilidad de la materia seca de grano de maíz in situ (bolsas de nylon sumergidas en el rumen de novillos) con la degradabilidad de la materia seca de grano de maíz bajo incubación con  $\alpha$ -amilasa (*B.subtilis*) y atribuye la diferencia varietal a diferencias en la textura del grano.

60 En otras palabras, la amilasa se evalúa como una herramienta de laboratorio para predecir la degradación ruminal de los granos de maíz.

65 [0009] Gutierrez et al. "Effect of exogenous amylase or glucoamylase on in situ ruminal digestion of corn and sorghum" *Journal of Applied Animal Research*, vol. 27, n° 1, 2005, páginas 7-10, divulga que la  $\alpha$ -amilasa

(*B.licheniformis*) aumentó in situ la desaparición ruminal de maíz y de materia seca del grano de sorgo, cuando los granos fueron molidos a 1 mm, rociados con la enzima durante 24 horas y luego incubados en el rumen de novillos durante 12 horas. La solicitud de patente de EEUU nº 2002/122846 describe un método de pretratamiento donde un carbohidrato se mezcla con proteína y material que contiene carbohidratos y se preincuba (remojo) en condiciones (temperatura, pH, contenido de humedad) adecuadas para una hidrólisis eficaz de parte de los carbohidratos hasta sus formas de reducción.

El grupo carbonilo del azúcar reductor puede formar aminas de azúcar sustituidas con los grupos amino en la proteína de pienso en la etapa de calentamiento posterior.

Se cree que la conversión del grupo amino libre de la proteína a la forma sustituida vuelve a la proteína menos disponible para el ataque microbiano en el rumen.

La etapa de calentamiento debería así ser realizada a condiciones (temperatura, tiempo) adecuadas para optimizar la utilización de proteínas reduciendo la biodisponibilidad en el rumen sin destruir la biodisponibilidad en el intestino delgado.

En un experimento (Ejemplo 6), una  $\alpha$ -amilasa (de *B. Licheniformis*) se usa en combinación con una glucoamilasa, pero sin indicar ninguna ventaja en la degradación de materia seca en el rumen.

[0010] WO 92/19744 (VALIO) describe la producción recombinante de amilasa de *B. acidocaldarius* expresada en *Lactobacillus* o *Bacillus*; y el uso de este huésped de expresión que produce  $\alpha$ -amilasa con ácido estable en procesos agrícolas bajos en pH tales como la conservación alimenticia y la producción de ensilado (que es una preincubación anaeróbica larga (semanas o meses) de forraje que actúa para preservar este componente de pienso).

Esto significa que la  $\alpha$ -amilasa de ácido estable se usa como componente de un inoculante o "solución de conservación".

También se describe un ejemplo en el que el huésped de expresión (inoculantes) se alimenta directamente a los animales (es decir como un alimento directo probiótico o microbiano).

[0011] WO 03/049550 (Danisco) concierne el uso de un componente que comprende una enzima para usarse en un pienso que comprende almidón, en un aspecto el uso de un componente que incluye una enzima que tiene actividad de amilasa y es capaz de degradar almidón resistente para usarlo en un pienso que comprende almidón.

Aunque se menciona "animales" como un término general, se centra en el cerdo, aves y seres humanos (todos monogástricos) y no hay ejemplos o consideraciones en cuanto a ningún animal rumiante.

Las Amilasas en D2 son capaces de degradar "almidón resistente".

La definición de almidón resistente lo describe como "la suma de almidón y productos de degradación de almidón no absorbidos en el intestino delgado de animales saludables" y que es capaz de "ayudar a la  $\alpha$ -amilasa pancreática en la degradación de almidón en el sistema digestivo".

No hay indicación de los sistemas de digestivos que comprende un rumen.

[0012] Es un objeto de la presente invención proporcionar amilasas alternativas y preferiblemente mejoradas que puedan aliviar los problemas anteriormente descritos mediante la mejora de la utilización de pienso, de la producción de leche, y/o del aumento de peso.

Las amilasas de la invención, además, o de forma alternativa, puede tener propiedades mejoradas tales como un perfil de respuesta a dosis, perfil de pH, estabilidad de granulación, estabilidad de temperatura, estabilidad de sales biliares, estabilidad de proteasa, y/o actividad específica.

Las amilasas de la invención pueden, además, o de forma alternativa, ser capaces de degradar almidón en el rumen, en el intestino grueso, y/o en el intestino delgado.

#### Resumen de la invención

[0013] La presente invención se refiere al uso de al menos una amilasa bacteriana en pienso para animales de la subfamilia Bovinae para mejorar la producción de leche, el aumento de peso, y/o el Índice de conversión del alimento (FCR), donde la amilasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEC ID n.º: 2, y por la cual la identidad se determina por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de gap de 10, y una penalización por extensión de gap de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en la alineación; iii) división del número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje.

[0014] La invención también se refiere al uso anterior de al menos una amilasa bacteriana en la preparación de una composición para usar en un pienso para animales de la subfamilia Bovinae.

[0015] La invención además se refiere a composiciones de aditivo de pienso que comprenden al menos una amilasa bacteriana, junto con al menos un ingrediente adicional seleccionado de vitaminas y/o minerales, donde la amilasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con aminoácidos los 1-481 de la SEC ID n.º: 2, y por la cual la identidad se determina por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de gap de 10, y una penalización por extensión de gap de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en la alineación; iii)

división del número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje.

[0016] Finalmente, la invención se refiere a una composición como se ha indicado anteriormente que comprende al menos una amilasa bacteriana junto con al menos un ingrediente adicional seleccionado de heno, forraje, fibra alimentaria, y/o concentrado de pienso, donde la amilasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEC ID n.º: 2, y por la cual la identidad se determina por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de gap de 10, y una penalización por extensión de gap de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en la alineación; iii) división del número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje. Ejemplos de tales composiciones son el concentrado de pienso y la Ración Total Mezclada (TMR).

Descripción detallada de la invención

[0017] En el presente contexto, una amilasa es una enzima que cataliza la endohidrólisis de almidón y otros oligo y polisacáridos lineales y ramificados.

En particular, la amilasa para uso según la invención tiene actividad de alfa-amilasa, es decir, cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en oligosacáridos y polisacáridos.

Las alfa-amilasas actúan, por ejemplo, en el almidón, glicógeno y polisacáridos y oligosacáridos relacionados de una manera aleatoria, liberando grupos de reducción de liberación en la configuración alfa.

[0018] La amilasa para uso según la invención se clasifica como perteneciente al grupo EC 3.2.1.1. Los números EC se refieren a Nomenclatura Enzimática o Enzyme Nomenclature 1992 de NC-IUBBM, Academic Press, San Diego, California, incluyendo los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223,1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232,1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237,1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250,1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264,610-650; respectivamente.

La nomenclatura es regularmente complementada y actualizada; véase por ejemplo en internet en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

[0019] La actividad de amilasa se puede determinar por cualquier ensayo adecuado.

Generalmente, el ensayo de pH y el ensayo de temperatura se pueden adaptar a la enzima en cuestión.

Algunos ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12.

Algunos ejemplos de temperatura de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, o 95°C.

Los valores de pH y las temperaturas preferidos están dentro del rango fisiológico, tales como valores de pH de 3, 4, 5, 6, 7, o 8, y temperaturas de 30, 35, 37, o 40°C.

Un ensayo preferido es el ensayo KNU(S) del Ejemplo 5 del presente documento.

Otro ensayo preferido es el ensayo de azúcar reductor del ejemplo 6 del presente documento.

Alternativamente, el siguiente ensayo de amilasa puede ser usado: Sustrato: tabletas Phadebas (Pharmacia Diagnostics; polímero de almidón reticulado insoluble azul, que se mezcla con albúmina de suero bovino y una sustancia de tampón, y fabricado en tabletas).

Temperatura de ensayo: 37°C. PH de ensayo: 4,3 (o 7,0, si se desea).

Tiempo de reacción: 20 min. Después de la suspensión en el agua, el almidón es hidrolizado por la alfa-amilasa, proporcionando fragmentos de azul solubles.

La absorbancia de la solución de azul resultante, medida a 620 nm, es una función de la actividad de alfa-amilasa.

Una unidad de alfa-amilasa fúngica (1 FAU) es la cantidad de enzima que rompe 5,26 g de almidón por hora en condiciones de ensayo estándar.

Un almidón preferido es Merck, Amylum solubile Erg. B. 6, Batch 9947275.

Una descripción de ensayo más detallada, APTSMYQI-3207, está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

[0020] En particular la amilasa, en la forma en que se añade al pienso, o cuando está incluida en un aditivo de pienso, está bien definida.

"Bien definida" significa que la preparación de amilasa es al menos 50% pura en base a proteínas.

En otras formas de realización particulares, la preparación de amilasa es al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos 95% pura.

La pureza se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo por SDS-PAGE, o por cromatografía de exclusión de tamaño (véase el ejemplo 12 de WO 01/58275).

[0021] Una preparación de amilasa bien definida es ventajosa.

Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente al pienso una amilasa que está esencialmente libre de interferencias o contaminaciones con otras enzimas.

El término dosis se refiere correctamente en particular al objetivo de obtener resultados coherentes y constantes, y a la capacidad de optimizar la dosificación basada en el efecto deseado.

[0022] Se puede obtener en particular preparaciones de amilasa con purezas de este orden de magnitud usando

métodos recombinantes de producción, mientras que no son tan fácilmente obtenibles y también están sujetas a una variación entre lotes mucho más alta cuando se producen por métodos de fermentación tradicionales.

[0023] El aislamiento, la purificación, y la concentración de la amilasa de la invención se pueden realizar por medios convencionales.

Por ejemplo, se puede recuperar de un caldo de fermentación por procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación, y además puede ser purificada por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, la cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico cromatoenfoco, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

La amilasa purificada se puede formular como se conoce en la técnica como un producto líquido o sólido adecuado para usar en pienso para animales y/o aditivos de pienso.

[0024] La amilasa bacteriana para uso según la invención se incluye en dietas bovinas o aditivos alimenticios bovinos en una cantidad eficaz.

Actualmente se contempla que una cantidad eficaz es de por debajo de 1000 mg de proteína enzimática por kg (ppm) de materia seca de dieta, preferiblemente por debajo de 800, 600, 500, 400, o por debajo de 300 ppm.

En una forma de realización preferida, la dosis de amilasa es de por debajo de 200 mg de proteína enzimática por kg de materia seca de dieta, preferiblemente por debajo de 150, 100, 90, 80, 70, 60, o por debajo de 50 ppm.

En una forma de realización aún más preferida, la dosis de amilasa es de por debajo de 40, 35, 30, 25, o por debajo de 20 ppm.

En una forma de realización más preferida, la dosis de amilasa es de por debajo de 15, 12, 10, 9, 8, o por debajo de 7 mg de proteína enzimática por kg de materia seca de dieta.

Por otro lado, una cantidad eficaz puede ser de por encima de 0,01 mg de proteína enzimática por kg de materia seca de dieta, preferiblemente por encima de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50; 0,75, 1, 2, 3, o por encima de 4 mg de proteína enzimática por kg (ppm) de materia seca de dieta.

Por consiguiente, ejemplos no limitativos de rangos de dosis preferidas son: 0,10-50 mg de proteína enzimática/kg, preferiblemente 0,50-10; 1-9; 2-8; 3-8 o 4-7 mg de proteína enzimática/kg.

Ejemplos adicionales de rangos de dosis preferidos, todos en ppm, son: 1-35; 1-30; 2-25; 3-20 y 4-15.

[0025] Para la determinación de los mg de proteína de amilasa por kg de pienso, la amilasa es purificada a partir de la composición de pienso, y la actividad específica de la amilasa purificada es determinada utilizando el ensayo de amilasa deseado.

La actividad de amilasa de la composición de pienso como tal es también determinada usando el mismo ensayo y, basándose en estas dos determinaciones, se calcula la dosis en mg de proteína de enzima de amilasa por kg de pienso.

[0026] Los mismos principios son de aplicación para la determinación de los mg de proteína de amilasa en aditivos alimenticios.

Por supuesto, si hay disponible una muestra de la amilasa usada para la preparación del aditivo de pienso o del pienso, la actividad específica es determinada a partir de esta muestra (no es necesario purificar la amilasa de la composición del pienso o del aditivo).

[0027] Para una clasificación e identificación taxonómica de las bacterias se hace referencia al Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986), vol 2; ISBN0-683-0783.

En la alternativa, se puede usar el ampliamente conocido análisis de secuencias 16SrRNA (véase por ejemplo Johansen et al, Int. J. Syst. Bacteriol, 1999, 49,1231-1240, en particular la sección Methods en P. 1233, 2ª columna); o se puede consultar a expertos de taxonomía, por ejemplo de DSMZ u otros institutos de depósitos reconocidos.

Tal y como se emplea en el presente documento, el término bacteriano designa amilasas que son derivadas de bacterias.

El término "derivadas de" incluye enzimas obtenibles, u obtenidas, de cepas bacterianas de tipo salvaje, así como variantes de las mismas.

Las variantes pueden tener al menos una sustitución, inserción, y/o delección de al menos un residuo de aminoácido. El término variante también incluye barajados, híbridos, enzimas quiméricas y enzimas consenso.

Las variantes se pueden producir por cualquier método conocido en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio, la mutagénesis aleatoria, los procesos de derivación de consenso (EP 897985), y la transposición de genes (WO 95/22625, WO 96/00343), etc. Para los fines presentes, una variante de amilasa cualifica como bacteriana cuando al menos una amilasa bacteriana ha sido usada para su diseño, derivación o preparación.

El término bacteriano no se refiere a un potencial huésped de producción recombinante, sino sólo al origen del gen de codificación de amilasa que es hospedado por él.

[0028] La amilasa para uso según la invención es preferiblemente derivada de una cepa de Bacillus, tales como cepas de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus circulans, Bacillus halmपालus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus sp., Bacillus stearothermophilus, y Bacillus subtilis; preferiblemente de cepas de Bacillus

amyloliquefaciens, Bacillus halmapalus, Bacillus licheniformis, Bacillus. Sp, Bacillus subtilis, y stearothermophilus de Bacillus; más preferiblemente de cepas de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus halmapalus, Bacillus licheniformis, Bacillus sp., y Bacillus stearothermophilus; aún más preferiblemente de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus halmapalus, Bacillus sp., y Bacillus stearothermophilus; de la forma más preferible de Bacillus stearothermophilus.

5 [0029] Ejemplos no limitativos de amilasas para uso según la invención son las derivadas de Bacillus licheniformis, tales como Swissprot, nombre de registro AMY\_BACST, número de registro primario P06279.

10 [0030] Para fines de la presente invención, las amilasas preferidas son las amilasas contenidas en los siguientes productos comerciales: BAN, Stainzyme, Termamyl SC, Natalase, y Duramyl (Novozymes).

[0031] Otros ejemplos particulares de amilasas para uso según la invención son las amilasas contenidas en los productos comerciales Validase BAA y Validase HT (de Valley Research).

15 [0032] Otros ejemplos particulares más de amilasas para uso según la invención son las amilasas contenidas en los siguientes productos comerciales: Clarase, DexLo, GC 262 SP, G-Zyme G990, G-Zyme G995, G-Zyme G997, G-Zyme G998, HTAA, Optimax 7525, Purastar OxAm, Purastar ST, Spezyme AA, Spezyme Alpha, Spezyme BBA, Spezyme Delta AA, Spezyme DBA, Spezyme Ethyl, Spezyme Fred (GC521), Spezyme HPA, Spezyme Extra, y Ultraphlow (todos de Genencor); Validase HT340L, Valley Thin 340L (todos de Valley Research); Avizyme 1500, Dextro 300 L, Kleistase, Maltazyme, Maxamyl, Thermozyme, Thermatex, Starzyme HT 120 L, Starzyme Super Conc, y Ultraphlo.

[0033] La presente invención también se refiere a:

25 El uso, en el pienso para animales de la subfamilia Bovinae, de una amilasa bacteriana, donde la amilasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEC ID n.º: 2, y por la cual la identidad se determina por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de gap de 10, y una penalización por extensión de gap de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en la alineación; iii) división del número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje;

30 el uso de una amilasa bacteriana en la preparación de una composición para usar en un pienso para animales de la subfamilia Bovinae, donde la amilasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEC ID n.º: 2, y por la cual la identidad se determina por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de gap de 10, y una penalización por extensión de gap de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en la alineación; iii) división del número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje;

35 composiciones de aditivo de pienso que comprenden dicha amilasa, junto con al menos un ingrediente adicional seleccionado de vitaminas y/o minerales; y

40 una composición (por ejemplo una composición de pienso) que comprende una amilasa bacteriana junto con al menos un ingrediente adicional seleccionado de heno, forraje, fibra alimentaria, y/o concentrado de pienso, donde la amilasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEC ID n.º: 2, y por la cual la identidad se determina por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de gap de 10, y una penalización por extensión de gap de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en la alineación; iii) división del número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje.

45 [0034] Preferiblemente, el uso en pienso es (i) para mejorar la producción de leche, el aumento de peso, y/o el índice de conversión del alimento; (ii) para mejorar la producción de leche, la digestibilidad aparente, y/o la desaparición de materia seca de pienso que utiliza el método de la bolsa de nylon; (iii) en combinación con celulosa.

50 El uso de (iii) puede ser (iv): para mejorar la producción de leche y/o el espesor de la grasa dorsal.

55 [0035] Preferiblemente, el aditivo de pienso comprende una celulosa.

Más preferiblemente el aditivo de pienso es una premezcla, tal como una premezcla mineral, una premezcla vitamínica, o una premezcla que incluye tanto vitaminas como minerales.

60 [0036] La composición de pienso preferiblemente comprende además una celulosa.

La composición de pienso puede ser un concentrado enriquecido con amilasa, una Ración Total Mezclada enriquecida con amilasa, y/o puede comprender maíz y/o sorgo, preferiblemente maíz.

65 [0037] El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia de la invención"; por ejemplo los aminoácidos 1-481 de la SEC ID n.º: 2 y una secuencia de aminoácidos diferente ("secuencia foránea") se calcula como el número de coincidencias exactas en una alineación de las dos secuencias,



Preferiblemente, un fragmento contiene al menos 450 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 460 residuos de aminoácidos, aún más preferiblemente al menos 470 residuos de aminoácidos, y de la forma más preferible al menos 480 residuos de aminoácidos.

Fragmentos preferidos adicionales contienen al menos 481, 483, 484, o al menos 513 residuos de aminoácidos.

5 Ejemplos de fragmentos enzimáticamente activos de la amilasa de la SEC ID nº 2 son las secuencias con aminoácidos 1-481, 1-484, y 1-486 de la misma.

10 [0049] Una variante puede ser una variante conservadora que comprende una sustitución, delección, y/o inserción conservadora de uno o varios aminoácidos, por ejemplo inserciones pequeñas de sustituciones que no afectan significativamente el plegamiento y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas o extensiones amino o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación al cambiar la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

15 Los ejemplos de sustituciones conservadoras están en 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).

20 [0050] Ejemplos no limitativos de variantes conservadoras de las amilasas de la invención incluyen (extensiones) de inserciones amino-terminales pequeñas, por ejemplo de 1 o 2 residuos de aminoácidos, tales como Ala, o Ala-Ala.

[0051] De forma alternativa, una variante puede incorporar cambios aminoácidos de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se ven alteradas.

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

[0052] El número total de sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos, en cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente es 40, 38, 36, 35, 32, 30, 25, 20, o 15 - como máximo.

30 Preferiblemente, el número total de sustituciones, delecciones y/o inserciones es como máximo de 10, preferiblemente 9, más preferiblemente 8, más preferiblemente 7, más preferiblemente como máximo 6, más preferiblemente como máximo 5, más preferiblemente 4, aún más preferiblemente 3, de la forma más preferible 2, e incluso de la forma más preferible 1.

35 [0053] En una forma de realización particular, la amilasa para uso según la invención es de granulación estable, y/o termoestable.

La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de una enzima es una medida de su termoestabilidad.

La amilasa de la invención puede tener una  $T_m$  de al menos 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81 °C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91 °C, 92°C, 93°C, 94°C o al menos 95°C, determinada según una Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

40 La DSC se realiza en un tampón de 10 mM de fosfato sódico, 50 mM de cloruro sódico, pH 7.0.

La tasa de barrido es constante, por ejemplo 1,5°C/min.

El intervalo escaneado puede ser de 20 a 100°C.

Otro tampón se puede seleccionar para el escaneado, por ejemplo un tampón de pH 5.0, 5.5, 6.0, o pH 6.5.

45 En otras formas de realización alternativas, una tasa de barrido más alta o inferior puede ser utilizada, por ejemplo una inferior a 1,4°C/min, 1,3°C/min, 1,2°C/min, 1,1°C/min, 1,0°C/min, o 0,9°C/min.

[0054] La amilasa para usar en la invención puede tener una actividad a pH 7.0 y 37°C de al menos 35% en relación a la actividad a pH óptimo y a 37°C.

50 Preferiblemente, la actividad a pH 7.0 y 37°C es al menos 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, o al menos 75% de la actividad a pH óptimo y 37°C (cf. Tabla 6 del Ejemplo 6).

[0055] La amilasa de la invención puede tener una actividad a pH 7.0 y 37°C y en presencia de 5 mM de sales biliares de al menos 25% en relación a la actividad a pH óptimo y 37°C en ausencia de sales biliares.

55 Más preferiblemente, la actividad a pH 7.0 y 37°C y en presencia de 5mM de sales biliares es al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, o al menos 65% de la actividad a pH óptimo y 37°C en ausencia de sales biliares (cf. Tabla 7 del Ejemplo 6).

60 [0056] Además, la actividad específica de la amilasa de la invención, a pH 7.0 y 37°C, puede ser al menos 10%, más preferiblemente al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, o al menos 70%, en relación a la actividad específica de la amilasa de TERMAMYL SC a pH 5.0 y 37°C (cf. Tabla 8 del Ejemplo 6).

65 [0057] La actividad específica de la amilasa de la invención, a pH 7.0 y 37°C y en presencia de 5 mM de sales biliares, puede ser al menos 10%, más preferiblemente al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, o al menos 75%, en relación a la actividad específica de la amilasa de TERMAMYL SC a pH 5.0 y 37°C y en presencia de 5 mM de sales biliares (cf. Tabla 9 del Ejemplo 6).

[0058] Las actividades a las que se hace referencia en las formas de realización preferidas anteriores pueden adecuadamente ser determinadas utilizando un ensayo de azúcar reductor, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 6, que usa preferiblemente maíz ceroso como sustrato.

5 Un procedimiento detallado se describe en el Ejemplo 6.

[0059] La amilasa para uso según la invención puede ser estable en presencia de proteasa.

Ejemplos de proteasas son las proteasas digestivas, y proteasas de pienso tales como las proteasas descritas en, por ejemplo, WO 01/58275, WO 01/58276, WO 2004/111220 2004/111221, WO 2004/072221, y WO 2005/035747.

10 Ejemplos de proteasas digestivas son la pancreatina y la pepsina.

La estabilidad de proteasa se puede determinar incubando 0,5 mg de enzima de proteína de amilasa purificada/ml en un tampón a un pH deseado (por ejemplo pH 3, 4, o 5), durante el tiempo deseado (por ejemplo 30, 45, 60, 90, o 120 minutos) en presencia de proteasa (por ejemplo pepsina, 70 mg/l), y luego aumentando el pH al pH deseado (por ejemplo pH 4, 5, 6, o 7) y midiendo la actividad residual usando por ejemplo el ensayo de azúcar reductor del Ejemplo 6 del presente documento.

15 La actividad de amilasa residual es preferiblemente de al menos 20%, preferiblemente al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, o al menos 90% en relación al control (una muestra no tratada con proteasa).

[0060] La amilasa de la invención se puede utilizar en combinación con una celulasa.

20 El término "en combinación con" incluye en particular casos en los que las dos enzimas están activas y ejercer su efecto de forma simultánea o solapándose en el tiempo, preferiblemente de forma simultánea, pero también puede incluir la acción de las enzimas una a una.

[0061] En el presente contexto, una celulasa es una enzima que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, liquenina y beta-D-glucanos de cereal.

25 Otros nombres son, por ejemplo, endo-1,4-beta-D-glucanasa; beta-1,4-glucanasa; y beta-1,4-endoglucanohidrolasa.

El nombre sistemático es 1,4-(1,3,1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa.

En una forma de realización preferida, la celulasa de la invención es, o, se puede clasificar como EC 3.2.1.4 (Enzyme Nomenclature 1992, véase anteriormente).

30

[0062] La actividad de celulasa se puede determinar mediante cualquier ensayo adecuado.

Generalmente, el pH de ensayo y la temperatura de ensayo se pueden adaptar a la enzima en cuestión.

Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12.

Ejemplos de temperaturas de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, o 95°C.

35 Los valores de pH y temperaturas preferidos están dentro del rango fisiológico, tales como valores de pH de 3, 4, 5, 6, 7, o 8, y temperaturas de 30, 35, 37, o 40°C.

[0063] Una celulasa preferida es derivada de una cepa de *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma reesei*, más preferiblemente la celulasa CELLUCLAST (o un componente de celulasa de la misma) que está comercialmente disponible de Novozymes A/S.

40 Ejemplos de componentes de celulasa son la celobiohidrolasa I y II (CBHI; CBHII), al igual que la endoglucanasa I y II (EGI, EGII).

El término "derivada de" se interpreta como se describe anteriormente (sección de amilasa) e incluye celulasas de tipo salvaje, así como variantes y fragmentos de las mismas.

45

[0064] En el presente contexto, un animal de la subfamilia Bovinae (también llamados bovinos, o animales bovinos) significa un animal del reino Animalia, del filo de los cordados, de la clase de los mamíferos, el orden de los artiodáctilos, y de la familia Bovidae.

[0065] Esta subfamilia biológica incluye aproximadamente 24 especies de ungulados de tamaño mediano a grande, incluyendo ganado bovino doméstico, bisonte, búfalo de agua, el yac, y los antílopes de cuatro cuernos y con cuernos en espiral.

Las características generales incluyen una pezuña hendida y normalmente que al menos uno de los sexos de una especie tenga un cuerno real.

50

[0066] Los géneros preferidos incluyen *Tetracerus*, *Boselaphus*, *Bubalus*, *Bos*, *Pseudoryx*, *Syncerus*, bisonte, *Tragelaphus*, y *Taurotragus*.

Un género más preferido es *Bos*, que incluye las especies de uro (*Bos primigenius*, extinguido), Banteng (*Bos javanicus*), Gaur (*Bos frontalis*), yac (*Bos mutus*), ganado bovino doméstico (*Bos taurus*, *Bos indicus* (hoy frecuentemente contado como *B. primigenius*), y Kouprey (*Bos sauveli*).

60 Para los fines presentes, las especies más preferidas son las de ganado bovino doméstico.

Para los fines presentes, el término incluye todas las razas de ganado bovino doméstico, y todos los tipos de ganado bovino de producción, en particular vacas lecheras y ganado bovino para carne.

65 [0067] Los bovinos son rumiantes, que se caracterizan por tener una capacidad de fermentación adicional en comparación con animales monogástricos.

Por ejemplo, las vacas y las ovejas tienen tres preestómagos antes del abomaso.

El más importante funcionalmente es el rumen, que sirven como cámara para el almacenamiento y la fermentación de pienso.

5 Los procesos de fermentación son llevados a cabo por una flora grande y compleja de microorganismos anaeróbicos (bacterias, protozoos y hongos).

Estos puede degradar el material de pared celular además de la proteína y el almidón, permitiendo así al animal rumiante ingerir y beneficiarse de material de pienso que de otro modo no se degradaría en el abomaso o intestino delgado.

10 Este incluye por ejemplo heno, otros forrajes y forrajes conservados en silos ricos en material de pared celular.

[0068] Los productos de la fermentación en el rumen son ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que sirven como una fuente de energía primaria en rumiantes, y gases tales como el metano y dióxido de carbono.

15 En los sistemas de rumen in vitro, el volumen de producción de gas es por lo tanto frecuentemente tomado como una medida de la fermentabilidad de un pienso dado, y una producción de gas aumentada in vitro se toma como una medida de una degradación de pienso mejorada y de una disponibilidad de energía aumentada.

La mayoría de los sistemas in vitro incluyen el uso de líquido ruminal recién extraído, típicamente de oveja o vacas.

[0069] La producción de leche óptima requiere una toma de energía suficiente y, por lo tanto, la utilización de pienso preferiblemente bueno por las vacas lecheras.

20 Lo mismo es aplicable para obtener un aumento de peso óptimo de ganado bovino para carne.

[0070] Se contempla que las amilasas para uso según la invención mejoran la degradación de almidón dietético en el rumen, en particular almidón lentamente degradable (tal como el almidón de maíz que no está termotratado y/o contiene partículas grandes, o el almidón de patata), aportando así más energía a los microorganismos del rumen y al propio rumiante (en forma de ácidos grasos de cadena corta).

25 [0071] Se contempla igualmente que las amilasas para uso según la invención mejoran la degradación en el intestino delgado del almidón de derivación (es decir, almidón que pasa el rumen y llega al intestino delgado) y/o aumentan la absorción de glucosa, ahorrando así energía al minimizar la degradación microbiana en el intestino grueso y la excreción de almidón en las heces.

30 [0072] Se contempla que la degradación de almidón mejorada observada proporcionará más energía a los bovinos e incrementará así la producción de leche o el aumento de peso.

35 [0073] En el uso de una amilasa bacteriana de la invención, en referencia al Ejemplo 2 del presente documento, la producción de gas media (GP) es al menos 0,9 ml, utilizando el método HFT modificado del Ejemplo 1 del presente documento y utilizando TMR como sustrato. Esto es así sea cual sea la dosis de la amilasa, preferiblemente una dosis óptima, determinada mediante el mismo método.

40 [0074] Preferiblemente, la producción de gas media (determinada como se describe arriba) es de al menos 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 o al menos 3,5 ml.

45 [0075] Como se puede ver en el Ejemplo 2, las amilasas fúngicas dieron lugar a una producción de gas de bastante por debajo de 0,9 ml.

Esto significa que las amilasas fúngicas aparentemente no hacen que el almidón desaparezca en el rumen.

Esta observación es confirmada por Tricarico et al (Animal Science 2005,81: 365-374), que observó lo mismo en vacas lecheras lactantes y novillos con cánula ruminal cuyo pienso fue suplementado con AMAIZE (véase el resumen).

50 [0076] El hecho de que la producción de gas observada aumentada por las amilasas bacterianas de la invención en realidad se traduce en una degradación mejorada del almidón puede verse en el Ejemplo 4.

55 [0077] Así, en referencia al ejemplo 4, las amilasas bacterianas para uso según la invención son capaces de reducir la cantidad de almidón residual, utilizar el método HFT modificado del ejemplo 1 con TMR como sustrato e incubación durante 4 horas, en comparación con un control sin amilasa exógena. El almidón residual se puede determinar como se describe en el Ejemplo 4.

60 [0078] Las amilasas bacterianas para uso según la invención degradan el almidón al menos parcialmente ya en el rumen de los animales bovinos.

[0079] La producción media de gas de al menos 0,9 ml a la que se hace referencia anteriormente se traduce en una degradación de al menos 5% del almidón presente en el sustrato.

65 Por consiguiente, la amilasa bacteriana para uso según la invención degrada preferiblemente al menos 5% (p/p) del almidón del sustrato (o dieta, o composición de pienso), más preferiblemente al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,14 o al menos 15% del almidón, correspondiendo el último porcentaje con la producción de gas media de 1,8 ml.

Así, la amilasa puede degradar al menos 20, 22, 24, 26, 28 o al menos 30% del almidón.  
Un sustrato preferido es TMR, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 1.

5 [0080] Para los fines presentes, una producción de leche mejorada significa cualquiera de los siguientes: (i) un volumen aumentado de la producción de leche al día (l/día); (ii) un peso aumentado de la producción de leche al día (kg/día); (iii) una proporción aumentada de kg de leche producidos en relación a la toma de materia seca en kg al día (kg de leche/kg de DMI); (iv) un peso aumentado de la grasa láctea producida al día (kg/día); (v) un peso aumentado de la proteína de la leche producida al día (kg/día); (vi) una producción aumentada del 3,5% de leche corregida en grasa al día (kg/día); y/o (VII) una producción aumentada de sólidos de leche al día, donde el término "sólidos de leche" incluye la cantidad total de lactosa, grasa, proteína, y lactosa.

10 Una producción de leche aumentada también se puede manifestar como (VIII) un peso aumentado de la lactosa producida al día (kg/día), o (ix) un aumento del 4% de leche corregida en grasa al día (kg/día), por ejemplo calculado de la siguiente manera:  $(0,4 \times \text{kg de producción de leche}) + (15 \times \text{kg de grasa láctea})$ .

15 [0081] Una producción de leche aumentada se obtiene, por ejemplo, cuando el contenido de materia seca de la leche aumenta (por ejemplo más grasa o proteína) sin un aumento de volumen concomitante, cuando el volumen aumenta sin un aumento de la materia seca, y cuando el volumen, así como el contenido de materia seca de la leche aumenta.

20 [0082] En particular, en referencia a ejemplo 7 del presente documento,  
(a) la producción de leche diaria (kg/día) aumenta en al menos 1%, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o al menos 9%, con respecto a un control sin amilasa añadida;  
(b) la proporción de producción de leche diaria (kg/día) con respecto a toma de materia seca (DMI) (kg/día) (kg de leche/kg de DMI) se mejora, con respecto a un control sin amilasa añadida, en al menos 1%, preferiblemente en al menos 2, 3, o al menos 4%;  
(c) el peso de la grasa láctea producida al día (kg/día) se mejora, con respecto a un control sin amilasa añadida, en al menos 1%, preferiblemente en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, o al menos 8%;  
(d) el peso de la proteína de la leche producida al día (kg/día) se mejora, con respecto a un control sin amilasa añadida, en al menos 1%, preferiblemente en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o en al menos 9%;  
(e) la producción de 3,5% (o 4%) de leche corregida en grasa al día (kg/día) se mejora, con respecto a un control sin amilasa añadida, en al menos 1%, preferiblemente en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o en al menos 9%; y/o  
(f) la producción de 3,5% (o 4%) de leche corregida en grasa (kg/día) se mejora, con respecto a un control sin amilasa añadida, en al menos 1%, preferiblemente en al menos 2, 3, 4, o en al menos 5%.  
(a)-(f) se refieren preferiblemente a una prueba en vacas como se describe en el párrafo sobre FCR a  
35 continuación.

[0083] El Índice de Conversión del alimento (FCR) es indicativo de la eficacia de la utilización de un pienso. Cuanto más bajo es el FCR, mejor es utilizado el pienso.  
El FCR se puede determinar basándose en una prueba en vacas que comprende un primer tratamiento en el que la amilasa para uso según la invención se añade al pienso para animales en una concentración deseada (por ejemplo, 6 o 30 mg de proteína enzimática por kg de pienso, preferiblemente por kg de materia seca (DM) de pienso), y un segundo tratamiento (control) sin adición de la amilasa al pienso para animales, cada tratamiento consistente en cuatro, o siete, vacas, preferiblemente vacas lecheras, alojadas en un establo, preferiblemente con compartimentos libres, equipados con alimentadores electrónicos Calan gates para la medición del consumo individual de pienso, donde las vacas son alimentadas con una dieta de Ración Total Mezclada, preferiblemente que contiene 50% de concentrado (principalmente compuesto por harina de maíz, harinillas de trigo, grano seco de destilería con solubles, y harina de soja (SBM)), 37% de ensilado de maíz, 7% de henilaje de alfalfa, y 6% de heno de alfalfa, el FCR siendo calculado como el consumo de pienso en kg/vaca (preferiblemente kg de DM/vaca) con respecto a la producción de leche (o alternativamente, el aumento de peso) en kg al día y vaca (alternativamente, kg por vaca, para el aumento de peso) durante un periodo deseado de la prueba (por ejemplo el primer, segundo, tercer, o cuarto periodo de 21 días, o el periodo de 84 días entero), siendo el FCR para el primer tratamiento mejorado en relación al FCR del segundo tratamiento.

Para detalles adicionales, véase el Ejemplo 7.  
En particular, el FCR es mejorado (es decir reducido) en comparación con el control en al menos 1,0%, preferiblemente al menos 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, o al menos 2,5%.  
En otras formas de realización particulares, el FCR es mejorado (es decir reducido) en comparación con el control en al menos 2,6%, 2,7%, 2,8%, 2,9%, o al menos 3,0%.  
Todavía más, el FCR es mejorado (es decir reducido) en comparación con el control en al menos 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, 3,5%, 3,6%, 3,7%, o al menos 3,8%.  
60 En la alternativa, la mejora es relativa a un grupo de control que recibe la amilasa AMAIZE en una dosis de 240 DU/kg de materia seca de TMR.

[0084] Un aumento de peso mejorado significa un aumento de peso diario semanal, bisemanal, o mensual mejorado (en g o kg durante el período de tiempo pertinente) con respecto a un control sin amilasa añadida.  
65 Esto se determina preferiblemente con una prueba tal y como como se describe anteriormente en el párrafo sobre FCR.

[0085] En particular, la amilasa de la invención puede mejorar la digestibilidad aparente del pienso (por ejemplo, en comparación con un control sin amilasa).

En particular, la amilasa de la invención mejora la digestibilidad de materia seca, la digestibilidad de fibra detergente neutro, y/o la digestibilidad de materia orgánica.

La amilasa de la invención, además, puede mejorar la digestibilidad de almidón, y/o la digestibilidad de proteína bruta.

Por ejemplo, la amilasa de la invención mejora la digestibilidad de materia seca (i) en al menos 1%, más preferiblemente en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o en al menos 9%; (ii) la digestibilidad de fibra detergente neutro en al menos 2%, más preferiblemente en al menos 4, 5, 10, o en al menos 20%, incluso más preferiblemente en al menos 25, 30 o en al menos 35%; (iii) la digestibilidad de materia orgánica en al menos 1%, más preferiblemente en al menos 2, 3, o en al menos 4%, incluso más preferiblemente en al menos 5, 6, o en al menos 7%; la digestibilidad de almidón (iv) en al menos 1%, más preferiblemente en al menos 2%; y/o (v) la digestibilidad de proteína bruta en al menos 1%, más preferiblemente en al menos 2, 3, 4, 5, o al menos 6%.

[0086] La digestibilidad aparente tal y como se describe anteriormente se puede determinar basándose en una prueba en vacas que comprende un primer tratamiento en el que la amilasa para uso según la invención se añade al pienso para animales en una concentración deseada (por ejemplo, 6 o 30 mg de proteína enzimática por kg de pienso), y un segundo tratamiento (control) sin adición de la amilasa al pienso para animales, cada tratamiento consistente en seis vacas, por ejemplo macho o hembra, preferiblemente vacas lecheras, alojadas en un establo, preferiblemente con compartimentos libres, equipados con alimentadores electrónicos Calan gates para la medición del consumo individual de pienso, donde las vacas son alimentadas con una dieta de TMR o de Ración Total Mezclada, preferiblemente que contiene 50% de concentrado (principalmente compuesto por harina de maíz, harinillas de trigo, grano seco de destilería con solubles, y harina de soja, 37% de ensilado de maíz, 7% de henilaje de alfalfa, y 6% de heno de alfalfa, en una cantidad que corresponde con la toma media diaria en la última semana del periodo 4 (de los cuatro periodos de 21 días) durante 8 días adicionales, recogiendo, desde el día 5 hasta el 8, muestras fecales al azar (de aproximadamente 300 g) a través de palpación rectal cada 8 h (preferiblemente el momento de la toma de muestras fue aumentado en 1 hora cada día) hasta que se recogió un total de 12 muestras para cada vaca, tomando muestras de TMR (de cada grupo) y de pienso sobrante (para cada vaca) diario, juntando las muestras fecales, de TMR, y de pienso sobrante (respectivamente, para cada vaca), secándolas durante 48 h en un horno de aire forzado a 60°C, triturando las mezclas a través de un tamiz de 1-mm, analizando la materia seca (DM), fibra detergente ácido (FDA) y fibra detergente neutro (FDN), por ejemplo como se describe por Goering, H.K., vana Soest, P.J., 1970, en Agriculture Handbook No. 379, analizando las muestras en busca de nitrógeno (N) (por ejemplo, utilizando un analizador Elementor Vario Max CN Analyzer), y de contenido de ceniza (600°C en un horno de mufla durante 5 h), que usa FDN indigerible como marcador para calcular la digestibilidad aparente del tracto total.

Preferiblemente, la FDN indigerible se determina después de 120 horas de incubación de rumen in vitro (Goering y Van Soest, 1970) utilizando una incubadora Daisy-II (Ankom Technology, Macedon, NY, US) y líquido ruminal de una vaca alimentada con la dieta de control.

Para más detalle, véase el Ejemplo 8 y la Tabla 11.

[0087] La amilasa de la invención puede mejorar la digestibilidad aparente del tracto total de la fibra bruta, proteína bruta, materia orgánica, y/o grasa bruta (por ejemplo, en comparación con un control sin amilasa).

Por ejemplo, la amilasa de la invención mejora la digestibilidad aparente de fibra bruta (i) en al menos 1%, más preferiblemente en al menos 2, o en al menos 3%; (ii) de proteína bruta en al menos 1%; (iii) de materia orgánica en al menos 1%, más preferiblemente en al menos 2 o en al menos 3%; y/o de grasa bruta (iv) en al menos 1%, más preferiblemente en al menos 2, 3, 4, o en al menos 5%.

[0088] Las digestibilidades aparentes del tracto total se pueden determinar basándose en un estudio en vacas in vivo con tres vacas no lactantes (Holstein alemanas), y dos tratamientos, en concreto la adición de 50 mg de proteína enzimática (EP) por kg de materia seca (DM), y un control sin enzima.

La enzima se añade a la ración diaria (por ejemplo, una TMR consistente en 44% de ensilado de maíz, 18% de ensilado de hierba, 9% de heno y 29% de concentrado a base de maíz).

Las vacas son preferiblemente mantenidas en un establo con compartimentos con aire acondicionado (20°C) sobre estereras de goma con alimentación individual y libre acceso al agua.

El experimento puede durar 2 periodos de 25 días cada uno (en total 50 días); en cada periodo los primeros 14 días fueron usados para la adaptación y los siguientes 11 días para la obtención de muestras.

Cada vaca se alimenta preferiblemente con 5,5 kg (DM) de TMR al día a las 7:00 h y a las 16:00 h y con 0,5 kg (DM) de heno dos horas después de la alimentación de la mañana.

Además, preferiblemente se administran 100 g/d de una premezcla mineral.

Del día 22 hasta el 25, se recogen muestras fecales al azar (de aproximadamente 200 g) de cada vaca mediante palpación rectal a las 8:30 h.

Se puede utilizar TiO<sub>2</sub> como marcador para calcular la digestibilidad aparente del tracto total.

Como es usual en la técnica, la DM se puede determinar por secado a 105°C hasta que no haya más pérdida de peso, normalmente durante 24 horas.

Para más detalles, véase el Ejemplo 9 y la Tabla 16.

[0089] Además, la amilasa de la invención puede mejorar la desaparición de la materia seca (DM) de los piensos durante la incubación en bolsas de nylon, por ejemplo de piensos tales como grano de maíz, cebada, ensilado de maíz, y/o TMR.

5 Por ejemplo, la desaparición de DM de grano de maíz, cebada, ensilado de maíz, y TMR después de un período de incubación de 2 horas es al menos 1% (preferiblemente al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30 o al menos 35%), al menos 1% (preferiblemente al menos 2, 4, 6, 8 o al menos 10%), al menos 1% (preferiblemente al menos 2, o al menos 3%), y al menos 1% (preferiblemente al menos 2, o al menos 3%), respectivamente.

10 Como otro ejemplo, la desaparición de DM de grano de maíz, cebada, ensilado de maíz, y TMR después de un período de incubación de 4 horas es al menos 1% (preferiblemente al menos 5, 10, 15, 20, 25, o al menos 26%), al menos 1% (preferiblemente al menos 2, 4, o al menos 6%), al menos 1% (preferiblemente al menos 2, o al menos 3%), y al menos 1% (preferiblemente al menos 2, o al menos 3%), respectivamente.

15 Como otro ejemplo más, la desaparición de DM de grano de maíz y de cebada después de un período de incubación de 8 horas es al menos 1% (preferiblemente al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30 o al menos 33%), al menos 1% (preferiblemente al menos 2%), respectivamente.

[0090] La desaparición de materia seca del pienso se puede determinar en una prueba in vivo como se ha descrito anteriormente (bajo digestibilidad aparente de tracto total), y utilizando la técnica de la bolsa de nylon ampliamente conocida a la que se hace referencia y la cual se describe con más detalle en el Ejemplo 9.

20 Para más detalles, véase el Ejemplo 9 y las Tablas 12-15.

[0091] En otras formas de realización, la amilasa de la invención en combinación con celulasa (i) mejora la producción de leche (kg/d), preferiblemente en la fase de lactancia temprana (por ejemplo del día 1 al 14 después del parto), más preferiblemente sin cambios en la composición de la leche; y/o (ii) mejora el espesor de la grasa dorsal, preferiblemente en o después del día 140 después del parto.

25 La producción de leche y el espesor de la grasa dorsal se pueden determinar en una prueba de alimentación in vivo de 9 meses que utiliza dos grupos, cada uno de ellos consistente en por ejemplo 220 vacas lecheras (Holstein alemanas).

Las vacas son preferiblemente alojadas en un establo de cubículos con suelo de rejilla.

30 El periodo experimental incluye preferiblemente tres semanas antes y 20 semanas después del parto.

Las vacas se alimentan (preferiblemente ocho veces al día) con una Ración Total Mezclada (TMR) que o bien no está suplementada con enzimas o bien está suplementada con una dosis adecuada de las enzimas (por ejemplo, amilasa que corresponde a 25 mg de proteína enzimática (EP)/kg de TMR materia seca (DM), y 1.4 ml/kg de TMR de celulasa, o una cantidad similar (EP/kg) en cuanto a la amilasa).

35 Las enzimas se pueden pulverizar sobre la TMR inmediatamente antes de la alimentación.

Los componentes principales de la TMR son ensilado de maíz, ensilado de hierba y concentrado (que se puede mezclar en la granja), y el contenido de materia seca puede ser aproximadamente 50%.

Las vacas son ordeñadas preferiblemente 3 veces al día en una sala de ordeño rotativa.

40 La producción y la composición de leche individuales, así como el espesor de la grasa dorsal se evalúan regularmente durante la prueba.

Para más detalles, véase el Ejemplo 10 y las Figuras 1 y 2.

[0092] Para los fines presentes, los términos pienso y forraje son considerados sinónimos.

45 En cuanto a las composiciones de pienso para bovinos tales como vacas, así como ingredientes de las mismas, la dieta bovina se compone normalmente de una fracción fácilmente degradable (llamada concentrado) y una fracción rica en fibra menos fácilmente degradable (llamada heno, forraje, o fibra alimentaria).

[0093] El heno se fabrica a partir de hierba, leguminosas o cereales integrales secos.

Entre las hierbas se incluyen, entre otros, fleo, raigrases, festucas.

50 Entre las leguminosas se incluyen entre otros el trébol, la lucerna o alfalfa, los guisantes, las alubias y las vicias.

Entre los cereales integrales se incluyen, entre otros, la cebada, el maíz, la avena, el sorgo.

Otros ejemplos de cereales integrales son el trigo y el centeno.

Para los fines presentes, los términos maíz y choclo son considerados sinónimos.

Otras plantas de cultivo de forraje incluyen la caña de azúcar, las coles, colzas y repollos.

55 Otras plantas de cultivo de raíces tales como nabos, colinabos, remolachas forrajeras, remolachas de pienso, y remolachas azucareras (incluyendo la pulpa de remolacha azucarera y la melaza de remolacha) se utilizan para alimentar a los rumiantes.

Otras plantas de cultivo son los tubérculos tales como las patatas, la mandioca y el boniato.

60 El ensilado es una versión ensilada de la fracción rica en fibra (por ejemplo de hierbas, leguminosas o cereales integrales, la planta entera o solo parte de la misma, por ejemplo el maíz) por la cual un material con un contenido elevado de agua se trata con un proceso de fermentación anaeróbica controlada (fermentado naturalmente o tratado con aditivos).

[0094] El concentrado está compuesto en gran medida por cereales (tales como la cebada, incluyendo bagazo de cerveza y residuos de destilería, maíz, trigo, sorgo, avena, y/o centeno), pero también contienen frecuentemente ingredientes de pienso ricos en proteínas, como la semilla de soja (preferiblemente harina de soja), semilla de colza,

65

nuez de palma, semilla de algodón y girasol.

[0095] Las vacas también pueden ser alimentadas con una Ración Total Mezclada (TMR), en la que todos los componentes dietéticos, por ejemplo forraje, concentrado de ensilado, y premezclas (por ejemplo minerales, vitaminas) se mezclan antes de servirse.

[0096] En referencia al Ejemplo 3, en una forma de realización particular, la composición de pienso de la invención incluye TMR, concentrado, maíz, cebada, centeno, trigo, avena, y/o patatas.

En una forma de realización preferida, la composición de pienso comprende al menos uno de entre maíz y sorgo (o incluye maíz y/o sorgo), más preferiblemente maíz.

Los términos como "maíz", "cebada", "patatas" etc. incluyen plantas enteras y partes de las mismas, al igual que varias preparaciones y sustancias derivadas de las mismas, incluyendo entre otros hojas, flores, tallos, raíces, frutas, semillas, granos, harina, y almidón.

Además, estas partes de planta se pueden utilizar como tales (en su forma natural), secas, molidas, impregnadas, o como ensilado (lista no limitativa).

[0097] En otras formas de realización particulares, la composición de pienso de la invención es un concentrado enriquecido con amilasa o una Ración Total Mezclada (TMR) enriquecida con amilasa, donde la amilasa es una amilasa bacteriana para uso según la invención, como se describe anteriormente.

El concentrado puede ser granulado, y la amilasa se puede añadir antes o después de la granulación.

El concentrado también puede ser un concentrado de pulpa.

La amilasa para uso según la invención puede además ser añadida en cualquier otro ingrediente composición de pienso, por ejemplo mezclada, o como un abono de cobertura, o se puede incluir en un aditivo de pienso, por ejemplo mediante una premezcla como se describe a continuación.

[0098] La composición de aditivo de pienso de la invención comprende, además de la amilasa para uso según la invención como se describe anteriormente, al menos un ingrediente adicional seleccionado de entre vitaminas y minerales.

Por ejemplo, el aditivo de pienso de la invención puede incluir (i) al menos una vitamina, (ii) al menos un mineral, o (iii) al menos una vitamina y al menos un mineral.

[0099] La al menos una vitamina puede ser liposoluble o hidrosoluble.

Algunos ejemplos de vitaminas liposolubles son la vitamina A, la vitamina D3, la vitamina E, y la vitamina K, por ejemplo la vitamina K3.

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

[0100] El al menos un mineral puede ser un macromineral y/o un oligoelemento.

Algunos ejemplos de oligoelementos son el manganeso, el zinc, el hierro, el cobre, el yodo, el selenio, y el cobalto.

Algunos ejemplos de macrominerales son el calcio, el fósforo y el sodio.

[0101] Las premezclas son términos reconocidos en la técnica para ciertos aditivos alimenticios. Pueden ser sólidas o líquidas.

Una premezcla mineral es una composición destinada a ser añadida a pienso para animales y que comprende tipos y cantidades de minerales deseados, en particular oligoelementos.

Una premezcla vitamínica es una composición destinada a ser añadida a pienso para animales y que comprende tipos y cantidades de vitaminas deseados.

Algunas premezclas incluyen tanto vitaminas como minerales.

Un ejemplo de tal premezcla combinada para vacas se incluye en Ejemplo 12 del presente documento.

[0102] La presente invención también es descrita mediante los ejemplos siguientes que no deberían ser interpretados como una limitación del ámbito de la invención.

## Ejemplos

[0103] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

Ejemplo 1: Test de valor de forraje de Hohenheim (HFT) modificado

[0104] El Test de valor de forraje de Hohenheim (HFT) es descrito por Menke et al. (1979), J. Agric. Sci. Camb. 93,217-222: "The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro", por Steingass, H. (1983): "Bestimmung des energetischen Futterwertes von wirtschaftseigenen Futtermitteln aus der Gasbildung bei der Pansensaftfermentation in vitro" Hohenheim Universität, Fak. Agrarwiss. Dissertation, y por Steingass et al. en Tierernährung 14; págs 251-270 (1986): "Schätzung des energetischen Futterwertes aus der in vitro mit Pansensaft bestimmten Gasbildung und

der chemischen Analyse. 1. Untersuchungen zur Methode "Übers". Su propósito principal es estimar la energía neta para la lactancia en piensos para la producción de leche en base a la producción de gas.

5 [0105] La presente versión modificada de esta prueba fue usada para evaluar el efecto de las enzimas exógenas en un sistema ruminal in vitro.

[0106] En resumen, el sustrato de pienso fue pesado en una jeringa de vidrio junto con una composición de líquido ruminal y una mezcla apropiada de tampones.

10 La jeringa de vidrio fue cerrada con un pistón móvil ajustado pero que permitía aumentar el volumen del gas producido.

La jeringa fue incubada a 39°C durante 4h.

La cantidad de gas producida fue medida e introducida en una fórmula para su conversión (véase la fórmula en el Ejemplo 2).

15 Reactivos

[0107] Solución del elemento de masa:

6,2 g de dihidrógeno fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

0,6 g de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

20 9 ml ácido fosfórico concentrado (1 mol/l)

disuelto en agua destilada hasta 1 l (pH de aproximadamente 1.6)

[0108] Solución tampón:

35,0 g de hidrogenocarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )

25 4,0 g de bicarbonato de amonio ( $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ )

disuelto en agua destilada hasta 1 l

[0109] Solución de oligoelemento:

13,2 g de cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

30 10,0 g de cloruro de manganeso (II) tetrahidratado ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

1,0 g cloruro de cobalto (II) hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

8,0 g cloruro de hierro (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

disuelto en agua destilada hasta 100 ml

35 [0110] Solución de sal de sodio:

100 mg de sal de sodio

disuelta en agua destilada hasta 100 ml

[0111] Solución de reducción:

40 Primero se añadieron 3 ml de hidróxido de sodio ( $c = 1 \text{ mol/l}$ ), y luego 427,5 mg de sulfuro de sodio hidratado ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) a 71,25 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . La solución fue preparada poco antes de ser añadida a la solución del medio

[0112] Tampón de enzima:

10,88 g de acetato de sodio trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

45 5,88 g de cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

0,1 g de ASB (albúmina de suero bovino)

disuelta en agua destilada hasta 2 l, con ácido acético ajustado a pH = 5,8

[0113] Equipo:

50 Jeringa (inyección de vidrio, 100 ml, 1/1 graduada con base capilar)

Un tubo de silicio (para cada pieza de jeringa de aproximadamente 50 mm), que fue colocado sobre la base capilar y se puede cerrar con una abrazadera

Rotor con generador para 65 jeringas, aproximadamente 1 rotación por minuto

Incubadora con ventilador (precisión  $+0,5^\circ\text{C}$ , tamaño mínimo interior: 70 cm\*70 cm\*50 cm)

55 Una balanza de precisión o analítica

Una bomba de succión (por ejemplo, una bomba de aire manual adaptada para motocicletas) para eliminar el contenido del rumen, válvula de retorno, matraz de lavado

Botella de alimentación (2 l) con tapón para recopilar líquido ruminal

Bombona de gas con válvula técnica de dióxido de carbono y de reducción

60 Equipo para llenar el líquido ruminal, consistente en: una pipeta semi automática (50 ml), una botella de Woulff (2 l), un agitador magnético, un termostato con bomba de circulación y un bol de PVC (10 l)

Procedimiento

65 [0114] Sustrato: el sustrato (pienso) era Ración Total Mezclada (TMR) compuesta de 44% de concentrado estándar (disponible comercialmente de la Universidad de Hohenheim, Institut für Tierernährung), 6% de heno estándar

(disponible comercialmente de la Universidad de Hohenheim, Institut für Tierernährung), 37% de ensilado de maíz y 13% de ensilado de hierba, ambos secados a 65°C (ambos ensilados procedían de una granja en Village-Neuf, St. Louis Cedex, Francia).

5 Todos los ingredientes fueron molidos con un molino de laboratorio a través de un tamiz de 1,5 mm y luego mezclados para formar la TMR.

[0115] Pesado de las muestras: pienso con un contenido de materia seca de 400 mg fue pesado con exactitud en cada una de las 36 jeringas. 15 de estas jeringas eran los controles de sustrato, que mostraban de la producción de gas sin el efecto de enzimas.

10 Las 21 jeringas restantes se necesitaron para las muestras enzimáticas (7 jeringas para 1 muestra enzimática).

Después, el pistón, que había sido untado primero con vaselina, fue insertado en la jeringa.

Esto se aplica también a las 28 jeringas restantes, que contienen los 24 ml de solución de medio con líquido ruminal, pero sin ninguna muestra de sustrato.

15 La producción de gas de 7 jeringas representa el valor medio de la producción de gas a partir del líquido ruminal solo.

Las 21 jeringas restantes son los controles enzimáticos sin ningún sustrato.

Cuando el pistón se unta con vaselina, la resistencia de rozamiento de la jeringa se reduce.

Además, la jeringa es impermeable y hermética.

20 Hasta el llenado con líquido ruminal, todas jeringas fueron retenidas en una incubadora a 39°C.

[0116] Preparación de la solución del medio: los componentes fueron mezclados en una botella de Woulff en el siguiente orden:

711 ml de agua

0,18 ml de solución de oligoelemento

25 355,5 ml de solución tampón

355,5 ml de solución del elemento de masa

[0117] La solución completada fue calentada hasta 39°C (al baño maría o en caja de PVC con termostato) y fue mantenida homogénea por un agitador magnético.

30 Primero, se añadieron 183 ml de solución de sal de sodio.

Durante todo el proceso, la solución del medio fue fumigada con CO<sub>2</sub> con una manguera sumergida.

A 36°C, se añadió toda la solución de reducción.

El indicador cambió de azul a rojo a incoloro.

Se añadió el líquido ruminal cuando el indicador se volvió incoloro.

35 El gaseado con CO<sub>2</sub> continuó, primero con una manguera sumergida durante 15 minutos, durante el llenado de las jeringas la manguera fue elevada para mantener el líquido saturado con CO<sub>2</sub>.

[0118] Extracción del líquido ruminal: antes de alimentar a los animales del experimento (principalmente ovejas fistuladas, ocasionalmente vacas) por la mañana, el líquido ruminal fue extraído en una botella de alimentación precalentada de 2 l, que fue usada como un vaso de recogida.

40 El líquido ruminal fue tamizado utilizando una bolsa de lino tejida holgadamente, y transferido con cuidado al termo, y se tuvo cuidado para extraer el aire durante el transporte al laboratorio. 750 ml de líquido ruminal se añadieron a aproximadamente 1400 ml de solución del medio bajo agitación continua y gaseado con CO<sub>2</sub>.

45 [0119] Llenado de las jeringas: las enzimas para ser evaluadas fueron diluidas en una relación determinada al tampón enzimático.

La enzima fue añadida en la jeringa correspondiente en solución de exactamente 0,4 ml, por lo que la solución enzimática debe cubrir el sustrato completamente.

50 Después de la que mezcla de la solución del medio y líquido ruminal estuviera homogeneizada, se introdujeron 24 ml con una pipeta semiautomática en cada jeringa, que había sido calentada antes hasta 39°C en la incubadora.

Esta representa un volumen de 18 ml de solución del medio y 6 ml de líquido ruminal.

Después, se eliminaron todas las burbujas por agitación moderada.

Simultáneamente, todas las aglomeraciones de pienso se rompieron de esta manera.

55 Después del cierre de la abrazadera, el volumen exacto del líquido sin ninguna fase gaseosa fue registrado en el nivel del pistón.

Las jeringas fueron puestas directamente en el rotor de una incubadora precalentada (39°C).

[0120] Incubación y determinación del volumen de gas: durante la incubación, las jeringas deben permanecer en una posición horizontal dentro del rotor.

60 La transmisión debería ser ajustada a una rotación por minuto.

Durante la incubación, la temperatura dentro de la incubadora debería ser mantenida a 39°C + 0,5°C. Después de cuatro horas, la incubación terminó.

La formación de gas fue medida mediante la lectura precisa de la posición del pistón en la escala de calibración.

Además, se controló por rotación cuidadosa que el pistón no se había bloqueado.

65 A través de la interpolación entre dos líneas de escala, se puede alcanzar una exactitud de lectura de hasta + 0,5 ml.

Ejemplo 2: prueba de amilasas in vitro

[0121] Un cierto número de amilasas bacterianas, y, para la comparación, tres amilasas fúngicas, fueron evaluadas en el modelo de rumiante in vitro del Ejemplo 1.

5 Cada experimento fue repetido un determinado número de veces ("n").

[0122] Las siguientes amilasas fueron obtenidas de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36,2880 Bagsvaerd, Dinamarca: STAINZYME 12L, TERMAMYL SC L, NATALASE 200L, DURAMYL 300 L DX, y FUNGAMYL 800L.

10 Las amilasas VALIDASE BAA y VALIDASE FAA fueron obtenidas de Valley Research Inc., 3502 North Olive Road, South Bend, IN 46628, US.

La amilasa AMAIZE se obtuvo de Alltech (Alltech International Head-quarters, 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356, US).

[0123] Los resultados se muestran en la Tabla 1 que aparece a continuación como Producción de Gas Media (GP).

15 La GP se da en figuras absolutas, así como en % en comparación a un control sin adición de enzimas exógenas (ml / %).

Para corregir a causa del gas producido a partir del sustrato disponible en las preparaciones enzimáticas (por ejemplo proteína y las sustancias de formulación tales como glucosa o sacarosa), se incubaron muestras de control enzimáticas que contenían enzimas y líquido ruminal pero no el sustrato de pienso en el sistema HFT.

20 El efecto de las enzimas en el sustrato de pienso (Delta-G) fue calculado de la siguiente manera, esencialmente como sugieren Wallace et al en J. Anim. Sci. 2001,79:1905-1916:  $\Delta G = (SE - SC) - (RFE - RFC)$ , donde SE = fluido ruminal, sustrato de pienso y enzima, SC = fluido ruminal y sustrato de pienso, RFE = fluido ruminal y enzima, y RFC = fluido ruminal.

[0124] En la Tabla 1, la dosis de cada una de las amilasas se indica como proteína bruta (CP) en mg por kg de sustrato, y como proteína enzimática (EP) en mg por kg de sustrato.

[0125] La proteína bruta (CP) fue medida por un método de combustión en el que principalmente CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub> y N<sub>2</sub> se pasan a través de tipos diferentes de filtros para excluir todo menos el nitrógeno, que es luego medido, en un portador de helio, por una célula de conductibilidad térmica.

30 Un analizador de nitrógeno LECO FP-528 fue usado para este propósito, según las instrucciones del fabricante.

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

35 El contenido de nitrógeno también se puede determinar mediante el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

[0126] La proteína enzimática (EP) fue determinada en base a la actividad enzimática y la actividad específica de la enzima en cuestión, en referencia al ensayo de alfa-amilasa del Ejemplo 5.

40 Tabla 1

Enzima	Origen	Dosis de enzima por kg de sustrato		n	Producción de gas (GP) media (ml/%)
		Mg de proteína (CP)	Mg de proteína enzimática (EP)		
<b>Amilasas bacterianas</b>					
BAN 240L	Bacillus amyloliquefaciens	983	500	3	1,2 / 5,1
STAINZYME 12L	Bacillus sp.	311	115	2	0,9 / 3,8
STAINZYME 12L	Bacillus sp.	933	345	2	1,7 / 6,6
STAINZYME 12L	Bacillus sp.	3108	1149	5	2,7 / 11,2
TERMAMYL SC L	Bacillus stearothermophilus	33	9	7	1,6 / 6,3
TERMAMYL SC L	Bacillus stearothermophilus	100	28	15	1,9 / 7,8
TERMAMYL SC L	Bacillus stearothermophilus	217	60	2	2,7 / 12,7
TERMAMYL SC L	Bacillus stearothermophilus	417	115	1	3,0 / 14,6
TERMAMYL SC L	Bacillus stearothermophilus	836	230	2	3,0 / 13,9
TERMAMYL SC L	Bacillus stearothermophilus	1000	275	10	3,2 / 11,2
TERMAMYL SC L	Bacillus stearothermophilus	1671	460	1	2,8 / 12,4
NATALASE 200L	Bacillus halmapalus	73	52	1	1,6 / 7,1
NATALASE 200L	Bacillus halmapalus	218	156	1	2,1 / 9,3
NATALASE 200L	Bacillus halmapalus	471	338	2	2,9 / 12,7
NATALASE 200L	Bacillus halmapalus	906	650	1	2,7 / 11,2
NATALASE 200L	Bacillus halmapalus	1813	1301	2	3,2 / 12,1
NATALASE 200L	Bacillus halmapalus	3626	2602	1	2,0 / 6,4

NATALASE 200L	Bacillus halmapalus	7252	5204	1	2,7 / 8,8
DURAMYL 300L DX	Bacillus licheniformis	186	217	3	0,9 / 3,6
DURAMYL 300L DX	Bacillus licheniformis	559	480	2	1,7 / 6,1
DURAMYL 300L DX	Bacillus licheniformis	1863	1600	4	3,7 / 14,5
VALIDASE BAA	Bacillus subtilis	1000	-	4	1,9 / 6,2
VALIDASE HT	Bacillus subtilis	1000	-	4	2,3 / 7,5
<b>Amilasas fúngicas</b>					
FUNGAMYL 800 L	Aspergillus oryzae	814	670	2	0 / 0
VALIDASE FAA	Aspergillus oryzae	1000	-	2	0,2 / 0,7
VALIDASE FAA	Aspergillus oryzae	10000	-	2	0 / 0
VALIDASE FAA	Aspergillus oryzae	100000	-	2	0 / 0
AMAIZE	Aspergillus oryzae	472	-	2	0,1 / 0,2
AMAIZE	Aspergillus oryzae	945	-	2	0,1 / 0,4
AMAIZE	Aspergillus oryzae	1889	-	4	0,1 / 0,3
AMAIZE	Aspergillus oryzae	10000	-	3	0 / 0
AMAIZE	Aspergillus oryzae	126349	-	1	0 / 0

5 [0127] Los resultados de la Tabla 1 muestran claramente que las amilasas bacterianas tiene un mejor rendimiento que las amilasas fúngicas que generalmente dan lugar a una producción de gas muy baja.

[0128] También parece haber un efecto claro de respuesta a la dosis en este modelo, véase por ejemplo los datos de STAINZYME 12L y DURAMYL 300 L DX para la producción de gas vs. la actividad de amilasa.

10 [0129] También para las amilasas TERMAMYL SC L y NATALASE 200L se observa un efecto claro de respuesta a la dosis, pero sólo en el extremo inferior del rango de la dosis - una nivelación o incluso un descenso ligero en la producción de gas se observa para dosis muy altas.

Sin desear quedar limitado por ninguna teoría, esto se puede deber a una sobredosificación de los productos químicos de formulación incluidos en las preparaciones enzimáticas comerciales.

15 [0130] Se evaluaron amilasas purificadas con las secuencias de aminoácidos de aminoácidos 1-486 de la SEC ID nº 2, 1-483 de la SEC ID nº 4, 1-483 de la SEC ID nº 5, 1-481 de la SEC ID nº 6, y 1-483 de la SEC ID nº 7 como se ha descrito anteriormente, con los mismos resultados.

20 Ejemplo 3: la actividad en varios sustratos de almidón in vitro

25 [0131] Cuatro de las amilasas descritas en ejemplo 2 fueron evaluadas en el modelo in vitro del Ejemplo 1, utilizando sin embargo una gama de diferentes sustratos que contienen almidón en vez del sustrato TMR, es decir concentrado (concentrado estándar, disponible comercialmente de la Universidad de Hohenheim, Institut für Tierernährung), harina de maíz, ensilado de maíz (preparado como se describe en el ejemplo 1), harina de cebada, harina de centeno, harina de trigo, harina de avena (para pienso), y almidón de patata (grado alimenticio).

30 [0132] Los resultados se muestran en la Tabla 2 que aparece a continuación. En cada sección, las tres amilasas que se mencionan primero son amilasas bacterianas, mientras que la amilasa mencionada en último lugar es una amilasa fúngica.

[0133] Estas amilasas son descritas con más detalle en el Ejemplo 2, que también describe cómo se calculó la dosis de proteína enzimática (CP, EP) y la GP media.

35 Tabla 2

Enzima	Dosis de enzima por kg de sustrato		n	GP media (%)
	Mg de proteína (CP)	Mg de proteína enzimática (EP)		
<b>TMR</b>				
STAINZYME 12L	3108	1149	5	11,2
TERMAMYL SC L	1000	275	10	11,2
DURAMYL 300L DX	1863	1600	4	14,5
AMAIZE	1889	-	4	0,3
<b>Concentrado</b>				
STAINZYME 12L	3108	1149	2	5,3

TERMAMYL SC L	-	-	-	-
DURAMYL 300L DX	1863	1600	2	7,3
AMAIZE	1889	-	2	0
<b>Harina de maíz</b>				
STAINZYME 12L	3108	1149	5	35,9
TERMAMYL SC L	1000	275	2	73,6
DURAMYL 300L DX	1863	1600	3	31,8
AMAIZE	1889	-	3	0,4
<b>Ensilado de maíz</b>				
STAINZYME 12L	3108	1149	2	28,8
TERMAMYL SC L	-	-	-	-
DURAMYL 300L DX	1863	1600	2	24,0
AMAIZE	1889	-	2	0
<b>Harina de cebada</b>				
STAINZYME 12L	3108	1149	2	9,1
TERMAMYL SC L	1000	275	1	16,2
DURAMYL 300L DX	-	-	-	-
AMAIZE	1889	-	1	0
<b>Harina de centeno</b>				
STAINZYME 12L	3108	1149	2	8,8
TERMAMYL SC L	1000	275	2	5,9
DURAMYL 300L DX	-	-	-	-
AMAIZE	1000	-	2	2,1
<b>Harina de trigo</b>				
STAINZYME 12L	3108	1149	2	9,5
TERMAMYL SC L	1000	275	2	17,7
DURAMYL 300L DX	-	1600	-	-
AMAIZE	1000	-	2	1,2
<b>Harina de avena</b>				
STAINZYME 12L	3108	1149	3	19,5
TERMAMYL SC L	1000	275	3	38,0
DURAMYL 300L DX	-	1600	-	-
AMAIZE	1000	-	3	1,6
<b>Almidón de patata</b>				
STAINZYME 12L	3108	1149	1	18,9
TERMAMYL SC L	1000	275	1	35,6
DURAMYL 300L DX	-	-	-	-
AMAIZE	1000	-	1	3,9

[0134] Los resultados de la Tabla 2 muestran que las amilasas bacterianas tienen un efecto en todos los sustratos, y el efecto fue más pronunciado en el ensilado de maíz y en la harina de maíz.

La amilasa TERMAMYL SC parece ser la amilasa bacteriana más eficaz en todos los sustratos.

5 Las amilasas purificadas con las secuencias de aminoácidos 1-486 de la SEC ID nº 2, 1-483 de la SEC ID nº 4, y 1-481 de la SEC ID n.º: 6 fueron evaluadas como se ha descrito anteriormente con los mismos resultados.

El efecto de la amilasa fúngica fue generalmente bajo en todos los sustratos.

Ejemplo 4: Degradación de almidón in vitro

10 [0135] Utilizando el sistema de rumen in vitro descrito en el ejemplo 1, se determinó la cantidad de almidón degradada durante 4 horas de incubación de rumen in vitro para la amilasa bacteriana TERMAMYL SC L, comparándola a muestras de control sin amilasa exógena.

El sustrato era TMR y la enzima fue dosificada con 1000 mg de proteína bruta por kg de pienso.

15 [0136] Las reacciones HFT fueron detenidas y el almidón fue precipitado por adición de 99,9% de etanol a una concentración final de 80 % de etanol.

Las muestras fueron centrifugadas (2500 x g, 4°C, 10 in.) y los sobrenadantes fueron desechados.

20 Para la cuantificación del almidón residual, las muestras fueron precipitadas de nuevo con 80% de etanol y después de la centrifugación; se añadió tampón de acetato (pH 5) a los residuos antes de la incubación a 40°C durante 15 min. seguido por la adición de 200 microlitros de Termamyl 300 L DX (Novozymes A/S) e incubación continua a más de 90°C durante 30 min. Posteriormente, la temperatura fue bajada a 60°C, se añadieron 500 microlitros de amiloglicosidasa (320 U/ml; Megazyme International), y las muestras fueron incubadas durante 16 horas.

25 [0137] La glucosa resultante fue cuantificada utilizando el reactivo GOPOD, que es un equipo colorimétrico que utiliza glucosa oxidasa y peroxidasa disponible de MEGAZYME International.

[0138] Como se muestra en la Tabla 4, la amilasa bacteriana redujo el almidón residual en comparación con la muestra de control que también ha sido incubada durante 4 horas.

La cantidad de almidón degradado por la amilasa fue de 18,7 mg/tubo, que corresponde al 30% del almidón restante en la muestra de control.

La amilasa purificada con la secuencia de aminoácidos 1-486 de la SEC ID n.º: 2 fue evaluada como se ha descrito anteriormente con el mismo resultado.

Tabla 4

Tratamiento	Almidón Residual (mg/ tubo HFT) media ± error estándar
Control (amilasa no exógena)	61,2 ± 2,5
Amilasa bacteriana (TERMAMYL SC L)	42,5 ± 1,8

[0139] El experimento anteriormente mencionado fue repetido, pero reemplazando la amilasa bacteriana con la amilasa fúngica AMAIZE.

[0140] Como se muestra en la Tabla 5, la amilasa fúngica no fue capaz de reducir el almidón residual en comparación con la muestra de control que también había sido incubada durante 4 horas.

Esto es conforme a la cantidad muy baja de gas producido en el HFT por esta amilasa (véase el Ejemplo 2).

Tabla 5

Tratamiento	Almidón residual (mg/HFT tubo) media ± error estándar
Control (amilasa no exógena)	77,3 ± 2,5
Amilasa fúngica (AMAIZE)	77,3 ± 1,3

Ejemplo 5: actividad de alfa-amilasa

[0141] La actividad de alfa-amilasa fue medida utilizando el kit de amilo (ANYL-kit) que está comercialmente disponible de Roche Diagnostics, n° de catálogo. 11876473.

El sustrato es 4,6-etilideno(G<sub>7</sub>)-p-nitrofenil(G<sub>1</sub>)-alfa,D-maltoheptaósido (etilideno-G<sub>7</sub>PNP).

La alfa-amilasa separa el Ethylideno-G<sub>n</sub> y el G<sub>n</sub>-p-nitrofenilo resultante es luego dividido por la alfa-glucosidasa enzimática (parte del kit) bajo formación de glucosa y el p-nitrofenol de color amarillo.

El índice de formación de p-nitrofenol, que es una medida de la velocidad de reacción y, por lo tanto, de la actividad de alfa-amilasa, se observa a 405 nm, por ejemplo mediante un analizador Konelab 30 (disponible comercialmente de Thermo Electron Corporation), por ejemplo utilizando un tiempo de medición de 2 min.

[0142] Las condiciones de reacción son: temperatura 37°C, pH: 7.15, tiempo de reacción: 5 min. Cloruro de calcio 0,03M con Brij 0,0025% (Sigma B 4184) es preferiblemente usado como un estabilizador.

[0143] La actividad de alfa-amilasa se puede dar con respecto a un estándar, por ejemplo en las unidades de KNU(s) que se determinan con respecto a un estándar de alfa-amilasa de una actividad KNU(s) declarada.

[0144] Una descripción de ensayo más detallada (EB-SM-0221.02) al igual que un estándar TERMAMYL KNU(S) SC están disponibles bajo solicitud en Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd.

Ejemplo 6: perfiles de pH de amilasa, con y sin sales biliares

[0145] Este experimento sirve para determinar los perfiles de pH de tres alfa-amilasas, dos amilasas bacterianas de la invención y una amilasa de *Aspergillus oryzae* fúngica del estado de la técnica, con y sin sales biliares añadidas.

[0146] Las amilasas usadas fueron amilasas de *Bacillus* purificadas (TERMAMYL SC y STAINZYME), y, para comparación, una amilasa de *Aspergillus oryzae* purificada (de FUNGAMYL). Todas estas preparaciones enzimáticas están disponibles comercialmente de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

Ensayo de azúcares reductores

[0147] Tampón enzimático: 50 mM de acetato, 50 mM de imidazol, 50 mM de ácido malónico, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,01% de Tritón X-100.

Ajustar a pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, o 7.0 con HCl/NaOH.

[0148] Tampón sustrato: 1,5 mg/ml de amilopectina (maíz ceroso, por ejemplo Waxy corn 04201 de Cerestar, lote

WM5671), 50 mM de acetato, 50 mM de midazol, 50 mM de ácido malónico, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Ajustar al pH deseado (como aparece anteriormente) con HCl/NaOH.

Incubar durante 5 min a 100°C.

5 El tampón sustrato fue hecho con o sin 5 mM de sales biliares (es decir, taurocolato sódico disponible comercialmente de, por ejemplo, LGC promochem, 500g/mol).

[0149] La actividad de amilasa fue detectada mediante ensayo de azúcares reductores.

Brevemente, se mezcló 50µl de enzima (diluida en tampón enzimático para caer en el rango lineal del ensayo) con 100µl de tampón de sustrato en placas PCR-MTP (Thermo-Fast 96, ABgene, N° de catálogo AB-0600).

10 Las de la placa MTP fueron incubadas a 37°C durante 15 min, tras lo cual se añadieron 75µl de solución de interrupción (100 mM hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico, 180 mM de K-Na-tartrato, 2% de NaOH), y las placas fueron incubadas a 95°C durante 10 min. Luego, se transfirieron 150µl de cada pocillo a placas MTP de 96 pocillos, y la absorbancia a 410 nm fue monitoreada como una medida de la actividad de amilasa.

15 [0150] Los resultados (promedio de determinaciones duplicadas) se muestran en las Tablas 6-9, a continuación.

La Tabla 6 muestra la actividad de cada enzima al pH indicado en ausencia de sales biliares. Para cada enzima, la actividad máxima fue establecida en 100%.

La Tabla 7 muestra lo mismo que la Tabla 6, pero en presencia de 5 mM de sales biliares.

20 La Tabla 8 muestra la actividad de cada enzima por mg de proteína enzimática al pH indicado en ausencia de sales biliares, en relación a la actividad enzimática máxima medida en este experimento, que fue la actividad de la enzima TERMAMYL SC a pH 5.0 (100%).

La actividad de cada enzima ha sido normalizada consecuentemente con respecto a esta actividad.

La cantidad de proteína enzimática para cada enzima fue determinada basándose en la actividad específica.

La Tabla 9 muestra lo mismo que la Tabla 8, pero en presencia de 5 mM de sales biliares.

25 Aquí la actividad de la enzima TERMAMYL SC a pH 5.0 en presencia de 5 mM de sales biliares es el valor de referencia (100%).

Tabla 6: actividad relativa sin sales biliares

Enzima / pH	2	3	4	5	6	7
FUNGAMYL	0,0	0,0	77,4	93,4	100,0	25,6
STAINZYME	0,3	0,8	2,8	22,2	79,7	100,0
TERMAMYL SC	0,1	1,8	29,4	100,0	86,0	71,1

30

Tabla 7: actividad relativa con sales biliares

Enzima / pH	2	3	4	5	6	7
FUNGAMYL	0,0	0,0	53,5	71,8	68,6	16,1
STAINZYME	0,0	0,0	0,8	2,5	61,4	78,1
TERMAMYL SC	0,0	0,0	10,4*	76,0	68,6	59,7

\* una medición descartada por ser claramente errónea

35

Tabla 8: actividades absolutas normalizadas con respecto a TERMAMYL SC sin sales biliares

Enzima / pH	2	3	4	5	6	7
FUNGAMYL	0,0	0,0	10,9	13,2	14,1	3,6
STAINZYME	0,1	0,4	1,4	10,7	38,3	48,0
TERMAMYL SC	0,1	1,8	29,4	100,0	86,0	71,1

40

Tabla 9: actividades absolutas normalizadas con respecto a TERMAMYL SC, con sales biliares

Enzima / pH	2	3	4	5	6	7
FUNGAMYL	0,0	0,0	9,9	13,3	12,7	3,0
STAINZYME	0,0	0,0	0,5	1,6	38,8	49,3
TERMAMYL SC	0,0	0,0	13,7	100,0	90,2	78,6

[0151] Estos resultados muestran que aunque las sales biliares parecen reducir ligeramente la actividad de amilasa, la actividad en presencia de 5 mM de sales biliares sigue siendo satisfactoria.

Los resultados también muestran que las sales biliares no llevan a un cambio del pH óptimo.

45

[0152] Los resultados además muestran que cada una de las amilasas de Bacillus de la invención tienen más del 50% de actividad relativa a pH 7, lo cual no es el caso de la amilasa fúngica comparativa.

[0153] Finalmente, las Tablas 8 y 9 demuestran que, al menos en estas condiciones, la amilasa de TERMAMYL SC tiene una actividad significativamente más alta por mg de enzima que las otras dos amilasas evaluadas.

5 Ejemplo 7: prueba in vivo en vacas lecheras - producción de leche

[0154] Una prueba in vivo se efectuó con 28 vacas lecheras (Holstein) alojada en establos con compartimentos libres equipados con alimentadores electrónicos Calan gates (American Calan, Northwood, NH) para la medición del consumo individual de pienso.

10 Se permitió que las vacas adaptaran a los alimentadores durante un periodo de tres semanas.

Luego las vacas fueron divididas en bloques en base a la producción de leche de pre-prueba y se les asignó de forma aleatoria uno de cuatro tratamientos.

El estudio fue conducido como un diseño de cuadrado latino 4 x 4 .

15 Los cuatro tratamientos fueron evaluados en cuatro periodos de 21 días y los datos fueron recogidos durante los últimos 7 días de cada periodo.

La amilasa bacteriana TERMAMYL SC (disponible comercialmente de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca) fue evaluada en dos dosis (baja = 6 mg de proteína enzimática (EP) por kg de materia seca (DM) de Ración Total Mezclada (TMR); alta = 30 mg de EP/kg de materia seca de TMR) y comparada con un control sin amilasa exógena, y al producto AMAIZE (AllTech Inc., Nicholasville, Kentucky, US), que contiene una amilasa fúngica.

20 La dosis de AMAIZE (240 DU/kg de materia seca de TMR) se basó en una prueba publicada (Tricarico et al, Animal Science 2005, 81: 365-374) que mostraba que esta era la dosis más eficaz de las tres evaluadas (240, 480 y 720 de DU/kg de materia seca de TMR).

25 La dieta consistió en un concentrado con 50% de TMR , 37% de ensilado de maíz, 7% de henilaje de alfalfa, y 6% de heno de alfalfa.

El concentrado estaba principalmente compuesto por harina de maíz, harinillas de trigo, grano seco de destilería con solubles, y harina de soja (SBM).

Se alimentaba a las vacas con la TMR ad libitum una vez al día, y las sobras de pienso individuales fueron medidos a diario.

30 [0155] Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día, y la producción de leche fue registrada automáticamente por ordenador.

Las muestras de leche se tomaron dos veces al día los días 19 y 21 de cada periodo.

35 La proteína y la grasa láctea de las muestras de leche fueron analizadas por análisis de infrarrojo cercano Dairy One Laboratories, University Park, PA, US).

La leche corregida en grasa (FCM) fue calculada de la siguiente manera:  $FCM\ 3,5\% = [(0,434 \times \text{kg de producción de leche}) + (16,216 \times \text{kg de grasa de leche})]$ .

Como ejemplo, para una vaca Jersey con 30 kg de producción de leche y 5% de grasa/kg, el FCM 3,5% es  $(0,434 \times 30) + (16,216 \times 1,5) = 37,34$ .

40 Todos los datos fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED del SAS (1999) con significancia declarada en  $P < 0,05$ .

Las diferencias entre los tratamientos fueron determinadas por medias de mínimos cuadrados.

45 [0156] Los resultados en forma de los valores medios de los diferentes parámetros medidos se muestran en la Tabla 10, y los valores del error estándar de la media (SEM) también se indican.

Parámetros de rendimiento	Control	Amilasa bacteriana		Amilasa fúngica	SEM
		Dosis baja	Dosis alta		
Toma de materia seca (DMI)(kg/día)	27,0 <sup>b</sup>	28,1 <sup>a,b</sup>	29,0 <sup>a</sup>	28,5 <sup>a</sup>	0,45
Leche (kg/día)	43,2 <sup>b</sup>	47,1 <sup>a</sup>	44,2 <sup>b</sup>	45,2 <sup>ab</sup>	0,74
Leche/DMI (kg de leche/kg de DMI)	1,60	1,68	1,52	1,59	-
Grasa láctea (%)	2,98	2,99	3,09	3,08	0,07
Grasa láctea (kg/día)	1,28 <sup>b</sup>	1,39 <sup>a</sup>	1,35 <sup>ab</sup>	1,40 <sup>a</sup>	0,04
Proteína láctea (%)	2,88	2,89	2,88	2,90	0,02
Proteína láctea (kg/día)	1,24 <sup>c</sup>	1,36 <sup>a</sup>	1,27 <sup>bc</sup>	1,30 <sup>ab</sup>	0,02
3,5% de leche corregida en grasa (kg/día)	39,4 <sup>b</sup>	43,0 <sup>a</sup>	41,0 <sup>ab</sup>	42,3 <sup>a</sup>	0,78
FCM/DMI (kg de leche/kg de DMI)	1,47 <sup>ab</sup>	1,55 <sup>a</sup>	1,43 <sup>b</sup>	1,49 <sup>ab</sup>	0,03

Las medias en filas con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

50 [0157] Como se muestra en la Tabla 10, la amilasa bacteriana en la dosis baja mejoró significativamente la producción de leche (kg/día) al igual que la FCM/DMI, a diferencia de la amilasa fúngica en su dosis óptima proporcionada.

La grasa láctea (kg/día), la proteína de la leche (kg/día), así como el 3,5% de leche corregida en grasa (FCM kg/día) fueron significativamente mejoradas por la amilasa bacteriana en la dosis baja, al igual que por la amilasa fúngica.

Ejemplo 8. Prueba in vivo en vacas lecheras - digestibilidad aparente del pienso

[0158] En la finalización del periodo 4 de la prueba in vivo descrita en el Ejemplo 7, las seis vacas con la máxima producción de cada grupo siguieron con sus dietas experimentales.  
 La toma media diaria fue determinada utilizando datos de la última semana del periodo 4 y las vacas fueron alimentadas con esta misma cantidad diario durante 8 días adicionales.  
 Durante los días 5 a 8, se recogieron muestras fecales (-300 g) vía palpación rectal cada 8 h (el punto temporal de muestreo fue aumentado en 1 hora cada día) hasta que se recogió un total de 12 muestras para cada vaca. Durante la recogida de muestras fecales, se recogieron TMR (de cada grupo) y pienso sobrante (para cada vaca) a diario.  
 Todas las muestras fecales, de TMR, y de pienso sobrante (para cada vaca) fueron agrupadas y secadas durante 48 h en un horno de aire forzado a 60°C.  
 Las muestras fueron molidas a través de un tamiz de 1-mm pantalla y se analizó la materia seca (DM), la fibra detergente ácido (FDA) y la fibra detergente neutro(FDN) en ellas como describe Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970, en Forage fibre analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications), Agriculture Handbook No. 379, Agric.Res.Serv., USDA, Washington, DC, USA).  
 También se analizó en las muestras el nitrógeno (N) (Elementor Vario Max CN Analyzer, Elementor Americas Inc., Mt.Laurel, NJ, US), el almidón (Cumberland Valley Analytical Laboratory), y el contenido de ceniza (600°C en un horno de mufla durante 5 h).  
 La FDN indigerible fue usada como un marcador para calcular la digestibilidad aparente del tracto total.  
 La FDN indigerible fue determinada después de 120 horas de incubación de rumen in vitro (Goering and Van Soest, 1970) utilizando una incubadora Daisy-II (Ankom Technology, Macedon, NY, US) y líquido ruminal de una vaca alimentada con la dieta de control.  
 Todos los datos fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED del SAS (1999) con significancia declarada a P < 0,05.  
 Los datos de digestibilidad se presentan como medias de mínimos cuadrados en la Tabla 11 junto con el error estándar de la media (SEM).

Tabla 11

	Control	Amilasa bacteriana		Amilasa fúngica	SEM
		Dosis baja	Dosis alta		
Toma de materia seca (DMI) (kg/día)	29,59	26,23	28,33	27,14	1,30
Digestibilidad de materia seca (%)	62,95 <sup>bc</sup>	68,64 <sup>a</sup>	60,52 <sup>c</sup>	65,74 <sup>ab</sup>	1,36
Digestibilidad de fibra detergente neutro (%)	30,02 <sup>bc</sup>	40,75 <sup>a</sup>	25,94 <sup>c</sup>	39,27 <sup>ab</sup>	3,77
Digestibilidad de materia orgánica (%)	65,27 <sup>bc</sup>	69,94 <sup>a</sup>	61,73 <sup>c</sup>	67,37 <sup>ab</sup>	1,47
Digestibilidad de almidón (%)	93,34 <sup>ab</sup>	95,118 <sup>a</sup>	92,62 <sup>b</sup>	94,09 <sup>ab</sup>	0,82
Digestibilidad de proteína bruta (%)	66,19 <sup>ab</sup>	70,00 <sup>a</sup>	61,80 <sup>b</sup>	66,73 <sup>ab</sup>	1,81

Las medias en filas con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes (p<0,05)

[0159] Como se muestra en la Tabla 11, la amilasa bacteriana en la dosis baja mejoró significativamente la digestibilidad de la materia seca, de la fibra de detergente neutro y de la materia orgánica en comparación con la muestra de control, a diferencia de la amilasa fúngica en su dosis óptima proporcionada.  
 La digestibilidad de almidón y de proteína bruta fue también la más alta numéricamente para la amilasa bacteriana en la dosis baja, pero la diferencia no era estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control.

Ejemplo 9: digestibilidad de tracto total - y degradación ruminal de piensos que utilizan la técnica de la bolsa de nylon

[0160] La enzima usada en este estudio fue la amilasa bacteriana TERMAMYL SC (disponible comercialmente de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca).

[0161] La desaparición ruminal de 8 piensos diferentes (grano de maíz, cebada (harina de cebada gruesa), residuos de cerveza, pulpa de remolacha azucarera seca, ensilado de maíz, ensilado de hierba, heno y Ración Total Mezclada (TMR)) fue determinada por el método de la bolsa de nylon (Flachowsky, G., M. Schneider, W. I. Ochrimenko, G. H. Richter, y H.-J. Löhnert, Methodische Hinweise zur Anwendung der Nylonbeutel-Technik beim Wiederkäuer. Schriftenreihe der Lehrgangseinrichtung für Fütterungsberatung Jena-Jemderoda 1988, 11: 20-26; Kurtz, H., and F.J. Schwarz, In situ- Abbaubarkeit von Restpflanzen verschiedener Maishybriden im Reifeverlauf. Übers. Tierernähg. 2005,33: 111-120; Madsen, J., y T. Hvelplund, Prediction of in situ protein degradability in the rumen. Results of a European ring test. Acta Agric. Scand., 1994, Suppl. 25: 103-124).  
 Los residuos de cerveza se liofilizaron a partir de residuos de cerveza alemana fresco de producción de cerveza basada en cebada. Se usó la misma TMR que la descrita a continuación.

[0162] Los piensos fueron molidos para simular el masticado de una vaca y para aumentar la homogeneidad de la muestra.

El grano de maíz, la cebada y las muestras de pulpa de remolacha azucarera fueron molidos utilizando un tamiz de 3 mm.

Las muestras de heno, de TMR y de ensilado fueron primero cortadas en trozos más pequeños, y luego liofilizados, salvo el heno, antes de ser molidos (tamiz de 5 mm).

5 De forma similar, los residuos de cerveza fueron liofilizados y molidos de esta manera (tamiz de 5 mm).

[0163] El estudio consistió básicamente en dos tratamientos, a saber la adición de 50 mg de proteína enzimática (EP) por kg de materia seca (DM), y un control sin enzima.

Cada tratamiento era, sin embargo, por duplicado, es decir, en las bolsas de nylon y en la ración diaria.

10 [0164] La enzima fue disuelta en agua destilada (volumen total 100 ml/kg DM) y pulverizada sobre la ración diaria (TMR consistente en 44% de ensilado de maíz, 18% de ensilado de hierba, 9% de heno y 29% de concentrado a base de maíz), así como sobre el pienso a ser evaluado en cada una de las 8 series de bolsas de nylon.

15 La misma cantidad de agua destilada fue pulverizada sobre el pienso de control, y sobre las bolsas de nylon de control.

Cada día se añadieron enzima/agua a la ración diaria, mientras que se añadieron enzima/agua a los piensos en las bolsas de nylon antes de la prueba y fueron ultracongeladas (-20°C) hasta su uso.

20 [0165] Estas dietas (es decir, la ración diaria así como las bolsas de nylon) fueron asignadas a tres vacas no lactantes (Holstein alemanas), cada una de ellas equipada con una cánula ruminal en el rumen dorsal, en dos series experimentales con 3 vacas por tratamiento, dando como resultado un diseño de cuadrado latino 3 x 3 no completo.

El grupo experimental recibió una ración diaria con enzima, así como bolsas de nylon con enzima; el grupo de control recibió raciones y bolsas de nylon diarias sin adición de enzima.

25 En cuanto a las bolsas de nylon, se colocaron bolsas por duplicado por período de incubación que contenían 5 g de los diferentes piensos en el rumen de tres vacas por tratamiento y la desaparición de DM fue monitorizada durante hasta 72 horas.

[0166] Las vacas fueron mantenidas en un establo con compartimentos con aire acondicionado (20°C) sobre esterillas de goma con alimentación individual y libre acceso al agua.

30 El experimento duró 2 periodos de 25 días cada uno (en total 50 días); en cada periodo los primeros 14 días fueron usados para la adaptación y los siguientes 11 días para la obtención de muestras utilizando las bolsas de nylon.

Cada vaca fue alimentada con 5,5 kg (DM) de TMR al día a las 7:00 h y a las 16:00 h y con 0,5 kg (DM) de heno dos horas después de la alimentación de la mañana.

Además se administraron 100 g/d de una premezcla mineral.

35 Del 22 al 25, se recogieron muestras fecales al azar (- 200 g) de cada vaca mediante palpación rectal a las 8:30 h.

Se utilizó TiO<sub>2</sub> como marcador para calcular digestibilidad aparente del tracto total.

40 Como ejemplo, si se usara un 1% de TiO<sub>2</sub> en el pienso con una toma de DM de pienso de 10 kg y se encontrara un 4% de TiO<sub>2</sub> en las heces, esto corresponde a una cantidad de heces de 2,5 kg de DM (según un balance de masa de TiO<sub>2</sub>, in=out), en otras palabras, una digestibilidad bruta del pienso de 75% (7,5 kg de 10).

[0167] Los resultados se muestran en las Tablas 12-15 que aparecen a continuación, que muestran la desaparición de materia seca (%) de grano de maíz, cebada, ensilado de maíz, y TMR, respectivamente, de la bolsa de nylon después de periodos de incubación de hasta 8 horas.

45 Como es usual en la técnica, la DM fue determinada mediante el secado a 105°C hasta que no hubo más pérdida de peso, normalmente durante 24 horas.

La Tabla 16 muestra el efecto del tratamiento de amilasa en la digestibilidad aparente de nutrientes in vivo (% de materia seca).

Tabla 12 (grano de maíz)

Período de incubación	Control	Amilasa
0	18,0	18,0
2	25,2 <sup>b</sup>	33,9 <sup>a</sup>
4	28,4 <sup>b</sup>	35,9 <sup>a</sup>
8	32,7 <sup>b</sup>	43,5 <sup>a</sup>

Las medias en filas con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes (p<0,05)

50

Tabla 13 (cebada)

Período de incubación	Control	Amilasa
0	23,0	23,0
2	58,8	64,9
4	70,6	75,1
8	79,9	81,5

Tabla 14 (ensilado de maíz))

Período de incubación	Control	Amilasa
0	51,9	51,9
2	49,3	50,9
4	50,3	52,0
8	54,3	54,8

Tabla 15 (TMR)

Período de incubación	Control	Amilasa
0	51,3	51,3
2	52,6	54,1
4	54,5	56,3
8	61,1	58,4

5 [0168] Como es aparente a partir de las Tablas 12-15, la suplementación de amilasa mejoró la desaparición de DM durante la incubación de los piensos que contenían cantidades más altas de almidón: significativamente ( $p < 0,05$ ) para el grano de maíz (contenido de almidón de 71,9%), numéricamente para la cebada (contenido de almidón de 57,6%) y el ensilado de maíz (contenido de almidón de 33,1%) en las primeras 8 h de incubación, y numéricamente para la TMR (contenido de almidón de 33,0%) en las primeras 4 h de incubación.

10 [0169] Como se podía esperar, no hubo efectos de la amilasa en los cuatro piensos que no contenían almidón o que contenían cantidades insignificantes de éste, es decir ensilado de hierba, heno, pulpa de remolacha azucarera y residuos de cerveza (datos no mostrados).

15 Tabla 16

	Control	Amilasa
Fibra bruta	62,3	64,3
Proteína bruta	63,1	64,0
Materia orgánica	70,1	71,9
Grasa bruta	59,0	62,1

[0170] Como es aparente a partir de la Tabla 16, la amilasa aumentó numéricamente la digestibilidad aparente del tracto total (de la boca a las heces) de fibra bruta, proteína bruta, materia orgánica y grasa bruta en TMR, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas.

20 Sin desear quedar limitado por ninguna teoría, esto se puede deber a uno o varios de los siguientes mecanismos: la amilasa afecta a la microflora en el rumen, lo que puede luego afectar a la degradación de estos otros ingredientes (no almidón); la amilasa puede proporcionar energía para el crecimiento de la microflora de modo que el número de microorganismos aumenta, y también lo hace la degradación de los otros ingredientes; la eliminación del almidón puede dar acceso más fácil a los otros ingredientes (efecto jaula).

25 [0171] Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED del SAS (1999) con significancia declarada a  $P < 0,05$ .

Las diferencias entre tratamientos fueron determinadas mediante medias de mínimos cuadrados.

30 Ejemplo 10: prueba in vivo en vacas lecheras - amilasa bacteriana y celulasa

[0172] Dos grupos (2 x 220) de vacas lecheras (Holstein alemanas) fueron incluidos en una prueba de alimentación de 9 meses para someter a prueba el efecto de la adición al pienso de una combinación de una amilasa bacteriana y celulasa

35 [0173] Las enzimas usadas fueron la amilasa bacteriana TERMAMYL SC y la celulasa CELLUCLAST, ambas disponibles comercialmente de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca. La celulasa CELLUCLAST es derivada de *Trichoderma reesei*.

40 [0174] Las vacas fueron alojadas en un establo de cubículos con suelo de rejilla. El periodo experimental incluyó 3 semanas antes y 20 semanas después del parto. Las vacas fueron alimentadas (ocho veces al día) con una Ración Total Mezclada (TMR) que o bien no estaba suplementada con enzima (control) o bien estaba suplementada con la amilasa (1,6 ml/kg de TMR, correspondientes a 25 mg de proteína enzimática (EP)/kg de materia seca (DM) de TMR) y la celulasa (1,4 ml/kg de TMR).

45 Las enzimas fueron pulverizadas sobre la TMR inmediatamente antes de ser alimentadas. Los componentes principales de la TMR eran ensilado de hierba, ensilado de maíz y concentrado (mezclado en la granja), y el contenido de materia era aproximadamente del 50%.

Los animales fueron divididos en dos grupos, de control y de tratamiento.

50 Se trató de componer los dos grupos de forma similar asignando a cada grupo vacas individuales con un rendimiento previsto similar.

Esto se hizo según el principio siguiente: primíparas según el rendimiento de leche predicha del progenitor (que pertenece al programa de crianza normal para vacas), y multíparas según el número de lactancia y la lactancia precedente.

5 [0175] Las vacas fueron ordeñadas 3 veces al día en una sala de ordeño rotativa. La producción y la composición de la leche individuales así como el espesor de la grasa dorsal fueron evaluados regularmente durante la prueba.

10 [0176] El efecto del tratamiento enzimático en la producción de leche se muestra en la Figura 1 como la diferencia en la producción de leche (kg/d) entre el grupo tratado y el grupo de control como una función de los días después del parto.

15 [0177] El uso de amilasa y celulasa en combinación resultó en una producción de leche aumentada (sin ningún cambio en la composición de la leche; datos no mostrados) en la fase de lactancia temprana. Las diferencias fueron significativas desde el día 1 hasta el día 14, y el efecto ya no era evidente en las fases finales de la lactancia.

20 [0178] Los espesores de la grasa dorsal de los dos grupos se muestran en la Figura 2 como una función de los días después del parto (normalizados de modo que el nivel de espesor de grasa dorsal el día 28 antes del parto se fija en 100%). El grupo tratado con enzimas (o) tuvo niveles más altos de espesor de grasa dorsal durante la prueba en comparación con el control (\*), y el efecto fue estadísticamente significativo en el día 140 después del parto (p=0,02).

25 Ejemplo 11: prueba in vivo en vacas lecheras: producción de leche, digestibilidad, experimentos con bolsa de nylon

[0179] La amilasa bacteriana purificada con la secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1-486 de la SEC ID n.º: 2 fue evaluada in vivo en vacas lecheras tal y como se describe en los ejemplos 7-10. Se obtuvieron los mismos resultados.

30 Ejemplo 12: composiciones de aditivo de pienso

[0180] La amilasa TERMAMYL SC se mezcla con una vitamina y premezcla mineral (también llamada pienso mineral) compuesto de la siguiente manera por kg: 14% de calcio, 9,5% de odio, 6% de fósforo, 5% de magnesio, 800 000 UI de vitamina A, 120 000 UI de vitamina D3, 3000 mg de vitamina E, 130 mg de vitamina B1, 78 mg de vitamina B2, 70 mg de vitamina B6, 525 µg de vitamina B12, 21 mg de ácido fólico, 260 mg de D-pantotenato de calcio, 2500 mg de niacina, 130 000 µg de biotina, 8500 mg de zinc, 4000 mg de manganeso, 1200 mg de cobre, 100 mg de yodo, 21 mg de cobalto, 50 mg de selenio. Los porcentajes indicados son p/p. La amilasa TERMAMYL SC se incluye en una cantidad que corresponde a 1,8 g de proteína enzimática /kg de la premezcla. La premezcla se alimenta a un ritmo de 100 g por animal y por día. El consumo de pienso al día asumido es 30 kg (DM).

Listado de secuencias

45 [0181]  
<110> Novozymes A/S DSM IP Assets B.V.

<120> Uso de amilasas bacterianas en pienso para animales bovinos

50 <130> 10886.204-WO

<160> 9

<170> versión de PatentIn 3.4

55 <210> 1

<211> 1620

<212> ADN

<213> Artificial

60 <220>

<223> variante de ADN de Bacillus stearothermophilus

<220>

<221> sig\_peptide

65 <222> (1)..(81)

ES 2 584 506 T3

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1620)  
<220>

5

<221> mat\_peptide  
<222> (82)..(1620)

10

<400> 1

ES 2 584 506 T3

atg	aaa	caa	caa	aaa	cgg	ctt	tac	gcc	cga	ttg	ctg	acg	ctg	tta	ttt	48
Met	Lys	Gln	Gln	Lys	Arg	Leu	Tyr	Ala	Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Phe	
		-25					-20					-15				
gcg	ctc	atc	ttc	ttg	ctg	cct	cat	tct	gca	gcc	gcg	gca	ccg	ttt	aac	96
Ala	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Pro	His	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Phe	Asn	
	-10					-5			-1	1				5		
ggc	acc	atg	atg	cag	tat	ttt	gaa	tgg	tac	ttg	ccg	gat	gat	ggc	acg	144
Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Leu	Pro	Asp	Asp	Gly	Thr	
				10					15					20		
tta	tgg	acc	aaa	gtg	gcc	aat	gaa	gcc	aac	aac	tta	tcc	agc	ctt	ggc	192
Leu	Trp	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Glu	Ala	Asn	Asn	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	
			25					30					35			
atc	acc	gct	ctt	tgg	ctg	ccg	ccc	gct	tac	aaa	gga	aca	agc	cgc	agc	240
Ile	Thr	Ala	Leu	Trp	Leu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gly	Thr	Ser	Arg	Ser	
		40					45					50				
gac	gta	ggg	tac	gga	gta	tac	gac	ttg	tat	gac	ctc	ggc	gaa	ttc	aat	288
Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Val	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	
	55					60					65					
caa	aaa	ggg	acc	gtc	cgc	aca	aaa	tac	gga	aca	aaa	gct	caa	tat	ctt	336
Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln	Tyr	Leu	
					75					80					85	
caa	gcc	att	caa	gcc	gcc	cac	gcc	gct	gga	atg	caa	gtg	tac	gcc	gat	384
Gln	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	His	Ala	Ala	Gly	Met	Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	
				90					95					100		
gtc	gtg	ttc	gac	cat	aaa	ggc	ggc	gct	gac	ggc	acg	gaa	tgg	gtg	gac	432
Val	Val	Phe	Asp	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Gly	Thr	Glu	Trp	Val	Asp	

ES 2 584 506 T3

105					110					115						
gcc	gtc	gaa	gtc	aat	ccg	tcc	gac	cgc	aac	caa	gaa	atc	tcg	ggc	acc	480
Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Asp	Arg	Asn	Gln	Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	
		120					125					130				
tat	caa	atc	caa	gca	tgg	acg	aaa	ttt	gat	ttt	ccc	ggg	cgg	ggc	aac	528
Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	
	135					140					145					
acc	tac	tcc	agc	ttt	aag	tgg	cgc	tgg	tac	cat	ttt	gac	ggc	ggt	gat	576
Thr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	
					155					160					165	
tgg	gac	gaa	agc	cga	aaa	ttg	agc	cgc	att	tac	aaa	ttc	cgt	ggc	aag	624
Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Lys	
				170					175					180		
gct	tgg	gat	tgg	gaa	gta	gac	acg	gaa	ttc	gga	aac	tat	gac	tac	tta	672
Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	
			185					190					195			
atg	tat	gcc	gac	ctt	gat	atg	gat	cat	ccc	gaa	gtc	gtg	acc	gag	ctg	720
Met	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	His	Pro	Glu	Val	Val	Thr	Glu	Leu	
		200					205					210				
aaa	aac	tgg	ggg	aaa	tgg	tat	gtc	aac	aca	acg	aac	att	gat	ggg	ttc	768
Lys	Asn	Trp	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Asn	Thr	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	
	215					220					225					
cgg	ctt	gat	gcc	gtc	aag	cat	att	aag	ttc	agt	ttt	ttt	cct	gat	tgg	816
Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	Phe	Pro	Asp	Trp	
					235					240					245	
ttg	tcg	tat	gtg	cgt	tct	cag	act	ggc	aag	ccg	cta	ttt	acc	gtc	ggg	864
Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Ser	Gln	Thr	Gly	Lys	Pro	Leu	Phe	Thr	Val	Gly	
				250					255					260		
gaa	tat	tgg	agc	tat	gac	atc	aac	aag	ttg	cac	aat	tac	att	acg	aaa	912
Glu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Lys	Leu	His	Asn	Tyr	Ile	Thr	Lys	
			265					270					275			
aca	gac	gga	acg	atg	tct	ttg	ttt	gat	gcc	ccg	tta	cac	aac	aaa	ttt	960
Thr	Asp	Gly	Thr	Met	Ser	Leu	Phe	Asp	Ala	Pro	Leu	His	Asn	Lys	Phe	
		280					285					290				
tat	acc	gct	tcc	aaa	tca	ggg	ggc	gca	ttt	gat	atg	cgc	acg	tta	atg	1008
Tyr	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	Ala	Phe	Asp	Met	Arg	Thr	Leu	Met	
		295				300					305					
acc	aat	act	ctc	atg	aaa	gat	caa	ccg	aca	ttg	gcc	gtc	acc	ttc	ggt	1056
Thr	Asn	Thr	Leu	Met	Lys	Asp	Gln	Pro	Thr	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	Val	
					315					320					325	
gat	aat	cat	gac	acc	gaa	ccc	ggc	caa	gcg	ctg	caa	tca	tgg	gtc	gac	1104
Asp	Asn	His	Asp	Thr	Glu	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Gln	Ser	Trp	Val	Asp	
				330				335						340		
cca	tgg	ttc	aaa	ccg	ttg	gct	tac	gcc	ttt	att	cta	act	cgg	cag	gaa	1152
Pro	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu	Thr	Arg	Gln	Glu	
			345					350					355			
gga	tac	ccg	tgc	gtc	ttt	tat	ggt	gac	tat	tat	ggc	att	cca	caa	tat	1200
Gly	Tyr	Pro	Cys	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Gln	Tyr	
		360					365					370				
aac	att	cct	tcg	ctg	aaa	agc	aaa	atc	gat	ccg	ctc	ctc	atc	gcg	cgc	1248
Asn	Ile	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Ile	Asp	Pro	Leu	Leu	Ile	Ala	Arg	
	375					380					385					

ES 2 584 506 T3

agg gat tat gct tac gga acg caa cat gat tat ctt gat cac tcc gac	1296
Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp	
390 395 400 405	
atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc act gaa aaa cca gga tcc gga	1344
Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly	
410 415 420	
ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg gga gga agc aaa tgg atg tac	1392
Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr	
425 430 435	
gtt ggc aaa caa cac gct gga aaa gtg ttc tat gac ctt acc ggc aac	1440
Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn	
440 445 450	
cgg agt gac acc gtc acc atc aac agt gat gga tgg ggg gaa ttc aaa	1488
Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys	
455 460 465	
gtc aat ggc ggt tcg gtt tcg gtt tgg gtt cct aga aaa acg acc gtt	1536
Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp Val Pro Arg Lys Thr Thr Val	
470 475 480 485	
tct acc atc gct cgg ccg atc aca acc cga ccg tgg act ggt gaa ttc	1584
Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe	
490 495 500	
gtc cgt tgg acc gaa cca cgg ttg gtg gca tgg cct	1620
Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val Ala Trp Pro	
505 510	

<210> 2  
 <211> 540  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

10 <400> 2

ES 2 584 506 T3

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe  
 -25 -20 -15

Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Pro Phe Asn  
 -10 -5 -1 1 5

Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr  
 10 15 20

Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn Leu Ser Ser Leu Gly  
 25 30 35

Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser Arg Ser  
 40 45 50

Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn  
 55 60 65

Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Tyr Leu



Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr  
 360 365 370

Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg  
 375 380 385

Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp  
 390 395 400 405

Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly  
 410 415 420

Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr  
 425 430 435

Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn  
 440 445 450

Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys  
 455 460 465

Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp Val Pro Arg Lys Thr Thr Val  
 470 475 480 485

Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe  
 490 495 500

Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val Ala Trp Pro  
 505 510

<210> 3  
 <211> 1449  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Variante de ADN de Bacillus sp.

10

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1449)

15

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(1449)

<400> 3

20

ES 2 584 506 T3

cac	cat	aat	ggt	acg	aac	ggc	aca	atg	atg	cag	tac	ttt	gaa	tgg	tat	48
His	His	Asn	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	
1			5					10					15			
cta	cca	aat	gac	gga	aac	cat	tgg	aat	aga	tta	agg	tct	gat	gca	agt	96
Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Ala	Ser	
			20					25					30			
aac	cta	aaa	gat	aaa	ggg	atc	tca	gcg	ggt	tgg	att	cct	cct	gca	tgg	144



ES 2 584 506 T3

305					310					315					320	
atg	cat	gct	ggt	aca	ttt	ggt	gat	aat	cat	gat	tcg	caa	cct	gaa	gaa	1008
Met	His	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Ser	Gln	Pro	Glu	Glu	
				325					330					335		
gct	tta	gag	tct	ttt	ggt	gaa	gaa	tgg	ttc	aaa	cca	tta	gcg	tat	gct	1056
Ala	Leu	Glu	Ser	Phe	Val	Glu	Glu	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	
			340					345					350			
ttg	aca	tta	aca	cgt	gaa	caa	ggc	tac	cct	tct	gta	ttt	tat	gga	gat	1104
Leu	Thr	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	
		355					360					365				
tat	tat	ggc	att	cca	acg	cat	ggt	gta	cca	gcg	atg	aaa	tcg	aaa	att	1152
Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Gly	Val	Pro	Ala	Met	Lys	Ser	Lys	Ile	
	370					375					380					
gac	ccg	att	cta	gaa	gcg	cgt	caa	aag	tat	gca	tat	gga	aga	caa	aat	1200
Asp	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Arg	Gln	Asn	
385				390						395					400	
gac	tac	tta	gac	cat	cat	aat	atc	atc	ggt	tgg	aca	cgt	gaa	ggg	aat	1248
Asp	Tyr	Leu	Asp	His	His	Asn	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Asn	
				405					410					415		
aca	gca	cac	ccc	aac	tcc	ggt	tta	gct	act	atc	atg	tcc	gat	ggg	gca	1296
Thr	Ala	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asp	Gly	Ala	
			420				425						430			
gga	gga	aat	aag	tgg	atg	ttt	ggt	ggg	cgt	aat	aaa	gct	ggt	caa	ggt	1344
Gly	Gly	Asn	Lys	Trp	Met	Phe	Val	Gly	Arg	Asn	Lys	Ala	Gly	Gln	Val	
		435				440						445				
tgg	acc	gat	atc	act	gga	aat	aaa	gcc	ggt	act	ggt	acg	att	aat	gct	1392
Trp	Thr	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Lys	Ala	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	Ala	
	450					455					460					
gat	gga	tgg	ggt	aat	ttt	tct	gta	aat	gga	gga	tca	ggt	tct	att	tgg	1440
Asp	Gly	Trp	Gly	Asn	Phe	Ser	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Trp	
465				470					475						480	
gta	aac	aaa														1449
Val	Asn	Lys														

<210> 4  
 <211> 483  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> construcción sintética

10 <400> 4

His	His	Asn	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Ala	Ser
			20					25					30		
Asn	Leu	Lys	Asp	Lys	Gly	Ile	Ser	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Trp
		35					40					45			

ES 2 584 506 T3

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



ES 2 584 506 T3

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

Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Gly Glu  
 325 330 335

Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350

Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365

Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala Lys Ile  
 370 375 380

Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr Gln His  
 385 390 395 400

Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asn  
 405 410 415

Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp Gly Pro  
 420 425 430

Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly Gln Val  
 435 440 445

Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala  
 450 455 460

Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp  
 465 470 475 480

Val Lys Arg

- 5 <210> 6
- <211> 510
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> variante de enzima de Bacillus licheniformis
- <220>
- <221> SIGNAL
- <222> (1)..(29)
- 15 <220>
- <221> mat\_peptide
- <222> (30)..(510)
- 20 <400> 6

ES 2 584 506 T3

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe  
-25 -20 -15

Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Val Asn Gly  
-10 -5 -1 1

ES 2 584 506 T3

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

ES 2 584 506 T3

Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Gln Phe His  
 280 285 290

Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys Leu Leu Asn  
 295 300 305

Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr Phe Val Asp  
 310 315 320

Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr  
 325 330 335

Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly  
 340 345 350 355

Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly Asp Ser  
 360 365 370

Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro Ile Leu Lys  
 375 380 385

Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr Phe Asp His  
 390 395 400

His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ala Asn  
 405 410 415

Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ala Lys Arg  
 420 425 430 435

Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His Asp Ile Thr  
 440 445 450

Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly Trp Gly Glu  
 455 460 465

Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Arg  
 470 475 480

<210> 7

<211> 514

<212> PRT

5 <213> Bacillus amyloliquefaciens (SWISSPROT P00692)

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(31)

10

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (32)..(514)

15

<400> 7

ES 2 584 506 T3

Met Ile Gln Lys Arg Lys Arg Thr Val Ser Phe Arg Leu Val Leu Met  
 -30 -25 -20

Cys Thr Leu Leu Phe Val Ser Leu Pro Ile Thr Lys Thr Ser Ala Val  
 -15 -10 -5 -1 1

Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp Gly  
 5 10 15

Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp Ile  
 20 25 30

Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser Gln  
 35 40 45

Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe  
 50 55 60 65

Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu Leu  
 70 75 80

Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr Gly  
 85 90 95

Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val  
 100 105 110

Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser Glu  
 115 120 125

Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg Gly  
 130 135 140 145

Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly Ala  
 150 155 160

Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg Gly  
 165 170 175

Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn Tyr  
 180 185 190

Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val  
 195 200 205

Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser Leu  
 210 215 220 225

Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu  
 230 235 240

Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met Phe

ES 2 584 506 T3

245 250 255

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

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

Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Tyr Asp Met Arg  
 290 295 300 305

Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala Val  
 310 315 320

Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser  
 325 330 335

Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr  
 340 345 350

Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr  
 355 360 365

Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile Glu  
 370 375 380 385

Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His Asp  
 390 395 400

Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser  
 405 410 415

Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly  
 420 425 430

Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr Trp  
 435 440 445

Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser Asp  
 450 455 460 465

Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val  
 470 475 480

Gln Lys

<210> 8

<211> 512

<212> PRT

5 <213> Bacillus licheniformis (SWISSPROT\_P06278)

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(29)

10 <220>

<221> mat\_peptide

ES 2 584 506 T3

<222> (30)..(512)

<400> 8

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe  
 -25 -20 -15

Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Ala Asn Leu  
 -10 -5 -1 1

Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro Asn Asp Gly  
 5 10 15

Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu Ala Glu His  
 20 25 30 35

Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser Gln  
 40 45 50

Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe  
 55 60 65

His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu Leu  
 70 75 80

Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr Gly  
 85 90 95

Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val  
 100 105 110 115

Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser Gly  
 120 125 130

Glu His Arg Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg Gly  
 135 140 145

Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly Thr  
 150 155 160

Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln Gly  
 165 170 175

Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr  
 180 185 190 195

Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Ala Ala Glu  
 200 205 210

ES 2 584 506 T3

Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp Gly  
 215 220 225

Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp  
 230 235 240

Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr Val  
 245 250 255

Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn  
 260 265 270 275

Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Gln  
 280 285 290

Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys Leu  
 295 300 305

Leu Asn Ser Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ala Val Thr Phe  
 310 315 320

Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val  
 325 330 335

Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu  
 340 345 350 355

Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly  
 360 365 370

Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro Ile  
 375 380 385

Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr Phe  
 390 400

Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val  
 405 410 415

Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ala  
 420 425 430 435

Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His Asp  
 440 445 450

Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly Trp  
 455 460 465

Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Arg  
 470 475 480

<210> 9

<211> 549

<212> PRT

5 <213> Bacillus stearothermophilus (SWISSPROT\_P06279)

<220>

<221> SIGNAL  
<222> (1)..(34)

5 <220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (35)..(549)

<400> 9

10

ES 2 584 506 T3

Met Leu Thr Phe His Arg Ile Ile Arg Lys Gly Trp Met Phe Leu Leu  
 -30 -25 -20

Ala Phe Leu Leu Thr Ala Leu Leu Phe Cys Pro Thr Gly Gln Pro Ala  
 -15 -10 -5

Lys Ala Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp  
 -1 1 5 10

Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala  
 15 20 25 30

Asn Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala  
 35 40 45

Tyr Lys Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu  
 50 55 60

Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Ala Val Arg Thr Lys Tyr  
 65 70 75

Gly Thr Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala  
 80 85 90

Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala  
 95 100 105 110

Asp Gly Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg  
 115 120 125

Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe  
 130 135 140

Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp  
 145 150 155

Tyr His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg  
 160 165 170

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp



ES 2 584 506 T3

Asn Ser Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
465 470 475

Val Trp Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Trp Ser Ile  
480 485 490

Thr Thr Arg Pro Trp Thr Asp Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg  
495 500 505 510

Leu Val Ala Trp Pro  
515

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una amilasa bacteriana en pienso para animales de la subfamilia Bovinae para mejorar la producción de leche, el aumento de peso, y/o el Índice de Conversión del Alimento, donde la amilasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEC ID n.º: 2, y por el cual la identidad se determina por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de gap de 10, y una penalización por extensión de gap de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en la alineación; iii) división del número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje.
- 10
2. Uso según la reivindicación 1 para mejorar la producción de leche, la digestibilidad aparente, y/o la desaparición de materia seca de pienso utilizando el método de la bolsa de nylon.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 en combinación con celulasa.
4. Uso según la reivindicación 3 para mejorar la producción de leche y/o el espesor de la grasa dorsal.
- 20 5. Uso según la reivindicación 1 para la preparación de una composición para usar en un pienso para animales de la subfamilia Bovinae.
- 25 6. Composición de aditivo de pienso que comprende una amilasa bacteriana, junto con al menos un ingrediente adicional seleccionado de vitaminas y minerales, donde la amilasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEC ID n.º: 2, y por la cual la identidad se determina por i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de gap de 10, y una penalización por extensión de gap de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en la alineación; iii) división del número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje.
- 30 7. Aditivo de pienso según la reivindicación 6 que comprende además una celulasa.
- 35 8. Composición según la reivindicación 7 que es una premezcla mineral, una premezcla vitamínica, o una premezcla que incluye vitaminas así como minerales.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 que comprende al menos un ingrediente adicional seleccionado de heno, forraje, fibra alimentaria, y/o concentrado.
- 40 10. Composición según la reivindicación 9 que es un concentrado enriquecido con amilasa.
11. Composición según la reivindicación 9 que es una Ración Total Mezclada enriquecida con amilasa.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9-11 que comprende maíz y/o sorgo.

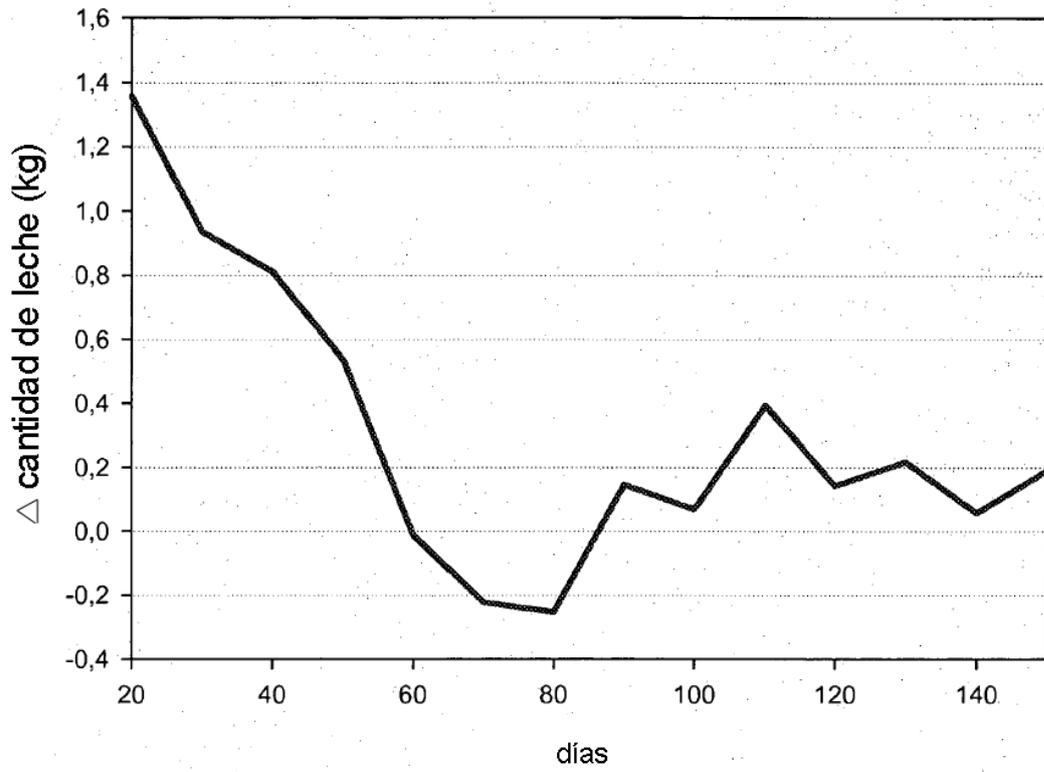


Figura 1

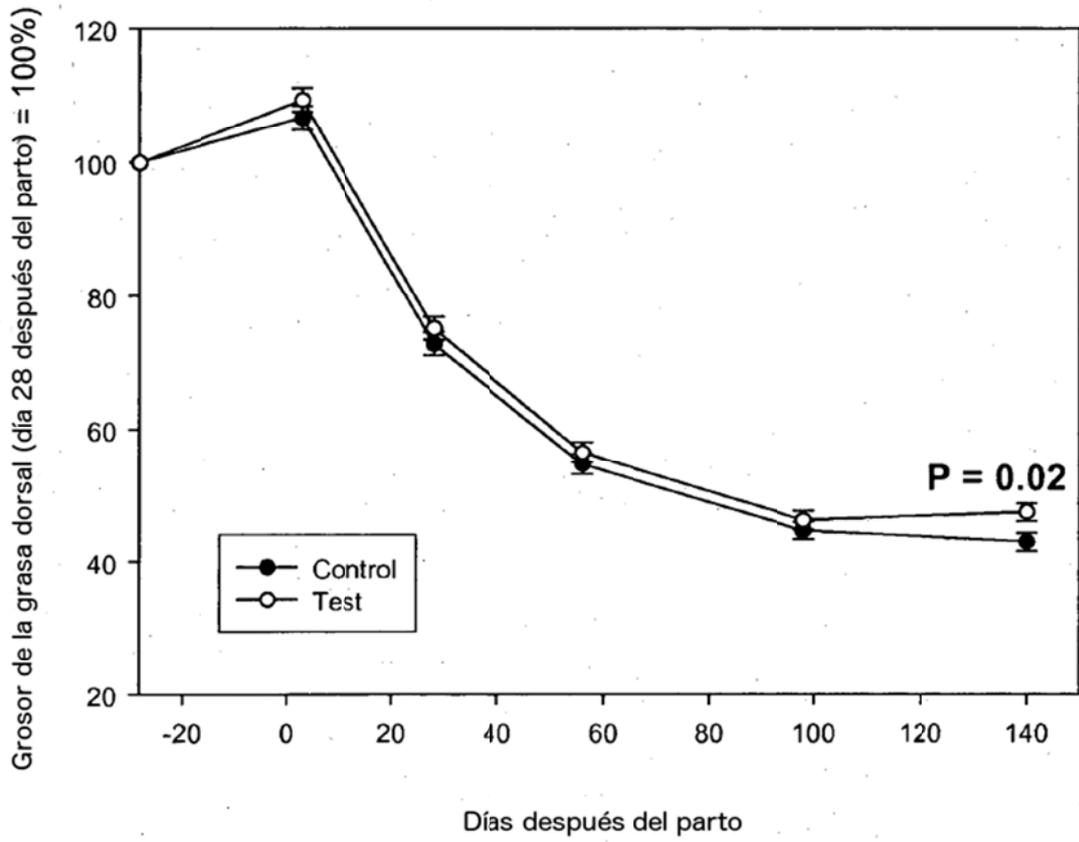


Figura 2