

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 478**

51 Int. Cl.:

A23K 10/18	(2006.01)	C12N 9/16	(2006.01)
A23K 20/189	(2006.01)	C12R 1/125	(2006.01)
A23K 50/30	(2006.01)		
A23K 50/75	(2006.01)		
A23K 50/60	(2006.01)		
A61K 38/46	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 35/741	(2015.01)		
A61K 31/745	(2006.01)		
C12N 1/20	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2012 PCT/GB2012/050122**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12110776**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 12728303 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2675287**

54 Título: **Composición de aditivo alimentario**

30 Prioridad:

18.02.2011 GB 201102865
18.02.2011 GB 201102857

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.02.2017

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

MILLÁN, LUIS FERNANDO ROMERO;
BERNARD, LUKE y
PLUMSTEAD, PETER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 599 478 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

Composición de aditivo alimentario

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para mejorar composiciones alimentarias que usan un microorganismo de alimentación directa en combinación con una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter* spp., preferentemente una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter braakii*, y a una composición de aditivo alimentario que comprende un microorganismo de alimentación directa en combinación con una fitasa que deriva de *Citrobacter* spp., particularmente una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter braakii*. La presente invención además se refiere a usos y kits.

10 Antecedentes de la invención

Enzimas complementarias se usan como aditivos en alimentación animal, particularmente en alimentos de aves y porcino, como un medio para mejorar la utilización de nutrientes y características de rendimiento de la producción.

15 Las combinaciones de enzimas están disponibles para mejorar el valor nutritivo de dietas que contienen granos de cereal, harina de soja, harinas de proteína animal, o subproductos alimentarios ricos en fibra. El concepto de microorganismos de alimentación directa (DFMs) implica alimentar con microorganismos beneficiosos a animales, tales como pollos broiler cuando están en periodos de estrés (enfermedad, cambios de ración, cambios medioambientales o de producción). Probióticos es otro término para esta categoría de aditivos alimentarios.

Probióticos o DFMs han mostrado que mejoran el rendimiento animal en estudios controlados. DFMs incluyen bacterias de alimentación directa y/o productos con base de levadura.

20 Aunque se han contemplado las combinaciones de DFMs con algunas enzimas, la interacción entre DFMs y enzimas exógenas en alimentación animal nunca se ha entendido completamente.

La base de datos WPI Week 200853 Thomson Scientific, Londres, GB, AN 2008-J20352 XP002675948 & CN101181016A describe un alimento para gallinas ponedoras para mejorar el rendimiento de puesta que comprende *Bacillus subtilis* y fitasa.

25 Ravindran V et al. (British Poultry Science (2000) 41:193-200) describe un estudio de la respuesta de pollos broiler a complementación con fitasa microbiana y se encontró que incrementaba la energía metabolizable aparente, fósforo y nitrógeno.

30 La patente de EEUU 2007/202088 describe una cepa aislada de *Bacillus* LSSAO1 que se puede administrar como un microorganismo de alimentación directa. La cepa se puede alimentar a un ave para incrementar bajo G+C, bacteria Gram positiva en la flora gastrointestinal del ave, o para inhibir un patógeno tal como *E. coli*, *Salmonella* o *Clostridium*. Estos beneficios pueden mejorar la conversión de alimento en aves.

La presente invención se refiere a combinaciones novedosas que sorprendentemente mejoran significativamente las características de rendimiento de producción en animales.

Compendio de la invención

35 Un descubrimiento trascendental de la presente invención es que un DFM en combinación con una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter* spp., (particularmente de *Citrobacter braakii*) tiene efectos significativamente beneficiosos sobre el rendimiento de un animal.

40 En particular, un descubrimiento trascendental de la presente invención es que un DFM en combinación con una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter* spp., (particularmente de *Citrobacter braakii*) tiene efectos significativamente beneficiosos sobre el rendimiento de un animal, que incluye mejora de uno o más de los siguientes: proporción de conversión del alimento (FCR), retención de nitrógeno, supervivencia, rendimiento de carcasa, velocidad de crecimiento, ganancia de peso, eficiencia alimentaria y resistencia de los animales a enteritis necrótica.

45 Otro efecto sorprendente de la presente invención es que puede reducir la excreción de nutrientes del estiércol (p. ej. reducir nitrógeno y fósforo) en el contenido del estiércol.

50 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de aditivo alimentario que comprende (o que consiste esencialmente en o que consiste en) un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter* spp. (particularmente de *Citrobacter braakii*), en la que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, y en la que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para mejorar la retención de nitrógeno, o para evitar los efectos negativos de enteritis necrótica o para mejorar la proporción de conversión del alimento (FCR) o para mejorar la ganancia de peso en un sujeto o para mejorar la eficacia alimentaria en un sujeto o para reducir la excreción de nutrientes en heces cuyo método comprende administrar a un sujeto un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter* spp. (particularmente de *Citrobacter braakii*), en la que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones, y en el que el sujeto es un ave.

Otro aspecto más de la presente invención es el uso de un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter* spp. (particularmente de *Citrobacter braakii*) para mejorar la retención de nitrógeno o para evitar los efectos negativos de enteritis necrótica o para mejorar la proporción de conversión del alimento (FCR) o para mejorar la ganancia de peso en un sujeto o para mejorar la eficacia alimentaria en un sujeto o para reducir la excreción de nutrientes en heces, en el que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones, y en el que el sujeto es un ave.

En un aspecto más de la presente invención se proporciona un kit que comprende un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter* spp. (particularmente de *Citrobacter braakii*), opcionalmente al menos una vitamina, opcionalmente al menos un mineral, e instrucciones para la administración, en el que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.

En otro aspecto la presente invención proporciona un método para preparar una composición de aditivo alimentario, que comprende administrar un microorganismo de alimentación directa (DFM) con una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter* spp. (particularmente de *Citrobacter braakii*) y (opcionalmente) envasar, en el que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.

Aún otro aspecto de la presente invención proporciona un alimento o producto alimentario que comprende una composición de aditivo alimentario según la presente invención.

La invención también proporciona una premezcla que comprende una composición de aditivo alimentario (o que consiste esencialmente en o consiste en) un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una fitasa derivable (preferentemente que deriva) de *Citrobacter* spp. (particularmente de *Citrobacter braakii*), y al menos un mineral y/o al menos una vitamina, en la que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un producto alimentario que comprende administrar un componente alimentario con una composición de aditivo alimentario según la presente invención.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a una composición de aditivo alimentario según la presente invención para prevenir y/o tratar coccidiosis y/o enteritis necrótica en aves.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una secuencia (SEC ID N° 1) para un polipéptido que tiene actividad fitasa (6-fitasa) de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 – el primer Xaa en la secuencia representa Gly y el segundo Xaa en la secuencia representa Pro. Los primeros 22 aminoácidos (subrayados) son un péptido señal que se adhieren a la proteína madura. Por tanto la proteína madura empieza en el aminoácido 23 de esta secuencia de aminoácidos. Por tanto la proteína madura es de 23-433. Esta enzima se vende comercialmente por DSM/Novozymes como Ronozyme HiPhos™.

La figura 2 muestra una secuencia (SEC ID N° 2) para un polipéptido que tiene actividad fitasa de *Citrobacter braakii* – el primer Xaa en la secuencia representa Gly y el segundo Xaa en la secuencia representa Pro. Los primeros 22 aminoácidos (subrayados) son un péptido señal que se adhieren a la proteína madura. Por tanto la proteína madura empieza en el aminoácido 23 de esta secuencia de aminoácidos. Por tanto la proteína madura es de 23-433.

La figura 3 muestra una secuencia (SEC ID N° 3) para una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa (6-fitasa). Los nucleótidos 67 a 1299 de SEC ID N° 3 codifican un polipéptido que tiene actividad fitasa (a saber el polipéptido mostrado en SEC ID N° 1) (donde aparece r significa g o a; y significa t/u o c; y s significa g o c).

- 5 La figura 4 muestra una secuencia (SEC ID N° 4) para una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa. Los nucleótidos 67 a 1299 de SEC ID N° 4 codifican un polipéptido que tiene actividad fitasa (a saber el polipéptido mostrado en SEC ID N° 2) (donde aparece r significa g o a; y significa t/u o c; y s significa g o c).

La figura 5 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 5) para un polipéptido que tiene actividad fitasa (6-fitasa) de *Citrobacter freundii*.

- 10 La figura 6 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 6) que codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa (a saber el mostrado en SEC ID N° 5).

La figura 7 muestra una secuencia de aminoácidos para un polipéptido que tiene actividad fitasa (6-fitasa) de *Citrobacter braakii* YH-15 (SEC ID N° 7).

- 15 La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 8) para un polipéptido que tiene actividad fitasa (6-fitasa) de *Peniphora lycii* expresado como *Aspergillus oryzae* – y vendido por DSM & Novozymes como Ronozyme P™.

La figura 9 muestra una secuencia (SEC ID N° 9) para un polipéptido que tiene actividad fitasa de *Citrobacter freundii* (UniProtKB/TrEMBL n° de acceso Q676V7).

- 20 La figura 10 muestra una secuencia (SEC ID N° 10) para un polipéptido que tiene actividad fitasa de *Citrobacter freundii* (EBI n° de acceso EM-PRO: AY390262).

La figura 11 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 11) que codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa (a saber el mostrado en SEC ID N° 10).

Descripción detallada de la invención

- 25 Preferentemente la enzima(s) usada en la presente invención es/son exógena al DFM. En otras palabras la enzima(s) preferentemente es/son añadida a o mezclada con el DFM.

- 30 A menos que se defina otra cosa, todas las técnicas y términos científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente comprende un experto en la técnica a la que pertenece la presente descripción. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley y Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan un recurso con un diccionario general de muchos de los términos usados en esta descripción.

Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo. A menos que se indique otra cosa, cualquier secuencia de ácidos nucleicos está escrita de izquierda a derecha con orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha con orientación de amino a carboxi, respectivamente.

- 35 Los títulos proporcionados en la presente memoria no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la presente descripción que se pueden tomar como referencia a las especificaciones en su conjunto. Por consiguiente, los términos que se definen a continuación están definidos más completamente en referencia a las especificaciones en su conjunto.

Los aminoácidos se nombran en la presente memoria usando el nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras o la abreviatura de una única letra.

- 40 El término "proteína", según se usa en la presente memoria, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos.

Como se usa en la presente memoria, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "enzima".

- 45 Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en la presente memoria. En la presente descripción y reivindicaciones, se pueden usar los códigos convencionales de una letra y tres letras para restos de aminoácidos. El código de 3 letras para aminoácidos según se define conforme con IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). También se entiende que un polipéptido se puede codificar por una o más secuencias de aminoácidos debido a la degeneración del código genético.

- 50 A lo largo de la presente especificación pueden aparecer otras definiciones de términos. También se entiende que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir sólo realizaciones particulares, y no

pretende ser limitante, ya que el ámbito de la presente descripción solo estará limitado por las reivindicaciones del anexo.

5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor que interviene, a la décima de la unidad del límite más bajo a menos que el contexto indique claramente otra cosa, también está específicamente descrito entre los límites más alto y más bajo de ese intervalo. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido en un intervalo establecido o valor que interviene en ese intervalo establecido se engloba en la presente descripción. Los límites más altos y más bajos de estos intervalos más pequeños pueden estar independientemente incluidos o excluidos en el intervalo, y cada intervalo donde alguno, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños también se engloban en la presente descripción, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o ambos de esos límites también están incluidos en la presente descripción.

10 Se debe señalar que como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones del anexo, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “una enzima” incluye una pluralidad de tales agentes candidatos y la referencia a “el alimento” incluye referencia a uno o más alimentos y sus equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y demás.

Las publicaciones discutidas en la presente memoria se proporcionan solamente para su descripción previa a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de la presente memoria debe ser tomado como admisión de que tales publicaciones constituyen técnica previa de las reivindicaciones del anexo.

20 Las enzimas para usar en la presente invención se pueden producir por cultivo o bien sólido o sumergido, incluyendo procesos en lotes, lotes alimentados o de flujo continuo. El cultivo se logra en un medio de crecimiento que comprende un medio acuoso de sales minerales, factores orgánicos de crecimiento, material de fuente de carbono y energía, oxígeno molecular, y, por supuesto, un inóculo de inicio de uno o más especies de microorganismos particulares que se van a emplear.

25 Microorganismos de alimentación directa (DFM)

El término “microbio” de la presente memoria se usa indistintamente con “microorganismo”.

El término “DFM” como se usa en la presente memoria significa microbio de alimentación directa.

Preferentemente el DFM comprende un microorganismo viable. Preferentemente el DFM comprende una bacteria viable.

30 El término “microorganismo viable” significa un microorganismo que es metabólicamente activo o capaz de diferenciarse.

En una realización el DFM puede ser una bacteria formadora de esporas y por consiguiente el término DFM puede estar comprendido por o contener esporas, p. ej., esporas bacterianas. Por lo tanto en una realización el término “microorganismo viable” como se usa en la presente memoria puede incluir esporas microbianas, tales como endosporas o conidias.

En otra realización el DFM en la composición de aditivo alimentario según la presente invención no comprende o no contiene esporas microbianas, p. ej., endosporas o conidia.

El microorganismo puede ser un microorganismo que se da de manera natural o puede ser un microorganismo transformado. El microorganismo también puede ser una combinación de microorganismos adecuados.

40 Preferentemente el DFM según la presente invención es un microorganismo probiótico.

Preferentemente el DFM es una bacteria de alimentación directa.

Preferentemente el DFM es una combinación que comprende dos o más bacterias, p. ej., tres o más o cuatro o más.

Preferentemente la bacteria o bacterias es o están aisladas.

En una realización el DFM se puede seleccionar a partir de *Bacillus* spp *Bacillus subtilis*.

45 En una realización el DFM puede ser una combinación que comprende dos o más cepas de *Bacillus subtilis*.

En una realización el DFM puede ser una combinación de dos o más de las cepas *Bacillus subtilis* 3A-P4 (PTA-6506); 15A-P4 (PTA-6507); 22C-P1 (PTA-6508); 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 NRRL-B-50104); BS 27 (NRRL B-50105); BS 18 (NRRL B-50633); y BS 278 (NRRL B-50634).

50 Las cepas 3A-P4 (PTA-6506), 15A-P4 (PTA-6507) y 22C-P1 (PTA-6508) están públicamente disponibles de American Type Culture Collection (ATCC).

Las cepas 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 NRRL-B-50104); BS 27 (NRRL B-50105) están públicamente disponibles de Agriculture Research Service Culture Collection (NRRL). La cepa de *Bacillus subtilis* LSSA01 algunas veces es referida como *B. subtilis* 8.

Estas cepas se muestran en la patente de EEUU 7.754.469 B2.

- 5 *Bacillus subtilis* BS18 y *Bacillus subtilis* BS 278 se depositaron por Andy Madisen de W227 N752 Westmound Dr. Waukesha, WI 53186, EEUU o Danisco USA Inc. de W227 N752 Westmound Dr. Waukesha, WI 53186, EEUU bajo el Tratado de Budapest en el Agriculture Research Service Culture Collection (NRRL) en 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, Estados Unidos de América, bajo los números de depósito NRRL B-50633 y NRRL B-50634, respectivamente el 9 de enero de 2012.
- 10 Andy Madisen de W227 N752 Westmound Dr. Waukesha, WI 53186, EEUU o Danisco USA Inc. de W227 N752 Westmound Dr. Waukesha, WI 53186, EEUU autorizan a Danisco A/S de Langebrogade 1, PO Box 17, DK-1001, Copenhagen K, Dinamarca a referirse a estos materiales biológicos depositados en esta solicitud de patente y han dado consentimiento sin reservas e irrevocable a que el material depositado esté disponible para el público.

- 15 En algunas realizaciones el DFM puede ser una combinación que comprende cepas de *Bacillus subtilis* según se detalla en la siguiente tabla:

Cepa de <i>B. subtilis</i>	Bs 2084	Bs 8 (LSA01)	Bs 3A-P4	Bs 15A-P4	Bs 278	Bs 18	Bs 22C-P1
Combinación DFM comprende	X	X	X	X			
	X	X	X				
	X	X			X		
	X	X		X			
	X		X	X			
		X	X	X			
	X	X				X	
			X	X			X
	X	X			X		

En una realización el DFM se puede seleccionar a partir de *Lactobacillus* spp, *Lactobacillus rhamnosus* o *Lactobacillus farciminis* y sus combinaciones.

El DFM según la presente invención comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.

- 20 La bacteria de alimentación directa usada en la presente invención puede ser del mismo tipo (género, especie y cepa) o puede comprender una mezcla de géneros, especies y/o cepas.

El DFM adecuado según la presente invención puede ser uno o más de los productos o de los microorganismos contenidos en esos productos según la siguiente tabla:

Nombre del producto	Empresa	Microorganismo(s)	Ingredientes simbióticos
Enviva Pro®, (antiguamente conocido como Avicorr®)	Danisco A/S	<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2084 n° de acceso NRRL B-50013, <i>Bacillus subtilis</i> cepa LSSA01 n° de acceso NRRL B-50104 y <i>Bacillus subtilis</i> cepa 15A-P4 ATCC n° de acceso PTA-6507	
Calsporin®	Calpis-Japan	<i>Bacillus subtilis</i> cepa C3102	
Clostat®	Kemin Industries Inc.	<i>Bacillus subtilis</i> cepa PB6	
Gallipro® & GalliproMax®	Chr. Hansen A/S	<i>Bacillus subtilis</i> cepa C3102	

Nombre del producto	Empresa	Microorganismo(s)	Ingredientes simbióticos
Proflora®	Alpharma Inc.	<i>Bacillus subtilis</i> cepa QST 713	β-mos β-manan oligosacáridos y β-glucanos
CSI®	Danisco A/S	cepa <i>Bacillus</i>	
Sorbiflore®	Danisco Nutrition	Animal <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus farciminis</i>	
Animavit®	KRKA	<i>Bacillus subtilis</i>	

En una realización adecuada el DFM puede ser Enviva Pro®. Enviva Pro® está disponible comercialmente de Danisco A/S y es una combinación de *Bacillus* cepa 2084 n° de acceso NRRI B-50013, *Bacillus* cepa LSSA01 n° de acceso NRRL B-50104 y *Bacillus* cepa 15A-P4 ATCC n° de acceso PTA-6507 (como muestra la patente de EEUU 7.754.469).

- 5 Preferentemente el DFM que se usa según la presente invención es un microorganismo que generalmente se reconoce como seguro y, que preferentemente está aprobado como GRAS.

Una persona experta enseguida apreciará especies y/o cepas específicas de microorganismos de los géneros descritos en la presente memoria que se usan en alimentación y/o industrias agrarias y que generalmente se consideran adecuadas para consumo animal.

- 10 Preferentemente, el DFM usado según la presente invención es uno que es adecuado para consumo animal.

Ventajosamente, donde el producto es un alimento o una composición de aditivo alimentario, el DFM viable debería permanecer eficaz a lo largo de la fecha "límite de venta" o "de caducidad" del producto durante la que el alimento o la composición de aditivo alimentario se ofrece para venta al consumidor. Los periodos de tiempo deseados y la vida útil variará de alimento a alimento y los expertos en la técnica reconocerán que el tiempo de vida útil variará con el tipo de alimento, el tamaño del alimento, temperaturas de almacenamiento, condiciones de procesado, material de envasado y equipamiento de envasado.

- 15

En algunas realizaciones es importante que el DFM sea tolerante al calor, es decir sea termotolerante. Este es el caso particular cuando el alimento se hace pellets. Por tanto en una realización el DFM puede ser un microorganismo termotolerante, tal como una bacteria termotolerante, incluyendo por ejemplo *Bacillus* spp.

En algunas realizaciones puede ser preferente que el DFM sea una bacteria que produce esporas, tal como Bacilli, p. ej., *Bacillus* spp. Bacilli son capaces de formar endosporas estables cuando las condiciones de crecimiento son desfavorables y son muy resistentes al calor, pH, humedad y desinfectantes.

5 En una realización el DFM según la presente invención puede ser una cepa inhibidora (o una cepa antipatógena). En una realización se puede usar el siguiente ensayo "ensayo DFM" para determinar la adecuación de un microorganismo para ser un DFM. Para evitar la duda en una realización un DFM seleccionado como una cepa inhibidora (o un DFM antipatógeno) según el "ensayo DFM" mostrado en la presente memoria es un DFM adecuado para usar según la presente invención, es decir en la composición de aditivo alimentario según la presente invención.

10 Ensayo DFM:

Cada tubo se sembró con un patógeno representativo de un grupo representativo

Se añadió el sobrenadante de un DFM potencial que creció aeróbicamente o anaeróbicamente a los tubos sembrados y se incubaron.

15 Tras la incubación, se midió para cada patógeno la densidad óptica (DO) de los tubos control y tratado con sobrenadante.

Las colonias de cepas (DFM potencial) que produjeron una DO más baja comparado con el control se clasificaron como una cepa inhibidora (o un DFM antipatógeno).

El ensayo DFM según se usa en la presente memoria se explica en más detalle en la patente de EEUU 2009/0280090.

20 Preferentemente el patógeno representativo usado en el ensayo es uno (o más) de los siguientes: *Clostridium*, tal como *Clostridium perfringens* y/o *Clostridium difficile*, y/o *E. coli* y/o *Salmonella* spp y/o *Campylobacter* spp. En una realización preferente el ensayo se lleva a cabo con uno o más de *Clostridium perfringens* y/o *Clostridium difficile* y/o *E. coli*, preferentemente *Clostridium perfringens* y/o *Clostridium difficile*, más preferentemente *Clostridium perfringens*.

25 En una realización el DFM de la presente invención es preferentemente un antipatógeno.

El término "antipatógeno" como se usa en la presente memoria significa que el DFM tiene un efecto (p. ej., un efecto negativo) de un patógeno.

30 En una realización para determinar si un DFM es un antipatógeno según la presente invención se puede usar el ensayo DFM mencionado anteriormente. Un DFM se considera que es un antipatógeno o un DFM antipatógeno si se clasifica como una cepa inhibidora en el ensayo DFM mencionado anteriormente, particularmente cuando el patógeno es *Clostridium perfringens*.

En una realización el DFM antipatógeno puede ser una o más de las siguientes bacterias:

Bacillus subtilis cepa 2084 n° de acceso NRRL B-50013,

Bacillus subtilis cepa LSSA01 n° de acceso NRRL B-50104,

35 *Bacillus subtilis* cepa 15A-P4 ATCC n° de acceso PTA-6507,

Bacillus subtilis cepa 3A-P4 ATCC n° de acceso PTA-6506, y

Bacillus subtilis cepa BS27 ATCC n° de acceso NRRL B-50105. Para evitar la duda estas cepas están disponibles y son referidas en la patente de EEUU 7.754.459 B.

40 En una realización el DFM usado según la presente invención no es *Lactobacillus gasseri* BNR 17 cepa con n° de acceso KCTC 10902BP como se muestra en la patente WO2008/016214.

Preferentemente el DFM no es un microorganismo inactivado.

45 En una realización el DFM como se usa en la presente memoria es una composición que comprende uno o más microorganismos DFM según se describe en la presente memoria. La composición adicionalmente puede comprender las enzimas de la presente invención. La composición puede alimentar a un animal como un microbio de alimentación directa (DFM). Se pueden añadir uno o más vehículo(s) u otros ingredientes al DFM. El DFM se puede presentar en formas físicas variadas, por ejemplo, como una cobertura, como un concentrado soluble en agua para usar como un empapador líquido o para añadir a un sustituto de leche, cápsula de gelatina o geles. En una realización de la forma de cobertura, se añade producto de fermentación liofilizado a un vehículo tal como suero, maltodextrina, sacarosa, dextrosa, piedra caliza (carbonato cálcico), cáscaras de arroz, cultivo de levadura, almidón

50 seco, y/o aluminio silicato de sodio. En una realización del concentrado soluble en agua para un empapador líquido

o complemento de sustituto de leche, se añade el producto de fermentación liofilizado a un vehículo soluble en agua, tal como suero, maltodextrina, almidón seco, aluminio silicato de sodio, y se añade un líquido para formar el empapador o el complemento a leche o un sustituto de leche. En una realización de la forma de cápsula de gelatina, se añade el producto de fermentación liofilizado a un vehículo, tal como suero, maltodextrina, azúcar, piedra caliza (carbonato cálcico), cáscaras de arroz, cultivo de levadura, almidón seco, y/o aluminio silicato de sodio. En una realización, la bacteria y el vehículo están incluidos en una cápsula de gelatina degradable. En una realización de la forma de geles, el producto de fermentación liofilizado se añade a un vehículo, tal como aceite vegetal, sacarosa, dióxido de silicio, polisorbato 80, propilén glicol, hidroxianisol butilato, ácido cítrico, etoxiquina, y/o colorantes artificiales para formar el gel.

El DFM(s) opcionalmente se puede administrar con una formulación seca de aditivos que incluyen pero no es limitante sustratos de crecimiento, enzimas, azúcares, hidratos de carbono, extractos y micro-ingredientes promotores de crecimiento. Los azúcares pueden incluir los siguientes: lactosa; maltosa; dextrosa; maltodextrina; glucosa; manosa; tagatosa; sorbosa; rafinosa; y galactosa. Los azúcares están de 50-95%, bien individualmente o en combinación. Los extractos pueden incluir levaduras o fermentación de levaduras secas solubles de 5-50%. Los sustratos de crecimiento pueden incluir: tripticasa, de 5-25%; lactato de sodio, de 5-30%; y, Tween 80, de 1-5%. Los hidratos de carbono pueden incluir manitol, sorbitol, adonitol y arabitól. Los hidratos de carbono están de 5-50% individualmente o en combinación. Los micro-ingredientes pueden incluir los siguientes: carbonato de calcio, de 0,5-5,0%; cloruro de calcio de 0,5-5,0%; fosfato de dipotasio, de 0,5-5,0%; fosfato de calcio, de 0,5-5,0%; proteinato de manganeso, de 0,25-1,00%; y, manganeso, de 0,25-1,0%.

Para preparar DFM(s) descrito en la presente memoria, el cultivo(s) y vehículo(s) (cuando se usa) se puede añadir a una mezcladora de cintas o palas y mezclar durante aproximadamente 15 minutos, aunque el tiempo se puede aumentar o disminuir. Los componentes se combinan de modo que resulta una mezcla uniforme de los cultivos y vehículos. El producto final preferentemente es un polvo seco, fluyente. El DFM(s) o composición que lo comprende después se puede añadir a un alimento animal o una premezcla alimentaria, añadir al agua del animal, o administrar por otras vías conocidas en la técnica (preferentemente simultáneamente con las enzimas de la presente invención). Un alimento para un animal se puede complementar con uno o más DFM(s) descrito en la presente memoria o con una composición descrita en la presente memoria.

Por “una mezcla de al menos dos cepas”, se entiende una mezcla de dos, tres, cuatro, cinco, seis, o incluso siete cepas. En algunas realizaciones de una mezcla de cepas, las proporciones pueden variar de 1% a 99%. Otras realizaciones de una mezcla de cepas son de 25% a 75%. Realizaciones adicionales de una mezcla de cepas son aproximadamente 50% de cada cepa. Cuando una mezcla comprende más de dos cepas, las cepas pueden estar presentes en proporciones significativamente iguales o en proporciones diferentes en la mezcla.

El DFM se puede dosificar apropiadamente.

Las dosis apropiadas de DFM en el alimento pueden estar entre aproximadamente 1×10^3 UFC/g de alimento a aproximadamente 1×10^9 UFC/g de alimento, apropiadamente entre aproximadamente 1×10^4 UFC/g de alimento a aproximadamente 1×10^8 UFC/g de alimento, apropiadamente entre aproximadamente $7,5 \times 10^4$ UFC/g de alimento a aproximadamente 1×10^7 UFC/g de alimento.

En una realización el DFM se dosifica en el producto alimentario a más de aproximadamente 1×10^3 UFC/g de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 1×10^4 UFC/g de alimento, apropiadamente más de aproximadamente $7,5 \times 10^4$ UFC/g de alimento.

Dosis apropiadas de DFM en la composición de aditivo alimentario pueden estar entre aproximadamente 1×10^5 UFC/g de composición a aproximadamente 1×10^{13} UFC/g de composición, apropiadamente entre aproximadamente 1×10^6 UFC/g de composición a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g de composición, apropiadamente entre aproximadamente $3,75 \times 10^7$ UFC/g de composición a aproximadamente 1×10^{11} UFC/g de composición.

En una realización el DFM se dosifica en la composición de aditivo alimentario a más de aproximadamente 1×10^5 UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 1×10^6 UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente $3,75 \times 10^7$ UFC/g de composición.

En una realización el DFM se dosifica en la composición de aditivo alimentario a más de aproximadamente 2×10^5 UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 2×10^6 UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente $3,75 \times 10^7$ UFC/g de composición.

Como se usa en la presente memoria el término “UFC” significa unidades formadoras de colonias y es una medida de las células viables en las que una colonia representa un agregado de células que derivan de una única célula progenitor.

Fitasa

El ácido fítico (royo-inositol hexaquisfostato) es un constituyente importante en cereales, legumbres y cultivos oleaginosos. La forma de sal, fitato, es la mayor forma de almacenamiento de fósforo en esas plantas.

Las fitasas catalizan la hidrólisis de fosfato monoéster del ácido fítico que da como resultado la formación escalonada de mio-inositol pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis-, y monofosfatos, así como la liberación de fosfato inorgánico.

5 El término "fitasa" significa una proteína o polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico incluyendo fitasa y liberar fosfato inorgánico. Las fitasas son capaces de hidrolizar, además de fitato, al menos uno de los fosfatos-inositol de grado de fosforilación intermedio.

La fitasa para usar en la presente invención se puede clasificar en 6-fitasa (clasificado como E.C. 3.1.3.26) o un 3-fitasa (clasificado como E.C. 3.1.3.8).

En una realización la fitasa es preferentemente un 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26).

10 La fitasa para usar en la presente invención es derivable (preferentemente deriva de) un *Citrobacter bacterium*.

La fitasa para usar en la presente invención es una fitasa de *Citrobacter*, preferentemente una fitasa de *Citrobacter braakii*.

15 En una realización la fitasa para usar en la presente invención es derivable, preferentemente deriva de, un *Citrobacter bacterium* seleccionado del grupo que consiste en: *Citrobacter braakii*, p.ej. *Citrobacter braakii* ATCC 51113; *Citrobacter freundii*, p.ej. *C. freundii* NCIMB 41247; *Citrobacter amalonaticus*, p.ej. *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25405 o *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25407; *Citrobacter gillenii*, p.ej. *Citrobacter gillenii* DSM 13694; *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter werkmanii*, *Citrobacter youngae*, o especies de *Citrobacter*

En una realización la fitasa es una *Citrobacterfitasa* que deriva de p.ej.,

20 • *Citrobacter braakii* ATCC 51113 según se describe en la patente WO2006/037328 – la secuencia de aminoácidos para la enzima se muestra en la presente memoria como SEC ID nº 1, así como sus variantes p.ej. según se describe en la patente WO2007/112739 y WO2011/117396,

• *Citrobacter braakii* YH-15 según se describe en la patente WO2004/085638 - la secuencia de aminoácidos para la enzima se muestra en la presente memoria como SEC ID nº 7.

25 • *Citrobacter freundii*, preferentemente *C. freundii* NCIMB 41247 y sus variantes p. ej. según se describe en la patente WO2006/038062 y WO2006/038128 o fitasas de *Citrobacter freundii* mostrada en UniProtKB/TrEMBL con nº de acceso Q676V7 (mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 9) o EBI nº de acceso EM-PRO:AY390262 (mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 10).

30 • *Citrobacter amalonaticus*, preferentemente *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25405 o *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25407 según se describe en la patente WO2006037327,

• *Citrobacter gillenii*, preferentemente *Citrobacter gillenii* DSM 13694 según se describe en la patente WO2006037327, o

• *Citrobacter intermedius*,

• *Citrobacter koseri*,

35 • *Citrobacter murlinae*,

• *Citrobacter rodentium*,

• *Citrobacter sedlakii*,

• *Citrobacter werkmanii*,

• *Citrobacter youngae*,

40 • *Citrobacter farmeri*.

En una realización preferente la fitasa para usar en la presente invención es la fitasa derivable o que deriva de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 según se describe en la patente WO2006/037328 y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 1, así como sus variantes p. ej. según se describe en la patente WO2007/112739 y WO2011/117396, o es la fitasa derivable o que deriva de *Citrobacter freundii*, preferentemente *C. freundii* NCIMB 41247 y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 5, o sus variantes p. ej. según se describe en la patente WO2006/038062 y WO2006/038128, o es la fitasa *Citrobacter freundii* mostrada en UniProtKB/TrEMBL con nº de acceso Q676V7 (mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 9) o es la fitasa *Citrobacter freundii* mostrada en EBI nº de acceso EM-PRO:AY390262 (mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 10), o es la fitasa que deriva o

derivable de *Citrobacter braakii* YH-15 según se describe en la patente WO2004/085638 y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 7 o sus variantes.

5 En una realización preferente la fitasa para usar en la presente invención es la fitasa (p. ej. 6-fitasa) derivable (o que deriva) de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 según se describe en la patente WO2006/037328, o una de sus variantes p.ej. según se describe en la patente WO2007/112739 y WO2011/117396.

La fitasa para usar en la presente invención comprende un polipéptido que tiene actividad fitasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID nº 1 o 2.

10 En una realización la fitasa para usar en la presente invención puede estar codificada por un polinucleótido, seleccionado a partir del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98,6% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 2; y (b) un polinucleótido que tiene 98,3% de igualdad con nucleótidos 67 a 1.299 de SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4.

La fitasa para usar en la presente invención puede estar codificada por un polinucleótido operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifican un péptido señal que consiste en (i) nucleótidos 1 a 66 de SEC ID nº 1 o (ii) nucleótidos 1 a 66 de SEC ID nº 3.

15 En algunas realizaciones la fitasa para usar en la presente invención puede tener una termoestabilidad indicada como actividad residual determinada dividiendo el sobrenadante en dos partes, una parte se incuba durante 30 minutos a 60°C, y la otra parte durante 30 minutos a 5°C, después se determina la actividad de ambos sobre fosfato p-nitrofenil a 37°C y pH 5,5, donde la actividad residual de la fitasa es la actividad de la muestra que se ha incubado a 60°C dividido por la actividad de la misma muestra que se ha incubado a 5°C, donde la actividad residual de la fitasa es al menos 105% de la actividad residual de la fitasa de referencia mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 1, medida en las mismas condiciones.

20

25 En algunas realizaciones la fitasa según se usa en la presente invención puede comprender al menos una alteración y no más de 4 alteraciones comparado con SEC ID nº 1 o SEC ID nº 2, en la que al menos una de dichas una a cuatro alteraciones se selecciona de los siguientes: 4P, 46E, 107G, 111P, 119K, 162C, 223E, 241 Q, 273L, 276K, 379K, 385D, 91C/46C, 52C/99C, 31C/176C, 31C/177C, 59C/100C, 141C/199C, 162C/247C, 111P/241Q, 31C, 119K, 202N, 286Q y 362K,R.

30 En algunas realizaciones la fitasa según se usa en la presente invención puede comprender al menos una alteración y no más de 4 alteraciones comparado con SEC ID nº 1 o SEC ID nº 2, en la que al menos una de dichas una a cuatro alteraciones se selecciona de los siguientes: 91C/46C, 52C/99C, 31C/176C, 31C/177C, 59C/100C, 141C/199C, 162C/247C, 111P/241Q.

En una realización preferente la fitasa para usar en la presente invención es la fitasa vendida comercialmente como Ronozyme HiPhos™.

La enzima Ronozyme HiPhos™ tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 1 en la presente memoria.

35 En una realización la fitasa para usar en la presente invención es la fitasa de *Citrobacter braakii* YH-15 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 7.

40 En una realización la fitasa puede ser una fitasa de *Citrobacter freundii*, tal como la enzima(s) fitasa mostrada en la patente WO2006/038128, o es la fitasa de *Citrobacter freundii* mostrada en mostrada en UniProtKB/TrEMBL con nº de acceso Q676V7 (mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 9), o es la fitasa *Citrobacter freundii* mostrada en EBI nº de acceso EM-PRO:AY390262 (mostrada en la presente memoria como SEC ID nº 10).

En una realización la fitasa puede ser una fitasa de *Citrobacter freundii*, tal como la enzima(s) fitasa mostrada en la patente WO2006/038128.

En una realización la fitasa para usar en la presente invención puede comprender la secuencia de aminoácidos según se muestra en SEC ID nº5; SEC ID nº 9 o SEC ID nº 10.

45 En una realización la fitasa para usar en la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos según se muestra en SEC ID nº 5 que es una fitasa de *Citrobacter freundii* o una secuencia que tenga al menos 90% de igualdad; en la que dicho polipéptido comprende una combinación de mutaciones seleccionada a partir del grupo que consiste en: R288M; K46E/Q82H/E168D/Q274L; Q82K/T154I/Q279E/N308T; Q82R/D112V/Q274H/T362A; D53N/D57Y/T199I/P229S/R288M; K46E/Q82H/N148D/T154I/T362I; D53N/D57Y/P229S/R288M/K358R; D53N/D57Y/T154I/P229S/R288M; K46E/Q82H/N95D/D112V/K142R/D383V; D53N/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P; D53K/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/F88Y/M152V/P229S/Q279E/N308T; D53N/D57Y/M152V/E204V/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/M152V/T154I/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/Q82H/G103E/M152V/P229S/R288M/A393P; K46E/D53N/D57Y/T1431/M152V/L176V/P229S/R288M/A393P;

50

Q82K/F88Y/N96P/Q97T/T98G/V105I/Q274H/Q279E/A393P;
 Q82R/F88Y/N95P/N96P/Q97T/Q279E/I384L/P386Q/A393P;
 H18Q/D53N/D57Y/E75V/M152V/A170T/P229S/R288M/Q385R/A393P;
 Q82K/F88Y/N96P/T98G/Y136N/M152V/Y177F/T362I/I384F/A393P/D397N;

5 D53N/D57Y/F88Y/N95P/N96P/V105I/D112V/Y136N/N148D/N164D/Q274H/T362I/I384L/A39 3P;
 D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N95P/P102L/V105I/Y136N/N 148D/Y177F/Q274H/Q279E/T362I/A3 93P;
 D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N96P/T98G/V105I/D112V/Y177F/Q274L/G343A/T362I/I384L/A393 P; E23K/K46E/Q82H;
 K46E/Q82H/Q385R; D53N/D57Y/E75V/M152V/A170T/P229S/R288M/Q385R/A393P; numerado según la
 10 numeración en SEC ID nº5, y en la que el polipéptido aislado tiene termoestabilidad incrementada comparado con
 un polipéptido que tiene la secuencia establecida en SEC ID nº5.

En una realización la fitasa para usar en la presente invención puede comprender la secuencia de aminoácidos según se muestra en SEC ID nº7.

15 En una realización preferentemente la fitasa de *Citrobacter* según la presente invención tiene un pH óptimo en el intervalo de 3-4,5. En una realización preferentemente la fitasa *Citrobacter* según la presente invención alcanza su actividad más alta en el intervalo de pH de aproximadamente 3-3,5.

Tanto *Citrobacter braakii* ATCC 51113 según se describe en la patente WO2006/037328 (incorporado en la presente memoria como referencia) – la secuencia de aminoácidos para la enzima se muestra en la presente memoria como SEC ID nº1 como *Citrobacter braakii* YH-15 según se describe en la patente WO2004/085638 – la secuencia de aminoácidos para la enzima se muestra en la presente memoria como SEC ID nº7 tienen un pH óptimo en el
 20 intervalo 3-4,5.

Citrobacter braakii ATCC 51113 según se describe en la patente WO2006/037328 (incorporado en la presente memoria como referencia) – la secuencia de aminoácidos para la enzima se muestra en la presente memoria como SEC ID nº1 también alcanza su actividad más alta en el intervalo de pH de aproximadamente 3-3,5.

25 *Citrobacter braakii* YH-15 según se describe en la patente WO2004/085638 – la secuencia de aminoácidos para la enzima se muestra en la presente memoria como SEC ID nº7 tiene su actividad más alta a pH de aproximadamente 4.

Apropiadamente se puede usar más de una fitasa en combinación, p.ej. 2 o 3 fitasas.

30 En la presente invención también se contempla que se puede usar en combinación más de una fitasa de *Citrobacter* (p. ej. de la misma o diferentes especies o cepas). Alternativamente, la al menos una fitasa de *Citrobacter* según se detalla en la presente memoria se puede usar en combinación con una o más fitasas de *no-Citrobacter*.

En una realización preferentemente la fitasa de *Citrobacter* usada en la presente invención es una 6-fitasa.

En una realización preferentemente la fitasa de *Citrobacter* usada en la presente invención no se usa en combinación con otra fitasa, p.ej. una fitasa de *Citrobacter* o una fitasa de *no-Citrobacter*.

35 Preferentemente, la fitasa está presente en el producto alimentario en el intervalo de aproximadamente 200 FTU/kg a aproximadamente 1.000 FTU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 300 FTU/kg de alimento a aproximadamente 750 FTU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 400 FTU/kg de alimento a aproximadamente 500 FTU/kg de alimento.

40 En una realización la fitasa está presente en el producto alimentario en más de aproximadamente 200 FTU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 300 FTU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 400 FTU/kg de alimento.

En una realización la fitasa está presente en el producto alimentario en menos de aproximadamente 1.000 FTU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 750 FTU/kg de alimento.

45 Preferentemente, la fitasa está presente en la composición de aditivo alimentario en el intervalo de aproximadamente 40 FTU/g a aproximadamente 40.000 FTU/g de composición, más preferentemente de aproximadamente 80 FTU/g de composición a aproximadamente 20.000 FTU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 100 FTU/g de composición a aproximadamente 10.000 FTU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 200 FTU/g de composición a aproximadamente 10.000 FTU/g de composición.

50 En una realización la fitasa está presente en la composición de aditivo alimentario en más de aproximadamente 40 FTU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 60 FTU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 100 FTU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 150 FTU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 200 FTU/g de composición.

En una realización la fitasa está presente en la composición de aditivo alimentario en menos de aproximadamente 40.000 FTU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 20.000 FTU/g de composición,

apropiadamente menos de aproximadamente 15.000 FTU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 10.000 FTU/g de composición.

5 Se entenderá que según se usa en la presente memoria 1 FTU (unidad de fitasa) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de ortofosfato inorgánico a partir de un sustrato en un minuto bajo las condiciones de reacción definidas en la prueba de fitasa ISO 2009 – Una prueba estándar para determinar la actividad fitasa y 1 FTU se puede encontrar en *International Standard ISO/DIS 30024: 1-17, 2009*.

En una realización apropiada la enzima se clasifica usando la clasificación E.C. anterior, y la clasificación E.C. señala una enzima que tiene esa actividad cuando se prueba en el ensayo mostrado en la presente memoria para determinar 1 FTU.

10 Ventajas

Sorprendentemente se encontró que fitasas de *Citrobacter* (en particular fitasas de *Citrobacter braakii* y/o fitasas de *Citrobacter freundii*) en combinación con DFMs mejoran la resistencia del sujeto a enteritis necrótica, p. ej. que se puede ver una reducción de los puntos de lesión por ejemplo.

15 Lo que es particularmente sorprendente es que las fitasas de *Citrobacter* (p. ej. de *Citrobacter braakii* y/o de *Citrobacter freundii*) como se muestra anteriormente en la presente memoria mejoran la resistencia del sujeto a enteritis necrótica más que otras fitasas conocidas (p. ej. de organismos no-*Citrobacter*) conocidos en la técnica cuando se combinan con un DFM.

20 En una realización el efecto es incluso más pronunciado con la fitasa de *Citrobacter braakii* vendida como Ronozyme HiPhos™ según se muestra en la presente memoria comparado con fitasas de otras cepas de *Citrobacter braakii* (p.ej. fitasa de *C. braakii* de la cepa YH-15 – cuya secuencia se muestra en la presente memoria como SEC ID n°7) – que fue completamente inesperado.

25 De nuevo si desear ser limitante de la teoría una sugerencia de cómo la combinación de fitasas de *Citrobacter* y DFMs proporcionan sorprendentemente mejores resultados comparado con otras fitasas y DFMs es que fitasas de *C. braakii* tienen una actividad más alta a pH más bajos (p. ej. 3,5-4,5) comparado con otras fitasas de no-*Citrobacter*. Como la primera parte del tracto gastrointestinal (GI) de animales de granja monogástricos, p. ej., porcino o aves, tiene un pH bajo – las fitasas de *C. braakii* parecen tener más actividad en esta parte del tracto GI de modo que estas fitasas son capaces de liberar fósforo y otros nutrientes, tales como proteína, mucho más deprisa a partir de sustrato de fitasa comparado con algunas otras fitasas de no-*Citrobacter*. Esto es ventajoso de muchas maneras, incluyendo que es deseable actuar sobre la fitasa tan pronto como sea posible ya que tiene tendencia a formar complejos con otras sustancias tales como minerales y proteínas, particularmente a medida que el pH aumenta. Una vez que la fitasa forma complejos puede ser menos accesible a la rotura por las enzimas. Por tanto es deseable actuar sobre el sustrato de fitasa sobre el inicio del tracto GI cuando el pH es aún bajo. Sin embargo la rotura de la fitasa en la parte inicial del tracto GI significa que ahí puede haber menos fósforo disponible en el yeyuno y la parte más baja del tracto GI que puede tener un impacto negativo sobre la población de comensales de bacteria “buena” tal como el *Lactobacilli* (que se ha mostrado que tiene efectos beneficiosos tal como modulación inmune y la producción de ácidos orgánicos que bajan el pH intestinal). Este impacto negativo sobre bacteria “buena” residente puede dar como resultado que florezcan patógenos oportunistas – alterando el equilibrio global de bacterias en la tripa.

40 En relación con la presente invención, sorprendentemente se ha encontrado que el impacto negativo del uso de fitasas de *C. braakii* se puede solucionar combinando su uso con uno o más DFM. El DFM reestablece el equilibrio de bacterias en la tripa – llevando así a reducir el daño en la tripa debido a bacterias patógenas y a un rendimiento más alto del sujeto animal.

45 De nuevo si desear ser limitante de la teoría una sugerencia más de cómo la combinación de fitasas de *Citrobacter* y DFMs proporcionan sorprendentemente mejores resultados comparado con otras fitasas y DFMs es que fitasas de *Citrobacter braakii* tienen una actividad más alta a pH más bajos (p. ej. 3,5-4,5) comparado con otras fitasas de no-*Citrobacter*. Como la primera parte del tracto gastrointestinal (GI) tiene un pH bajo – las fitasas de *C. braakii* parecen tener más actividad en esta parte del tracto GI. Esto puede mejorar la digestión de proteína de un sujeto debido a que el fitato puede formar complejos uniéndose a proteínas. El resultado de este incremento inicial en la absorción de proteínas puede dar como resultado que el animal produzca menos ácido hidrociorhídrico (HCl) – esto puede tener un impacto negativo posterior en el tracto GI ya que puede incrementar el pH en la última parte del tracto GI. El incremento del pH en la última parte del tracto GI no es ventajoso ya que incrementa las oportunidades de que los patógenos sean capaces de establecerse en la tripa. Sorprendentemente los presentes inventores han encontrado que estos efectos negativos de usar fitasas de *Citrobacter* se pueden solucionar combinándolas con DFMs.

55 Sorprendentemente la 6-fitasa de la cepa *C. braakii* ATCC 51113 (con la secuencia de aminoácidos SEC ID n°1) tiene influencia incluso más positiva que incluso otras enzimas 6-fitasa de *C. braakii* tal como 6-fitasa de cepa *C. braakii* YH-15 (con la secuencia de aminoácidos SEC ID n°7).

Formulación del DFM con la enzima

El DFM y las enzimas se pueden formular de cualquier manera apropiada para asegurar que la formulación comprende DFM's viables y una enzima activa.

En una realización el DFM y enzimas se pueden formular como un líquido, un polvo seco o un gránulo.

5 El polvo seco o gránulos se pueden preparar por medios conocidos por los expertos en la técnica, tal como, revestimiento en lecho fluidizado, revestimiento Wurster o por granulado en tambor (p. ej. granulado de alto cizallamiento), extrusión, revestimiento en bandeja o una mezcladora de microingredientes.

10 Para algunas realizaciones el DFM y/ la enzima(s) se pueden revestir, por ejemplo encapsular. Apropiadamente el DFM y enzimas se pueden formular con el mismo revestimiento o encapsulado en la misma cápsula. Alternativamente una o ambas enzimas se pueden formular con el mismo revestimiento o encapsulado en la misma cápsula y el DFM se podría formular en un revestimiento separado de una o ambas enzimas. En algunas realizaciones, tal como cuando el DFM es capaz de producir endosporas, el DFM se puede proporcionar sin ningún revestimiento. En tales circunstancias, las endosporas de DFM simplemente se pueden mezclar con una o ambas enzimas. En el último caso, las enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular, por ejemplo una o ambas enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular. Las enzimas se pueden encapsular como mezclas (es decir comprende una o 15 ambas) de las enzimas o se pueden encapsular por separado, p. ej. como enzimas solas. En una realización preferente ambas enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular, juntas.

En una realización el revestimiento protege las enzimas del calor y se puede considerar un termoprotector.

20 En una realización la composición de aditivo alimentario se formula como un polvo seco o gránulos según se describe en la patente WO2007/044968 (referido como gránulos TPT) o la patente WO1997/016076 o la patente WO1992/012645 (cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia).

25 En un aspecto un alimento de la presente invención comprende una composición alimentaria peletizada tratada con vapor que comprende un gránulo que comprende un centro y uno o más revestimientos. El centro puede ser un gránulo de sal o similar sobre el que se puede pulverizar una disolución de enzimas de modo que se forma una capa sobre él. El centro comprende uno o más compuestos activos, tal como al menos la fitasa y/o DFM de la presente invención. Al menos uno de los revestimientos puede ser un revestimiento de barrera a humedad. En algunas realizaciones al menos uno de los revestimientos comprende una sal. Para ciertas realizaciones, los gránulos son aproximadamente de 210 a 390 μm de tamaño. En algunas realizaciones, los gránulos pueden ser de hasta 450 μm o más de tamaño o hasta 500 μm o más de tamaño. Ejemplos de tal realización se puede encontrar en las patentes WO 2006/034710, WO 00/01793, WO99/32595, WO 2007/044968, WO 00/47060, WO 03/059086, WO 03/059087, 30 WO 2006/053564 y EEUU 2003/0054511.

35 Una sal preferente para el revestimiento de los pelets es una o más de las que se describen en la patente WO2006/034710. Ejemplos de sales preferentes para revestir los pelets incluyen una o más de: Na_2SO_4 , NaCl , Na_2CO_3 , NaNO_3 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KNO_3 , K_2SO_4 , KHSO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 y citrato de sodio o sus mezclas. Para algunos aspectos, ejemplos de más sales preferentes para revestir los pelets incluyen uno o más sulfatos, tal como uno o más Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2SO_4 , KHSO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 o sus mezclas. Para algunos aspectos, ejemplos de más sales preferentes para revestir los pelets incluyen uno o más Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y MgSO_4 o sus mezclas. Para algunos aspectos, una sal preferente para revestir los pelets es o incluye al menos Na_2SO_4 .

40 En ciertos aspectos el alimento de la presente invención comprende un gránulo que comprende un centro, en el que el centro comprende al menos una fitasa y/o DFM según la presente invención, y en el que el centro se reviste con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende una barrera a humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo peletizado tratado con vapor.

45 En ciertos aspectos el alimento de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un centro que comprende al menos una fitasa y/o DFM según la presente invención, y en el que el centro se reviste con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende una sal que es capaz de actuar como una barrera a humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo peletizado tratado con vapor.

50 En ciertos aspectos el alimento de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un centro que comprende al menos una fitasa y/o DFM según la presente invención, y en el que el centro se reviste con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más de Na_2SO_4 , NaCl , Na_2CO_3 , NaNO_3 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KNO_3 , K_2SO_4 , KHSO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 y citrato de sodio o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo peletizado tratado con vapor.

55 En ciertos aspectos el alimento de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un centro que comprende al menos una fitasa y/o DFM según la presente invención, y en el que el centro se reviste con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más sulfatos, tal como

uno o más Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo peletizado tratado con vapor.

5 En ciertos aspectos el alimento de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un centro que comprende al menos una fitasa y/o DFM según la presente invención, y en el que el centro se reviste con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ y MgSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo peletizado tratado con vapor.

10 En ciertos aspectos el alimento de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un centro que comprende al menos una fitasa y/o DFM según la presente invención, y en el que el centro se reviste con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos es o incluye al menos Na₂SO₄. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo peletizado tratado con vapor.

15 En una realización la composición de aditivo alimentario se puede formular como un gránulo para composiciones alimentarias que comprenden: un centro; un agente activo; y al menos un revestimiento, el agente activo del gránulo retiene al menos 50% de actividad, al menos 60% de actividad, al menos 70% de actividad, al menos 80% de actividad después de las condiciones seleccionadas de una o más de a) un proceso de peletizar alimento, b) un proceso de pretratamiento del alimento con vapor caliente, c) almacenamiento, d) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla sin peletizar, y e) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla base de alimento o un premezcla de alimento que comprende al menos un compuesto seleccionado de trazas de minerales, ácidos orgánicos, azúcares reducidos, vitaminas, cloruro de colina, y compuestos que dan como resultado una mezcla base de alimento o un premezcla de alimento un ácido o básico.

20

En relación al gránulo al menos un revestimiento puede comprender un material hidratante húmedo que constituya al menos 55% p/p del gránulo; y/o al menos un revestimiento puede comprender dos revestimientos. Los dos revestimientos pueden ser un material hidratante húmedo y un revestimiento barrera a humedad. En algunas realizaciones el revestimiento hidratante húmedo puede estar entre 25% y 60% p/p del gránulo y el revestimiento barrera a humedad puede estar entre 2% y 15% p/p del gránulo. El revestimiento hidratante húmedo se puede seleccionar a partir de sales inorgánicas, sacarosa, almidón, y maltodextrina y el revestimiento barrera a humedad se puede seleccionar a partir de polímeros, gomas, suero y almidón.

25

El gránulo se puede producir usando un proceso de peletizar alimentos y el proceso de pretratamiento del alimento se puede llevar a cabo entre 70°C y 95°C durante varios minutos, tal como entre 85°C y 95°C.

30 En una realización la composición de aditivo alimentario se puede formular como un gránulo para alimentación animal que comprende: un centro; un agente activo, el agente activo del gránulo retiene al menos 80% de actividad después de almacenamiento y después del proceso de peletizar con vapor caliente donde el gránulo es un ingrediente; un revestimiento de barrera a humedad; un revestimiento hidratante húmedo que es al menos 25% p/p del gránulo, el gránulo tiene una actividad del agua de menos de 0,5 antes del proceso de peletizar con vapor caliente.

35

El gránulo puede tener un revestimiento de barrera a humedad seleccionado de polímeros y gomas y el material hidratante húmedo puede ser una sal inorgánica. El revestimiento hidratante húmedo puede estar entre 25% y 45% p/p del gránulo y el revestimiento de barrera húmeda puede estar entre 2% y 10% p/p del gránulo.

40 El gránulo se puede producir usando un proceso de peletizar con vapor caliente que se puede llevar a cabo entre 85°C y 95°C durante varios minutos.

En algunas realizaciones el DFM (p. ej. endosporas de DFM por ejemplo) se pueden diluir usando un diluyente, tal como polvo de almidón, piedra caliza o similar.

En una realización, la composición es un líquido adecuado para consumo preferentemente tal líquido para consumo contiene uno o más de los siguientes: un tampón, sal, sorbitol y/o glicerol.

45 En otra realización la composición aditiva alimentaria se puede formular aplicando, p. ej. pulverizando, la enzima(s) sobre un sustrato vehículo, tal como trigo molido por ejemplo.

En una realización la composición de aditivo alimentario según la presente invención se puede formular como una premezcla. A modo sólo de ejemplo la premezcla puede comprender uno o más componentes alimentarios, tal como uno o más minerales y/o uno o más vitaminas.

50 En una realización el DFM y/o enzimas para usar en la presente invención se formulan con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado a partir de al menos uno de maltodextrina, piedra caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o un componente de trigo, sacarosa, almidón, Na₂SO₄, Talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbiato, glicerol, sacarosa, propilén glicol, 1,3-propano diol, glucosa, parabenos, cloruro sódico, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formato y sus mezclas.

Envasado

En una realización la composición de aditivo alimentario y/o premezcla y/o alimento o producto alimentario según la presente invención se envasa.

5 En una realización preferente la composición de aditivo alimentario y/o premezcla y/o alimento o producto alimentario se envasa en una bolsa, tal como una bolsa de papel.

En una realización alternativa la composición de aditivo alimentario y/o premezcla y/o alimento o producto alimentario se puede sellar en un recipiente. Se puede usar cualquier recipiente adecuado.

Alimento

10 La composición de aditivo alimentario de la presente invención se puede usar como – o en la preparación de – un alimento.

El término “alimento” se usa en la presente memoria como sinónimo de “producto alimentario”.

El alimento puede estar en la forma de una disolución o como un sólido – dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

15 Cuando se usa como – o en la preparación de – un alimento – tal como alimento funcional – la composición de la presente invención se puede usar en conjunción con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente nutricionalmente activo.

En una realización preferente la composición de aditivo alimentario de la presente invención se mezcla con un componente alimentario para formar un producto alimentario.

20 El término “componente alimentario” como se usa en la presente memoria significa todo o parte de un producto alimentario. Parte del producto alimentario puede significar un constituyente del producto alimentario, p. ej. 2, o 3 o 4. En una realización el término “componente alimentario” engloba una premezcla o constituyentes de premezcla.

25 Preferentemente el alimento puede ser un forraje o una premezcla del mismo, un compuesto alimentario, o una premezcla del mismo. En una realización la composición de aditivo alimentario según la presente invención se puede mezclar con un componente alimentario, un componente de compuesto alimentario o una premezcla de un componente alimentario o un forraje, un componente de forraje, o una premezcla de un forraje.

El término forraje como se usa en la presente memoria significa cualquier alimento que se proporciona a un animal (antes de que el animal lo tenga que buscar por sí mismo). El forraje engloba plantas que se han cortado.

30 El término forraje incluye heno, paja, ensilado, alimentos comprimidos y peletizados, aceites y raciones mezcladas, y también granos germinados y legumbres.

35 El forraje se puede obtener de una o más de las plantas seleccionadas de: alfalfa (lucerne), cebada, trébol zapaticos, brasicas, Chau moellier, berza, semilla de colza (canola), nabo sueco, nabo, trébol, trébol Alsike, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco, hierba, hierba avena falsa, festuca, hierba Bermuda, bromo, dantonía, poa (de mezclas naturales de céspedes), dactilis, lolium, phleum pratense, maíz (maize), avenas, sorgo, soja, árboles (cortes de poda para henificar), trigo, y legumbres.

El término “alimento compuesto” significa un alimento comercial en la forma de una harina, un pelet, nuez, pastel o un crujiente. Los alimentos compuestos se pueden combinar a partir de varias materias primas y aditivos. Estas formulaciones se combinan según los requerimientos específicos del animal objetivo.

40 Los alimentos compuestos pueden ser alimentos completos que proporcionan todos los nutrientes requeridos diariamente, concentrados que proporcionan una parte de la ración (proteína, energía) o complementos que solo proporcionan micronutrientes adicionales, tales como minerales y vitaminas.

Los ingredientes principales usados en alimentos compuestos son los granos de alimentos, que incluyen maíz, soja, sorgo, avenas, almidón y cebada.

45 Adecuadamente una premezcla según se refiere en la presente memoria puede ser una composición compuesta de microingredientes tales como vitaminas, conservantes químicos, antibióticos, productos de fermentación, y otros ingredientes esenciales. Las premezclas usualmente son composiciones adecuadas para combinaciones en raciones comerciales.

50 Cualquier producto alimentario de la presente invención puede comprender uno o más materiales alimentarios seleccionados del grupo que comprende a) cereales, tales como granos pequeños (p. ej. trigo, cebada, arroz, avenas y sus combinaciones) y/o cereales grandes tales como maíz o sorgo; b) subproductos de cereales, tal como

- 5 harina de gluten de maíz, granos y solubles de maíz (DDGS), salvado de trigo, harinillas de trigo, restos de trigo, salvado de arroz, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, nuez de palmera, y pulpa de cítrico; c) proteína obtenida de fuentes tales como soja, girasol, cacahuete, altramuza, guisantes, habas, algodón, colza, harina de pescado, proteína de plasma seco, harina de carne y hueso, proteína de patata, suero, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidas de fuentes animales y vegetales; e) minerales y vitaminas.
- Un producto alimentario de la presente invención puede contener al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% o al menos 60% en peso de harina de maíz y soja o maíz y grasa de soja, o harina de trigo o harina de girasol.
- Además o de modo alternativo, un producto alimentario de la presente invención puede comprender al menos un material alimentario rico en fibra y/o al menos un subproducto del al menos un material rico en fibra para proporcionar un producto alimentario rico en fibra. Ejemplos de materiales alimentarios ricos en fibra incluyen: trigo, cebada, arroz, avenas, subproductos de cereales, tales como harina de gluten de maíz, granos y solubles de maíz (DDGS), salvado de trigo, harinillas de trigo, restos de trigo, salvado de arroz, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, nuez de palmera, y pulpa de cítrico. Algunas fuentes de proteína también se pueden considerar ricas en fibra: proteína obtenida de fuentes tales como girasol, altramuza, habas y algodón.
- 15 En la presente invención el alimento puede ser uno o más de los siguientes: un alimento compuesto y premezcla, que incluye pelets, nueces o alimento (para ganado); un cultivo o residuo de cultivo: maíz, soja, sorgo, avenas, cebada, rastrojo de maíz, copra, paja, cáscaras, desechos de remolacha azucarera; harina de pescado; hierba recién cortada y otras plantas forrajeras; harina de carne y hueso; melazas; pastel oleoso y pastel prensado; oligosacáridos; plantas forrajeras conservadas: heno y silo; algas; semillas y granos, o bien enteros o preparados por triturado, molido, etc.: granos germinados y legumbres; extracto de levadura.
- 20 Como se usa en la presente memoria el término “en contacto” se refiere a la aplicación indirecta o directa de la composición de la presente invención al producto (p. ej. al alimento). Ejemplos de métodos de aplicación que se pueden usar, incluyen, pero no son limitantes, tratar el producto en un material que comprende la composición de aditivo alimentario, aplicación directa por mezclado de la composición de aditivo alimentario con el producto, pulverizar la composición de aditivo alimentario sobre la superficie del producto o empapar el producto en una preparación de la composición de aditivo alimentario.
- 25 En una realización la composición de aditivo alimentario de la presente invención preferentemente se mezcla con el producto (p. ej. producto alimentario). Alternativamente, la composición de aditivo alimentario se puede incluir en la emulsión o ingredientes crudos de un producto alimentario.
- 30 Para algunas aplicaciones, es importante que la composición esté disponible sobre o en la superficie de un producto que se va a afectar/tratar. Esto permite a la composición impartir una o más de las siguientes características favorables: beneficios de rendimiento.
- Las composiciones de aditivo alimentario de la presente invención se pueden aplicar para entremezclar, cubrir y/o impregnar un producto (p. ej. producto alimentario o ingredientes crudos de un producto alimentario) con una cantidad controlada de DFM y enzimas.
- 35 El DFM y enzimas se pueden usar simultáneamente (p. ej. cuando están mezclados juntos o incluso cuando se suministran por diferentes rutas) o secuencialmente (p. ej. cuando se pueden suministrar por diferentes rutas). En una realización preferentemente el DFM y enzimas se aplican simultáneamente. Preferentemente el DFM y enzimas se mezclan antes de suministrarse a un producto alimentario o a un ingrediente crudo de un producto alimentario.
- 40 El DFM en composiciones de aditivo alimentario según la presente invención – se puede añadir en concentraciones adecuadas – tal como por ejemplo en concentraciones en el producto alimentario final que ofrecen una dosis diaria entre aproximadamente 2×10^5 UFC a aproximadamente 2×10^{11} UFC, adecuadamente entre aproximadamente 2×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} , adecuadamente entre aproximadamente $3,75 \times 10^7$ UFC a aproximadamente 1×10^{10} UFC.
- 45 Preferentemente, la composición de aditivo alimentario de la presente invención será estable térmicamente a tratamiento térmico de hasta aproximadamente 70°C; hasta aproximadamente 85°C; o hasta aproximadamente 95°C. El tratamiento térmico se puede llevar a cabo durante hasta aproximadamente 1 minuto; hasta aproximadamente 5 minutos; hasta aproximadamente 10 minutos; hasta aproximadamente 30 minutos; hasta aproximadamente 60 minutos. El término estable térmicamente significa que al menos aproximadamente 75% de los componentes de enzima y/o DFM que estaban presentes/activos en el aditivo antes de calentar a la temperatura especificada aún están presentes/activos después de que se enfríe a temperatura ambiente. Preferentemente, al menos aproximadamente 80% de los componentes de enzima y/o DFM que estaban presentes y activos en el aditivo antes de calentar a la temperatura especificada están aún presentes y activos después de que se enfríe a temperatura ambiente.
- 50
- 55 En una realización particularmente preferente la composición de aditivo alimentario se homogeniza para producir un polvo.

En una realización alternativa preferente, la composición de aditivo alimentario se formula en gránulos según se describe en la patente WO2007/044968 (referidos como gránulos TPT).

5 En otra realización preferente cuando la composición de aditivo alimentario se fórmula en gránulos los gránulos comprenden una sal de barrera hidratada que cubre el centro de proteína. La ventaja de tal recubrimiento de sal es mejorar la termotolerancia, mejorar la estabilidad a almacenamiento y proteger frente a otros aditivos alimentarios que de otro modo tienen efecto adverso sobre la enzima y/o DFM.

Preferentemente, la sal usada para el recubrimiento de sal tiene una actividad del agua mayor de 0,25 o humedad constante mayos de 60% a 20°C.

Preferentemente, el recubrimiento de sal comprende Na₂SO₄.

10 El método para preparar una composición de aditivo alimentario también puede comprender el paso posterior de peletizar el polvo. El polvo se puede mezclar con otros componentes conocidos en la técnica. El polvo, o mezcla que comprende el polvo, se puede forzar a través de un troquel y las tiras que resultan se cortan en pelets apropiados de longitud variable.

15 Opcionalmente, la etapa de peletizar puede incluir un tratamiento con vapor, o etapa de acondicionado, antes de la formación de los pelets. La mezcla que comprende el polvo se puede colocar en un acondicionador, p. ej. una mezcladora con inyección de vapor. La mezcla se calienta en el acondicionador hasta una temperatura especificada, tal como de 60-100°C, temperatura típicas serían de 70°C, 80°C, 85°C, 90°C o 95°C. El tiempo de residencia puede variar de segundos a minutos e incluso horas. Tal como 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.

20 Se entenderá que la composición de aditivo alimentario de la presente invención es adecuada para adicionar a cualquier material alimentario adecuado.

Como se usa en la presente memoria, el término material alimentario se refiere a material alimentario básico a consumir por un animal. Se entenderá también que esto puede comprender, por ejemplo, al menos uno o más granos sin procesar, y/o plantas procesadas y/o material animal tal como harina de soja o harina de hueso.

25 Como se usa en la presente memoria, el término "producto alimentario" se refiere a un material alimentario al que se han añadido una o más composiciones de aditivo alimentario.

La persona experta comprenderá que animales diferentes requieren productos alimentarios diferentes, e incluso el mismo animal puede requerir productos alimentarios diferentes, dependiendo del propósito para el que se cría el animal.

30 Preferentemente, el producto alimentario puede comprender materiales alimentarios que comprenden maize o maíz, trigo, cebada, triticale, centeno, arroz, tapioca, sorgo, y/o cualquiera de los subproductos, así como componentes ricos en proteína como harina de soja, harina de semilla de colza, harina de canola, harina de semilla de algodón, harina de semilla de girasol, harinas de subproductos animales y sus mezclas. Más preferentemente, el producto alimentario puede comprender grasas animales y/o aceites vegetales.

35 Opcionalmente, el producto alimentario también puede contener minerales adicionales tal como, por ejemplo, calcio y/o vitaminas adicionales.

Preferentemente, el producto alimentario es una mezcla de harina de maíz soja.

En una realización, preferentemente el alimento no es alimento de mascotas.

40 En otro aspecto se proporciona un método para producir un producto alimentario. El producto alimentario típicamente se produce en molinos de alimentos en los que las materias primas primero se granulan hasta un tamaño de partícula adecuado y después se mezclan con aditivos apropiados. El producto alimentario después se puede producir como una masa o pelets; lo último típicamente implica un método por el que la temperatura se eleva a un nivel objetivo y después el alimento pasa a través de un troquel para producir pelets de un tamaño particular. Los pelets se dejan enfriar. Posteriormente se pueden añadir aditivos líquidos tal como grasa y enzima. La producción de producto alimentario también puede implicar una etapa adicional que incluye extrusión o expansión antes de peletizar – en particular por técnicas adecuadas que pueden incluir al menos el uso de vapor.

45 El producto alimentario según la presente invención es para aves, por ejemplo, pollo, ponedoras, producción de broilers, pavo, pato, ganso y pato de agua.

En una realización el producto alimentario no es para ponedoras.

50 Por medio solo de ejemplo un producto alimentario para pollos, p. ej. pollos broiler puede estar comprendido por uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

ES 2 599 478 T3

Ingredientes	Inicial (%)	Final (%)
Maíz	46,2	46,7
Harinillas de trigo	6,7	10,0
Maíz DDGS	7,0	7,0
Harina de soja 48%CP	32,8	26,2
Combinación de grasa an/veg	3,0	5,8
L-lisina HCl	0,3	0,3
DL-metionina	0,3	0,3
L-treonina	0,1	0,1
Sal	0,3	0,4
Piedra caliza	1,1	1,1
Fosfato dicálcico	1,2	1,2
Vitaminas y microminerales de aves	0,3	0,3

A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para pollos, tal como pollos broiler, puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta		
Proteína cruda (%)	23,00	20,40
Energía metabolizable de ave (kcal/kg)	2.950	3.100
Calcio (%)	0,85	0,85
Fósforo disponible (%)	0,38	0,38
Sodio (%)	0,18	0,19
Lisina dig (%)	1,21	1,07
Metionina dig (%)	0,62	0,57
Metionina + cisteína dig (%)	0,86	0,78
Treonina dig (%)	0,76	0,68

A modo sólo de ejemplo un producto alimentario para gallinas ponedoras puede comprender uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

Ingrediente	Fase de puesta (%)
Maíz	10,0
Trigo	53,6
Maíz DDGS	5,0
Harina de soja 48%CP	14,9
Harinillas de trigo	3,0
Aceite de soja	1,8
L-lisina HCl	0,2
DL-metionina	0,2
L-treonina	0,1
Sal	0,3
Fosfato dicálcico	1,6
Piedra caliza	8,9

ES 2 599 478 T3

Ingrediente	Fase de puesta (%)
Vitaminas y microminerales de aves	0,6

A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para gallinas ponedoras puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta	
Proteína cruda (%)	16,10
Energía metabolizable de ave (kcal/kg)	2.700
Lisina (%)	0,85
Metionina (%)	0,42
Metionina + cisteína (%)	0,71
Treonina (%)	0,60
Calcio (%)	3,85
Fósforo disponible (%)	0,42
Sodio (%)	0,16

A modo sólo de ejemplo un producto alimentario para pavos puede comprender uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

Ingredientes	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)	Fase 3 (%)	Fase 4 (%)
Trigo	33,6	42,3	52,4	61,6
Maíz DDGS	7,0	7,0	7,0	7,0
Harina de soja 48%CP	44,6	36,6	27,2	19,2
Harina de semilla de colza	4,0	4,0	4,0	4,0
Aceite de soja	4,4	4,2	3,9	3,6
L-lisina HCl	0,5	0,5	0,4	0,4
DL-metionina	0,4	0,4	0,3	0,2
L-treonina	0,2	0,2	0,1	0,1
Sal	0,3	0,3	0,3	0,3
Piedra caliza	1,0	1,1	1,1	1,0
Fosfato dicálcico	3,5	3,0	2,7	2,0
Vitaminas y microminerales de aves	0,4	0,4	0,4	0,4

5 A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para pavos puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta				
Proteína cruda (%)	29,35	26,37	22,93	20,00
Energía metabolizable de ave (kcal/kg)	2.850	2.900	2.950	3.001
Calcio (%)	1,43	1,33	1,22	1,02
Fósforo disponible (%)	0,80	0,71	0,65	0,53
Sodio (%)	0,16	0,17	0,17	0,17
Lisina dig (%)	1,77	1,53	1,27	1,04
Metionina dig (%)	0,79	0,71	0,62	0,48
Metionina + cisteína dig (%)	1,12	1,02	0,90	0,74

ES 2 599 478 T3

Especificación de dieta				
Treonina dig (%)	1,03	0,89	0,73	0,59

A modo sólo de ejemplo un producto alimentario para cochinitos puede comprender uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

Ingrediente	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)
Maíz	20,0	7,0
Trigo	25,9	46,6
Centeno	4,0	10,0
Harinillas de trigo	4,0	4,0
Maíz DDGS	6,0	8,0
Harina de soja 48%CP	25,7	19,9
Suero seco	10,0	0,0
Aceite de soja	1,0	0,7
L-lisina HCl	0,4	0,5
DL-metionina	0,2	0,2
L-treonina	0,1	0,2
L-triptófano	0,03	0,04
Piedra caliza	0,6	0,7
Fosfato dicálcico	1,6	1,6
Vitaminas y microminerales de porcino	0,2	0,2
Sal	0,2	0,4

A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para cochinitos puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta		
Proteína cruda (%)	21,50	20,00
Energía digestible de porcino (kcal/kg)	3.380	3.320
Energía neta de porcino (kcal/kg)	2.270	2.230
Calcio (%)	0,80	0,75
Fósforo disponible (%)	0,40	0,35
Sodio (%)	0,20	0,20
Lisina dig (%)	1,23	1,14
Metionina dig (%)	0,49	0,44
Metionina + cisteína dig (%)	0,74	0,68
Treonina dig (%)	0,80	0,74

5 A modo sólo de ejemplo un producto alimentario para cerdos cebados/terminados puede comprender uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

Ingrediente	Cebado/terminado (%)
Maíz	27,5
Harina de soja 48%CP	15,4
Maíz DDGS	20,0

Salvado de trigo	11,1
Salvado de arroz	12,0
Harina de semilla de canola	10,0
Piedra caliza	1,6
Fosfato dicálcico	0,01
Sal	0,4
Vitaminas y microminerales de porcino	0,3
L-lisina HCl	0,2
Aceite vegetal	0,5

A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para cerdos cebados/terminados puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta	
Proteína cruda (%)	22,60
Energía metabolizable de porcino (kcal/kg)	3.030
Calcio (%)	0,75
Fósforo disponible (%)	0,29
Lisina digestible (%)	1,01
Metionina + cisteína dig (%)	0,73
Treonina dig (%)	0,66

Formas

5 La composición de aditivo alimentario de la presente invención y otros componentes y/o producto alimentario que lo comprende se pueden usar en cualquier forma adecuada.

10 La composición de aditivo alimentario de la presente invención se puede usar en la forma de preparaciones sólidas o líquidas o sus alternativas. Ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolos, cápsulas, pelets, tabletas, polvillos, y gránulos que se puede humedecer, secar por pulverizado o liofilizar. Ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no son limitantes, disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuosas-orgánicas.

En algunas aplicaciones, DFM o composiciones de aditivo alimentario se pueden mezclar con alimento o administrar en el agua de beber. En una realización el intervalo de dosis para incluir en el agua es aproximadamente 1×10^3 UFC/animal/día a aproximadamente 1×10^{10} UFC/animal/día, y más preferentemente aproximadamente 1×10^7 UFC/animal/día.

15 Ejemplos de formas adecuados incluyen uno o más de: polvos, pastas, bolos, pelets, tabletas, píldoras, cápsulas, óvulos, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación instantánea, retrasada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

20 A modo de ejemplo, si la composición de la presente invención se usa en un sólido, p. ej. forma peletizada, también puede contener uno o más de: excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina; desintegrantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato de sodio, croscarmelosa sódica y ciertos complejos de silicato; ligantes de granulacion tales como polivinil pirrolidona, hidroxil propil metil celulosa (HPMC), hidroxil propil celulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia; se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato gliceril y talco.

25 Ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para usar en preparar las formas incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, glicoles de polietileno, propilén glicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silíceo, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácido graso de petroetral, hidroxil metil celulosa, polivinil pirrolidona, y similares.

Excipientes preferentes para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilén glicoles de alto peso molecular.

5 Para suspensiones acuosas y/o elixires, la composición de la presente invención se puede combinar con diversos edulcorantes o agentes saborizantes, materia colorante o tintes, con emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilén glicol y glicerina, y sus combinaciones.

A menudo se usa suero no higroscópico como un vehículo para DFM (particularmente DFM bacteriano) y es un buen medio para iniciar el crecimiento.

DFM bacteriano contiene pastas que se pueden formular con aceite vegetal e ingredientes de gelatina inertes.

Se pueden formular productos fúngicos con subproductos de grano como vehículos.

10 En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario según la presente invención no está en la forma de un sistema de micropartículas, tal como el sistema de micropartículas mostrado en la patente WO2005/123034.

Dosificación

15 El DFM y/o composición de aditivo alimentario según la presente invención se puede diseñar para dosis de una toma o se puede diseñar para alimentación diaria.

La cantidad óptima de la composición (y de cada uno de sus componentes) para usar en la combinación de la presente invención dependerá del producto a tratar y/o el método de poner en contacto el producto con la composición y/o el uso que se pretende de la misma.

20 La cantidad de DFM y enzimas usadas en las composiciones debería ser una cantidad suficiente para ser eficaz y para permanecer suficientemente eficaz en la mejora del rendimiento de los productos alimentarios para alimentar al animal que contienen dicha composición. Esta cantidad del tiempo de eficacia debería extenderse hasta al menos el tiempo de utilización del producto (p. ej. composición de aditivo alimentario o alimento que lo contiene).

La proporción de DFM de cada enzima en el alimento puede estar en los intervalos que se dan a continuación:

25 DFM: fitasa (UFC/FTU): en el intervalo de $5,0 \times 10^2$ UFC DFM: 1 FTU, enzima a $5,0 \times 10^9$ UFC: 1 FTU enzima; preferentemente en el intervalo de $7,5 \times 10^4$ UFC DFM: 1 FTU enzima hasta $2,5 \times 10^7$ UFC: 1 FTU enzima.

En una realización preferentemente el producto alimentario comprende el siguiente:

una fitasa a al menos 500 FTU/kg de alimento; y

Enviva Pro® (DFM) a 75.000 UFC/g hasta 150.000 UFC/g de alimento.

En una realización preferentemente el producto alimentario comprende el siguiente:

30 una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

Enviva Pro® (DFM) a 75.000 UFC/g hasta 150.000 UFC/g de alimento.

En una realización preferentemente el producto alimentario comprende el siguiente:

una fitasa a 625 FTU/kg de alimento; y

Enviva Pro® (DFM) a 37.500 UFC/g hasta 75.000 UFC/g de alimento.

35 En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario comprende enzima y DFM suficientes para dosificar el producto alimentario como sigue:

una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

Enviva Pro® (DFM) a 75.000 UFC/g hasta 150.000 UFC/g de alimento.

40 En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario comprende enzima y DFM suficientes para dosificar el producto alimentario como sigue:

una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

Enviva Pro® (DFM) a 37.500 UFC/g hasta 75.000 UFC/g de alimento.

El Enviva Pro® listado en estas realizaciones preferentes se puede sustituir por cualquier otro DFM mostrado en la presente memoria.

Preferentemente la fitasa listada en estas realizaciones preferentes es la enzima Ronozyme HiPhos™ o tiene un aminoácido que tiene al menos 98,6% de identidad con aminoácidos 23-433 de SEC ID nº 1 o SEC ID Nº 2.

5 En una combinación preferente de la composición de aditivo alimentario que comprende una combinación de la fitasa que es la enzima Ronozyme HiPhos™ o tiene un aminoácido que tiene al menos 98,6% de identidad con aminoácidos 23-433 de SEC ID nº 1 o SEC ID nº2 con un DFM, preferentemente el DFM se selecciona a partir del grupo que consiste en Envivo Pro®, Calsporin®, Clostat®, Gallipro®, GalliproMax®, Profloa®, CSI®, Sorbiflore® y Animavit®.

10 En una realización la composición de aditivo alimentario comprende una combinación de la fitasa con la enzima Ronozyme HiPhos™ o tiene un aminoácido que tiene al menos 98,6% de identidad con aminoácidos 23-433 de SEC ID nº 1 o SEC ID nº2 con un DFM en la que DFM se selecciona del grupo que consiste en bacterias de uno o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.

15 En una combinación preferente de la composición de aditivo alimentario comprende una combinación de la fitasa derivable, preferentemente deriva de, un *Citrobacter* seleccionado del grupo que consiste en: *Citrobacter braakii*, p. ej. *Citrobacter braakii* ATCC 51113; *Citrobacter freundii*, p. ej. *C. freundii* NCIMB 41247; *Citrobacter amalonaticus*, p. ej. *Citrobacter amaloriaticus* ATCC 25405 o *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25407; *Citrobacter gillienii*, p. ej. *Citrobacter gillienii* DSM 13694; *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murliniae*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter werkmanii* y *Citrobacter youngae* con un DFM seleccionado del grupo que consiste en Enviva Pro®, Calsporin®, Clostat®, Gallipro®, GalliproMax®, Gallipro®Tect®, Poultry star®, Protexin®, Profloa®, Ecobiol®, Ecobiol® Plus, Fortiflora®, BioPlus2B®, Lactiferm®, CSI®, Yea-Sac®, Biomin IMB52®, Biomin C5®, Biacton®, Oralin E1707®, Probios-pioneer PDFM®, Sorbiflore®, Animavit®, Bonvital®, Levucell SB 20®, Levucell SC 0 & SC10®, ME Bactocell ActiSaf® (antiguamente BioSaf®), Miya-Gold®, Fecinor, Fecinor Plus®, InteSwine®, BioSprint®, Provita®, PepSoyGen-C®, Toyocerin®, y TOYOCERIN®.

Combinación con otros componentes

25 El DFM y enzimas para usar en la presente invención se puede usar en combinación con otros componentes. Así, la presente invención también se refiere a combinaciones. El DFM en combinación con una fitasa de *Citrobacter* (p. ej. una fitasa de *Citrobacter braakii* o fitasa de *Citrobacter freundii*) se puede referir en la presente memoria como "la composición de aditivo alimentario de la presente invención".

30 La composición de aditivo alimentario comprende una composición de aditivo alimentario de la presente invención (o uno o más de sus constituyentes) y otro componente que es adecuado para consumo animal y es capaz de proporcionar un beneficio médico o fisiológico al consumidor.

En una realización el "otro componente" puede ser uno o más de otras enzimas alimentarias.

Enzimas adicionales adecuadas para usar en la presente invención pueden ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: amilasas, xilanasas y/o proteasas.

En una realización el "otro componente" no es otra enzima u otro DFM.

35 Los componentes pueden ser prebióticos. Los prebióticos típicamente son hidratos de carbono no digeribles (oligo o poligosacáridos) o un azúcar alcohol que no se degrada o se absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos usados en productos comerciales y útiles según la presente invención incluyen inulina (fructo oligosacárido, o FOS) y transgalacto oligosacáridos (GOS o TOS). Prebióticos adecuados incluyen palatino oligosacárido, soja oligosacárido, alginato, xantana, pectina, goma garrofin (LBG), inulina, goma guar, galacto oligosacárido (GOS), fructo oligosacárido (FOS), almidón no degradable, lactosacarosa, lactulosa, lactilol, maltitol, maltodextrina, polidextrosa (esto es, Litesse®), lactilol, lactosacarosa, soja oligosacáridos, palatinosa, isomalto oligosacáridos, gluco oligosacáridos y xilo oligosacáridos, fragmentos de pectina, fibras alimentarias, manan oligosacáridos.

40 Fibras alimentarias pueden incluir polisacáridos no de almidón, tales como arabiloxilanos, celulosa y muchos otros componentes de plantas, tales como dextrinas resistentes, inulina, lignina, ceras, quitinas, pectinas, beta glucanos y oligosacáridos.

45 En una realización la presente invención se refiere a la combinación de la composición de aditivo alimentario según la presente invención (o uno o más de sus constituyentes) con un prebiótico. En otra realización la presente invención se refiere a una composición de aditivo alimentario que comprende (o esencialmente consiste o consiste en) un DFM en combinación con una fitasa de *Citrobacter* y un prebiótico.

50 El prebiótico se puede administrar simultáneamente (p. ej. mezclar juntos o suministrar simultáneamente por la misma o diferente ruta) o secuencialmente (p. ej. la misma o diferente ruta) con la composición de aditivo alimentario (o sus constituyentes) según la presente invención.

Otros componentes de las combinaciones de la presente invención incluyen povidona, tal como Litesse®, y/o una maltodextrina y/o lactitol. Estos otros componentes opcionalmente se pueden añadir a la composición de aditivo alimentario para asistir en el proceso de secado y ayudar a la supervivencia de DFM.

5 Otros ejemplos de otros componentes adecuados incluyen uno o más de: espesantes, agentes gelificantes, emulsionantes, ligantes, modificantes de cristal, edulcorantes (que incluyen edulcorantes artificiales), modificadores reológicos, estabilizantes, antioxidantes, tintes, enzimas, transportes, vehículos, excipientes, diluyentes, agentes lubricantes, agentes saborizantes, materia colorante, agentes de suspensión, desintegrantes, ligantes de granulado, etc. Estos otros componentes pueden ser naturales. Estos otros componentes se pueden preparar usando técnicas químicas y/o enzimáticas.

10 En una realización el DFM y/o enzima se puede encapsular. En una realización la composición de aditivo alimentario y/o DFM y/o enzimas se formula(n) como un polvo seco o granulado según se describe en la patente WO2007/044968 (referidos como gránulos TPT).

En una realización preferente el DFM y/o enzima para usar en la presente invención se pueden usar en combinación con uno o más lípidos.

15 Por ejemplo, el DFM y/o enzima para usar en la presente invención se puede usar en combinación con uno o más micelas de lípidos. La micela de lípido puede ser una micela simple o un complejo de micelas de lípidos.

La micela de lípidos puede ser un agregado de moléculas orientadas de sustancias anfipáticas, tal como un lípido y/o un aceite.

20 Como se usa en la presente memoria el término “espesante o agente gelificante” se refiere a un producto que evita la separación decelerando o evitando el movimiento de partículas, o bien gotas de líquidos inmiscibles, aire o sólidos insolubles. El espesamiento se da cuando moléculas individuales hidratadas causan un incremento de la viscosidad, haciendo más lenta la separación. La gelificación se da cuando las moléculas hidratadas se unen para formar una red tridimensional que atrapa las partículas, que las inmoviliza.

25 El término “estabilizante” como se usa en la presente memoria se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que evita que un producto (p. ej. un producto alimentario) cambie con el tiempo.

30 El término “emulsionante” como se usa en la presente memoria se refiere a un ingrediente (p. ej. un producto alimentario) que evita la separación de emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presente en forma de gotas, contenida en la otra. Las emulsiones pueden consistir en aceite en agua, donde la gota o fase dispersa es aceite y la fase continua es agua; o agua en aceite, donde el agua es la fase dispersa y la fase continua es aceite. Las espumas, que son gas en líquido, y suspensiones, que son sólido el líquido, también se pueden estabilizar por el uso de emulsionantes.

35 Como se usa en la presente memoria el término “ligante” se refiere a un ingrediente (p. ej. un ingrediente alimentario) que liga el producto junto a través de una reacción física o química. Durante “gelificación” por ejemplo, se absorbe agua, proporcionando un efecto ligante. Sin embargo, los ligantes pueden absorber otros líquidos, tal como aceites, manteniéndolos con el producto. En el contexto de la presente invención los ligantes típicamente se deberían usar es productos sólidos o de baja humedad por ejemplo productos de panadería; pastas, donuts, pan u otros.

40 “Transportes” o “vehículos” significa materiales adecuados para la administración de DFM y/o enzimas e incluyen cualquier material conocido en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante, o similar, que es no tóxico y que no interactúa con cualquier componente de la composición de una manera nociva.

45 La presente invención proporciona un método para preparar una composición de aditivo alimentario que comprende mezclar un DFM y una fitasa de *Citrobacter* con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado de al menos uno de maltodextrina, piedra caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o un componente de trigo, sacarosa, almidón, Na₂SO₄, Talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbiato, glicerol, sacarosa, propilén glicol, 1,3-propano diol, glucosa, parabenos, cloruro sódico, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formato y sus mezclas.

Ejemplos de excipientes incluyen uno o más de: celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio, glicina, almidón, azúcar de leche y polietilén glicol de alto peso molecular.

50 Ejemplos de desintegrantes incluyen uno o más de; almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato de sodio, croscarmelosa sódica y ciertos complejos de silicato.

Ejemplos de ligantes de granulación incluyen uno o más de: polivinil pirrolidona, hidroxil propil metil celulosa (HPMC), hidroxil propil celulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y acacia.

Ejemplos de agente lubricantes incluyen uno o más de: estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato gliceril y talco.

Ejemplos de diluyentes incluyen uno o más de: agua, etanol, propilén glicol y glicerina, y sus combinaciones.

Los otros componentes se pueden usar simultáneamente (p. ej. cuando se mezclan juntos o incluso cuando se suministran por diferentes rutas) o secuencialmente (p. ej. se pueden suministrar por diferentes rutas).

5 Preferentemente, cuando la composición de aditivo alimentario de la presente invención se mezcla con otro componente(s), el DFM permanece viable.

En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario según la presente invención no comprende cromo o cromo orgánico.

En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario según la presente invención no contiene glucanasa.

10 En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario según la presente invención no contiene ácido sórbico.

Concentrados

Los DFMs para usar en la presente invención pueden estar en la forma de concentrados. Típicamente estos concentrados comprenden una concentración significativamente alta de un DFM.

15 Las composiciones de aditivo alimentario según la presente invención pueden tener un contenido de células viables (unidades formadoras de colonias, UFCs) que está en el intervalo de al menos 10^4 UFC/g (adecuadamente que incluye al menos 10^5 UFC/g, tal como al menos 10^6 UFC/g, p. ej. al menos 10^7 UFC/g, al menos 10^8 UFC/g) a aproximadamente 10^{10} UFC/g (o incluso aproximadamente 10^{11} UFC/g o aproximadamente 10^{12} UFC/g).

20 Cuando el DFM está en la forma de un concentrado las composiciones de aditivo alimentario según la presente invención pueden tener un contenido de células viables en el intervalo de al menos 10^9 UFC/g a aproximadamente 10^{12} UFC/g, preferentemente al menos 10^{10} UFC/g a aproximadamente 10^{12} UFC/g.

Composiciones en polvo, gránulo y líquido en la forma de concentrados se pueden diluir con agua o resuspender en agua u otros diluyentes adecuados, por ejemplo, un medio de crecimiento adecuado tal como leche o aceites minerales o vegetales, para dar composiciones listas para usar.

25 El DFM o composición de aditivo alimentario de la presente invención o las combinaciones de la presente invención en la forma de concentrados se pueden preparar según los métodos conocidos en la técnica.

En un aspecto de la presente invención las enzimas o alimento se ponen en contacto por una composición en una forma de concentrado.

30 Las composiciones de la presente invención pueden ser secadas por espray o liofilizadas según métodos conocidos en la técnica.

Procesos típicos para fabricar partículas usando un proceso de secado por espray implican un material sólido que se disuelve en un disolvente apropiado (p. ej. un cultivo de un DFM en un medio de fermentación). Alternativamente, el material se puede suspender o emulsionar en un no disolvente para formar una suspensión o emulsión. Otros ingredientes (como se discute a continuación) o componentes tales como agentes antimicrobianos, agentes estabilizantes, tintes y agentes de asistencia al proceso de secado se pueden añadir opcionalmente en esta etapa.

40 Después la disolución se atomiza para formar una fina niebla de gotas. Las gotas inmediatamente entran en una cámara de secado donde entran en contacto con un gas de secado. El disolvente se evapora de las gotas y pasa al gas de secado para solidificar las gotas que están en contacto con el gas de secado. El disolvente se evapora a partir de las gotas al gas de secado para solidificar las gotas, formando así partículas. Las partículas después se separan del gas de secado y se recogen.

Sujeto

El término "sujeto", como se usa en la presente memoria, significa un animal al que se va a administrar o se ha administrado una composición de aditivo alimentario según la presente invención o un producto alimentario que comprende dicha composición de aditivo alimentario según la presente invención.

45 Según la invención, el "sujeto" animal es ave (que incluye broilers, pollos y pavos).

En una realización el término ave y/o pollos no incluye puesta de huevos.

En una realización el sujeto se puede someter a desafío con patógenos entéricos.

A modo de ejemplo un sujeto puede tener uno o más patógenos entéricos presentes en la tripa o tracto digestivo. Por ejemplo un sujeto puede tener uno o más patógenos entéricos presentes en la tripa o tracto digestivo a un nivel que:

i) da como resultado pérdida de rendimiento del animal y/o

5 ii) está a niveles clínicamente relevantes; o

iii) está a niveles subclínicos.

El patógeno entérico puede ser *Clostridium perfringens* por ejemplo.

Índice de conversión del alimento (ICA)

10 Como se usa en la presente memoria el término “índice de conversión del alimento” se refiere a una cantidad de alimento que se alimenta a un animal para incrementar el peso del animal en una cantidad específica.

Un índice de conversión de alimento mejorado significa un índice de conversión de alimento más bajo.

15 Por “índice de conversión de alimento más baja” o “índice de conversión de alimento mejorado” significa que el uso de una composición de aditivo alimentario en alimentos da como resultado una cantidad más baja de alimento que se requiere para incrementar el peso del animal en la misma cantidad que cuando el alimento no comprende dicha composición de aditivo alimentario.

20 Energía digestible como se usa en la presente memoria significa la energía bruta del alimento consumido menos la energía bruta de las heces o la energía bruta del alimento consumido menos la energía bruta del contenido digerido que queda en un segmento específico del tracto gastrointestinal del animal, p. ej. el íleon. La energía metabolizable como se usa en la presente memoria se refiere a energía metabolizable aparente y significa la energía bruta del alimento consumido menos la energía bruta contenida en las heces, orina, y productos gaseosos de la digestión. La energía digestible y la energía metabolizable se puede medir como la diferencia entre la energía bruta ingerida y la energía bruta excretada en las heces o en el contenido digerido presente en el segmento específico del tracto gastrointestinal usando el mismo método para medir la digestibilidad de nutrientes, con correcciones apropiadas para excreción de nitrógeno para calcular energía metabolizable del alimento.

25 Retención de nitrógeno

La retención de nitrógeno como se usa en la presente memoria significa la capacidad de un sujeto para retener nitrógeno de la dieta como masa corporal. Un equilibrio negativo de nitrógeno se da cuando la excreción de nitrógeno excede la ingesta diaria y a menudo se ve cuando el músculo se ha perdido. Un equilibrio de nitrógeno positivo a menudo se asocia con crecimiento muscular, particularmente en animales en crecimiento.

30 La retención de nitrógeno se puede medir como la diferencia entre la ingesta de nitrógeno y el nitrógeno excretado por medio de la recolección total de excreta y orina durante un periodo de tiempo. Se entiende que la excreta de nitrógeno incluye proteína sin digerir del alimento, secreciones proteaginosas endógenas, proteína microbiana, y nitrógeno de la orina.

Supervivencia

35 El término supervivencia como se usa en la presente memoria significa el número de sujetos que permanecen vivos. El término “supervivencia mejorada” puede ser otra manera de decir “mortalidad reducida”.

Rendimiento de carcasa y rendimiento de carne

40 El término rendimiento de carcasa como se usa en la presente memoria significa la cantidad de carcasa como una proporción del peso del cuerpo vivo, después de un proceso de matanza comercial o experimental. El término carcasa significa el cuerpo de un animal que se ha sacrificado para alimentación, con eliminación de la cabeza, vísceras, parte de las patas, y plumas o piel. El término rendimiento de carne como se usa en la presente memoria significa la cantidad de carne comestible como una proporción del peso del cuerpo vivo, o la cantidad de un corte de carne específico como una proporción del cuerpo de peso vivo.

Ganancia de peso

45 La presente invención además proporciona un método de incrementar ganancia de peso en un sujeto, p. ej. ave o porcino, que comprende alimentar a dicho sujeto con un producto alimentario que comprende una composición de aditivo alimentario según la presente invención.

50 Una “ganancia de peso incrementada” se refiere a un animal que tiene incremento del peso corporal al ser alimentado con el alimento que comprende una composición de producto alimentario comparado con un animal que se alimenta con un alimento sin que esté presente dicha composición de aditivo alimentario.

Enteritis necrótica

5 Enteritis necrótica es una entero toxemia aguda o crónica vista en pollos, pavos y patos de todo el mundo, causada por *Clostridium perfringens*. Enteritis necrótica a menudo se caracteriza por una enteritis fibrino necrótica, usualmente en el intestino delgado medio. La mortalidad puede ser del 5-50%, normalmente alrededor de 10%. Las infecciones se dan por transmisiones fecales orales. Las esporas del organismo causante son muy resistentes. Los factores de predisposición incluyen coccidiosis/coccidiasis, dieta (rica en proteína), en patos posiblemente cepas fuertes, dietas de alta viscosidad (a menudo asociadas con dietas ricas en inclusiones de cebada y trigo), alimento y/o agua contaminados, otras enfermedades debilitantes.

10 La presente invención se refiere a incremento de la resistencia del sujeto a enteritis necrótica. En otras palabras, la presente invención se refiere a evitar o reducir el efecto negativo de enteritis necrótica.

El término "resistencia a" como se usa en la presente memoria puede englobar el término "tolerancia a". Por tanto en una realización el sujeto puede no ser resistente a enteritis necrótica pero el sujeto puede ser capaz de tolerar la enteritis necrótica, es decir, sin efectos negativos sobre el rendimiento del sujeto.

15 En una realización la presente invención se refiere a una composición de aditivo alimentario según la presente invención para tratar o prevenir enteritis necrótica en un sujeto. Típicamente el sujeto será uno que se ha desafiado o se va a desafiar a *Clostridium perfringens* y/o especies de *Eimeria*. Tal desafío puede venir del medio ambiente o la aplicación de microorganismos vivos en el alimento o agua de beber, p. ej., cuando se usan vacunas vivas de coccidia.

20 Otra realización de la presente invención se refiere a una composición de aditivo alimentario para prevenir y/o tratar coccidiosis en un sujeto.

Otra realización de la presente invención aún se proporciona un método para prevenir y/o tratar enteritis necrótica y/o coccidiosis en la que se administra a un sujeto una cantidad eficaz de composición de aditivo alimentario según la presente invención.

Bacteria patógena

25 El término bacteria patógena como se usa en la presente memoria significa por ejemplo especies de clostridia toxigénica, p. ej., *Clostridium perfringens* y/o *E. coli* y/o *Salmonella* spp y/o *Campylobacter* spp. En una realización la bacteria patógena puede ser especies de *E. coli* aviar patógena.

Excreción de nutrientes

30 En una realización la presente invención se refiere a reducir la excreción de nutrientes en el estiércol. Esto tiene efectos positivos en reducción de daños medioambientales. Por ejemplo, en una realización preferente la presente invención se refiere al contenido de nitrógeno reducido y/o fósforo en el estiércol del sujeto. Así, por tanto, se reduce la cantidad de nitrógeno y/o fósforo en el ambiente, que puede ser beneficioso.

Probiótico

35 Para algunas aplicaciones, se cree que DFM en la composición de la presente invención puede ejercer un efecto de cultivo probiótico. También está en el ámbito de la presente invención añadir a la composición de la presente invención más probióticos y/o prebióticos.

Aquí, un prebiótico es:

"un ingrediente alimentario no digestible que afecta beneficiosamente al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias beneficiosas".

40 El término "cultivo probiótico" como se usa en la presente memoria define organismos vivos (que incluyen bacterias o levaduras por ejemplo) que, cuando por ejemplo se ingiere o se aplica localmente en número suficiente, afecta beneficiosamente al organismo huésped, es decir, le confiere uno o más beneficios de salud demostrables sobre el organismo huésped. Los probióticos pueden mejorar el equilibrio microbiano en una o más superficies mucosas. Por ejemplo, la superficie mucosa puede ser el intestino, el tracto urinario, el tracto respiratorio o la piel. El término "probiótico" como se usa en la presente memoria también engloba microorganismos vivos que pueden estimular las ramas beneficiosas del sistema inmune y al mismo tiempo disminuye las reacciones inflamatorias en una superficie mucosa, por ejemplo la tripa.

50 Mientras que no hay límites inferiores y superiores para la ingesta de probióticos, se ha sugerido que al menos 10^6 - 10^{12} , preferentemente al menos 10^6 - 10^{10} , preferentemente 10^8 - 10^9 UFC como dosis diaria será eficaz para lograr los efectos beneficiosos para la salud del sujeto.

El término “bacteria buena” como se usa en la presente memoria significa que son bacterias no patógenas comensales en la tripa. “Bacteria buena” incluye *Lactobacillus* spp, p. ej. *Lactobacillus acidophilus* y bifidobacterias. Bacterias buenas pueden prevenir enfermedades haciendo el medio desfavorable para bacterias menos deseables.

Aislado

- 5 En un aspecto, adecuadamente la enzima o DFM usada en la presente invención puede estar en una forma aislada. El término “aislado” significa que la enzima o DFM está al menos significativamente libre de al menos uno u otro componente con el que la enzima o DFM se asocia naturalmente en la naturaleza y según se encuentra en la naturaleza. La enzima o DFM de la presente invención se puede proporcionar en una forma que está significativamente libre de uno o más contaminantes con los que la sustancia se puede asociar. Así, por ejemplo, 10 puede estar significativamente libre de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes.

Purificado

- 15 En un aspecto, preferentemente la enzima y/o DFM según la presente invención está en una forma purificada. El término “purificado” significa que la enzima y/o DFM está presente en un nivel alto. La enzima y/o DFM deseablemente es el componente predominante en la presente composición. Preferentemente, está presente en un nivel de al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 98%, estando determinado dicho nivel en base a peso seco/peso seco con respecto a la composición total considerada.

- 20 Se prevé en el ámbito de la presente invención que las realizaciones de la invención se puedan combinar de modo que las combinaciones de cualquiera de las características descritas en la presente memoria estén incluidas en el ámbito de la presente invención. En particular, se prevé en el ámbito de la presente invención que cualquier efecto beneficioso de las bacterias se pueda mostrar simultáneamente.

Secuencia de nucleótidos

El ámbito de la presente invención engloba secuencias de nucleótidos que codifican proteínas que tienen las propiedades específicas según se define en la presente memoria.

- 25 El término “secuencia de nucleótidos” como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o secuencia de polinucleótidos, y sus variantes, homólogos, fragmentos y derivados (tales como sus partes). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser de cadena doble o cadena simple que represente o bien la cadena sentido o antisentido.

- 30 El término “secuencia de nucleótidos” en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético, y ARN. Preferentemente significa ADN, más preferentemente secuencia ADNc que codifica la presente invención.

- 35 En una realización preferente, la secuencia de nucleótidos cuando se refiere y cuando está englobada *per se* por el ámbito de la presente invención no incluye la secuencia nativa de nucleótidos según la presente invención cuando está en su medio ambiente natural y cuando se une a su secuencia naturalmente asociada que también está(n) en su(s) medio ambiente natural. Para facilitar la referencia, podemos llamar a esto realización preferente de “secuencia no nativa de nucleótidos”. En este sentido, el término “secuencia nativa de nucleótidos” significa una secuencia de nucleótidos completa que está en su medio ambiente natural cuando se une operativamente a un promotor completo que se asocia naturalmente, cuando el promotor también está en su medio ambiente natural. Sin embargo, la 40 secuencia de aminoácidos englobada por el ámbito de la presente invención se puede aislar y/o purificar post expresión de una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo. Preferentemente, sin embargo, la secuencia de aminoácidos englobada por el ámbito de la presente invención se puede expresar por una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo pero en la que la secuencia de aminoácidos no está bajo el control del promotor con el que está asociado naturalmente en ese organismo.

- 45 Típicamente, la secuencia de nucleótidos englobada por el ámbito de la presente invención se prepara usando técnicas de ADN recombinante (es decir ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos se podría sintetizar, en todo o en parte, usando métodos químicos conocidos en la técnica (véase Caruthers MH et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Horn T et al., (1980) Nuc Acids Res Symp 225-232).

Preparación de la secuencia de nucleótidos

- 50 Una secuencia de nucleótidos codifica o bien una proteína que tiene las propiedades específicas según se define en la presente memoria o una proteína que es adecuada para modificación se puede identificar y/o aislar y/o purificar a partir de cualquier célula u organismo que produce dicha proteína. Varios métodos son muy conocidos en la técnica para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencia de nucleótidos. A modo de ejemplo, se pueden usar técnicas de amplificación de PCR para preparar más de una secuencia una vez que se ha identificado y/o 55 aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

A modo de un ejemplo más, se puede construir una ADN genómico y/o genoteca de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero a partir del organismo que produce la enzima. Si se conoce la secuencia de aminoácidos de la enzima, los tubos de nucleótidos etiquetados se pueden sintetizar y usar para identificar clones que sintetizan enzimas a partir de la genoteca de genoma preparada a partir del organismo. Alternativamente, se podría usar un tubo de nucleótido etiquetado que contiene secuencias homólogas de otro gen de enzima conocido para identificar los clones que codifican enzimas. En el último caso, se usan condiciones de hibridación y lavado de menor dureza.

Alternativamente, los clones que codifican enzimas se podrían identificar insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, que transforma la bacteria de enzima negativa dando como resultado la genoteca de ADN genómico, y después cultivando la bacteria transformada en platos de agar que contienen un sustrato para enzimas (es decir, maltosa), permitiendo así que los clones expresen la enzima a identificar.

Aún en otra alternativa, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, p. ej. el método de la fósforo amidita descrito por Beucage S.L. et al., (1981) Tetrahedron Letters 22, p 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., (1984) EMBO J. 3, p 801-805. En el método de la fósforo amidita, se sintetizan oligonucleótidos, p. ej., en una sintetizador de ADN automático, purificado, reconocido, ligado y clonado en vectores apropiados.

La secuencia de nucleótidos puede ser mezcla genómica y de origen sintético, mezcla sintética y de origen ADNc, o mezcla genómica y de origen ADNc, preparado por fragmentos ligantes de origen sintético, genómico o ADNc (según sea apropiado) según técnicas estándar. Cada fragmento ligante corresponde a varias partes de la secuencia de nucleótidos completa. La secuencia de ADN también se puede preparar por reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo según se describe en la patente de EEUU 4.683.202 o en Saiki R K et al., (Science (1988) 239, pp 487-491).

Secuencias de aminoácidos

El ámbito de la presente invención también engloba secuencias de aminoácidos de enzimas que tienen propiedades específicas según se define en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "enzima".

La secuencia de aminoácidos se puede preparar/aislar de una fuente adecuada, o se puede fabricar sintéticamente o se puede preparar mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

La proteína englobada por la presente invención se puede usar en conjunción con otras proteínas, particularmente enzimas. Así la presente invención también cubre una combinación de proteínas en la que la combinación comprende la proteína/enzima de la presente invención y otra proteína/enzima, que puede ser otra proteína/enzima según la presente invención.

Preferentemente la secuencia de aminoácidos cuando se refiere y cuando está englobada *per se* en el ámbito de la presente invención no es una enzima nativa. En este sentido, el término "enzima nativa" significa una enzima completa que está en su medio ambiente nativo y cuando se ha expresado por su secuencia de nucleótidos nativa.

Secuencia de identidad o secuencia de homología

La presente invención también engloba el uso de secuencias que tienen un grado de secuencia de identidad o secuencia de homología con secuencia(s) de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o en cualquier secuencia de nucleótidos que codifica tal polipéptido (de aquí en adelante referido como una "secuencia(s) homóloga". Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos del sujeto y la secuencia de nucleótidos del sujeto. Aquí, el término "homología" puede ser equiparado con "identidad".

La secuencia de aminoácidos homóloga y/o secuencia de nucleótidos debería proporcionar y/o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o mejora la actividad de la enzima.

En el presente contexto, una secuencia homóloga se toma para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 75, 85 o 90% idéntica, preferentemente 95 o 98% idéntica a la secuencia del sujeto. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc que la secuencia de aminoácidos del sujeto. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, restos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención es preferente expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 75, 85 o 90% idéntica, preferentemente 95 o 98% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia del sujeto). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos etc que la secuencia del sujeto. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, restos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención es preferente expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología se pueden llevar a cabo a ojo, o más normalmente con la ayuda de programas de comparación de secuencias inmediatamente disponibles. Estos programas de ordenador comercialmente disponibles pueden calcular % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología se puede calcular sobre secuencias continuas, es decir una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un resto cada vez. Esto se llama una alineación "sin huecos". Típicamente, tales alineamientos sin huecos se llevan a cabo sólo sobre un número relativamente pequeño de restos.

Aunque este es un método muy sencillo y consistente, falla al tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias idénticas, una inserción o eliminación causará que el siguiente resto de aminoácido salga del alineamiento, por tanto potencialmente da como resultado una gran reducción del porcentaje de homología cuando se lleva a cabo un alineamiento global. Como consecuencia, los métodos de comparación más frecuentes se diseñan para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar excesivamente la puntuación de homología general. Esto se logra insertando "huecos" en el alineamiento de la secuencia para tratar de maximizar homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones de huecos" en cada hueco que se da en el alineamiento de modo que, para un número idéntico de aminoácidos, un alineamiento de secuencia con tan pocos huecos como sea posible – que refleja una relación más alta entre las dos secuencias comparadas – logrará una puntuación más alta que una con muchos huecos. "Costes de huecos afines" típicamente se usan los que cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización más pequeña para cada resto siguiente en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más comúnmente usado. La penalización por muchos huecos por supuesto producirá alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamientos permiten modificar la penalización de huecos. Sin embargo, es preferente usar los valores por defecto cuando se usan tales programas para comparación de secuencias.

Por lo tanto el cálculo del % máximo de homología primeramente requiere la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta la penalización de huecos. Un programa de ordenador adecuado para llevar a cabo tal alineamiento es Vector NTI (Invitrogen Corp.). Ejemplos de programas que pueden realizar las comparaciones de secuencias incluyen, pero no son limitantes, el paquete BLAST (véase Ausubel et al 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed – capítulo 18), BLAST 2 (véase FEMS Microbiol Lett 1999 (174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov). FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA están disponibles para búsqueda offline y online (véase Ausubel et al 1999, páginas 7-58 a 7-60).

Aunque el % final de homología se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineamiento en sí mismo típicamente no se basa en comparaciones de pares todo o nada. En vez de esto, generalmente se usa una matriz de puntuación de escala de similitud que asigna puntuación a cada comparación de pares en base a similitud química o distancia de evolución. Un ejemplo de tal matriz comúnmente usada es la matriz BLOSUM62 – la matriz por defecto para los programas de BLAST. Los programas Vector NTI generalmente usan o bien los valores públicos por defecto o una tabla de comparación de símbolos normales si se proporciona (véase manual de usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, es preferente usar los valores por defecto para el paquete Vector NTI.

Alternativamente, se puede calcular el porcentaje de homología usando el carácter de alineamiento múltiple en Vector NTI (Invitrogen Corp.) basado en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Una vez que el programa ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de la identidad de la secuencia. El programa típicamente hace esto como parte de la comparación de la secuencia y genera un resultado numérico.

Si se usa penalización de huecos cuando se determina la identidad de la secuencia, entonces preferentemente se usan los siguientes parámetros para alineamiento de pares:

Para BLAST	
Apertura de hueco	0
Extensión de hueco	0

Para CLUSTAL	ADN	PROTEÍNA	
Tamaño de letra	2	1	Triple K
Penalización de hueco	15	10	
Extensión de hueco	6,66	0,1	

En una realización, se puede usar CLUSTAL con la penalización de hueco y extensión de hueco fijados como se define anteriormente.

- 5 Adecuadamente, el grado de identidad con relación a una secuencia de nucleótidos se determina al menos sobre 20 nucleótidos continuos, preferentemente al menos sobre 30 nucleótidos continuos, preferentemente al menos sobre 40 nucleótidos continuos, preferentemente al menos sobre 50 nucleótidos continuos, preferentemente al menos sobre 60 nucleótidos continuos, preferentemente al menos sobre 100 nucleótidos continuos.

Adecuadamente, el grado de identidad con relación a una secuencia de nucleótidos se puede determinar sobre la secuencia completa.

10 **Hibridación**

La presente invención también engloba secuencias que son complementarias a la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención o secuencias que son capaces de hibridar o bien las secuencias de la presente invención o las secuencias que son complementarias a ellas.

- 15 El término “hibridación” como se usa en la presente memoria puede incluir “el proceso mediante el que una cadena de ácidos nucleicos se une a una cadena complementaria a través de un par de bases” así como el proceso de amplificación según se lleva a cabo en tecnologías de reacción de cadena de polimerasa (PCR).

La presente invención también engloba el uso de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridar las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o su derivado.

- 20 El término “variante” también engloba secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

Preferentemente, secuencias complementarias son aquellas capaces de hibridar bajo condiciones estrictas (p. ej. 50°C y 0,2 x SSC {1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M citrato Na₃ pH 7,0} la secuencia de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

- 25 Más preferentemente, secuencias complementarias son aquellas capaces de hibridar bajo condiciones estrictas (p. ej. 65°C y 0,1 x SSC {1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M citrato Na₃ pH 7,0} la secuencia de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

- 30 En un aspecto más preferente, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridar la secuencia de nucleótidos de la presente invención, o su complemento, bajo condiciones estrictas (p. ej. 65°C y 0,1 x SSC).

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos

- 35 Se compraron cuatro mil pollitos macho Cobb de un día de edad de un criadero comercial. Al comienzo del estudio, se colocan 50 machos en cada corral de tratamiento en bloques, con un total de 9 corrales por tratamiento. El estudio consiste en los siguientes tratamientos (tabla 1):

Tabla 1. Diseño experimental del ejemplo 1

Tratamiento	Desafiado a <i>Clostridium perfringens</i>	Fitasa	DFM
1	No	Ninguna	Ninguno
2	Si	Ninguna	Ninguno
3	Si	Ninguna	Bacillus DFM ¹
4	Si	Ninguna	Lactobacillus DFM ²
5	Si	Ronozyme P® ³ 500 FTU/kg	Ninguno
6	Si	Citrobacter fitasa A ⁴ 500 FTU/kg	Ninguno
7	Si	Citrobacter fitasa B ⁵ 500 FTU/kg	Ninguno
8	Si	Ronozyme P® 500 FTU/kg	Bacillus DFM
9	Si	Citrobacter fitasa A 500 FTU/kg	Bacillus DFM
10	Si	Citrobacter fitasa B 500 FTU/kg	Bacillus DFM
11	Si	Ronozyme P® 500 FTU/kg	Lactobacillus DFM
12	Si	Citrobacter fitasa A 500 FTU/kg	Lactobacillus DFM
13	Si	Citrobacter fitasa B 500 FTU/kg	Lactobacillus DFM

¹ "Bacillus DFM" - es Enviva Pro ® que es una combinación de *Bacillus subtilis* cepa Bs2084, LSSAO1 y 15AP4, proporcionado por Danisco A/S y se dosifica a 150,000 UFC/g de alimento.

² "Lactobacillus DFM" - es Sorbiflore® que es una combinación *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus farciminis*, proporcionado por Danisco Animal Nutrition y se dosifica a 350,000 UFC/g de alimento.

³ "Ronozyme P®" es una 6-fitasa de *Peniphora lycii* expresada en *Aspergillus oryzae* – cuya secuencia de aminoácidos se da en la presente memoria como SEC ID nº 8. (Esto es una 6-fitasa "no-Citrobacter")

⁴ *Citrobacter A* fitasa – es una 6-fitasa de *Citrobacter braakii* cepa ATCC 51113. La secuencia de aminoácidos de esta enzima se da en la presente memoria como SEC ID nº 1.

⁵ *Citrobacter B* fitasa – es una 6-fitasa de *Citrobacter braakii* cepa YH-15. La secuencia de aminoácidos de esta enzima se da en la presente memoria como SEC ID nº 7.

5

Se toman los pesos de las aves por corral al inicio del estudio, día 23, día 35, y al final (día 42). El corral es la unidad de medida. Las raciones de los broiler se dan como alimento de masa. Las raciones cumplen o exceden los estándares NRC (tabla 2). La mezcladora se descarga para evitar contaminación cruzada de las raciones. Todos los alimentos de los tratamientos se mezclan usando mezcladora Davis S-20. Las muestras se recogen de cada ración de tratamiento desde el comienzo, mitad, y fin de cada lote y se combinan para confirmar actividad de enzimas y presencia de DFM en el alimento.

Tabla 2. Composición de la ración experimental del ejemplo 1.

Ingrediente (%)	Inicio (0 a 21 días)	Crecimiento (21 a 35 días)	Finalización (35 a 42 días)
Maíz	53,62	57,87	59,82
Maíz DDGS	10,00	10,00	10,00
Harina de soja 49% CP	26,93	23,97	21,36
Ampro 55	5,00	5,00	5,00
Aceite de soja	2,07	0,91	1,74
Lisina	0,24	0,24	0,24
DL-metionina	0,21	0,19	0,18
L-treonina	0,01	0,01	0,01

Ingrediente (%)	Inicio (0 a 21 días)	Crecimiento (21 a 35 días)	Finalización (35 a 42 días)
Sal	0,30	0,34	0,35
Piedra caliza	1,04	1,07	0,94
Fosfato dicálcico	0,26	0,11	0,02
Premezcla de vitaminas y trazas de minerales	0,33	0,33	0,33
Composición de nutrientes calculada (%)			
CP	22,60	21,50	20,39
Energía, kcal/kg	3.060	3.025	3.100
Lisina digestible	1,36	1,26	1,21
Metionina digestible	0,58	0,61	0,53
Treonina digestible	0,83	0,83	0,80

- Las aves reciben alimento *ad-libitum* adecuado al tratamiento desde el día 0 al 42. Enzimas y DFM se suministran por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Los corrales se colocan en las instalaciones para no tener contacto directo para evitar contaminación. En el día 21 ocurrió un cambio desde el inicio al crecimiento. La ración de crecimiento se sustituye por la ración de terminación en día 35. En cada cambio de ración, los comederos se quitan de los corrales en bloque, se pesan, se vacían, y se rellenan con la ración de tratamiento adecuada. El último día del estudio se pesa el alimento. En los corrales se comprueban diariamente la mortalidad. Cuando un ave se sacrifica o se encuentra muerto, se anota el día y el peso (kg) al eliminarlo. Se lleva a cabo una necropsia macroscópica sobre todas las aves muertas o sacrificadas para determinar el sexo y causa probable de muerte. Se anotan signos de enteritis necrótica.
- 5
- 10 Todos los corrales tienen aproximadamente 10,16 cm (4 pulgadas) de basura acumulada con una cubierta de viruta fresca de pino. Todas las aves se vacunan por pulverizado antes de colocarlas en los corrales con una vacuna de coccidiosis comercial (Coccivac-B). Los días 18, 19 y 20 todas las aves, excepto las del tratamiento 1, se dosifican con un caldo de cultivo de *C. perfringens*. Un campo aislado de *C. perfringens* que se sabe que causa NE y que se origina de una operación de broiler comercial se utiliza como el organismo objetivo. Cada día se usan inóculos frescos. Los niveles de titulación son aproximadamente $1,0 \times 10^{8-9}$. Cada corral recibe la misma cantidad de inóculo. El inóculo se administra mezclándolo con el alimento que se encuentra en la base del comedero de tubo. El día 21, se seleccionan cinco aves de cada corral, se sacrifican, se pesan en grupo, se examina el grado de presencia de lesiones de enteritis necrótica. La puntuación se basa en una puntuación de 0 a 3, siendo 0 normal y siendo 3 el más agudo (0 = nada, 1 = medio, 2 = moderado, 3 = marcado/agudo; Hofacre et al., 2003 J. Appl. Poult. Res. 12: 60-64).
- 15
- 20 No se usa terapia con medicamentos concomitante durante el estudio. Se mide el pH de la digestión del yeyuno sobre muestras frescas (0,5 g) diluido con 5 ml de agua desionizada y que usa un microelectrodo combinado de vidrio de referencia.

Recogida de muestras

- 25 El día 21, se sacrifican un total de 8 aves de tratamiento y se recoge el tracto gastrointestinal total desde debajo de la molleja hasta la unión del íleon con el ciego de cada ave y se envía con hielo durante la noche al laboratorio. Las muestras después se diseccionan en el laboratorio para obtener una parte de 20 cm del yeyuno que rodea el divertículo de Meckle; el tracto intestinal restante se desecha. Las secciones se enjuagan con peptona 0,1 % para eliminar el contenido intestinal y se abre longitudinalmente para exponer el tejido epitelial. Las secciones se mastican en 99 ml de peptona 0,1 % a 7,0 golpes/s durante 60 s para liberar células bacterianas asociadas a mucosa. Las bacterias de la disolución masticada se cultivan por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos. Las bolas bacterianas que resultan se vuelven a suspender en 10 ml de MTS caldo + glicerol 10%, se hace congelado rápido en nitrógeno líquido, y almacenado a -20°C hasta análisis posterior.
- 30

Aislamiento ADN

- 35 Se aísla ADN genómico de todas las muestras por extracción de fenol cloroformo y se purifica usando el kit Roche Applied Science High Pure PCR Template Purification Kit (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN).

Pirosecuenciación

- 40 Se lleva a cabo pirosecuenciación FLX amplicón de bacterias codificadas con etiqueta según se describe en Dowd (Dowd et al. 2008; 8, 125). Una cantidad equivalente de ADN aislada de la mucosa intestinal de cada ave se analiza. La región V1-V3 del gen 16S ARNr se amplifica en cada muestra usando los cebadores 28 F (5'-GAGTTTGATCNTGGCTCAG) y 519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG). Siguiendo la secuenciación, los datos sin

procesar se proyectan y se recortan en base a la calidad. Las secuencias se ordenan en muestras individuales en base a secuencias de códigos de barra. Las etiquetas de códigos de barras se eliminan y las secuencias de ribosoma no bacteriano se eliminan. La composición de comunidad bacteriana se determina usando comparación BlastN a calidad controlada y bases de datos tratadas manualmente que derivan de NCBI. La abundancia relativa de cada bacteria ID se determina para cada muestra. Los datos se recaban en cada nivel taxonómico usando nomenclatura NCBI.

Análisis estadístico

Para representación las medias de los datos se separan usando pruebas t en forma de par. Se consideran diferencias significativas a $P < 0,05$. Los corrales se usan como la unidad experimental. Se calculan las proporciones de especies de bacterias a partir de datos tomados y los resultados se analizan usando un análisis de modelo categórico y después una probabilidad chi-cuadrado que se calcula usando JMP 8.0.2 (instituto SAS, Cary, NC), donde cada muestra que representa un ave se considera una unidad experimental.

Resultados y discusión

La ganancia de peso corporal y la eficiencia alimentaria se reducen significativamente por el desafío a *C. perfringens* comparado con el control sin desafío. Las fitasas de *Citrobacter*, con o sin DFM mejora significativamente la ganancia de peso corporal y eficiencia alimentaria en broilers antes del desafío NE, comparado con otros tratamientos. En el experimento global (0 a 42 días), incluyendo el desafío de 18 a 20 días, la complementación con una fitasa de *Citrobacter*, Ronozyme P, *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM mejora ligeramente la ganancia de peso corporal y eficiencia alimentaria (de 0 a 42 días) comparado con el desafío control, hasta un nivel entre el desafío y controles sin desafío. La combinación de Ronozyme P y el *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM no mejora significativamente la ganancia de peso corporal o eficacia alimentaria de broilers comparado con Ronozyme P o el DFM por sí mismos. Por el contrario, la combinación de una fitasa de *Citrobacter* (o fitasa de *Citrobacter* A o B) y o bien el DFM mejora la ganancia del peso corporal y eficacia alimentaria de broilers hasta un nivel que es mayor que el control sin desafío, que indica un efecto sinérgico de las fitasas de *Citrobacter* y un producto DFM. Este efecto es más pronunciado para fitasa de *Citrobacter* A comparado con fitasa de *Citrobacter* B – que indica que inesperadamente se puede obtener un efecto incluso mejor usando *Citrobacter* A en combinación con un DFM comparado con fitasa de *Citrobacter* B en combinación con un DFM.

Hay una reducción de mortalidad y puntuación de lesiones que se observa con la complementación o bien de un *Bacillus* o un *Lactobacillus* DFM a un nivel cercano, pero no igual al control sin desafío. Ronozyme P reduce la mortalidad y puntuación de lesiones comparado con el control con desafío, aunque no hasta el nivel del control sin desafío. Las fitasas de *Citrobacter* A y B no cambian significativamente la gravedad de la puntuación de las lesiones o la mortalidad debido a NE comparado con el control con desafío. La combinación de Ronozyme P y o bien *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM reduce la mortalidad debida a NE y la puntuación de las lesiones hasta el nivel del control sin desafío. La combinación de fitasa de *Citrobacter* y o bien *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM reduce la mortalidad debida a NE y la puntuación de las lesiones hasta un nivel que fue ligeramente mejor (menos mortalidad y puntuación de lesiones) comparado con el control sin desafío. Este efecto es más pronunciado para fitasa de *Citrobacter* A comparado con fitasa de *Citrobacter* B – que indica que inesperadamente se puede obtener un efecto incluso mejor usando *Citrobacter* A en combinación con DFM comparado con fitasa de *Citrobacter* B en combinación con un DFM.

Ambos DFM reducen el pH de la ingesta del yeyuno comparado con el control con desafío; Ronozyme P no cambia el pH, y las fitasas de *Citrobacter* incrementan el pH. La combinación de Ronozyme P o fitasa de *Citrobacter* A o fitasa de *Citrobacter* B, y *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM reduce el pH de la digestión del yeyuno hasta un nivel que es más bajo comparado con los tratamientos control con desafío o sin desafío. El pH de la digestión del yeyuno está negativamente correlacionada con la proporción de *Lactobacillus* spp como una proporción del ADN bacteriano total en la mucosa del yeyuno el día 21. Por el contrario, la proporción relativa de *Lactobacillus* spp está positivamente correlacionada con la ganancia de peso corporal y la eficacia alimentaria después del desafío (días 21 a 35).

Hay un beneficio en el uso de fitasas de *Citrobacter* (particularmente fitasa de *Citrobacter* A) en combinación con un DFM, para evitar pérdidas particularmente durante un desafío con *C. perfringens* para maximizar los efectos positivos de esta fitasa en la digestibilidad de minerales, proteína y energía, que se traslada en incrementar la eficacia alimentaria y la ganancia de peso corporal comparado con los controles con desafío y sin desafío. Estos beneficios también son evidentes sobre el daño intestinal reducido y mortalidad debido a NE con la combinación comparada de la fitasa en sí misma y el tratamiento control con desafío.

Discusión

De nuevo sin desear ser limitante de la teoría una sugerencia de cómo la combinación de fitasas de *Citrobacter* y DFM proporciona sorprendentemente mejores resultados comparado con otras fitasas y DFM es que las fitasas de *Citrobacter braakii* tienen una actividad más alta a un pH más bajo (p. ej. 3,5-4,5) comparado con alguna otra fitasa de no *Citrobacter*. Como la primera parte del tracto gastrointestinal (GI) de animales monogástricos de granja, p. ej.

porcino o aves, tiene un pH más bajo – fitasas de *Citrobacter braakii* parecen tener más actividad en esta parte del tracto GI por consiguientes estas fitasas con capaces de liberar fósforo y otros nutrientes, tal como proteínas, mucho más deprisa del sustrato de fitato comparado con algunas otras fitasas de no *Citrobacter*. Esto es ventajoso en muchos aspectos, que incluye que es deseable actuar sobre el fitato tan pronto como sea posible ya que tiene tendencia a formar complejo con otras sustancias tal como minerales, particularmente a medida que el pH aumenta. Una vez que el fitato forma complejo se hace menos accesible a la rotura por enzimas. Por tanto es deseable actuar sobre el sustrato de fitato pronto en el tracto GI cuando el pH es aún bajo. Sin embargo la rotura del fitato en la parte inicial del tracto GI significa que puede haber menos fósforo disponible en el yeyuno y en la parte más baja del tracto GI que puede tener un impacto negativo sobre la población de comensales de bacteria “buena” tal como el *Lactobacilli* (que se ha mostrado que tiene efectos beneficiosos tal como modulación inmune y la producción de ácidos orgánicos que bajan el pH intestinal). Este impacto negativo sobre bacterias “buenas” residentes puede dar como resultado el florecimiento de patógenos oportunistas- así alteran el equilibrio global de bacterias en la tripa.

En relación con la presente invención, sorprendentemente se ha encontrado que el impacto negativo usando fitasas de *Citrobacter braakii* se puede solucionar combinando su uso con uno o más DFM. El DFM reestablece el equilibrio de bacterias en la tripa – conduciendo así a la reducción de daño en la tripa debido a bacterias patógenas y rendimiento más alto del animal sujeto.

De nuevo sin desear ser limitante de la teoría una sugerencia más de cómo la combinación de fitasas de *Citrobacter* y DFM proporciona sorprendentemente mejores resultados comparado con otras fitasas y DFM es que las fitasas de *Citrobacter braakii* tienen una actividad más alta a un pH más bajo (p. ej. 3,5-4,5) comparado con alguna otra fitasa de no *Citrobacter*. Como la primera parte del tracto gastrointestinal (GI) tiene un pH más bajo - fitasas de *Citrobacter braakii* parecen tener más actividad en esta parte del tracto GI. Esto puede mejorar la digestión de proteína de un sujeto porque el fitato puede formar complejos uniéndose a proteínas. Los resultados de este pronto incremento de absorción de proteínas puede dar como resultado que el animal produzca menos ácido clorhídrico (HCl) - esto puede tener un impacto negativo posterior en el tracto GI ya que puede incrementar el pH en la parte posterior del tracto GI. El incremento del pH en la parte posterior del tracto GI no es ventajoso ya que incrementa las oportunidades de los patógenos de ser capaces de establecerse por sí mismos en la tripa. Sorprendentemente los presentes inventores han encontrado que estos efectos negativos del uso de fitasas de *Citrobacter* se pueden solucionar combinándolos con DFM.

Sorprendentemente la 6-fitasa de *Citrobacter braakii* cepa ATCC 51113 (con la secuencia de aminoácidos SEC ID nº1) está influenciada incluso más positivamente que otras enzimas de 6-fitasa de *Citrobacter braakii* tal como la 6-fitasa de *Citrobacter braakii* cepa YH-15 (con la secuencia de aminoácidos SEC ID nº7).

Ejemplo 2 – estudio de rendimiento

Métodos

Se compraron cuatro mil pollitos macho Cobb de un día de edad de un criadero comercial. Al comienzo del estudio, se colocan 50 machos en cada corral de tratamiento en bloques, con un total de 8 corrales por tratamiento. El estudio consiste en los siguientes tratamientos (tabla 1):

Tabla 1. Diseño experimental del ejemplo 2.

Tratamiento	Fitasa	DFM	Nivel P disponible	Nivel Ca
1 PC	Ninguna	Ninguno	Basal	Basal
2 NC	Ninguna	Ninguno	-0,17	-0,16
3	Ninguna	Bacillus DFM ¹	-0,17	-0,16
4	Ninguna	Lactobacillus DFM ²	-0,17	-0,16
5	Ronozyme P® ³ 500 FTU/kg	Ninguno	-0,17	-0,16
6	Citrobacter fitasa A ⁴ 500 FTU/kg	Ninguno	-0,17	-0,16
7	Citrobacter fitasa B ⁴ 500 FTU/kg	Ninguno	-0,17	-0,16
8	Ronozyme P® ³ 500 FTU/kg	Bacillus DFM	-0,17	-0,16
9	Citrobacter fitasa A 500 FTU/kg	Bacillus DFM	-0,17	-0,16
10	Citrobacter fitasa B 500 FTU/kg	Bacillus DFM	-0,17	-0,16
11	Ronozyme P® ³ 500 FTU/kg	Lactobacillus DFM	-0,17	-0,16
12	Citrobacter fitasa A 500 FTU/kg	Lactobacillus DFM	-0,17	-0,16

ES 2 599 478 T3

Tratamiento	Fitasa	DFM	Nivel P disponible	Nivel Ca
13	Citrobacter fitasa B 500 FTU/kg	Lactobacillus DFM	-0,17	-0,16

¹ "Bacillus DFM" - es Enviva Pro ® que es una combinación de *Bacillus subtilis* cepa Bs2084, LSSAO1 y 15AP4, proporcionado por Danisco A/S y se dosifica a 150,000 UFC/g de alimento.

² "Lactobacillus DFM" - es Sorbiflore® que es una combinación *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus farciminis*, proporcionado por Danisco Animal Nutrition y se dosifica a 350,000 UFC/g de alimento.

³ "Ronozyme P®" es una 6-fitasa de *Peniphora lycii* expresada en *Aspergillus oryzae* – cuya secuencia de aminoácidos se da en la presente memoria como SEC ID nº 8. (Esto es una 6-fitasa "no-Citrobacter")

⁴ *Citrobacter A* fitasa – es una 6-fitasa de *Citrobacter braakii* cepa ATCC 51113. La secuencia de aminoácidos de esta enzima se da en la presente memoria como SEC ID nº 1.

⁵ *Citrobacter B* fitasa – es una 6-fitasa de *Citrobacter braakii* cepa YH-15. La secuencia de aminoácidos de esta enzima se da en la presente memoria como SEC ID nº 7.

Tabla 2. Composición de ración experimental del ejemplo 2.

	Inicial		Crecimiento		Terminación	
	PC	NC	PC	NC	PC	NC
Maíz	59,54	62,20	60,10	63,30	61,24	64,50
Harina de soja	34,35	33,90	32,80	32,20	31,41	30,80
Bentonita de sodio	-	0,28	-	-	-	-
Fosfato dicálcico	2,14	1,17	1,87	0,91	1,72	0,76
Piedra caliza fina	1,162	1,32	0,94	1,10	0,91	1,08
Sal fina	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
L-lisina HCl	0,34	0,34	0,16	0,16	0,015	0,01
DL-metionina	0,17	0,16	0,12	0,11	0,09	0,08
Treonina	0,09	0,07	0,01	-	-	-
Premezcla vit-min	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Aceite de soja	1,62	-	3,46	1,66	4,03	2,22
Proteína cruda	22,00	22,00	21,00	21,00	20,34	20,3
EMA aves (MJ/KG)	12,6	12,4	13,2	12,9	13,4	13,1
Lisina-disp	1,31	1,30	1,12	1,11	0,99	0,97
Metionina	0,51	0,50	0,45	0,44	0,41	0,40
Treonina	0,94	0,92	0,83	0,82	0,80	0,80
Calcio	1,05	0,89	0,9	0,74	0,85	0,69
Fósforo (disp.)	0,50	0,33	0,45	0,28	0,42	0,25
Fósforo (tot)	0,77	0,60	0,72	0,54	0,68	0,51

Las aves reciben alimento *ad-libitum* adecuado al tratamiento desde el día 0 al 42. Enzimas y DFM se suministran por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Los corrales se colocan en las instalaciones para no tener contacto directo para evitar contaminación de raciones. La ración de crecimiento se sustituye por la ración de terminación el día 21, y la ración de crecimiento se sustituye por la ración de terminación el día 35. En cada cambio de ración, los comederos se quitan de los corrales en bloque, se pesan, se vacían, y se rellenan con la ración de tratamiento adecuada. El último día del estudio se pesa el alimento. Los corrales se comprueban diariamente para mortalidad. Cuando un ave se sacrifica o se encuentra muerto, se anota el día y el peso (kg) al eliminarlo.

5

Todos los corrales tienen aproximadamente 10,16 cm (4 pulgadas) de basura acumulada con una cubierta de viruta fresca de pino. Todas las aves se vacunan por pulverizado antes de colocarlas en los corrales con una vacuna de coccidiosis comercial (Coccivac-B). No se usa terapia con medicamentos concomitante durante el estudio.

5 Las medias de los datos se separan usando pruebas t en forma de par. Se consideran diferencias significativas a $P < 0,05$. Los corrales se usan como la unidad experimental.

Resultados y discusión

10 La ganancia de peso corporal se reduce significativamente por el tratamiento de control negativo el día 42. No hay mejora significativa del rendimiento cuando se complementa cualquiera de DFM. Por el contrario, el complemento con fitasas de *Citrobacter* a la ración da como resultado mejoras significativas en la ganancia de peso, a un nivel similar al control positivo. Sin embargo Rinozyme P no conduce a una mejora significativa frente al control negativo. Cuando Rinozyme P se complementa en combinación con *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM hay una mejora numérica en ganancia de peso corporal a los 42 días, comparado con el control negativo. La combinación de fitasa de *Citrobacter* y *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM demuestra una mejora significativa comparada con la ración de control positivo, mostrando un efecto realzado de la fitasa de *Citrobacter* y el DFM.

15 Observaciones similares se observan cuando se analiza la proporción de conversión del alimento (FCR). No hay efecto significativo al complementar con cualquiera de los probióticos sobre la eficacia de la conversión del alimento, solo un ligero incremento numérico. Hay efectos significativos de las fitasas de *Citrobacter* pero no Ronozyme P, cuando la fitasa se complementa sola. Similarmente, cuando se complementa una combinación o bien de *Lactobacillus* o *Bacillus* y Ronozyme P no hay mejora significativa sobre el control negativo. Sin embargo, la combinación de fitasas de *Citrobacter* y bien *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM da como resultado mejoras significativas en FCR a un nivel más bajo (eficacia alimentaria mejorada) que el control positivo, y más baja (eficacia alimentaria mejorada) que el efecto añadido o bien por *Lactobacillus* DFM o *Bacillus* DFM, y fitasas cuando se complementan solos. Este efecto es más pronunciado para fitasas de *Citrobacter* A con fitasas de *Citrobacter* B – que indica que inesperadamente se puede obtener un efecto incluso mejor usando *Citrobacter* A en combinación con un DFM comparado con *Citrobacter* B en combinación con un DFM.

En conclusión, hay un efecto positivo entre fitasa de *Citrobacter* y cada uno de los DFM – *Bacillus* y *Lactobacillus*. Esto se mantiene por el incremento de la ganancia de peso y eficacia alimentaria, más grande que la suma de los efectos de cada complemento solo. Este efecto es más pronunciado para fitasa de *Citrobacter* A comparado con fitasa de *Citrobacter* B.

30 Ejemplo 3 – estudio de digestibilidad

Métodos

Mil pollos broiler macho Ross 308 se crían 12 días en corrales en el suelo y se alimentan con una ración de inicio típica comercial. El día 13, las aves se colocan para producir 8 réplicas por tratamiento, haciendo un total de 64 aves por tratamiento (8 aves por caja). Del día 13 al 21, se dan raciones de tratamiento (Tabla 1).

35 Tabla 1. Diseño experimental del ejemplo 3.

Tratamiento	Fitasa	DFM	Nivel P disponible	Nivel Ca
1 PC	Ninguna	Ninguno	0,684	0,9
2 NC	Ninguna	Ninguno	0,474	0,73
3	Ninguna	Bacillus DFM ¹	0,474	0,73
4	Ninguna	Lactobacillus DFM ²	0,474	0,73
5	Ronozyme P® ³ 500 FTU/kg	Ninguno	0,474	0,73
6	Citrobacter fitasa A ⁴ 500 FTU/kg	Ninguno	0,474	0,73
7	Citrobacter fitasa B ⁴ 500 FTU/kg	Ninguno	0,474	0,73
8	Ronozyme P® ³ 500 FTU/kg	Bacillus DFM	0,474	0,73
9	Citrobacter fitasa A 500 FTU/kg	Bacillus DFM	0,474	0,73
10	Citrobacter fitasa B 500 FTU/kg	Bacillus DFM	0,474	0,73
11	Ronozyme P® ³ 500 FTU/kg	Lactobacillus DFM	0,474	0,73
12	Citrobacter fitasa A 500 FTU/kg	Lactobacillus DFM	0,474	0,73

ES 2 599 478 T3

Tratamiento	Fitasa	DFM	Nivel P disponible	Nivel Ca
13	Citrobacter fitasa B 500 FTU/kg	Lactobacillus DFM	0,474	0,73

¹ "Bacillus DFM" - es Enviva Pro ® que es una combinación de *Bacillus subtilis* cepa Bs2084, LSSAO1 y 15AP4, proporcionado por Danisco A/S y se dosifica a 150,000 UFC/g de alimento.

² "Lactobacillus DFM" - es Sorbiflore® que es una combinación *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus farciminis*, proporcionado por Danisco Animal Nutrition y se dosifica a 350,000 UFC/g de alimento.

³ "Ronozyme P®" es una 6-fitasa de *Peniphora lycii* expresada en *Aspergillus oryzae* – cuya secuencia de aminoácidos se da en la presente memoria como SEC ID nº 8. (Esto es una 6-fitasa "no-Citrobacter")

⁴ *Citrobacter A* fitasa – es una 6-fitasa de *Citrobacter braakii* cepa ATCC 51113. La secuencia de aminoácidos de esta enzima se da en la presente memoria como SEC ID nº 1.

⁵ *Citrobacter B* fitasa – es una 6-fitasa de *Citrobacter braakii* cepa YH-15. La secuencia de aminoácidos de esta enzima se da en la presente memoria como SEC ID nº 7.

Las raciones de los broiler se dan como alimento de masa. Las raciones cumplen o exceden los estándares NRC (tabla 2). La mezcladora se descarga para evitar contaminación cruzada de las raciones. Todos los alimentos de los tratamientos se mezclan usando mezcladora Davis S-20. Las muestras se recogen de cada ración de tratamiento desde el comienzo, mitad, y fin de cada lote y se combinan para confirmar actividad de enzimas y presencia de DFM en el alimento.

5

Tabla 2. Composición de ración experimental del ejemplo 3.

Ingrediente	Control positivo	Control negativo
Maíz	55,67	57,06
Harina de soja, 48%	37,60	37,35
Aceite de soja	2,56	2,13
L-lisina HCl	0,16	0,16
DL-metionina	0,28	0,28
L-treonina	0,07	0,07
Sal	0,38	0,38
Piedra caliza	0,81	0,81
Fosfato dicálcico	1,87	1,17
Premezcla 1 vitaminas/trazas minerales	0,30	0,30
Óxido de titanio	0,30	0,30
Análisis calculado		
Materia seca	88,9	88,8
Proteína cruda	23,0	23,0
EM (MJ/kg)	12,7	12,7
EM (kcal/kg)	3.025	3.025
Calcio	0,90	0,73
P disponible	0,45	0,33
Sodio	0,18	0,18
Lisina dig.	1,21	1,21
Metionina dig.	0,60	0,60
Metionina + cistina dig.	0,86	0,86
Treonina dig.	0,76	0,76

Ingrediente	Control positivo	Control negativo
Triptófano dig.	0,22	0,22

Las aves reciben alimento *ad-libitum* adecuado al tratamiento desde el día 0 al 21, la duración completa del estudio. No se usa terapia con medicamentos concomitante durante el estudio. Enzimas y DFM se suministran por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Las cajas se dividen físicamente para no tener contacto directo para evitar contaminación. En el día final del estudio, las aves, así como el alimento de los comederos se pesan.

Se recogen muestras fecales los días 18, 19 y 20, se pesan y se anota, y después se congelan a -20°C el día de la recogida. Posteriormente la excreta se aplica para cada grupo de tratamiento, se mezcla con una mezcladora y se toman dos muestras. Las muestras se liofilizan y se muelen para pasar a través de un tamiz de 0,5 mm se recongelan y se almacenan hasta que se analizan; materia seca (MS), energía bruta (EB), nitrógeno (N), fósforo (P) y calcio (Ca).

El día 21, todas las aves se sacrifican y se obtienen todos los contenidos de la mitad más baja del íleon descargándolo con agua destilada. El contenido digestivo de las aves de cada caja se apila y se congela inmediatamente tras la recolección. Se llevan a cabo análisis proximal duplicado de raciones, contenido digestivo del íleon, y excreta para MS, N, aminoácidos, EB, Ca, P y un marcador inerte.

La MS se determina secando todas las muestras a 100°C durante 24 horas. Se realiza cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) sobre las raciones y contenido digestivo del íleon para determinar la concentración relativa de aminoácidos. Los niveles de fósforo y calcio se determinan por espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente y la energía se determina usando calorímetro de bomba adiabática (Modelo 1261, Parr Instrumento Co., Moline IL). Finalmente, el contenido de N se mide por el método de combustión (Modelo FP2000, LECO Corp., St. Joseph, MI). Los coeficientes de digestibilidad se calculan para ambas digestiones fecal e íleon.

Las medias de los datos se separan usando pruebas t en forma de par. Se consideran diferencias significativas a $P < 0,05$, usando cada caja como la unidad experimental.

Resultados y discusión

No hay efecto significativo sobre la digestibilidad del fósforo en el íleon, comparado con el control negativo, cuando *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM se complementan solos. Sin embargo, el complemento con fitasa de *Citrobacter* incrementa la digestibilidad del fósforo en el íleon hasta un nivel igual al control positivo. Hay un incremento significativo de la digestibilidad del fósforo en el íleon cuando se añade Ronozyme P a las raciones solo, hasta un nivel más bajo que la ración de control positivo.

Cuando se añade la combinación de la fitasa de *Citrobacter* y DFM a las dietas, la digestibilidad del fósforo en el íleon incrementa comparado con fitasa de *Citrobacter* complementada sola. Por el contrario, cuando se añaden combinaciones de la Ronozyme P y DFM a la ración, los coeficientes de digestibilidad del fósforo en el íleon son similares a los observados cuando se complementa Ronozyme P solo. Estas tendencias se reflejan en la digestibilidad total del fósforo en el tracto.

Hay un incremento significativo de la digestibilidad del aminoácido en el íleon cuando la fitasa de *Citrobacter* se complementa a la ración, comparado con el control negativo. Cuando se complementa con Ronozyme P hay un ligero incremento en la digestibilidad del aminoácido en el íleon comparado con el control negativo. Cuando *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM se complementan solos, solo hay un ligero incremento en la digestibilidad del aminoácido en el íleon. Hay un efecto significativo al complementar con una combinación de fitasa de *Citrobacter* y *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM sobre la digestibilidad del aminoácido, comparado con el complemento con DFM o fitasa de *Citrobacter* sola, que es mayor que la suma de los incrementos cuando cada uno se complementaba solo.

El efecto incremental no se observa cuando se añade la combinación de Ronozyme P + DFM a las raciones. Este efecto es más pronunciado para fitasa de *Citrobacter* A comparado con fitasa de *Citrobacter* B – que indica que inesperadamente se puede obtener un efecto incluso mejor cuando se usa *Citrobacter* A en combinación con un DFM comparado con fitasa de *Citrobacter* B en combinación con DFM.

La digestibilidad de la energía (EMA) se incrementa significativamente desde el nivel del control negativo cuando se complementan las raciones con fitasa de *Citrobacter*. Este no es el caso cuando se añade Ronozyme P a las raciones; donde solo se observa un ligero incremento numérico en EMA. Cuando se complementa a las raciones o bien *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM hay un incremento muy ligero en EMA, sin embargo no hay diferencia significativa con el control negativo. Cuando alguno de los DFM se complementan en combinación con la fitasa de *Citrobacter*, hay un incremento significativo en EMA mayor que la suma del incremento de fitasa o de cualquiera de DFM solo. Este no era el caso cuando cualquiera de DFM se complementaba con la fitasa de Ronozyme P.

En conclusión, hay un efecto significativo entre la fitasa de *Citrobacter* y el *Bacillus* DFM o *Lactobacillus* DFM. Este efecto es más pronunciado para fitasa de *Citrobacter* A comparado con fitasa de *Citrobacter* B – que indica que

5 inesperadamente se puede obtener un efecto incluso mejor cuando se usa *Citrobacter A* en combinación con un DFM comparado con fitasa de *Citrobacter B* en combinación con DFM. Esto se refleja en incrementos en P, EMA y digestibilidad de aminoácidos en el íleon. El incremento en los coeficientes de digestibilidad observados cuando se complementan combinaciones de productos es mayor que la suma de las mejoras cuando cualquiera se complementa solo.

Listado de Secuencias

<110> DuPont Nutrition Biosciences ApS
 <120> Composición de aditivo alimentario
 <130> P043063EPJ
 10 <140> 127283034
 <141> 19-01-2012
 <150> GB1102865.1
 <151> 18-02-2011
 15 <150> GB1102857.8
 <151> 18-02-2011
 <160> 13
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 433
 20 <212> PRT
 <213> *Citrobacter braakii*
 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (40)..(40)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (345)..(345)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 30 <400> 1

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Xaa Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 35 40 45

Pro Ile Met Lys Asn Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 50 55 60

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 65 70 75 80

Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 85 90 95

ES 2 599 478 T3

Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
100 105 110

Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
115 120 125

Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp
130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu
145 150 155 160

Gln Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
165 170 175

Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
180 185 190

Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
195 200 205

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

Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
225 230 235 240

Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
245 250 255

Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
260 265 270

Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
275 280 285

Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
290 295 300

Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
305 310 315 320

Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
325 330 335

Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Xaa Asp Asn Thr Pro Pro Gly Asp
340 345 350

ES 2 599 478 T3

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

Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 370 375 380

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

Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
 405 410 415

Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
 420 425 430

Glu

<210> 2

<211> 433

<212> PRT

5 <213> Citrobacter braakii

<400> 2

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 35 40 45

Pro Ile Met Lys Asn Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 50 55 60

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 65 70 75 80

Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 85 90 95

Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
 100 105 110

Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125

ES 2 599 478 T3

Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp
 130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu
 145 150 155 160

Gln Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 165 170 175

Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
 180 185 190

Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
 195 200 205

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

Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
 225 230 235 240

Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
 245 250 255

Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
 260 265 270

Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
 275 280 285

Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
 290 295 300

Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
 305 310 315 320

Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 325 330 335

Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly
 340 345 350

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

Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 370 375 380

ES 2 599 478 T3

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

Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
405 410 415

Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
420 425 430

Glu

<210> 3

<211> 1302

<212> ADN

5 <213> *Citrobacter braakii*

<400> 3

atgagtacat tcatcattcg tttattatth tttctctct tatgctggtc tttctcaata 60
 catgctgaag agcagaatgg tatgaaactt gagcgggttg tgatagttag tcgtcatggr 120
 gtaagagcac ctacgaagtt cactccaata atgaaaaatg tcacaccoga tcaatggcca 180
 caatgggatg tgccgttagg atggctaacg cctcgtgggg gagaacttgt ttctgaatta 240
 ggtcagtatc aacgtttatg gttcacgagc aaaggtctgt tgaataatca aacgtgccca 300
 tctccagggc aggttgctgt tattgcagac acggatcaac gcaccctgaa aacgggtgag 360
 gcgtttctgg ctgggttagc accaaaatgt caaattcaag tgcattatca gaaggatgaa 420
 gaaaaaatg atcctctttt taatccggta aaaatgggga aatgttcgtt taacacattg 480
 caggttaaaa acgctattct ggaacgggac ggaggaaata ttgaactgta taccacacgc 540
 tatcaatctt catttcggac cctggaaaat gttttaaatt tctcacaatc ggagacatgt 600
 aagactacag aaaagtctac gaaatgcaca ttaccagagg ctttaccgtc tgaacttaag 660
 gtaactcctg acaatgtatc attacctggt gcctggagtc tttcttccac gctgactgag 720
 atatttctgt tgcaagaggc ccagggaaatg ccacaggtag cctggggggcg tattacggga 780
 gaaaaagaat ggagagattt gttaagtctg cataacgctc agtttgatct tttgcaaaga 840
 actccagaag ttgccgtag tagggccaca ccattactcg atatgataga cactgcatta 900
 ttgacaaatg gtacaacaga aacaggtat ggataaaaat taccgtatc tctgttgttt 960
 attgctggtc atgataccaa tcttgcaaat ttaagcgggg ctttagatct taactggtcg 1020
 ctaccgggtc aaccsgataa yaccccgccg ggcgacaagc ttgtattcga aaagtggaaa 1080
 agaaccagtg ataatacggg ttgggttcag gtttcatttg tttatcagac gctgagagat 1140
 atgagggata tacaaccgtt gtcgttagaa aaacctgctg gcaaagttga tttaaaatta 1200
 attgcatgtg aagagaaaaa tagtcaggga atgtgttcgt taaaaagttt ttccaggctc 1260
 attaaggaaa ttgcggtgcc agagtgtgca gttacggaat aa 1302

<210> 4

<211> 1299

10

ES 2 599 478 T3

<212> ADN

<213> *Citrobacter braakii*

<400> 4

atgagtacat tcatcattcg tttattatth tttctctct tatgctggtc tttctcaata	60
catgctgaag agcagaatgg tatgaaactt gacgctggtg tgatagtgg tctgcatgga	120
gtaagagcac ctacgaagt cactccaata atgaaaaatg tcacacccga tcaatggcca	180
caatgggatg tgccggttag atggctaacg cctcgtgggg gagaacttgt ttctgaatta	240
ggtcagtatc aacgtttatg gttcacgagc aaaggtctgt tgaataatca aacgtgcca	300
tctccagggc aggttgctgt tattgcagac acggatcaac gcacccgtaa aacgggtgag	360
gctgttctgg ctgggtagc accaaaatgt caaattcaag tgcattatca gaaggatgaa	420
gaaaaaatg atcctctttt taatccggta aaaatgggga aatgttctgt taacacattg	480
caggttaaaa acgctattct ggaacgggccc ggaggaaata ttgaactgta taccacacgc	540
tatcaatctt catttcggac cctggaaaat gttttaaatt tctcacaatc ggagacatgt	600
aagactacag aaaagtctac gaaatgcaca ttaccagagg cttaccgctc tgaacttaag	660
gtaactcctg acaatgtatc attacctggg gcctggagtc tttcttccac gctgactgag	720
atatttctgt tgcaagaggc ccagggaatg ccacaggtag cctgggggagc tattacggga	780
gaaaaagaat ggagagattt gttaagtctg cataacgctc agtttgatct tttgcaaaga	840
actccagaag ttgcccgtag tagggccaca ccattactcg atatgataga cactgcatta	900
ttgacaaatg gtacaacaga aaacaggtat ggcataaaat taccgctatc tctgttgttt	960
attgctggtc atgataccaa tcttgcaaat ttaagcgggg ctttagatct taactggtcg	1020
ctaccggtc aaccgataa taccctcct ggtggggagc ttgtattcga aaagtggaaa	1080
agaaccagtg ataatacggg ttgggttcag gtttcatttg tttatcagac gctgagagat	1140
atgagggata tacaaccggt gtcgtagaa aaacctgctg gcaaagtga tttaaaatta	1200
attgcatgtg aagagaaaa tagtcaggga atgtgtctgt taaaaagttt ttccaggctc	1260
attaaggaaa ttgcgctgcc agagtgtgca gttacggaa	1299

5

<210> 5

<211> 433

<212> PRT

<213> *Citrobacter freundii*

<400> 5

ES 2 599 478 T3

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Pro Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
35 40 45

Pro Ile Met Lys Asp Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
50 55 60

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
85 90 95

Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
100 105 110

Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
115 120 125

Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Thr Asp
130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Thr Cys Ser Phe Asn Thr Leu
145 150 155 160

Lys Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
165 170 175

Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
180 185 190

Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
195 200 205

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

Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
225 230 235 240

Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
245 250 255

ES 2 599 478 T3

Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
 260 265 270

Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
 275 280 285

Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
 290 295 300

Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
 305 310 315 320

Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 325 330 335

Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly
 340 345 350

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

Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 370 375 380

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

Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
 405 410 415

Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
 420 425 430

Glu

<210> 6

<211> 1401

<212> ADN

5 <213> Citrobacter freundii

<400> 6

aaaggtggtg ctggtaatga gtacattcat cattcgttta ttattttttt ctctcttatg 60

cggttctttc tcaatacatg ctgaagagcc gaacggtatg aaacttgagc gggttgatg 120

agtgagccgt catggagtaa gagcacctac gaagttcact ccaataatga aagatgttac 180

acccgatcaa tggccacaat gggatgtgcc gttaggatgg ctaacgcctc gtgggggaga 240

ES 2 599 478 T3

acttgtttct gaattaggtc agtatcaacg tttatggttc acaagcaaag gtctgttgaa 300
 taatcaaacg tgcccatctc cagggcaggt tgctgttatt gcagacacgg atcaacgcac 360
 ccgtaaaacg ggtgaggcgt ttctggctgg gttagcacca aatgtcaaa ttcaagtgca 420
 ttatcagaag gatgaagaaa aaactgatcc tctttttaat ccagtaaaaa tggggacatg 480
 ttcgtttaac acattgaagg ttaaaaacgc tattctggaa cgggccggag gaaatattga 540
 actgtatacc caacgctatc aatcttcatt tcggaccctg gaaaatgttt taaatttctc 600
 acaatcggag acatgtaaga ctacagaaaa gtctacgaaa tgcacattac cagaggcttt 660
 accgtctgaa cttaaggtaa ctctgacaa tgtatcatta cctggtgcct ggagtctttc 720
 ttccacgctg actgagatat ttctgttgca agaggcccag ggaatgccac aggtagcctg 780
 ggggcgtatt acgggagaaa aagaatggag agatttgta agtctgcata acgctcagtt 840
 tgatcttttg caaagaactc cagaagttgc ccgtagtagg gccacaccat tactcgatat 900
 gatagacact gcattattga caaatggtac aacagaaaac aggtatggca taaaattacc 960
 cgtatctctg ttgtttattg ctggtcatga taccaatctt gcaaatttaa gcggggcttt 1020
 agatcttaac tggctgctgc ccggtcaacc cgataatacc cctcctggtg gggagcttgt 1080
 attcgaaaag tggaaaagaa ccagtgataa tacggattgg gttcaggttt catttgttta 1140
 tcagacgctg agagatatga gggatataca accgttgctg ttagaaaaac ctgccggcaa 1200
 agttgattta aaattaattg catgtgaaga gaaaaatagt cagggaatgt gttcgttaaa 1260
 aagtttttcc aggctcatta aggaaattcg cgtgccagag tgtgcagtta cggaataagt 1320
 aactaattac tatatatagc gtattaaaaa atagaaacc cgggtttgta gtcgggggta 1380
 ttcgtattgt tcataattac a 1401

<210> 7

<211> 433

<212> PRT

5 <213> Citrobacter braakii

<400> 7

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Ile Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 35 40 45

Pro Ile Met Lys Asp Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 50 55 60

ES 2 599 478 T3

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

ES 2 599 478 T3

305 310 315 320

Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 325 330 335

Leu Lys Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly
 340 345 350

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

Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 370 375 380

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

Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
 405 410 415

Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
 420 425 430 435

Glu

- <210> 8
- <211> 423
- <212> PRT
- 5 <213> Peniphora lycii

<400> 8

Ser Leu Ala Leu Ser Thr Gln Phe Ser Phe Val Ala Ala Gln Leu Pro
 1 5 10 15

Ile Pro Ala Gln Asn Thr Ser Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Pro Phe Phe
 20 25 30

Pro Val Glu Pro Tyr Ala Ala Pro Pro Glu Gly Cys Thr Val Thr Gln
 35 40 45

Val Asn Leu Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Trp Pro Thr Ser Gly Ala
 50 55 60

Arg Ser Arg Gln Val Ala Ala Val Ala Lys Ile Gln Met Ala Arg Pro
 65 70 75 80

Phe Thr Asp Pro Lys Tyr Glu Phe Leu Asn Asp Phe Val Tyr Lys Phe

ES 2 599 478 T3

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

ES 2 599 478 T3

Leu Asp Pro Leu Lys Pro Asp Glu Asn Arg Leu Trp Val Asp Ser Lys
 340 345 350

Leu Val Pro Phe Ser Gly His Met Thr Val Glu Lys Leu Ala Cys Ser
 355 360 365

Gly Lys Glu Ala Val Arg Val Leu Val Asn Asp Ala Val Gln Pro Leu
 370 375 380

Glu Phe Cys Gly Gly Val Asp Gly Val Cys Glu Leu Ser Ala Phe Val
 385 390 395 400

Glu Ser Gln Thr Tyr Ala Arg Glu Asn Gly Gln Gly Asp Phe Ala Lys
 405 410 415

Cys Gly Phe Val Pro Ser Glu
 420

<210> 9

<211> 433

<212> PRT

5 <213> *Citrobacter freundii*

<400> 9

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 35 40 45

Pro Ile Met Lys Asp Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 50 55 60

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 65 70 75 80

Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 85 90 95

Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
 100 105 110

Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125

ES 2 599 478 T3

Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Thr Asp
 130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Thr Cys Ser Phe Asn Thr Leu
 145 150 155 160

Lys Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 165 170 175

Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
 180 185 190

Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
 195 200 205

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

Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
 225 230 235 240

Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
 245 250 255

Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
 260 265 270

Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
 275 280 285

Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
 290 295 300

Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
 305 310 315 320

Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 325 330 335

Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly
 340 345 350

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

Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 370 375 380

ES 2 599 478 T3

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

Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
405 410 415

Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
420 425 430

Glu

<210> 10

<211> 433

<212> PRT

5 <213> *Citrobacter freundii*

<400> 10

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
35 40 45

Pro Ile Met Lys Asp Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
50 55 60

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
85 90 95

Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
100 105 110

Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
115 120 125

Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Thr Asp
130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Thr Cys Ser Phe Asn Thr Leu
145 150 155 160

ES 2 599 478 T3

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

ES 2 599 478 T3

Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
 420 425 430

Glu

- <210> 11
- <211> 3279
- <212> ADN
- 5 <213> Citrobacter freundii
- <220>
- <221> característica_nueva
- <222> (185)..(185)
- <223> n es a, c, g, o t
- 10 <220>
- <221> característica_nueva
- <222> (515)..(515)
- <223> n es a, c, g, o t
- 15 <220>
- <221> característica_nueva
- <222> (536)..(536)
- <223> n es a, c, g, o t
- 20 <220>
- <221> característica_nueva
- <222> (612)..(612)
- <223> n es a, c, g, o t
- 25 <220>
- <221> característica_nueva
- <222> (903)..(903)
- <223> n es a, c, g, o t
- <400> 11

```

aaaggaagc ccgttgctgt tctttcaaac aacgatggct gcgttattgc cagtagcgta      60
gaggcaaagg cgcttggcgt taatatgggc gctccgtact tcaaacagaa agatctgttc      120
aggcgctatg gcgtgttctg ttttagttcg aactacgaac tgtatgcgga tatgagcagc      180
agggntgatg tcgattctgg aggagtgtgc gccacgcgtg gagatataca gtattgatga      240
agccttttgt gatttaacgg gcgtgcgaaa ctgcagggat cttacggatt ttggtcagga      300
aatcagagca accatthtgc agaaaacacg tctcacggtt ggggtcggca ttgctcagac      360
caaaaccctg gccaaactgg cgaaccatgc ggccaaaaag tggcaggaac agacgggcg      420
agtcgtgat ctctcaaata ttgaacgcca gcgtaagctg atggcagcac tcccggttga      480
tgaagtctgg ggcatcggac gccgtatcgg caagnaactg gaacgtcatg ggcatncaaa      540
cggttctcga acctcgcggg tcccgatcat tcgcttcatt cgtcaaacat cttcagcgtc      600
gtgcttgaag cncaaccgtc cgggcattgc gcggtgagcc ttgttctggc gctggaaaaa      660
    
```

ES 2 599 478 T3

gtttgcgccg gaatcagcag gcaattatct gctcagaatc gtttggtgaa aaactcacgg 720
 aattacaacg ccatgaaaaa aggccatttg cacctatgct tcacgtgctg cggaaaagct 780
 gcgcagaaaa caccagtact gccggtttat ctctacgttt atcaaaaacca gtccgtttgc 840
 cctgaatgaa ccttattacg gtaacagcgc atcgataaaa ctgctgacgc caactcagga 900
 tanccgggac attattacag cagccacgcg cagcctggac gccgtttggc gagaggggct 960
 acgttatcaa aaagcgggcg ttatgctggg ggattttttt agctctggcg ttgcacagct 1020
 gaatcttttt gataataacg ccccgcggcg taacagcgat aaattgatgg acctactgga 1080
 tactcttaat gctgaaaagg ggaaaggaac gctctacttt gccgggcaag ggatacagca 1140
 gccgtgggcg atgaagcgag acatgctttc accacgttat acaacaagat acagtgattt 1200
 gctgcgggta aattgatagc caaacaaggc ttccgccac cttatttata ccggatcaat 1260
 tacccttca atgacaggac gttgtaaatt gccaacgatt ccataacctt gggatacctt 1320
 tccagcgcgg ctaaattagc gtccttttaa tacttggata agatacaaag ttgatatgca 1380
 aaaagttgga ttgttgtgaa ctcaggagta ggattatttc tatctgatag aaccagttat 1440
 cgaactggct tatacgagtt gtttgttttt cacttacgaa aaggtggtgc tggctaataga 1500
 gtacattcat cattcgttta ttattttttt ctctcttatg cggttctttc tcaatacatg 1560
 ctgaagagca gaacggtatg aaacttgagc gggttgtgat agtgagccgc catggagtaa 1620
 gagcacctac gaagttcact ccaataatga aagatgtcac acccgatcaa tggccacaat 1680
 gggatgtgcc gttaggatgg ctaacgcctc gtgggggaga acttgtttct gaattagtc 1740
 agtatcaacg tttatggttc acgagcaaag gtctgttgaa taatcaaacg tgcccatctc 1800
 cagggcaggt tgctgttatt gcagacacgg atcaacgcac ccgtaaacg ggtgaggcgt 1860
 ttctggctgg gttagcacca aaatgtcaaa ttcaagtgca ttatcagaag gatgaagaaa 1920
 aaactgatcc tctttttaat ccagtaaaaa tggggacatg ttcgtttaac acattgaagg 1980
 ttaaaaacgc tattctggaa cgggcccggag gaaatattga actgtatacc caacgctatc 2040
 aatcttcatt tcggaccctg gaaaatgttt taaatttctc acaatcggag acatgtaaga 2100
 ctacagaaaa gtctacgaaa tgcacattac cagaggcttt accgtctgaa cttaaggtaa 2160
 ctctgacaa tgtatcatta cctggtgcct ggagcctttc ttccacgctg actgagatat 2220
 ttctgttgca agaggcccag ggaatgccac aggtagcctg ggggcgtatt acgggggaaa 2280
 aagaatggag agatttgta agtctgcata acgctcagtt tgatcttttg caaagaactc 2340
 cagaagttgc ccgtagtaga gccacacat tactcgatat gatagacact gcattattga 2400
 caaatggtac aacagaaaac aggtatggca taaaattacc cgtatctctg ttgtttattg 2460
 ctggtcatga taccaatctt gcaaatttaa gcggggcttt agatcttaac tggtcgctac 2520

ES 2 599 478 T3

```

ccggtcaacc cgataatacc cctcctggtg gggagcttgt attcgaaaag tggaaaagaa      2580
ccagtgataa tacggattgg gttcaggttt catttgttta tcagacgctg agagatatga      2640
gggatataca accgttgtcg ttagaaaaac ctgccggcaa agttgattta aaattaattg      2700
catgtgaaga gaaaaatagt cagggaatgt gttcgttaa aagtttttcc aggctcatta      2760
aggaaattcg cgtgccagag tgtgcagtta cggaataagt aattaattat tatatatata      2820
gcgtattaaa aaatagaaac ccccggtttg tagtcggggg tattcgtatt gtttcataat      2880
tacatgagtc ttcaactgac tgctctttgc gagtgacaat ccagttacgc tgctccagaa      2940
aaaatccgga ctggttcagcg atgcagaata catcgaaaag cgctcgggtg tggactgcga      3000
ctctaaaacc gcttaacacg gttatatgcc cacatatgtc taaatgtgct gtttgtgcaa      3060
cgtattaaat aataacaagt tattaatfff acaattagtt aaaaaaactg atagtatacc      3120
cccctatagt atttggaggg cgtatgccgc attcaccgca agataaaaaa cgcattctca      3180
cccgtgtacg ccgtattcgc ggtcaggttg atgcgcttga gcgcgcgctg gagtccggcg      3240
agccgtgttt ggctatcctg caacaaattg ccgccgtgc                                3279

<210> 12
<211> 19
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador 28F

<220>
<221> característica_nueva
10 <222> (11)..(11)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 12
gagtttgatc ntggctcag      19

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador 519R

20 <220>
<221> característica_nueva
<222> (3)..(3)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
25 <221> característica_nueva
<222> (8)..(8)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 13
30 gntttacngc ggckgctg      18

```

REIVINDICACIONES

1. Una composición de aditivo alimentario que comprende un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una fitasa que deriva de *Citrobacter* spp., en la que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, y en la que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.
2. Un método para mejorar la retención de nitrógeno o para mejorar la proporción de conversión del alimento (FCR) o para mejorar la ganancia de peso en un sujeto o para mejorar la eficacia alimentaria en un sujeto o para reducir la excreción de nutrientes en heces, cuyo método comprende administrar a un sujeto un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una fitasa derivable de *Citrobacter* spp., en el que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones, y en el que el sujeto es un ave.
3. El uso de un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una fitasa derivable de *Citrobacter* spp. para mejorar la retención de nitrógeno o para mejorar la proporción de conversión del alimento (FCR) o para mejorar la ganancia de peso en un sujeto o para mejorar la eficacia alimentaria en un sujeto o para reducir la excreción de nutrientes en heces, en el que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones, y en el que el sujeto es un ave.
4. Un kit que comprende un microorganismo de alimentación directa (DFM), una fitasa derivable de *Citrobacter* spp., e instrucciones para la administración, en el que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.
5. Una composición de aditivo alimentario según la reivindicación 1 o un método según la reivindicación 2 o un uso según la reivindicación 3 o un kit según la reivindicación 4 – en la que la fitasa es derivable de un *Citrobacter bacterium* seleccionado del grupo que consiste en: *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter werkmanii* y *Citrobacter youngae*, preferentemente en la que la fitasa deriva de *Citrobacter braakii*.
6. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5 o un método según las reivindicaciones 2 o 5 o un uso según la reivindicación 3 o 5 o un kit según las reivindicaciones 4-5 en la que la fitasa deriva de *Citrobacter braakii* ATCC 51113.
7. Una composición de aditivo alimentario según la reivindicación 1 o un método según la reivindicaciones 2 o 5-6, o un uso según las reivindicaciones 3 o 5-6, o un kit según las reivindicaciones 4-6 en la que la fitasa es 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26).
8. Una composición de aditivo alimentario la reivindicación 1 un método según las reivindicaciones 2 o 5-7 o un uso según la reivindicación 3 o 5-7 o un kit según las reivindicaciones 4-7 en la que la fitasa comprende al menos una alteración y no más de 4 alteraciones comparado con la SEC ID n°1 o SEC ID n°2, en el que al menos una de dichas una o cuatro alteraciones se selecciona de las siguientes: 4P, 46E, 107G, 111P, 119K, 162C, 223E, 241 Q, 273L, 276K, 379K, 385D, 91C/46C, 52C/99C, 31C/176C, 31C/177C, 59C/100C, 141C/199C, 162C/247C, 111P/241Q, 31C, 119K, 202N, 286Q y 362K,R.
9. Una composición de aditivo alimentario, un método, un uso o un kit según la reivindicación 8 en la que la fitasa comprende al menos una alteración y no más de 4 alteraciones comparado con la SEC ID n°1 o SEC ID n°2, en la que al menos una de dichas una o cuatro alteraciones se selecciona de las siguientes: 91C/46C, 52C/99C, 31C/176C, 31C/177C, 59C/100C, 141C/199C, 162C/247C, 111P/241Q.
10. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-9 o un método según las reivindicaciones 2 o 5-9 o un uso según las reivindicaciones 3 o 5-9 o un kit según las reivindicaciones 4-9 en la que la fitasa tiene un pH óptimo en el intervalo de 3-4,5.
11. Una composición de aditivo alimentario, un método, un uso o un kit según la reivindicación 10, en la que la fitasa tiene un pH óptimo entre 3 y 3,5.

12. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-11 o un método según las reivindicaciones 2 o 5-11 o un uso según las reivindicaciones 3 o 5-11 o un kit según las reivindicaciones 4-11 en el que el microorganismo de alimentación directa es un microorganismo de alimentación directa antipatógeno.
- 5 13. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-12 o un método según las reivindicaciones 2 o 5-12 o un uso según las reivindicaciones 3 o 5-12 o un kit según las reivindicaciones 4-12 en la que el microorganismo de alimentación directa es una bacteria viable.
- 10 14. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 8-13 o un método según las reivindicaciones 2 o 5-13 o un uso según las reivindicaciones 4 o 5-13 o un kit según las reivindicaciones 4-13 en la que el microorganismo de alimentación directa es uno o más de los siguientes: *Bacillus subtilis* cepas 3A-P4 (PTA-6506); 15A-P4 (PTA-6507); 22C-P1 (PTA-6508); 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 NRRL-B-50104); BS 27 (NRRL B-50105); BS 18 (NRRL B-50633; y BS 278 (NRRL B-50634).
- 15 15. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-14 o un método según las reivindicaciones 2 o 5-14 o un uso según las reivindicaciones 3 o 5-14 o un kit según las reivindicaciones 4-14 en la que el microorganismo de alimentación directa está en la forma de una endospora.
- 15 16. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-15 en la que la fitasa está presente en una dosis entre 200 FTU/g de composición de aditivo alimentario y 10.000 FTU/g de composición de aditivo alimentario.
- 20 17. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-16 en la que DFM está presente en una dosis entre $3,75 \times 10^7$ UFC/g de composición de aditivo alimentario y 1×10^{11} UFC/g de composición de aditivo alimentario.
18. Un método según la reivindicación 2 que comprende administrar la composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-17.
19. El uso según la reivindicación 3 en el que se usa la composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-17.
- 25 20. Un kit según la reivindicación 4 en el que dicho kit comprende la composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-17.
21. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 4-15 o 20 que comprende al menos una vitamina y/o al menos un mineral.
- 30 22. Un método para preparar una composición de aditivo alimentario, que comprende administrar un microorganismo de alimentación directa (DFM) con una fitasa que deriva de *Citrobacter* spp., en el que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.
- 35 23. Un método según la reivindicación 22, que además comprende envasado.
24. Un alimento que comprende una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-17.
25. Un alimento según la reivindicación 24 en el que la fitasa está presente en una dosis entre 400 FTU/kg de alimento y 1.000 FTU/kg de alimento.
- 40 26. Un alimento según cualquiera de las reivindicaciones 24-25 en el que DFM está presente en una dosis entre $7,5 \times 10^4$ UFC/kg de alimento y 1×10^7 UFC/kg alimento.
27. Un método para preparar un producto alimentario que comprende mezclar un componente alimentario con una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-17.
- 45 28. Una premezcla que comprende una composición de aditivo alimentario que comprende un microorganismo de alimentación directa en combinación con una fitasa de *Citrobacter*, y al menos un mineral y/o al menos una vitamina, en la que la fitasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,1% de igualdad con aminoácidos 23-433 de SEC ID N° 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus* y sus combinaciones.
- 50 29. Una premezcla que comprende una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-17 en combinación con al menos un mineral y/o al menos una vitamina.

30. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-17 para usar en la prevención y/o tratamiento de enteritis necrótica y/o coccidiosis en aves.

FIGURA 1

SEC ID nº1

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
Val Val Ile Val Ser Arg His Xaa Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 Pro Ile Met Lys Asn Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
 Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
 Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp
 Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu
 Gln Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
 Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
 Cys Thr Leu Pro Glu Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp
 Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
 Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
 Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
 Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
 Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
 Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
 Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Xaa Asp Asn Thr Pro Pro Gly Asp
 Lys Leu Val Phe Glu Lys Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp
 Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 Gln Pro Leu Ser Leu Glu Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu
 Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
 Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr Glu

FIGURA 2

SEC ID nº2

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 Pro Ile Met Lys Asn Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
 Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
 Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp
 Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu
 Gln Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
 Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
 Cys Thr Leu Pro Glu Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp
 Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
 Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
 Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
 Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
 Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
 Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
 Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly
 Glu Leu Val Phe Glu Lys Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp
 Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 Gln Pro Leu Ser Leu Glu Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu
 Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
 Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
 Glu

FIGURA 3

SEC ID n°3

atg agt aca ttc atc att cgt tta tta ttt ttt tct ctc tta tgc ggt
 tct ttc tca ata cat gct gaa gag cag aat ggt atg aaa ctt gag cgg
 gtt gtg ata gtg agt cgt cat ggr gta aga gca cct acg aag ttc act
 cca ata atg aaa aat gtc aca ccc gat caa tgg cca caa tgg gat gtg
 ccg tta gga tgg cta acg cct cgt ggg gga gaa ctt gtt tct gaa tta
 ggt cag tat caa cgt tta tgg ttc acg agc aaa ggt ctg ttg aat aat
 caa acg tgc cca tct cca ggg cag gtt gct gtt att gca gac acg gat
 caa cgc acc cgt aaa acg ggt gag gcg ttt ctg gct ggg tta gca cca
 aaa tgt caa att caa gtg cat tat cag aag gat gaa gaa aaa aat gat
 cct ctt ttt aat ccg gta aaa atg ggg aaa tgt tgg ttt aac aca ttg
 cag gtt aaa aac gct att ctg gaa cgg gcc gga gga aat att gaa ctg
 tat acc caa cgc tat caa tct tca ttt cgg acc ctg gaa aat gtt tta
 aat ttc tca caa tgg gag aca tgt aag act aca gaa aag tct acg aaa
 tgc aca tta cca gag gct tta ccg tct gaa ctt aag gta act cct gac
 aat gta tca tta cct ggt gcc tgg agt ctt tct tcc acg ctg act gag
 ata ttt ctg ttg caa gag gcc cag gga atg cca cag gta gcc tgg ggg
 cgt att acg gga gaa aaa gaa tgg aga gat ttg tta agt ctg cat aac
 gct cag ttt gat ctt ttg caa aga act cca gaa gtt gcc cgt agt agg
 gcc aca cca tta ctc gat atg ata gac act gca tta ttg aca aat ggt
 aca aca gaa aac agg tat ggc ata aaa tta ccc gta tct ctg ttg ttt
 att gct ggt cat gat acc aat ctt gca aat tta agc ggg gct tta gat
 ctt aac tgg tgg cta ccc ggt caa ccc gat aay acc ccg ccg ggc gac
 aag ctt gta ttc gaa aag tgg aaa aga acc agt gat aat acg gat tgg
 gtt cag gtt tca ttt gtt tat cag acg ctg aga gat atg agg gat ata
 caa ccg ttg tgg tta gaa aaa cct gct ggc aaa gtt gat tta aaa tta
 att gca tgt gaa gag aaa aat agt cag gga atg tgt tgg tta aaa agt
 ttt tcc agg ctc att aag gaa att cgc gtg cca gag tgt gca gtt acg
 gaa taa

FIGURA 4

SEC ID n°4

atg agt aca ttc atc att cgt tta tta ttt ttt tct ctc tta tgc ggt
 tct ttc tca ata cat gct gaa gag cag aat ggt atg aaa ctt gag cgg
 gtt gtg ata gtg agt cgt cat gga gta aga gca cct acg aag ttc act
 cca ata atg aaa aat gtc aca ccc gat caa tgg cca caa tgg gat gtg
 ccg tta gga tgg cta acg cct cgt ggg gga gaa ctt gtt tct gaa tta
 ggt cag tat caa cgt tta tgg ttc acg agc aaa ggt ctg ttg aat aat
 caa acg tgc cca tct cca ggg cag gtt gct gtt att gca gac acg gat
 caa cgc acc cgt aaa acg ggt gag gcg ttt ctg gct ggg tta gca cca
 aaa tgt caa att caa gtg cat tat cag aag gat gaa gaa aaa aat gat
 cct ctt ttt aat ccg gta aaa atg ggg aaa tgt tgg ttt aac aca ttg
 cag gtt aaa aac gct att ctg gaa cgg gcc gga gga aat att gaa ctg
 tat acc caa cgc tat caa tct tca ttt cgg acc ctg gaa aat gtt tta
 aat ttc tca caa tgg gag aca tgt aag act aca gaa aag tct acg aaa
 tgc aca tta cca gag gct tta ccg tct gaa ctt aag gta act cct gac
 aat gta tca tta cct ggt gcc tgg agt ctt tct tcc acg ctg act gag
 ata ttt ctg ttg caa gag gcc cag gga atg cca cag gta gcc tgg ggg
 cgt att acg gga gaa aaa gaa tgg aga gat ttg tta agt ctg cat aac
 gct cag ttt gat ctt ttg caa aga act cca gaa gtt gcc cgt agt agg
 gcc aca cca tta ctc gat atg ata gac act gca tta ttg aca aat ggt
 aca aca gaa aac agg tat ggc ata aaa tta ccc gta tct ctg ttg ttt
 att gct ggt cat gat acc aat ctt gca aat tta agc ggg gct tta gat
 ctt aac tgg tgg cta ccc ggt caa ccc gat aat acc cct cct ggt ggg
 gag ctt gta ttc gaa aag tgg aaa aga acc agt gat aat acg gat tgg
 gtt cag gtt tca ttt gtt tat cag acg ctg aga gat atg agg gat ata
 caa ccg ttg tgg tta gaa aaa cct gct ggc aaa gtt gat tta aaa tta
 att gca tgt gaa gag aaa aat agt cag gga atg tgt tgg tta aaa agt
 ttt tcc agg ctc att aag gaa att cgc gtg cca gag tgt gca gtt acg
 gaa

FIGURA 5

SEC ID nº5

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Pro Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 Pro Ile Met Lys Asp Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
 Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
 Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Thr Asp
 Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Thr Cys Ser Phe Asn Thr Leu
 Lys Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
 Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
 Cys Thr Leu Pro Glu Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp
 Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
 Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
 Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
 Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
 Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
 Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
 Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly
 Glu Leu Val Phe Glu Lys Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp
 Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 Gln Pro Leu Ser Leu Glu Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu
 Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
 Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
 Glu

FIGURA 6

SEC ID n°6

aaaggtggg ctggaatga gtacattcat cattcgttta ttatTTTT ctctcttatg
 cggttcttc tcaatacatg ctgaagagcc gaacgggatg aaacttgagc gggttgtgat
 agtgagccgt catggagtaa gagcacctac gaagttcact ccaataatga aagatgttac
 acccgatcaa tggccacaat gggatgtgcc gttaggatgg ctaacgcctc gtgggggaga
 actgtttct gaattaggtc agtatcaacg ttatgggtc acaagcaaag gtctgtgaa
 taatcaaacg tgcccatctc cagggcaggt tgctgttatt gcagacacgg atcaacgcac
 ccgtaaaacg ggtgaggcgt ttctggctgg gttagcacca aaatgtcaaa ttcaagtga
 ttatcagaag gatgaagaaa aaactgatcc tcttttaac ccagtaaaaa tggggacatg
 ttctgttaac acattgaagg ttaaaaacgc tattctggaa cgggccggag gaaatattga
 actgtatacc caacgctac aatcttcatt tcggaccctg gaaaatgttt taaattctc
 acaatcggag acatgtaaga ctacagaaaa gtctacgaaa tgcacattac cagaggcttt
 accgtctgaa ctaaggtaa ctctgacaa tgtatcatta cctggtgctt ggagtcttc
 ttccacgctg actgagatat ttctgtgca agaggcccag ggaatgccac aggtagcctg
 ggggcgtatt acgggagaaa aagaatggag agatttgta agtctgcata acgctcagtt
 tgatctttg caaagaactc cagaagttgc ccgtagtagg gccacacat tactcgatat
 gatagacact gcattattga caaatgttac aacagaaaa acggtatggca taaaattacc
 cgtatctctg ttgtttattg ctggatga taccaatctt gcaaatttaa gcggggcttt
 agatctaac tggctgctgc ccggtcaacc cgataatacc cctctggg gggagcttgt
 attcgaaaag tggaaaagaa ccagtgataa tacggattgg gttcaggttt catttgttt
 tcagacgctg agagatatga gggatataca accgtgtctg ttagaaaaac ctgccggcaa
 agttgattta aaattaattg catgtgaaga gaaaaatagt cagggaatgt gttcgttaaa
 aagttttcc aggctatta aggaaattcg cgtgccagag tgtgcagttt cggaataagt
 aactaattac tatatatagc gtattaaaaa atagaaaccc ccggtttgta gtcgggggta
 ttctattgt tcataattac a

FIGURA 7

SEC ID nº7

MSTFIIRLLIFSLLCGSFSIHAEEQNGMKLERVVIVSRHGVRAPTKFTPIMKDVTPDQWPQWDVPLGWL
TPRGGELVSELGQYQRLWFTSKGLLNQTCPSPGQVAVIADTDQRTRKTGEAFLAGLAPKCQIQVHY
QKDEEKNDPLFNPVKMGKCSFNLTQVKNAILERAGGNIELYTQRYQSSFRLENVLFNSQSETCKTTE
KSTKCTLPEALPSEFKVTPDNVSLPGAWSLSSTLTEIFLLQEAQGMPQVAWGRITGEKEWRDLSLHN
AQFDLLQRTPEVARSRATPLLDMIDTALLTNGTTENRYGIKLPVSLFFIAGHDTNLANLSGALDLKWSLP
GQPDNTPPGGELVFEKWKRTSDNTDWWQVSFVYQTLRDMRDIQPLSLEKPAKVDLKLIACEEKNSQ
GMCSLKSFSRLIKEIRVPECAVTE

FIGURA 8

SEC ID nº8

SLALSTQFSFVAAQLPIPAQNTSNWGPYDPFFPVEPYAAPPEGCTVTQVNLQIRHGARWPTSGARSR
QVA AVAKIQMARPFTDPKYEF LNDFVYKFGVADLLPFGANQSHQTGTDMYTRYSTLFE GGDVFPVRA
AGDQRRVDSSTNWTAGFGDASGETVLP TLQVVLQEEGNCTLCNNMCPNEVDGDESTTWLGVFAPNI
TARLNAAAPSANLSDSDALTLMDMCPFDLSSGNASPFCDLFTAEEYVSYEYDYDLKYYGTGPGNA
LGPVQGVGYVNE LLARLTGQAVRDETQTNRTLSDPATFPLNRTFYADFSHDNTMVPIFAALGLFNAT
ALDPLKPDENRLWVDSKLVPFSGHMTVEKLACSGKEAVRVLVNDVAVQPLEFCGGVDGVCELSAFVE
SQTYARENGQGDFAKCGFVPSE

FIGURA 9

SEC ID nº9

MSTFIIIRLLF FSLLCGSFSI HAAEQNGMKL ERVVIVSRHG VRAPTKFTPI MKDVTPDQWP
 70 80 90 100 110 120
 QWDVPLGWLT PRGGELVSEL GQYQRLWFTS KGLLNNQTCF SPGQVAVIAD TDQTRKTGE
 130 140 150 160 170 180
 AFLAGLAPKC QIQVHYQKDE EKTDFLFPV KMGTCFNTL KVKNAILERA GGNIELYTOR
 190 200 210 220 230 240
 YQSSFRTLEN VLNFSQSETC KTEKSTKCT LPEALPSELK VTPDNVSLPG AWSLSSTLTE
 250 260 270 280 290 300
 IFLLQEAQGM POVAWGRITG EKEWRDLSL HNAQFDLLOR TPEVARSRAT PLLDMIDTAL
 310 320 330 340 350 360
 LTNGTTENRY GIKLPVSLLF IAGHDTNLAN LSGALDLNWS LPGQPDNTPP GGELVFEKWK
 370 380 390 400 410 420
 RTSNDTDWVQ VSFVYQTLRD MRDIQPLSLE KPAGKVDLKL IACEEKNSQG MCSLKSF SRL
 430
 IKEIRVPECA VTE

FIGURA 10

SEC ID n°10

MSTFIIRLLFFSLLCGSFSIHAEEQNGMKLERVVIVSRHGVRAPT
KFTPIMKDVTPDQWPQWDVPLGWLTPRGGELVSELGQYQLWFTSKGLLNNQTCPSPGQ
VAVIADTDQORTRKTGEAFLAGLAPKCQIQVHYQKDEEKTDFLFPVKMGTCSENTLKVK
NAILERAGGNIELYTQRYQSSFRLENVLFNFSQSETCKTTEKSTKCTLPEALPSELKVT
PDNVS LPGAWSLSSTLTEIFLLQEAQGMPQVAWGRITGEKEWRDILLSLHNAQFDLLQRT
PEVARSRATPLLDMIDTALLTNGTTENRYGIKLPVSLLFIAGHDTNLANLSGALDLNWS
LPGQPDNTPPGGELVFEKWKRTSDNTDWVQVSFVYQTLRDMRDIQPLSLEKPAKVDLK
LIACEEKNSQGMCSLKSFSRLIKEIRVPECAVTE

FIGURA 11

SEC ID n°11

aaagggaaagc	ccglttgctgt	tctttcaaac	aacgatggct	gcgttattgc	cagtagcgta	60
gaggcaaagc	cgcttggcgt	taatatgggc	gctccgtact	tcaaacagaa	agatctgttc	120
aggcgctatg	gcgtgttctg	ttttagttcg	aactacgaac	tgtatgcgga	tatgagcagc	180
aggngtgatg	tcgattctgg	aggagtgttc	gccacgcgtg	gagatataca	gtattgatga	240
agccttttgt	gatttaacgg	gcgtgcgaaa	ctgcagggat	cttacggatt	ttggtcagga	300
aatcacagca	accatthtgc	agaaaacacg	tctcacgggt	ggggtcggca	ttgctcagac	360
caaaaccctg	gcccactctg	cgaaccatgc	ggccaaaaag	tggcaggaac	agacgggagg	420
agtcgtggat	ctctcaaata	ttgaacgccca	gcgtaagctg	atggcagcac	tcccggttga	480
tgaagtctgg	ggcatcggac	gccgtatcgg	caagnaactg	gaacgtcatg	ggcatncaaa	540
cggttctcga	acctcgcggg	tcccgatcat	tcgcttcatt	cgtcáaacat	cttcagcgtc	600
gtgcttgaag	cncaaccgtc	cgggcattgc	gcggtgagcc	ttgttctggc	gctggaaaaa	660
gtttgcgccg	gaatcagcag	gcaattatct	gctcagaatc	gtttggtgaa	aaactcaccg	720
aattacaacg	ccatgaaaaa	aggccatttg	cacctatgct	tcacgtgctg	cggaaaagct	780
gcgcagaaaa	caccagtact	gccggtttat	ctctacgttt	atcaaaaacca	gtccgtttgc	840
cctgaatgaa	ccttattacg	gtaacagcgc	atcgataaaa	ctgctgacgc	caactcagga	900
tanccgggac	attattacag	cagccacgcg	cagcctggac	gccgtttggc	gagaggggct	960
acgttatcaa	aaagcggggc	ttatgctggg	ggatthtttt	agctctggcg	ttgcacagct	1020
gaatcttttt	gataataacg	ccccgcggcg	taacagcgcg	aaattgatgg	acctactgga	1080
tactcttaat	gctgaaaaag	ggaaaggaaac	gctctacttt	gccgggcaag	ggatacagca	1140
gccgtggggc	atgaagcgag	acatgctttc	accacgttat	acaacaagat	acagtgattt	1200
gctgcgggta	aattgatagc	caaacaaggc	ttccgcccac	cttattttata	ccggatcaat	1260
tatcctttca	atgacaggac	gttgtaaaatt	gccaacgatt	ccataacctt	gggatacctt	1320
tccagcgcgg	ctaaattagc	gctcctttaa	tacttcgata	agatacaaa	ttgatatgca	1380
aaaagtggga	ttgthgtgaa	ctcaggagta	ggattatttc	tatctgatag	aacaggttat	1440
cgaactggct	tatacagatt	gtttgttttt	cacttacgaa	aaggtgggtc	tggctaattga	1500
gtacattcat	cattcgttta	ttatthtttt	ctctcttatg	cggttctttc	tcaatacatg	1560
ctgaagagca	gaacgggatg	aaacttgagc	gggttgatg	agtgagccgc	catggagtaa	1620
gagcacctac	gaagttcact	ccaataatga	aagatgtcac	acccgatcaa	tggccacaat	1680
gggatgtgcc	gttaggatgg	ctaacgcctc	gtgggggaga	acttgthtct	gaattaggtc	1740
agttcaacag	tttatggthc	acgagcaaa	gtctgttgaa	taatcaaacg	tgccactctc	1800
cagggcaggt	tgctgtttat	gcagacacgg	atcaacgcac	ccgtaaaacg	ggtgaggcgt	1860
ttctggctgg	gttagcacca	aaatgtcaaa	ttcaagtgca	ttatcagaag	gatgaagaaa	1920
aaactgatcc	tctthttaat	ccagtaaaaa	tggggacatg	ttcgthtaac	acattgaagg	1980
ttaaaaacgc	tattctggaa	cgggcccggg	gaaatattga	actgtatacc	caacgctatc	2040
aatcttcatt	tcggaccctg	gaaaatgtht	taaatttctc	acaatcggag	acatgtaaga	2100
ctacagaaaa	gtctacgaaa	tgcacattac	cagaggcttt	acogtctgaa	cttaaggtaa	2160
ctcctgacaa	tgtatcatta	cctggtgctc	ggagcctttc	ttccacgctg	actgagatat	2220
ttctgttgca	agaggcccag	ggaatgccac	aggtagcctg	ggggcgtatt	acgggggaaa	2280
agaatggag	agatthgtta	agtctgcata	acgctcagtt	tgatctthttg	caaagaactc	2340
cagaagttgc	ccgtagttaga	gccacaccat	tactcगतat	gatagacact	gcattattga	2400
caaatggtag	aacagaaaa	aggtagggca	taaaattacc	cgtatctctg	ttgtthattg	2460
ctggtagtag	taccaatctt	gcaaatttaa	gcggggcttt	agatcttaac	tggctcgtac	2520
ccggtcaacc	cgataatacc	cctcctgggt	gggagcttgt	attcgaaaag	tggaaaagaa	2580
ccagtataaa	tacggattgg	gttcaggtht	catttgthta	tcagacgctg	agagatatga	2640
gggatataca	accgthgtcg	ttagaaaaac	ctgccggcaa	agthgattta	aaattaattg	2700
catgtgaaga	gaaaaatagt	cagggaaatgt	gttcgthtaaa	aagthtttcc	aggctcatta	2760
aggaaattcg	cgtgccagag	tgtgcagtht	cggaataagt	aatthattat	tatatatata	2820
gcgtatthaa	aaatagaaac	ccccgthttg	tagtcggggg	tattcgtatt	gtthcataat	2880
tacatgagtc	ttcaactgac	tgctctthtg	gagtgacaat	ccagthtacgc	tgctccagaa	2940
aaaatccgga	ctgttcagcg	atgcagaata	catcgaaaag	cgctcggtht	tggactgcga	3000
ctctaaaaacc	gcttaacacg	gttatatgcc	cacatagthc	taaatgtgct	gtthgtgcaa	3060
cgatthaaat	aataacaagt	tattthattt	acaattagth	aaaaaaactg	atagthatacc	3120
cccctatagt	atthggaggg	cgatggccgc	atthccccga	agataaaaaa	cgcatthctca	3180
ccggtgtacg	cogtattcgc	ggtcaggttg	atgcgcttga	gcgcgcgctg	gagthccggcg	3240
agccgthgtt	ggctatctctg	caacaaattg	ccgcgctgc			3279