

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 137**

51 Int. Cl.:

<b>A23K 10/18</b>	(2006.01)	<b>A61K 38/48</b>	(2006.01)
<b>A23K 20/189</b>	(2006.01)	<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>A23K 40/10</b>	(2006.01)	<b>C12R 1/125</b>	(2006.01)
<b>A23K 40/30</b>	(2006.01)		
<b>A23K 50/30</b>	(2006.01)		
<b>A23K 50/75</b>	(2006.01)		
<b>A61K 35/741</b>	(2015.01)		
<b>A61K 35/742</b>	(2015.01)		
<b>A61K 38/46</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/47</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2012 PCT/GB2012/050124**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO2012110778**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 12701264 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2675286**

54 Título: **Composición de aditivo alimentario**

30 Prioridad:

**18.02.2011 GB 201102857**

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

**03.07.2017**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS  
(100.0%)  
Langebrogade 1 P.O. Box 17  
1001 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**MILLÁN, LUIS FERNANDO ROMERO;  
GREGORY ROSS SIRAGUS;  
MARI ELLEN DAVIS y  
ALEXANDRA HELENA SMITH**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 621 137 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 combinación específica de enzimas, y a una composición de aditivo alimentario que comprende un microorganismo de alimentación directa en combinación con una combinación específica de enzimas. La presente invención además se refiere a usos y kits.

**Antecedentes de la invención**

10 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. Las combinaciones de enzimas están disponibles para mejorar el valor nutritivo de dietas que contienen granos de soja, harinas de proteína animal, o subproductos alimentarios ricos en fibra.

15 El concepto de microorganismos de alimentación directa (DFM) implica alimentar con microorganismos beneficiosos a animales, tales como ganado lácteo cuando están en periodos de estrés (enfermedad, cambios de ración, objetivos medioambientales o de producción). Probióticos es otro término para esta categoría de aditivos alimentarios. Probióticos o DFM han mostrado que mejoran el rendimiento animal en estudios controlados. DFM incluyen bacterias de alimentación directa y/o productos con base de levadura.

20 Aunque se han contemplado las combinaciones de DFM con algunas enzimas, la interacción entre DFM y enzimas nunca se ha entendido completamente. La presente invención se refiere a combinaciones específicas nuevas que sorprendentemente mejoran significativamente las características de rendimiento de producción de animales.

25 La base de datos WPI Week 200853 Thomson Scientific, Londres, GB, AN 2008-J20352 & CN 101 181 016 A describe un alimento para pollos adecuado para mejorar el rendimiento de puesta, que comprende fosfato de calcio, polvo de piedra, sal común, bicarbonato de sodio, colina, micro elementos, citrina, vitamina C, metionina, harina de pescado *Bacillus subtilis*, fitasa y una preparación de complejo de enzimas. Preferentemente, dicha preparación de complejo de enzimas consiste en una o más combinaciones de proteasa, amilasa, celulasa, xilanas,  $\beta$ -manasa. *Bacillus subtilis* puede consumir oxígeno libre en el ambiente interno del tracto alimentario rápidamente, genera hipoxia intestinal, promueve el crecimiento de anaerobio útiles, produce ácidos orgánicos tal como ácido láctico, reduce el valor del pH intestinal, indirectamente suprime el crecimiento de otras bacterias patógenas, la capacidad del *Bacillus subtilis* de autodigestión sintética de enzimas naturales, tales como proteasa, amilasa, lipasa, celulasa, etc, actúa junto con enzimas endógenas en el tracto alimentario y mejora la digestibilidad del forraje. La fitasa mejora la proporción de la utilización de absorción del fósforo del fitato del forraje.

30 WANG J ET AL: "Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens.", JOURNAL OF APPLIED POULTRY RESEARCH, vol. 15, n° 4, página 544, describe un estudio de los efectos beneficiosos de Versazyme, un aditivo alimentario de queratinasa, sobre el peso corporal, conversión de alimento, y rendimiento de pechuga de pollos broiler.

40 RAVINDRAN V ET AL: "Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorous levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention", BRITISH POULTRY SCIENCE, vol 41, 1 de enero de 2000 (2000-01-01), páginas 193-200, ISSN: 0007-1668 describe un estudio de la respuesta de pollos broiler a complementación con fitasa microbiana influenciado por ácido fítico dietético y niveles de fósforo no de fitato. La fitasa complementaria aumenta la energía metabolizable aparente, digestibilidad de fósforo, nitrógeno y aminoácidos en el íleon, y retención de materia seca, fósforo y nitrógeno.

45 La patente WO 03/062409 A2 describe una composición que comprende al menos dos enzimas termoestables seleccionadas del grupo que consiste en endoglucanasa, xilanas, fitasa, proteasa, galactanasa, mananasa, dextranasa, y algalactosidasa como un aditivo de alimentación animal. Además puede comprender (a) al menos una vitamina soluble en grasa, y/o (b) al menos una vitamina soluble en agua, y/o (c) al menos una traza de mineral. Es útil para mejorar el valor nutricional de alimentos para animales, especialmente los que contienen soja, trigo, cebada, avena y/o arroz como una fuente de proteína vegetal. Preferentemente, comprende una combinación de fitasa y proteasa.

50 La patente de EEUU 2007/202088 A1 (BALTZLEY TAMMY [US] ET AL) 30 de agosto de 2007 (2007-08-30) describe una cepa aislada de *Bacillus* LSSAO1, que además comprende al menos una cepa más de *Bacillus* escogida de al menos una de las cepas 3A-P4, 15A-P4, 22C-P1, BS27, y 2084. También se describe un método que comprende administrar una cantidad eficaz de dicha cepa de *Bacillus* a pollo, la administración de la cepa proporciona al menos un beneficio escogido de aumentar G + C bajo, bacteria gram positiva en la flora gastrointestinal del ave e inhibir un patógeno elegido de al menos uno de *E. coli*, *Salmonella* y *Clostridium* en el ave, y control enteritis necrótica.

### Compendio de la invención

Un descubrimiento trascendental de la presente invención es que un DFM en combinación con una proteasa, xilanasa, amilasa y fitasa tiene efectos significativamente beneficiosos sobre el rendimiento de un animal.

5 En particular, un descubrimiento trascendental de la presente invención es que un DFM en combinación con una proteasa, xilanasa, amilasa y fitasa 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), capacidad de digestión de una materia prima (p. ej., digestibilidad de nutrientes, tal como digestibilidad de aminoácidos), retención de nitrógeno, supervivencia, rendimiento de carcasa, velocidad de crecimiento, ganancia de peso, eficiencia alimentaria, resistencia de los animales a enteritis necrótica, respuesta inmune del sujeto, o el crecimiento de bacterias beneficiosas en el tracto gastrointestinal de un sujeto.

10 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 del sujeto.

15 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 proteasa, una xilanasa, una amilasa y una fitasa, según se reivindica.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para mejorar el rendimiento de un sujeto, cuyo método comprende administrar a un sujeto un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa, una xilanasa, una amilasa y una fitasa, según se reivindica. Aún un aspecto más de la presente invención es el uso de un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa, una xilanasa, una amilasa y una fitasa para mejorar el rendimiento de un sujeto, según se reivindica.

En un aspecto más de la presente invención se proporciona un kit que comprende un microorganismo de alimentación directa, una proteasa, una xilanasa, una amilasa, una fitasa (y opcionalmente al menos una vitamina y/o opcionalmente al menos un mineral) e instrucción de administración.

25 En otro aspecto la presente invención proporciona un método para preparar una composición de aditivo alimentario, que comprende administrar un microorganismo de administración directa con una proteasa, una xilanasa, una amilasa y una fitasa y (opcionalmente) envasar.

Aún un aspecto más de la presente invención proporciona alimento o producto alimentario que comprende una composición de aditivo alimentario que comprende (o que consiste esencialmente en o consiste en) un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa, una xilanasa, una amilasa y una fitasa.

30 Una premezcla que comprende una composición de aditivo alimentario que comprende (o que consiste esencialmente en o consiste en) un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa, una xilanasa, una amilasa y una fitasa, y al menos un mineral y/o al menos una vitamina.

35 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 que comprende (o que consiste esencialmente en o consiste en) un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa, una xilanasa, una amilasa y una fitasa.

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

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

### Breve descripción de las figuras

45 La figura 1 muestra que una combinación de DFM (Envivo Pro® disponible de Danisco A/S) con una combinación de una xilanasa (p. ej., una endo-xilanasa de *Trichoderma xilanasa*), una amilasa (p. ej., una *Bacillus licheniformis* alfa-amilasa), una proteasa (p. ej., *Bacillus subtilis* proteasa) y una fitasa (p. ej., 500 FTU/kg de Phyzyme XP (una *E. coli* fitasa) disponible de Danisco A/S) mejora significativamente (reduce) grados de lesión de enteritis necrótica en el intestino de los animales comparado con el control objetivo. En algunas realizaciones la xilanasa, amilasa y proteasa se pueden formular juntas en AxtaXAP® [que contiene 2.000 XU/kg alimento de xilanasa; 200 AU/kg alimento de amilasa y 4.000 PU/kg alimento de proteasa] también disponible de Danisco A/S).

50 La figura 2 muestra que una combinación de DFM (Envivo Pro® disponible de Danisco A/S) con una combinación de una xilanasa (p. ej., una endo-xilanasa de *Trichoderma xilanasa*), una amilasa (p. ej., una *Bacillus licheniformis* alfa-amilasa), una proteasa (p. ej., *Bacillus subtilis* proteasa) y una fitasa (p. ej., 500 FTU/kg de Phyzyme XP (una *E. coli* fitasa) disponible de Danisco A/S) mejora significativamente la ganancia de peso corporal (ganancia PC) en pollos broiler objetivo con *Clostridium perfringens* comparado con el control objetivo – incluso dando como resultado una

- ganancia PC que mejoró sobre un control negativo (es decir, un control no objetivo). Esto fue significativamente mejor que cualquier otra combinación de enzimas tal como amilasa y fitasa o proteasa y fitasa, y significativamente mejor que DFM aplicado al control objetivo. En algunas realizaciones la xilanasa, amilasa y proteasa se pueden formular juntas en AextraXAP® [que contiene 2.000 XU/kg alimento de xilanasa; 200 AU/kg alimento de amilasa y 4.000 PU/kg alimento de proteasa] también disponible de Danisco A/S). EEM combinado = 28,6.
- La figura 3 muestra una combinación de DFM (Envivo Pro® disponible de Danisco A/S) con una combinación de una xilanasa (p. ej., una endo-xilanasa de *Trichoderma xilanasa*), una amilasa (p. ej., una *Bacillus licheniformis* alfa-amilasa), una proteasa (p. ej., *Bacillus subtilis* proteasa) y una fitasa (p. ej., 500 FTU/kg de Phyzyme XP (una *E. coli* fitasa) disponible de Danisco A/S) que mejora significativamente la proporción de conversión del alimento (FCR) (g ingesta alimento/g ganancia PC) en pollos broiler objetivo con *Clostridium perfringens* al nivel de las aves no objetivo. Esto fue significativamente mejor que otra combinación de enzimas con el DFM tal como amilasa y fitasa o proteasa y fitasa. En algunas realizaciones la xilanasa, amilasa y proteasa se pueden formular juntas en AextraXAP® [que contiene 2.000 XU/kg alimento de xilanasa; 200 AU/kg alimento de amilasa y 4.000 PU/kg alimento de proteasa] también disponible de Danisco A/S).
- La figura 4 muestra expresión relativa de ARNm de IFN-g usado como indicador de inflamación en el intestino, y muestra que una combinación de DFM (Envivo Pro®) con una combinación de xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa (Avizyme 1502® disponible de Danisco A/S + 500 FTU/kg de PhyzymeXP (una *E. coli* fitasa) aumenta la expresión IFN-g a los 11 días y la reduce a los 20 días.
- La figura 5 muestra la energía aparente digestible en el íleon (mCal/kg) y muestra que una combinación de DFM (Envivo Pro®) con una xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa (se usaron dos mezclas diferentes de enzimas, la primera era Avizyme 1502® disponible de Danisco A/S + 500 FTU/kg de PhyzymeXP (una *E. coli* fitasa); y la segunda era AextraXAP® [que contiene 2.000 XU/kg alimento de xilanasa; 200 AU/kg alimento de amilasa y 4.000 PU/kg alimento de proteasa] también disponible de Danisco A/S + 500 FTU/kg de PhyzymeXP (una *E. coli* fitasa) mejoraba significativamente de energía digestible.
- La figura 6 muestra digestibilidad de aminoácidos significativamente mejorada con una combinación de DFM (Envivo Pro®) con una xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa. La mejora de digestibilidad de las fracciones indigestibles de aminoácido a nivel del íleon con una combinación de DFM con xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa era mayor que la mejora de DFM sólo o la combinación de xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa sin DFM.
- La figura 7 muestra digestibilidad de energía mejorada con una combinación de DFM (Envivo Pro®) con una xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa.
- La figura 8 muestra energía metabolizable aparente EMAn corregida en nitrógeno de dietas de tratamiento para alimentar pollos broiler de 17 a 21 días de edad.
- La figura 9 muestra que una combinación de DFM (Envivo Pro®) con una xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa (se usaron dos mezclas diferentes de enzimas, la primera era Avizyme 1502® disponible de Danisco A/S + 500 FTU/kg de PhyzymeXP (una *E. coli* fitasa); y la segunda era AextraXAP también disponible de Danisco A/S + 500 FTU/kg de PhyzymeXP (una *E. coli* fitasa) mejoraba significativamente la retención de nitrógeno.
- La figura 10 muestra que una combinación de DFM (Envivo Pro®) con una xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa (Avizyme 1502® disponible de Danisco A/S + PhyzymeXP (una *E. coli* fitasa)) reduce significativamente la abundancia de ARNm de MUC-2 en los raspados de mucosa del íleon en el día 14 tratados con una sobredosis de vacuna de coccidios al eclosionar, comparado con los tratamientos control objetivo y no objetivo.
- La figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 1) de una alfa amilasa resistente a pepsina de *Bacillus licheniformis*.
- La figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº2) de una alfa amilasa resistente a pepsina de *Bacillus licheniformis*.
- La figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 3) de una alfa amilasa resistente a pepsina de *Trichoderma reesei*.
- La figura 14 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 4) de una alfa amilasa resistente a pepsina de *Trichoderma reesei*.
- La figura 15 muestra la proporción de conversión del alimento de pollos broiler a 48 días de edad.
- La figura 16 muestra un mapa de calor de los perfiles de expresión de genes de interés para todos los tratamientos para yeyuno a los 23 días de edad.

Control no objetivo = control no objetivo + fitasa

CO = control objetivo + fitasa

CO + amilasa = control objetivo + fitasa + amilasa

CO + XAP = control objetivo + fitasa + xilanasas + amilasa + proteasa

CO + EP = control objetivo + fitasa + Envivo Pro

CO + EP + Amilasa = control objetivo + fitasa + amilasa + Envivo Pro

5 CO + EP+ XAP = control objetivo + fitasa + xilanasas + amilasa + proteasa + Envivo Pro

La figura 17 muestra un mapa de calor de perfil de expresión de alfa amilasa de pollo para todos los tratamientos de páncreas a los 23 días de edad.

Control no objetivo = control no objetivo + fitasa

CO = control objetivo + fitasa

10 CO + amilasa = control objetivo + fitasa + amilasa

CO + XAP = control objetivo + fitasa + xilanasas + amilasa + proteasa

CO + EP = control objetivo + fitasa + Envivo Pro

CO + EP + Amilasa = control objetivo + fitasa + amilasa + Envivo Pro

CO + EP+ XAP = control objetivo + fitasa + xilanasas + amilasa + proteasa + Envivo Pro

15 La figura 18 muestra energía metabolizable aparente (EMAn) corregida por retención de nitrógeno de pollos broiler de 21 días de edad. Efecto de DFM; P<0,001; efecto de enzima; P<0,001; efecto de DFM x enzima; P = 0,27; EEM combinado = 32 kcal.

La figura 19 muestra proporción de conversión de alimentos (FCR) de pollos broiler en un modelo objetivo de enteritis necrótica (EEM combinado: 0,015).

20 La figura 20 muestra la proporción relativa de *Lactobacillus* spp. el día 21 en yeyuno en pollos broiler ChSq <0,0001.

### Descripción detallada de la invención

Preferentemente cada una de las enzimas usadas en la presente invención son exógenas al DFM. En otras palabras las enzimas preferentemente son añadidas a o mezcladas con el DFM.

25 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.

30 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.

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

40 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.

5 A lo largo de la presente especificación pueden aparecer otras definiciones de términos. Antes de que se describan las realizaciones de ejemplos en más detalle, se entiende que la presente descripción no está limitada a las realizaciones particulares descritas, como tal pueden variar, por supuesto. 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

#### Microorganismos de alimentación directa (DFM)

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

30 Preferentemente el DFM comprende un microorganismo viable. Preferentemente el DFM comprende una bacteria viable o una levadura viable o un hongo viable.

En una realización preferente el DFM comprende una bacteria viable.

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

35 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.

40 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.

En algunos aspectos, el DFM según la presente invención puede ser uno o más de los siguientes: una bacteria, una levadura o un hongo.

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

En la presente invención, el término microorganismo de alimentación directa (DFM) engloba bacteria de alimentación directa, levadura de alimentación directa, hongo de alimentación directa y sus combinaciones.

Preferentemente el DFM es una bacteria de alimentación directa.

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

Preferentemente la bacteria o bacterias es o están aisladas. El DFM se puede seleccionar de los siguientes *Bacillus* spp: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

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

5 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).

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

10 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.

15 *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.

20 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.

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 (LSSA01)	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		

25 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
Envivo Pro®, (antiguamente conocido como Avicorr®)	Danisco A/S	<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2084 n° de acceso NRRI 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	

Nombre del producto	Empresa	Microorganismo(s)	Ingredientes simbióticos
Clostat®	Kemin Industries Inc.	<i>Bacillus subtilis</i> cepa PB6	
Gallipro® & GallipoMax®	Chr. Hansen A/S	<i>Bacillus subtilis</i> cepa C3102	
Gallipro® & GallipoMax®	Chr. Hansen A/S	<i>Bacillus licheniformis</i>	
Proflora®	Alpharma Inc.	<i>Bacillus subtilis</i> cepa QST 713	β-mos β-manan oligosacáridos y β-glucanos
Ecobiol® &	Norel S.A.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CECT-5940	
Ecobiol® Plus			
BioPlus2B®	DSM	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i>	
CSI®	Danisco A/S	cepa <i>Bacillus</i>	
	Nutrition		
Animavit®	KRKA	<i>Bacillus subtilis</i>	
PepSoyGen-C®	Regal BV (Nutraferma)	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Aspergillus oryzae</i>	

En una realización adecuada el DFM puede ser Envivo Pro®. Envivo 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, incorporada en la presente memoria como referencia).

- 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.

- 20 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.

- 25 En una realización el DFM adecuadamente puede disminuir o prevenir el establecimiento intestinal de microorganismo patógenos (tales como *Clostridium perfringens* y/o *E. coli* y/o *Salmonella* spp y/o *Campylobacter* spp.).

- 30 El DFM según la presente invención puede ser cualquier DFM adecuado. 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.

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.

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

- 5 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.

- 10 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*.

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

- 15 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.

- 20 En una realización para determinar si un DFM es un DFM antipatógeno 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, por ejemplo 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,

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

- 25 *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.

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.

- 30 Preferentemente el DFM no es un microorganismo inactivado.

- 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 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.

- 50 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; fructosa; 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 arabitol. 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 más 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  $1 \times 10^3$  UFC/g de alimento a aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/g de alimento, apropiadamente entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  UFC/g de alimento a aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/g de alimento, apropiadamente entre aproximadamente  $7,5 \times 10^4$  UFC/g de alimento a aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/g de alimento.

En una realización el DFM se dosifica en el producto alimentario a más de aproximadamente  $1 \times 10^3$  UFC/g de alimento, apropiadamente más de aproximadamente  $1 \times 10^4$  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  $1 \times 10^5$  UFC/g de composición a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  UFC/g de composición, apropiadamente entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/g de composición a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  UFC/g de composición, apropiadamente entre aproximadamente  $3,75 \times 10^7$  UFC/g de composición a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  UFC/g de composición.

En una realización el DFM se dosifica en la composición de aditivo alimentario a más de aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente  $1 \times 10^6$  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  $2 \times 10^5$  UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente  $2 \times 10^6$  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.

Xilanasa.

Xilanasa es el nombre que se da a una clase de enzimas que degradan el polisacárido beta-1,4-xilano lineal en xilosa, por consiguiente rompiendo hemicelulosa, uno de los mayores componentes de las paredes celulares de plantas.

La xilanasa para usar en la presente invención puede ser cualquier xilanasa comercialmente disponible.

Apropiadamente la xilanasa puede ser una endo-1,4-β-d-xilanasa (clasificada como E.C. 3.2.1.8) o una 1,4-β-xilosidasa (clasificada como E.C. 3.2.1.37).

En una realización preferentemente la xilanasa es una endoxilanasa, p. ej., una endo-1,4-β-d-xilanasa. La clasificación para una endo-1,4-β-d-xilanasa es E.C. 3.2.1.8.

En una realización la presente invención se refiere a un DFM es combinación con una endoxilanasa, p. ej., una endo-1,4-β-d-xilanasa, y otra enzima.

Toda la clasificación de enzimas E.C. referida en la presente memoria se relaciona con la clasificación proporcionada en Recomendaciones de Nomenclatura Enzimática (1992) del comité de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular – ISBN 0-12-226164-3.

5 Apropriadamente, la xilanasa para usar en la presente invención puede ser una xilanasa de *Bacillus*, *Trichoderma*, *Thermomyces*, *Aspergillus* y *Penicillium*.

En una realización la xilanasa puede ser la xilanasa en Axtra XAP® o Avizyme 1502®, ambos productos disponibles comercialmente de Danisco AVS.

En una realización preferente la xilanasa para usar en la presente invención puede ser una o más de las xilanasas en uno o más de los productos comerciales siguientes:

Nombre comercial ®	Empresa	Tipo de xilanasa	Fuente de xilanasa
Allzyme PT	Alltech	endo-1,4-β-xilanasa	Aspergillus Niger
Amylofeed	Andrés Pinaluba S.A.	endo-1,4-β-xilanasa	Aspergillus Niger (phoenicis)
Avemix 02 CS	Aveve	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma reesei
AveMix XG 10	Aveve, NL	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma reesei
Avizyme 1100	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Avizyme 1110	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Avizyme 1202	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Avizyme 1210	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Avizyme 1302	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Avizyme 1500	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Avizyme 1505	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Avizyme SX	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Belfeed MP 100	Beldem	endo-1,4-β-xilanasa	Bacillus subtilis
Biofeed Plus	DSM	endo-1,4-β-xilanasa	Humicola insolens
Danisco Glycosidase (TPT/L)	Danisco Animal Nutrition	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma reesei
Danisco Xylanase	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma reesei
Econase XT	ABVista	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma reesei
Endofeed® DC	Andrés Pinaluba S.A.	endo-1,4-β-xilanasa	Aspergillus Niger
Feedlyve AXL	Lyven	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Grindazym GP	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Aspergillus Niger
Grindazym GV	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Aspergillus Niger
Hostazym X	Huvepharma	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Kemzyme Plus Dry	Kemin	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma viride
Kemzyme Plus Liquid	Kemin	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma viride
Kemzyme W dry	Kemin	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma viride
Kemzyme W liquid	Kemin	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma viride
Natugrain	BASF	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Natugrain TS Plus	BASF	endo-1,4-β-xilanasa	Aspergillus Niger
Natugrain Wheat	BASF	endo-1,4-β-xilanasa	Aspergillus Niger
Natugrain® TS/L	BASF	endo-1,4-β-xilanasa	Aspergillus Niger

Nombre comercial ®	Empresa	Tipo de xilanasa	Fuente de xilanasa
Natuzyme	Bioproton	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum/ Trichoderma reesei
Porzime 8100	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Porzime 8300	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Porzime 9102	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Porzime 9310/Avizyme 1310	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Porzime tp 100	Danisco	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Ronozyme Ax	DSM	endo-1,4-β-xilanasa	Thermomyces lanuginosus gen expresado en Aspergillus oryzae
Ronozyme WX	DSM/Novozymes	endo-1,4-β-xilanasa	Thermomyces lanuginosus gen expresado en Aspergillus oryzae
Rovabio Excel	Adisseo	endo-1,4-β-xilanasa	Penicillium funiculosum
Roxazyme G2	DSM/Novozymes	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Safizym X	Le Saffre	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum
Xylanase	Lyven	endo-1,4-β-xilanasa	Trichoderma longibrachiatum

Preferentemente, la xilanasa está presente en el producto alimentario en el intervalo de aproximadamente 500 XU/Kg a aproximadamente 16.000 XU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 750 XU/Kg a aproximadamente 8.000 XU/Kg de alimento, e incluso más preferentemente de aproximadamente 1.000 XU/Kg de alimento a aproximadamente 4.000 XU/Kg de alimento.

- 5 En una realización la xilanasa está presente en el producto alimentario más de aproximadamente 500 XU/Kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 600 XU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 700 XU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 800 XU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 900 XU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 1.000 XU/kg de alimento.

- 10 En una realización la xilanasa está presente en el producto alimentario menos de aproximadamente 16.000 XU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 8.000 XU/kg, apropiadamente menos de aproximadamente 7.000 XU/kg, apropiadamente menos de aproximadamente 6.000 XU/kg, apropiadamente menos de aproximadamente 5.000 XU/kg, apropiadamente menos de aproximadamente 4.000 XU/kg.

- 15 Preferentemente, la xilanasa está presente en la composición de aditivo alimentario en un intervalo de aproximadamente 100 XU/g a aproximadamente 320.000 XU/g de composición, más preferentemente de aproximadamente 300 XU/g de composición a aproximadamente 160.000 XU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 500 XU/g de composición a aproximadamente 50.000 XU/g de composición, e incluso más preferentemente aproximadamente 500 XU/g de composición a aproximadamente 40.000 XU/g de composición.

- 20 En una realización la xilanasa está presente en la composición de aditivo alimentario más de aproximadamente 100 XU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 200 XU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 300 XU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 400 XU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 500 XU/g de composición.

- 25 En una realización la xilanasa está presente en la composición de aditivo alimentario menos de aproximadamente 320.000 XU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 160.000 XU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 50.000 XU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 40.000 XU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 30.000 XU/g de composición.

- 30 Se entenderá que una unidad de xilanasa (XU) es la cantidad de enzima que libera 0,5 µml de equivalentes de azúcar reductor (como xilosa por el ensayo ácido dinitrosalicílico (DNS) – método de azúcar reductor) de un sustrato de avena-espelta-xilano por minuto a pH 5,3 y 50°C. (Bailey, M.J. Biely, P. and Poutanen, K., Journal of Biotechnology, volumen 23, (3), mayo 1992, 257-270).

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

Amilasa

5 Amilasa es el nombre que se da a una clase de enzimas capaces de hidrolizar almidón a un oligosacárido de cadena más corta tal como maltosa. El resto de glucosa se puede transferir más fácilmente de maltosa a un monoglicérido o glicosilmonoglicérido que la molécula de almidón original. La amilasa es una  $\alpha$ -amilasa.  $\alpha$ -amilasas se clasifican como (E.C. 3.2.1.1).

10 Esto puede incluir amilasas de origen bacteriano o fúngico, químicamente modificadas están incluidos mutaciones por ingeniería de proteínas.

En una realización preferentemente la amilasa puede ser una  $\alpha$ -amilasa, de *Bacillus licheniformis* y/o amilasa, p. ej., una  $\alpha$ -amilasa, de *Bacillus amyloliquefaciens*.

En una realización la  $\alpha$ -amilasa puede ser la  $\alpha$ -amilasa en Axta XAP® o Avizyme 1502®, ambos productos disponibles comercialmente de Danisco A/S.

15 En otra realización la amilasa puede ser una  $\alpha$ -amilasa resistente a pepsina, tal como una alfa amilasa de *Trichoderma* (tal como *Trichoderma reesei*) resistente a pepsina. Una  $\alpha$ -amilasa resistente a pepsina apropiada se muestra en la solicitud de GB número 1011513.7 y PCT/IB2011/053018.

En una realización la amilasa puede ser una  $\alpha$ -amilasa resistente a pepsina que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos:

20 i) según se describe en SEC ID nº1 o SEC ID nº3;

ii) según se describe en SEC ID nº1 o SEC ID nº3 excepto para uno o varias adiciones/inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos;

25 iii) que tiene al menos 85% (preferentemente, al menos 90%, 95%, 97%, 98% o 99%) de igualdad con la SEC ID nº1 o al menos 70% (preferentemente, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99%) de igualdad con la SEC ID nº3;

iv) que se produce por expresión de una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEC ID nº2 o SEC ID nº4;

v) que se produce por expresión de una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEC ID nº2 o SEC ID nº4 debido a la degeneración del código genético;

30 vi) que se produce por expresión de una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEC ID nº2 o SEC ID nº4 para uno o varias adiciones/inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos; o

vii) que se produce por expresión de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% (preferentemente, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99%) de igualdad con la SEC ID nº2 o SEC ID nº4.

35 La alfa amilasa resistente a pepsina también puede estar codificada por una secuencia de nucleótido que hibridiza a SEC ID nº2 o SEC ID nº4 bajo condiciones severa o muy severas.

En una realización preferente la amilasa para usar en la presente invención puede ser una o más de las amilasas en uno o más de los productos comerciales siguientes:

Producto® comercial	Empresa	Tipo de amilasa	Fuente de amilasa
Amylofeed	Andrés Pinaluba S.A.	Alfa amilasa	<i>Aspergillus oryzae</i>
Avizyme 1500	Danisco	Alfa amilasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Avizyme 1505	Danisco	Alfa amilasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Kemzyme Plus Dry	Kemin	Alfa amilasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Kemzyme Plus Liquid	Kemin	Alfa amilasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Kemzyme W dry	Kemin	Alfa amilasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Kemzyme W liquid	Kemin	Alfa amilasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

Producto® comercial	Empresa	Tipo de amilasa	Fuente de amilasa
Natuzyme	Bioproton	Alfa amilasa	Trichoderma longibrachiatum/Trichoderma reesei
Porzyme 8100	Danisco	Alfa amilasa	Bacillus amyloliquefaciens
Porzyme tp100	Danisco	Alfa amilasa	Bacillus amyloliquefaciens
Ronozyme A	DSM/Novozymes	Alfa amilasa	Bacillus amyloliquefaciens
Ronozyme AX	DSM	Alfa amilasa	Bacillus amyloliquefaciens
Ronozyme® RumiStar (L/CT)	DSM/Novozymes	Alfa amilasa	Bacillus stearothermophilus expresado en Bacillus licheniformis

En una realización la amilasa puede ser una alfa amilasa amaltogénica de Bacillus (véase la patente EP 120 693). Esta amilasa está disponible comercialmente bajo el nombre comercial Novamyl™ (Novo Nordisk A/S, Dinamarca). Novamyl se describe en detalle en la publicación de patente internacional WO 91/104669.

5 Preferentemente, la amilasa está presente en el producto alimentario en el intervalo de aproximadamente 50 AU/kg a aproximadamente 10.000 AU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 70 AU/kg de alimento a 7.500 AU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 70 AU/kg de alimento a 5.000 AU/kg de alimento e incluso más preferentemente de aproximadamente 100 AU/kg de alimento a 2.000 AU/kg de alimento.

10 En una realización la amilasa está presente en el producto alimentario más de aproximadamente 50 AU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 60 AU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 70 AU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 80 AU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 90 AU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 100 AU/kg de alimento.

15 En una realización la amilasa está presente en el producto alimentario menos de aproximadamente 10.000 AU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 8.000 AU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 7.000 AU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 5.000 AU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 4.000 AU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 3.000 AU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 2.000 AU/kg de alimento.

20 Preferentemente, la amilasa está presente en la composición de aditivo alimentario en un intervalo de aproximadamente 10 AU/g a aproximadamente 200.000 U/g de composición, más preferentemente de aproximadamente 30 AU/g de composición a aproximadamente 100.000 AU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 40 AU/g de composición a aproximadamente 50.000 AU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 50 AU/g de composición a aproximadamente 20.000 AU/g de composición.

25 En una realización la amilasa está presente en la composición de aditivo alimentario más de aproximadamente 10 AU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 20 AU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 30 AU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 40 AU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 50 AU/g de composición.

30 En una realización la amilasa está presente en la composición de aditivo alimentario menos de aproximadamente 200.000 AU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 100.000 AU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 50.000 AU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 40.000 AU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 30.000 AU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 200.000 AU/g de composición.

35 Se entenderá que una unidad de amilasa (AU) es la cantidad de enzima que libera 1 mmol de enlaces glucosídicos de un sustrato de polímero de almidón reticulado insoluble en agua por minuto a pH 6,5 y 37°C (esto puede estar referido en la presente memoria como el ensayo para determinar 1 AU).

1 TAU (actividad  $\alpha$ -amilasa) es la cantidad de enzima requerida para liberar (en presencia de exceso de  $\alpha$ -glucosidasa) 0,20  $\mu$ mol de enlaces glucosídicos (expresados como equivalentes p-nitrofenol) de un sustrato maltoheptaosido por minuto a pH 8,0 y 40°C. Esto puede estar referido en la presente memoria como el ensayo para determinar una unidad TAU.

40 En una realización apropiadamente la enzima se clasifica usando la clasificación E.C. anterior, y la clasificación E.C. designa un enzima que tiene esa actividad cuando se prueba en el ensayo mostrado en la presente memoria para determinar 1 AU.

Proteasa

El término proteasa se usa en la presente memoria como sinónimo de peptidasa o proteinasa. La proteasa según la presente invención es una subtilisina.

5 Proteasas apropiadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. También son apropiadas modificadas químicamente o mutadas por ingeniería. La proteasa puede ser una proteasa sérica o una metaloproteasa, p. ej., una proteasa microbiana alcalina o una proteasa similar a tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente las que derivan de *Bacillus* sp., p. ej., subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309 (véase, p. ej., la patente de EEUU nº 6.287.841, subtilisina 147, y subtilisina 168 (véase, p. ej., WO 89/06279).

10 En una realización preferente la proteasa para usar en la presente invención puede ser una de las proteasas en uno o más de los productos comerciales siguientes:

Producto® comercial	Empresa	Tipo de proteasa	Fuente de proteasa
Avizyme 1100	Danisco A/S	subtilisina	Bacillus subtilis
Avizyme 1202	Danisco A/S	subtilisina	Bacillus subtilis
Avizyme 1302	Danisco A/S	subtilisina	Bacillus subtilis
Avizyme 1500	Danisco A/S	subtilisina	Bacillus subtilis
Avizyme 1505	Danisco A/S	subtilisina	Bacillus subtilis
Porzyme 8300	Danisco	subtilisina	Bacillus subtilis

En una realización la proteasa puede ser una proteasa de *B. subtilis*.

En una realización la proteasa puede ser una proteasa *Nocardiopsis* disponible de Novozymes A/S.

15 Preferentemente, la proteasa está presente en el producto alimentario en un intervalo de aproximadamente 1.000 PU/kg a aproximadamente 20.000 PU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 1.500 PU/kg de alimento a aproximadamente 10.000 PU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 2.000 PU/kg de alimento a aproximadamente 6.000 PU/kg de alimento.

En una realización la proteasa está presente en el producto alimentario más de aproximadamente 1.000 PU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 1.500 PU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 2.000 PU/kg de alimento.

20 En una realización la proteasa está presente en el producto alimentario menos de aproximadamente 20.000 PU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 10.000 PU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 7.000 PU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 6.000 PU/kg de alimento.

25 Preferentemente, la proteasa está presente en la composición de aditivo alimentario en un intervalo de aproximadamente 200 PU/g de composición a aproximadamente 400.000 PU/g de composición, más preferentemente de aproximadamente 300 PU/g de composición a aproximadamente 200.000 PU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 5.000 PU/g de composición a aproximadamente 100.000 PU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 700 PU/g de composición a aproximadamente 70.000 PU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 1.000 PU/g de composición a aproximadamente 60.000 PU/g de composición.

30 En una realización la proteasa está presente en la composición de aditivo alimentario más de aproximadamente 200 PU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 300 PU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 400 PU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 500 PU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 750 PU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 1.000 PU/g de composición.

35 En una realización la proteasa está presente en la composición de aditivo alimentario menos de aproximadamente 400.000 PU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 200.000 PU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 100.000 PU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 80.000 PU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 70.000 PU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 60.000 PU/g de composición.

40 Se entenderá que una unidad de proteasa (PU) es la cantidad de enzima que libera de un sustrato (disolución de caseína 0,6%) un microorganismo de compuesto fenólico (expresado como equivalentes de tirosina) en un minuto a pH 7,5 (40 mM tampón Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ácido láctico) y 40°C. Esto puede ser referido como el ensayo para determinar 1 PU.

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

Fitasa

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

En una realización preferente la fitasa para usar en la presente invención puede ser uno o más de las fitasas en una o más de los productos comerciales siguientes:

Producto® comercial	Empresa	Tipo de fitasa	Fuente de fitasa
Finase EC	AB Vista	6-fitasa	Gen E. coli expresado en <i>Trichoderma reesei</i>
OPTIPHOS®	Huvepharma	6-fitasa	Gen E. coli expresado en <i>Pichia pastoris</i>
Phyzyme XP	Danisco	6-fitasa	Gen E. coli expresado en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Quantum 2500D, 5000L	AB Vista	6-fitasa	Gen E. coli expresado en <i>Pichia pastoris</i> o <i>Trichoderma</i>
Ronozyme Hi-Phos (M/L)	DSN/Novozymes	6-fitasa	Gen <i>Citrobacter braakii</i> expresado en <i>Aspergillus oryzae</i>
Ronozyme NP	DSN/Novozymes	6-fitasa	Gen <i>Peniphora lycii</i> expresado en <i>Aspergillus oryzae</i>
Ronozyme P	DSN/Novozymes	6-fitasa	Gen <i>Peniphora lycii</i> expresado en <i>Aspergillus oryzae</i>

- 10 El término gen consenso como se usa en la presente memoria significa que el vector ADN usado para transformar el organismo contiene un gen sintético de fitasa basado en una secuencia consenso, un gen URA de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* no patógena y el origen de replicación del plásmido de *Escherichia coli* pBR322.

- 15 En una realización la fitasa es una fitasa de *Citrobacter* que deriva de p. ej. *Citrobacter freundii*, preferentemente *C. freundii* NCIMB 41247 y sus variantes p. ej. según se describe en la patente WO2006/038062 y WO2006/038128, *Citrobacter braakii* YH-15 según se describe en la patente WO2004/085638, *Citrobacter braakii* ATCC 51113 según se describe en la patente WO2006/037328, así como sus variantes p. ej. según se describe en la patente WO2007/112739 y WO2011/117396, *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 WO200603732 (o *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter werkmanii*, *Citrobacter youngae*, polipéptidos de especies de *Citrobacter* o sus variantes.

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

En realizaciones preferentes, la fitasa es preferentemente fitasa de *E. coli* comercializada bajo el nombre Phyzyme XP™ de Danisco A/S.

- 25 Alternativamente la fitasa puede ser un fitasa de *Buttiauxella*, p. ej. una fitasa de *Buttiauxella agrestis*, por ejemplo, las enzimas fitasa mostradas en las patentes WO 2006/043178, WO 2008/097619, WO 2009/129489, WO 2008/092901, PCT/US2009/41011 o PCT/IB2010/051804.

En una realización la fitasa puede ser una fitasa de *Hafnia*, p. ej., de *Hafnia alvei*, tal como las enzimas de fitasa mostradas en la patente de EEUU 2008263688.

En una realización la fitasa puede ser una fitasa de *Aspergillus*, p. ej. de *Aspergillus oryzae*.

- 30 En una realización la fitasa puede ser una fitasa de *Penicillium*, p. ej. de *Penicillium funiculosum*.

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.

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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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  $\mu$ mol 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.

25 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.

#### Ventajas

30 La interacción de DFMs con enzimas es complicada y sin desear ser limitante de la teoría, es muy sorprendente que se puede ver una mejora de la resistencia del sujeto a enteritis necrótica, p. ej. que se puede ver una reducción de los puntos de lesión por ejemplo. Antes de la presente invención la combinación de DFMs y enzimas (p. ej., según se muestra en la presente memoria) no se ha mostrado para este propósito específico.

Una ventaja de la presente invención es que la composición de aditivo alimentario según la presente invención puede evitar los efectos negativos de enteritis necrótica o se puede usar para mejorar la resistencia del sujeto a enteritis necrótica.

35 Sin desear ser limitante de la teoría, la fitasa cataliza la hidrólisis secuencial de fitato, una reserva principal de fósforo en cereales y legumbres, a derivados de mio-inositol menos fosforilados con liberación concomitante de fosfato inorgánico. La hidrólisis de fitato causa una reducción de pérdidas endógenas de aminoácidos en el lumen intestinal. Una reducción de pérdidas endógenas de aminoácidos en el intestino reduce la disponibilidad de nitrógeno para crecimiento bacteriano, lo que ayuda a DFMs en la inhibición de *C. prefringens* y otras bacterias patógenas.

40 Sin desear ser limitante de la teoría las proteasas causan hidrólisis no específica de proteína dietética dando una variedad de polipéptidos en el lumen intestinal. Los animales concluyen la hidrólisis de proteína y absorben tales aminoácidos. Sin embargo, en el caso de retar patógenos entéricos, la bacteria patógena puede tener ventaja de las más alta disponibilidad de péptidos en el lumen del yeyuno e íleon. DFMs inhibe el crecimiento de entero patógenos mediante por ejemplo la competición por las fuentes de N, así como por inhibición directa.

45 Además, la xilanasas degrada el polisacárido lineal beta-1,4-xilano en xilosa. Sin desear ser limitante de la teoría, los inventores de la presente memoria han mostrado que el incremento de digestibilidad de energía con la combinación de DFMs y enzimas no se explica por almidón, grasa, o proteína, por lo tanto se debe explicar por polisacáridos sin almidón.

50 La actividad de la amilasa hidroliza los enlaces alfa de polisacáridos grandes con uniones alfa tal como almidón que da dextrinas y oligosacáridos, que son absorbidos principalmente en el intestino delgado después de hidrólisis a maltosa y glucosa en la pared intestinal. Sorprendentemente, la rápida hidrólisis de almidón en el intestino anterior y la mayor absorción de glucosa en el duodeno priva la bacteria patógena de una importante fuente de energía (glucosa) en el yeyuno e íleon, lo que mejora la actividad de DFM debido a la ventaja competitiva frente a patógenos que no pueden usar pentosas tan eficazmente.

55

Combinadas las cuatro enzimas y DFM sorprendentemente proporcionan una mejora significativa sobre la reducción de patógenos y/o resistencia a enteritis necrótica comparado con otras combinaciones de DFM y enzimas y/o DFMs solos y/o enzimas solas.

5 La combinación específica de DFMs y las enzimas mostrada en la presente memoria ventajosamente puede llevar a reducir la secreción de mucina. Sin desear se limitante de la teoría esta secreción reducida de mucina puede resultar en una reducción de la pérdida de aminoácidos endógenos, y/o puede ser responsable de mejorar el rendimiento.

La combinación específica de DFMs y las enzimas mostrada en la presente memoria ventajosamente puede llevar a reducir inflamación en el íleon. Esto se puede ver por disminución de la expresión IFR-g en el íleon. Los inventores han mostrado que la modulación de la respuesta inmune puede mejorar el rendimiento.

10 Formulación del DFM con la enzima

El DFM y las enzimas se pueden formular de cualquier manera apropiada para asegurar que la formulación comprende DFMs viables y enzimas activas.

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

15 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.

20 Para algunas realizaciones el DFM y/o 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 dos o tres o cuatro de las 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 más o todas las 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 dos o tres o cuatro enzimas. En el último caso, las enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular, por ejemplo una o más o todas las enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular. Las enzimas se pueden encapsular como mezclas (es decir comprende una o más, dos o más, tres o más o todas) de las enzimas o se pueden encapsular por separado, p. ej. como enzimas solas. En una realización preferente las cuatro enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular, juntas.

25 encapsular como mezclas (es decir comprende una o más, dos o más, tres o más o todas) de las enzimas o se pueden encapsular por separado, p. ej. como enzimas solas. En una realización preferente las cuatro enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular, juntas.

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

30 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 WO1997/01607 o la patente WO1992/012645.

35 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 ácido o básico.

40 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 revestimiento 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.

45 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.

50 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.

55

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.

5 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 una formulación líquida adecuada para consumo preferentemente tal líquido para consumo contiene uno o más de los siguientes: un tampón, sal, sorbitol y/o glicerol.

10 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.

15 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, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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.

20 Envasado

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

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.

25 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

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

30 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.

35 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.

40 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.

45 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.

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

5 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.

10 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.

15 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.

20 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 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, altramuz, 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.

25 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.

30 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 ricos en fibra: proteína obtenida de fuentes tales como girasol, altramuz, habas y algodón.

35 En la presente invención el alimento puede ser uno o más de los siguientes: un alimento compuesto y premezcla, que incluye pellets, 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.

40 El término alimento en la presente invención también engloba algunas realizaciones de alimento para mascotas. Un alimento para mascotas es un material de planta o animal destinado a consumo por mascotas, tal como alimento para perros o alimento para gatos. El alimento para mascotas, tal como alimento para perros y alimento para gatos, puede estar o bien en una forma seca, tal como pienso para perros, o en forma húmeda enlatada. El alimento para mascotas puede contener el aminoácido taurina.

45 El término alimento en la presente invención también engloba en algunas realizaciones alimento para peces. Un alimento para peces normalmente contiene macro nutrientes, elementos en traza y vitaminas necesarias para mantener los peces en cautividad con buena salud. El alimento para peces puede estar en la forma de un copo, pelet o tableta. Las formas peletizadas, algunas de las cuales se hunden rápidamente, a menudo se usan para peces más grandes o especies que se alimentan del fondo. Algunos alimentos para peces también contienen aditivos, tales como beta caroteno o hormonas sexuales, para mejorar artificialmente el color de los peces ornamentales.

50 El término alimento en la presente invención también engloba algunas realizaciones de alimento para pájaros. El alimento para pájaros incluye alimento que se usa tanto en comederos para pájaros como para alimentar pájaros mascota. Típicamente el alimento para pájaros comprende una variedad de semillas, pero también puede englobar sebo (grasa de ternera o cordero).

55

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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  $2 \times 10^5$  UFC a aproximadamente  $2 \times 10^{11}$  UFC, adecuadamente entre aproximadamente  $2 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ , adecuadamente entre aproximadamente  $3,75 \times 10^7$  UFC a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC.
- 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.
- En una realización particularmente preferente la composición de aditivo alimentario se homogeniza para producir un polvo.
- En una realización preferente alternativa, la composición de aditivo alimentario se formula en gránulos según se describe en la patente WO2007/044968 (referidos como gránulos TPT).
- 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 mayor de 60% a 20°C.
- Preferentemente, el recubrimiento de sal comprende  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .
- 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.
- 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.

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

5 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.

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.

10 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.

15 Preferentemente, el producto alimentario puede comprender materiales alimentarios que comprenden maiz 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.

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.

20 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.  
25 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.

30 El producto alimentario según la presente invención es para un animal monogástrico, tal como aves (por ejemplo, broiler, ponedora, criadores de broiler, pavo, pato, ganso, pato de agua), porcino (todas las categorías de edad), una mascota (por ejemplo, perros, gatos), o peces, preferentemente el producto alimentario es para aves.

En una realización el producto alimentario no es para ponedoras.

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:

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

## ES 2 621 137 T3

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
Vitaminas y microminerales de aves	0,6

- 5 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

## ES 2 621 137 T3

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

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
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:

5

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

ES 2 621 137 T3

Ingrediente	Fase 1 (%)	Fase 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

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

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

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.

5 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 acuoso-orgánicas.

10 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  $1 \times 10^3$  UFC/animal/día a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC/animal/día, y más preferentemente aproximadamente  $1 \times 10^7$  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 granulación tales como polivinil pirrolidona, hidroxí propil metil celulosa (HPMC), hidroxí 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, hidroxí matil 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.

30 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 DFMs (particularmente DFM bacteriano) y es un buen medio para iniciar el crecimiento.

35 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.

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.

40 Dosificación

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.

45 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.

## ES 2 621 137 T3

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).

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

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.

DFM: xilanasa (UFC/XU): en el intervalo de  $6,25 \times 10^1$  UFC DFM: 1 XU, enzima a  $2,0 \times 10^9$  UFC: 1 XU enzima; preferentemente en el intervalo de  $1,88 \times 10^4$  UFC DFM: 1 XU enzima hasta  $1,0 \times 10^7$  UFC: 1 XU enzima.

10 DFM: amilasa (UFC/AU): en el intervalo de  $1,0 \times 10^2$  UFC DFM: 1 AU, enzima a  $2,0 \times 10^{10}$  UFC: 1 AU enzima; preferentemente en el intervalo de  $3,7 \times 10^4$  UFC DFM: 1 AU enzima hasta  $1,0 \times 10^8$  UFC: 1 AU enzima.

DFM: proteasa (UFC/PU): en el intervalo de  $5,0 \times 10^1$  UFC DFM: 1 PU, enzima a  $1,0 \times 10^9$  UFC: 1 PU enzima; preferentemente en el intervalo de  $1,25 \times 10^4$  UFC DFM: 1 PU enzima hasta  $5,0 \times 10^6$  UFC: 1 PU enzima.

En una realización preferentemente el producto alimentario comprende el siguiente:

15 una proteasa a al menos 4.000 PU/kg de alimento;

una xilanasa de al menos 1.000 XU/kg a 2.000 XU/kg de alimento (p. ej., Avizyme a 1.000 XU/kg de alimento o Aextra XAP a al menos 2.000 XU/kg de alimento);

una amilasa; al menos a 1.800 AU/kg o 200 TAU/kg de alimento (p. ej., Avizyme a 1.800 AU/kg o Aextra XAP a al menos 200 TAU/kg de alimento);

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

Envivo 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 proteasa a 4.000 PU/kg de alimento;

25 una xilanasa de 1.000 XU/kg a 2.000 XU/kg de alimento (p. ej., Avizyme a 1.000 XU/kg de alimento o Aextra XAP a 2.000 XU/kg de alimento);

una amilasa; 1.800 AU/kg o 200 TAU/kg de alimento (p. ej., Avizyme a 1.800 AU/kg o Aextra XAP a 200 TAU/kg de alimento);

una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

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

30 En una realización preferentemente el producto alimentario comprende el siguiente:

una proteasa a 5.000 PU/kg de alimento;

una xilanasa a 1.250 XU/kg a 2.500 XU/kg de alimento (p. ej., Avizyme a 1.000 XU/kg de alimento o Aextra XAP a 2.500 XU/kg de alimento);

35 una amilasa; 2.250 AU/kg o 250 TAU/kg de alimento (p. ej., Avizyme a 1.800 AU/kg o Aextra XAP a 250 TAU/kg de alimento);

una fitasa a 625 FTU/kg de alimento; y

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

En otra realización el producto alimentario comprende lo siguiente:

una proteasa a 2.000 PU/kg de alimento;

40 una xilanasa a 500 XU/kg a 1.000 XU kg de alimento (p. ej., Avizyme a 500 XU/kg de alimento o Aextra XAP a 1.000 XU/kg de alimento);

una amilasa; 900 AU/kg o 100 TAU/kg de alimento (p. ej., Avizyme a 900 AU/kg o Aextra XAP a 100 TAU/kg de alimento);

una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

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

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

5 una proteasa a 4.000 PU/kg de alimento;

una xilanasa a 1.000 XU/kg a 2.000 XU kg de alimento (p. ej., Avizyme a 1.000 XU/kg de alimento o Aextra XAP a 2.000 XU/kg de alimento);

una amilasa; 1.800 AU/kg o 200 TAU/kg de alimento (p. ej., Avizyme a 1.800 AU/kg o Aextra XAP a 200 TAU/kg de alimento);

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

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

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

una proteasa a 2.000 PU/kg de alimento;

15 una xilanasa a 500 XU/kg a 1.000 XU kg de alimento (p. ej., Avizyme a 500 XU/kg de alimento o Aextra XAP a 1.000 XU/kg de alimento);

una amilasa; 900 AU/kg o 100 TAU/kg de alimento (p. ej., Avizyme a 900 AU/kg o Aextra XAP a 100 TAU/kg de alimento);

una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

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

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 proteasa, xilanasa, amilasa y fitasa se puede referir en la presente memoria como "la composición de aditivo alimentario de la presente invención".

La combinación de la presente invención comprende la 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 preferentemente el "otro componente" no es otra enzima u otro DFM.

30 Los componentes pueden ser prebióticos. Los prebióticos típicamente son hidratos de carbono no digestibles (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 garrofín (LBG), inulina, goma guar, galacto oligosacárido (GOS), fructo oligosacárido (FOS), almidón no degradable, lactosacarosa, lactulosa, lactilol, maltitol, maltodextrina, povidona (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 xilanasa, una amilasa, una fitasa, una proteasa y un prebiótico.

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 enzimas 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 en 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 en 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, una xilanas, una proteasa, una fitasa y una amilasa 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, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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.

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

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, hidroxipropil metil celulosa (HPMC), hidroxipropil celulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y acacia.

Ejemplos de agentes 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.

5 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).

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.

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

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

Concentrados

15 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.

20 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, p. ej. Al menos  $10^9$  UFC/g) a aproximadamente  $10^{10}$  UFC/g (o incluso aproximadamente  $10^{11}$  UFC/g o aproximadamente  $10^{12}$  UFC/g).

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.

25 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.

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.

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

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

35 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 discutió anteriormente) 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

45 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.

El término "sujeto", como se usa en la presente memoria, significa un animal. Preferentemente, el sujeto es un mamífero, ave, pez o crustáceo que incluye por ejemplo ganadería o un animal doméstico (p. ej. una mascota).

50 En una realización el "sujeto" es ganadería.

El término “ganadería” como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier animal de granja. Preferentemente, ganadería es uno o más de vacas o toros (incluyendo terneras), cerdos (incluyendo cochinitos), aves (incluyendo broilers, pollos y pavos), pájaros, peces (incluyendo peces de agua dulce, tal como salmón, bacalao, trucha y carpa, p. ej. carpa de estanque, y pescado marino, tal como lubina), crustáceos (tal como gambas, mejillones y vieiras), caballos (incluyendo caballos de carreras), ovejas (incluyendo corderos).

En una realización el término ganadería y/o aves y/o pollos no incluye ponedoras.

En otra realización el “sujeto” es un animal doméstico o mascota o un animal mantenido en un zoológico.

El término “animal domesticado o mascota o un animal mantenido en un zoológico” como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier animal relevante que incluye caninos (p. ej. perros), felinos (p. ej. gatos), roedores (p. ej. cerdos de guinea, ratas, ratones), pájaros, peces (incluyendo peces de agua dulce y peces marino), y caballos.

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

ii) está a niveles clínicamente relevantes; o

iii) está a niveles subclínicos.

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

#### Rendimiento

Como se usa en la presente memoria “rendimiento animal” se puede determinar mediante la eficacia del alimento y/o ganancia de peso del animal y/o mediante el índice de conversión del alimento y/o la digestibilidad de un nutriente en un alimento (p. ej. digestibilidad de aminoácidos) y/o energía digestible o energía metabolizable en un alimento y/o mediante retención de nitrógeno y/o mediante la capacidad de los animales de evitar los efectos negativos de enteritis necrótica y/o la respuesta inmune del sujeto.

Preferentemente “rendimiento animal” se determina mediante eficacia del alimento y/o ganancia de peso del animal y/o mediante el índice de conversión del alimento.

Por “rendimiento animal mejorado” se indica que hay eficacia del alimento incrementada, y/o ganancia de peso incrementada y/o índice de conversión del alimento reducida y/o digestibilidad de nutrientes o energía en un alimento mejorada y/o retención de nitrógeno mejorada y/o capacidad mejorada de evitar los efectos negativos de enteritis necrótica y/o mediante respuesta inmune del sujeto mejorada que resulta del uso de una composición de aditivo alimentario de la presente invención en alimento en comparación con el alimento que no comprende dicha composición de aditivo alimentario.

Preferentemente, mediante “rendimiento animal mejorado” se indica que hay eficacia del alimento incrementada, y/o ganancia de peso incrementada y/o índice de conversión del alimento reducida.

Como se usa en la presente memoria, el término “eficacia alimentaria” se refiere a la cantidad de ganancia de peso en un animal que se da cuando el animal se alimenta ad-libitum o con una cantidad específica de alimento durante un periodo de tiempo.

Mediante “eficacia del alimento incrementada” se indica que el uso de una composición de aditivo alimentario según la presente invención da como resultado una ganancia de peso incrementada por unidad de ingesta de alimento comparado con un animal alimentado sin que esté presente dicha composición de aditivo.

#### Índice de conversión del alimento (ICA)

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.

Por “índice de conversión de alimento más bajo” 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 una cantidad específica comparado con la cantidad de alimento requerida para incrementar el peso del animal en la misma cantidad cuando el alimento no comprende dicha composición de aditivo alimentario.

Digestibilidad de nutriente

5 Digestibilidad de nutriente como se usa en la presente memoria significa la fracción de un nutriente que desaparece del tracto gastrointestinal o de un segmento específico del tracto gastrointestinal, p. ej. el intestino delgado. La digestibilidad de nutriente se puede medir como la diferencia entre lo que se administra al sujeto y lo que se sale en las heces del sujeto, o entre lo que se administra al sujeto y lo que queda en la digestión de un segmento específico del tracto intestinal, p. ej. el íleon.

10 Digestibilidad de nutriente como se usa en la presente memoria se puede medir por la diferencia entre la ingesta de un nutriente y la excreción del nutriente por medio de la total recolección de la excreta durante un periodo de tiempo; o con el uso de un marcador inerte que no es absorbido por el animal, y permite al investigador calcular la cantidad de nutriente que desaparece en el tracto gastrointestinal entero o en un segmento del tracto gastrointestinal. Tal marcador inerte puede ser dióxido de titanio, óxido de cromo o cenizas ácidas insolubles. La digestibilidad se puede expresar mediante un porcentaje de un nutriente en el alimento, o como unidades de masa de nutriente digestible por unidades de masa de nutriente en el alimento.

15 Digestibilidad de nutriente como se usa en la presente memoria engloba digestibilidad de almidón, digestibilidad de grasa, digestibilidad de proteína, y digestibilidad de aminoácidos.

20 La digestibilidad de energía 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 de la digestión 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 la 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 energía metabolizable se puede medir como la diferencia entre la ingesta de energía bruta y la energía bruta excretada en las heces o presente en la digestión en un segmento específico del tracto gastrointestinal usando los mismos métodos de medir la digestibilidad de nutrientes, con correcciones apropiadas para excreción de nitrógeno para calcular la 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

Enteritis necrótica es una enteritis 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.

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.

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.

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

La presente invención además 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.

#### Respuesta inmune

Respuesta inmune como se usa en la presente memoria significa una de las múltiples maneras en las que DFM modula el sistema inmune de los animales, incluyendo incremento de la producción de anticuerpos, regulación creciente de inmunidad mediada por células, regulación creciente de citoquinas proinflamatorias, y señal de receptores tipo Toll aumentada. Se entiende que la inmunoestimulación del tracto gastrointestinal por DFM puede ser ventajoso para proteger al huésped frente a enfermedades, y que la inmunosupresión del tracto gastrointestinal puede ser ventajoso para el huésped porque se usan menos nutrientes y energía para realizar la función inmune.

Preferentemente la respuesta inmune es una respuesta inmune celular.

Preferentemente la respuesta inmune se mide mirando los marcadores inmunes.

#### Bacteria patógena

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* Avian patógena.

La presente invención puede reducir poblaciones de bacteria patógena en el tracto gastrointestinal de un sujeto.

#### Excreción de nutrientes

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

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".

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.

5 Mientras que no hay límites inferiores o 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.

#### Aislado

10 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, puede estar significativamente libre de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes.

#### 15 Purificado

20 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.

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.

#### 25 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.

30 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.

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 esta 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 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.

40 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

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 aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

- 5 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.

- 10 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.

- 15 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 un sintetizador de ADN automático, purificado, reconocido, ligado y clonado en vectores apropiados.

- 20 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

- 30 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".

- 35 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 proteína/enzima según la presente invención.

- 40 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

- 45 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".

- 50 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.

5 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  
10 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.

15 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  
20 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.

25 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  
30 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.

35 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](mailto:tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)). FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX por  
40 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  
45 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.

50 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.

55 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 Na<sub>3</sub> 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 Na<sub>3</sub> 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

Materiales y métodos

35 Se compraron tres mil seiscientos pollitos macho Cobb de un día de edad de un criadero comercial. Al comienzo del estudio, se colocan cincuenta machos en cada corral de tratamiento en bloques. El estudio consiste en los siguientes tratamientos (tabla 1):

Tabla 1. Diseño experimental del ejemplo 1

Tratamiento	Desafiado a <i>Clostridium perfringens</i>	Fitasa <sup>1</sup>	Enzima adicional <sup>2</sup>	DFM <sup>3</sup>
1	No	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
2	Si	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
3	Si	500 FTU/kg	Amilasa (200 u/kg)	Ninguno
4	Si	500 FTU/kg	Proteasa (5.000 u/kg)	Ninguno
5	Si	500 FTU/kg	Xilanasas <sup>4</sup> (2.000 u/kg) Amilasa <sup>4</sup> (200 u/kg) Proteasa <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Ninguno
6	Si	500 FTU/kg	Ninguna	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
7	Si	500 FTU/kg	Amilasa (200 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
8	Si	500 FTU/kg	Proteasa (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
9	Si	500 FTU/kg	Xilanasas <sup>4</sup> (2.000 u/kg) Amilasa <sup>4</sup> (200 u/kg) Proteasa <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli*.  
<sup>2</sup> Amilasa de *Bacillus licheniformis*, xilanasas de *Trichoderma reesei*, proteasa de *Bacillus subtilis*.  
<sup>3</sup> Enviva Pro® es combinación de cepas Bs2084, LSSA01 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>4</sup> Axtra XAP® proporcionado por Danisco A/S.

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 migas (inicio) o pelets (crecimiento y finalización). 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 y se forman pelets usando California Pellet Mill (temperatura fría de pelet 65-70 C). 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 Enviva Pro en el alimento.

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

Ingrediente (%)	Inicio	Crecimiento	Finalización
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
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

Ingrediente (%)	Inicio	Crecimiento	Finalización
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 Enviva Pro se suministran por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Todas las raciones contenían 500 FTU de fitasa E. coli en la base. Los corrales se colocan en las instalaciones para no tener contacto directo para evitar contaminación. En el día 23 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.

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 20, 21 y 22 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 23, 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). No se usa terapia con medicamentos concomitante durante el estudio.

Las medias se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Los corrales se usaron como la unidad experimental.

#### Resultados

La figura 1 muestra puntos de lesión de enteritis necrótica en pollos broiler en un modelo objetivo de enteritis necrótica, en base a un sistema de puntuación de 0 a 3. EEM combinado = 0,15.

El tratamiento control objetivo incrementó los puntos de lesión comparado con el tratamiento control no objetivo. La adición de DFMs con una combinación de una xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa redujo puntos de lesión comparado con todos los otros tratamientos. La adición de DFMs en combinación con las enzimas redujo los puntos de lesión comparado con DFMs solos o enzimas por sí mismas.

La figura 2 muestra la ganancia de peso corporal de pollos broiler en un modelo objetivo de enteritis necrótica. EEM combinado = 28,6.

La figura 2 muestra que una combinación del DFM (Enviva Pro®) con una combinación de xilanasa, una amilasa, una proteasa y una fitasa mejora significativamente la ganancia de peso corporal (ganancia PC) en pollos broiler desafiado a *Clostridium perfringens* comparado con el control objetivo – incluso resultando una ganancia PC que mejoró sobre un control negativo (p. ej. un control no objetivo). Esto fue significativamente mejor que cualquier otro tratamiento.

La figura 3 muestra la conversión de conversión del alimento de pollos broiler en un modelo objetivo de enteritis necrótica. EEM combinado = 0,016.

La combinación de Enviva Pro® (DFM) con una xilanasa, amilasa, proteasa y fitasa mejora significativamente (reduce) FCR (g ganancia PC/g ingesta alimento) de broilers desde eclosión al día 42 comparado con el control objetivo, y enzimas por sí mismas y los otros tratamientos.

## Ejemplo 2

## Materiales y métodos.

Se adquirieron 500 pollitos macho Cobb de un criadero comercial. Un total de 26 pollitos se distribuyeron al azar a uno de los 8 corrales repetidos por tratamiento. Se colocaron corrales en el suelo (1,48 m<sup>2</sup>/corral, 16 pies<sup>2</sup>/corral) en una nave separados por cortinas que tenían calefacción controlada, ventiladores de circulación, lámparas de calor y virutas de madera fresca. Las aves se expusieron a iluminación fluorescente en ciclos de luz de 24 h durante los primeros cuatro días y después un ciclo de 16 h luz: 8 h oscuridad para el resto del experimento. Se proporcionó el alimento en alimentadores de campana y el agua se suministró vía bebedero de boquilla *ad libitum*. Se administró manualmente una dosis 5X de Coccivac-B (Intervet) con una jeringa en la cavidad oral de los pollitos a la edad de un día.

Tabla 3. Diseño experimental del ejemplo 2.

Tratamiento	Vacuna de <i>coccidiosis</i>	Fitasa <sup>1</sup>	Enzima adicional <sup>2</sup>	DFM <sup>3</sup>
1	5X	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
2	5X	500 FTU/kg	Ninguna	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
3	5X	500 FTU/kg	Xilanasas <sup>4</sup> (1.000 u/kg) Amilasas <sup>4</sup> (1.800 u/kg) Proteasas <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Ninguno
4	5X	500 FTU/kg	Xilanasas <sup>4</sup> (1.000 u/kg) Amilasas <sup>4</sup> (1.800 u/kg) Proteasas <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli*.  
<sup>2</sup> Amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, xilanasas de *Trichoderma reesei*, proteasa de *Bacillus subtilis*.  
<sup>3</sup> Enviva Pro® es combinación de cepas Bs2084, LSSAO1 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>4</sup> Avizyme 1505® proporcionado por Danisco A/S.

Los pollitos se alimentaron con dietas con o sin o bien Enviva Pro o bien con xilanasas, amilasa, y proteasa (Avizyme 1502; tabla 3). Las enzimas y Enviva Pro se proporcionaron por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Todas las dietas contenían 500 FTU de fitasa de *E. coli*. Los corrales se colocan en las instalaciones para no tener contacto directo para evitar contaminación.

Todas las dietas eran dietas basadas en DDGS harina de maíz-soja. Se proporcionaron dietas de iniciación durante el estudio (20 días). Las dietas se hicieron pelets (65-70°C) y migas. Se tomaron muestras de cada tratamiento del principio, medio y final de cada lote y se combinaron juntas para confirmar presencia de actividad de enzimas y Enviva Pro en el alimento.

Tabla 4. Composición de dieta experimental del ejemplo 2.

Ingrediente (%)	Inicio (0-20 días)	Crecimiento (20-38 días)	Finalización (38-48 días)
Maíz	50,60	52,3	57,40
Triturado de trigo	1,33	1,03	1,32
Maíz DDGS	7,00	7,00	7,00
Harina de soja	34,60	33,50	28,60
Grasa vegetal	2,50	2,50	2,50
Piedra caliza	1,41	1,38	1,09
MD-fosfato	1,20	1,00	0,84
DL-metionina	0,31	0,27	0,27
Sal	0,46	0,46	0,46
L-lisina	0,29	0,23	0,28
Premezcla de vitaminas y trazas de minerales	1,50	1,50	1,50

Ingrediente (%)	Inicio (0-20 días)	Crecimiento (20-38 días)	Finalización (38-48 días)
Composición de nutrientes calculada (%)			
EM pollo, kcal/kg	2.950	3.000	3.040
CP	23,0	22,5	20,4
Calcio	0,85	0,81	0,75
Fósforo disponible	0,38	0,35	0,32
TSAA	0,98	0,94	0,89
Lisina	1,36	1,29	1,20
Metionina	0,62	0,59	0,56

Se anotaron los pesos corporales y peso de los comederos los días 1, 11, 20, 38 y 48 para calcular la ingesta de alimento, ganancia de peso corporal y conversión del alimento. La mortalidad y sacrificio se controlaron diariamente y se usó para ajustar el consumo de alimento y la ganancia. Se sacrificó un ave de cada seis réplicas de corral mediante dislocación cervical para recolectar raspados de la mucosa los días 11 y 20. Se tomaron raspados de mucosa del íleon (divertículo del Meckel a la válvula ileocecal). El íleon se extirpó y cortó a lo largo de su longitud para exponer el lumen y después se descarga rápidamente y suavemente con PBS para eliminar la digesta. Se usó el borde de una placa de microscopio para eliminar la capa de mucosa por raspado a lo largo de la longitud de la sección de tejido extirpado. La capa de mucosa inmediatamente se congeló atrapada entre placas de aluminio en N líquido para mantener la integridad de ARN y se almacenó en bolsas whirl-pak individuales. Las muestras de tejido congelado se almacenaron en N líquido durante el muestreo y a -80°C antes del análisis. Se aisló el ARN total del raspado de mucosa usando el reactivo Trizol (Invitrogen) usando un homogeneizador mecánico para alteración de tejido. El ARN total (0,5 µg) se sometió a transcripción inversa a ADN complementario usando iScript (Bio-Rad) según las recomendaciones del fabricante. La abundancia de ARNm de genes de citoquina inflamatoria secretados (interleucina-10, interferón-γ e interleucina-17) se valoró usando cebadores específicos de pollo. Además, la abundancia de TATA-BP, HPRT-1 y ARNm β-acción se midió para normalizar datos usando el software geNorm. En cambio en la abundancia de ARNm en la expresión del gen se determinó usando la ecuación delta-delta Ct según describe Rudrappa y Humphrey (2007) J. Nutr. 137-: 427-432 y logaritmo transformado por análisis de datos.

Las medias se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Las aves se usaron como la unidad experimental para datos ARNm.

## 20 Resultados

La figura 4 muestra abundancia de ARNm del gen interferón-gamma en el raspado de mucosa del íleon de pollos broiler.

11 días edad: EEC combinado = 0,1

20 días edad: EEC combinado = 0,6

25 La combinación de Enviva Pro y xilanasa, amilasa, proteasa + fitasa aumenta la expresión IFR-g en el íleon de broilers de 11 días de edad que recibieron 5 veces una vacuna de coccidiosis viva al eclosionar comparado con el control negativo, Enviva Pro + fitasa, y xilanasa, amilasa, proteasa + fitasa. En el día 21, Enviva Pro + fitasa, y la combinación de Enviva Pro y xilanasa, amilasa, proteasa + fitasa disminuye la expresión IFR-g en el íleon comparado con el control negativo. Estos datos sugieren que modular la respuesta inmune puede ser uno de los mecanismos de mejorar el rendimiento de DFMs en combinación con las 4 enzimas en broilers.

30 La figura 15 muestra la proporción de conversión del alimento de pollos broiler a los 48 días de edad. Edad 48 días: EEC combinado = 0,041.

## Ejemplo 3

### Materiales y métodos

35 Se llevó a cabo un ensayo de digestibilidad con pollos broiler para determinar los efectos de las enzimas de la ración y tratamientos DFMs sobre utilización de nutrientes. Las jaulas se metieron en habitaciones con ambiente controlado. Las aves recibieron 20 horas de iluminación fluorescente y, se les permitió acceso libre a las raciones y agua. En el día 1, se dio vacuno de coccidiosis viva de broiler a todos los pollos mediante el agua de bebida. Se proporcionó papel en el suelo de alambre de la jaula para los tres primeros días para permitir reciclar Eimeria Oocystes. El estudio consistía en los siguientes tratamientos (tabla 5).

Tabla 5. Diseño experimental del ejemplo 3.

Tratamiento	Fitasa <sup>1</sup>	Enzima adicional <sup>2</sup>	DFM <sup>3</sup>
1	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
2	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>4</sup> (1.000 u/kg) Amilasa 1 <sup>4</sup> (1.800 u/kg) Proteasa <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Ninguno
3	500 FTU/kg	Xilanasa (2.000 u/kg) Amilasa 2 (200 u/kg)	Ninguno
4	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>4</sup> (1.000 u/kg) Amilasa 1 <sup>4</sup> (1.800 u/kg) Proteasa <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Ninguno
5	500 FTU/kg	Ninguna	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
6	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>4</sup> (1.000 u/kg) Amilasa 1 <sup>4</sup> (1.800 u/kg) Proteasa <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
7	500 FTU/kg	Xilanasa (2.000 u/kg) Amilasa 2 (200 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
8	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>5</sup> (2.000 u/kg) Amilasa 2 <sup>5</sup> (200 u/kg) Proteasa <sup>5</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli*.  
<sup>2</sup> Amilasa 1 de *Bacillus amyloliquefaciens*, amilasa 2 de *Bacillus licheniformis*, xilanasa de *Trichoderma reesei*, proteasa de *Bacillus subtilis*.  
<sup>3</sup> Enviva Pro® es combinación de cepas Bs2084, LSSAO1 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>4</sup> Avizyme 1505® proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>5</sup> Axtra XAP® proporcionada por Danisco A/S

5 Un total de 192 aves se pesaron individualmente y se asignaron en base al peso corporal a 48 jaulas (4 aves/jaula). Las 8 raciones de tratamiento se asignaron al azar a cada seis jaulas. Las aves recibieron alimento de iniciación ad libitum adecuada al tratamiento del día 0 al 21. Enzimas y Enviva Pro se proporcionaron por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Todas las raciones contenían 500 FTU de fitasa de *E. coli*. Los corrales se colocan en las instalaciones para no tener contacto directo para evitar contaminación. Las aves se alimentaron con raciones de inicio (tabla 6) en forma de masa a lo largo del experimento.

Tabla 6. Composición de la ración experimental del ejemplo 3.

Ingrediente (%)	Inicio
Maíz	46,22
Triturado de trigo	6,73
Maíz DDGS	7,00
Harina de soja 48% CP	32,81
Premezcla almidón maíz/enzima/DFM	0,30
Combinación grasa animal/vegetal (50:50)	3,00
L-lisina. HCl	0,27
DL-metionina	0,30
L-treonina	0,11
Dióxido de titanio	0,30

Ingrediente (%)	Inicio
Sal	0,34
Piedra caliza	1,12
Fosfato de dicalcio	1,20
Premezcla de vitaminas y trazas de minerales	0,30

Composición de nutriente calculada (%)	
CP	23,00
EM, kcal/kg	2.950
Calcio	0,85
Fósforo disponible	0,38
Sodio	0,18
Lisina digestible	1,21
Metionina digestible	0,62
TSAA digestible	0,86
Treonina digestible	0,76

En el día 21, se sacrificaron cuatro pájaros por jaula por inyección intracardiada de sodio pentobarbital y el contenido del íleon inferior se expresó descargando suavemente con agua destilada. La digesta de las aves en una jaula se acumuló dando como resultado seis muestras por ración de tratamiento. Las muestras de digesta se congelaron inmediatamente después de recoger, se liofilizaron y procesaron. Las muestras de digesta y dietas se analizaron para Ti, DM, GE, almidón, grasa, N y aminoácidos, excluyendo triptófano, según procedimientos estándar. El cálculo de los coeficientes de digestibilidad del íleon se llevó a cabo según indica Ravindran et al. (2005), basado en la concentración de Ti indigestible. La contribución de energía de almidón, grasa y proteína a la energía digestible del íleon se calculó en base a la energía bruta media del almidón (4,2 kcal/g), grasa (9,4 kcal/g), o proteína (5,5 kcal/kg). La mejora de aminoácidos digestibles en respuesta a enzimas y DFMs se expresó en relación a la cantidad de aminoácidos no digestibles a nivel del íleon; la pendiente de esa función lineal se usó como indicador de los efectos de los aditivos sobre la digestibilidad de aminoácidos.

Las medias se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Los corrales se usaron como la unidad experimental.

#### Resultados

La figura 5 muestra energía digestible aparente en el íleon de pollos broiler a 21 días de edad. EEC combinada = 0,027.

La adición de Enviva Pro (un DFM) es combinación con una amilasa, xilanasas, proteasa y fitasa mostró incrementos comercialmente relevantes de energía digestible del íleon comparado con las enzimas por sí mismas y los controles negativos. Estos datos indican que DFMs mejoran los efectos de esas enzimas exógenas sobre la digestibilidad de energía de raciones para aves. Para despejar las dudas Amilasa 2 se usa como amilasa en AextraXAP y Amilasa 1 se usa como amilasa en Avizyme 1502.

La figura 6 muestra incremento de digestibilidad de aminoácidos en el íleon para tres raciones de tratamiento frente al tratamiento control como función de aminoácidos sin digerir en el íleon en el tratamiento control usando pollos broiler de 21 días de edad.

La figura presenta la mejora de digestibilidad de aminoácidos en el íleon para raciones de tratamiento con respecto a la fracción sin digerir de aminoácidos en el íleon de pollos broiler en el tratamiento control. Cada punto del tratamiento representa uno de los aminoácidos medidos. La adición de Enviva Pro sobre xilanasas, amilasa 2, proteasa + fitasa incrementó la digestibilidad en el íleon de aminoácidos (+11,3%) comparado con Enviva Pro + fitasa (+3,6%) y xilanasas, amilasa 2, proteasa + fitasa por sí mismas (es decir, sin DFM) (+4,7%). Estos datos indican que DFMs mejoran la eficacia de estas enzimas exógenas al incrementar la digestibilidad de aminoácidos de raciones para aves.

La figura 7 muestra la mejora de energía digestible en el íleon con respecto al tratamiento control usando pollos broiler de 21 días de edad.

5 La figura presenta el incremento de energía digestible en el ileon de cada ración de tratamiento comparado con un tratamiento de control negativo con fitasa. Además, se presentan las contribuciones calculadas de energía de almidón, grasa o proteína. La adición de Enviva Pro en combinación con xilanasa, amilasa 2, proteasa + fitasa incrementó la energía digestible en el ileon comparado con el tratamiento Enviva Pro + fitasa y el tratamiento xilanasa, amilasa 2, proteasa + fitasa por sí mismos. La adición de Enviva Pro en combinación con xilanasa, amilasa 1, proteasa + fitasa produjo incrementos comercialmente importantes de energía digestible en el ileon frente a las enzimas por sí mismas. Estos datos indican una capacidad mejorada de las 4 enzimas para incrementar la energía digestible en el ileon de raciones para broiler en presencia de DFMs.

Ejemplo 4

10 Materiales y método

15 Se llevó a cabo un ensayo de digestibilidad con pollos broiler para determinar los efectos de enzimas dietéticas y tratamientos con DFMs sobre la utilización de nutrientes. Las jaulas se pusieron en habitaciones con ambiente controlado. Las aves recibieron 20 horas de iluminación fluorescente y, se dejó acceso libre a las raciones y al agua. El día 1, se dio una vacuna de coccidiosis viva a todos los pollitos por medio del agua de bebida. Se proporcionó papel en el suelo de alambre de la jaula para los tres primeros días para permitir reciclar Eimeria Oocysts. El estudio consistía en los siguientes tratamientos (tabla 7).

Tabla 7. Diseño experimental del ejemplo 4.

Tratamiento	Fitasa <sup>1</sup>	Enzima adicional <sup>2</sup>	DFM <sup>3</sup>
1	500 FTU/kg	Ninguno	Ninguno
2	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>4</sup> (1.000 u/kg) Amilasa 1 <sup>4</sup> (1.800 u/kg) Proteasa <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Ninguno
3	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>5</sup> (2.000 u/kg) Amilasa 2 <sup>5</sup> (200 u/kg) Proteasa <sup>5</sup> (5.000 u/kg)	Ninguno
4	Ninguno	Ninguno	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
5	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>4</sup> (1.000 u/kg) Amilasa 1 <sup>4</sup> (1.800 u/kg) Proteasa <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
6	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>5</sup> (2.000 u/kg) Amilasa 2 <sup>5</sup> (200 u/kg) Proteasa <sup>5</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli*.

<sup>2</sup> Amilasa 1 de *Bacillus amyloliquefaciens*, amilasa 2 de *Bacillus licheniformis*, xilanasa de *Trichoderma reesei*, proteasa de *Bacillus subtilis*.

<sup>3</sup> Enviva Pro® es combinación de cepas Bs2084, LSSAO1 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.

<sup>4</sup> Avizyme 1505® proporcionado por Danisco A/S.

<sup>5</sup> Axtra XAP® proporcionada por Danisco A/S

20 Un total de 144 aves se pesaron individualmente y se asignaron en base al peso corporal a 36 jaulas (4 aves/jaula). Las 6 raciones de tratamiento se asignaron al azar a cada seis jaulas. Las aves recibieron alimento de iniciación ad-libitum adecuada al tratamiento del día 0 al 21. Enzimas y Enviva Pro se proporcionaron 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. Las aves se alimentaron con raciones de inicio (tabla 6) en forma de masa a lo largo del experimento.

Tabla 8. Composición de la ración experimental del ejemplo 4.

Ingrediente (%)	Inicio
Maíz	46,22
Triturado de trigo	6,73
Maíz DDGS	7,00
Harina de soja 48% CP	32,81
Premezcla almidón maíz/enzima/DFM	0,30
Combinación grasa animal/vegetal (50:50)	3,00
L-lisina. HCl	0,27
DL-metionina	0,30
L-treonina	0,11
Dióxido de titanio	0,30
Sal	0,34
Piedra caliza	1,12
Fosfato de dicalcio	1,20
Premezcla de vitaminas y trazas de minerales	0,30
<hr/>	
Composición de nutriente calculada (%)	
CP	23,00
EM, kcal/kg	2.950
Calcio	0,85
Fósforo disponible	0,38
Sodio	0,18
Lisina digestible	1,21
Metionina digestible	0,62
TSAA digestible	0,86
Treonina digestible	0,76

5 Se midió cualitativamente la ingesta de alimento y la excreta total por jaula durante cuatro días consecutivos (del día 17 al 20) para la determinación de la energía metabolizable aparente corregida (EMAn) y retención de nitrógeno. Se juntaron las recolecciones de excreta diaria por jaula, se mezclaron en una batidora y se tomaron muestras. Las muestras se liofilizaron, se molió para pasar a través de un tamiz de 0,5 mm y se almacenó en contenedores de plástico al vacío a -4°C pendientes del análisis. Las muestras procesadas se analizaron para DM, GE y N, usando procedimientos estándar.

Las medias se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Las jaulas se usaron como la unidad experimental.

## 10 Resultados

La figura 8 muestra la energía metabolizable aparente corregida EMAn de raciones de tratamiento alimentados a pollos broiler de 17 a 21 días de edad. EEC combinada = 0,015.

15 La adición de Enviva Pro en combinación con xilanasa, amilasa, proteasa + fitasa incrementó la EMAn de raciones en respuesta a enzimas comparado con la ración de control negativo. En particular, la adición de Enviva Pro en combinación con xilanasa, amilasa 2, proteasa + fitasa incrementó la EMAn de raciones en respuesta a enzimas comparado con raciones sólo con Enviva Pro.

La figura 9 muestra retención de nitrógeno en pollos broiler de 17 a 21 días de edad. EEC combinada = 0,006.

La adición de Enviva Pro en combinación con xilanasa, amilasa, proteasa + fitasa incrementó la retención de nitrógeno de pollos broiler en respuesta a enzimas comparado con la ración de control negativo. En particular, la adición de Enviva Pro sobre xilanasa, amilasa 2, proteasa + fitasa incrementó la retención de nitrógeno de broilers en respuesta a enzimas comparado con broilers alimentados con raciones sólo con Enviva Pro.

## 5 Ejemplo 5

## Materiales y métodos

Se adquirieron 308 pollitos macho broiler Ross de un criadero comercial. Un total de 10 pollitos se distribuyeron al azar a uno de los 6 corrales repetidos por tratamiento. Las aves se expusieron a iluminación fluorescente en ciclos de luz de 24 h durante los primeros cuatro días y después un ciclo de 16 h luz: 8 h oscuridad para el resto del experimento. Se proporcionó alimento y agua *ad libitum*. El diseño experimental consistió en los siguientes tratamientos.

Tabla 9. Diseño experimental del ejemplo 5.

Tratamiento	Vacuna de coccidiosis	Estat coccidio	Fitasa <sup>1</sup>	Enzima adicional <sup>2</sup>	DFM <sup>3</sup>
1	5X	Ninguna	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
2	5X	Ninguna	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
3	5X	Salinomicina	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
4	5X	Ninguna	500 FTU/kg	Ninguna	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g) Ninguno
5	5X	Ninguna	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>4</sup> (1.000 u/kg) Amilasa <sup>4</sup> (1.800 u/kg) Proteasa <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Ninguno
6	5X	Ninguna	500 FTU/kg	Xilanasa <sup>4</sup> (1.000 u/kg) Amilasa <sup>4</sup> (1.800 u/kg) Proteasa <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli*.  
<sup>2</sup> Amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, xilanasa de *Trichoderma reesei*, proteasa de *Bacillus subtilis*.  
<sup>3</sup> Enviva Pro® es combinación de cepas Bs2084, LSSAO1 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>4</sup> Avizyme 1505® proporcionado por Danisco A/S.

En los tratamientos 2 a 6, se administró manualmente una sobredosis (dosis recomendada 5X) de vacuna de coccidiosis (B, Intervet) con una jeringa en la cavidad bucal de los pollitos a la edad de 1 día. En el tratamiento 2, se usó salinomicina (Bio-cox) al nivel apropiado (60 g/MT) como un coccidiostático. Los corrales se colocaron en las instalaciones para no tener contacto directo para evitar contaminación cruzada de *Eimeria* oocysts y DFMs. Se proporcionaron enzimas y Enviva Pro por Danisco A/S en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Todas las dietas contenían 500 FTU de fitasa de *E. coli* en la base.

Tabla 10. Composición de la ración experimental del ejemplo 5.

Ingrediente (%)	Inicio
Maíz	53,18
Maíz DDGS	10,00
Harina de soja 48% CP	32,05
Aceite de soja	1,07
L-lisina. HCl	0,31
DL-metionina	0,31
L-treonina	0,12
Sal	0,33

Ingrediente (%)	Inicio
Piedra caliza	1,14
Fosfato de dicalcio	1,19
Premezcla de vitaminas y trazas de minerales	0,30
Composición de nutriente calculada (%)	
CP	23,00
EM, kcal/kg	2.950
Calcio	0,85
Fósforo disponible	0,38
Sodio	0,18
Lisina digestible	1,21
Metionina digestible	0,63
TSAA digestible	0,86
Treonina digestible	0,76

Se sacrificó un total de 2 aves por réplica de corral a los 14 días de edad para recolectar raspados de la mucosa del íleon medio. Los íleon se descargaron con agua destilada y se abrieron al corte con un par de tijeras. Las secciones abiertas se posaron sobre un plato de cristal limpio. La mucosa se raspó cuidadosamente de la región media del íleon con la parte larga de una placa de vidrio. Cada muestra se almacenó en 2 ml del último ARN (Ambion) y se congeló a -80°C. Las muestras se descongelaron en hielo. Se aisló el ARN con reactivo Tizol según protocolos estándar. Se determinó la integridad de ARN sobre gel agarosa. Se hizo transcripción inversa de ARN con la transcriptasa inversa MMLV. Se determinó la expresión de mucina (MUC2) en tiempo real PCR sobre una máquina Biorad real-time MyIQ.

Las medias se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Las aves se usaron como la unidad experimental para datos ARNm.

#### Resultados

La figura 10 muestra abundancia de ARNm del gen MUC2 en raspado de mucosa del íleon de pollos broiler de 14 días de edad. EEC combinado = 0,14.

La adición de Enviva Pro en combinación con xilanasas, amilasa, proteasa + fitasa disminuye la expresión de MUC2 en el íleon de broiler objetivo con una dosis 5X de una vacuna de coccidiosis viva comparado con el control objetivo. Estos datos sugieren que una reducción de pérdida de aminoácidos endógenos debida a secreción de mucina reducida puede ser responsable del rendimiento mejorado de broiler que reciben combinaciones de DFMs y las 4 enzimas.

#### Ejemplo 6

#### 20 Material y método

Se tomaron muestras de tejido de pollitos broiler del ensayo presentado en el ejemplo 1 a 23 días de edad. Las especificaciones del tratamiento se presentan en la tabla 1. Se quitaron el yeyuno, páncreas e hígado de 2 aves de cada corral y la mucosa junta resultó en ocho muestras por tratamiento. Las muestras se enjuagaron en disolución tampón (PBS) sumergido en un reactivo de almacenar tejidos (último ARN) según el protocolo del fabricante y se almacenó a -80°C. Se aisló el ARN total de cada muestra de tejido usando un método de extracción de única etapa de extracción en fenol-cloroformo según describe Chomczynski y Sacchi (1987; Anal. Biochem. 162: 156-9). Se determinó la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm (Nanodrop) y se monitorizó la integridad mediante electroforesis en gel sobre 1,2% geles de agarosa. Solo era considerado para usar ARN de pureza suficiente y que tenga un radio de absorción a 260 nm vs 280 nm mayor de 1,87.

Se fabricaron micromatrices usando 70 pares de bases de oligonucleótidos (Opereon Biotechnologies Inc) según el protocolo descrito por Druyan et al. (2008; Poult. Sci. 87:2418-29). El diseño experimental de la matriz era un círculo completo entretelado según describe Garosi et al. (2005; Br. J. Nutr. 93: 425-32) que cada muestra se compara directamente con las otras en una manera de emparejado múltiple permitiendo comparar todos los tratamientos. Las muestras se etiquetaron según el método descrito por Druyan et al. (2008; Poult. Sci. 87:2418-29) en el que la mitad

de las muestras se deberían etiquetar con Cy3 y la mitad con Cy5 que son tintes fluorescentes de cianina. Se llevó a cabo hibridación usando el kit de hibridación de micromatrices Pronto Plus! antes de la adición de sondas de ADN etiquetadas con Cy3 y Cy5 y cubiertas con un cobertor de vidrio limpio (Lifterslip) y dejado hibridar durante 16 horas. Después las micromatrices se escanearon sobre un escáner de micromatrices Scan Array GX. PLUS ajustado a un poder de láser de 65% para adquirir imágenes.

El ARN total de las muestras individuales se hizo transcripción inversa para producir ADNc que después se usó como muestra para amplificaciones PCRq según describe Druyan et al (2008; Poult. Sci. 87: 2418-29). Se optimizaron los parámetros de termociclado para cada gen y cada gen se amplificó independientemente por duplicado en una vez en un único instrumento.

Se generaron archivos de datos de las imágenes escaneadas de las micromatrices pero extrayendo la intensidad de datos iniciales para cada placa y combinación de tintes usando software ScanAlyze. Después se analizó la intensidad de los archivos usando JMP Genomics incluyendo transformación log2 inicial. Se llevó a cabo normalización de datos usando regresión con pesado local y suavizado primero en la matriz y a lo largo de todas las matrices. Las intensidades log2 normalizadas que resultan se analizaron usando un modelo mezclado ANOVA.

Se compararon intensidades medias usando un umbral de significancia en base a la corrección de Bongerroni de P = 0,05. Para la matriz completa, incluyendo todos los replicados, se calculó una media por intensidad de cuadrícula para cada gen usando las tres sondas una al lado de otra, dando como resultado un total de cuatro medias replicadas, una por cada cuadrícula, por gen. Los datos para la media Ct de las muestras duplicadas (muestra de gen Ct: muestra GAPDH Ct) dependiendo del tratamiento se sometieron a ANOVA de una vía.

Resultados

Se tomaron los datos de expresión usando la plataforma de micromatriz y un “mapa de calor” producido para visualizar los datos del yeyuno (figura 16) y páncreas (figura 17). Los niveles de expresión relativa de seis genes de interés se convirtieron en señales visuales en base a la escala vista en la figura 16. Los genes débilmente expresados se marcan con un signo menos (“-“), y los genes fuertemente expresados se marcan con un signo más (“+“); mientras que una intensidad de cuadrícula más grande representa una diferencia mayor del nivel de expresión media de los tratamientos. Los genes que se midieron y sus funciones pretendidas se ven en la tabla 11. Se usó PCR a tiempo real para validar la expresión del gen mostrada en el mapa de calor para sacarosa-isomaltasa (SI) y amilasa 2A (AMY2a) y estaban muy correlacionados con los datos de la matriz.

Tabla 11. Función pretendida de genes medidos.

Gen	Identidad	Función
PEPT1	Transportador 1 oligopéptido	Transporte de nutrientes
GCK	Glucoquinasa	Etapas inicial de metabolismo de glucosa
SI	Sacarosa isomaltasa	Metabolismo de glucosa
ZO1	Proteína 1 unión estrecha	Formación de unión estrecha, integridad intestinal
CD3d	Antígeno CD3 célula T	Marcador célula T
AMY2A	2A amilasa	Metabolismo de almidón y sacarosa

La figura 16 muestra un mapa de calor de perfiles de expresión de genes de interés para todos los tratamientos para yeyuno a los 23 días de edad.

La figura 17 muestra un mapa de calor de perfil de expresión de alfa amilasa de pollo para todos los tratamientos para páncreas a los 23 días de edad.

En las figuras 16 y 17 la clave es la siguiente:

Control no objetivo = control no objetivo + fitasa

CO = control objetivo + fitasa

CO + amilasa = control objetivo + fitasa + amilasa

CO + XAP = control objetivo + fitasa + xilanasas + amilasa + proteasa

CO + EP = control objetivo + fitasa + Envivo Pro

CO + EP + Amilasa = control objetivo + fitasa + amilasa + Envivo Pro

CO + EP + XAP = control objetivo + fitasa + xilanasas + amilasa + proteasa + Envivo Pro

La expresión del transportador 1 de oligopéptido (PEPT1) incrementó por xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa, y esto incrementó más cuando está en combinación con Enviva Pro. PEPT1 es parte de un sistema de transporte de péptido y es responsable de la ingesta de un amplio intervalo de di- y tripéptidos.

5 La expresión de glucoquinasa (GCK) disminuyó mediante el control objetivo pero la combinación de amilasa + fitasa o xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa con Enviva Pro produjo un aumento similar al control no objetivo. El grado de aumento fue mayor que cuando se usó xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa con Enviva Pro.

10 También se vio un progreso similar con sacarosa isomaltasa (SI) donde la combinación de Enviva Pro con amilasa + fitasa o xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa produjo un aumento mayor que ambos control el objetivo y el no objetivo. GCK es una enzima clave en el metabolismo de glucosa y SI es responsable de la hidrólisis de sacarosa e isomaltosa, y por tanto juega un papel importante en la digestión y absorción de hidratos de carbono en animales.

15 La proteína 1 de unión estrecha (ZO1) era la más fuertemente expresada en el control objetivo. Se vio una reducción con los tratamientos de enzima pero se vio una mayor disminución en la expresión cuando se usó Enviva Pro y particularmente cuando está en combinación con xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa que produjo un nivel similar de reducción que el control no objetivo. ZO1 es una proteína que está sobre el lado citoplásmico de las uniones estrechas, hay varias funciones para esta proteína que van desde transducción de señal para ensamblaje de uniones estrechas hasta estabilidad de las propias uniones estrechas.

20 El antígeno CD3 célula T (CD3D) se expresó fuertemente en el control objetivo. Los tratamientos solo con enzima redujeron algo la expresión pero se redujo significativamente cuando se combinó con Enviva Pro. La combinación de xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa produjo la mayor reducción de los tratamientos de enzima, y, cuando se combinó con Enviva Pro, produjo una reducción incluso mayor parecida a la que se vio para el control no objetivo. CD3D es una molécula de superficie encontrada en células T y juega un papel importante en la transducción de señal durante la unión al receptor célula T y es parte del complejo célula T/CD3.

25 La alfa amilasa (AMY2A) se expresaba fuertemente en los controles no objetivo y objetivo pero la adición de amilasa + fitasa o xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa, dio como resultado expresión reducida, que se redujo más cuando se usó Enviva Pro en combinación, particularmente para xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa. Alfa amilasa en pollo se produce principalmente en el páncreas y juega un papel principal en digestión de almidón.

#### Discusión

30 El incremento en la expresión del transportador de péptidos transportador 1 de oligopéptidos (PEPT1) cuando se dan xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa, particularmente en combinación con Enviva Pro, sugiere disponibilidad incrementada de péptido y por lo tanto un incremento del requerimiento de transportadores de péptidos, que indica un efecto sinérgico de enzimas y DFMs para incrementar la adsorción de péptidos por el animal lo que permite mayor crecimiento. Los resultados del rendimiento del animal del ejemplo 1 apoyan esta conclusión. El incremento en la expresión de glucoquinasa y sacarosa isomerasa con la combinación de amilasa + fitasa, o xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa, y Enviva Pro sugiere que había absorción de glucosa incrementada, y disponibilidad incrementada de sacarosa e isomaltosa en el borde de cepillo, que indica una interacción positiva entre la enzima y DFMs para incrementar la absorción de hidratos de carbono en el intestino delgado y por tanto incrementa la disponibilidad de energía de la ración. La disminución de la expresión de glucoquinasa para el control objetivo sugiere que el *Clostridium perfringens* objetivo causa daño a la mucosa y que la adición de Enviva Pro y xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa lo alivia.

40 El efecto de Enviva Pro de reducir la expresión de proteína 1 unión estrecha indica requerimiento menor de recambio proteico en el intestino, que puede estar relacionado con alta integridad intestinal. La expresión incrementada en el control objetivo, sin embargo, sugiere que el recambio/requerimiento de la proteína era alta debido al fallo de la integridad intestinal debido posiblemente a infecciones de coccidia y *Clostridium perfringens*. Las enzimas solas tenían algún efecto sobre mejorar esto pero el efecto aditivo visto con Enviva Pro sugiere un beneficio mayor a partir de la combinación. Esto indica que Enviva Pro actúa para incrementar la integridad intestinal y por tanto beneficia la salud del animal. La integridad intestinal incrementada, y por tanto la capacidad de absorción, puede ser uno de los mecanismos mediante el que se incrementa la eficacia de las enzimas exógenas cuando está presente un DFM.

50 La expresión incrementada de antígeno CD3d célula T en el control objetivo indica incremento de la respuesta inmune mediada por células debido al objetivo. En estas condiciones, las aves sufrirán rendimiento por debajo del óptimo porque la respuesta inmune demandará energía que se podría usar para el crecimiento, y porque algunas aves experimentarán una respuesta de enfermedad sistémica. La expresión incrementada de este marcador inmunológico era marcadamente reversible cuando se usaba Enviva Pro sólo o en combinación con enzimas. La disminución de la respuesta inmune en el intestino puede ser uno de los mecanismos mediante el que se incrementa la eficacia de las enzimas exógenas en la absorción de nutrientes y el rendimiento cuando está presente un DFM.

55 La disminución de la producción alfa amilasa (AMY2A) que se vio con la combinación de amilasa + fitasa, o xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa sugiere que el pollo reduce su producción de amilasa endógena como una respuesta al complemento de enzimas exógenas. El efecto aditivo visto con Enviva Pro y xilanasas + amilasa + proteasa + fitasa

sugiere que el DFM está funcionando sinérgicamente con las enzimas exógenas para permitir al ave utilizar la energía que habría gastado en producir enzimas para digerir el almidón en la ración.

El efecto neto de una disminución de la respuesta inmune e integridad intestinal más alta, y una mejor digestión de nutrientes y absorción con la combinación de enzimas y DFMs, determina claramente rendimiento de producción mejorada de pollos broiler.

Ejemplo 7

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un ensayo de digestibilidad con pollos broiler para determinar los efectos de enzimas de la ración y tratamientos DFM sobre la utilización de energía. Se adquirieron un total de 308 pollitos macho Ross de 288 días de edad de un criadero comercial y se criaron en jaulas de alambre en batería hasta el día 14. Las aves se vacunaron con una vacuna de coccidia viva al eclosionar (Coccivac-B). Los pollitos se alimentaron con una ración de inicio basada en maíz-SBM-DDGS. Los pollitos se les alimentó con raciones experimentales desde el día 14 hasta el día 21. Se proporcionó alimento y agua *ad libitum* a lo largo del periodo de 21 días. Se encerraron seis pollitos por corral en corrales en batería colocados en una habitación con ambiente controlado, donde recibieron calor complementario comenzando a 35°C con un día de edad y disminuyendo 2°C semanalmente. Se proporcionó luz a 23L:1D. El día 15, los pollitos se pesaron individualmente, clasificaron, se señaló el ala y se colocaron al azar en las unidades experimentales usando un diseño completamente al azar. Cada tratamiento consistía en 8 corrales por tratamiento. El estudio consistió en los siguientes tratamientos (tabla 12).

Tabla 12. Diseño experimental del ejemplo 7.

Tratamiento	Fitasa <sup>1</sup>	Enzima adicional <sup>2</sup>	DFM <sup>3,4</sup>
1	Ninguno	Ninguno	Ninguno
2	500 FTU/kg	Xilanasa (2.000 u/kg) Amilasa 1 (200 u/kg) Proteasa (5.000 u/kg)	Ninguno
3	Ninguno	Ninguno	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
4	500 FTU/kg	Xilanasa (2.000 u/kg) Amilasa 1 (200 u/kg) Proteasa (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
5	Ninguno	Ninguno	GalliPro Tect (8 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)
6	500 FTU/kg	Xilanasa (2.000 u/kg) Amilasa 1 (200 u/kg) Proteasa (5.000 u/kg)	GalliPro Tect (8 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli*.

<sup>2</sup> Amilasa de *Bacillus licheniformis*, xilanasa de *Trichoderma reesei*, proteasa de *Bacillus subtilis*.

<sup>3</sup> Enviva Pro® es una combinación de cepas Bs2084, LSSAO1 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.

<sup>4</sup> GalliPro Tect es un DFM comprendido por una cepa de *Bacillus licheniformis* (DSM 17236).

Enzimas y DFM se proporcionaron 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 cruzada. Las aves se alimentaron con raciones de inicio (tabla 13) en forma de masa a lo largo del experimento.

Tabla 13. Composición de la ración experimental del ejemplo 7.

Ingrediente (%)	Inicio
Maíz	52,94
Maíz DDGS	12,00
Harina de soja 48%	29,38
Combinación grasa animal/vegetal	1,08

Ingrediente (%)	Inicio
Sal	0,40
DL-metionina	0,22
Bio-Lys	0,44
Piedra caliza	1,30
Fosfato de dicalcio	1,27
Cloruro de colina 60	0,10
Premezcla de vitaminas y trazas de minerales	0,63
TiO <sub>2</sub>	0,25

Composición de nutriente calculada (%)	
CP	22,25
EM, kcal/kg	2.925
Calcio	0,90
Fósforo disponible	0,38
Sodio	0,18
Lisina digestible	1,20
Metionina digestible	0,52
TSAA digestible	0,85
Treonina digestible	0,75

Se colocaron bandejas de excreta limpias para los últimos 2 días y se recogieron muestras de excreta por corral el día 21. Las muestras de excreta recogidas se congelaron a -20°C antes de secarse al horno a 65°C durante 3 días para determinar la materia seca (Internacional AOAC, 2005; método 934.01). Las muestras de alimento también se corrigieron para medir en base a materia seca 5,0 g de cada muestra y secarlas en un horno a 100°C durante 24 horas. Las muestras de excreta después pasaron a través de un tamiz de 1 mm mientras que las muestras de alimento se molieron a un tamiz de 0,5 mm. Las muestras de excreta después se molieron a un tamiz de 1 mm mientras que las muestras de alimento se molieron a un tamiz de 0,5 mm. Las muestras de excreta y ración se analizaron para Ti, DM, GE, y N, según procedimientos estándar. El cálculo de la energía metabolizable aparente (EMA) se basó en la concentración del marcador indigestible (Ti) y la energía bruta de raciones y excretas. Se hicieron las correcciones adecuadas para la diferencia en el contenido de humedad. Se determinó EMA corregida en N (EMAN) para retención cero en nitrógeno multiplicando por 8,22 kcal por gramo de nitrógeno retenido en el cuerpo (Hill y Anderson, 1958; J. Nutr. 64: 587-603).

Las medias se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Los corrales se usaron como la unidad experimental.

## 15 Resultados

La figura 18 muestra energía metabolizable aparente corregida por retención de nitrógeno (EMAN) de pollos broiler de 21 días de edad. Efecto de DFM;  $P < 0,001$ ; Efecto de enzimas;  $P < 0,001$ ; Efecto de DFM x efecto de enzimas;  $P = 0,27$ ; EEC combinado = 32 kcal.

La adición de xilanasas, amilasa, proteasa, y fitasa, en combinación con Enviva Pro o GalliPro Tect resultó en mejoras de EMAN frente al tratamiento control, que fueron significativamente mayores comparado con las enzimas o el DFM por sí mismos. Los incrementos de EMAN debido a la combinación de xilanasas, amilasa, proteasa, y Enviva Pro (235 kcal/kg) o GalliPro Tect (215 kcal/kg) fueron mayores que los efectos de la adición de las enzimas y los DFM cuando se aplican separadamente (152 kcal/kg para Enviva Pro, o 120 kcal/kg para GalliPro Tect), comparado con el tratamiento con control negativo.

## 25 Ejemplo 8

Materiales y métodos

Se adquirieron mil cuatrocientos pollitos macho Cobb de un día de un criadero comercial. Al inicio del estudio, se colocaron cincuenta machos en uno de los siete corrales para tratamiento en bloque. El estudio consistió en los siguientes tratamientos (tabla 1):

Tabla 1. Diseño experimental del ejemplo 8

Tratamiento	Desafiado a <i>Clostridium perfringens</i>	Fitasa <sup>1</sup>	Enzima adicional <sup>2</sup>	DFM <sup>3</sup>
1	No	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
2	Si	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
3	Si	500 FTU/kg	Ninguna	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
4	Si	500 FTU/kg	Xilanasas <sup>4</sup> (2.000 u/kg) Amilasas <sup>4</sup> (200 u/kg) Proteasas <sup>4</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli*.  
<sup>2</sup> Amilasa de *Bacillus licheniformis*, xilanasas de *Trichoderma reesei*, proteasa de *Bacillus subtilis*.  
<sup>3</sup> Enviva Pro® es combinación de cepas Bs2084, LSSAO1 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>4</sup> Axtra XAP® proporcionado por Danisco A/S.

- 5 Se toman los pesos de las aves por corral al inicio del estudio, día 21 y al final (día 42). El corral es la unidad de medida. Las raciones de los broiler se dan como migas (inicio) o pelets (crecimiento y finalización). 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 y se forman pelets usando California Pellet Mill (temperatura fría de pelet 65-70 C). 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 Enviva Pro en el alimento.
- 10

Tabla 2. Composición de la ración experimental del ejemplo 8.

Ingrediente (%)	Inicio	Crecimiento	Finalización
Maíz	50,959	59,6156	62,7488
Maíz DDGS	12	12	12
Harina de soja 49% CP	30,7176	22,5873	19,4
Cloruro de colina	0,06	0,06	0,06
Aceite de soja	3,0693	2,7035	2,84841
Lisina	0,21	0,2426	0,244
DL-metionina	0,1723	0,1566	0,1341
L-treonina	0,0387	0,0551	0,0564
Sal	0,4668	0,4692	0,47
Piedra caliza	1,4467	1,4501	1,33389
Fosfato dicálcico	0,7346	0,5349	0,571
Premezcla de vitaminas y trazas de minerales	0,125	0,125	0,125
Composición de nutrientes calculada (%)			
CP	22,642	19,45	19,45
Energía, kcal/kg	12,761	12,012	12,012
Lisina digestible	1,327	1,142778	1,124778
Metionina digestible	0,53142	0,475425	0,475425
Treonina digestible	0,89401	0,78494	0,78494

Las aves reciben alimento *ad-libitum* adecuado al tratamiento desde el día 0 al 42. Enzimas y Enviva Pro se suministran por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Todas las raciones contenían 500 FTU de fitasa E. coli en la base. Los corrales se colocan en las instalaciones para no tener contacto directo para evitar contaminación.

- 5 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.

10 Todos los corrales tienen aproximadamente 10,16 cm (4 pulgadas) de basura acumulada con una cubierta de viruta fresca de pino.

- 15 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 enteritis necrótica 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.

#### Toma de muestras

- 20 El día 21, se sacrificaron un total de 8 aves por tratamiento (1-2 aves por corral) y el tracto gastrointestinal total por debajo de la molleja hasta la unión ileocecal se tomó de cada ave y se mandó en hielo durante la noche al laboratorio. Las muestras se diseccionaron más en el laboratorio para obtener un trozo de 20 cm del yeyuno que rodea el divertículo de Meckel; el resto del tracto intestinal se descartó. Las secciones se enjuagaron con peptona 0,1% para eliminar el contenido intestinal y se abrió longitudinalmente para dejar expuesto el revestimiento epitelial.
- 25 Las secciones se masticaron en 99 ml de peptona 0,1% a 7,0 golpes/s durante 60 s para liberar células bacterianas asociadas a mucosa. Se recogieron las bacterias de la disolución masticada mediante centrifugación a  $12.000 \times g$  durante 10 minutos. El pelet bacteriano resultante se resuspendió en 10 ml de caldo MRS + 10% glicerol, congelado en nitrógeno líquido, y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta análisis posterior.

#### Aislamiento de ADN

- 30 Se aisló ADN genómico de todas las muestras con fenol, extracción con cloroformo y se purificó usando Roche Applied Science High Pure PCR Template Purification Kit (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Las muestras se juntaron al azar en pares y el nivel de ADN después de la extracción, para un total de cuatro muestras por tratamiento.

#### Pirosecuenciación

- 35 Se llevó a cabo pirosecuenciación de amplicon FLX bacteriano codificado por marcaje según describe Dowd (Dowd et al. 2008; BMC Microbiol. 8, 125). Una cantidad equivalente de ADN aislado de la mucosa intestinal de cada ave se analizó en muestra juntas que contenían ADN de dos aves. La región V1-V3 del gen 16S ARNr se amplificó en cada muestra usando los cebadores 28 F (5'-GAGTTTGATCNTGGCTCAG) Y 519R. (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG). Siguiendo la secuencia, los datos iniciales se filtran y recortan en base a la calidad.
- 40 Las secuencias se clasifican mediante muestras individuales en base a secuencias de código de barras. Los marcajes de código de barras se eliminan y las secuencias de ribosomas no bacteriano se eliminan. Se determinó la composición de la comunidad de bacterias usando BlastN comparando con una base de datos controlada y conservada manualmente que deriva de NCBI. La abundancia relativa de cada ID bacteriano se determinó para cada muestra. Se recopilaron los datos de cada nivel taxonómico usando nomenclatura NCBI.

- 45 **Análisis estadístico**

Para el rendimiento las medias de los datos se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Los corrales se usaron como la unidad experimental.

- 50 Las identificaciones a nivel de género se usaron para el análisis de los datos de la pirosecuencia. Se calculó la abundancia relativa de cada género y se usó para el análisis. Los resultados se analizaron usando un análisis de modelo categórico y después una probabilidad chi-cuadrado calculado usando JMP 8.0.2 (SAS institute, Cary, NC), donde cada muestra que representa dos aves se consideró como una unidad experimental.

#### Resultados:

La figura 19 muestra proporción de conversión de alimentos (FCR) de pollos broiler en un modelo objetivo de enteritis necrótica (EEC combinado: 0,015).

La combinación de Enviva Pro con xilanasa, amilasa, proteasa + fitasa redujo FCR (g ganancia PC/g ingesta alimento) comparado con el tratamiento control objetivo y el uso de Enviva Pro y fitasa solo. La proporción de conversión de alimento se redujo por la combinación del nivel de control + fitasa no objetivo.

5 La figura 20 muestra la abundancia relativa de *Lactobacillus spp.* el día 21 en la mucosa del yeyuno de pollos broiler. ChSq<0,0001.

10 La figura 20 muestra la abundancia relativa de *Lactobacillus spp.* en comparación con otras especies en la mucosa del yeyuno de broiler el día 21 en un modelo objetivo de enteritis necrótica. La proporción de *Lactobacillus spp.* se redujo en el control objetivo en comparación con el control no objetivo. La combinación de Enviva Pro, xilanasa, amilasa, proteasa + fitasa incrementa la proporción de *Lactobacilli* más que Enviva Pro y fitasa sólo y el control objetivo.

15 *Lactobacilli* se usan ampliamente como probióticos tanto para uso humano como animal (Patterson y Burkeholder 2003; Poult Sci 82 (4) 627-31) y se ha documentado que mejoran la salud de la tripa a un nivel que sería comparable con promotores de crecimiento antibiótico (Awad et al. 2009 Poult Sci 88 (1) 49-56). Por tanto incrementando la proporción de *Lactobacilli* en los microorganismos de la tripa, la combinación de Enviva Pro, xilanasa, amilasa, proteasa + fitasa puede mejorar la salud de la tripa y tener un impacto positivo en la eficacia alimentaria.

20 Todas las publicaciones mencionadas en las especificaciones anteriores se incorporan en la presente memoria mediante referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos en la presente invención serán aparentes para los expertos en la técnica sin alejarse del ámbito y espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas preferentes, se debería entender que la invención según se reivindica no se debería limitar a tales realizaciones específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados se pretende que estén incluidos en el ámbito de las siguientes reivindicaciones.

#### Listado de Secuencias

- <110> DuPont Nutrition Biosciences ApS
- <120> Composición de aditivo alimentario
- <130> P041547EP1
- <140> 12701264.9
- <141> 19-01-2012
- <150> GB1102857.8
- <151> 18-02-2011
- <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 483
- <212> PRT
- <213> Bacillus licheniformis
- <400> 1

ES 2 621 137 T3

Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro  
 1 5 10 15

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

Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu  
 50 55 60

Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys  
 65 70 75 80

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

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

Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val  
 115 120 125

Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro  
 130 135 140

Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe  
 145 150 155 160

ES 2 621 137 T3

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

ES 2 621 137 T3

	405		410		415
Ser	Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro				
	420		425		430
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr					
	435		440		445
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser					
	450		455		460
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr					
	465		470		475
					480

Val Gln Arg

- <210> 2
- <211> 1452
- <212> ADN
- <213> Bacillus licheniformis

5

<400> 2

gcaaacttta atgggacgct gatgcagtat tttgaatggt acatgcccaa tgacggccaa	60
cattggaagc gtttgcaaaa cgactcggca tatttggtg aacacgggtat tactgccgtc	120
tggattcccc cggcatataa gggaacgagc caagcgggatg tgggctacgg tgcttacgac	180
ctttatgatt taggggagtt tcatcaaaaa gggacggttc ggacaaagta cggcacaaaa	240
ggagagctgc aatctgcgat caaaagtctt cattcccgcg acattaacgt ttacggggat	300
gtggtcatca accacaaagg cggcgctgat gcgaccgaag atgtaaccgc ggttgaagtc	360
gatcccgtcg accgcaaccg cgtaatttca ggagaacacc taattaaagc ctggacacat	420
tttcattttc cggggcgcgg cagcacatac agcgatttta aatggcattg gtaccatttt	480
gacggaaccg attgggacga gtcccgaag ctgaaccgca tctataagtt tcaaggaaag	540
gcttgggatt ggggaagtcc caatgaaaac ggcaactatg attatttgat gtatgccgac	600
atcgattatg accatcctga tgtcgcagca gaaattaaga gatggggcac ttggtatgcc	660
aatgaactgc aattggacgg tttccgtctt gatgctgtca aacacattaa attttctttt	720
ttgcgggatt gggttaatca tgtcagggaa aaaacgggga aggaaatggt tacggtagct	780
gaatattggc agaatgactt gggcgcgctg gaaaactatt tgaacaaaac aaattttaat	840
cattcagtgt ttgacgtgcc gcttcattat cagttccatg ctgcatcgac acagggaggc	900
ggctatgata tgaggaaatt gctgaacggg acggctggtt ccaagcatcc gttgaaatcg	960
gttacatttg tcgataacca tgatacacag ccggggcaat cgcttgagtc gactgtccaa	1020

ES 2 621 137 T3

acatggttta agccgcttgc ttacgctttt attctcaciaa gggaatctgg ataccctcag 1080  
 gttttctacg gggatatgta cgggacgaaa ggagactccc agcgcgaaat tcctgccttg 1140  
 aaacacaaaa ttgaaccgat cttaaaagcg agaaaacagt atgcgtacgg agcacagcat 1200  
 gattatttcg accaccatga cattgtcggc tggacaaggg aaggcgacag ctcggttgca 1260  
 aattcaggtt tggcggcatt aataacagac ggacccgggtg gggcaaagcg aatgtatgtc 1320  
 ggccggcaaa acgccggtga gacatggcat gacattaccg gaaaccgttc ggagccggtt 1380  
 gtcatcaatt cggaaggctg gggagagttt cacgtaaacy gcgggtcgggt ttcaatttat 1440  
 gttcaaagat ga 1452

<210> 3  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 5 <213> Trichoderma reesei  
 <400> 3

Met Lys Leu Arg Tyr Ala Leu Pro Leu Leu Leu Gln Leu Ser Leu Pro  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Ala Asp Thr Ala Ala Trp Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Phe  
 20 25 30

Ala Leu Thr Asp Arg Ile Ala Arg Gly Ser Gly Asp Thr Gly Gly Ser  
 35 40 45

Ala Cys Gly Asn Leu Gly Asp Tyr Cys Gly Gly Thr Phe Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Ser Lys Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp  
 65 70 75 80

Ile Thr Pro Val Val Thr Ser Asp Asp Gly Gly Tyr His Gly Tyr Trp  
 85 90 95

Ala Glu Asp Ile Asp Ser Ile Asn Ser His Tyr Gly Ser Ala Asp Asp  
 100 105 110

Leu Lys Ser Leu Val Asn Ala Ala His Ser Lys Gly Phe Tyr Met Met  
 115 120 125

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

Ser Pro Ser Pro Leu Asn Gln Ala Ser Ser Tyr His Pro Glu Cys Asp  
 145 150 155 160

ES 2 621 137 T3

Ile Asp Tyr Asn Asn Gln Thr Ser Val Glu Asn Cys Trp Ile Ser Gly  
 165 170 175

Leu Pro Asp Leu Asn Thr Gln Ser Ser Thr Ile Arg Ser Leu Tyr Gln  
 180 185 190

Asp Trp Val Ser Asn Leu Val Ser Thr Tyr Gly Phe Asp Gly Val Arg  
 195 200 205

Ile Asp Thr Val Lys His Val Glu Gln Asp Tyr Trp Pro Gly Phe Val  
 210 215 220

Asn Ala Thr Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Phe Asp Gly Asp Pro  
 225 230 235 240

Asn Tyr Leu Leu Pro Tyr Ala Ser Leu Met Pro Gly Leu Leu Asn Tyr  
 245 250 255

Ala Ile Tyr Tyr Pro Met Thr Arg Phe Phe Leu Gln Gln Gly Ser Ser  
 260 265 270

Gln Asp Met Val Asn Met His Asp Gln Ile Gly Ser Met Phe Pro Asp  
 275 280 285

Pro Thr Ala Leu Gly Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe  
 290 295 300

Leu Ser Ile Lys Asn Asp Thr Ala Leu Leu Lys Asn Ala Leu Thr Tyr  
 305 310 315 320

Thr Ile Leu Ser Arg Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln  
 325 330 335

Ala Phe Ser Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Asp Leu Trp Arg  
 340 345 350

Ser Gly Phe Asn Ala Gln Ser Asp Met Tyr Asp Ala Ile Ser Lys Leu  
 355 360 365

Thr Tyr Ala Lys His Ala Val Gly Gly Leu Ala Asp Asn Asp His Lys  
 370 375 380

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

Asn Met Val Ala Leu Thr Thr Asn Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ala Gln  
 405 410 415

ES 2 621 137 T3

His Cys Phe Gly Thr Gln Val Pro Asn Gly Arg Trp Gln Asn Val Phe  
 420 425 430

Asp Glu Gly Asn Gly Pro Thr Tyr Ser Ala Asp Gly Asn Gly Gln Leu  
 435 440 445

Cys Leu Asn Val Ser Asn Gly Gln Pro Ile Val Leu Leu Ser Ser  
 450 455 460

- <210> 4
- <211> 1392
- <212> ADN
- <213> Trichoderma reesei

5

<400> 4

atgaagctcc ggtacgctct cccgctgctc ttgcagctct ctttgccggt cctctccgca 60  
 gacaccgccg cctggaggtc ccgcaccatc tactttgccc tgacagaccg catcgctcgt 120  
 ggaagcgggtg acacgggggg cagtgcgtgt gggaacctgg gggactactg cggtggcacg 180  
 ttccagggct tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg 240  
 atcacacctg ttgtgacgag tgatgatggg ggctaccatg gctattgggc ggaggacatc 300  
 gactccatca actctcatta tggctctgcg gacgatctca agagtctcgt caacgccgcg 360  
 catagcaagg gcttctatat gatggtggac gtcgtggcca accacatggg ctacgccaat 420  
 atctctgacg atagtccctc tccactgaac caggcctcgt cgtatcacc cagagtgtgat 480  
 atcgactaca acaaccaaac cagcgtcgag aactgctgga tcagcggcct cccgatctc 540  
 aacacgcaga gctcaaccat ccgcagcctc taccaggact gggctcctcaa cctcgtgtcc 600  
 acgtacggct tcgacggcgt ccgcacgac accgtcaagc acgtcgagca agactactgg 660  
 cccggcttcg tcaacgccac cggcgtctac tgcatcggcg aggtctttga cggagaccca 720  
 aactacctgc tgcctacgc cagcctcatg ccgggcctgc tcaactacgc catctactac 780  
 cccatgacgc gcttcttct ccagcagggc tcctcgcagg acatggtcaa catgcacgac 840  
 cagatcggca gcatgttccc cgacccgacc gcgctcggca cctttgtcga caaccacgac 900  
 aaccgcgct tcctgagcat caagaacgac acggccctgc tcaagaacgc gctgacgtac 960  
 accatcctct cgcgcgcat ccccatcgtc tactacggca ccgagcaggc cttctcgggc 1020  
 ggcaacgacc cggccaacag ggaggacctc tggcgcagcg gcttcaacgc ccagtccgac 1080  
 atgtacgacg ccatctccaa gctcacctac gccaaagcac ccgtcggcgg cctcgccgac 1140  
 aacgaccaca agcacctgta cgtcgcgac acggcctacg ccttcagccg cgccggcggc 1200  
 aacatggtgg cctgaccac caacagcggc agcgggagct cggcccagca ctgcttcggc 1260  
 acgcaggtgc ccaacggccg ctggcagaat gtctttgacg agggcaatgg gccgacgtat 1320

ES 2 621 137 T3

tccgccgacg gcaacggcca gctttgcttg aatgtgtcca acggtcagcc cattgtcttg 1380

ctgtcttctgt ga 1392

<210> 5  
 <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> 5

gagtttgatc ntggctcag 19

<210> 6  
 15 <211> 18  
 <212> ADN  
 <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> 6

gtnttacngc ggckgctg 18

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de aditivo alimentario que comprende un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa, en la que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y sus combinaciones.
- 10 2. Un microorganismo de alimentación directa que comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y sus combinaciones, en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa para usar en mejorar el rendimiento de un sujeto en el que el rendimiento se determina por la eficacia alimentaria y/o ganancia de peso del animal y/o por la proporción de conversión del alimento y/o la capacidad de evitar los efectos negativos de enteritis necrótica o para usar para mejorar la resistencia del sujeto a enteritis necrótica o para usar en mejorar la proporción de conversión del alimento (FCR) o para usar en mejorar la ganancia de peso de un sujeto o para usar en mejorar la eficacia alimentaria en un sujeto, en el que el sujeto es ave o porcino.
- 15 3. Un kit que comprende un microorganismo de alimentación directa, una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa e instrucciones para la administración, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y sus combinaciones.
- 20 4. Una composición de aditivo alimentario según la reivindicación 1 o un microorganismo de alimentación directa en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa para usar según la reivindicación 2 o un kit según la reivindicación 3 en el que el microorganismo de alimentación directa es una bacteria viable.
- 25 5. Una composición de aditivo alimentario según la reivindicación 1 o 4 o un microorganismo de alimentación directa en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa para usar según la reivindicación 2 o 4 o un kit según la reivindicación 3 o 4 en la que el microorganismo de alimentación directa es uno o más de las siguientes cepas: *Bacillus subtilis* cepas 3A-P4 (PTA-6506); 15A-P4 (PTA-6507); 22C-P1 (PTA-6508); 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 (NRRL-B-50104); BS27 (NRRL B-50105); BS 18 (NRRL B-50633); y BS 278 (NRRL B-50634).
- 30 6. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-5 o un microorganismo de alimentación directa en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-5, o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 3-5 en la que el microorganismo de alimentación directa está en la forma de una endospora.
- 35 7. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-6 o un microorganismo de alimentación directa en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa para usar según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-6 o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 3-6 en la que la xilanasa es una endo-1,4- $\beta$ -d-xilanasa o una 1,4- $\beta$ -xilosidasa, preferentemente una endo-1,4- $\beta$ -d-xilanasa.
- 40 8. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-7 o un microorganismo de alimentación directa en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa para usar según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-7 o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 3-7 en la que la xilanasa es de *Bacillus*, *Trichoderma*, *Thermomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Humicola*.
- 45 9. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-8 o un microorganismo de alimentación directa en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa para usar según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-8 o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 3-8 en la que 6-fitasa es una fitasa de *E. coli* o una fitasa de *Buttiauxella* o una fitasa de *Hafnia* o una fitasa de *Citrobacter* o una fitasa de *Aspergillus* o una fitasa de *Penicillium* o una fitasa de *Trichoderma* o una fitasa de *Hansenula*.
- 50 10. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-9 o un microorganismo de alimentación directa en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa para usar según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4-9 o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 3-9 en la que la  $\alpha$ -amilasa es de *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Trichoderma* spp. o *Aspergillus* spp.
11. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-10 en la que 6-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.
12. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-11 en la que  $\alpha$ -amilasa está presente en una dosis entre 50 AU/g de composición de aditivo alimentario y 20.000 AU/g de composición de aditivo alimentario.

13. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-12 en la que la xilanasa está presente en una dosis entre 500 XU/g de composición de aditivo alimentario y 40.000 XU/g de composición de aditivo alimentario
- 5 14. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-13 en la que la subtilisina está presente en una dosis entre 1.000 PU/g de composición de aditivo alimentario y 60.000 PU/g de composición de aditivo alimentario.
15. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-14 en la que DFM está presente en una dosis entre  $3,75 \times 10^7$  UFC/g de composición de aditivo alimentario y  $1 \times 10^{11}$  UFC/g de composición de aditivo alimentario.
- 10 16. Un microorganismo de alimentación directa en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa para usar según la reivindicación 2 en el que se usa la composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-15.
17. Un kit según la reivindicación 3 en el que dicho kit comprende la composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-15.
- 15 18. Un método para preparar una composición de aditivo alimentario, que comprende administrar un microorganismo de alimentación directa con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa y (opcionalmente) envasar, en el que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y sus combinaciones.
- 20 19. Un alimento que comprende una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-15.
20. Un alimento según la reivindicación 19 en el que la 6-fitasa está presente en una dosis entre 400 FTU/kg de alimento y 1.000 FTU/kg de alimento.
- 25 21. Un alimento según la reivindicación 19 o reivindicación 20, en el que  $\alpha$ -amilasa está presente en una dosis entre 100 AU/kg de alimento y 2.000 AU/kg de alimento.
22. Un alimento según cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en el que la xilanasa está presente en una dosis entre 1.000 XU/kg de alimento y 4.000 XU/kg de alimento.
23. Un alimento según cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en el que la proteasa está presente en una dosis entre 2.000 PU/kg de alimento a 6.000 PU/kg de alimento.
- 30 24. Un alimento según cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en el que el DFM está presente en una dosis entre  $7,5 \times 10^4$  UFC/kg de alimento y  $1 \times 10^7$  UFC/kg de alimento.
25. 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 4-15.
- 35 26. Una premezcla que comprende una composición de aditivo alimentario en combinación con una subtilisina, una xilanasa, una  $\alpha$ -amilasa y una 6-fitasa, y al menos un mineral y/o al menos una vitamina, en la que el microorganismo de alimentación directa comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y sus combinaciones.
27. Una premezcla que comprende una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-15 en combinación con al menos un mineral y/o al menos una vitamina.
- 40 28. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-15 para usar en la prevención y/o tratamiento de enteritis necrótica y/o coccidiosis en ave o porcino.

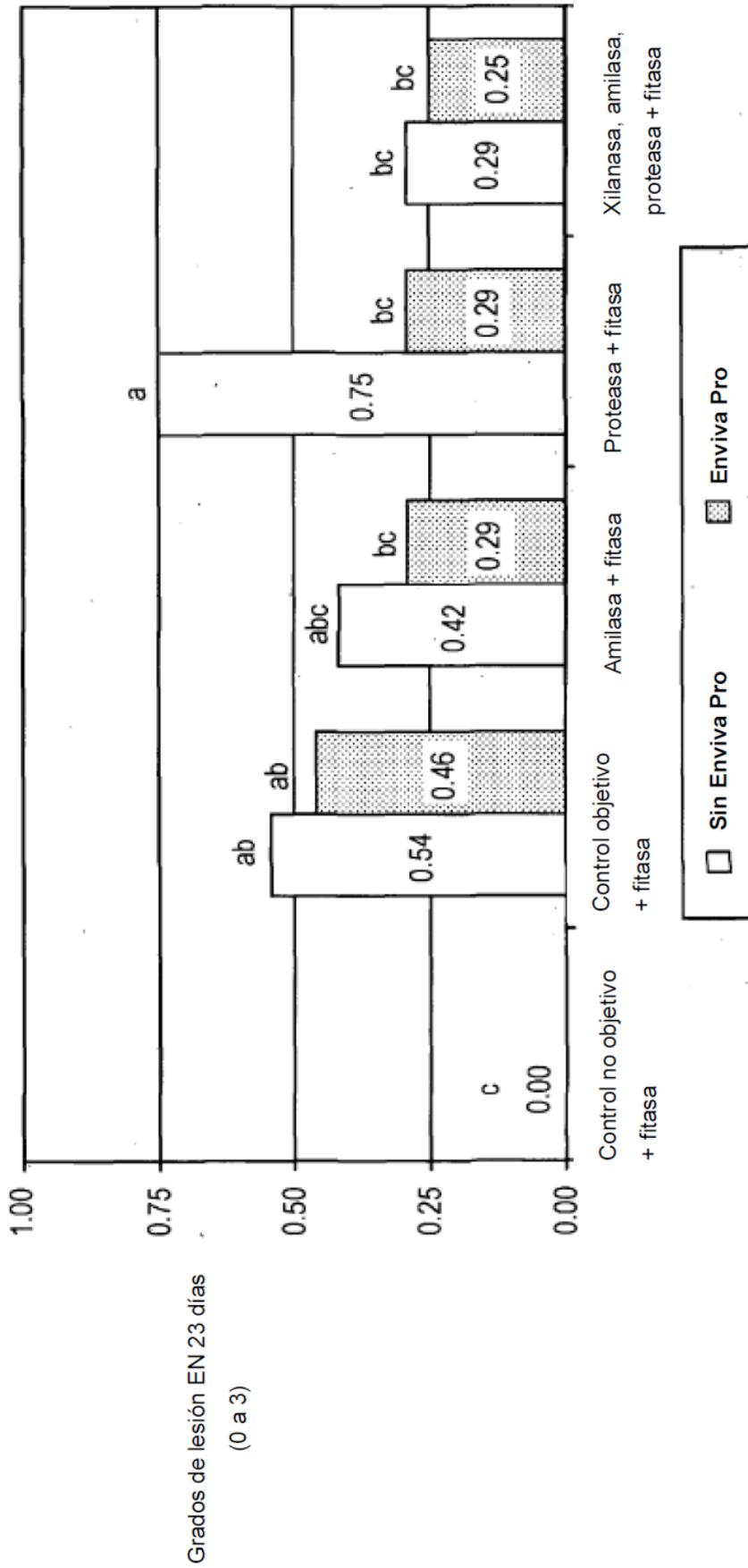


FIG. 1

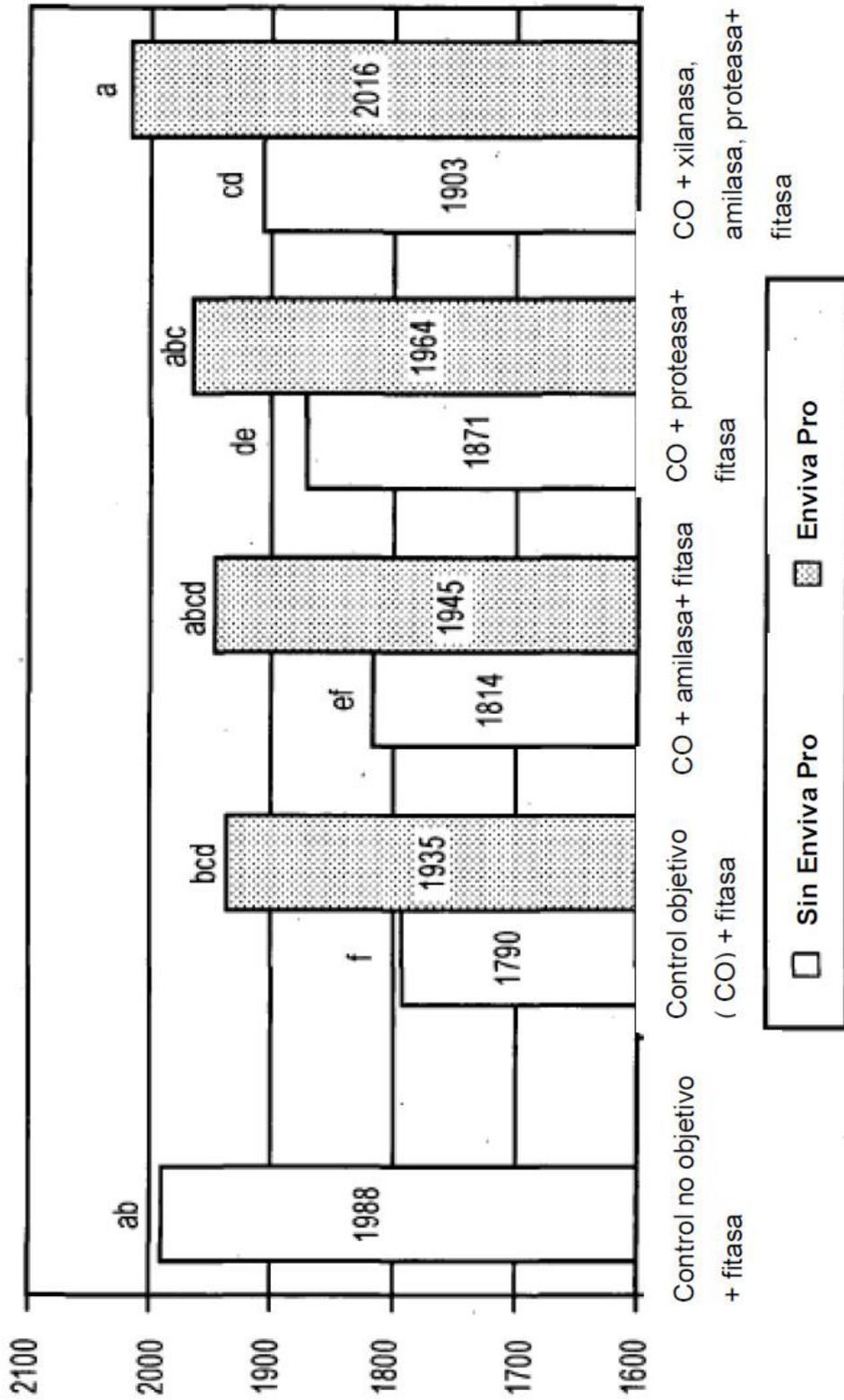


FIG. 2

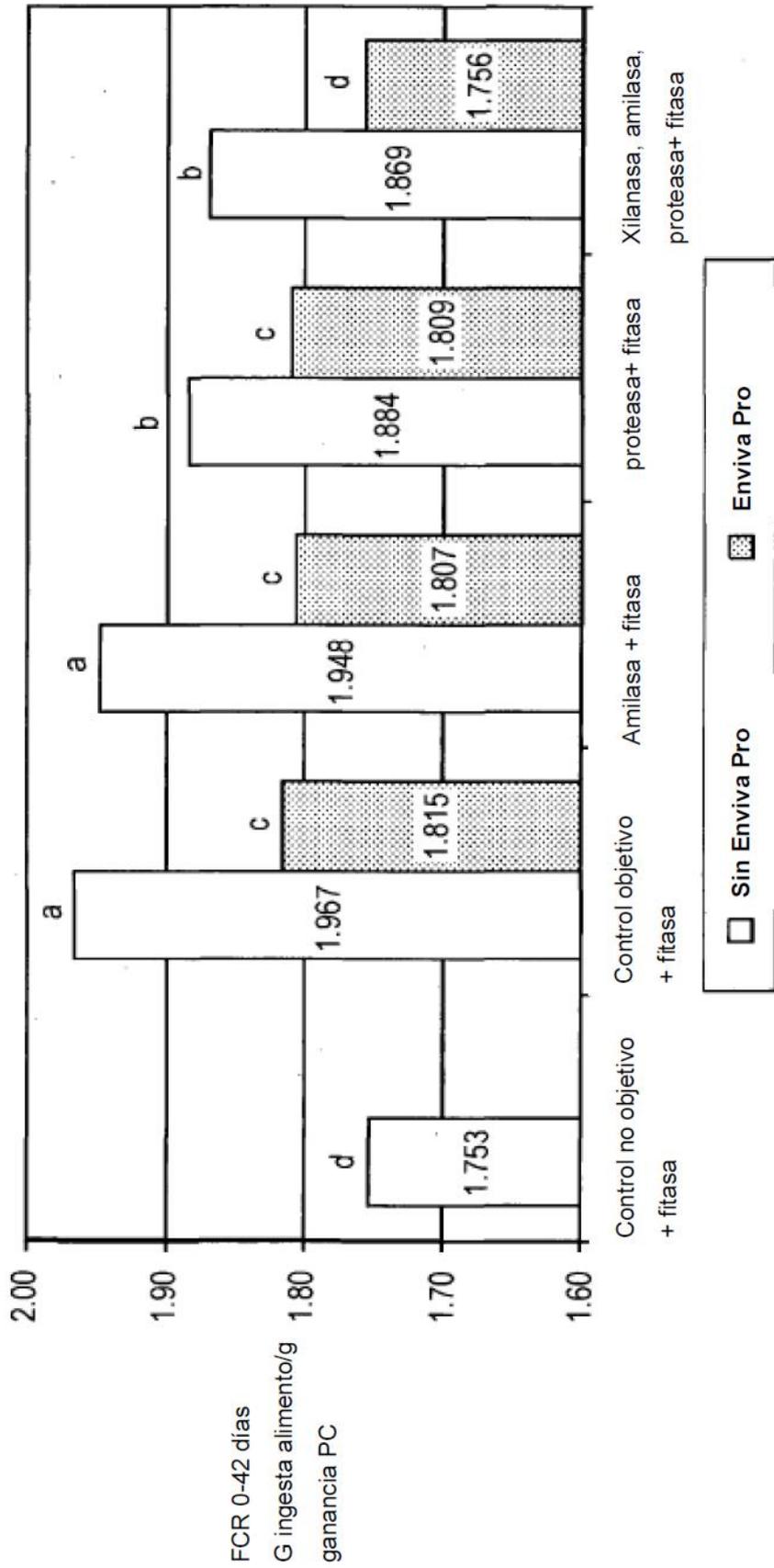


FIG. 3

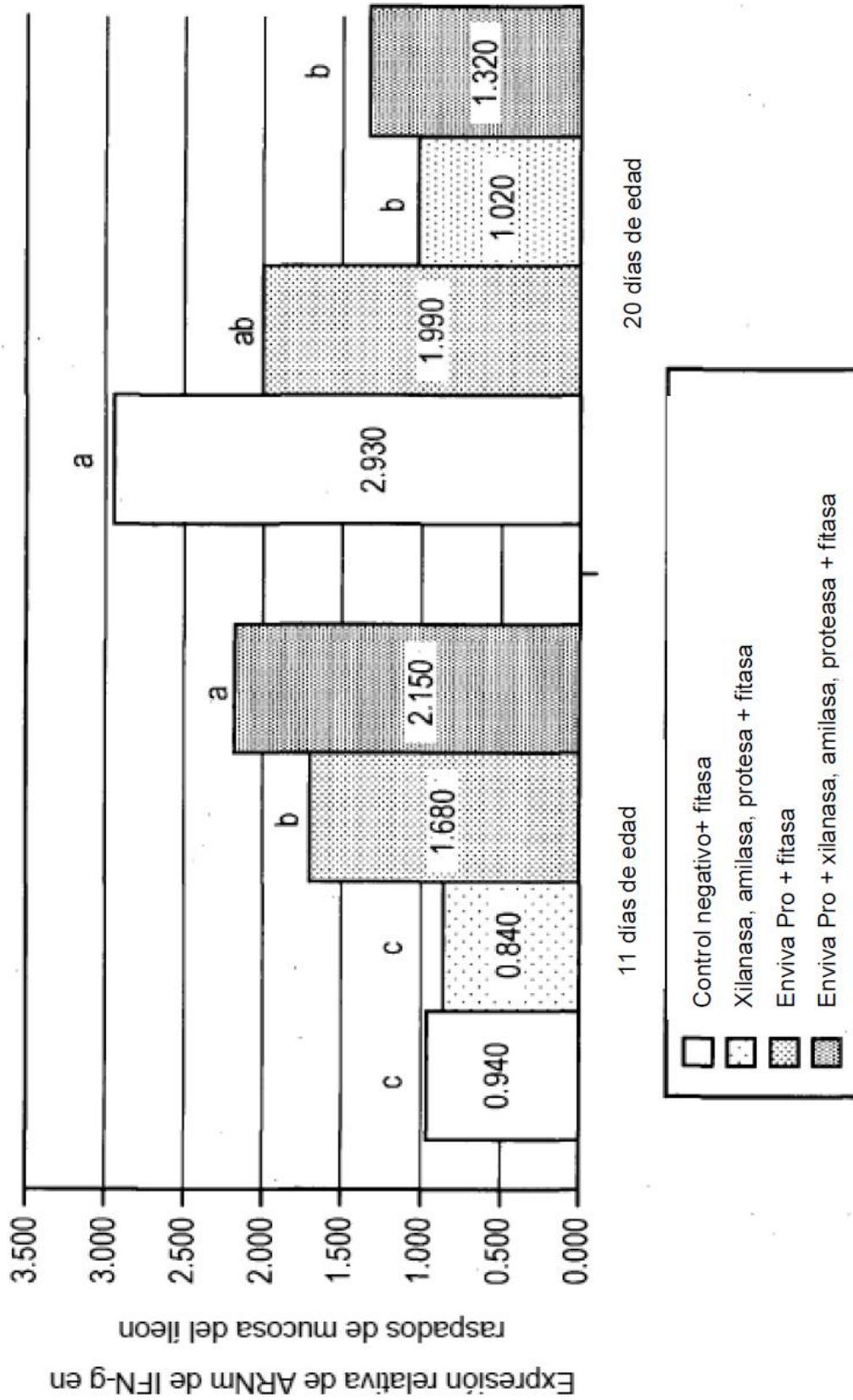


FIG. 4

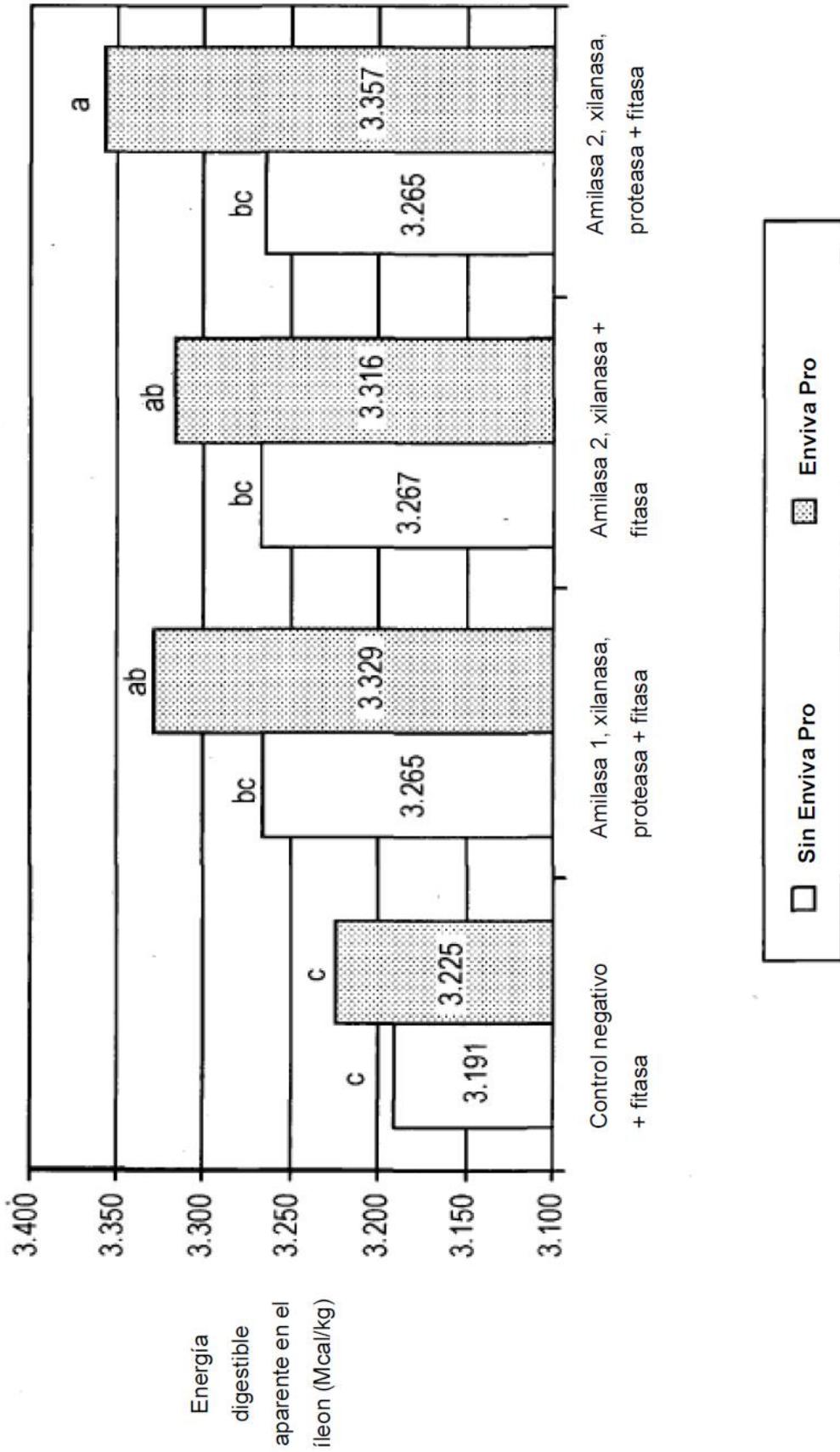
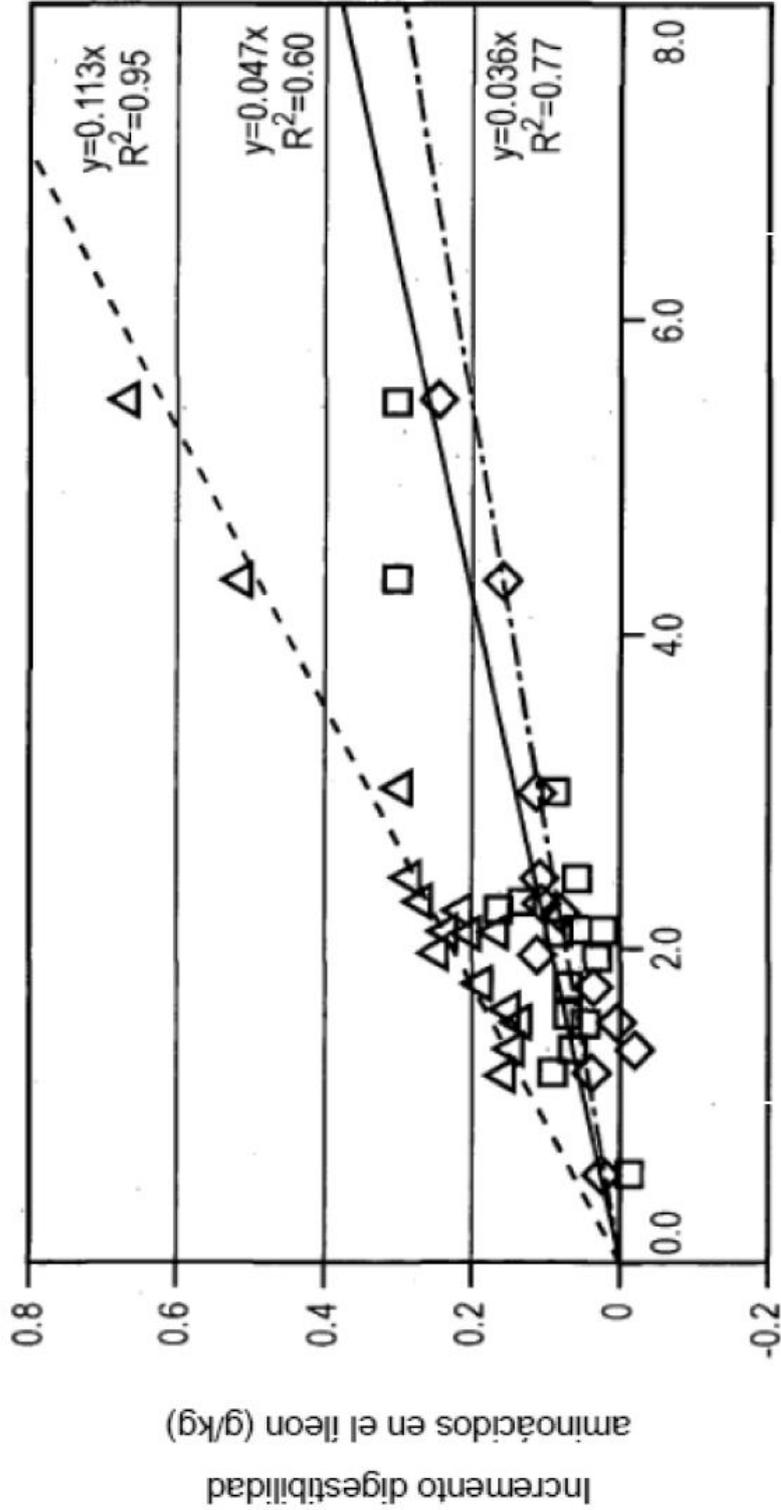
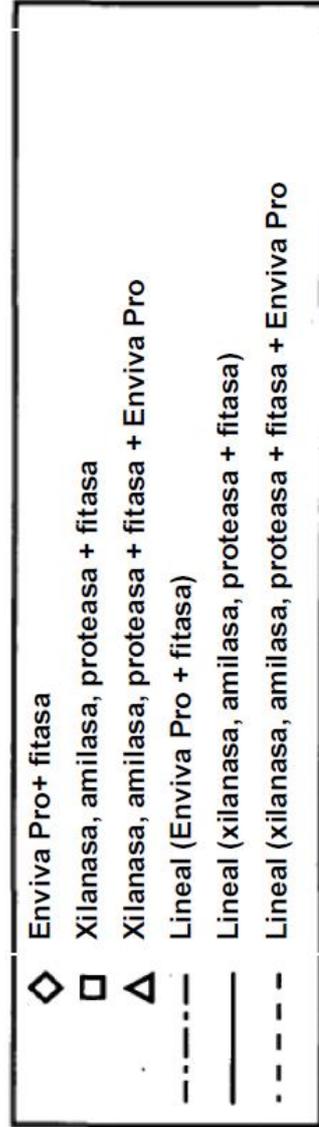


FIG. 5



Aminoácidos no digeridos en el ileon del tratamiento control (g/kg)



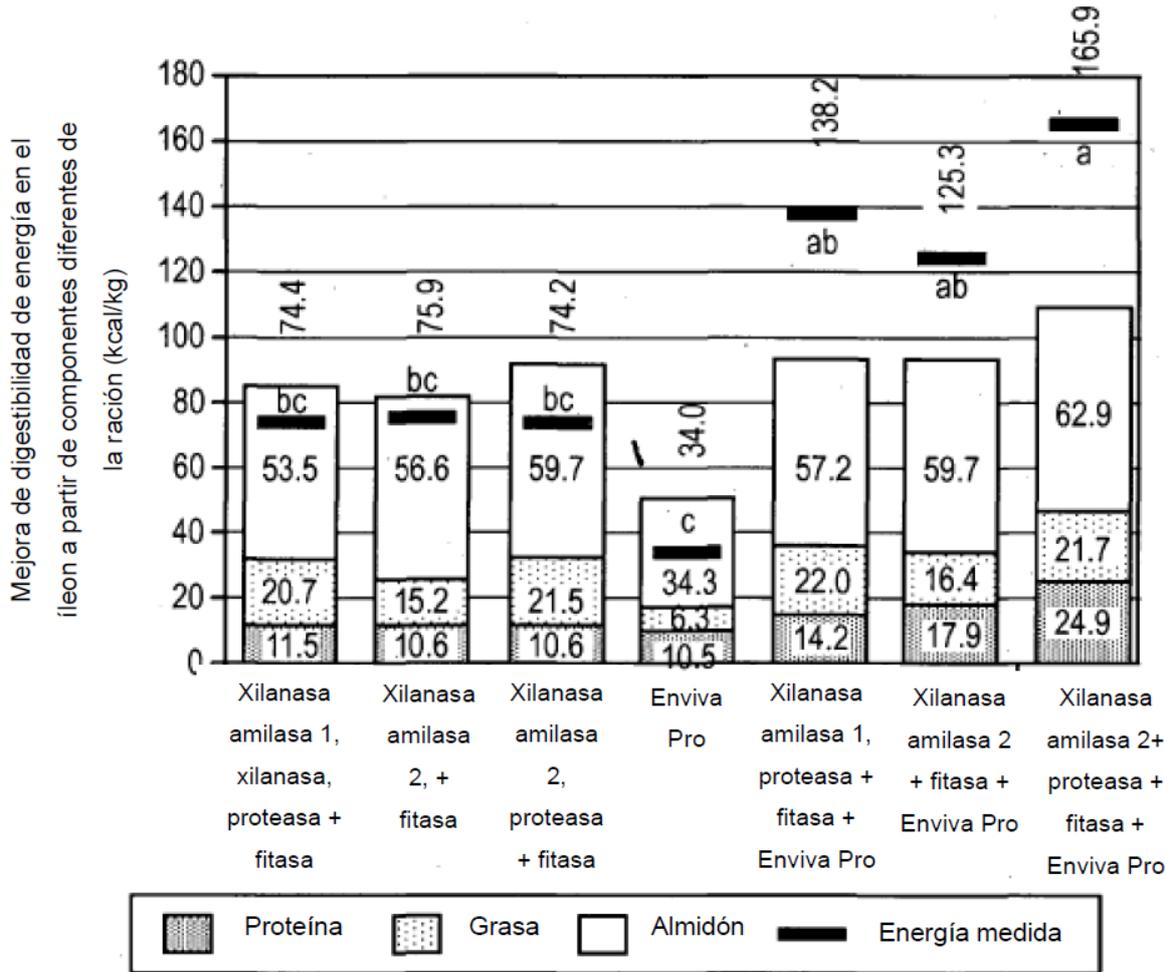


FIG. 7

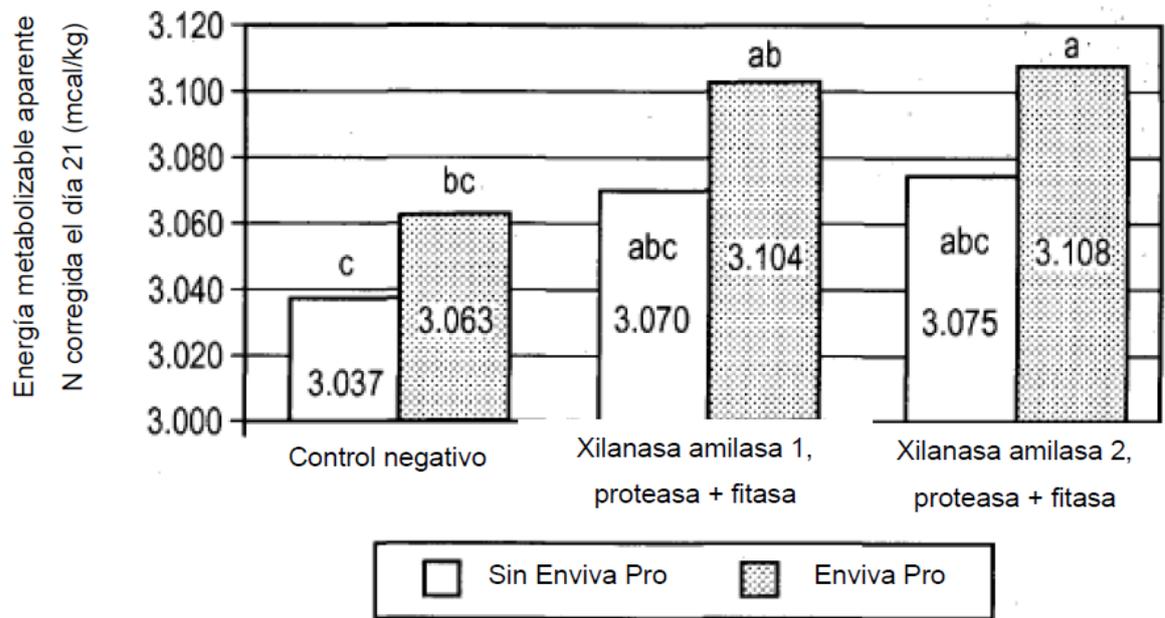


FIG. 8

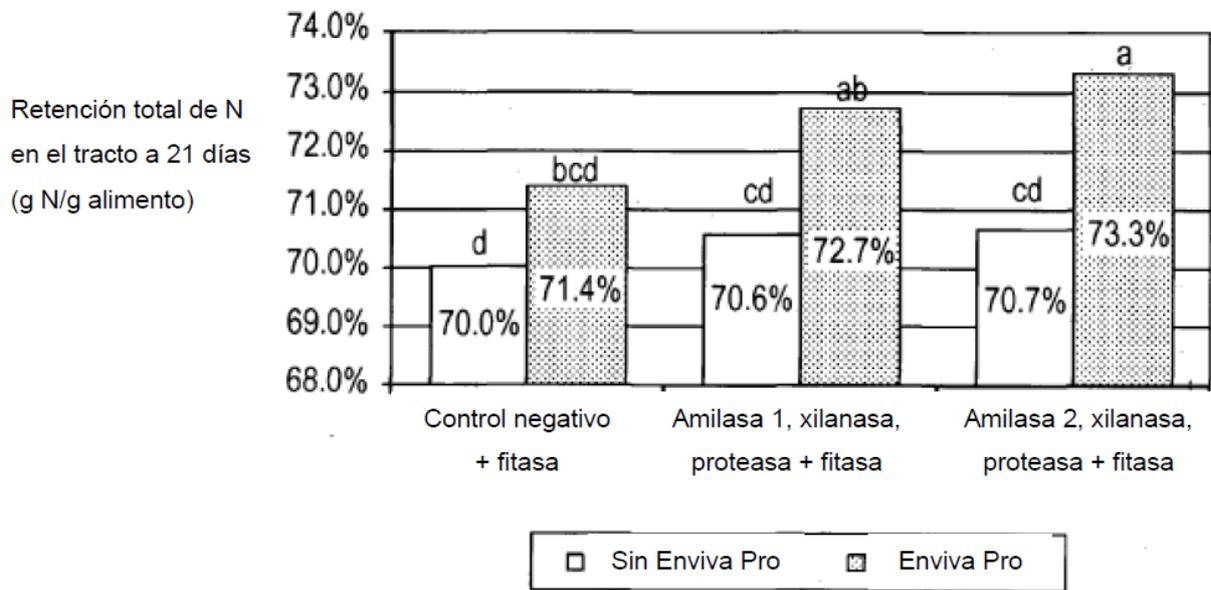


FIG. 9

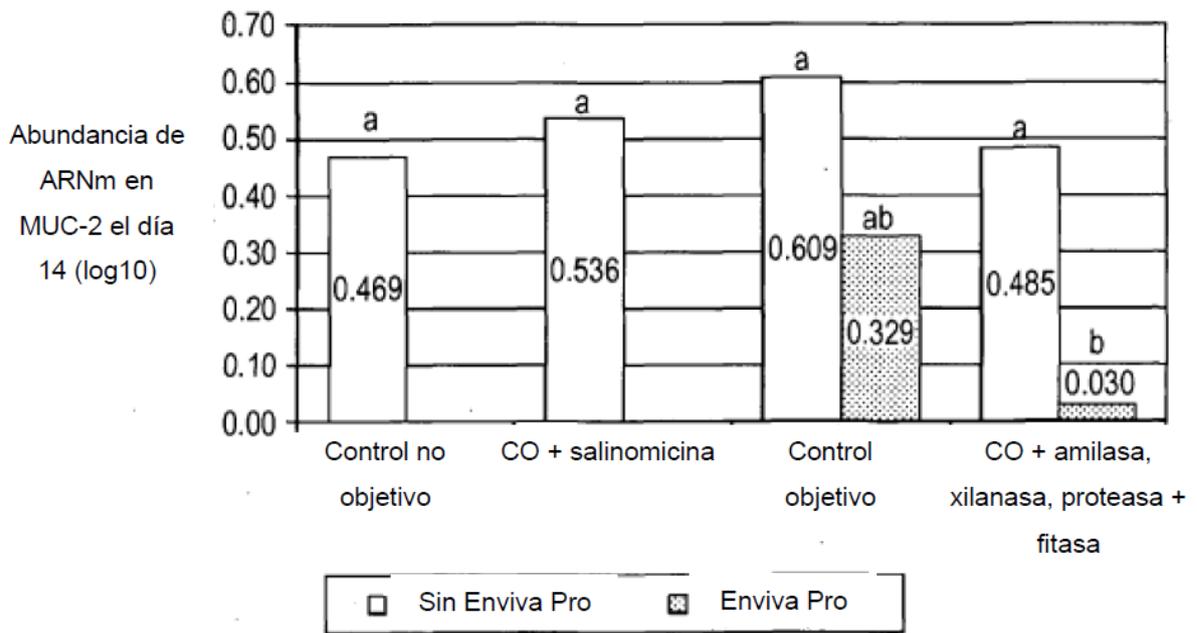


FIG. 10



1 MKLRYALPLL LQLSLPVLSA DTAAWRSRTI YFALTDRIAR GSGDTGGSAC GNLGDYCGGT 60  
 61 FQGLESKLDY IKGMGFDAIW ITPVVTSDDG GYHGYWAEDI DSINSHYGSA DDLKSLVNAA 120  
 121 HSKGFYMMVD VVANHMGYAN ISDDSPSPLN QASSYHPECD IDYNNQTSVE NCWISGLPDL 180  
 181 NTQSSTIRSL YQDWVSNLVS TYGFDGVRID TVKHVEQDYW PGFVNATGVY CIGEVFDGDP 240  
 241 NYLLPYASLM PGLLNyaiyy PMTRFFLQQG SSQDMVNMHD QIGSMFPDPT ALGTFVDNHD 300  
 301 NPRFLSIKND TALLKNALTY TILSRGIPIV YYGTEQAFSG GNDPANREDL WRSGFNAQSD 360  
 361 MYDAISKLTy AKHAVGGLAD NDHKHLYVAD TAYAFSRAGG NMVALTTNSG SGSSAQHCFCG 420  
 421 TQVPNGRWQN VFDEGNGPTY SADGNGQLCL NVSNGQPIVL LSS

FIG. 13

atgaagctccggtacgctctcccgtgctcttgacgctctctttgccggtcctctccgcagacaccgc  
 cgctggaggtcccgcaccatctactttgccctgacagaccgcatcgctcgtggaagcggtgacacgg  
 ggggcagtgcggtgtgggaacctgggggactactgcggtggcacggtccagggcttgagagcaagttg  
 gactacatcaagggcatgggattcgatgccatctggatcacacctgttgtagcagagtgatggggg  
 ctaccatggctattgggcgaggacatcgactccatcaactctcattatggctctgcgggacgatctca  
 agagtctcgtcaacgccgcgcatagcaagggcttctatatgatggtggacgctcgtggccaaccacatg  
 ggctacgccaatatctctgacgatagtcctctccactgaaccaggcctcgtcgtatcaccccgagtg  
 tgatatcgactacaacaaccaaccagcgtcgagaactgctggatcagcggcctcccgatctcaaca  
 cgcagagctcaaccatccgcagcctctaccaggactgggtctccaacctcgtgtccacgtacggcttc  
 gacggcgtccgcatcgacaccgtcaagcacgctcgagcaagactactggcccggcttcgtcaacgccac  
 cggcgtctactgcatcggcgaggtctttgacggagacccaaactacctgctgccctacgccagcctca  
 tgccgggctgctcaactacgccatctactaccccatgacgcgcttcttctccagcagggctcctcg  
 caggacatggtcaacatgcacgaccagatcggcagcatggtccccgaccgaccgcgctcggcacctt  
 tgtcgacaaccacgacaaccgcgcttctctgagcatcaagaacgacacggcctcgtcaagaacgcgc  
 tgacgtacaccatcctctcgcgggcatccccatcgtctactacggcaccgagcaggccttctcgggc  
 ggcaacgaccggccaacagggaggacctctggcgcagcggcttcaacgcccagtcggacatgtacga  
 cgccatctccaagctcacctacgccaagcacgccgctcggcggcctcgccgacaacgaccacaagcacc  
 tgtacgtcgccgacacggcctacgccttcagccgcgccggcggaacatggtggccctgaccaccaac  
 agcggcagcgggagctcggcccagcactgcttcggcacgcaggtgcccaacggccgctggcagaatgt  
 ctttgacgagggcaatgggcccagctattccgccgacggcaacggccagctttgcttgaatgtgtcca  
 acggtcagcccattgtcttctgtcttctcgtga

FIG. 14

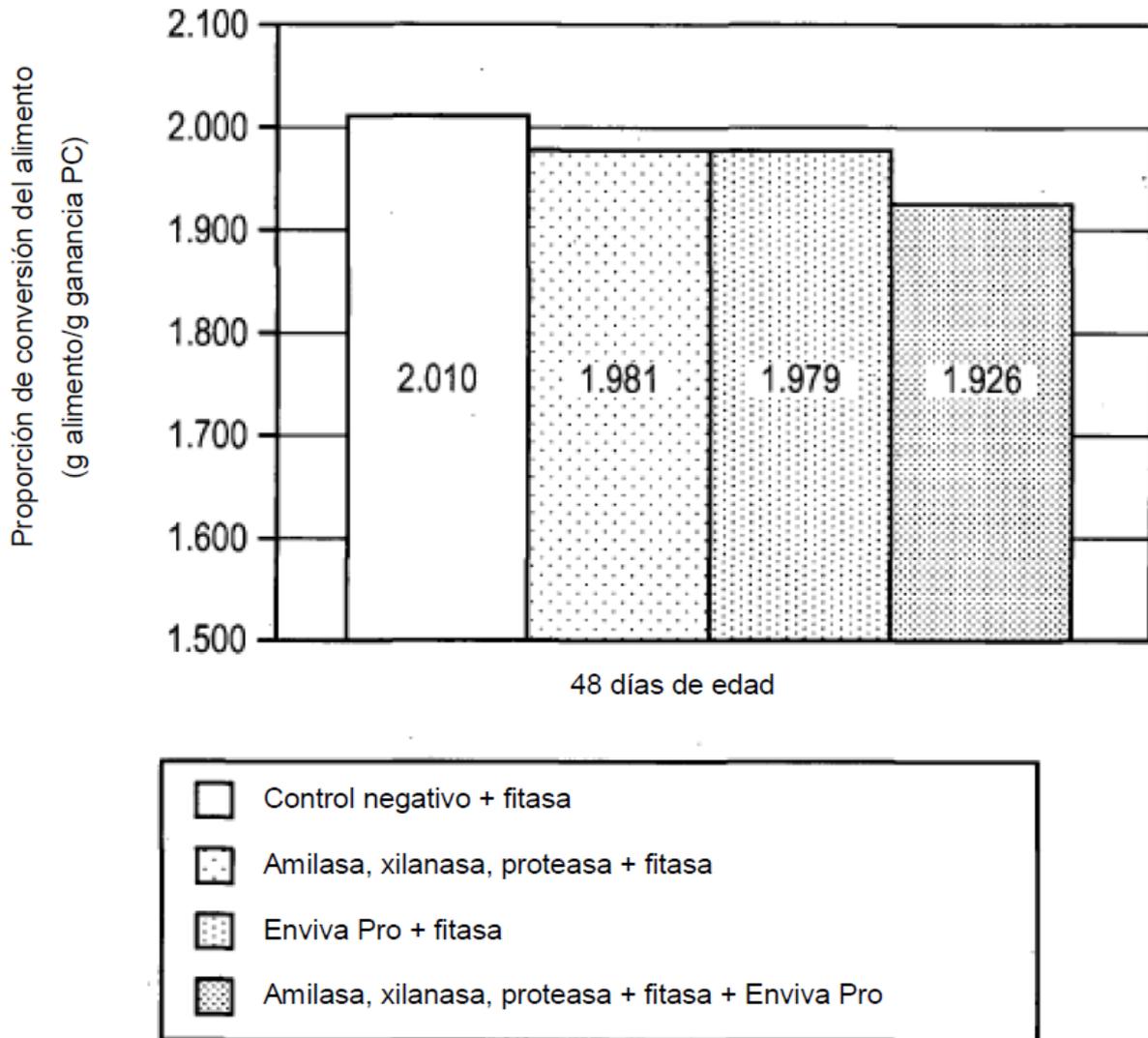


FIG. 15

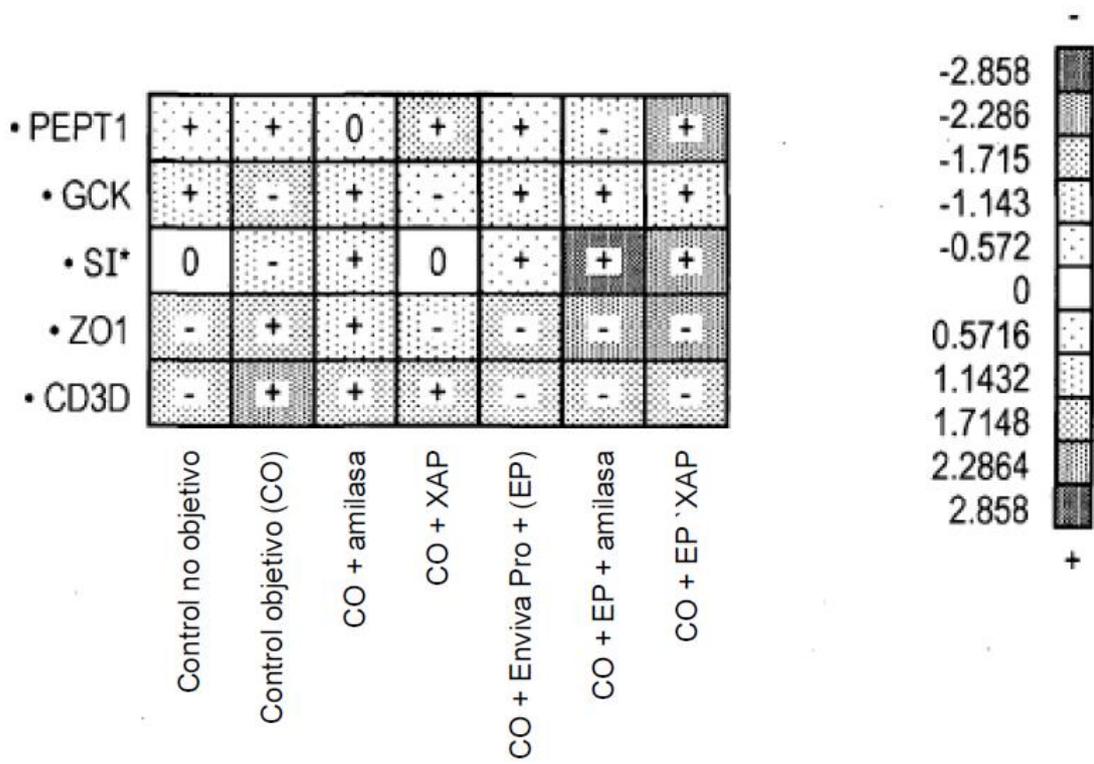


FIG. 16

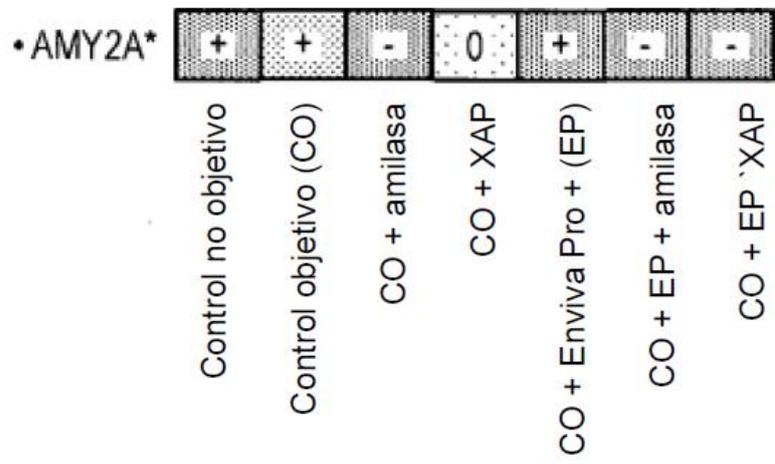


FIG. 17

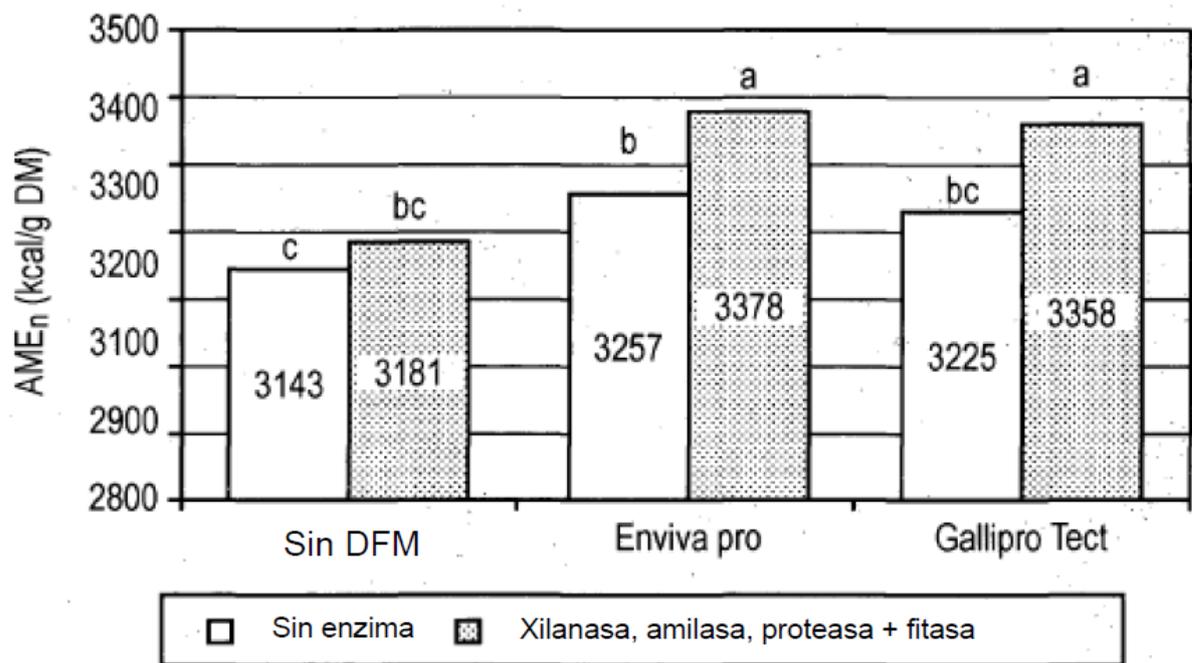


FIG. 18

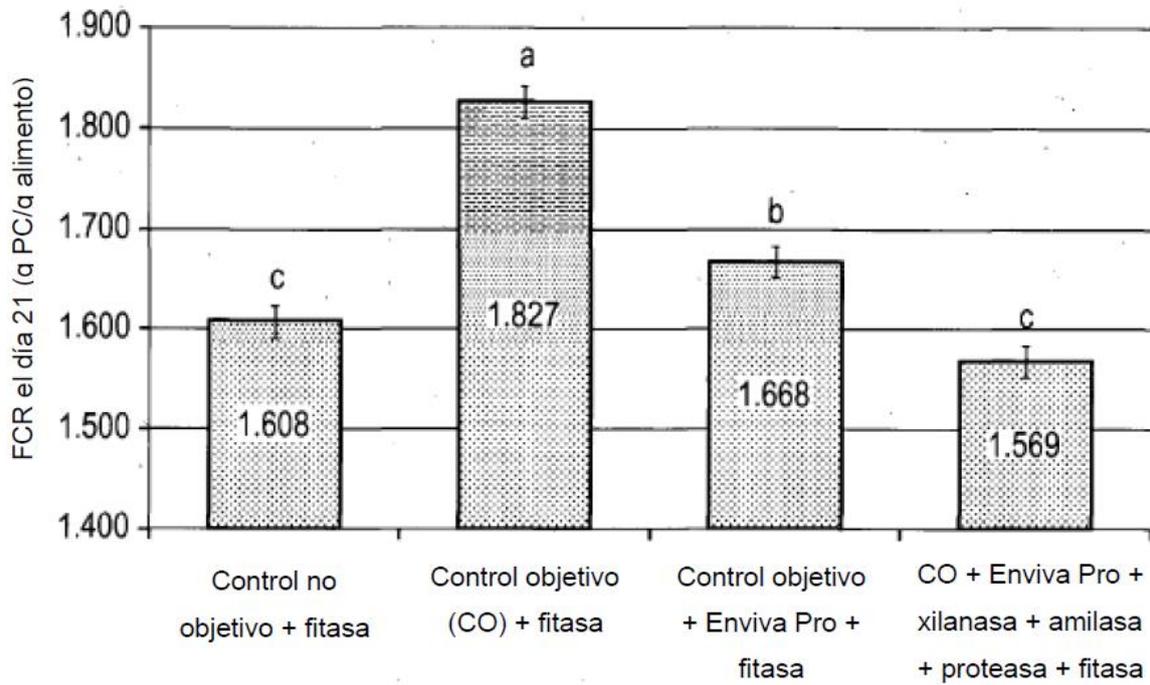


FIG. 19

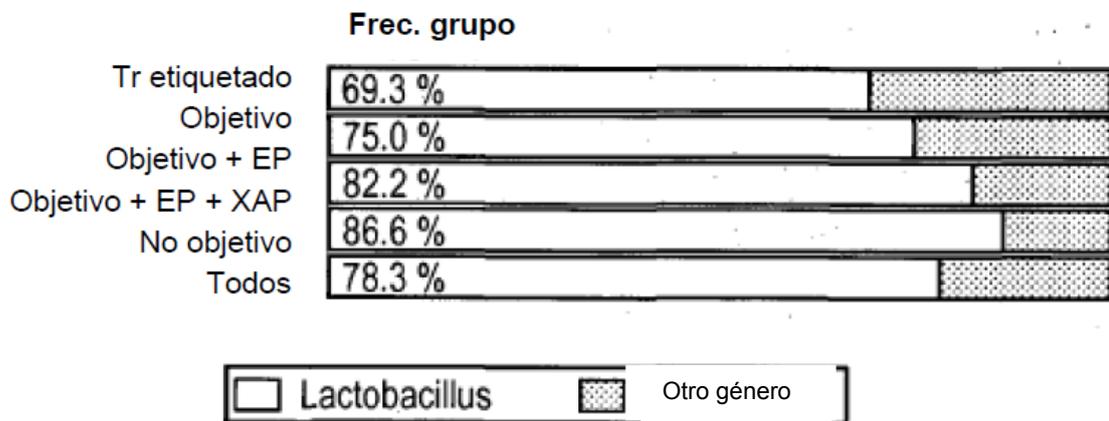


FIG. 20