

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 036**

51 Int. Cl.:

A23K 40/20	(2006.01)	A61K 38/46	(2006.01)
A23K 20/168	(2006.01)		
A23K 20/189	(2006.01)		
A23K 10/14	(2006.01)		
A23K 50/75	(2006.01)		
A23K 50/80	(2006.01)		
A23K 50/60	(2006.01)		
A23K 40/25	(2006.01)		
A23K 50/30	(2006.01)		
C12N 9/16	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2013 PCT/CN2013/000004**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13102430**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2013 E 13733582 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2800476**

54 Título: **Procedimiento de alimentación**

30 Prioridad:

05.01.2012 GB 201200132
09.02.2012 US 201261596944 P
06.03.2012 GB 201203868
22.06.2012 GB 201211169
22.06.2012 GB 201211168
22.06.2012 GB 201211170
22.06.2012 GB 201211167
22.06.2012 GB 201211166

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GILBERT, CEINWEN;
PLUMSTEAD, PETER;
HAGEN, KLAUS SCHULZE;
FROUEL, STÉPHANE;
PERON, ALEXANDRE;
WU, GUANGBING y
YU, SHUKUN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 736 036 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

Procedimiento de alimentación

Campo técnico

5 La invención se refiere a un procedimiento de alimentación de un animal, en particular un animal monogástrico, animal no monogástrico, animal rumiante o animal acuático y está definido estrictamente por las reivindicaciones.

En particular la invención se refiere a un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en uno o más de dichas características biofísicas del animal cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* o una fitasa de *E. coli*.

10 La invención además se refiere al uso de fitasa en los alimentos para animales y se describen procedimientos de producción de tales alimentos para animales.

Antecedentes

15 Para un óptimo crecimiento y mejora en otras características biofísicas, los animales deben obtener una nutrición adecuada, minerales y vitaminas. El uso de agentes activos, tales como enzimas, en alimentos y alimentos para animales es común para ayudar a lograr este objetivo.

Se sabe que las enzimas mejoran la digestibilidad de los alimentos o los alimentos para animales, reducen los factores antinutricionales en los alimentos y los alimentos para animales, y mejoran la productividad de los animales.

20 Cuando se comparan con las mezclas de alimentos para animales secos, los pellets de alimento tienen propiedades que son preferidas en la industria, tales como mejor calidad de alimento, disminución de patógenos, menores niveles de polvo durante la fabricación, buena manipulación y una dosificación de ingredientes más uniforme.

Algunos componentes esenciales de la alimentación están ausentes, presentes en niveles reducidos o presentes solo en forma inactiva o inaccesible en los alimentos naturales y fabricados.

25 El ácido fítico (y su sal de fitato) es el principal compuesto de almacenamiento de fósforo de la mayoría de las semillas y los cereales (Zhou, JR y Erdman, JW, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1995, Vol. 35, Issue 6, pp 495-508). El fósforo en la forma de ácido fítico o fitato es poco digerido por animales tales como los animales monogástricos. El ácido fítico tiene una gran capacidad para quelar iones metálicos, especialmente zinc, calcio, cobre y hierro. Esta unión produce sales insolubles que se absorben deficientemente en el tracto gastrointestinal, lo que da como resultado una biodisponibilidad deficiente de los minerales (Zhou y Erdman, como anteriormente y Sebastian, S. y otros, World's Aves de corral Science Journal., 1998, Vol,54, pp 27-47).

30 Además de los iones metálicos quelantes, está bien establecido que en el intervalo de pH ácido el fitato interactúa con las proteínas de la dieta, lo que lleva a la formación de agregados y precipitados de fitato-proteína, que tienen menor accesibilidad a las proteasas, lo que posiblemente produzca una digestión de proteínas ineficiente (Knuckles, B. E. Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on in vitro protein digestibility. J. Food Sci. 1985, 50, 1080-1082; Konietzny, U.; Greiner, R. Phytic acid and nutritional impact. In Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, second edition; Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. M., Eds; Elsevier Science: Amsterdam, 2003: vol. 7, pp 4546-4563; Kies, A. K.; De Jonge, L. H. ; Kemme, P. A.; Jongbloed, A. W. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 1753-1758; Vaintraub, I. A.; Bulmaga, V. P. Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases. J. Agric. Food Chem. 1991, 39, 859-861; Carnovale, E.; Lugaro, E.; Lombardi-Boccia, G. Ácido fítico in Faba bean and pea: effect on protein availability. Cereal Chem. 1988, 65, 114-117; A. J. Cowieson, V. Ravindranand P. H. Selle Influence of Dietary Ácido fítico and Source of Microbial Fitasa on Ileal Endogenous Amino Acid Flows in Broiler. Poult Sci. 2008. 87, 2287-2299)

45 Las enzimas fitasa, tal como por ejemplo, la 6-fitasa BP17 derivada de *Buttiauxella sp.*, se añaden a los alimentos y alimentos para animales para aumentar el mineral y, en particular, la disponibilidad de fosfato y, por lo tanto, aumentar el valor nutricional del producto. También se ha demostrado que las enzimas de fitasa añadidas a los alimentos y alimentos para animales aumentan la cantidad de aminoácidos y energía digerida y absorbida de la dieta (Ravindran et al., J. Poult. Sci. 1999 Vol. 78 págs. 699-706). Además, las fitasas añadidas al alimento para animales pueden reducir la contaminación por fosfato en el ambiente (Oh, B. C., et al., Appl. Microbiol Biotechnol, 2004, Vol. 63, pp 362-372). El documento WO2010/122532 divulga un procedimiento para alimentar a un animal con un suplemento alimenticio que comprende una fitasa de *Buttiauxella sp.* (BP-17) en combinación con una lipasa para mejorar la tasa de crecimiento de los animales.

50 Los documentos EP0619369 y US5554399 divulgan composiciones de enzimas que comprenden una fitasa y una fosfatasa ácida y e uso de la composición de enzima en alimentos, alimentos para animales en pellet y forraje.

El documento WO2004071218 describe el aumento del contenido de minerales en un alimento. El documento WO2004071218 divulga una preparación que comprende una fitasa activa, un fitato y un catión esencial. El documento

WO2004071218 divulga que la preparación se puede añadir a cualquier producto de comida o bebida para consumo humano o condimentos tales como polvo de curry.

El procesamiento de alimentos o alimentos para animales, por ejemplo bajo calor y alta presión, puede desnaturalizar la fitasa y reducir su actividad.

5 Se conocen fitasas con estabilidad térmica mejorada.

Se sabe que algunos animales, tales como los animales monogástricos, no contienen o contienen cantidades insignificantes de fitasa endógena en el estómago ni en el intestino delgado y, por lo tanto, dependen la fitasa vegetal y/o microbiana o fúngica suplementaria para la hidrolización del ácido fítico en el tracto digestivo proximal. (Pallauf, J. and Rimbach, G. Arch. Anim. Nutr., 1997, Vol,50, pp 301-319). Se puede añadir fitasa adicional a los alimentos para animales tales como animales monogástricos.

10

La presente invención busca superar algunos de los problemas asociados con las características biofísicas deficientes en los animales, especialmente debido a la inaccesibilidad o falta de nutrientes, minerales y vitaminas, especialmente fosfato, especialmente debido al ácido fítico/fitatos.

La presente invención busca además superar los problemas asociados con las propiedades antinutricionales del ácido fítico que llevan a una disponibilidad mejorada de nutrientes, minerales, vitaminas y energía y, por consiguiente, características biofísicas mejoradas de los animales.

15

La presente invención se describirá a continuación. Para facilitar la referencia, se han descrito elementos de la presente invención en uno o más títulos. Cabe señalar que las enseñanzas de cada uno de los títulos también se aplican a las enseñanzas de los otros títulos.

20 **Sumario de la invención**

En un aspecto, se proporciona un procedimiento de alimentación de un animal, tal como un animal monogástrico, animal no monogástrico, animal rumiante o animal acuático, con un alimento, donde dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal cuando se compara con el uso equivalente de una fitasa de *Peniophora lycii* o una fitasa de *E. coli*, en el que dichas mejoras de dichas características biofísicas del animal comprenden un aumento de la ganancia de peso, en el que el aumento de la ganancia de peso es al menos 2% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales, además en el que dicha fitasa es o se puede obtener a partir de o es derivable de la especie *Buttiauxella*

25

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento como se describió anteriormente en el que dicha fitasa produce una mejora de dichas características biofísicas del animal como una fuente de alimentos.

30

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento como se describió anteriormente en el que la mejora de dichas características biofísicas del animal comprenden una mejora adicional en una o más de peso corporal; masa; porcentaje de grasa corporal; altura; distribución de la grasa corporal; crecimiento; tasa de crecimiento; tamaño del huevo; peso del huevo; masa del huevo; tasa de puesta de huevos; absorción de minerales; excreción mineral, retención mineral; densidad ósea; resistencia ósea; tasa de conversión de los alimentos para animales; retención y/o secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio; retención o absorción de aminoácidos; mineralización y mineralización ósea.

35

En un aspecto adicional, se proporcionan usos de un alimento para animales que comprende fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal cuando se compara con el uso equivalente de una *Peniophora lycii* o una fitasa de *E. coli*.

40

Las enzimas de fitasa, tales como BP17 (SEQ ID NO: 1) se añaden al alimento para animales para aumentar la disponibilidad del fosfato, de este modo aumenta el valor nutricional del producto. La presente descripción proporciona procedimientos y usos para la fitasa en los alimentos para animales. En un aspecto preferido la fitasa usada es BP17.

Las mejoras en la disponibilidad de nutrientes, fosfato y minerales obtenidos con la fitasa añadida son dependientes entre otros de las características biofísicas y químicas de la dieta, el tipo y la edad del animal que consume el alimento para animales y la fuente, tipo y concentración de la fitasa usada.

45

La mejora obtenida en la disponibilidad de nutrientes, fosfato y minerales al añadir fitasa al alimento para animales aumenta con la concentración de fitasa activa presente en el alimento consumido por el animal. Cuando se compara la mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal en comparación con los animales que se han alimentado o involucrado en un procedimiento de alimentación que comprende fitasa de diferentes fuentes de fitasa, como fitasa de *Peniophora lycii* o una fitasa de *E. coli*, esto se debe realizar usando concentraciones de fitasa equivalentes, determinadas utilizando la misma metodología analítica, así como utilizando dietas y animales equivalentes.

50

En un aspecto particular, la presente invención demuestra que si se añade BP17 u otras fitasas, medidas según lo

determinado por el procedimiento de análisis especificado, al alimento para animales, esto produce una mejora en una o más de las características biofísicas de dicho animal cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* o una fitasa de *E. coli*.

Algunas ventajas

5 La presente invención permite que las características biofísicas de animales, tales como animales mono-gástricos, animales no mono-gástricos, animales rumiantes o animales acuáticos, experimenten una mejora. En particular, la invención permite que muchos tipos de animales experimenten una mejora en sus características biofísicas a través de un procedimiento de alimentación. Este procedimiento se puede aplicar en el corral normal u otro ambiente comercial de cría de animales, y también en una pequeña propiedad o ambiente doméstico. No es necesario ningún laboratorio.

10 En particular la presente invención se refiere a una mejora en dichas características biofísicas del animal como fuente de alimento. Esto permite criar animales más valiosos, sin grandes costos para el agricultor o el propietario. Además, el bienestar y la salud de los animales alimentados de acuerdo con los procedimientos descritos pueden mejorar.

15 La presente invención también demuestra que la eficacia en algunas especies animales entre diferentes fitasas puede ser altamente variable. Esto puede permitir que se seleccionen fitasas más efectivas para alimentar a diferentes especies, de este modo se benefician los animales por un aumento de la nutrición y se benefician los propietarios por un costo y desperdicio potencialmente reducidos.

Descripción de las figuras

La presente invención se describirá con referencia a las siguientes Figuras:

20 La Figura 1 muestra una representación gráfica de los resultados de la Digestibilidad de aminoácidos ileal (%) en pollos de engorde a los 21 días de edad (también mostrado en la Tabla 1.2). Esto demuestra que la fitasa BP17 aumenta la digestibilidad de varios aminoácidos en el pollo de engorde en comparación con el producto de fitasa del competidor.

25 La Figura 2 muestra una representación gráfica de la digestibilidad mineral de un control comparado con 3 alimentos para animales que contienen fitasa.

La Figura 3 muestra una representación gráfica de la ganancia de peso (BWG), ingesta de alimentos, relación de conversión del alimento para animales (FCR) y conversión de calorías de los pollos en varios alimentos para animales con fitasa en comparación con el control.

La Figura 4 muestra una representación gráfica del ensayo de digestibilidad del tracto en pollos.

30 La Figura 5 muestra una representación gráfica de mineralización ósea de un control comparado con pollos en un alimento para animales con fitasa.

La Figura 6 muestra una representación gráfica de la mineralización ósea de pollos en varios alimentos para animales con fitasa en comparación con los controles positivos y negativos.

35 La Figura 7 muestra una representación gráfica de la ganancia de peso (BWG), ingesta de alimentos, relación de conversión del alimento para animales (FCR) y conversión de calorías de los pavos en varias dosis de fitasa en los alimentos para animales en comparación con el control.

La Figura 8 muestra una representación gráfica del ensayo de digestibilidad del tracto y mediciones de mineralización ósea en pavos.

La Figura 9 muestra una representación gráfica del ensayo de digestibilidad de Cu del tracto en pavos.

40 La Figura 10 muestra una representación gráfica del efecto de diferentes dosis de BP17 en ponedoras.

La Figura 11 muestra una representación gráfica del efecto de diferentes dosis de BP17 sobre la retención diaria g/pájaro/día) de nitrógeno (NR), Calcio (Ca), Fósforo (PR) y Sodio (NaR) dietario en ponedoras.

45 La Figura 12 muestra una representación gráfica de los resultados de la tasa de puesta de las gallinas ponedoras alimentadas con alimentos que comprenden niveles variados de BP17, en comparación con los controles positivos y negativos.

La Figura 13 muestra una representación gráfica de los resultados del peso del huevo, ingesta de alimentos y relación de conversión del alimento para animales (FCR) de las gallinas ponedoras de 23 a 26 semanas de edad alimentadas con alimentos que comprenden niveles variados de BP17, en comparación con los controles positivos y negativos.

50 La Figura 14 muestra una representación gráfica de los resultados de la alimentación con varios niveles de fitasa BP17 a lechones destetados.

La Figura 15 muestra una representación gráfica de los resultados de la comparación de fitasa BP17 con fitasa de *E. coli* en pollos de engorde, usando digestibilidad de fósforo y aminoácido ileal, retención de fósforo y digestibilidad de calcio como mediciones del rendimiento.

5 La Figura 16 muestra una representación gráfica de los resultados de la comparación de fitasa BP17 una fitasa de *E. coli* en pollos de engorde usando energía metabolizable aparente como una medición del rendimiento.

La Figura 17 muestra una representación gráfica de los resultados de la comparación de fitasa BP17 con fitasa de *E. coli* en pollos de engorde usando la digestibilidad de nutrientes como una medición del rendimiento.

La Figura 18 muestra una representación gráfica de los resultados de la comparación de fitasa BP17 Phyzyme® XP.

10 La Figura 19 muestra una representación gráfica del efecto de las diferentes fitasas sobre la digestibilidad del fosfato en el Ejemplo 21.

La Figura 20 muestra una representación gráfica de los criterios de calidad del agua a lo largo del Ejemplo 23.

La Figura 21 muestra una representación gráfica de la determinación del pH Optima de la fitasa BP17 en comparación con 3 fuentes de fitasa comerciales diferentes.

15 La Figura 22 muestra una representación gráfica de la actividad de fitasa BP17 a pH diferente, medido por la cantidad de fósforo liberado de fitato de Na en pH variado.

La Figura 23 muestra una representación gráfica de la actividad relativa de fitasa BP17 en la liberación de fósforo a partir de fitato a pH diferente, con actividad de cada fitasa a pH 5,5 ajustado a 100%.

Secuencias

20 SEQ ID NO: 1= BP17, una variante de fitasa que comprende 12 sustituciones de aminoácidos en comparación con la de tipo salvaje (SEQ ID NO:4), que carece de la secuencia señal (SEQ ID NO:5).

SEQ ID NO: 2 = BP11, una variante de fitasa que comprende 11 sustituciones de aminoácidos en comparación con la de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4), que carece de la secuencia señal (SEQ ID NO: 5).

SEQ ID NO: 3 = BP111, una variante de fitasa que comprende 21 sustituciones de aminoácidos en comparación con la de tipo salvaje (SEQ ID NO:4), que carece de la secuencia señal (SEQ ID NO: 5).

25 SEQ ID NO: 4 = fitasa tipo salvaje codificada por la cepa *Buttiauxella sp. P 1-29* depositado bajo el número de acceso NCIMB 41248, que carece de la secuencia señal (SEQ ID NO: 5).

SEQ ID NO: 5 = secuencia señal de la cepa de *Buttiauxella sp. tipo salvaje P 1-29* depositado bajo el número de acceso NCIMB 41248 (SEQ ID NO: 4).

SEQ ID NO:6 = Phyzyme XP.

30 Descripción detallada

Los presentes inventores han hallado de modo sorprendente un procedimiento de alimentación de animal, tal como un animal monogástrico, animal no monogástrico, animal rumiante, o animal acuático, con un alimento para animales, en el que dicho alimento comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* o una fitasa de *E. coli*.

35 Más específicamente, la mejora en dichas características biofísicas del animal es un aumento de la ganancia de peso y uno o más de: peso corporal; masa; altura; crecimiento; tasa de crecimiento; tamaño del huevo; peso del huevo; masa del huevo; tasa de puesta de huevos; absorción de minerales; retención mineral; densidad ósea; resistencia ósea; tasa de conversión del alimento para animales; retención de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio; retención de aminoácido o absorción; mineralización y mineralización ósea.

40 Más específicamente, la mejora en dichas características biofísicas del animal es una disminución en uno cualquiera o más de: porcentaje de grasa corporal; distribución de grasa corporal; excreción mineral, una secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio.

45 Más específicamente, la mejora en dichas características biofísicas del animal es (a) un aumento de la ganancia de peso y uno o más de: peso corporal; masa; altura; crecimiento; tasa de crecimiento; tamaño del huevo; peso del huevo; masa del huevo; tasa de puesta de huevos; absorción de minerales; retención mineral; densidad ósea; resistencia ósea; tasa de conversión del alimento para animales; retención de uno o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio; retención o abasorción de aminoácidos; mineralización y mineralización ósea y/o (b) una disminución en uno cualquiera o más de: porcentaje de grasa corporal; distribución de grasa corporal; excreción mineral, una secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio.

50

Además, los presentes inventores encontraron sorprendentemente que dicha fitasa en particular produce una mejora en las características biofísicas de dicho animal como fuente de alimento.

Definiciones generales

5 Como se usa en la presente, el término "fitasa" se refiere a una enzima (es decir, un polipéptido que tiene actividad de fitasa) que cataliza la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico, que incluyen fitato y ácido fítico, y libera fosfato inorgánico.

Otros aspectos relacionados con el término "fitasa" se presentan en este documento en una sección posterior.

10 Como se usa en la presente, el término "características biofísicas" abarca todas las mediciones de crecimiento, madurez y salud de un animal. El término "características biofísicas" puede ser sinónimo de características digestivas-fisiológicas y/o de rendimiento. Las características biofísicas pueden incluir, pero sin limitación: peso corporal; ganancia de peso; masa; porcentaje de grasa corporal; altura; distribución de la grasa corporal; crecimiento; tasa de crecimiento; tamaño del huevo; peso del huevo; masa del huevo; tasa de puesta de huevos; absorción de minerales; excreción de minerales; retención de minerales; densidad ósea; resistencia ósea; tasa de conversión del alimento para animales (FCR); retención y/o secreción de uno o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio; retención o absorción de aminoácidos; mineralización y mineralización ósea. Las características biofísicas se discuten más adelante.

20 La característica biofísica de un animal "como fuente de alimento" se refiere a las características biofísicas que aumentan el valor del animal como fuente de alimento, particularmente una fuente de alimento humano. Estas características biofísicas pueden mejorar la salud, peso, tamaño, contenido de grasa, tasa de crecimiento, tiempo para alcanzar la madurez, sabor y otras características relacionadas con la facilidad de uso en la producción de alimentos. Además, estas características biofísicas pueden incluir, pero sin limitación, las siguientes: - madurez y salud de un animal. Las características biofísicas pueden incluir, pero sin limitación: peso corporal; ganancia de peso; masa; porcentaje de grasa corporal; altura; distribución de la grasa corporal; crecimiento; tasa de crecimiento; tamaño del huevo; peso del huevo; masa del huevo; tasa de puesta de huevos; absorción de minerales; excreción mineral; retención de minerales; densidad ósea; resistencia ósea; tasa de conversión del alimento para animales; retención y/o secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio; retención o absorción de aminoácidos; mineralización y mineralización ósea. Tal animal con estas características biofísicas mejoradas puede tener un mayor valor como alimento, un mayor valor de mercado, mejor sabor, más valor nutricional y ser utilizado en diferentes procedimientos de cocción.

30 Una "fuente de alimento" puede abarcar cualquier aspecto de un animal tal como carne, proteínas, grasa, pelaje o piel, plumas, leche o huevos.

35 Una "mejora" se refiere a una mejora mejor que la mostrada cuando se compara con el uso equivalente de otros alimentos para animales. Estos otros alimentos pueden no comprender una fitasa o pueden contener otra fitasa, como la fitasa de *Peniophora lycii* o una fitasa de *E. coli*. Tal mejora puede comprender un aumento o disminución de una característica. Por ejemplo, un aumento o disminución de peso, y un aumento o disminución de la retención de minerales.

La mejora en las características biofísicas puede ser al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 12%, al menos 15%, al menos 20% o al menos 30%. En algunas realizaciones la mejora puede ser al menos 50% o al menos 100% o al menos 150%.

40 El porcentaje de mejora en las características biofísicas puede ser en un aspecto en comparación con el uso de un alimento para animales que no comprende una fitasa. En otro aspecto el porcentaje de mejora en las características biofísicas puede ser en comparación con otra fitasa, especialmente fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli*.

45 El término "ganancia de peso" incluye ganancia de peso corporal, ganancia de peso de cualquier corte de carne, ganancia de peso de patas y extremidades, un aumento de peso de proteína, un aumento de peso de grasa y un aumento de peso del hueso.

El aumento de la ganancia de peso es al menos 2%, puede ser al menos 3%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 12%, al menos 15%, al menos 20% o al menos 30%. En algunas realizaciones la mejora puede ser al menos 50% o al menos 100%.

50 El aumento en la ganancia de peso puede ser con respecto a un control en el que el alimento para animales usado no comprende una fitasa. En otro aspecto, el aumento en de la ganancia de peso puede ser con respecto al uso de un alimento que comprende otra fitasa, especialmente la fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli*.

55 Como se usa en la presente, el término "termoestable" se refiere a la capacidad de una enzima para retener la actividad después de la exposición a temperaturas elevadas. Una enzima termoestable tiene una resistencia aumentada contra la descomposición estructural o funcional a temperaturas elevadas. La frase "termoestabilidad aumentada" se refiere a una enzima que es más termoestable y, en algunas realizaciones, más termoestable cuando se compara con una

enzima de tipo salvaje tal como la SEQ ID NO: 4.

Como se usa en la presente, el término "T_m" se refiere a la temperatura de fusión de una enzima como la fitasa.

5 El término "mineralización" abarca la deposición o liberación de minerales. Los minerales se pueden depositar o liberar del cuerpo del animal. Los minerales pueden ser liberados del alimento para animales. Los minerales pueden incluir cualquier mineral necesario en una dieta animal, y pueden incluir calcio, cobre, sodio, fósforo, hierro y nitrógeno.

La termoestabilidad se puede medir utilizando la temperatura de fusión aparente (T_{mapp}).

El término "derivado de" abarca los términos "originado de", "obtenido de", "obtenible de", "aislado de" y "creado a partir de".

10 Los procedimientos de alimentación descritos en la presente pueden implicar cualquier etapa que se pueda usar normalmente en la alimentación de animales. Por ejemplo, los procedimientos pueden comprender mezclar el alimento, incorporar, triturar el alimento, preparar un salvado y añadir suplementos, lípidos, carbohidratos, proteínas, nutrientes, nutrición, vitaminas, minerales y mejoradores del sabor al alimento para animales. El procedimiento de alimentación se puede aplicar a los animales regularmente, diariamente, varias veces al día o de manera irregular.

15 En un aspecto, el procedimiento de alimentación de un animal con un alimento no es un procedimiento de tratamiento o terapia

Fitasa

La presente invención se refiere al uso de una fitasa.

20 Como se usa en la presente, el término "fitasa" significa una proteína o polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico, que incluyen fitato y ácido fítico, y liberar fosfato inorgánico. Algunas fitasas además del fitato son capaces de hidrolizar al menos algunos de los fosfatos de inositol de grados intermedios de fosforilación.

El término "fitasa" puede ser una fitasa o una combinación de fitasas, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 En el presente contexto, el término "fitasa" se refiere a una fitasa exógena suplementada en el alimento para animales, es decir, a una fitasa suplementaria. Sin embargo, la presente invención proporciona la presencia adicional de fitasa endógena. Por lo tanto, expresado alternativamente, para la presente invención, el término "fitasa" significa al menos una fitasa exógena suplementada a la alimentación, es decir, al menos una fitasa suplementaria.

30 Las enzimas de fitasa, tales como por ejemplo la 6-fitasa BP17 derivada de *Buttiauxella sp.*, se añaden a los alimentos y alimentos para animales para aumentar la disponibilidad de fosfato, lo que aumenta el valor nutricional del producto. El procesamiento del alimento o alimentos para animales, por ejemplo bajo calor y alta presión, puede desnaturalizar la fitasa y reducir su actividad.

La fitasa usada en la presente invención es una fitasa de o que se puede obtener o derivar de una especie de *Buttiauxella*, que es adecuada para uso en alimentos o alimentos para animales.

Una fitasa se clasifica como una 6-fitasa (clasificada como E.C. 3.1.3.26) o una 3-fitasa (clasificada como E.C. 3.1.3.8).

35 La fitasa usada en el procedimiento de la invención es una 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26).

Además se describen los siguientes productos comerciales en la siguiente Tabla:

Producto comercial®	Compañía	Tipo de fitasa	Fuente de fitasa
Finase®	ABVista	3-fitasa	<i>Trichoderma reesei</i>
Finase® EC	ABVista	6-fitasa	Gen de <i>E. coli</i> expresado en <i>Trichoderma reesei</i>
Natuphos®	BASF	3-fitasa	<i>Aspergillus Niqer</i>
Natuzyme	Bioproton	fitasa (type not specified)	<i>Trichoderma longibrachiatum/Trichoderma reesei</i>
OPTIPHOS®	Huvepharma AD	6-fitasa	Gen de <i>E. coli</i> expresado en <i>Pichia pastoris</i>

Producto comercial®	Compañía	Tipo de fitasa	Fuente de fitasa
Fitasa sp1002	DSM	3-fitasa	Un gen de consenso expresado en <i>Hansenula polymorpha</i>
Quantum®2500D, 5000L	ABVista	6-fitasa	Gen de <i>E. coli</i> expresado en <i>Pichia pastoris</i> o <i>Trichoderma reesei</i>
Ronozyme® Hi-Phos (M/L)	DSM/Novozymes	6-fitasa	Gen de <i>Citrobacter braakii</i> expresado en <i>Aspergillus oryzae</i>
Rovabio® PHY	Adisseo	3-fitasa	<i>Penicillium funiculosum</i>

La fitasa es una fitasa de *Buttiauxella* fitasa, por ejemplo, una fitasa de *Buttiauxella agrestis*; por ejemplo: la enzimas de fitasa descritas en los documentos WO 2006/043178, WO 2008/097619, WO2009/129489, WO2006/038128, WO2008/092901, PCT/US2009/41011 o PCT/IB2010/051 804.

5 En un aspecto, la enzima usada es BP17 o un polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:1 o una variante del mismo, tal como una secuencia de polipéptidos que tiene al menos 70% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 75% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 80% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 85% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 90% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 95% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 96% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 97% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 98% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 99% de identidad con la misma. BP17 es una variante de enzima de una fitasa de *Buttiauxella sp.* y se describe en por ejemplo, el documento WO2008/097619. La secuencia para BP17 (que excluye el péptido señal), que se usa como referencia para la numeración de posición de los aminoácidos en todas partes, se muestra como la SEQ ID No. 1 de la presente solicitud.

15 En una realización muy preferida, la enzima usada es BP17 y se describe en por ejemplo, el documento WO2008/097619. BP17 es una variante de enzima de una fitasa de *Buttiauxella sp.* La secuencia para BP17 (que excluye el péptido señal) se muestra como la SEQ ID No. 1.

20 En un aspecto, la enzima usada es BP11 o un polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:2 o una variante del mismo, tal como una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 75% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 80% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 85% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 90% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 95% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 96% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 97% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 98% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 99% de identidad con la misma. BP11 es una variante de enzima de una fitasa de *Buttiauxella sp.* y se describe en por ejemplo, el documento WO 06/043178. La secuencia para BP11 (que excluye el péptido señal) se muestra como la SEQ ID No. 2.

25 En consecuencia, en otra realización, la enzima usada es BP11 como por ejemplo se describe en el documento WO 06/043178. BP11 se usa actualmente en la producción de bioetanol. La secuencia para BP11 (que excluye el péptido señal) se muestra como la SEQ ID No. 2.

30 En un aspecto, la enzima usada es BP111 o un polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:3 o una variante del mismo, tal como una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 75% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 80% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 85% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 90% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 95% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 96% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 97% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 98% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 99% de identidad con la misma. BP111 es una variante de enzima de una fitasa de *Buttiauxella sp.* y se describe en por ejemplo, el documento WO 2009/129489. La secuencia para BP111 (que excluye el péptido señal) se muestra como la SEQ ID No. 3.

35 En consecuencia en otra realización, la enzima usada es BP111. La secuencia para BP111 (que excluye el péptido señal) se muestra como la SEQ ID No. 3.

40 Todas estas fitasas son variantes de la secuencia tipo salvaje tal como la derivada de la *Buttiauxella sp.* cepa P 1-29 depositada bajo el número de acceso NCIMB 41248, que tiene la secuencia que se muestra como la SEQ ID No. 4.

45 En su forma madura, las enzimas de fitasa detalladas anteriormente carecen de una secuencia señal. La secuencia señal apropiada derivada de *Buttiauxella sp.* cepa P 1-29 depositada bajo el número de acceso NCIMB 41248 se muestra como la SEQ ID No. 5.

En una realización, la fitasa se produce en una célula huésped *Trichoderma*. Como se usa en la presente, el término "*Trichoderma*" o "*Trichoderma* sp" se refiere a cualquier género fúngico previa o actualmente clasificado como *Trichoderma*.

5 Alternativamente la fitasa incluye una fitasa de *E. coli*, por ejemplo la fitasa comercializada bajo el nombre Phyzyme® XP por Danisco Animal Nutrition.

Además se describe una fitasa de *Citrobacter* de, derivada de, obtenida de y/u obtenible de por ejemplo *Citrobacter freundii*, preferiblemente *C. freundii* NCIMB 41247 y sus variantes por ejemplo como se divulga en el documento WO2006/038062 y WO2006/038128 *Citrobacter braakii* ATCC 51113 como se divulga en el documento WO2006/037328 (incorporado en la presente por referencia), así como sus variantes, por ejemplo, como se divulga
10 en el documento WO2007/112739, *Citrobacter amalonaticus*, preferiblemente *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25405 o *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25407 como se divulga en el documento WO2006037327, *Citrobacter gillanii*, preferiblemente *Citrobacter gillanii* DSM 13694 como se divulga en el documento WO2006037327, o *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter werkmanii*, *Citrobacter youngae*, polipéptidos de especies de *Citrobacter* o sus variantes.

15 También se describe una fitasa de, derivada de, obtenida de y/o obtenible de *Hafnia*, por ejemplo de *Hafnia alvei*, tal como la enzima fitasa enseñada en el documento US2008263688, cuya referencia se incorpora en la presente por referencia.

Además se describe una fitasa de, derivada de, obtenida de y/o obtenible de *Aspergillus*, por ejemplo de *Aspergillus oryzae*.

20 También se describe una fitasa de, derivada de, obtenida de y/o obtenible de *Penicillium*, por ejemplo de *Penicillium funiculosum*.

La fitasa está presente en el alimento para animales en una cantidad de al menos 500/kg de alimento para animales, preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 100 FTU/kg a aproximadamente 3000 FTU/kg de alimento para animales, preferiblemente aproximadamente 200 FTU/kg a aproximadamente 2000 FTU/kg de alimento para animales,
25 más preferiblemente aproximadamente 300 FTU/kg de alimento para animales a aproximadamente 1500 FTU/kg de alimento para animales, más preferiblemente aproximadamente 400 FTU/kg de alimento para animales a aproximadamente 1000 FTU/kg de alimento para animales.

En una realización la fitasa está presente en el alimento o materia prima de alimentos para animales en más de aproximadamente 100 FTU/kg de alimento para animales, adecuadamente 200 FTU/kg de alimento para animales,
30 adecuadamente más de aproximadamente 300 FTU/kg de alimento para animales, adecuadamente más de aproximadamente 400 FTU/kg de alimento para animales.

En una realización la fitasa está presente en el alimento o materia prima de alimentos para animales en menos de aproximadamente 2000 FTU/kg de alimento para animales, adecuadamente menos de aproximadamente 1500 FTU/kg de alimento para animales, adecuadamente menos de aproximadamente 1000 FTU/kg de alimento para
35 animales.

En una realización, la fitasa está presente en la composición aditiva del alimento para animales en el intervalo de aproximadamente 40 FTU/g a aproximadamente 100.000 FTU/g de composición, más preferiblemente aproximadamente 100 FTU/g a aproximadamente 50.000 FTU/g de composición, más preferiblemente aproximadamente 150 FTU/g a aproximadamente 40.000 FTU/g de composición, más preferiblemente
40 aproximadamente 40 FTU/g a aproximadamente 40.000 FTU/g de composición, más preferiblemente aproximadamente 80 FTU/g de composición a aproximadamente 20.000 FTU/g de composición, e incluso más preferiblemente aproximadamente 100 FTU/g de composición a aproximadamente 10.000 FTU/g de composición, e incluso más preferiblemente aproximadamente 200 FTU/g de composición a aproximadamente 10.000 FTU/g de composición.

45 En una realización la fitasa está presente en la composición aditiva del alimento para animales a más de aproximadamente 40 FTU/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 60 FTU/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 100 FTU/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 125 FTU/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 150 FTU/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 200 FTU/g de composición.

50 En una realización la fitasa está presente en la composición aditiva del alimento para animales en menos de aproximadamente 40.000 FTU/g de composición, adecuadamente menos de aproximadamente 20.000 FTU/g de composición, adecuadamente menos de aproximadamente 15.000 FTU/g de composición, adecuadamente menos de aproximadamente 10.000 FTU/g de composición.

55 Se entenderá que, como se usa en la presente una unidad de fitasa (FTU) se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de fósforo inorgánico/min desde 0.00015 mol/L de fitato de sodio a pH 5,5 a 37 grados C (Denbow, L. M., V. Ravindran, E. T. Kornegay, Z. Yi, and R. M. Hulet. 1995. Improving fósforo availability in soybean meal for

broilers by supplemental phytase. Poult. Sci,74:1831-1842).

Preferiblemente, las fitasas usadas en la presente tienen una alta relación de actividad de fitasa entre pH 2,5 y 5,5 en comparación con las fitasas fúngicas conocidas y las fitasas de *E. coli*.

5 En una realización adecuadamente la enzima se clasifica usando la clasificación E.C. anterior y la clasificación E.C. designa una enzima que tiene esta actividad cuando se analiza en el ensayo descrito en la presente para determinar 1 FTU.

10 La cantidad de unidades de Fitasa añadidas a los alimentos o alimentos para animales dependerá de la composición del alimento o alimentos para animales mismos. Los alimentos y alimentos para animales que contienen cantidades más bajas de fósforo disponible generalmente requerirán cantidades más altas de actividad de fitasa. La cantidad de fitasa requerida puede ser determinada por la persona experta.

En una realización, la fitasa está en solución o en forma líquida. En una realización preferida, la fitasa está en una formulación líquida que comprende agua, sorbitol, cloruro de sodio (NaCl), sorbato de potasio (K-sorbato) y benzoato de sodio, y opcionalmente sólidos de fermentación no activos.

En otra realización, la fitasa está en estado sólido.

15 En una realización adicional, la fitasa se seca por aspersión sobre un soporte sólido.

En otra realización, la fitasa se incorpora en un gránulo tal como un gránulo multicapas.

20 En una realización, la fitasa es termoestable, estable al pH, tolerante al pH bajo, tolerante al pH alto, resistente a la pepsina o muestra una exoespecificidad exo aumentada o disminuida, o una combinación de estas propiedades. La fitasa usada en la invención puede mostrar propiedades diferentes en comparación con una fitasa de tipo salvaje, particularmente la fitasa de tipo salvaje de la que se derivó.

Los usos y procedimientos de la invención se comparan con la fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli*.

25 Como se usa en la presente, el término "actividad de fitasa se retiene" y "retiene la actividad de fitasa" se refiere a la cantidad de actividad enzimática de una fitasa. Esto puede ser después de uno o más de los siguientes tratamientos durante la granulación de alimentos o alimentos para animales: calentamiento, aumento de la presión, aumento del pH, disminución del pH, almacenamiento, secado, exposición a tensioactivos, exposición a disolventes y estrés mecánico.

Pellet y granulación

30 Como se usa en la presente, los términos "pellet" y "granulación" se refieren, por ejemplo, a comprimidos o pellet sólidos, redondeados, esféricos y cilíndricos y los procesos para formar tales formas sólidas, en particular pellets para alimentos para animales y alimentos para animales extrudidos, sólidos. Los pellets pueden comprender gránulos y/o gránulos multicapa o fitasa líquida para aplicar después del proceso de granulación de alimentos para animales.

35 Los procesos de fabricación conocidos de granulación de alimentos y alimentos para animales generalmente incluyen mezclar los ingredientes de alimentos o alimentos para animales durante aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente, transferir la mezcla resultante a un recipiente de sobrecarga, transportar la mezcla a un acondicionador de vapor, opcionalmente transferir la mezcla acondicionada al vapor a un expansor, transferir la mezcla al molino de pellets o extrusor, y finalmente transferir los pellets a un enfriador de pellets (Fairfield, D. 1994. Chapter 10, Pelleting Cost Center. In Feed Manufacturing Technology IV. (McElhiney, editor), American Feed Industry Association, Arlington, Va., pp. 110-139).

40 Los pellets usados en los procedimientos de la presente invención se producen típicamente mediante un procedimiento en el que la temperatura de una mezcla de alimentos para animales se eleva a un nivel alto para matar bacterias. La temperatura a menudo se eleva mediante tratamiento con vapor antes del granulación, un proceso conocido como acondicionamiento. Posteriormente, la mezcla de alimentos para animales acondicionada se pasa a través de un troquel para producir pellets de un tamaño particular. La mezcla de alimento se prepara mediante la mezcla de gránulos y/o gránulos de múltiples capas descrita en la presente con alimento alimentos o alimentos para animales como se describe en la presente. Los pellets pueden comprender las enzimas mencionadas en la presente. Específicamente al menos una enzima (es decir, fitasa) mencionada en la presente.

50 El acondicionador de vapor trata la mezcla durante aproximadamente 20 a aproximadamente 90 segundos, y hasta varios minutos, a aproximadamente 85°C a aproximadamente 95°C. Los términos "acondicionamiento" y "acondicionamiento con vapor", como se usa en la presente, se refieren a esta etapa en el proceso de fabricación de pellets. La cantidad de vapor puede variar de acuerdo con la cantidad de humedad y la temperatura inicial de la mezcla de alimento o alimento para animales. Se ha informado de aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de vapor añadido en los procesos de granulación, y la cantidad se selecciona para producir menos de aproximadamente 18% de humedad en la pasta antes de la granulación, o hasta aproximadamente 28% de humedad en la pasta destinada a la extrusión.

Los términos "acondicionamiento de vapor", "tratamiento de vapor" y "vapor" se usan en la presente de forma indistinta.

Se lleva a cabo un proceso de expansión opcional durante aproximadamente 4 a aproximadamente 10 segundos en un intervalo de temperatura de aproximadamente 100°C a aproximadamente 140°C. La porción de molino de pellets del proceso de fabricación funciona típicamente durante aproximadamente 3 a aproximadamente 5 segundos a una temperatura de aproximadamente 85°C a aproximadamente 95°C.

Las "mezclas sin granular" se refieren a premezclas o precursores, mezclas de bases, pasta y diluyentes para pellets. Las premezclas normalmente contienen vitaminas y minerales traza. Las mezclas básicas normalmente contienen ingredientes de alimentos y alimentos para animales, tal como fosfato dicálcico, piedra caliza, sal y una premezcla de vitaminas y minerales, pero no ingredientes de granos y proteínas. Los diluyentes incluyen, pero sin limitación, granos (por ejemplo, harinillas de trigo y salvado de arroz) y arcillas, tales como filosilicatos (el silicato de magnesio, sepiolita, bentonita, caolín, montmorilonita, hectorita, saponita, beidelita, attapulgita y estevenita). Las arcillas también funcionan como portadores y agentes fluidificantes, o diluyentes, para premezclas de alimentos y alimentos para animales. El puré típicamente comprende una dieta animal completa. Por ejemplo, el puré comprende o consiste en maíz, harina de soja, aceite de soja, sal, DL metionina, piedra caliza, fosfato dicálcico y vitaminas y minerales. En un ejemplo, el puré consiste en 61,10% de maíz, 31,43% de harina de soja 48, 4% de aceite de soja, 0,40% de sal, 0,20% de metionina DL, 1,16% de piedra caliza, 1,46% de fosfato dicálcico y 0,25% de vitaminas y minerales.

En una realización, un alimento o un alimento para animales para uso en la invención se produce mediante la mezcla de al menos un ingrediente del alimento o alimento para animales (tal como un puré) con una fitasa en solución, acondicionamiento con vapor de la mezcla resultante seguido de granulación de la mezcla.

En una realización, un alimento o un alimento para animales para uso en la invención se produce mediante la mezcla de al menos un ingrediente del alimento o alimento para animales (tal como un puré) con una fitasa en estado sólido (tal como en un gránulo multicapas), acondicionamiento con vapor de la mezcla resultante seguido de granulación de la mezcla.

En una realización, el alimento o alimento para animales para uso en la invención está en forma de pellets, gránulos, harina, pasta, líquido, forma húmeda, cápsula o forma de spray.

Como se usa en la presente, el término "pellets de alimento o alimentos para animales tratados con calor" se refiere a las mezclas no granuladas que se someten a un tratamiento térmico (tal como, acondicionamiento con vapor) a una temperatura de al menos 90°C durante al menos 30 segundos (tal como, 30 segundos a 90°C y/o 30 segundos a 95°C). La mezcla posteriormente se extrude, por ejemplo, para formar los pellets de alimentos para animales. Por ejemplo, la mezcla se acondiciona con vapor durante 30 segundos a 90°C. En otro ejemplo, la mezcla se acondiciona con vapor durante 30 segundos a 95°C.

En un aspecto, un alimento para animales de la presente invención comprende una composición de alimento para animales granulada tratada con vapor que comprende un gránulo que comprende un núcleo y uno o más revestimientos. El núcleo puede ser un gránulo de sal o similar sobre el que se puede haber pulverizado una solución de enzima para formar una capa sobre el mismo. El núcleo comprende uno o más compuestos activos, tales como al menos la fitasa de la presente invención. Al menos uno de los revestimientos puede ser un recubrimiento de barrera de humedad. En algunas realizaciones, al menos uno de los revestimientos comprende una sal. Para ciertas realizaciones, los gránulos tienen un tamaño de aproximadamente 210 a 390 mm. En algunas realizaciones, los gránulos pueden tener un tamaño de hasta 450 mm o más o un tamaño de hasta 500 mm o más. Se pueden encontrar ejemplos de tal realización en los documentos WO 2006/034710, WO 00/01793, WO 99/32595, WO 2007/044968, WO 00/47060, WO 03/059086, WO 03/059087, WO 2006/053564 y US 2003/0054511.

Una sal preferida para el revestimiento de los pellet es uno o más de los descriptos en el documento WO2006/034710. Los ejemplos de las sales preferidas para revestir los pellets incluyen una o más de: Na₂SO₄ NaCl, Na₂CO₃, NaNO₃, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, KNO₃, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ y citrato de sodio o sus mezclas. Para algunos aspectos, los ejemplos de las sales más preferidas para revestir los pellets incluyen uno o más sulfatos, tales como uno o más Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ o sus mezclas. En algunos aspectos, los ejemplos de las sales más preferidas para revestir los pellet incluyen uno o más Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, y MgSO₄ o sus mezclas. Para algunos aspectos, una sal preferida para revestir los pellet es o incluye al menos Na₂SO₄.

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo que comprende un núcleo, en el que el núcleo comprende al menos una fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende una barrera de humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos una fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende una sal que es capaz de actuar como una barrera de humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo

puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

5 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos una fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más de Na₂SO₄, NaCl, Na₂CO₃, NaNO₃, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, KNO₃, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ y citrato de sodio o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

10 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos una fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más sulfatos, tal como uno o más Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

15 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos una fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más de Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, y MgSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

20 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos una fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos es o incluye al menos Na₂SO₄. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

25 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo que comprende un núcleo, en el que el núcleo comprende al menos la fitasa BP17 de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende una barrera de humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

30 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos la fitasa BP17 de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende una sal que es capaz de actuar como una barrera de humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

35 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos la fitasa BP17 de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más de Na₂SO₄, NaCl, Na₂CO₃, NaNO₃, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, KNO₃, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ y citrato de sodio o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

40 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos la fitasa BP17 de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más sulfatos, tal como uno o más Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

45 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos la fitasa BP17 de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más de Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, y MgSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

50 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos la fitasa BP17 de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos es o incluye al menos Na₂SO₄. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

55 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP17 o un polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:1 o una variante del mismo, tal como una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 75% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 80% de identidad con la misma,

preferiblemente que tiene al menos 85% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 90% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 95% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 96% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 97% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 98% de identidad con la misma, preferiblemente que tiene al menos 99% de identidad con la misma.

5

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo que comprende un núcleo, en el que el núcleo comprende al menos BP11 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende a barrera de humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

10

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP11 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende una sal que es capaz de actuar como una barrera de humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

15

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP11 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más de Na₂SO₄, NaCl, Na₂CO₃, NaNO₃, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, KNO₃, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ y citrato de sodio o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

20

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos la BP11 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más sulfatos, tal como uno o más Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

25

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP11 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más de Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, y MgSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

30

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP11 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos es o incluye al menos Na₂SO₄. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

35

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo que comprende un núcleo, en el que el núcleo comprende al menos BP111 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende a barrera de humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

40

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP111 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende una sal que es capaz de actuar como a barrera de humedad. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

45

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP111 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más de Na₂SO₄ NaCl, Na₂CO₃, NaNO₃, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, KNO₃, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ y citrato de sodio o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

50

En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP111 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más sulfatos, tal como uno o más Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

55

5 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP111 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos comprende uno o más de Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, y MgSO₄ o sus mezclas. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

10 En ciertos aspectos el alimento para animales de la presente invención comprende un gránulo, en el que el gránulo comprende un núcleo que comprende al menos BP111 fitasa de acuerdo con la presente invención, y en el que el núcleo está revestido con uno o más revestimientos, en el que al menos uno de los revestimientos es o incluye al menos Na₂SO₄. El gránulo puede ser un gránulo tratado con vapor. El gránulo puede ser un gránulo granulado tratado con vapor.

Para ciertas realizaciones, los gránulos tienen un tamaño de aproximadamente 210 a 390 mm. Los ejemplos de tales realizaciones se pueden hallar en los documentos WO 2006/034710, WO 00/01793, WO 99/32595, WO 2007/044968, WO 00/47060, WO 03/059086, WO 03/059087, WO 2006/053564 y US 2003/0054511.

15 Una sal preferida para revestimiento de los pellets es una o más de las descritas en el documento WO2006/034710. Los ejemplos de las sales preferidas para revestir los pellet incluyen uno o más de: Na₂SO₄ NaCl, Na₂CO₃, NaNO₃, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, KNO₃, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ y citrato de sodio o sus mezclas. Para algunos aspectos, los ejemplos de las sales más preferidas para revestir los pellets incluyen uno o más sulfatos, tal como uno o más Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄, KHSO₄, MgSO₄, ZnSO₄ o sus mezclas. Para algunos aspectos, los ejemplos de las sales más preferidas para revestir los pellets incluyen uno o más de Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, y MgSO₄ o sus mezclas. Para algunos aspectos, una sal preferida para revestir los pellets es o incluye al menos Na₂SO₄.

20 En la presente también se describe un procedimiento para fabricar una composición de alimentos para animales. En un aspecto, este procedimiento comprende las etapas de: i. mezcla de los componentes del alimento para animales con gránulos que comprenden un núcleo y un revestimiento en el que el núcleo comprende un compuesto activo, tal como una enzima que incluye fitasa, y el revestimiento comprende una sal, ii. Tratamiento con vapor de dicha composición (i), y iii. granulación de dicha composición (ii).

Alimento y alimento para animales

30 Un "alimento para animales" y un "alimento", respectivamente, significa cualquier dieta, comida natural o artificial o similares o componentes de tales comidas destinadas o adecuadas para ser comida, tomada, digerida, por un animal y un ser humano, respectivamente.

Como se usa en la presente, el término "alimento" se usa en sentido amplio - y abarca alimentos y productos alimenticios para seres humanos así como alimentos para animales (es decir, un alimento para animales). El término "productos alimenticios" abarca cualquier ingrediente que se puede usar para el alimento.

35 El término "alimento para animales" se usa con referencia a productos para alimentar a los animales en la cría de ganado. El término " alimento para animales" puede abarcar un alimento para animales por se o una composición de alimento para animales o un componente de la misma. Los términos "alimento para animales" y "alimento de animal" se usan indistintamente. En una realización preferida, el alimento o el alimento para animales es para el consumo de animales tales como animales monogástricos, animales no monogástricos, animales rumiantes o animales acuáticos, por ejemplo, porcinos (por ejemplo, cerdos), aves de corral (por ejemplo, pavo, pollo, pato), ganado vacuno y peces. 40 En una realización más preferida, los alimentos o alimentos para animales son para el consumo de pollos, pavos, cerdos, vacas o peces. El término "producto alimenticio" abarca cualquier ingrediente que se puede usar para para alimento para animales.

45 En una realización preferida, el alimento o alimento para animales es para el consumo de animales monogástricos. En otra realización preferida, el alimento o alimento para animales es para el consumo de animales monogástricos tales como animales rumiantes o no rumiantes.

50 En una realización preferida, los animales no monogástricos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: rumiantes de la subfamilia de Bovinae incluyen bisonte, yak, vacunos, vacas, búfalos, bovinos, ganado, buey, novillos, nilgó, y animales productoras de carne y leche; Rumiantes de Bos taurus y Bos Indicus, tales como vacas, toros, novillos, ganado de carne, ganado lechero y terneros; rumiantes de la subfamilia Cervidae que incluyen, ciervos, renos, antílopes, alces, ciervos canadienses y muntjac; o los rumiantes de la subfamilia de Caprinae, que incluyen ovejas, cabras, corderos, gamuzas y antilope americano; o no rumiantes, tales como jirafa, o no rumiantes, tales como Equus o especies equinas tales como caballo, burro y mula; o no rumiantes tales como Camelidae que incluyen llama, alpaca y camello.

55 En otra realización preferida, el alimento o alimento para animales es para el consumo por animales acuáticos tales como - por ejemplo - peces, peces agástricos, peces gástricos, peces de agua dulce, peces marinos y camarones y otros crustáceos.

En otra realización preferida, el alimento o alimento para animales es para consumo de animales monogástricos tales como - por ejemplo - cerdos, aves de corral tales como patos, pollos y pavos, perros, gatos y seres humanos.

5 El alimento o alimento para animales puede estar en la forma de una solución o como un sólido, de acuerdo con el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración. En algunas realizaciones, las enzimas mencionadas en la presente se pueden usar como - o en la preparación o producción de - una sustancia de alimento o alimento para animales.

10 Como se usa en la presente el término "ingrediente del alimento o alimento para animales" incluye una formulación, que es o se puede añadir a alimentos o productos alimenticios e incluye formulaciones que se pueden usar a bajos niveles en una amplia variedad de productos. El ingrediente alimenticio puede estar en forma de una solución o como un sólido, de acuerdo con el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración. Las enzimas descritas en la presente se pueden usar como un ingrediente del alimento o alimento para animales o en la preparación o producción. Las enzimas pueden ser, o se puede añadir a, suplementos alimenticios.

15 Las composiciones de alimentos para animales tales como animales monogástricos, animales no monogástricos, animales rumiantes y animales acuáticos incluyen típicamente composiciones que comprenden productos vegetales que contienen fitato. Tales composiciones incluyen harina de maíz, harina de soja, harina de colza, harina de semilla de algodón, maíz, trigo, cebada y alimentos a base de sorgo. La fitasa puede ser, o se puede añadir a, sustancias y composiciones de los alimentos o alimentos para animales.

En una realización, el alimento o alimento para animales es un líquido tal como un alimento para animales líquido.

En otra realización, el alimento o alimento para animales es un sólido.

20 En otra realización, el alimento para animales es un alimento para animales para aves de corral (alimento para aves de corral).

En una realización, el alimento para animales es alimento para animales para pollos (alimentos para pollos).

En otra realización, el alimento para animales es alimento para animales para pavos (alimentos para pavos).

En otra realización, el alimento para animales es alimento para animales para patos (alimentos para patos).

25 En una realización, el alimento para animales es alimento para animales para cerdos (alimento para cerdos).

El alimento o alimento para animales puede comprender proteínas vegetales. Las proteínas vegetales se pueden derivar de legumbres, semillas oleaginosas, nueces y cereales. Los ejemplos de fuentes de proteínas vegetales incluyen, pero sin limitación, plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Poaceae*, *Cruciferaeae*, y *Chenopodiaceae*.

30 Las fuentes adecuadas de proteínas vegetales son las frijoles de soja, harina de soja, cereales (tales como maíz, trigo, avena, cebada, centeno y sorgo), harinas de cereales (tal como harina de maíz, harina de trigo, harina de avena, harina de cebada, harina de centeno, harina de sorgo y harina de canola, salvados (tal como salvado de trigo y salvado de avena), semillas oleaginosas (tales como semillas de colza y girasol), harina de semillas oleaginosas (tales como harina de colza), harina de semilla de algodón, repollo, remolacha y remolacha azucarera. Estas proteínas vegetales son ejemplos de ingredientes alimentarios e ingredientes de los alimentos para animales.

35 El alimento o alimento para animales puede comprender proteínas animales. Las proteínas animales adecuadas incluyen, pero sin limitación, harina de pescado y suero. Estas proteínas animales son ejemplos de ingredientes alimentarios e ingredientes de los alimentos para animales.

40 El alimento o alimento para animales pueden comprender aditivos. Los aditivos adecuados incluyen, pero sin limitación, inhibidores de enzimas, vitaminas, minerales traza, macro minerales, agentes colorantes, compuestos aromáticos y péptidos antimicrobianos. Estos aditivos son ejemplos de ingredientes alimentarios e ingredientes de los alimentos para animales.

El alimento o alimento para animales o sus ingredientes pueden ser un líquido.

45 El alimento o alimento para animales o sus ingredientes pueden ser un sólido. Los ejemplos incluyen harina de maíz, trigo o soja.

50 Como se usa en la presente, el término "digestibilidad" se refiere a la capacidad de un animal para absorber o retener la nutrición de un alimento o alimento para animales en lugar de excretarlo. La palabra "nutrición" en este contexto puede incluir minerales, grasas, lípidos, vitaminas, proteínas, aminoácidos, carbohidratos y almidones. Una medida de la digestibilidad es la cantidad de cualquier aspecto de la nutrición que retiene el animal en lugar de excretarlo. Esto se puede expresar como un porcentaje

Animales

Como se usa en la presente, el término "animal" incluye todos los animales monogástricos, animales no monogástricos, todos los animales rumiantes y todos los animal acuáticos.

5 Los ejemplos de animales incluyen animales monogástricos tales como cerdos, aves de corral tales como patos, pollos y pavos, perros, gatos y seres humanos.

Cuando el animal es un pollo, puede ser cualquier tipo o raza de pollo. En realizaciones preferidas, el pollo es un pollo de engorde o ponedora o un pavipollo. Los términos "pollo" y "gallina" se usan indistintamente en la presente.

Cuando el animal es un pavo, puede ser cualquier tipo o raza de pavo. Por ejemplo, el pavo puede ser un pavipollo.

10 Cuando el animal es un cerdo, puede ser cualquier tipo o raza de cerdo. En realizaciones preferidas, el porcino es un cerdo, lechón, cerda, puercos o un cerdo de engorde-finalización.

15 Como se usa en la presente, el término "animal" incluye todos los animales monogástricos. En realizaciones preferidas los animales no monogástricos incluyen, pero sin limitación, los siguientes:- rumiantes de la subfamilia de Bovinae incluyen bisonte, Yak, vacunos, vacas, búfalos, bovinos, ganado, buey, novillos, nilgó, y animales productoras de carne y leche; Rumiantes de Bos taurus y Bos Indicus, tales como vacas, toros, novillos, ganado de carne, ganado lechero y terneros; rumiantes de la subfamilia Cervidae que incluyen, ciervos, renos, antílopes, alces, ciervos canadienses y muntjac; o los rumiantes de la subfamilia de Caprinae, que incluyen ovejas, cabras, corderos, gamuzas y antílope americano; o no rumiantes, tales como jirafa, o no rumiantes, tales como Equus o especies equinas tales como caballo, burro y mula; o no rumiantes tales como Camelidae que incluyen llama, alpaca y camello.

Un animal puede ser un animal no monogástrico y también un animal rumiante.

20 Los términos "no mono-gástrico", "no monogástrico" y "no mono gástrico" se usan de forma indistinta en la presente.

Los términos "mono-gástrico" y "monogástrico" se usan de forma indistinta en la presente.

Como se usa en la presente, el término "animal" incluye todos los animales acuáticos.

25 Los ejemplos de animales acuáticos incluyen camarones y otros crustáceos, por ejemplo camarones peneidos: camarón tigre negro *Peneaus monodon*, camarón blanco *Penaeus vananamei*. Otros ejemplos de animales acuáticos incluyen todos los peces. Todos los peces incluyen peces de agua dulce, peces gástricos que incluyen todas las especies de tilapia (por ejemplo, *Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus*) y todas las especies de pez gato (por ejemplo, *Pangasus spp* y el pez gato americano *Ictalurus punctatus*). Todos los peces también incluyen peces agástricos, que incluyen todas las especies de carpa (por ejemplo, carpa común *Cyprinus carpio* y carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella*), salmónidos (por ejemplo, salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón del Pacífico (*Oncorhynchus spp*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y todos los peces marinos (por ejemplo, familias de anguilas, lubinas y besugos).

30

Nucleótidos y polipéptidos

35 Como se usa en la presente, el término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y cualquier estructura tridimensional y de cadena simple o cadena múltiple (por ejemplo, cadena simple, cadena doble triple hélice, etc.), que contienen desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o análogos o formas modificadas de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, que incluyen los nucleótidos o bases modificados o sus análogos. Debido a que el código genético está degenerado, se puede usar más de un codón para codificar un aminoácido particular, y la presente descripción abarca polinucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos particular. Se puede usar cualquier tipo de nucleótido modificado o análogo de nucleótido, siempre que el polinucleótido retenga la funcionalidad deseada en las condiciones de uso, que incluyen las modificaciones que aumentan la resistencia a la nucleasa (por ejemplo, desoxi, 2'-O-Me, fosforotioatos, etc). Las etiquetas también se pueden incorporar con fines de detección o captura, por ejemplo, etiquetas o anclajes radioactivos o no radioactivos, por ejemplo, biotina. El término polinucleótido también incluye ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los polinucleótidos pueden ser naturales o no naturales. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" y "oligonucleótido" y "secuencia de nucleótidos" se usan en la presente de manera intercambiable. Los polinucleótidos de la descripción pueden contener ARN, ADN, o ambos, y/o formas modificadas y/o análogos de los mismos. Una secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Uno o más enlaces fosfodiéster se pueden reemplazar por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)O', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R y R' es de modo independiente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o aralquilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. Los polinucleótidos pueden ser lineales o circulares o comprender una combinación de porción lineal y circular.

50

Como se usa en la presente, "polipéptido" se refiere a cualquier composición que comprende o está compuesto de

aminoácidos y es reconocida como una proteína por los expertos en la técnica. El código convencional de una letra o de tres letras para los residuos de aminoácidos se usa en la presente. Los términos "polipéptido" y "proteína" y "secuencia de aminoácidos" se usan de manera intercambiable en la presente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcación. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Enzimas

El término "enzima", como se usa en la presente, se refiere a una proteína que cataliza las reacciones químicas de otras sustancias sin que se destruya o se altere después de completar las reacciones.

La enzima puede ser de tipo salvaje, que es una enzima presente en la naturaleza, o una variante. Una "variante" es una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una o varias inserciones, supresiones y/o sustituciones en comparación con la secuencia progenitora de la cual se deriva la variante, tal como una enzima de tipo salvaje o incluso una enzima variante, y que retiene una propiedad funcional y/o mejora una propiedad, por ejemplo, una actividad potenciada de la enzima. Como se usa en la presente, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". Una variante e enzima también se puede denominar enzima modificada o alterada.

El término "enzima activa", como se usa en la presente, se refiere a una enzima que retiene su función catalítica. Por ejemplo, la fitasa es capaz de catalizar la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico.

El término "enzima inactiva" se refiere a la enzima que está presente en una muestra pero es incapaz de realizar su función catalítica. La inactivación puede ocurrir debido a la desnaturalización, agregación, desamidación u oxidación de la enzima, debido al tratamiento térmico o debido al tratamiento químico o procesamiento por otra enzima, tal como la proteólisis por una proteasa. La inactivación también se puede deber a un inhibidor químico. En el caso de que la enzima sea fitasa, tal como por ejemplo, fitasa BP17, un inhibidor que se puede usar es el hexasulfato de mioinositol (MIHS). La inactivación puede ser completa, lo que significa que no hay actividad enzimática, o parcial en la que queda algo de actividad residual.

Como se usa en la presente, un "vector" se refiere a una secuencia de polinucleótidos diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos de células. Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores de lanzadera, plásmidos, partículas de fagos, casetes y similares.

Como se usa en la presente, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido sobre la base de la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción. La expresión puede implicar el uso de un organismo huésped para producir el polipéptido. Un organismo huésped, también denominado simplemente un huésped, puede incluir procariotas y eucariotas, y en algunas realizaciones puede incluir especies bacterianas y fúngicas.

Como se usa en la presente, "vector de expresión" se refiere a un constructo de ADN que contiene una secuencia codificadora de ADN (por ejemplo, una secuencia de genes) que está operativamente unida a una o más secuencias de control adecuadas capaces de afectar la expresión de la secuencia codificadora en un huésped. Dichas secuencias de control incluyen un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia de operador opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica los sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago o simplemente un potencial inserto genómico. Una vez transformado en un huésped adecuado, el vector se puede replicar y funcionar independientemente del genoma huésped, o, en algunos casos, se puede integrar en el propio genoma. El plásmido es la forma de vector de expresión más comúnmente usada. Sin embargo, la descripción está destinada a incluir otras formas de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que son, o se conocen, en la técnica.

Un "promotor" se refiere a una secuencia reguladora que está involucrado en la unión del ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. El promotor puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivo. Un ejemplo no limitante de un promotor inducible que se puede usar es *Trichoderma reesei* cbh1, que es un promotor inducible.

El término "unido operativamente" se refiere a la yuxtaposición en la que los elementos están en una disposición que les permite estar relacionados funcionalmente. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificadora si controla la transcripción de la secuencia codificadora.

"Bajo control transcripcional" es un término bien entendido en la técnica que indica que la transcripción de una secuencia de polinucleótidos depende de que esté unida operativamente a un elemento que contribuye al inicio o promueve la transcripción.

"Bajo control de traducción" es un término bien entendido en la técnica que indica un proceso regulador que se produce después de que se ha formado el ARNm.

5 Un "gen" se refiere a un segmento de ADN que está involucrado en la producción de un polipéptido e incluye regiones que preceden y siguen las regiones codificadoras, así como secuencias intermedias (intrones) entre los segmentos codificadoras individuales (exones).

10 Como se usa en la presente, el término "célula huésped" se refiere a una célula o línea celular en la que un vector de expresión recombinante para la producción de un polipéptido se puede transfectar para la expresión del polipéptido. Las células huésped incluyen la progenie de una célula huésped única, y la progenie no necesariamente puede ser completamente idéntica (en morfología o en el complemento de ADN genómico total) a la célula progenitora original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas o transformadas in vivo con un vector de expresión. "Célula huésped" se refiere tanto a las células como a los protoplastos creados a partir de las células de una cepa de hongo filamentoso y, en particular, una cepa *Trichoderma* sp.

15 El término "recombinante" cuando se usa en referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otra manera se expresan de manera anormal, subexpresan o no se expresa en absoluto.

20 Una "secuencia señal" (también denominada "presecuencia", "péptido señal", "secuencia líder" o "péptido líder") se refiere a una secuencia de aminoácidos unida a la porción N-terminal de una proteína que facilita la secreción de la forma madura de la proteína de la célula (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). La secuencia señal dirige el polipéptido a la vía secretora y se escinde del polipéptido naciente una vez que se transloca en la membrana del retículo endoplásmico. La forma madura de la proteína extracelular (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) carece de la secuencia de señal que se escinde durante el proceso de secreción.

25 El término "marcador selectivo" o "marcador seleccionable" se refiere a un gen capaz de expresión en una célula huésped que permite una fácil selección de estos huéspedes que contienen un ácido nucleico o vector introducido. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero sin limitación, sustancias antimicrobianas (por ejemplo, higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, tal como una ventaja nutricional, en la célula huésped.

El término "cultivo" se refiere al crecimiento de una población de células microbianas en condiciones adecuadas para el crecimiento, en un medio líquido o sólido.

35 El término "heterólogo" en referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que no se produce naturalmente en una célula huésped. En algunas realizaciones, la proteína es una proteína industrial comercialmente importante. Se considera que el término abarca proteínas que están codificadas por genes naturales, genes mutados y/o genes sintéticos. El término "homólogo" en referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que se produce naturalmente en la célula huésped.

40 El término "introducido" en el contexto de la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula incluye "transfección", "transformación" o "transducción" y se refiere a la incorporación de una secuencia de ácido nucleico en una célula eucariótica o procariótica en la que la secuencia de ácido nucleico se puede incorporar en el genoma de la célula (por ejemplo, ADN de cromosoma, plásmido, plástido o mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo o expresarse de forma transitoria.

45 Como se usa en la presente, los términos "transformado", "transformado de manera estable" y "transgénico" se refieren a una célula que tiene una secuencia de ácidos nucleicos no nativa (por ejemplo, heteróloga) integrada en su genoma o como un plásmido episómico que se mantiene a través de múltiples generaciones.

50 Los términos "recuperado", "aislado", "purificado" y "separados" como se usa en la presente se refieren a un material (por ejemplo, una proteína, ácido nucleico o célula) que se retira de al menos un componente con el que está naturalmente asociado. Por ejemplo, estos términos se pueden referir a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado nativo, tal como, por ejemplo, un sistema biológico intacto.

Como se usa en la presente, los términos "modificación" y "alteración" se usan indistintamente y significan cambiar o variar. En el contexto de la modificación o alteración de un polipéptido, estos términos pueden significar cambiar la secuencia de aminoácidos, ya sea directamente o mediante el cambio del ácido nucleico codificador o para cambiar la estructura del polipéptido tal como por glicosilación de la enzima.

55 "NCIMB" se refiere al NCIMB Ltd ubicado en Aberdeen, Escocia (www.NCIMB.com).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular y bioquímica, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1994); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994); y Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (Kriegler, 1990).

A menos que se defina lo contrario en este documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, second ed., John Wiley and Sons, New York (1994), and Hale & Markham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta invención. Cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente se puede usar en la práctica o en el ensayo de la presente invención.

A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi, respectivamente.

Los rangos numéricos proporcionados en la presente incluyen los números que definen el intervalo.

"Un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Identidad de secuencia u homología de secuencia

La presente descripción también abarca el uso de secuencias que tienen un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con secuencias de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica tal polipéptido (de aquí en adelante, "secuencias homólogas"). Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos presentes y las secuencias de nucleótidos presentes. Aquí, el término, el término "homología" se puede equiparar a "identidad".

La secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos homólogas deberían proporcionar y/o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o aumenta la actividad de la enzima.

En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que puede ser al menos 75, 80, 85 o 90% idéntica, en algunas realizaciones al menos 95 o 98% idéntica a la secuencia presente. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc., por ejemplo que la secuencia de aminoácidos presente. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas), en el contexto de la presente descripción, se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

En algunas realizaciones, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que tiene una o varias adiciones, supresiones y/o sustituciones en comparación con la secuencia presente.

En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos está representada en la presente o una proteína derivada de esta proteína (original) por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos o más aminoácidos, como como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína original y que tienen la actividad de la proteína original.

En algunas realizaciones la presente descripción se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos (o gen) que codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos está representada en la presente o codifica una proteína derivada de esta proteína (original) por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, tal como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína original y que tiene la actividad de la proteína original.

En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 75, 80, 85 o 90% idéntica, en algunas realizaciones al menos 95 o 98% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente descripción (la secuencia presente) Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc., como la secuencia presente. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente descripción, se prefiere expresar homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología se pueden realizar a ojo, o más generalmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas de computadora disponibles en el comercio

pueden calcular el% de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología se puede calcular respecto de secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo por vez. Esto se llama un alineamiento "sin brechas". Normalmente, estos alineamientos sin brechas se realizan solo en un número relativamente corto de residuos.

Aunque este es un procedimiento muy simple y consistente, no toma en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o eliminación causará que los siguientes residuos de aminoácidos queden fuera de alineamiento, lo que podría producir gran reducción en el % de homología cuando se realiza un alineamiento global. En consecuencia, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que toman en consideración posibles inserciones y supresiones sin penalizar excesivamente la puntuación de homología global. Esto se logra al insertar "brechas" en el alineamiento de la secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones de brecha" a cada brecha que se produce en el alineamiento, de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencia con la menor cantidad posible de brechas - lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas - obtendrá una puntuación más alta que una con muchas brechas. "Costos de brecha afín" normalmente se utilizan los costos que cobran un costo relativamente alto por la existencia de una brecha y una penalización menor por cada residuo subsiguiente en la brecha. Este es el sistema de puntuación de brechas más comúnmente utilizado. Las penalizaciones de brechas altas producirán, obviamente, alineamientos optimizados con menos brechas. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones de brecha. Sin embargo, se prefiere usar los valores predeterminados cuando se usa dicho software para comparaciones de secuencias.

Por lo tanto, el cálculo del % máximo de homología requiere, en primer lugar, la producción de un alineamiento óptimo, que toma en consideración las penalizaciones de brecha. Un programa de computadora adecuado para llevar a cabo tal alineamiento es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Los ejemplos de software que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete BLAST (ver Ausubel et al 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18), BLAST 2 (see FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov), FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA están disponibles para búsqueda en línea y sin conexión (ver Ausubel et al 1999, páginas 7-58 a 7-60).

Aunque el % de homología final se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineamiento mismo no se basa normalmente en una comparación de pares de todo o nada. En cambio, generalmente se utiliza una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por pares en función de la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz utilizada comúnmente es la matriz BLOSUM62, la matriz predeterminada para el conjunto de programas BLAST. Los programas Vector NTI generalmente usan los valores predeterminados públicos o una tabla de comparación de símbolos a medida si se suministran (ver el manual del usuario para obtener más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores predeterminados para el paquete Vector NTI.

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

Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, por ejemplo, el % de identidad de secuencia. El software normalmente hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En caso de que se utilicen penalizaciones de brecha cuando se determina la identidad de secuencia, los siguientes parámetros se pueden usar para el alineamiento por pares, por ejemplo:

PARA BLAST	
APERTURA DE BRECHA	0
EXTENSIÓN DE BRECHA	0

PARA CLUSTAL	ADN	PROTEÍNA	
TAMAÑO DE PALABRAS	2	1	K triple
PENALIZACIÓN DE BRECHA	15	10	
EXTENSIÓN DE BRECHA	6,66	0,1	

En una realización, CLUSTAL se puede usar con el conjunto de penalización de brecha y extensión de brecha como se definió anteriormente.

5 Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se determina en al menos 20 nucleótidos contiguos, por ejemplo en al menos 30 nucleótidos contiguos, por ejemplo en al menos 40 nucleótidos contiguos, por ejemplo, en al menos 50 nucleótidos contiguos, por ejemplo, en al menos 60 nucleótidos contiguos, por ejemplo, en al menos 100 nucleótidos contiguos.

De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se puede determinar en la secuencia entera.

Variantes/Homólogos/Derivados

10 La presente descripción también abarca el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una proteína o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína.

En la presente, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos presentes y las secuencias de nucleótidos presentes. Aquí, el término "homología" se puede equiparar a "identidad".

15 En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 75, 80, 85 o 90% idéntica, por ejemplo al menos 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia presente. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc., que la secuencia de aminoácidos presente. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente descripción, se prefiere expresar
20 homología en términos de identidad de secuencia.

En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 75, 80, 85 o 90% idéntica, en algunas realizaciones al menos 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de la presente descripción (la secuencia presente) Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc., como la secuencia presente.
25 Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente descripción, se prefiere expresar homología en términos de identidad de secuencia.

Como se discutió anteriormente, las comparaciones de homología se pueden realizar a ojo, o más generalmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles, tanto para secuencias de polipéptidos como nucleótidos.
30

Como se describió anteriormente, el % de homología se puede calcular respecto de las secuencias contiguas.

Los procedimientos de alineamiento más complejos asignan "penalizaciones de brecha" a cada brecha que se produce en el alineamiento, de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencia con la menor cantidad posible de brechas - lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas -
35 obtendrá un puntuación más alta que una con muchas brechas. Se prefiere usar los valores predeterminados cuando se usa dicho software para comparaciones de secuencias. Por ejemplo cuando se usa el paquete de mejor ajuste GCG Wisconsin, la penalización de brecha predeterminada para las secuencias de aminoácidos es -12 para una brecha y -4 para cada extensión.

Por lo tanto, el cálculo del % máximo de homología requiere, en primer lugar, la producción de un alineamiento óptimo, que toma en consideración las penalizaciones de brecha. Un programa de computadora adecuado para llevar a cabo tal alineamiento es el paquete de mejor ajuste GCG Wisconsin (Devereux et al 1984 Nuc. Acids Research 12 p387). Los ejemplos de otros software que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete BLAST (ver Ausubel et al 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18), FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y el conjunto GENWORKS de herramientas de comparación. BLAST y FASTA están
40 disponibles para la búsqueda sin conexión y en línea (ver Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa mejor ajuste GCGt. También está disponible una nueva herramienta, llamada Secuencias BLAST 2 para comparar la secuencia de proteína y nucleótido (ver FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@nc-bi.nlm.nih.gov).

45 Aunque el % de homología final se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineamiento mismo no se basa normalmente en una comparación de pares de todo o nada. En cambio, generalmente se utiliza una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por pares en función de la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz utilizada comúnmente es la matriz BLOSUM62, la matriz predeterminada para el conjunto de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin generalmente usan los valores predeterminados públicos o una tabla de comparación de símbolos a medida si se suministran (ver el manual del
50 usuario para obtener más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores predeterminados públicos

para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz predeterminada, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, el porcentaje de homología se puede calcular usando la función de alineamiento múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basada en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG y Sharp PM (1988), Gene 73 (1), 237-244).

5 Como se describió anteriormente, una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, por ejemplo, el % de identidad de secuencia. El software normalmente hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

10 Las secuencias también pueden tener supresiones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y producen una sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos deliberadas sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre que se mantenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos principales polares no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

15 Se pueden hacer sustituciones conservadoras, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y en algunas realizaciones en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar - no cargado	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

20 La presente descripción también abarca la sustitución homóloga (tanto la sustitución como la sustitución se usan en la presente para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo) que puede ocurrir, es decir, una sustitución de igual a igual, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no homóloga también puede ocurrir, es decir, de una clase de residuo a otra o, alternativamente, que implica la inclusión de aminoácidos no naturales tal como ornitina (de aquí en adelante denominada Z), ornitina del ácido diaminobutírico (de aquí en adelante denominada B), norleucina ornitina (de aquí en adelante denominado O), pirilalanina, tienilalanina, nafilalanina y fenilglicina.

25 Los reemplazos también se pueden realizar por aminoácidos no naturales incluidos; Aminoácidos alfa* y alfa-disustituidos*, N-alquil* aminoácidos, ácido láctico*, derivados haluros de aminoácidos naturales tales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I -fenilalanina*, L-alil-glicina*, β-alanina*, ácido L-α-amino butírico*, ácido L-γ-amino butírico*, ácido L-α-amino isobutírico*, ácido L-ε-amino caproico#, ácido 7-amino heptanoico*, L-metionina sulfona #*, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*, derivados metílicos de fenilalanina (Phe) tal como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)", L-Tyr (metilo)*, L-Phe (4-isopropil)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilo)*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo)*. La notación* se ha utilizado para los fines de la discusión anterior (relacionada con la sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, #* indica características anfipáticas.

30 Las variantes de secuencias de aminoácidos pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se pueden insertar entre dos residuos de aminoácidos cualquiera de la secuencia, que incluyen grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos de glicina o β-alanina. Una forma adicional de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, será bien entendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas, "la forma peptoide" se utiliza para referirse a las variantes de residuos de aminoácidos en los que el grupo sustituyente α-carbono está en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar del α-carbono. Los procesos para preparar péptidos en la forma peptoide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon RJ y col., PNAS (1992) 89 (20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13 (4), 132-134.

45 Las secuencias de nucleótidos para usar en la presente descripción pueden incluir dentro de ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica varios tipos diferentes de modificación de oligonucleótidos. Estos incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente descripción, se debe entender que las secuencias de nucleótidos

descriptas en la presente se pueden modificar mediante cualquier procedimiento disponible en la técnica. Tales modificaciones se pueden llevar a cabo con el fin de mejorar la actividad in vivo o la vida útil de las secuencias de nucleótidos de la presente descripción.

5 La presente descripción también abarca el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias con las secuencias presentadas en este documento, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria con un fragmento de la misma, esa secuencia se puede usar como una sonda para identificar secuencias codificadoras similares en otros organismos, etc.

10 Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente descripción pero que están dentro del alcance de la descripción se pueden obtener de varias maneras. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente se pueden obtener, por ejemplo, mediante la exploración de bibliotecas de ADN obtenidas de una variedad de individuos, por ejemplo, individuos de diferentes poblaciones. Además, se pueden obtener otros homólogos y dichos homólogos y fragmentos de los mismos en general serán capaces de hibridar selectivamente las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Tales secuencias se pueden obtener mediante la exploración de bibliotecas de ADNc obtenidas a partir de bibliotecas de ADN genómico de otras especies animales, y mediante la exploración de dichas bibliotecas con sondas que comprenden la totalidad o parte de cualquiera de las secuencias en los listados de secuencias adjuntos en condiciones de rigurosidad media a alta. Consideraciones similares se aplican a la obtención de homólogos de especies y variantes alélicas de las secuencias de polipéptidos o nucleótidos de la descripción.

20 Las variantes y homólogos de cepa/especie también se pueden obtener usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para dirigirse a secuencias dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente descripción. Las secuencias conservadas se pueden predecir, por ejemplo, mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencia se pueden realizar utilizando un software de computadora conocido en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp es ampliamente utilizado.

25 Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de rigurosidad inferiores a las utilizadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia única frente a secuencias conocidas.

30 Como alternativa, tales polinucleótidos se pueden obtener mediante mutagénesis dirigida de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios de secuencia de codones silenciosos para optimizar las preferencias de codones para una célula huésped particular en la que se están expresando las secuencias de polinucleótidos. Se pueden desear otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

35 Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la descripción se pueden usar para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo, marcados con una marca reveladora por medios convencionales usando marcas radiactivas o no radiactivas, o los polinucleótidos se pueden clonar en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 15, por ejemplo al menos 20, por ejemplo, al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud, y también están abarcados por el término polinucleótidos de la descripción como se usa en la presente.

40 Los polinucleótidos tales como los polinucleótidos de ADN y las sondas de acuerdo con la descripción se pueden producir de forma recombinante, sintética o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También se pueden clonar mediante técnicas estándares.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, que implica una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada, un nucleótido por vez. Las técnicas para lograr esto usando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

45 Los polinucleótidos más largos generalmente se producirán usando medios recombinantes, por ejemplo, usando técnicas de clonación de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores se pueden diseñar para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de modo que el ADN amplificado se puede clonar en un vector de clonación adecuado.

50 La presente descripción también se puede referir al uso de un alimento para animales que comprende una enzima de cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4 o un polipéptido derivado de esta enzima (original) por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o more aminoácidos, tal como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína original y que tiene la actividad de la proteína original.

55 Las enzimas de la presente descripción se usan en alimentos o alimentos para animales, en la preparación de alimentos o alimentos para animales y/o en aditivos de alimentos o alimentos para animales o su preparación. En algunas realizaciones las enzimas de la presente descripción pueden formar una composición con otros ingredientes para alimentos o alimentos para animales o se pueden añadir a una composición de ingredientes del alimento o

alimento para animales. En algunas realizaciones las enzimas de la presente descripción son más termoestables que las enzimas comparativas o similares usada en la producción de alimentos o alimentos para animales.

Utilidad

5 La presente invención proporciona un procedimiento de alimentación de un animal, tal como un animal monogástrico, animal no monogástrico, animal rumiante o animal acuático, con un alimento para animales que produce una mejora de una o más dichas características biofísicas del animal.

Tales propiedades permiten que los procedimientos de esta descripción se utilicen para mejorar la producción de los agricultores y criadores de animales, aumentar la productividad y mejorar el bienestar animal.

10 En particular, los procedimientos de la descripción actual se pueden usar para aumentar la mejora en las características biofísicas de un animal como fuente de alimento.

Esto permite que se produzcan animales que tienen un valor más alto como alimento, un valor de mercado más alto, animales que saben mejor, animales que se pueden usar en diferentes procedimientos de cocción, animales que son más valiosos nutricionalmente. Particularmente como fuente de alimento humano.

La presente invención se describirá ahora a modo de ejemplos.

15 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplos

En los siguientes Ejemplos se usan los siguientes términos de medición.

Términos de medición

20 El término "FCR" significa "relación de conversión del alimento para animales" como se usa en la presente. Esta es una medición de la eficiencia del alimento para animales y se calcula de la siguiente manera: FCR (Relación de conversión del alimento para animales) = FI/BWG, donde FI = ingesta del alimento para animales durante un período de tiempo específico, y BWG = ganancia de peso corporal durante el mismo período. El BWG se calcula mediante la sustracción del peso inicial del animal del peso del animal al final del período de prueba. La relación de conversión alimento para animales es esencialmente la cantidad de kilogramos de alimento para animales que se necesita consumir por kg de ganancia de peso. Esto se calcula tomando la cantidad total de alimento consumido (en kg, ya sea por un período dado o durante todo el estudio) y dividiéndolo por la ganancia de peso corporal (en kg, ya sea por el período dado o durante todo el estudio).

30 La actividad de la enzima fitasa se expresa en FTU/kg de alimento. Una unidad de fitasa (FTU) se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de fósforo inorgánico/min de 0.00015 mol/L de fitato de sodio a pH 5,5 a 37 grados C (Denbow, L. M., V. Ravindran, E. T. Kornegay, Z. Yi, and R. M. Hulet. 1995. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poult. Sci.*,74:1831-1842.

35 El término "AME" significa "energía metabolizable aparente" y es una estimación de la energía disponible en los productos alimenticios. La AME se calcula de la siguiente manera: AME = IE - FE - UE, donde IE = Energía bruta ingerida por el animal, FE es la energía bruta restante en las heces y UE es la energía urinaria (Sibbald, I.R. 1980. *BioScience*, Vol. 30, No. 11, Nov., 1980).

El término "AMEn" se refiere a la energía metabolizable aparente corregida por nitrógeno.

40 La "conversión de calorías" es la cantidad de calorías que el animal consumió por cada kg de ganancia de peso corporal (expresado en kcal/kg). El número se calcula tomando la ingesta de alimento (en kg, ya sea por un período determinado o durante todo el ensayo) y multiplicándola por el contenido de ME en la dieta correspondiente (en kcal/kg), lo que da el número total de calorías consumidas. Esto posteriormente se divide por la ganancia de peso corporal (en kg) para dar la conversión de calorías. La "conversión de calorías" es igual a la AME consumida por el animal durante un período específico/ganancia de peso corporal. La conversión de calorías se utiliza como una medida de la eficiencia de la utilización de la energía del alimento para animales. Cuanto menor sea el número, más eficiente será el animal. Mediante la adición de las enzimas, se obtiene una mejora (reduce) de la conversión de calorías.

45 Los términos "FCE" o "G: F" significan "Eficiencia de conversión del alimento para animales", que es la cantidad de kilogramos de ganancia de peso que se obtiene por kilogramo de alimento consumido. Esto se calcula tomando la ganancia de peso corporal (en kg, ya sea por un período dado o durante todo el período de prueba) y dividiéndolo por la cantidad de alimento consumido (en kg, ya sea por el período dado o durante todo el período de prueba).

50 Los términos "coeficientes de digestibilidad" y "coeficiente de digestibilidad" se usan indistintamente y se calculan mediante la cantidad de un nutriente que se ingiere/la cantidad de ese nutriente que permanece en la digesta (ya sea digestión ileal o digesta fecal). Si el coeficiente de digestibilidad es x 100, también se puede llamar "porcentaje de digestibilidad".

El término "ADG" significa "Ganancia diaria promedio", calculado mediante la división de la ganancia de peso total durante el período de prueba por el número de días.

El término "ADFI" significa "ingesta diaria promedio del alimento para animales", que se calcula mediante la división de la ingesta total de alimento durante el período de prueba por el número de días de la prueba.

- 5 El término "DE" significa "energía digestible". Esto se calcula mediante la multiplicación de la energía de la dieta por la digestibilidad de GE.

El término "GE" significa "Energía Bruta".

El término "CP" significa Proteína bruta.

El término "DM" significa "materia seca".

- 10 El término "AA" significa "aminoácido".

El término "NC" significa "control negativo".

El término "PC" significa "control positivo".

El término "DE" significa "energía digestible", que es la proporción de la energía potencial en alimento para animales que, de hecho, se digiere.

- 15 El término "CP" significa "Proteína bruta".

El término "EAA significa" aminoácidos esenciales". Por ejemplo, en peces estos son arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina.

El término "DCP" significa "fosfato dicálcico" que se puede usar como un suplemento dietético.

- 20 Cuando se hace referencia a los efectos lineales y cuadráticos en los Ejemplos, esto se refiere a si la respuesta al aumento de la dosis de enzima es una línea recta (lineal) o tiene curvatura (efectos cuadráticos).

En los siguientes ejemplos, se estudian las siguientes enzimas:

BP17 – suministrada por Danisco Animal Nutrition

- 25 Fitasa de *Peniophora lycii* (algunas veces denominada como Fitasa R) - suministrada por DSM. Esta fitasa se comercializa bajo la marca Ronozyme® P/Bio-Feed® Phytase/ZY®. La fitasa es una 6-fitasa producida por *Aspergillus oryzae* que porta un gen que codifica la fitasa de *Peniophora lycii*.

Phyzyme® XP (Fitasa de *E. coli*) - suministrada por Danisco Animal Nutrition.

Ensayo de fitasa en alimentos para animales (FTU/kg de alimento para animales)

- 30 La enzima fitasa se extrae del alimento para animales, usando un tampón de acetato de sodio diluido, y el extracto se filtra. Los extractos se incuban a 37°C durante exactamente 5 minutos con una solución de fitato de sodio (sal dodecasódica, de arroz (P3168), Sigma Chemical Company) en tampón de acetato de sodio, que contiene cloruro de calcio y una traza de Tween 20, a 37°C. y pH 5,5, durante 60 minutos. La incubación de la enzima se detiene y el fosfato liberado se determina mediante la adición de un reactivo de molibdo-vanadato, y la absorbancia se mide a 415 nm. Se utiliza una curva de calibración, generada por la incubación de soluciones de dihidrógeno fosfato de potasio de 0 a 4 mM (0 a 4 mmoles/ml) en las mismas condiciones, para calcular la actividad de la fitasa.

- 35 Ejemplo 1: Rendimiento del alimento para animales en pollo de engorde

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de pollos de engorde con los siguientes parámetros: digestibilidad de fosfato, calcio, nitrógeno, aminoácidos, energía y ganancia de peso, ingesta de alimentos, conversión de calorías y relación de conversión del alimento para animales (FCR), como se describió anteriormente.

- 40 1.1 Material y Procedimientos

- 45 192 pollos de engorde machos de un día se asignaron a 4 tratamientos con 6 jaulas replicadas por tratamiento (8 aves/jaula). Las aves se alimentaron con una dieta de control comercial desde los días 0-4, las dietas de tratamiento se proporcionaron desde los días 5-21. La dieta de control positivo se basó en la harina de maíz y soja (48% CP). La dieta de control se formuló para tener una relación Ca:AvP (relación de calcio:Fosfato disponible) de 2,14, mediante la alteración de la inclusión de Ca se alimentó sin suplementar o con suplemento de 500 o 1.000 FTU/kg de alimento BP17 o con 1,850 FTU/kg de alimento de la fitasa *P. lycii* comercial (Phytase R). Todas las dietas se administraron como pasta ad libitum.

El día 21 se recolectaron heces para la determinación de energía metabolizable aparente (AME, como se describió anteriormente), tracto total; digestibilidad de nitrógeno, fósforo y calcio. También en el día 21, todas las aves se sacrificaron y se recolectaron los contenidos ileales para determinar la digestibilidad de los aminoácidos utilizando un marcador dietario inerte (dióxido de titanio).

5

Tabla 1.1 Dieta (kg/tonelada) según se administras

Ingredientes	Control
Maíz	613
Harina de soja 48% CP	342
Aceite de soja	10,1
L-Lisina HCl	3,0
DL-metionina	3,1
L-Treonina	1,2
Sal	3,3
Piedra caliza	8,3
Fosfato dicálcico	9,8
Premezcla de mineral traza/vitamina	3,0
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	0/500/1000
Fitasa de <i>Peniophora lycii</i> (FTU/kg de alimento para animales)	0/1850
Marcador indigerible	3
Análisis calculado	
Proteína bruta (%)	22
Energía metabolizable (MJ/kg)	12,5
Energía metabolizable (kcal/kg)	2990
Calcio (%)	0,60
P total (%)	0,55
Lisina (%)	1,40
Lisina digerible (%)	1,24
Metionina (%)	0,64
Metionina digerible (%)	0,62
Metionina + Cisteína (%)	1,00
Metionina+ cisteína digerible (%)	0,87
Fósforo disponible (%)	0,28
Sodio (%)	0,16
Ca:AvP	2,14

1.2 Resultados

Tabla 1.2: Digestibilidad de aminoácidos ileal (%) a 21 días de edad

	Control	BP17 500FTU	BP17 1.000FTU	Fitasa R 1,850FTU
Treonina	62,6 ^b	74,3 ^a	77,3 ^a	74,0 ^a
Valina	64,1 ^b	77,9 ^a	77,7 ^a	77,9 ^a
Metionina	87,3 ^b	92,3 ^a	93,7 ^a	92,1 ^a

	Control	BP17 500FTU	BP17 1.000FTU	Fitasa R 1,850FTU
Isoleucina	69,4 ^b	80,5 ^a	83,0 ^a	80,8 ^a
Leucina	69,9 ^b	81,1 ^a	83,5 ^a	81,9 ^a
Fenilalanina	71,6 ^b	81,9 ^a	84,3 ^a	82,4 ^a
Histidina	70,3 ^b	81,4 ^a	82,9 ^a	81,4 ^a
Arginina	79,2 ^b	86,4 ^a	90,1 ^a	86,6 ^a
Serina	65,3 ^b	78,2 ^a	81,9 ^a	77,5 ^a
Ácido glutámico	78,6 ^c	85,9 ^b	88,9 ^a	86,3 ^b
Prolina	70,4 ^c	80,0 ^a	82,2 ^a	80,3 ^a
Glicina	62,0 ^c	74,7 ^a	77,6 ^a	74,8 ^a
Tirosina	73,2 ^b	82,0 ^a	84,7 ^a	81,2 ^a
Alanina	67,2 ^b	79,6 ^a	82,0 ^a	80,2 ^a
Lisina	77,2 ^c	85,2 ^a	89,5 ^a	85,8 ^{ab}
Cisteína	51,9 ^c	66,2 ^{ab}	69,3 ^a	62,1 ^b
Ácido aspártico	79,9 ^c	81,4 ^b	85,9 ^a	81,0 ^b
Aminoácidos totales	72,3 ^b	82,0 ^a	84,9 ^a	82,1 ^a

abc Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P <0,05). Solo los valores que no tienen superíndice común son significativamente diferentes. A todos los valores en la misma columna se les asignarán superíndices (a, b, c), pero solo los valores que no tienen superíndice común difieren estadísticamente. Dicho de otra manera, todos los valores que tienen una "a" no son diferentes.t.

1.2.1 Digestibilidad de aminoácidos

Los resultados mostrados en la Tabla 1.2 y la Figura 1 demuestran que la fitasa BP17 aumenta la digestibilidad de varios aminoácidos en pollos de engorde en comparación con el producto de fitasa del competidor. La digestibilidad promedio de los aminoácidos se mejoró en un 13,3% y 17,3% con 500 FTU y 1000 FTU/kg de BP17.

5 1.2.2 Digestibilidad de minerales e hidrólisis de fitato.

Los resultados de la digestibilidad del mineral y la hidrólisis del fitato se muestran en la Tabla 1.3. La fitasa BP17 mejoró la digestibilidad del fosfato en pollos en un 10% en comparación con el control. La digestibilidad del calcio aumenta al menos 11% en comparación con el control y el producto comercial de *P. lycii* cuando se incluye BP17 en la dieta de pollo. La AME mejoró en 90 kcals (2,8%) versus la dieta control.

10 La degradación de fitato aumentó en 86% en comparación con el control y el producto comercial de *P. lycii* cuando se usa BP17 en la dieta de pollo.

1.2.3 Rendimiento

15 Los resultados de la prueba de rendimiento se muestran en la Tabla 1.3. La fitasa BP17 aumentó la ganancia de peso (BWG) de los pollos en 17% en comparación con el control (Figura 3). La ingesta de alimento del pollo que recibe fitasa BP17 aumentó en un 7% en comparación con el pollo en el grupo de control. La relación de conversión del alimento para animales (FCR) mejoró significativamente la reducción del FCR en 8,4%) por la fitasa BP17 en comparación con el control. La conversión de calorías se mejoró con 514 kcal del pollo que recibe la fitasa BP17 en comparación con el control.

1.2.4 Digestibilidad total del tracto

20 Los resultados del ensayo de digestibilidad del tracto se muestran en la Figura 4 y en la Tabla 1.3. La fitasa BP17 redujo la secreción de sodio (en 11%), cobre y zinc (en 7,5% y 8,4%, respectivamente) y, por lo tanto, aumenta la digestibilidad de estos minerales esenciales o oligoelementos en pollos de engorde.

Tabla 1.3 Resultados (también se muestra en las Figuras 2, 3 y 4)

	Control	BP17 500 FTU	BP17 1.000 FTU	Fitasa R 1,850 FTU
BWG (g)	589 ^c	649 ^b	688 ^a	605 ^c
Ingesta de alimentos (g)	1194 ^b	1245 ^{ab}	1279 ^a	1231 ^{ab}
FCR	2,03 ^a	1,93 ^{ab}	1,86 ^b	2,06 ^a
Ingesta de alimentos	1194 ^b	1245 ^{ab}	1279 ^a	1231 ^{ab}
Conversión de calorías	6085 ^a	5751 ^b	5571 ^b	6115 ^a
Digestibilidad DM ileal , %	63,73 ^b	69,40 ^a	72,76 ^a	71,00 ^a
Digestibilidad GE ileal , %	64,61 ^b	71,63 ^a	74,09 ^a	72,95 ^a
Digestibilidad DM fecal , %	75,88	76,76	78,43	77,59
AME kcal/kg DM	3133 ^b	3190 ^{ab}	3223 ^a	3140 ^{ab}
Digestibilidad N fecal , %	69,75 ^a	67,91 ^{ab}	71,93 ^a	65,40 ^b
Digestibilidad P fecal , %	63,3 ^b	69,8 ^a	69,8 ^a	69,9 ^a
Digestibilidad Ca fecal , %	54,9 ^b	61,2 ^a	60,0 ^a	53,9 ^b
Digestibilidad GE fecal , %	68,2	68,8	67,4	68,2
Digestibilidad Na fecal , %	70,49 ^a	56,09 ^c	62,83 ^b	61,94 ^b
Digestibilidad Cu fecal , %	48,31 ^(a)	44,29 ^(ab)	44,68 ^(ab)	43,39 ^(b)
Digestibilidad Zn fecal , %	20,75	18,19	19,01	16,8
Degradación de fitato , %	40,4 ^c	53,8 ^b	75,2 ^a	39,7 ^c
<i>abc Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)</i>				

Ejemplo 2: Mineralización ósea en pollos de engorde

El propósito de este ejemplo fue demostrar el efecto de BP17 sobre la mineralización ósea en pollos de engorde.

2.1 Material y procedimientos

- 5 250 pollos de engorde machos de 7 días se asignaron a 5 tratamientos con 10 jaulas replicadas por tratamiento (5 pollos/jaula). Las dietas de control positivo (PC) y de control negativo (NC) se basaron en la harina de maíz y soja (48% CP, % CP = Proteína bruta expresada como%. Proteína bruta = Nitrógeno analizado x 6,25). La prueba duró 14 días. La dieta NC se redujo en fósforo disponible en 0,16%, las dietas se modificaron mediante la eliminación de 9,3 g/kg de alimento para animales de fosfato monocálcico. Las dietas de control negativo se administraron sin suplementar o suplementadas con 250 FTU, 1.000 FTU o 2.000 FTU/kg de alimento para animales BP17. Todas las dietas se administraron como puré ad libitum.
- 10

Tabla 2.1: Dietas: (kg/tonelada) según se administra

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Maíz	594	619
Harina de soja 48% CP	331	325
Aceite de soja	29,4	18,6
L-Lisina HCl	0,52	0,24
DL-metionina	2,31	2,31
L-treonina	2	2
Salt	2,8	2,9
Piedra caliza	12,3	14
Fosfato monocálcico	16,2	6,9
Premezcla de mineral traza/vitamina	3,5	3,5
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	-	-/250/1.000/2.000

Análisis calculado		
Proteína bruta (%)	21	21
Energía metabolizable (MJ/kg)	12,8	12,6
Energía metabolizable (kcal/kg)	3060	3010
Calcio	0,99	0,83
P total (%)	0,67	0,50
Fósforo disponible (%)	0,40	0,24
Lisina digerible (%)	0,98	0,95
Metionina (%)	0,55	0,55
Metionina digerible (%)	0,51	0,51
Metionina + cisteína (%)	0,90	0,90
Metionina+ cisteína digerible (%)	0,79	0,79
Sodio (%)	0,20	0,20

El día 21 se recolectaron heces para la determinación de AME, tracto total; Digestibilidad de nitrógeno, fósforo y calcio. También en el día 21, todas las aves se sacrificaron y se recolectaron los contenidos ileales para determinar la digestibilidad de los aminoácidos utilizando un marcador dietario inerte (dióxido de titanio). La mineralización ósea se determinó mediante la medición del contenido de ceniza de la tibia y su expresión como un porcentaje del peso de tibia seca.

5

2.2 Resultados

Los resultados de la mineralización ósea se muestran en la Tabla 2.2. La fitasa BP17 mejoró significativamente la ceniza de tibia en comparación con NC (+ 10%) y todos los tratamientos de fitasa BP17 tienen un contenido de ceniza de tibia similar al encontrado para PC. La ceniza de tibia y la ceniza de hueso se utilizan para estimar la mineralización ósea (resistencia ósea). Un valor más alto indica huesos más fuertes.

10

Tabla 2.2 Efectos de BP17 sobre ceniza de hueso (%) (también se muestra en las Figuras 5 y 6)

Tratamiento	Ceniza de hueso (%)
Control positivo	47,55 ^{ab}
Control negativo (NC)	41,65 ^c
NC + 250 FTU/kg BP17	46,99 ^b
NC + 1000 FTU/kg BP17	48,20 ^a
NC + 2000 FTU/kg BP17	48,12 ^a

Ejemplo 3: Rendimiento del alimento para animales en pavos

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de pavos con los siguientes parámetros: digestibilidad de fosfato, calcio, nitrógeno, proteína y energía, y ganancia de peso, ingesta de alimentos, conversión de calorías, FCR y ceniza de tibia.

15

3.1 Materiales y procedimientos

Se asignaron 720 pollos de pavo de 7 días de edad a 8 tratamientos con 9 jaulas replicadas por tratamiento (10 pavipollos/ jaula). Las dietas de tratamiento se administraron desde los días 7-28. La dieta de control positivo se basó en la harina de maíz y soja (48% CP). La dieta de control negativo estaba reducida en fósforo disponible en 0,12%, esto se logró mediante la eliminación del fosfato dicálcico. La dieta de control negativo se administró sin suplemento o con suplemento de 250, 1.000 o 2.000 FTU/kg de de alimento para animales fitasa BP17 o 250, 500 o 1.000 FTU/kg de de alimento para animales fitasa Phyzyme XP. Todas las dietas se administraron en gránulos a ad libitum.

20

La ingesta de alimento se midió diariamente durante todo el período de tratamiento, el peso del pavipollo se midió en los días 7 y 28, estas mediciones se utilizaron para calcular los parámetros de rendimiento. Las heces se recolectaron de los días 24-28 y se analizaron para los cálculos de digestibilidad total del tracto. El día 28, se sacrificaron 4 pavipollos por jaula y se recogió la tibia derecha para determinar la ceniza de hueso.

25

Tabla 3.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	BP17 250 FTU/kg
4	BP17 1.000 FTU/kg
5	BP17 2.000 FTU/kg
6	Fitasa de <i>E. coli</i> 250 FTU/kg
7	Fitasa de <i>E. coli</i> 1.000 FTU/kg
8	Fitasa de <i>E. coli</i> 2.000 FTU/kg

Tabla 3.2: Composición de la dieta

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Maíz	324	324
Harina de gluten de maíz	60	60
Soja (grasa total)	72	72
Harina de soja	350	350
Harina de colza	50	50
Harina de semillas de girasol	10	10
Harina de pescado	10	10
Almidón de maíz	12,16	12,16
Aceite de soja	45	45
L-Lisina HCl	3,6	3,6
DL-metionina	2,6	2,6
L-Treonina	0,2	0,2
L-Triptofano	0,4	0,3
Bicarbonato de sodio	3,1	3,1
Sal	1,5	1,5
Piedra caliza	13,6	14,2
Fosfato monocálcico	5,3	5,3
Fosfato dicálcico	6,436	0
Premezcla de mineral traza/vitamina BP17/Phyzyme XP (FTU/kg alimento para animales)	5	5
	-	-/250/1.000/2.000
Análisis calculado		
Proteína bruta (%)	26	26
Energía metabolizable (MJ/kg)	12,2	12,2
Energía metabolizable (kcal/kg)	2915	2915

Calcio (%)	1,00	0,87
P total (%)	0,73	0,61
Fósforo disponible (%)	0,42	0,30
Lisina (%)	1,76	1,76
Lisina digerible (%)	1,52	1,52
Metionina (%)	0,67	0,67
Metionina digerible (%)	0,61	0,61
Metionina + Cisteína (%)	1,10	1,10
Metionina+ cisteína digerible (%)	0,94	0,94
Sodio (%)	0,19	0,19

Resultados

5 Los resultados del estudio en los pavos se muestran en la Tabla 3.3. En todos los niveles de dosis, la fitasa BP17 dio como resultado un mayor BWG, una mayor ingesta de alimento y una menor FCR y una menor conversión de calorías en comparación con la fitasa de Phyzyme (*E. coli*) (Figura 7). La adición de fitasa BP17 a 250-2000 FTU/kg a la dieta de control negativo dio como resultado un mejor BWG (+ 21 a 36%), FCR (mejora de 4,3 a 5,7%), conversión de calorías (175 kcals a 220 kcals/kg), digestibilidad P (+ 22 a 41%), digestibilidad Ca (+ 23,5 a 46,5%) y ceniza de tibia (+ 13,4 a 33,4%).

En todos los niveles de dosis, la fitasa BP17 dio como resultado una mayor digestibilidad de fósforo y calcio y un aumento en el contenido de ceniza de tibia y tibia P en comparación con la fitasa de *E. coli* (Figura 8).

10 Se concluye que en función de la eficacia in vivo en pavos entre las fitasas puede ser muy diferente.

Tabla 3.3: Resultados: Resultados de rendimiento, digestibilidad y análisis de tibia durante la prueba de 21 días (también se muestra en las Figuras 7, 8 y 9).

		Fitasa FTU/kg alimento para animales				
		PC	NC	250	1.000	2.000
Ingesta de alimentos (g)		1866 ^b	1530 ^e	1775 ^c	1899 ^{ab}	1966 ^a
	Fitasa de <i>E. coli</i>			1660 ^d	1792 ^c	1936 ^a
BWG (g)	BP17	1403 ^b	1112 ^d	1348 ^b	1481 ^a	1510 ^a
	Fitasa de <i>E. coli</i>			1246 ^c	1376 ^b	1508 ^a
FCR	BP17	1,33 ^b	1,38 ^a	1,32 ^c	1,28 ^c	1,30 ^{bc}
	Fitasa de <i>E. coli</i>			1,33 ^b	1,30 ^{bc}	1,28 ^c
Conversión de calorías (kcal/kg)	BP17	3869 ^b	4018 ^a	3843 ^b	3741 ^c	3798 ^{bc}
	Fitasa de <i>E. coli</i>			3886 ^b	3802 ^{bc}	3744 ^c
Digestibilidad P(%)	BP17	47,6 ^e	47,8 ^e	58,4 ^c	68,7 ^a	67,2 ^a
	Fitasa de <i>E. coli</i>			54,0 ^d	63,0 ^b	67,9 ^a
Digestibilidad Ca (%)	BP17	43,8 ^c	40,9 ^e	50,5 ^c	61,6 ^a	59,9 ^a
	Fitasa de <i>E. coli</i>			46,6 ^d	55,3 ^b	60,5 ^a
Ceniza de tibia(%)	BP17	40,1 ^b	33,5 ^c	38,0 ^c	44,3 ^a	44,7 ^a
	Fitasa de <i>E. coli</i>			35,2 ^d	39,6 ^{bc}	44,3 ^a
Tibia P (g/kg)	BP17	71,4 ^b	58,8 ^d	67,8 ^c	79,7 ^a	80,2 ^a
	Fitasa de <i>E. coli</i>			61,9 ^d	70,9 ^{bc}	79,6 ^a

		Fitasa FTU/kg alimento para animales				
		PC	NC	250	1.000	2.000
Contribución de P digerible	BP17	-	0,73*	0,0647	0,1275	0,1183
	Fitasa de <i>E. coli</i>			0,0378	0,0927	0,1226
GE	Fitasa de <i>E. coli</i> BP17	70,4c	71,9 ^a	71,6ab	71,4ab	71,5ab
				71,2abc	71,5ab	70,9bc
AMEn	Fitasa de <i>E. coli</i> BP17	3090c	3153 ^a	3137ab	3128ab	3133ab
				3120abc	3134ab	3107bc
Tibia Ca	Fitasa de <i>E. coli</i> BP17	145b	119 ^d	136c	159a	159a
				131c	142b	159a

*Contribución de P digerible adicional en comparación con NC para tratamientos de fitasa

Ejemplo 4: Rendimiento del alimento para animales en pavos

El rendimiento de fitasa BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de pavos con los siguientes parámetros: digestibilidad de cobre.

Materiales y procedimientos

- 5 Se asignaron 336 pavos macho a 7 tratamientos con 12 jaulas replicadas por tratamiento (4 por jaula). Las dietas de tratamiento se administraron desde los días 7-23. La dieta de control positivo se basó en la harina de maíz y soja formulada con inclusiones de 0,98% de P y 1,2% de Ca. La dieta de control negativo fue una dieta de harina de trigo + soja con una inclusión de 0,82% de P y 1,05% de Ca. La dieta de control negativo se administró sin suplementar o
- 10 administraron en gránulos con ad libitum.

Se midieron y registraron las ingestas de alimento para del día de inicio, la ingesta diaria de alimento y los rechazos (datos no mostrados). Se recolectó la digesta ileal de cada ave para su análisis.

Tabla 4.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	BP17 250 FTU/kg
4	BP17 500 FTU/kg
5	BP17 750 FTU/kg
6	BP17 1000 FTU/kg
7	BP17 2000 FTU/kg

Tabla 4.2: Composición de la dieta %, según se administra)

Ingredientes: Kg/tonelada	Control positivo – de inicio	Control negativo – de inicio
Trigo	48,0	49,9
Harina de soja -48	43,61	43,07
Aceite de soja	3,0	2,5
sal	0,30	0,30
MCP	2,43	1,70
Piedra caliza	1,45	1,36

Ingredientes: Kg/tonelada	Control positivo – de inicio	Control negativo – de inicio
Premezcla de vitamina	0,50	0,50
Lisina-HCl	0,168	0,158
DL-Metionina	0,217	0,204
L-treonina	0,026	0,030
TiTO ₂	0,3	0,3
Total	100	100
Composición de nutrientes		
Proteína bruta	26,66	26,60
ME Pavipollo kcal/kg	2844	2842
Ca, %	1,2	1,05
P, %	0,98	0,82
Av. P, %	0,70	0,55
Lys%	1,59	1,57
Met %	0,59	0,58
Met + Cys %	1,03	1,02
Na, %	0,19	0,19

4.2 Resultados

la digestibilidad mineral se muestra en la Tabla 4.3 y Figura 9. Para Cu se halló un aumento de digestibilidad (x 4,8 en comparación con el control negativo), mediante la adición de fitasa BP17.

Tabla 4.3: Digestibilidad del cobre

Nivel	Digestibilidad de CU (%)
Control positivo	0,43
Control negativo	0,08
BP17 250 FTU/kg	0,28
BP17 500 FTU/kg	0,32
BP17 750 FTU/kg	0,39
BP17 1000 FTU/kg	0,16
BP17 2000 FTU/kg	0,01

5 Ejemplo 5: Rendimiento del alimento para animales en ponedoras

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de ponedoras con los siguientes parámetros: digestibilidad de fosfato, calcio, nitrógeno, sodio y energía.

5,1 Materiales y procedimientos

En una prueba de digestibilidad de ponedoras se asignaron 96 ponedoras a uno de cuatro tratamientos, con doce replicados por tratamientos. Las ponedoras se alojaron en pares de dos por jaula. La dieta de control positivo se basó en trigo, cebada, harina de soja y harina de colza formulada con inclusiones de 0,80% de P y 4,0% de Ca. La dieta de control negativo fue una dieta a base de trigo, cebada, harina de soja y harina de colza con una inclusión de 0,36% de P y 4,23% de Ca. La dieta de control negativo se administró sin suplemento o suplementada con 250 o 2.000 FTU/kg de alimento para animales BP17. Todas las dietas se administraron como harina ad libitum. Las dietas se administraron durante 6 semanas. Se recolectaron muestras de heces durante 39-42.

Tabla 5.1 Diseño del estudio

Tratamiento	Descripción	Inclusión (g/MT)	Núm. de replicados	Núm. de aves/replicado
1	Control positivo (PC)	0	12	24
2	Control negativo (NC)	0	12	24
3	NC + 250 FTU/kg fitasa BP17	500	12	24
4	NC + 2.000 FTU/kg de fitasa BP17	500	12	24

Nota: La tasa de inclusión de la muestra de enzima para cada tratamiento fue 500 g/tonelada y la enzima tenía actividad diferente.

Tabla 5.2 Composición dietaria (como base de alimento) de las dietas de control positivo (PC) y control negativo (NC)

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Trigo (11,3%CP)	48,4	50,9
Cebada	20	20
Harina de soja 48% CP	5,3	4,7
Harina de colza	5	5
Harina de gluten de maíz (60%)	7,5	7,5
Aceite de soja	2,3	1,6
L-Lisina HCl	0,364	0,377
DL-metionina	0,101	0,101
L-treonina	0,004	0,004
Sal	0,31	0,30
Fosfato dicálcico	1,75	0,0
Piedra caliza	8,18	8,76
Vit y Min.	0,5	0,5
Dióxido de titanio	0,3	0,3

Tabla 5.3: Análisis dietario determinado

Tratamiento	DM	AHEE	CP	NDF	P	Ca	N
	g/kg	g/kg DM	g/kgDM	g/kgDM	g/kgDM	g/kgDM	g/kgDM
PC	873,7	54,8	182	123	8,02	40,2	1,70
NC	871,9	47,9	188	112	4,14	48,5	1,77
BP17, 250	877,7	49,7	187	105	3,90	54,1	2,05
BP17, 2.000	873,3	50,0	186	113	4,44	39,5	1,47

Donde DM=Materia seca, AHEE=Extracto de éter hidrolizado en ácido, CP= Proteína bruta y NDF= Fibra detergente neutra.

5 5.2 Resultados

Las ponedoras alimentadas con hasta 2.000 FTU/kg de alimento para animales de BP17 mejoraron el peso corporal en comparación con NC (Tabla 5.4). Se halló una mejora de AME (hasta 6,7%), digestibilidad de DM, N (hasta 11%), Ca (hasta 37%), P (hasta 86%) y Na (hasta 22%) de la adición de BP17 al alimento para animales (Tabla 5.5). Además,

se encontró una mejora en la retención (g/ave/día) de N (hasta 16%), Ca (hasta 51%), P (hasta 79%) y Na (hasta 33%) (Tabla 5.6).

Tabla 5.4: Efecto de diferentes dosis de BP17 sobre el peso corporal de las ponedoras durante el período experimental

Tratamiento	Peso corporal (kg/ave)
Enzimas	
PC	1813,5b
NC	1745,1a
BP17, 250	1728,5a
BP17, 2.000	1828,1b
LSD	56,00
Valor P	0,001
Edad (semanas)	
21	1719,5a
26	1838,1b
LSD	37,53
Valor P	<0,001
Edad enzima *	
Edad (semanas)	
Valor P	0,468
<i>Hay una diferencia estadísticamente significativa cuando P<0,05; LSD - Diferencias de medias menos significativas.</i>	

- 5 Tabla 5.5: Efecto de las diferentes dosis de BP17 sobre la energía metabolizable aparente dietaria de excrementos (AME; MJ/Kg DM), digestibilidad de materia seca (DMD), coeficiente de digestibilidad del nitrógeno (NED), coeficiente de digestibilidad del calcio (CaED), coeficiente de digestibilidad del fósforo (PED) y coeficiente de digestibilidad del sodio (NaED) (ver también Figura 10)

Tratamiento	AME	DMD	NED	CaED	PED	NaED
PC	13,7 ^{ab}	0,717 ^a	0,502 ^a	0,453 ^{ab}	0,272 ^a	0,562
NC	13,5 ^a	0,717 ^a	0,502 ^a	0,408 ^a	0,218 ^a	0,486
BP17, 250	13,9 ^b	0,746 ^b	0,559 ^b	0,522 ^{bc}	0,395 ^b	0,594
BP17, 2.000	14,4 ^c	0,740 ^b	0,530 ^b	0,558 ^c	0,406 ^b	0,562
LSD	0,254	0,019	0,024	0,076	0,077	0,103
Valor P	<0,001	0,021	<0,001	0,003	<0,001	0,201
<i>Hay una diferencia estadísticamente significativa cuando P<0,05; LSD - Diferencias de medias menos significativas.</i>						

- 10 Tabla 5.6: El Efecto de las diferentes dosis de BP17 sobre la retención diaria (g/ave/día) de nitrógeno (NR), Calcio (Ca), Fósforo (PR) t sodio (NaR) dietarios (también se muestra en la Figura 11)

Tratamiento	NR	CaR	PR	NaR
PC	1,687 ^a	2,094 ^a	0,201 ^b	0,108 ^a
NC	1,618 ^a	2,143 ^a	0,115 ^a	0,102 ^a
BP17, 250	1,882 ^b	3,241 ^b	0,176 ^b	0,136 ^b
BP17, 2.000	1,770 ^{ab}	2,403 ^a	0,206 ^b	0,095 ^a

Tratamiento	NR	CaR	PR	NaR
LSD	0,147	0,419	0,045	0,021
Valor P	0,008	<0,001	0,002	0,004

Hay una diferencia estadísticamente significativa cuando $P < 0,05$; LSD - Diferencias de medias menos significativas.

Ejemplo 6: Rendimiento del alimento para animales en ponedoras

El rendimiento de fitasa BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de ponedoras con los siguientes parámetros FCR, masa del huevo, peso del huevo, y tasa de puesta.

6.1 Materiales y procedimientos

- 5 Quinientas setenta y seis ponedoras se usaron en una prueba de rendimiento. La dieta de control positivo se basó en una dieta de trigo, cebada y harina de soja formulada con inclusiones de 0,46% de P y 3,80% de Ca. La dieta de control negativo fue una dieta de harina de trigo, cebada y soja con una inclusión de 0,34% de P y 3,65% de Ca. La dieta de control negativo se administró sin suplemento y suplementada con 250, 500, 1.000 o 2.000 de FTU/kg de alimento para animales fitasa BP17. Las aves se alimentaron ad libitum con una dieta de harina. Se registraron la
- 10 conversión del alimento para animales, masa del huevo, peso del huevo y tasa de puesta durante la prueba.

Tabla 6.1: La descripción de los tratamientos experimentales y los códigos de dieta

Trt	Descripción	Inclusión de fitasa (FTU/kg)	Código de dieta
1	Control negativo (NC)	-	A
2	NC más 1,3 g de DCP-P (control positivo, PC)	-	B
3	NC plus 250 FTU Fitasa BP17 ¹	250	C
4	NC plus 500 FTU Fitasa BP17	500	D
5	NC plus 1.000 FTU Fitasa BP17	1.000	E
6	NC plus 2.000 FTU Fitasa BP17	2.000	F

¹ El producto de prueba se pulverizó sobre las dietas granuladas

Tabla 6.2: Composición del alimento para animales de las dietas experimentales

	Control neg.	Control pos.
	ret. P baja	+1,3 g DCP-P
	g/kg	g/kg
Trigo	450,00	450,00
Cebada	150,00	150,00
Harina de soja (48)	141,00	141,00
Harina de gluten de maíz (60)	53,00	53,00
Harinillas de trigo	10,00	10,00
Almidón de maíz	50,00	50,00
Grasa animal	17,00	17,00
Aceite de soja	10,00	10,00
Sal	1,70	1,70
NaHCO ₃	0,60	0,60
Premezcla min+vit ²	10,00	10,00
Cr ₂ O ₃ ¹	0,75	0,75
Piedra caliza	88,20	88,20

	Control neg.	Control pos.
	ret. P baja	+1,3 g DCP-P
	g/kg	g/kg
Almidón de maíz	11,314	11,314
CaCO ₃	0,594	3.000
DCP-anhidrato	0.000	6,436
Diamol	5,842	0.000
	1000.000	1000.000

Tabla 6.3: Contenido de nutrientes analizado y calculado¹ en las dietas experimentales

Dieta	DM	CP	Cenizas	Grasa	Cr ²	NDF	GE	P	Ca	Fitato-P
	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	MJ/kg	g/kg	g/kg	g/kg
A	898	185 (185)	110	50 (48)	0,546	91	15,59	3,4 (3,3)	33,8 (36,5)	2,5 (2,1)
B	895	n.a.	110	n.a.	0,537	n.a.	n.a.	4,6 (4,6)	34,9 (38,0)	2,6 (2,1)
	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	MJ/kg	g/kg	g/kg	g/kg
C	900	n.a.	n.a.	n.a.	0,532	n.a.	n.a.	3,4	33,5	n.a.
D	901	n.a.	n.a.	n.a.	0,536	n.a.	n.a.	3,3	33,9	n.a.
E	899	n.a.	n.a.	n.a.	0,521	n.a.	n.a.	3,3	35,1*	n.a.
F	902	n.a.	n.a.	n.a.	0,493	n.a.	n.a.	3,2	33,8	n.a.

¹ Los valores calculados se dan entre paréntesis

² La digestibilidad de Cr se calculó con Cr = 0,595 g/kg de DM para todas las dietas (promedio de A a E)

n.a. No analizado, ya que todas las dietas se obtuvieron del mismo lote de dieta basal

* No incluido en el cálculo del contenido medio de nutrientes de la dieta A, C-F

6.1 Resultados

La adición de fitasa BP17 mejoró la tasa de puesta en comparación con NC (Tabla 6.3). Además, el peso del huevo, la masa del huevo y el consumo de alimento mejoraron hasta en un 2%, 4% y 4% respectivamente al añadir fitasa BP17 al alimento para animales, sin ningún efecto sobre la FCR (Tabla 6.4).

Tabla 6.4: Resultados para la tasa de puesta de las gallinas ponedoras (también se muestra en la Figura 12).

		wk 23	wk 24-26		
	BP17	Tasa de puesta ¹	Tasa de puesta		Tasa de puesta
Trt.	FTU/kg	%	%		Δ (%)
1	0	92,6	84,1	b	-8,5
2	0	94,0	89,1	a	-4,9
3	250	91,9	91,0	a	-0,9
4	500	93,5	90,3	a	-3,2
5	1.000	94,3	92,4	a	-1,9
6	2.000	93,8	92,2	a	-1,6

			wk 23		wk 24-26		
			Tasa de puesta ¹		Tasa de puesta		Tasa de puesta
	BP17						
Trt.	FTU/kg		%		%		Δ (%)
<i>P</i> (trt)			NS		<0,001		0,01
<i>Lsd</i> (trt)			3,6		3,5		4,5
<i>P</i> (dosis, lin)			NS		<0,001		0,049
<i>P</i> (dosis, quad)			NS		0,002		0,072
<i>LSD</i> (dosis)			3,8		3,4		4,7

NS: no significativo ($P \geq 0,10$)

^{a,b} Los valores medios sin una letra superíndice común dentro de una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$) Se probó el efecto de dosis lineal y cuadrática excluyendo PC

Tabla 6.5: Resultados para peso del huevo, ingesta de alimentos (FI) y relación de conversión del alimento para animales (FCR) de las gallinas ponedoras durante el período experimental de 23 a 26 semanas (ver también Figura 13).

	BP17	Peso del huevo	Masa del huevo		FI		FCR
Trt.	FTU/kg	%	g/d		%		%
1	0	50,8	42,2	b	76,4	c	1,81
2	0	50,7	45,7	a	84,1	ab	1,84
3	250	51,3	47,2	a	85,7	ab	1,82
4	500	50,9	45,9	a	82,4	b	1,80
5	1.000	51,4	47,5	a	87,3	a	1,84
6	2.000	51,6	47,4	a	87,3	a	1,84
<i>P</i> (trt)		NS	<0,001		<0,001		NS
<i>Lsd</i> (trt)		0,8	1,9		4,15		0,074
<i>P</i> (dosis, lin)		0,048	<0,001		<0,001		NS
<i>P</i> (dosis, quad)		0,864	0,001		0,005		NS
<i>LSD</i> (dosis)		0,8	2,0		4,29		0,078

NS: no significativo ($P \geq 0,10$)

^{a,b} Los valores medios sin una letra superíndice común dentro de una columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$) Se probó el efecto de dosis lineal y cuadrática excluyendo PC

Ejemplo 7: Rendimiento del alimento para animales en ponedoras

- 5 El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de ponedoras con los siguientes parámetros: FCR, masa del huevo, peso del huevo, tasa de puesta, calidad del huevo y peso del ave

7.1 Materiales y procedimientos

- 720 ponedoras de semanas se asignaron a 9 tratamientos con 16 jaulas replicadas por tratamiento (5 ponedoras/jaula). Las dietas de tratamiento se administraron desde la semana 26-60. La dieta control se basó en harina de maíz y soja (48% de CP), la dieta de control negativo era reducida en fósforo disponible en 0,20 durante la etapa 1 y en 0,18%
- 10

ES 2 736 036 T3

durante la etapa 2, esto se obtuvo a través de la eliminación de fosfato dicálcico. La dieta de control negativo se administró sin suplemento y suplementada con 300, 600 o 900 FTU/kg de alimento para animales fitasa BP17, 300, 600 o 900 FTU/kg de alimento para animales Fitasa XP o 900 FTU/kg de alimento para animales Fitasa de *P. lycii*. Todas las dietas se administraron como harina ad libitum.

- 5 Se recolectaron excretas durante 4 días en la semana 12 y 24. El rendimiento, que incluye ingesta de alimentos, ganancia de peso y producción de huevos y calidad del huevo se midió diariamente a lo largo del período de tratamiento, estos datos se usaron para calcular los parámetros de rendimiento.

Tabla 7.1: Tratamientos dietarios, identificación de la enzima y tasas de incorporación

Trt.*	Descripción	Inclusión (g/MT)	Excretas para recolectar durante 4 días en	Excretas para recolectar durante 4 días en
1	Control positivo (PC)	0	Semana 12	Semana 24
2	Control negativo (NC)	0	Semana 12	Semana 24
3	NC + 300 FTU/kg BP17	60	Semana 12	Semana 24
4	NC + 600 FTU/kg BP17	120	Semana 12	Semana 24
5	NC + 900 FTU/kg BP17	180	Semana 12	Semana 24
6	NC + 300 FTU/kg Fitasa XP	30	Semana 12	Semana 24
7	NC + 600 FTU/kg Fitasa XP	60	Semana 12	Semana 24
8	NC + 900 FTU/kg Fitasa XP	90	Semana 12	Semana 24
9	NC + Fitasa de <i>P. lycii</i> (CT)	90	Semana 12	Semana 24

Tabla 7.2: Formulaciones de dieta

Ponedoras : 90% de Prod., 115 g/ d ingesta				
	dietas etapa 1		dietas etapa 2	
Ingrediente	Control positivo	Control negativo	Control positivo	Control negativo
Maíz	57,67	59,31	57,14	58,64
SBM 48	22,09	21,87	22,17	21,93
Aceite de soja	2,5	1,95	2,56	2,09
Rice Bran	5,0	5,0	5,0	5,0
Sal	0,33	0,33	0,30	0,3
Lisina HCL	0,032	0,007	0,032	0,027
DL Met	0,167	0,165	0,169	0,166
L-Triptofano	0,005	0,005	0,005	0,005
Piedra caliza	8,54	8,86	9,14	9,40
Fosf dical	1,26	0,10	1,03	0
Bicarb sodio	0	0	0,048	0,046
Vit/Min	0,4	0,4	0,4	0,4
Marcador inerteAiA	2,0	2,0	2,0	2,0
Nutrientes				

Ponedoras : 90% de Prod., 115 g/ d ingesta				
	dietas etapa 1		dietas etapa 2	
Ingrediente	Control positivo	Control negativo	Control positivo	Control negativo
CP	16,35	16,35	16,35	16,35
MEP kcal/kg	2820	2818	2811	2811
Ca%	3,63	3,47	3,8	3,65
P total%	0,62	0,41	0,58	0,39
Av P%	0,33	0,13	0,29	0,11
Met %	0,428	0,427	0,430	0,428
Lys %	0,858	0,835	0,860	0,852
M+C %	0,710	0,710	0,711	0,710
Thr %	0,62	0,62	0,62	0,62

7.2 Resultados

En la Tabla 7.3 se informan el rendimiento de producción y la calidad del huevo. Las gallinas en dietas con fitasa BP17, en general, se desempeñaron mejor que las gallinas en NC y alimentaron con fitasas de la competencia. La producción de huevos se mejoró en hasta 5,5%, el peso de los huevos en hasta 3,8%, la masa de huevos en hasta 9,7% y la FCR en 6,2%.

5

Tabla 7.3: Eficacia de BP17, Fitasa XP (*E. coli*) y la fitasa de *P. lysi* en el rendimiento de gallinas ponedoras alimentadas con dieta a base maíz/soja

Mediciones	PC	NC	NC+300 FTU BP17	NC+600 FTU BP17	NC+900 FTU BP17	NC+300 FTU/kg fitasa de <i>E. coli</i>	NC+600 FTU/kg fitasa de <i>E. coli</i>	NC+900 FTU/kg fitasa de <i>E. coli</i>	NC+450 FTU/kg <i>P. lysi</i> fitasa	LSD	P
Rendimiento de producción											
Producción de huevos (HH) (%)	89.96 ^{ab}	87.48 ^b	92.36 ^a	91.05 ^a	91.67 ^a	90.23 ^{ab}	91.51 ^a	90.94 ^a	91.61 ^a	2.79	0.04
Producción de huevos (HD) (%)	91.064	89.032	92.36	91.07	91.67	90.72	91.51	92.08	91.61	2.64	0.39
Peso del huevo (g/egg)	66.69 ^{ab}	64.72 ^c	67.21 ^a	65.67 ^{bc}	66.46 ^{ab}	65.81 ^{bc}	66.78 ^{ab}	65.73 ^{bc}	65.39 ^{bc}	1.39	0.01
Masa del huevo (g/gallina/día)	60.00 ^{ab}	56.65 ^c	62.18 ^a	59.77 ^b	60.93 ^{ab}	59.37 ^b	61.10 ^{ab}	59.79 ^b	59.91 ^b	2.21	0.006
Ingesta de alimento (g/gallina/día)	119.37	115.81	117.23	115.84	118.69	115.12	117.12	116.49	115.84	2.99	0.08
FCR (g alimento/g huevo)	1.971 ^{ab}	2.012 ^a	1.886 ^c	1.939 ^{bc}	1.951 ^b	1.932 ^{bc}	1.917 ^{bc}	1.925 ^{bc}	1.936 ^{bc}	0.05	0.003
Eficiencia del alimento para animales (%)	50.88 ^{bc}	49.78 ^c	53.06 ^a	51.59 ^b	51.33 ^b	51.86 ^{ab}	52.17 ^{ab}	51.97 ^{ab}	51.73 ^{ab}	1.45	0.003
Mortalidad (%)	5.00 ^{ab}	6.25 ^a	0 ^c	1.25 ^{bc}	0 ^c	1.25 ^{bc}	0 ^f	3.75 ^{abc}	0 ^c	3.94	0.004
Ganancia de peso (g/pollo)	8.69 ^a	-173.69 ^c	-47.5 ^b	-10.84 ^{ab}	-28.19 ^{ab}	-54.22 ^b	-32.28 ^{ab}	-6.34 ^{bc}	-54.81 ^b	54.40	0.001
Parámetros de calidad del huevo											
Unidad Haugh	82.75	87.25	83.37	85.68	81.87	81.50	85.12	84.37	87.81	6.05	0.38
Color de la yema	10.75	10.68	11.37	11.50	11.12	11.31	10.75	11.25	11.18	0.65	0.11
Grosor de la cascara	0.42	0.41	0.39	0.41	0.40	0.40	0.40	0.41	0.42	0.02	0.13
<i>Medias con los mismos superíndices no son significativamente diferentes (P<0.05)</i>											

Ejemplo 8: Rendimiento del alimento para animales en lechones

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de lechones con los siguientes parámetros: digestibilidad de fosfato, calcio, nitrógeno, DM y energía.

8.1 Materiales y procedimientos

- 5 Se asignaron 48 lechones destetados de género mixto (10-15 kg de peso corporal) a 6 tratamientos con 8 replicados (un lechón por replicado). Los lechones se alimentaron con una dieta de control comercial con BP17 añadida a (250 FTU/kg a 1000 FTU/kg) y fitasa XP administrada como 500 FTU/kg de alimento para animales. Las dietas se administraron como un puré durante 24 días. La dieta de control positivo se basó en cebada y maíz y se formuló con una inclusión de 0,667% de P y 0,75% de Ca. La dieta de control negativo se basó en maíz y cebada y se formuló con 10 0,476% de P y 0,6% de Ca. Las dietas no contenían promotores de crecimiento antimicrobianos ni ninguna otra alternativa.

- 15 Las heces y la orina se recolectaron por separado del día 10-14 en cada período experimental. La orina se recolectó en HCl para minimizar la evaporación del nitrógeno. Las heces se recolectaron por estimulación rectal dos veces al día. Todas las muestras se congelaron (-18°C) y se mezclaron al final del experimento para cada animal. Posteriormente se determinó el análisis de digestibilidad.

Tabla 8.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	fitasa BP17 250 FTU/kg
4	fitasa BP17 500 FTU/kg
5	fitasa BP17 1.000 FTU/kg

Tabla 8.2: Composición de la dieta (kg/tonelada) según se administra

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Maíz	20,48	21,77
Cebada	45	45
Melazas de caña	1	1
Ext de harina de girasol.	4	4
Suero deshidratado	5	5
Concentrado de proteína de soja	4,5	4,5
Aceite de soja	3,31	2,89
DL-metionina	0,12	0,12
Relleno inerte	3	3
Sal	0,39	0,39
Piedra caliza	0,93	0,93
Fosfato monocálcico	1,05	0,18
Premezcla de traza mineral/vitamina	2,14	2,14
Harina de soja 47%CP	8,5	8,5
L-lisina HCl 79%	0,43	0,43
L-treonina 98%	0,09	0,09
L-triptofano 98%	0,03	0,03
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	-	0/250/500/1.000
Fitasa XP (FTU/kg de alimento para animales)	-	0/500

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Análisis calculado		
Proteína bruta (%)	16,02	16,13
DE kcal/kg (MJ/kg)	3178 (13,3)	3178 (13,3)
NE kcal/kg (MJ/kg)	2265 (9,48)	2263 (9,47)
Calcio	0,85	0,72
P total (%)	0,6	0,4
Lisina digerible (%)	0,9	0,9
Metionina (%)	0,3	0,3
Metionina digerible (%)	0,3	0,3
Metionina + Cisteína (%)	0,6	0,6
Metionina+ cisteína digerible	0,54	0,54
Fósforo disponible	0,3	0,19
Sodio	0,22	0,22

8.2 Resultados

La inclusión de la fitasa BP17 mejoró la digestibilidad de P y Ca, así como la retención de P y N (Tabla 8.3). La suplementación de una dieta de control negativo con fitasa BP17 mejoró la digestibilidad del nitrógeno (en 3,5 a 8,9%), Calcio (en 17,3 a 25%) y Fósforo (en 33,9 a 59,8%). BP17 también mejoró la retención de nitrógeno (en 4,2 a 12,4%), Calcio (en 28,7 a 48,7%) y Fósforo (en 34,4 a 60,4%).

Tabla 8.3 Mejoras de la digestibilidad con fitasa BP17

	NC	BP17 250 FTU/kg	BP17 500 FTU/kg	BP17 1000 FTU/kg
Dig DM, %	77,9x	79,5xy	79,7yz	81,4z
Digestibilidad de cenizas, %	38,1x	42,7y	43,8yz	45,2z
Dig. N, %	72,3x	74,9x	75,6xy	78,8y
Dig. Ca, %	62,6	73,4	77,3	78,3
Dig. P., %	41,0x	54,9y	62,3z	65,5z
Ret N., %	61,9x	64,5x	66,2xy	69,6y
Ret Ca, %	49,4x	63,6y	70,3z	73,5z
Ret P., %	40,7x	54,7y	62,1z	65,3z

Ejemplo 9: Rendimiento del alimento para animales en lechones

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de lechones con los siguientes parámetros: crecimiento, Ingesta de alimentos y FCR.

9.1 Materiales y procedimientos

48 lechones destetados machos (7-11 kg de peso corporal) se asignaron a 6 tratamientos con 8 replicados (un lechón por replicado). La dieta de control positivo se basó en trigo/soja con una tasa de inclusión formulada de 0,65% de P y 0,65% de Ca. Los lechones se alimentaron con una dieta de control negativo a base de harina de trigo y soja formulada con 0,46% de P disponible y 0,55% de calcio con diferentes niveles de enzimas requeridas agregadas (250 FTU/kg a 2000 FTU/kg) administradas como pellets durante 14 días.

La producción urinaria y fecal se registró dos veces al día (am y pm) de 10 a 14 días. Las heces se recolectaron por separado del día una vez al día. Todas las muestras se pesaron y almacenaron en un refrigerador (4°C) y se mezclaron al final del experimento para cada animal. La orina se recolectó dos veces al día en un recipiente hermético y se añadieron 25 ml de ácido sulfúrico para evitar la volatilización de la fracción de nitrógeno. Posteriormente se determinó el análisis de digestibilidad.

Tabla 9.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	fitasa BP17 250 FTU/kg
4	fitasa BP17 500 FTU/kg
5	fitasa BP17 1.000 FTU/kg
6	fitasa BP17 2.000 FTU/kg

Tabla 9.2: Composición de la dieta

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Trigo (11,3%CP)	58,31	59,58
Harina de soja 48% CP	20,79	20,54
Harina de pescado 60/9	1	1
Lecho descremada 2A	5	5
Suero deshidratado	10	10
Aceite de soja	2,37	2
L-lisina HCl	0,38	0,38
DL-metionina	0,08	0,08
L-treonina	0,16	0,16
Sal	0,1	0,1
Piedra caliza	0,27	0,67
Fosfato dicálcico	1,06	0
Premezcla de mineral traza /vitamina	0,05	0,5
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	-	0/250/500/1000/2000
Análisis calculado		
Proteína bruta (%)	20,4	20,5
DE kcal/kg (MJ/kg)	3465 (14,5)	3465 (14,5)
NE kcal/kg (MJ/kg)	2372 (9,92)	2367 (9,90)
Calcio	0,65	0,55
P total (%)	0,65	0,46
Lisina digerible (%)	1,23	1,22
Metionina (%)	0,39	0,39
Metionina digerible (%)	0,36	0,36
Metionina + Cisteína (%)	0,74	0,75
Metionina+ cisteína digerible	0,63	0,63
Fósforo disponible	0,44	0,26
Sodio	0,19	0,19

9.2 Resultados

5 La inclusión de fitasa BP17 mejoró la FCE (Eficiencia de conversión del Alimento para animales = BWG (Ganancia de peso corporal)/Ingesta de alimentos), FCR, ADG (Ganancia diaria promedio = BWG/días que el animal estuvo en la

prueba) y ADFI (Ingesta de alimentos para animales diaria promedio = Ingesta de alimentos total/días que el animal estuvo en la prueba) en lechones destetados (Tabla 9.3), además, también DE (Energía digerible = Energía del alimento - Energía fecal) mejoró también con la inclusión creciente de fitasa BP17. La administración de fitasa BP17 entre 250 y 2000 FTU/kg produjo aumento de la ganancia diaria promedio (en 14,5 a 24%), FCR (en 10,8 a 14,4%) y Energía digerible (en 2,1 a 4%) en comparación con los lechones alimentados con una dieta de control negativo.

Tabla 9.3 Mejoras del rendimiento y energía digerible con fitasa BP17 (ver también Figura 14).

	PC	NC	fitasa BP17 250 FTU/kg	fitasa BP17 500 FTU/kg	fitasa BP17 1000 FTU/kg	fitasa BP17 2000 FTU/kg
ADG, g	467	411	471	473	474	511
ADFI, g	578	562	578	577	575	606
FCR	1,25	1,39	1,24	1,23	1,21	1,19
FCE	0,804	0,733	0,817	0,825	0,831	0,845
DE (kcal/kg)	-	3766	3844	3867	3874	3919

Ejemplo 10: Rendimiento del alimento para animales en lechones

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de lechones con los siguientes parámetros: Ceniza de hueso, Ca óseo, P óseo y retención de Ca.

10 10.1 Materiales y procedimientos

Se asignaron 30 lechones machos (15-20 kg) a 5 tratamientos con 6 replicados (1 cerdo por replicado). La dieta de control positivo era a base de maíz/soja con una tasa de inclusión formulada de 6,0 g/kg de P y 7,0 g/kg de Ca. Los lechones se alimentaron con una dieta de control negativo a base de maíz/soja formulada con 4,0 g/kg de P y 6,0 g/kg de Ca con diferentes niveles de enzimas requeridas agregadas (125 FTU/kg a 1,500 FTU/kg) administradas como puré durante 15 días. La orina se recolectó en contenedores con control ambiental desde el día 8-12. Las heces se recolectaron durante el mismo período por separado. Todas las muestras se almacenaron a -20°C durante el período de recolección antes del análisis. La resistencia ósea se determinó a partir de los metacarpianos.

Tabla 10.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	fitasa BP17 125 FTU/kg
4	fitasa BP17 250 FTU/kg
5	fitasa BP17 1,500 FTU/kg

Tabla 10.2: Composición de la dieta

	Control positivo	Control negativo
Maíz	624,0	635,0
Harina de soja (47,5%)	330,0	330,0
Retención de Ca	20,0	20,0
Sal	4,0	4,0
Piedra caliza (36% de Ca)	8,0	12,5
Fosfato dicálcicoa	11,0	0,0
Premezcla de mineral traza ^d	3,0	3,0
Premezcla de fitasa ^e	-	0,0/125/250/1.500
<i>Nutrientes y energía calculados</i>		

	Control positivo	Control negativo
Proteína, g/kg	208,5	208,5
Nutrientes y energía calculados		
DE, kcal/kg	3417	3440
Ca, g/kg	7,0	6,0
P, g/kg	6,0	4,0
<i>* la mezcla de enzimas se reemplaza con una cantidad mínima de maíz</i>		

10.2 Resultados

5 En la Tabla 10.3 se muestran P óseo, Ca óseo, ceniza de hueso y retención de Ca. A partir de una inclusión de fitasa BP17 a 250 FTU se halló una mejora en Ca óseo (0,4%) y ceniza de hueso (7%) en comparación con el control negativo. Para la retención de Ca se halló una mejora para la inclusión de fitasa BP17 a 125 FTU (21%) en comparación con el control negativo. Para P óseo y ceniza de hueso la inclusión de 1,500 FTU/kg retornó el rendimiento al nivel del control positivo.

Tabla 10.3 Parámetros óseos y retención de Ca

	PC	NC	Fitasa BP17 125 FTU/kg	Fitasa BP17 250 FTU/kg	Fitasa BP17 1500 FTU/kg
retención de Ca, %	72,6v	32,2x	39,1xy	48,4yz	57,9z
P óseo, %	18,4y	17,9x	17,9x	17,9x	18,1xy
Ca óseo, %	41,1	40,5	40,4	40,7	40,9
Ceniza de hueso, %	36,5z	29,7x	28,8x	31,8y	34,7z

Ejemplo 11: Rendimiento del alimento para animales en cerdos de crecimiento-finalización

10 El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de cerdos de crecimiento-finalización con los siguientes parámetros: digestibilidad de fosfato, calcio, nitrógeno, energía, y DM, y crecimiento, ingesta de alimentos y FCR.

11.1 Materiales y procedimientos

15 Se asignaron 72 cerdos de crecimiento-finalización (40-60kg de peso corporal) a 6 tratamientos con 12 replicados. Los cerdos se alimentaron con una dieta de puré comercial estándar antes de comenzar la prueba. La dieta de control positivo fue una dieta de harina de cebada, trigo y soja formulada con 0,54% de P y 0,68% de Ca. La dieta de control negativo se basó en la dieta de harina de cebada, trigo y soja con inclusión de 0,37% de P y 0,59% de Ca y se administró sin suplemento o suplementada con BP17 250, 500, 1.000 y 2.000 FTU/kg. El alimento y el agua estaban libremente disponibles.

20 La orina y las heces se recolectaron del día 5 al 7. Todas las muestras se recolectaron en recipientes con control ambiental. Las muestras se almacenaron a -20°C y se mezclaron para cada animal para el análisis de digestibilidad. Se calculó la digestibilidad total del tracto de P, Ca, N, energía y DM, además de DE. Se calculó el rendimiento de los cerdos.

Tabla 11.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	fitasa BP17 250 FTU/kg
4	fitasa BP17 500 FTU/kg
5	fitasa BP17 1.000 FTU/kg
6	fitasa BP17 2.000 FTU/kg

Tabla 11.2: Composición de la dieta

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Trigo (11,3%CP)	35	36,11
Cebada	40,8	41,46
Harina de soja 48% CP	12,01	12,76
Harina de colza	5	3,5
Grasa blanca de elección	3,13	2,65
L-lisina HCl	0,28	0,27
DL-metionina	0,04	0,05
L-treonina	1	0,04
Marcador inerte	0,43	1
Bicarbonato de sodio	0,14	0,42
Sal	0,14	0,14
Piedra caliza	0,84	1,2
Fosfato dicálcico	0,89	0
Premezcla de mineral traza /vitamina	0,4	0,4
BP17BP17 (FTU/kg de alimento para animales	-	0/250/500/1.000/2.000
Análisis calculado		
Proteína bruta (%)	16,2	16,2
DE kcal/kg (MJ/kg)	3250 (13,6)	3250 (13,6)
NE kcal/kg (MJ/kg)	2308 (9,66)	2303 (9,64)
Calcio	0,68	0,59
P total (%)	0,54	0,37
Lisina digerible (%)	0,80	0,79
Metionina (%)	0,28	0,29
Metionina digerible (%)	0,25	0,26
Metionina + Cisteína (%)	0,60	0,60
Metionina+ cisteína digerible	0,48	0,49
Fósforo disponible	0,30	0,14
Sodio	0,21	0,20

11.2 Resultados

La inclusión de fitasa BP17 mejoró la digestibilidad del tracto total de P (en hasta 135%), Ca (en hasta 28,1%), N (en hasta 3,3%), DM (en hasta 2,1%), y DE (en hasta 40 kcal; Tabla 11,3). En la Tabla 11,4, se muestra el rendimiento para los cerdos. Se observaron mejoras en ADG (hasta 58%) y FCR (hasta 2%) después de la inclusión de fitasa BP17, sin influir en la ingesta de alimentos para los cerdos.

5

Tabla 11.3 Mejoras de digestibilidad con BP17 en cerdos de crecimiento-finalización

	NC	Fitasa BP17 250 FTU/kg	Fitasa BP17 500 FTU/kg	Fitasa BP17 1000 FTU/kg	Fitasa BP17 2000 FTU/kg
Dig DM, %	82,5x	83,9y	84,0y	83,9y	84,2y
Dig N, %	81,9x	84,4y	84,1y	84,6y	84,5y

	NC	Fitasa BP17 250 FTU/kg	Fitasa BP17 500 FTU/kg	Fitasa BP17 1000 FTU/kg	Fitasa BP17 2000 FTU/kg
Dig Ca., &	54,3x	67,7y	69,3y	68,4y	69,6y
Dig P., %	25,9x	51,5y	53,8yx	57,2zv	61,0v
DE (kcal/kg)	3411	3449	3439	3451	3446

Tabla 11.4 Rendimiento de dietas administradas a cerdos de crecimiento-finalización que contienen BP17

	NC	Fitasa BP17 250 FTU/kg	Fitasa BP17 500 FTU/kg	Fitasa BP17 1000 FTU/kg	Fitasa BP17 2000 FTU/kg
ADG, q	298x	443y	465y	450y	472y
ADFI, kg	1,43	1,43	1,39	1,41	1,4
FCR	5,22y	3,45x	3,11x	3,19x	3,12x
G:F	0,211x	0,312y	0,334y	0,322y	0,333y

Ejemplo 12 - Rendimiento del alimento para animales en cerdos de crecimiento-finalización

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en a prueba de crecimiento de cerdos de crecimiento-finalización sobre la digestibilidad de las cenizas.

5 12.1 Materiales y procedimientos

Se asignaron 45 cerdos de crecimiento-finalización cultivo (40-60 kg de peso corporal). a 5 tratamientos con 9 replicados. Los cerdos se alimentaron con una dieta granulada comercial estándar antes de comenzar el ensayo. La dieta de control positivo fue una dieta de harina de maíz/soja formulada con 0,64% de P y 0,5% de Ca. La dieta de control negativo se basó en una harina de maíz /soja formulada con 0,45% de P y 0,4% de Ca, esta se administró sin suplemento o suplementada con Fitasa BP17 a 250, 1.000 o 2.000 FTU/kg de alimento para animales. El alimento y el agua estaban disponibles libremente. Las heces se recolectaron en la tercera semana durante tres días mediante muestreo simple. Las muestras se almacenaron en un refrigerador (4°C) y se mezclaron para cada animal para el análisis de digestibilidad. Se calculó la digestibilidad total de las cenizas del tracto.

10

Tabla 12.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	fitasa BP17 250 FTU/kg
4	fitasa BP17 1.000 FTU/kg
5	fitasa BP17 2.000 FTU/kg

15

Tabla 12.2: Composición de la dieta

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Maíz	57,33	58,67
Melazas de caña	4	4
Harina de soja 48% CP	12,5	12,5
Harina de colza	12,5	12,5
Ext de harina de girasol	6	6
Aceite de hígado de bacalao	2,23	1,76
L-lisina HCl	0,2	0,2

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
L-triptofano	0,1	0,1
Sal	0,25	0,25
Piedra caliza	0,58	0,57
Fosfato monocálcico	0,9	0,05
Premezcla de traza mineral/vitamina	0,4	0,4
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	-	0/250/1.000/2.000
Análisis calculado		
Proteína bruta (%)	17,3	17,4
DE kcal/kg (MJ/kg)	3178 (13,3)	3178 (13,3)
NE kcal/kg (MJ/kg)	2251 (9,42)	2248 (9,41)
Calcio	0,5	0,4
P total (%)	0,64	0,45
Lisina digerible (%)	0,79	0,79
Metionina (%)	0,3	0,3
Metionina digerible (%)	0,28	0,28
Metionina + Cisteína (%)	0,65	0,65
Metionina+ cisteína digerible	0,51	0,52
Fósforo disponible	0,32	0,13
Sodio	0,13	0,13

12.2 Resultados

En la tabla 12.3, se muestra la digestibilidad total del tracto de las cenizas. La inclusión de la fitasa BP17 aumentó la digestibilidad de la ceniza (en hasta 29%), lo que sugiere una mejora en la resistencia ósea (mineralización ósea).

Tabla 12.3 Mejora de la digestibilidad de las cenizas con fitasa BP17

	Control negativo	fitasa BP17 250 FTU/kg	fitasa BP17 1000 FTU/kg	fitasa BP17 2000 FTU/kg
Cenizas digestibilidad (%)	31,2x	37y	38,1y	40,2z

5 Ejemplo 13: Rendimiento del alimento para animales en cerdos de crecimiento-finalización

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de cerdos de crecimiento-finalización con los siguientes parámetros: retención de nutrientes de Ca.

13.1 Materiales y procedimientos

10 Se asignaron 54 cerdos de crecimiento-finalización cultivo (más de 35 kg de peso corporal). a 6 tratamientos con 9 replicados. Los cerdos se alimentaron con una dieta de puré comercial estándar antes de comenzar el ensayo. La dieta de control positivo fue una dieta de harina de trigo/soja formulada con 0,57% de P y 0,53% de Ca. La dieta de control negativo se basó en una harina de trigo /soja formulada con 0,37% de P y 0,40% de Ca, esta se administró sin suplemento o suplementada con Fitasa BP17 a 250, 500, 1.000 o 2.000 FTU/kg de alimento para animales durante 14 días, El alimento y el agua estaban disponibles libremente.

15 Las heces y orina se recolectaron durante cuatro días por separado. Las muestras se almacenaron en un congelador (-20°C) y se mezclaron para cada animal para el análisis de retención.

ES 2 736 036 T3

Tabla 13.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	fitasa BP17 250 FTU/kg
4	fitasa BP17 500 FTU/kg
5	fitasa BP17 1.000 FTU/kg
6	fitasa BP17 2.000 FTU/kg

Tabla 13.2: Composición de la dieta

La formulación de la dieta puede necesitar revisión según la edad/peso del cerdo		
Dieta (intervalo de edad 14-42 días)	Control positivo	Control negativo
Ingredientes en %		
Trigo	71,33	73,00
Harina de soja	22,60	22,16
Aceite de canola	2,21	1,75
Dical (20% de Ca; 18,5% de P)	1,07	0,00
Piedra caliza (36% de Ca)	0,30	0,58
Sal	0,30	0,30
Lisina.HCl	0,33	0,34
DL-Metionina	0,04	0,04
L-Treonina	0,13	0,13
Celite	1,00	1,00
Premezcla V/TM	0,70	0,70
PREMEZCLA FITASA**		
TOTAL	100	100
Nutrientes y energía calculados		
Proteína, %	19,45	19,45
DE, Mj/kg	14,32	14,32
Ca, %	0,53	0,40
P, %	0,57	0,37
Dig. P %	0,25	0,12
Aminoácidos digeribles, %		
Lys	1,04	1,04
Met	0,29	0,29
Met+Cys	0,56	0,57
Thr	0,65	0,65
Trp	0,20	0,20
Aminoácidos totales, %		
Lys	1,15	1,15

Met	0,31	0,31
Met+Cys	0,65	0,65
Thr	0,78	0,78
Aminoácidos totales, %		
Trp	0,23	0,23
<p>^a Proporciona lo siguiente por kg de premezcla: vitamina A 1.650.000 IU, vitamina D 165, 000 IU, vitamina E 8.000, menadiona 800 mg, tiamina 200 mg, riboflavina 1.000 mg, niacina 7.000 mg, ácido d-pantoténico 3.000 mg, vitamina B12 5 mg, biotina 40 mg y ácido fólico 400 mg.</p> <p>^b Proporciona los siguiente por kg de premezcla: cobre 10 g, hierro 16 g, manganeso 5 g, zinc 20 g, yodo 100 mg, selenio 20 m</p> <p>** Premezcla de Fitasa reemplazó la cantidad mínima de trigo</p>		

13.2 Resultados

En la Tabla 13.3, se muestra la retención de Ca (%). La inclusión de fitasa BP17 aumentó la retención de Ca en hasta 40% respecto de la NC.

5 Tabla 13.3 Retención de calcio de los cerdos de crecimiento-finalización alimentados con dietas que contienen fitasa BP17

	Control negativo	fitasa BP17 250 FTU/kg	fitasa BP17 500 FTU/kg	fitasa BP17 1000 FTU/kg	fitasa BP17 2000 FTU/kg
Retención de calcio (%)	51,5x	64,1y	67,2y	71,9z	67,7yz

Ejemplo 14: Rendimiento del alimento para animales en cerdas lactantes

El rendimiento de BP17BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de rendimiento de cerdas con los siguientes parámetros: digestibilidad de DM, Ca, P, proteína y energía.

14.1 Materiales y procedimientos

10 Se asignaron 56 cerdas lactantes a 7 tratamientos con 8 replicados. Las cerdas se alimentaron con una dieta de gestación y lactancia comercial adecuada en P y Ca. La dieta de control positivo es a base de soja y maíz formulada con 0,67% de P y 0,68% de Ca. 4 días después de parir las cerdas se alimentaron con una dieta de control negativo a base de maíz/soja y formulada con 0,48% de P y 0,54% de Ca en forma de pellet. Esta dieta se administró sin suplemento o suplementada con fitasa BP17 250, 500, 750, 1.000 y 2.000 FTU/kg. El agua estaba disponible ad libitum.

15

Las heces se recolectaron en el día 17 durante tres días. Todas las muestras se recolectaron en contenedores con control ambiental. Las muestras se almacenaron en un congelador se mezclaron para cada animal para el análisis de digestibilidad. Se determinaron cenizas, Ca, P y CP.

Tabla 14.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	fitasa BP17 250 FTU/kg
4	fitasa BP17 500 FTU/kg
5	fitasa BP17 750 FTU/kg
6	fitasa BP17 1.000 FTU/kg
7	fitasa BP17 2.000 FTU/kg

Tabla 14.2. Composición de la dieta

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Maíz	51,51	52,96
Melazas de caña	4	4
Harina de soja 48% CP	14,55	14,43
Cáscaras de soja	3	3
Harina de colza	8	8
Ext de harina de girasol	8,5	8,5
Sebo	3,77	3,3
Lisina 20%	0,46	0,46
Sal	0,28	0,28
Piedra caliza	0,52	0,51
Fosfato monocálcico	1,14	0,29
Premezcla de traza mineral/vitamina	1,25	1,25
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	-	0/250/500/750/1.000/2,00 0
Análisis calculado		
Proteína bruta (%)	17,5	17,5
DE kcal/kg (MJ/kg)	3130 (13,1)	3154 (13,2)
NE kcal/kg (MJ/kg)	2258 (9,45)	2256 (9,44)
Calcio	0,68	0,54
P total (%)	0,67	0,48
Lisina digerible (%)	0,74	0,74
Metionina (%)	0,30	0,30
Metionina digerible (%)	0,28	0,28
Metionina + Cisteína (%)	0,63	0,63
Metionina+ cisteína digerible	0,49	0,49
Fósforo disponible	0,37	0,18
Sodio	0,14	0,14

14.2 Resultados

En la Tabla 14.3. se muestra la digestibilidad de todos nutrientes. La inclusión de fitasa BP17 mejoró la digestibilidad de Ca (en hasta 24,8%), cenizas (en hasta 15%), P (en hasta 75%) y CP (en hasta 1,3%).

5

Tabla 14.3 Digestibilidad de todos los nutrientes

	NC	fitasa BP17 250 FTU/kg	fitasa BP17 500 FTU/kg	fitasa BP17 750 FTU/kg	fitasa BP17 1000 FTU/kg	fitasa BP17 2000 FTU/kg
DM	83	82,7	82,9	83	82,9	83,1
Cenizas	32,5 ^x	35,2 ^y	36,0 ^y	36,4 ^{yx}	36,1 ^{yz}	37,4 ^y
CP	84	84,7	84,3	84,7	84,8	85,1
GE	86,5	85,9	86,9	85,9	85,9	86
P	30,1 ^x	44,7 ^y	48,9 ^z	49,2 ^z	50,4 ^{zv}	52,7 ^v
Ca	28,6	32,1	35,7	35,1	34,5	35,4

Ejemplo 15: Rendimiento en el alimento para animales en lechones

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de lechones con los siguientes parámetros: digestibilidad de fosfato, calcio y DM y retención de fosfato y calcio.

15.1 Materiales y procedimientos

- 5 Se asignaron 70 lechones destetados de género mixto (10-13 kg de peso corporal) a 7 tratamientos con 10 replicados (un lechón por replicado). Los lechones se alimentaron con una dieta de control comercial con BP17 añadida a (250 FTU/kg a 2000 FTU/kg). Las dietas se alimentaron en forma de pellets durante 12 días. La dieta de control positivo se basó en cebada y maíz y se formuló con una inclusión de 0,63% de P y 0,70% de Ca. La dieta de control negativo se basó en maíz y cebada y se formuló con 0,45% de P y 0,57% de Ca. Las dietas no contenían promotores de crecimiento antimicrobianos ni ninguna otra alternativa.
- 10

Las heces y orina se recolectaron por separado desde el día 8-12 en cada período experimental. La orina se recolectó en HCl para minimizar la evaporación de nitrógeno. Las heces se recolectaron dos veces por día. Todas las muestras se congelaron (-18°C) y se mezclaron al final del experimento para cada animal. Posteriormente se realizó el análisis de digestibilidad.

15

Tabla 15.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	fitasa BP17 250 FTU/kg
4	fitasa BP17 500 FTU/kg
5	fitasa BP17 750 FTU/kg
6	fitasa BP17 1.000 FTU/kg
7	fitasa BP17 2.000 FTU/kg

Tabla 15.2: Composición de la dieta (%) administrada

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Maíz	20,48	21,77
Cebada	45	45
Melazas de caña	1	1
Ext de harina de girasol.	4	4
Suero deshidratado	5	5
Concentrado de proteína de soja	4,5	4,5
Aceite de soja	3,31	2,89
DL-metionina	0,12	0,12
Relleno inerte	3	3
Sal	0,39	0,39
Piedra caliza	0,93	0,93
Fosfato monocálcico	1,05	0,18
Premezcla de mineral traza/vitamina	2,14	2,14
Harina de soja 47% CP	8,5	8,5
L-lisina HCl 79%	0,43	0,43
L-treonina 98%	0,09	0,09
L-triptofano 98%	0,03	0,03
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	-	0/250/500/750/1.000/2.000

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Análisis calculado		
Proteína bruta (%)	16,02	16,13
DE kcal/kg (MJ/kg)	3178 (13,3)	3178 (13,3)
NE kcal/kg (MJ/kg)	2265 (9,48)	2263 (9,47)
Calcio	0,85	0,72
P total (%)	0,6	0,4
Lisina digerible (%)	0,9	0,9
Metionina (%)	0,3	0,3
Metionina digerible (%)	0,3	0,3
Metionina + Cisteína (%)	0,6	0,6
Metionina+ cisteína digerible	0,54	0,54
Fósforo disponible	0,3	0,19
Sodio	0,22	0,22

15.2 Resultados

La inclusión de fitasa BP17 mejoró la digestibilidad de P y Ca, así la retención de P y Ca (Tabla 15.3). La suplementación de una dieta de control negativo con fitasa BP17 mejoró la digestibilidad de Calcio (en 47,8 a 54,0%) y Fósforo (en 82,8 a 107,1%). BP17 también mejoró la retención de Calcio (en 42,1 a 54,9%) y Fósforo (en 98,3 a 122,2%).

5

Tabla 15.3 Mejoras de digestibilidad y retención con fitasa BP17

	NC	BP17 250 FTU/kg	BP17 500 FTU/kg	BP17 750 FTU/kg	BP17 1.000 FTU/kg	BP17 2.000 FTU/kg
Dig DM, %	73,2	73,2	73,6	74,2	74,1	73,4
Dig. cenizas,	31,1x	37,6y	37,8yz	38,6yzv	39,4zv	39,7v
Dig. Ca, %	44,8x	66,2y	64,7y	65,9y	68,7y	69,0y
Dig. P, %	32,5x	59,4y	62,0yz	63,8zv	66,0vw	67,3W
Ret Ca, %	43,0x	61,1y	61,6y	62,7yz	66,6Z	66,6z
Ret P, %	29,8x	59,1y	61,6yz	63,3zv	65,3v	66,2v

xyzvw Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05).

Ejemplo 16: Rendimiento en el alimento para animales en lechones

El rendimiento de BP17 en el alimento para animales se evaluó en una prueba de crecimiento de lechones con los siguientes parámetros: digestibilidad de fosfato, calcio, DM y energía.

10 16.1 Materiales y procedimientos

48 lechones destetados de género mixto (10-14 kg de peso corporal) se asignaron a 6 tratamientos con 8 replicados (un lechón por replicado). Los lechones se alimentaron con una dieta de control comercial con BP17 añadida a (250 FTU/kg a 2000 FTU/kg). Las dietas se administraron como purés durante 14 días. La dieta de control positivo era a base de harina de trigo y soja y formulada con la inclusión de 0,66% de P y 0,75% de Ca. La dieta de control negativo se basó en harina de trigo y soja y se formuló con 0,50% de P y 0,55% de Ca. Las dietas no contenían promotores de crecimiento antimicrobianos ni ninguna otra alternativa.

15

Las heces se recolectaron desde el día 10-14 en cada periodo experimental dos veces por día. Todas las muestras se congelaron (-18°C) y se mezclaron al fin del experimento para cada animal. Posteriormente se realizó el análisis de digestibilidad.

20

Tabla 16.1: Diseño experimental

Tratamiento	Nivel
1	Control positivo
2	Control negativo
3	fitasa BP17 250 FTU/kg
4	fitasa BP17 500 FTU/kg
5	fitasa BP17 1.000 FTU/kg
6	fitasa BP17 2.000 FTU/kg

Tabla 16.2: Composición de la dieta (%) administrada

Ingredientes	Control positivo	Control negativo
Trigo	37,59	38,49
Cebada	17,11	17,11
Harina de canola	6,00	6,00
Peas	5,00	5,00
Suero deshidratado	7,96	7,96
Harina de soja 47%CP	22,00	22,00
Aceite vegetal	1,00	1,00
DL-metionina	0,04	0,04
Relleno inerte	0,30	0,30
Piedra caliza	0,83	0,83
Fosfato dicálcico	1,00	0,10
Premezcla de mineral traza/vitamina	1,00	1,00
L-lisina HCl 79%	0,06	0,06
L-treonina 98%	0,11	0,11
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	-	0/250/500/1.000/2.000
Análisis calculado	Control positivo	Control negativo
[VOLUMEN]	100,00	100,00
MAT SECO (%)	88,94	88,83
PROTEÍNA (%)	21,15	21,25
CFAT (%)	2,62	2,64
CFIBRE (%)	3,21	3,23
CENIZAS (%)	6,59	5,72
DE PIG (MJ/kg)	13,66	13,78
TLISINA (%)	1,17	1,18
METH (%)	0,35	0,36
M+C (%)	0,75	0,75
CALCIO (%)	0,84	0,63
TPHOS (%)	0,64	0,48
Dig. P (%)	0,30	0,19
FITATO P (%)	0,27	0,27
AV FOS (%)	0,38	0,22
NA (%)	0,10	0,10

16.2 Resultados

La inclusión de fitasa BP17 mejoró la digestibilidad de P, DM y GE (Tabla 16.3). La suplementación de una dieta de control negativo con fitasa BP17 mejoró la digestibilidad de Fósforo (en 106,7 a 149,6%), DM (en 0,1 a 4,3%) y GE (en 0,7 a 5,1).

5 Tabla 16.3 Mejoras de la digestibilidad con fitasa BP17

	NC	BP17 250 FTU/kg	BP17 500 FTU/kg	BP17 1.000 FTU/kg	BP17 2.000 FTU/kg
Dig DM, %	77,4x	79,6y	7,5xy	80,3z	80,7z
Dig GE, %	75,0x	77,9yz	75,5xy	78,2z	78,8z
Dig. Ca, %	56,3	63,0	62,5	67,6	66,6
Dig. P, %	28,4x	58,7y	64,1yz	67,9z	70,9z

^{xyz} Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05).

Ejemplo 17: Rendimiento en el alimento para animales en pollos de engorde

Sumario de resultados:

La BP17 mostró superior digestibilidad de fósforo y aminoácido ileal, retención de fósforo y digestibilidad del calci en comparación con an Fitasa de *E. coli*.

- 10
- BP17 fue en promedio, un 156% más efectivo que la fitasa de *E. coli* sobre la base de la curva exponencial para la retención de fósforo.
 - BP17 a 699 FTU/kg de alimento para animales fue equivalente a 1,2 g/kg de alimento para animales de P de MCP, mientras que, en contraste, se requirieron 2311 FTU/kg de alimento para animales de fitasa de *E. coli* sobre la base del fósforo retenido.
- 15
- BP17 proporcionó superior digestibilidad de proteínas y aminoácidos en comparación con la fitasa de *E. coli*.

Resultados:

La equivalencia de BP17 en FTU en comparación con 1 FTU de la fitasa de *E. coli* para P digerible ileal (g/kg de dietaa) y P retenido (dieta de g/kg) y bioeficacia relativa de BP17 versus la fitasa de *E. coli*. Los resultados de este ejemplo se muestran en la Figura 15.

20 Tabla 17.1: Digestibilidad de fósforo y aminoácido ileal

	250 FTU	500 FTU	750 FTU	1000 FTU	Promedio
P digerible ileal	0,96 +4%	0,78 +28%	0,64 +56%	0,53 +89%	0,73 +37%
P retenido	0,40 +150%	0,39 +156%	0,38 +163%	0,37 +170%	0,39 +156%

Niveles (FTU/kg de alimento para animales) de BP17 y la Fitasa de *E. coli* equivalente a 0,6 g o 1,2 g/kg de alimento para animales de P de MCP.

Tabla 17.2: Comparación de digestibilidad de fósforo y aminoácido ileal de las fitasas

	0,6 g P de MCP			1,2 g P de MCP*		
	P digerible ileal (g/kg de dieta)	P retenido (g/kg de dieta)	Media	P digerible ileal (g/kg de dieta)	P retenido (g/kg de dieta)	Media
Fitasa de <i>E. coli</i>	467	629	548 (100)	-	2311 (100)	-
BP17	374	242	308 (56)	963	699 (30)	-

*Si el nivel de rendimiento del MCP no se alcanzó, no se pudo calcular una equivalencia y, por lo tanto, se muestra un -

ES 2 736 036 T3

Tabla 17.3: Digestibilidad ileal de nutrientes (%; día 20)

	Fitasa (FTU/kg de alimento para animales)					NC + 0,6 g P	NC + 1,2 g P	NC +1,8 g P
	0	250	500	750	1000			
Fósforo								
Fitasa de <i>E. coli</i>	59,1 ^e	65,2 ^d	68,8 ^{bc}	57,6 ^{ed}	68,6 ^{bc}	52,7 ^g	52,7 ^g	55,8 ^f
BP17		65,5 ^d	67,8 ^{bc}	71,5 ^{ab}	73,9 ^a			
Proteína bruta								
Fitasa de <i>E. coli</i>	78,5 ^{cd}	79,2 ^{bcd}	79,0 ^{bcd}	79,4 ^{abc}	79,7 ^{ab c}	77,5 ^d	78,7 ^{cd}	78,3 ^{cd}
BP17		78,1 ^{cd}	79,8 ^{abc}	80,7 ^{ab}	81,3 ^a			
Aminoácidos totales								
Fitasa de <i>E. coli</i>	80,6 ^{cd}	81,3 ^{bcd}	81,3 ^{bcd}	81,6 ^{bc}	82,0 ^{ab c}	79,6 ^d	81,1 ^{cd}	80,8 ^{cd}
BP17		80,7 ^{cd}	82,2 ^{abc}	83,0 ^{ab}	83,6 ^a			
Lisina (%)								
Fitasa de <i>E. coli</i>	84,3 ^{bc de}	84,6 ^{abcd}	84,4 ^{bcd}	84,5 ^{abcd}	84,8 ^{ab cd}	82,9 ^e	83,8 ^{cde}	83,6 ^{de}
BP17		83,9 ^{cde}	85,1 ^{abc}	85,7 ^{ab}	5,9 ^a			
Metionina (%)								
Fitasa de <i>E. coli</i>	89,6	90,8	90,4	90,6	90,9	89,7	90,6	90,7
BP17		90,1	91,1	91,4	92,2			
Treonina (%)								
Fitasa de <i>E. coli</i>	72,1	73,0	72,7	73,3	73,5	71,0	72,8	72,5
BP17		72,4	73,8	74,4	75,0			
a,b,c Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)								

Tabla 17.4: Digestibilidad del tracto total del calcio (%)

	Fitasa (FTU/kg de alimento para animales)					NC + 0,6 g P	NC + 1,2 g P	NC +1,8g P
	0	250	500	750	1000			
Calcio total								
Fitasa de <i>E. coli</i>	44,9 ^e	48,1 ^d	53,6 ^{bc}	54,0 ^{bc}	54,7 ^b	44,9 ^e	52,0 ^{bc}	52,2 ^{bc}
BP17		46,7 ^{de}	51,9 ^c	53,4 ^{bc}	57,6 ^a			
a,b,c Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)								

Tabla 17.5: Dietas: (kg/tonelada) según se administra

	Control negativo	NC + 0,6 g P*	NC + 1,2 g P*	NC + 1,8 g P*
Maíz	560,3	560,3	560,3	560,3
Harina de gluten de maíz 60	14,8	14,8	14,8	14,8
Harina de soja 48% CP	300,5	300,5	300,5	300,5

	Control negativo	NC + 0,6 g P*	NC + 1,2 g P*	NC + 1,8 g P*
Harina de colza	38	38	38	38
Almidón de maíz/trigo	2,5	2,5	2,5	2,5
Aceite de soja	21,1	21,1	21,1	21,1
Grasa de cerdo/aves de corral	20	20	20	20
L-Lisina HCl	1,69	1,69	1,69	1,69
DL-metionina	2,24	2,24	2,24	2,24
L-treonina	0,37	0,37	0,37	0,37
Bicarbonato de sodio	1,67	1,67	1,67	1,67
Sal	2,44	2,44	2,44	2,44
Piedra caliza	13,68	14,63	13,55	12,47
Fosfato monocálcico	1,001	3,668	6,334	9,001
Aves de corral Vits/TE's	5,0	5,0	5,0	5,0
Diamol	14,73	11,12	9,53	7,94
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	0/250/500/75 0/1000	-	-	-
Fitasa de <i>E. coli</i> (FTU/kg de alimento para animalesT)	0/250/500/75 0/1000	-	-	-
Proteína bruta (%)	21,54	21,54	21,54	21,54
ME kcal/kg (MJ/kg)	3102 (12,98)	3102 (12,98)	3102 (12,98)	3102 (12,98)
Calcio (%)	0,70	0,79	0,79	0,79
P total (%)	0,42	0,48	0,54	0,60
P digerible (%)	0,16	0,22	0,27	0,32
Fitato P (%)	0,26	0,26	0,26	0,26
P disponible (%)	0,15	0,21	0,27	0,33
Lisina (%)	1,25	1,25	1,25	1,25
Lisina digerible (%)	1,08	1,08	1,08	1,08
Metionina (%)	0,57	0,57	0,57	0,57
Metionina digerible (%)	0,55	0,55	0,55	0,55
Metionina + cisteína (%)	0,94	0,94	0,94	0,94
Metionina digerible + cisteína (%)	0,80	0,80	0,80	0,80
* Suministrado de MCP, tasa de dosis planificadas				

Diseño de la prueba:

288 pollos de engorde Ross 308 machos se asignaron a 12 tratamientos con 6 replicados de jaula por tratamiento (4 aves por jaula). Todas las aves recibieron una dieta estándar durante los primeros 5 días: Proteína bruta 21,5%; AME 2900 kcal/kg (12,1 MJ/kg). La dieta de control negativo (NC) se basó en la harina de maíz/soja y tenía contenido reducido de fósforo (0,42% de fósforo total, 0,15% de fósforo disponible) y se suplementó con BP17 o una fitasa de *E. coli* a 250, 500, 750 o 1000 FTU/kg de alimento para animales. Las dosis del alimento para animales se verificaron en 2 laboratorios después de la dosificación y los niveles analizados reales posteriormente se utilizaron para todos los modelos posteriores. Las 3 dietas de control positivo contenían adiciones incrementales de fosfato monocálcico (+0.6, +1,2 y +1,8 g/kg de P de alimento para animales) a la formulación de NC. Todas las dietas se administraron como puré desde los días 5-20. Los excrementos se recolectaron de cada jaula los días 17-20 para la determinación de la digestibilidad del calcio y la retención de fósforo. En el día 20, todas las aves se sacrificaron y se tomaron contenidos ileales para la determinación de la digestibilidad de fósforo, proteína y aminoácidos ileales.

Las relaciones de dosis-respuesta se determinaron utilizando un modelo exponencial de la forma: $Y=A + B \cdot R^x$ donde Y = parámetro de respuesta, A = valor de asíntota superior, B = valor de respuesta máxima, R = parámetro de pendiente no lineal, X = actividad de fitasa dosificada (FTU/kg de alimento para animales).

- 5 Las equivalencias de BP17 y la fitasa de *E. coli* (en FTU/kg de alimento para animales) se calcularon tanto para el fósforo digestible ileal como para el fósforo retenido utilizando los datos de las dietas de control positivo que contienen adiciones incrementales de MCP. Al igual que con los datos de dosis-respuesta, una curva exponencial describe mejor esta relación y se usó para calcular las equivalencias del producto.

Ejemplo 18: Rendimiento en el alimento para animales en pollos de engorde

Sumario de resultados

- 10 BP17 mostró superior rendimiento, ceniza de tibia y AMEn en comparación con una Fitasa de *E. coli*
- BP17 fue en promedio, un 96% más efectivo que la fitasa de *E. coli* sobre la base de la curva exponencial para el contenido de ceniza de tibia
 - BP17 a 1000 FTU/kg de alimento pudo restaurar completamente la ganancia de peso corporal y la ceniza de tibia al nivel de las aves alimentadas con la dieta con 1,8 g P de MCP
- 15 • BP17 a 691 FTU/kg de alimento para animales fue equivalente a 1,2 g/kg de P de MCP mientras que, en contraste, 1372 FTU/kg de alimento para animales de la fitasa de *E. coli* fue equivalente a 1,2 g/kg de P de MCP.

Los resultados de este ejemplo se muestran en la Figura 16.

Tabla 18.1: Resultados: Ingestas de alimentos (g, 5-20 días)

	Fitasa (FTU/kg de alimento para animales)					NC +0,6 gP	NC +1,2 gP	NC +1,8g P
	0	250	500	750	1000			
fitasa de <i>E. coli</i>	944 ^g	1026 ^{ef}	1066 ^{cd}	1111 ^{ab}	1089 ^{bcd}	1004 ^f	1089 ^{b cd}	1134 ^a
BP17		1012 ^f	1057 ^{de}	1093 ^{bc}	1113 ^{ab}			

^{a,b,c} Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)

- 20 Tabla 18.2: Equivalencia de BP17 en FTU en comparación con 1 FTU de la Fitasa de *E. coli* para ganancia de peso corporal (5-20 días) y ceniza de tibia (día 20), y BP17 versus la Fitasa de *E. coli*.

	250 FTU	500 FTU	750 FTU	1000 FTU	Promedio
Ganancia de peso corporal	0,87	0,78	0,70	0,62	0,74
	+15%	+28%	+42%	+61%	+35%
Ceniza de tibia	0,53	0,52	0,51	0,49	0,51
	+89%	+92%	+96%	+104%	+96%

Tabla 18.3: Niveles (FTU/kg de alimento para animales) de BP17 y la Fitasa de *E. coli* equivalente a 0,6 g o 1,2 g/kg de alimento para animales de P de MCP.

	0,6 g P de MCP			1,2 g P de MCP		
	Ganancia de peso corporal (g)	Ceniza de tibia (g/kg DM)	Media	Ganancia de peso corporal (g)	Ceniza de tibia (g/kg DM)	Media
Fitasa de <i>E. coli</i>	355	682	519 (100)	1156	1588	1372 (100)
BP17	296	350	323(62)	659	722	691 (50)

Tabla 18.4: Dietas: (kg/tonelada) según se administra

	Control negativo	NC + 0,6g P*	NC + 1,2 g P*	NC + 1,8 g P*
Maíz	560,3	560,3	560,3	560,3
Harina de gluten de maíz 60	14,8	14,8	14,8	14,8
Harina de soja 48% CP	300,5	300,5	300,5	300,5
Harina de colza	38	38	38	38
Almidón de maíz/trigo	2,5	2,5	2,5	2,5
Aceite de soja	21,1	21,1	21,1	21,1
Grasa de cerdo/aves de corral	20	20	20	20
L-Lisina HCl	1,69	1,69	1,69	1,69
DL-metionina	2,24	2,24	2,24	2,24
L-treonina	0,37	0,37	0,37	0,37
Bicarbonato de sodio	1,67	1,67	1,67	1,67
Sal	2,44	2,44	2,44	2,44
Piedra caliza	13,68	14,63	13,55	12,47
Fosfato monocálcico	1,001	3,668	6,334	9,001
Aves de corral Vits/TE's	5,0	5,0	5,0	5,0
Diamol	14,73	11,12	9,53	7,94
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	0/250/500/750/1000	-	-	-
Fitasa de <i>E. coli</i> (FTU/kgT)	0/250/500/750/1000	-	-	-
Proteína bruta (%)	21,54	21,54	21,54	21,54
ME kcal/kg (MJ/kg)	3102 (12,98)	3102 (12,98)	3102 (12,98)	3102 (12,98)
Calcio (%)	0,70	0,79	0,79	0,79
P total (%)	0,42	0,48	0,54	0,60
P digerible (%)	0,16	0,22	0,27	0,32
Fitato P (%)	0,26	0,26	0,26	0,26
P disponible (%)	0,15	0,21	0,27	0,33
Lisina (%)	1,25	1,25	1,25	1,25
Lisina digerible (%)	1,08	1,08	1,08	1,08
Metionina (%)	0,57	0,57	0,57	0,57
Metionina digerible (%)	0,55	0,55	0,55	0,55
Metionina + cisteína (%)	0,94	0,94	0,94	0,94
Metionina digerible + cisteína (%)	0,80	0,80	0,80	0,80
Suministrada de MCP, ^T Niveles planificados para añadir				

Diseño de la prueba

288 pollos de engorde Ross 308 machos se asignaron a 12 tratamientos con 6 replicados de jaula por tratamiento (4 aves por jaula). Todas las aves recibieron una dieta estándar durante los primeros 5 días: Proteína bruta 21,5%; AME 2900 kcal/kg (12,1 MJ/kg). La dieta de control negativo (NC) se basó en la harina de maíz/soja y tenía contenido reducido de fósforo (0,42% de fósforo total, 0,15% de fósforo disponible) y se suplementó con BP17 o una fitasa de *E. coli* a 250, 500, 750 o 1000 FTU/kg alimento para animales. Las dosis del alimento para animales se verificaron en 2

laboratorios después de la dosificación y los niveles analizados reales se utilizaron para todos los modelos posteriores. Las 3 dietas de control positivo contenían adiciones incrementales de fosfato monocálcico (+0.6, +1,2 y +1,8 g/kg de P alimento para animales) a la formulación de NC. Todas las dietas se administraron como como puré desde los días 5-20. Las aves se pesaron los días 5 y 20 y se calculó el FCR. Los excrementos se recolectaron de cada jaula los días 17-20 para la determinación de AMEn. El día 20, todas las aves se sacrificaron y la tibia izquierda se diseccionó para determinar la ceniza de hueso.

Las relaciones de dosis-respuesta se determinaron utilizando un modelo exponencial de la forma: $Y=A + B \cdot R^x$ donde Y = parámetro de respuesta, A = valor de asíntota superior, B = valor de respuesta máxima, R = parámetro de pendiente no lineal, X = actividad de fitasa dosificada (FTU/kg de alimento para animales). Las equivalencias de BP17 y la fitasa de *E. coli* (en FTU/kg de alimento para animales) se calcularon tanto para la ganancia de peso corporal como la ceniza de tibia (%) utilizando los datos de las dietas de control positivo que contienen adiciones incrementales de MCP. Al igual que con los datos de dosis-respuesta, una curva exponencial describe mejor esta relación y se usó para calcular las equivalencias del producto.

Ejemplo 19: Rendimiento en el alimento para animales en pollos de engorde

Sumario de resultados:

BP17 mostró superior rendimiento, ceniza de tibia y digestibilidad de nutrientes en comparación con una Fitasa de *E. coli*.

- BP17 fue en promedio, 33-35% más efectivo que la fitasa de *E. coli* sobre la base de la curva exponencial para el contenido de ceniza de tibia y fósforo retenido
- BP17 a 1000 FTU/kg de alimento pudo restaurar completamente la ganancia de peso corporal FCR y ceniza de tibia al nivel de las aves alimentadas con la dieta con 1,8 g P de MCP
- BP17 a 656 FTU/kg de alimento para animales fue equivalente a 1,2 g/kg de P de MCP sobre la ganancia de peso corporal, ceniza de tibia y P retenido mientras que, en contraste, se requirieron 833 FTU/kg de alimento para animales de la fitasa de *E. coli* sobre la base de los mismos parámetros

Resultados:

Los resultados de este ejemplo se muestran en la Figura 17.

Tabla 19.1: Ingestas de alimentos (g, 5-20 días)

	fitasa (FTU/kg de alimento para animales)					NC +0,6 g P	NC +1,2 g P	NC +1,8g P
	0	250	500	750	1000			
fitasa de <i>E. coli</i>	885d	985 ^c	1074 ^{ab}	1072 ^{ab}	1087 ^a	1002 ^c	1087 ^a	1092 ^a
BP17		1000 ^c	1059 ^b	1 082 ^{ab}	1087 ^a			

^{a,b,c} Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)

La equivalencia de BP17 en FTU en comparación con 1 FTU de la fitasa de *E. coli* para ganancia de peso corporal (5-20 días), cenizas de tibia (día 20) y P retenido. La siguiente tabla muestra la bioeficacia relativa de BP17 versus la Fitasa de *E. coli*.

Tabla 19.2: Bioeficacia relativa de fitasas

	250 FTU	500 FTU	750 FTU	1000 FTU	Promedio
Ganancia de peso corporal	1,08 -8%	1,02 -2%	0,95 +5%	0,85 +18%	0,98 +2%
Ceniza de tibia	0,85+18%	0,79+27%	0,72+39%	0,63+59%	0,75+33%
P retenido	0,75+33%	0,74+35%	0,73+37%	0,72+39%	0,74+35%

ES 2 736 036 T3

Tabla 19.3: Niveles (FTU/kg de alimento para animales) de BP17 y la Fitasa de *E. coli* equivalente a 0,6 g o 1,2 g/kg de alimento para animales de P de MCP para peso corporal, ceniza de tibia y P retenido.

	0,6 g P de MCP				1,2 g P de MCP			
	Ganancia de peso corporal (g)	Ceniza de tibia (g/kg DM)	P retenido	Media	Ganancia de peso corporal (g)	Ceniza de tibia (g/kg DM)	P retenido	Media
Fitasa de <i>E. coli</i>	264	232	463	320 (100)	666	690	1144	833 (100)
BP17	284	199	343	275 (86)	648	508	813	656 (79)

Tabla 19.4: Digestibilidad ileal de nutrientes (% , día 20)

	fitasa (FTU/kg de alimento para animales)					NC +0,6g P	NC +1,2g P	NC +1,8g P
	0	250	500	750	1000			
Proteína bruta								
fitasa de <i>E. coli</i>	77,4 ^{fg}	78,4 ^{def}	79,3 ^{cde}	79,7 ^{bc}	80,7 ^{sb}	76,8 ^g	79,6 ^{bcd}	79,3 ^{cde}
BP17		78,2 ^{ef}	79,2 ^{cde}	81,4 ^a	81,1 ^a			
Aminoácidos totales								
fitasa de <i>E. coli</i>	80,0 ^{ef}	80,8 ^{de}	81,9 ^{cd}	82,3 ^{bc}	83,3 ^{ab}	79,3 ^f	82,1 ^c	81,9 ^{cd}
BP17		80,7 ^e	83,8 ^{9a}	81,8 ^{cd}	83,5 ^a			
Lisina (%)								
fitasa de <i>E. coli</i>	84,4 ^{de}	84,8 ^{cd}	85,4 ^{bc}	85,4 ^{bc}	86,2 ^{ab}	83,8 ^e	85,3 ^c	84,7 ^{cd}
BP17		84,6 ^{cd}	86,6 ^a	82,3 ^c	86,4 ^a			
Metionina (%)								
fitasa de <i>E. coli</i>	89,0 ^g	90,1 ^{de}	90,7 ^{bcde}	90,8 ^{bcd}	91,5 ^{ab}	89,2 ^{fg}	91,5 ^{abc}	91,1 ^{bc}
BP17		89,9 ^{ef}	92,0 ^a	90,6 ^{cde}	91,5 ^{ab}			
Treonina (%)								
fitasa de <i>E. coli</i>	71,0 ^g	72,8 ^{ef}	74,1 ^{de}	74,7 ^{bcd}	76,1 ^{ab}	71,4 ^{fg}	74,7 ^{bcd}	74,2 ^{cde}
BP17		73,0 ^{ef}	76,6 ^a	73,8 ^{de}	75,8 ^{abc}			
a,b,c Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)								

Tabla 19.5: Digestibilidad del tracto total de calcio y fósforo (%)

	Fitasa (FTU/kg de alimento para animales)					NC + 0,6 g P	NC + 1,2 g P	NC +1,8 g P
	0	250	500	750	1000			
Fósforo								
Fitasa de <i>E. coli</i>	59,3 ^e	61,4 ^{de}	63,5 ^{cd}	66,3 ^b	67,5 ^{ab}	54,8 ^f	53,1 ^{fg}	50,9 ^g
BP17		62,0 ^d	66,2 ^{bc}	68,7 ^{ab}	69,1 ^a			

ES 2 736 036 T3

	Fitasa (FTU/kg de alimento para animales)					NC + 0,6 g P	NC + 1,2 g P	NC +1,8 g P
	0	250	500	750	1000			
Calcio								
Fitasa de <i>E. coli</i>	45,8 ^e	45,6 ^e	48,3 ^d	51,8 ^{ab}	52,5 ^a	44,5 ^e	48,3 ^d	51,9 ^{ab}
BP17		44,3 ^e	48,9 ^{cd}	50,5 ^{bc}	51,9 ^{ab}			
a,b,c Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)								

Tabla 19.6: Dietas: (kg/tonelada) según se administra

	Control negativo	NC +0,6 g P*	NC +1,2 g P*	NC +1,8 g P*
Maíz	560,3	560,3	560,3	560,3
Harina de gluten de maíz 60	14,8	14,8	14,8	14,8
Harina de soja 48% CP	300,5	300,5	300,5	300,5
Harina de colza	38	38	38	38
Almidón de maíz/trigo	2,5	2,5	2,5	2,5
Aceite de soja	21,1	21,1	21,1	21,1
Grasa de cerdo/aves de corral	20	20	20	20
L-Lisina HCl	1,69	1,69	1,69	1,69
DL-metionina	2,24	2,24	2,24	2,24
L-treonina	0,37	0,37	0,37	0,37
Bicarbonato de sodio	1,67	1,67	1,67	1,67
Sal	2,44	2,44	2,44	2,44
Piedra caliza	13,68	14,63	13,55	12,47
Fosfato monocálcico	1,001	3,668	6,334	9,001
Aves de corral Vits/TE's	5,0	5,0	5,0	5,0
Diamol	14,73	11,12	9,53	7,94
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	0/250/500/750/1000	-	-	-
Fitasa de <i>E. coli</i> (FTU/kg)	0/250/500/750/1000	-	-	-
Proteína bruta (%)	21,54	21,54	21,54	21,54
ME kcal/kg (MJ/kg)	3102 (12,98)	3102 (12,98)	3102 (12,98)	3102 (12,98)
Calcio (%)	0,70	0,79	0,79	0,79
P total (%)	0,42	0,48	0,54	0,60
P digerible (%)	0,16	0,22	0,27	0,32
Fitato P (%)	0,26	0,26	0,26	0,26
P disponible (%)	0,15	0,21	0,27	0,33
Lisina (%)	1,25	1,25	1,25	1,25
Lisina digerible (%)	1,08	1,08	1,08	1,08
Metionina (%)	0,57	0,57	0,57	0,57
Metionina digerible (%)	0,55	0,55	0,55	0,55

	Control negativo	NC +0,6 g P*	NC +1,2 g P*	NC +1,8 g P*
Metionina +cisteína (%)	0,94	0,94	0,94	0,94
Metionina digerible + cisteína (%)	0,80	0,80	0,80	0,80
*Suministrado de MCP				

Diseño de la prueba:

288 pollos de engorde Ross 308 machos se asignaron a 12 tratamientos con 6 replicados de jaula por tratamiento (4 aves por jaula). Todas las aves recibieron una dieta estándar durante los primeros 5 días: Proteína bruta 21,5%; AME 2900 kcal/kg (12,1 MJ/kg). La dieta de control negativo (NC) se basó en la harina de maíz/soja y tenía contenido reducido de fósforo (0,42% de fósforo total, 0,15% de fósforo disponible) y se suplementó con BP17 o una fitasa de *E. coli* a 250, 500, 750 o 1000 FTU/kg alimento para animales. Las dosis del alimento para animales se verificaron en 2 laboratorios después de la dosificación y los niveles analizados reales se utilizaron para todos los modelos posteriores. Las 3 dietas de control positivo contenían adiciones incrementales de fosfato monocálcico (+0,6, +1,2 y +1,8 g/kg de P alimento para animales) a la formulación de NC. Todas las dietas se administraron como como puré desde los días 5-20. Las aves se pesaron los días 5 y 20 y se calculó el FCR. Los excrementos se recolectaron de cada jaula los días 17-20 para la determinación de la digestibilidad del Ca y P. En el día 20, todas las aves se sacrificaron y se disecó la tibia izquierda para la determinación de la ceniza de hueso. Los contenidos ileales también se tomaron para la medición de proteína y digestibilidad de aminoácidos.

Las relaciones de dosis-respuesta se determinaron utilizando un modelo exponencial de la forma: $Y=A + B \cdot R^x$ donde Y = parámetro de respuesta, A = valor de asíntota superior, B = valor de respuesta máxima, R = parámetro de pendiente no lineal, X = actividad de fitasa dosificada (FTU/kg de alimento para animales).

Las equivalencias de BP17 y la fitasa de *E. coli* (en FTU/kg de alimento para animales) se calcularon tanto para la ganancia de peso corporal como la ceniza de tibia (%) utilizando los datos de las dietas de control positivo que contienen adiciones incrementales de MCP. Al igual que con los datos de dosis-respuesta, una curva exponencial describe mejor esta relación y se usó para calcular las equivalencias del producto.

Ejemplo 20: Rendimiento del alimento para animales en pollos de engorde

Sumario de resultados:

BP17 mostró superior rendimiento y ceniza de tibia en comparación con Phyzyme® XP.

- BP17 fue en promedio, 82% más efectiva que la Phyzyme® XP sobre la base de la curva exponencial para el contenido de ceniza de tibia y 85% sobre la base de la ganancia de peso corporal
- BP17 a 500 FTU/kg de alimento para animales pudo restaurar completamente la ganancia de peso corporal y FCR al nivel de las aves alimentadas con la dieta con 1,8 g P de MCP y 1000 FTU/kg de alimento para animales pudo restaurar completamente ceniza de tibia
- BP17 a 468 FTU/kg de alimento para animales fue equivalente a 1,2 g/kg de alimento para animales de P de MCP mientras que, en contraste, se requirieron 988 FTU/kg de alimento para animales de la Phyzyme® XP sobre la base de la ganancia de peso corporal
- BP17 a 680 FTU/kg de alimento para animales fue equivalente a 1,2 g/kg de alimento para animales de P de MCP sobre la base de la ceniza de tibia, mientras que Phyzyme® XP no pudo alcanzar el nivel de respuesta de 1,2 g/kg de alimento para animales de P de MCP en el intervalo de dosis analizado

Los resultados de este ejemplo se muestran en la Figura 18.

Tabla 20.1: Resultados: Ingestas de alimentos (g, 5-20 días)

	Fitasa (FTU/kg de alimento para animales)					NC + 0,6 g P	NC + 1,2 g P	NC + 1,8 g P
	0	250	500	750	1000			
Phyzyme® XP	792 ^a	948 ^b	1012 ^c	1029 ^{cd}	1077 ^e	1011 ^c	1075 ^e	1063 ^{de}
BP17		1003 ^c	1037 ^{cd}	1059 ^{de}	1086 ^e			

La equivalencia de BP17 en FTU en comparación con 1 FTU de Phyzyme® XP para ganancia de peso corporal (5-20 días) y ceniza de tibia (día 20), y bioeficacia relativa de BP17 versus Phyzyme® XP.

ES 2 736 036 T3

Tabla 20.2: Bioeficacia relativa de fitasas

	250 FTU	500 FTU	750 FTU	1000 FTU	Promedio
Ganancia de peso corporal	0,60	0,57	0,53	0,47	0,54
	+67%	+75%	+89%	+113%	+85%
Ceniza de tibia	0,61	0,57	0,53	0,48	0,55
	+64%	+75%	+87%	+108%	+82%

Tabla 20.3: Niveles (FTU/kg de alimento para animales) de BP17 y Phyzyme XP equivalente a 0,6 g o 1,2 g/kg de alimento para animales de P de MCP.

	0,6 g P de MCP			1,2 g P de MCP*		
	Ganancia de peso corporal(g)	Ceniza de tibia (g/kg DM)	Media	Ganancia de peso corporal (g)	Ceniza de tibia (g/kg DM)	Media
Phyzyme® XP	459	493	476 (100)	988 (100)	-	-
BP17	264	283	274 (58)	468 (47)	680	-

* Si no se alcanzó el nivel de rendimiento del MCP, no se pudo calcular una equivalencia y, por lo tanto, no se muestra ningún valor.

Tabla 20.4: Dietas: (kg/tonelada) según se administra

	Control negativo	NC + 0,6 g P*	NC + 1,2 g P*	NC + 1,8 g P*
Maíz	584,2	584,2	584,2	584,2
Harina de gluten de maíz 60	10,0	10,0	10,0	10,0
Harina de soja 48% CP	297,0	297,0	297,0	297,0
Harina de colza	30	30	30	30
Almidón de maíz/trigo	2,5	2,5	2,5	2,5
Aceite de soja	15,0	15,0	15,0	15,0
Grasa de cerdo/aves de corral	14,9	14,9	14,9	14,9
L-Lisina HCl	1,60	1,60	1,60	1,60
DL-metionina	2,30	2,30	2,30	2,30
L-treonina	0,30	0,30	0,30	0,30
Bicarbonato de sodio	1,80	1,80	1,80	1,80
Sal	2,40	2,40	2,40	2,40
Piedra caliza	15,29	14,18	13,07	11,97
Fosfato monocálcico	3,555	6,198	8,841	11,49
Aves de corral Vits/TE's	5,0	5,0	5,0	5,0
Diamol	14,15	12,62	11,08	9,55
BP17 (FTU/kg de alimento para animales)	0/250/500/750/1000	-	-	-
Fitasa de <i>E. coli</i> (FTU/kg)	0/250/500/750/1000	-	-	-
Proteína bruta (%)	21	21	21	21
ME kcal/kg (MJ/kg)	3040 (12,72)	3040 (12,72)	3040 (12,72)	3040 (12,72)

	Control negativo	NC + 0,6 g P*	NC + 1,2 g P*	NC + 1,8 g P*
Calcio (%)	0,80	0,80	0,80	0,80
P total (%)	0,47	0,53	0,59	0,65
P digerible (%)	0,21	0,26	0,31	0,36
Fitato P (%)	0,26	0,26	0,26	0,26
P disponible (%)	0,20	0,26	0,32	0,38
Lisina (%)	1,22	1,22	1,22	1,22
Lisina digerible (%)	1,05	1,05	1,05	1,05
Metionina (%)	0,56	0,56	0,56	0,56
Metionina digerible (%)	0,54	0,54	0,54	0,54
Metionina + cisteína (%)	0,92	0,92	0,92	0,92
Metionina digerible + cisteína (%)	0,79	0,79	0,79	0,79
Suministrado de MCP				

Diseño de la prueba:

288 pollos de engorde Ross 308 machos se asignaron a 12 tratamientos con 6 replicados de jaula por tratamiento (4 aves por jaula). Todas las aves recibieron una dieta estándar durante los primeros 5 días: Proteína bruta 21,5%; AME 2900 kcal/kg (12,1 MJ/kg). La dieta de control negativo (NC) se basó en la harina de maíz/soja y tenía contenido reducido de fósforo (0,47% de fósforo total, 0,20% de fósforo disponible) y se suplementó con BP17 Phyzyme® XP a 250, 500, 750 o 1000 FTU/kg alimento para animales. Las dosis del alimento para animales se verificaron en 2 laboratorios después de la dosificación y los niveles analizados reales se utilizaron para todos los modelos posteriores. Las 3 dietas de control positivo contenían adiciones incrementales de fosfato monocálcico (+0,6, +1,2 y +1,8 g/kg de P alimento para animales) a la formulación de NC. Todas las dietas se administraron como como puré desde los días 5-20. Las aves se pesaron los días 5 y 20 y se calculó el FCR. En el día 20, todas las aves se sacrificaron y se disecó la tibia izquierda para la determinación de la ceniza de hueso.

Las relaciones de dosis-respuesta se determinaron utilizando un modelo exponencial de la forma: $Y=A + B \cdot R^X$ donde Y = parámetro de respuesta, A = valor de asíntota superior, B = valor de respuesta máxima, R = parámetro de pendiente no lineal, X = actividad de fitasa dosificada (FTU/kg de alimento para animales).

Las equivalencias de BP17 y Phyzyme® XP (en FTU/kg de alimento para animales) se calcularon tanto para la ganancia de peso corporal como la ceniza de tibia (%) utilizando los datos de las dietas de control positivo que contienen adiciones incrementales de MCP. Al igual que con los datos de dosis-respuesta, una curva exponencial describe mejor esta relación y se usó para calcular las equivalencias del producto.

Ejemplo 21: Comparación de eficacia de BP17 en comparación con otras fitasas en lechones

El objetivo fue evaluar la bioeficacia de BP17 en comparación con dos enzimas de fitasa diferentes comercialmente disponibles (una fitasa de *E. coli* y una fitasa derivada de *P. lycii* en lechones alimentados con dietas a base de maíz, deficientes en fósforo y calcio. El objetivo del estudio fue evaluar la digestibilidad y retención de nutrientes, así como controlar y registrar la ingesta diaria de alimentos, ganancia diaria de peso vivo y la eficiencia de uso de alimentos para animales de los lechones alojados individualmente desde aproximadamente 7 a 14 días después del destete (35-38 días de edad, con un peso de 8- 12 kg de peso vivo) durante un período de 22 días.

21.1 Materiales y procedimientos

21.1.1 Artículos de prueba

Los artículos de prueba se suministraron como productos enzimáticos líquidos y dos en polvo por Danisco UK Ltd. Los productos enzimáticos se enviaron a Target Feeds Ltd y se aplicaron a las dietas de estudio de puré, que se muestran en la Tabla 21.1. La formulación de las dietas fue proporcionada por Danisco UK Ltd.

21.1.2 Animales

Se seleccionaron 66 lechones Landroc X machos destetados (tres corridas de alimentación de 22 lechones) de entre 28 y 32 días de edad. Su promedio de peso en vivo de inicio fue de 10,7 kg. Hubo 121 dietas de tratamiento y se asignaron seis lechones (dos en cada serie) a cada tratamiento. Los lechones tuvieron un período de aclimatación de seis días antes de comenzar el estudio, tiempo durante el cual se alimentaron con una dieta de destete comercial. Los

lechones se pusieron a prueba durante 22 días. Todos los lechones fueron suministrados por Rattlerow Farms Ltd y fueron vacunados contra la neumonía enzoótica antes del parto. La semana de nacimiento de cada lechón se registró en los registros del estudio.

21.2. Diseño experimental

5 21.2.1 Asignación de los grupos de tratamiento

El diseño experimental fue un bloque aleatorio completo con 6 replicados de 11 tratamientos, con dos replicados por serie y un animal por replicado por serie. Había un lechón por caja, dentro de una sala de 22 cajas de metabolismo de lechones individuales. Hubo tres corridas, por lo tanto, se utilizaron un total de 66 lechones machos en este estudio.

21.2.2 Tratamientos

10 Hubo 11 dietas de tratamiento mostradas en la Tabla 21.1.

Tabla 21.1: Tratamientos dietarios, identificación de la enzima y tasas de incorporación

Tratamiento	Enzima*	FTU/kg de alimento para animales	Inclusión (g/tonelada)
T1	Control positivo (PC)	0	0
T2	Control negativo (NC)	0	0
T3	NC +.BP17 líquida	250	50
T4	NC +.BP17 líquida	1000	200
T5	NC +.BP17 líquida	2000	400
T6	NC + Fitasa de <i>E. coli</i> líquida I	250	50
T7	NC + Fitasa de <i>E. coli</i> líquida I	1000	200
T8	NC + Fitasa de <i>E. coli</i> líquida I	2000	400
T9	NC + Fitasa de <i>P. lycii</i>	500	50
T10	NC + Fitasa de <i>P. lycii</i>	2000	200
T11	NC + Fitasa de <i>P. lycii</i>	4000	400

Tabla 21.2 Formulaciones de dieta de los alimentos para animales terminados

Fase I Dietas 0 – 14 días	Control positivo (PC)	Control negativo (NC)
Ingredientes en %		
Maíz	55,67	57,1
SBM 48%	26,7	26,6
Suero en polvo	10,0	10,0
Proteína de soja conc	2,5	2,5
Aceite de soja	1,7	1,2
L-lisina HCl	0,135	0,135
D-L-metionina	0,11	0,11
L-treonina	0,06	0,06
TiO2	0,40	0,40
Sal	0,12	0,12
Piedra caliza	0,63	0,98
DCP	1,47	0,29
Vitaminas y Minerales	0,50	0,50
TOTAL	100	100

Fase I Dietas 0 – 14 días	Control positivo (PC)	Control negativo (NC)
Nutrientes y energía calculados		
Protein, %	20,5	20,5
DE, Mj/kg	14,5	14,5
Ca, %	0,80	0,65
P, %	0,68	0,47
Dig. P %	0,35	0,20
Aminoácidos digeribles, %		
Lys	1,09	1,09
Met	0,40	0,40
Met+Cys	0,65	0,65
Thr	0,71	0,71
Trp	0,195	0,195

21.2.3 Ingesta diaria de alimentos

Las dietas de prueba se ofrecieron ad libitum, a los lechones, en tazones de alimentación en cada una de las cajas durante todo el período de prueba desde el día 0 hasta el día 22 de cada serie. Cada una de las 11 dietas de tratamiento se administró a dos replicados de lechones en cajas individuales. Se registró la cantidad total consumida por lechón desde el día 0 al 22. El alimento pesado se añadió a los tazones de alimentación diariamente y se retiró, se pesó y se desechó cualquier alimento no consumido desde el día anterior.

21.2.4 Peso corporal

Todos los lechones se pesaron en los días 0 y 22 del estudio para cada una de las tres corridas de alimentación. Todos los pesos de los animales se registraron en el formulario de peso del animal. El día 0 se realizó el pesaje previo a la alimentación de las dietas de prueba.

21.2.5 FCR y FCE

La relación de conversión de alimentación (FCR), ingesta de alimentos/ganancia de peso) y eficiencia de conversión del alimento para animales (FCE), ganancia de peso/ingesta de alimento para animales) se calcularon utilizando el alimento total consumido y el peso total ganado por lechón y por tratamiento en cada uno de los tres períodos de alimentación de 22 días.

21.2.6 Digestibilidad y retención

La producción urinaria y fecal se registró dos veces al día (am y pm) para cada una de las 22 cajas durante los días 18 a 22 para cada una de las tres corridas de alimentación.

Las heces frescas se recolectaron de cada caja al menos dos veces al día, y se almacenaron refrigeradas a aproximadamente 4°C. Al final del período de recolección, se pesó el total de la recolección de cuatro días para cada animal y se mezcló completamente.

Debido a las pequeñas cantidades de material fecal recolectado, solo un conjunto de muestras de cada animal se pesó y se secó a 55°C para determinar la materia seca de la muestra individual (DM). Después del secado, las muestras de animales individuales de material fecal seca se enviaron a Eurofins Ltd y se analizaron para determinar el fósforo total, calcio, nitrógeno total, cenizas y energía bruta.

La orina se recolectó de los días 18 a 22 de cada una de las tres corridas de alimentación. Antes del inicio de la recolección de orina el primer día, se colocaron 25 ml de ácido sulfúrico 25% v/v en el recipiente hermético (bidones). Se utilizó un bidón para recolectar la orina de cada una de las jaulas de lechones. Se añadieron 25 ml adicionales de ácido sulfúrico a cada bidón que contiene orina cada mañana, para evitar la volatilización de la fracción de nitrógeno. Al final del período de recolección, se pesó la recolección total de cuatro días para cada animal.

Al final del período de recolección, se tomaron dos muestras representativas de orina (cada una de aproximadamente 100 g) de cada bidón. La primera muestra se mantuvo congelada en ADAS Drayton y la segunda muestra se envió fría en bolsas de hielo a Eurofins Ltd y se analizó la materia seca, nitrógeno total, fósforo total y calcio al final de cada serie.

21.3 Resultados

Tabla 21.3 : Efecto de las dosis crecientes de diferentes fitasas administradas a 1.000 FTU, excepto la fitasa de *P. lycii* que se administró a 2.000 FTU, sobre lechones destetados

Artículo	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 4	Dieta 7	Dieta 10	Valor P
Fuente de fitasa	PC	NC	BP17	<i>E. coli</i>	<i>P. lycii</i>	
Nivel planificado	0	0	1.000	1.000	2.000	
ADFI, g	443	470	484	485	480	0,968
ADG, g	267	293	329	323	311	0,488
FCR	1,67	1,6	1,47	1,5	1,56	0,062
GF	0,602	0,628	0,68	0,671	0,645	0,064

Tabla 21.4 Efecto de diferentes fitasas en comparación con PC y NC sobre la digestibilidad de P y Ca y retención de P y Ca en lechones destetados

5

Fitasa BP17								
	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5		Valor P		
	NC	Phy B	Phy B	Phy B		Anova	Lineal	Cuadrático
	0	250	1000	2000				
Dosis de fitasa	72,1 ^x	75,5 ^x	85,3 ^y	87,4 ^y		0,001	0,001	0,105
Digestibilidad Ca, %	80,9 ^x	83,3 ^{xy}	89,0 ^{yz}	90,9 ^z		0,011	0,002	0,594
Retención P, %	69,8 ^x	74,4 ^x	81,8 ^y	86,5 ^y		0,001	0,001	0,119
Retención Ca, %	65,0 ^x	71,7 ^{xy}	76,1 ^{yz}	82,1 ^z		0,006	0,001	0,462
Fitasa de <i>E. coli</i>								
	Dieta 2	Dieta 6	Dieta 7	Dieta 8		Valor P		
	NC	PXP	PXP	PXP		Anova	Lineal	Cuadrático
	0	250	1000	2000				
Dosis de fitasa	72,1 ^{xy}	71,6 ^x	77,6 ^y	84,0 ^y		0,001	0,001	0,841
Digestibilidad P, %	80,9 ^x	81,4 ^x	82,8 ^x	91,9 ^y		0,002	0,008	0,124
Digestibilidad Ca, %	80,9 ^x	81,4 ^x	82,8 ^x	91,9 ^y		0,002	0,008	0,124
Retención P, %	69,8 ^x	70,5 ^{xy}	76,5 ^y	83,1 ^z		0,001	0,001	0,991
Retención Ca %	65,0 ^x	70,0 ^x	69,0 ^x	86,8 ^y		0,001	0,004	0,083
fitasa de <i>P. lycii</i>								
	Dieta 2	Dieta 9	Dieta 10	Dieta 11		Valor P		
	NC	<i>P. lycii</i>	<i>P. lycii</i>	<i>P. lycii</i>		Anova	Lineal	Cuadrático
	0	500	2000	4000				
Dosis de fitasa	72,1	72,6	72,6	77,9		0,333	0,334	0,467
Digestibilidad P, %	80,9	85,4	82,3	82,6		0,533	0,951	0,755
Digestibilidad Ca, %	80,9	85,4	82,3	82,6		0,533	0,951	0,755
Retención P, %	69,8	71,3	70	76,4		0,265	0,368	0,383
Retención Ca %	65	72,9	68,4	70,7		0,388	0,581	0,769

Análisis estadístico para comparar fuentes de fitasa								
		ANOVA				Contrastes ¹		
Artículo		Valores P				Valores P		
		Fitasa	FTU	Fitasa x FTU		BP17 vs. PXP	BP17 vs. <i>P. lycii</i>	PXP vs. <i>P. lycii</i>
Digestibilidad P, %		0,001	0,001	0,188		<0,05	<0,05	<0,05
Digestibilidad Ca, %		0,047	0,002	0,002		Ns	<0,05	Ns
Retención P, %		0,001	0,001	0,195		<0,05	<0,05	<0,05
Ca retención, %		0,039	0,001	0,009		Ns	<0,05	Ns

^{x,y,z} Los promedios dentro de cada fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P <0,05)

¹ Contrastes utilizados para determinar diferencias significativas en la respuesta media entre las fuentes de fitasa en los 3 niveles de dosis

Las tablas anteriores muestran que tanto la fitasa BP17 como la de *E. coli* fueron capaces de aumentar significativamente la digestibilidad de P y Ca y la retención de P y Ca de forma lineal, mientras que la fitasa de *P. lycii* solo incrementó numéricamente (P> 0,1) estas variables. El uso de enunciados de contraste para comparar estadísticamente la respuesta media a la fitasa BP17 con las fuentes de fitasa de *E. coli* o *P. lycii* mostró que la fitasa BP17 era significativamente mejor que la de fitasa de *E. coli* o *P. lycii* para mejorar la digestibilidad de P y la retención de P. Estos resultados se ilustran en la Figura 19.

Ejemplo 22: La eficacia de la fitasa BP17 sobre la digestibilidad de aminoácidos en lechones destetados alimentados con una dieta a base de maíz-soja

Para optimizar la eficacia de la fitasa, es importante desarrollar una fitasa que pueda mejorar no solo la digestibilidad del fósforo, sino también de los aminoácidos. Esto no solo puede reducir el costo del alimento para animales y aumentar la uniformidad del crecimiento, sino que también puede reducir la excreción de nutrientes (P y N). En este ejemplo, se investigó la eficacia que suplementa el nivel graduado de fitasa BP17 en la digestibilidad de los aminoácidos ileales utilizando cerdos canulados en destete.

Materiales y procedimientos

Un total de 16 cerdos destetados que se canularon utilizando la cánula T simple ajustada a unos 6 cm por delante de la unión ileocecal-colónica se usaron en este estudio como un diseño incompleto de cuadrado latino. Hubo 2 periodos de 4 bloques de cerdos con 4 cerdos/bloque. Cada dieta se representó en cada bloque y cada cerdo recibió una dieta diferente en cada uno de los dos periodos. La ingesta de alimento se restringió a 4,5% del peso del cerdo más liviano dentro de cada bloque. Al final del período I todos los cerdos se alimentaron con una dieta de control positivo (dieta de reposo) durante 5 días, después de lo cual comenzó el segundo período. Cada dieta se administró durante 9 días continuos. Las muestras fecales frescas se recolectaron al azar las mañanas y las tardes de los días 5 y 6, mientras que la digesta ileal se recolectó durante 12 horas/día los días 7, 8 y 9. Cada cerdo se pesó individualmente al comienzo y al final de cada período.

Tratamientos dietarios

Se elaboró una dieta basal a base de harina de maíz-soja-DDGS de maíz- harinillas de trigo-harina de soja (dieta NC). A la dieta NC, se añadió fitasa BP17 en un orden creciente de 500, 1000, y 2000 FTU fitasa/kg de dieta para preparar las dietas 2, 3 y 4, respectivamente. Las composiciones de energía, minerales y aminoácidos analizadas de las 4 dietas se muestran en las Tablas 22,2 y 22,3.

Los contenidos de minerales, nitrógeno y energía de las dietas experimentales (Tabla 22.1 y 22,2) y aminoácidos (Tabla 22.3) mostraron que los contenidos de minerales, aminoácidos y energía son similares en las cuatro dietas.

ES 2 736 036 T3

Tabla 22.1: Composición de la dieta

Descripción de dietas	1	2	3	4	5
BP17	0	500	1000	2000	Dieta de reposo
Ingredientes, g/kg	NC (T1)	T2	T3	T4	PC
Maíz	506,3	496,3	496,3	496,3	533,8
Harinillas de trigo	71,9	71,9	71,9	71,9	73
DDGS de maíz	72,4	72,4	72,4	72,4	72,4
Harina de soja, 48% CP	271	271	271	271	258
L-Lisina HCl	2	2	2	2	2
DL-Met	0,6	0,6	0,6	0,6	0,1
L-Treonina	1,5	1,5	1,5	1,5	0,9
Aceite de soja	28	28	28	28	28
Fosfato monocálcico	0	0	0	0	11,3
Sal	4	4	4	4	4
Piedra caliza (A)	13	13	13	13	12,2
Óxido de titanio (B)	25	25	25	25	0
Premezcla de vitamina (C)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Premezcla de mineral (D)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Premezcla de selenio (E)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
T2 (fitasa a 500 unidades/kg) (F)	0	10	0	0	0
T3 (fitasa a 1000 unidades/kg) (G)	0	0	10	0	0
T4 (fitasa a 2000 unidades/kg) (H)	0	0	0	10	0
Maíz molido	0	0	0	0	0
Total	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
<i>Nutrientes y energía calculados</i>					
Dietas	1798	1799	1800	1801	1802
Proteína, g/kg	189	189	189	189	183
DE, kcal /kg	3307	3306	3306	3306	3289
ME, kcal /kg	3138	3137	3137	3137	3123
Ca, g/kg	6,25	6,25	6,25	6,25	5,91
P, g/kg	4,57	4,57	4,57	4,57	4,51
No fitato P, g/kg	1,34	1,34	1,34	1,34	1,33
Ca:P	1,4	1,4	1,4	1,4	1,3
Ca:NPP	4,7	4,7	4,7	4,7	4,5
Dig AA ileal aparente g/kg					
Arg	11,3	11,3	11,3	11,3	10,9
His	4,5	4,5	4,5	4,5	4,4
Ile	6,9	6,9	6,9	6,9	6,7
Leu	14,9	14,9	14,9	14,9	14,6
Lys	9,9	9,9	9,9	9,9	9,6

ES 2 736 036 T3

Descripción de dietas	1	2	3	4	5
BP17	0	500	1000	2000	Dieta de reposo
Ingredientes, g/kg	NC (T1)	T2	T3	T4	PC
Met	3,3	3,3	3,3	3,3	2,8
Met + Cys	6,1	6,1	6,1	6,1	5,5
Phe	8,3	8,3	8,3	8,3	8,1
Phe + Tyr	14,2	14,2	14,2	14,2	13,8
Thr	6,9	6,9	6,9	6,9	6,2
Trp	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Val	7,6	7,6	7,6	7,6	7,4

Tabla 22.2: Contenidos de mineral (g/100 g DM) y energía bruta (kcal/kg DM) analizados de las dietas experimentales

Dietas	1	2	3	4
	NC	NC+500	NC+1000	NC+2000
Nitrógeno	3,74	3,85	3,67	3,74
Calcio	1,14	1,14	1,08	1,01
Fósforo	0,62	0,62	0,62	0,62
Sodio	0,22	0,22	0,19	0,18
Magnesio	0,24	0,25	0,25	0,24
Potasio	1,32	1,28	1,29	1,26
Cobre	0,00	0,00	0,00	0,00
Hierro	0,05	0,03	0,03	0,03
Zinc	0,01	0,02	0,01	0,01
Cloruro	0,38	0,38	0,33	0,32
Ácido fítico	0,15	0,21	0,24	0,28
Energía bruta	4687	4679	4726	4695

Tabla 22.3 Contenido de aminoácidos de la dieta experimental

Dietas	1	2	3	4
	NC	NC+500	NC+1000	NC+2000
<i>Aminoácido esencial, %</i>				
Arg	1,58	1,56	1,50	1,56
His	0,63	0,63	0,61	0,63
Ile	1,01	1,01	0,99	1,04
Leu	2,15	2,13	2,06	2,14
Lys	1,53	1,50	1,46	1,49
Met	0,46	0,44	0,41	0,45
Phe	1,20	1,19	1,15	1,19
Thr	1,06	1,05	0,99	1,01
Trp	0,26	0,28	0,26	0,25
Val	1,16	1,16	1,14	1,19
<i>Aminoácido no esencial, %</i>				

Dietas	1	2	3	4
	NC	NC+500	NC+1000	NC+2000
Ala	1,25	1,24	1,20	1,24
Asp	2,32	2,30	2,19	2,31
Cys	0,46	0,47	0,46	0,49
Glu	3,95	3,91	3,73	3,96
Gly	1,00	1,00	0,97	1,00
Pro	1,46	1,48	1,42	1,47
Ser	1,09	1,07	1,00	1,03
Tyr	0,85	0,84	0,81	0,85
Total	23,67	23,49	22,57	23,52

Procesamiento de muestras y análisis químico

5 Antes del análisis, las dietas se molían para pasar a través de un tamiz de 0,5 mm. Posteriormente, todas las muestras de dieta (4) se analizaron para determinar materia seca, nitrógeno, fósforo, sodio, magnesio, potasio, cobre, hierro, zinc, cloruro, ácido fítico y energía bruta. La materia seca en las dietas se determinó mediante el secado de las muestras en un horno de secado durante 24 horas. El contenido de energía bruta se determinó en un calorímetro adiabático de Parr utilizando ácido benzoico como estándar de calibración. La proteína bruta se determinó usando el procedimiento de combustión con EDTA como estándar de calibración; el contenido de proteína bruta se calculó posteriormente como N multiplicado por un factor de 6,25. El análisis de P y Ca fue precedido por la digestión de muestras con ácido nítrico y perclórico.

10 La digestión se usó posteriormente para los análisis de P y Ca utilizando procedimientos espectrofotométricos y de absorción atómica de llama, respectivamente.

Estadística

15 Los datos se analizaron como un diseño de rectángulo latino replicado utilizando SAS. Las medias se separaron por contrastes lineales y cuadráticos. Los coeficientes de contraste para el espaciado desigual se generaron usando Proc IML de SAS. Se presentaron las medias de los cuadrados mínimos, los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron significativos.

Resultados

20 Los contrastes mostraron que la suplementación de la dieta NC con 500 unidades de fitasa BP17 produjo una mayor digestibilidad de AA ileal (tendencias para Ala, Gly, Glu y Lys) a excepción de la metionina (Tabla 22.4). El aumento en el nivel (0, 500, 1.000 y 2.000) de la suplementación con fitasa BP17 produjo un aumento lineal en la digestibilidad ileal AA (7 AA, Tabla 22.4). No hubo efecto cuadrático de la suplementación con fitasa sobre la digestibilidad AA ileal.

Tabla 22.4: Digestibilidad de aminoácidos ileal

Dieta	1	2	3	4	SE	Dieta	Probabilidad de contrastes		
	NC+0	NC+500	NC+1000	NC+2000			0 vs. 500	Lineal	Cuadrático
Aminoácido indispensable, %									
Arg	87,3	89,6	88,8	90,3	0,359	0,00	0,001	0,001	0,265
His	80,9	84,8	82,4	84,8	1,165	0,04	0,037	0,122	0,635
Ile	80,0	83,4	82,3	84,6	1,043	0,02	0,041	0,026	0,585
Leu	80,9	84,4	83,2	84,9	0,911	0,02	0,019	0,034	0,375
Lys	83,3	86,8	84,8	87,1	1,167	0,06	0,055	0,122	0,672
Met	85,6	87,1	85,9	88,1	1,122	0,26	0,363	0,227	0,784
Phe	81,1	84,8	83,2	85,1	0,878	0,01	0,012	0,030	0,381

Dieta	1	2	3	4				Probabilidad de contrastes		
	NC+0	NC+500	NC+1000	NC+2000				0 vs. 500	Lineal	Cuadrático
					SE	Dieta				
Aminoácido indispensable, %										
Thr	74,9	79,3	76,0	77,7	1,200	0,05	0,023	0,408	0,474	
Try	76,4	81,4	77,8	77,8	1,350	0,08	0,021	0,960	0,237	
Val	76,4	80,8	78,9	81,3	1,197	0,02	0,024	0,050	0,458	
Aminoácido dispensable, %										
Ala	76,3	80,3	78,2	80,4	1,363	0,09	0,064	0,152	0,602	
Asp	77,1	80,8	78,6	81,3	0,948	0,01	0,016	0,036	0,679	
Cys	69,7	76,9	74,1	76,3	2,024	0,06	0,027	0,131	0,306	
Glu	82,7	86,1	84,1	86,0	0,751	0,01	0,007	0,050	0,461	
Gly	66,0	72,4	69,6	71,1	2,176	0,16	0,058	0,303	0,363	
Pro	78,8	82,2	80,4	81,6	1,201	0,15	0,066	0,299	0,475	
Ser	78,9	83,8	80,7	81,3	0,882	0,01	0,002	0,464	0,112	
Tyr	82,1	85,2	83,3	85,2	0,899	0,03	0,030	0,107	0,603	
Total	79,4	83,1	81,1	83,3	1,078	0,03	0,032	0,096	0,584	
n	8	8	8	8						

Ejemplos de peces

Ejemplo 23: Efecto de los niveles de suplementación graduados de fitasa BP17 sobre la digestibilidad aparente de nutrientes y energía en *Nile tilapia* alimentada con una dieta libre de harina de pescado

- 5 El objetivo de este experimento fue investigar el efecto de dosis suplementarias graduadas de fitasa BP17 sobre la digestibilidad aparente de nutrientes, energía y aminoácidos en la tilapia del Nilo alimentada con una dieta libre de harina de pescado.

Materiales y procedimientos

23.1 Condiciones de cría

- 10 Para fines experimentales, los peces se sometieron a anestesia moderada (20 ml/L de AQUI-S™, Nueva Zelanda), se pesaron individualmente y se seleccionaron de acuerdo con el rango de peso corporal. Se almacenaron grupos homogéneos de 12 juveniles de tilapia, con un peso corporal inicial promedio (IBW) de 56 ± 3 g en cada tanque. El experimento se realizó en tanques cilíndricos de fibra de vidrio (60 l) en instalaciones interiores, provistos de agua fresca recirculada (caudal de agua: 3,5 l/min) a una temperatura constante del agua de $27,8 \pm 0,2$ °C. Se adoptó un ciclo de fotoperíodo luz: oscuridad de 14:10 h. Los parámetros de calidad del agua, que incluyen oxígeno disuelto, temperatura (diaria), amoníaco y el pH (semanalmente) se controlaron, registraron y mantuvieron dentro del rango de comodidad para la especie (ver Figura 20). Antes del inicio de la fase de cría experimental (recolección de heces), los peces se sometieron a un período de acondicionamiento de una semana durante el cual se adaptaron a cada dieta experimental y a las condiciones experimentales generales.

23.2 Tratamientos dietarios

- 20 Los tratamientos dietarios usados en los presentes experimentos se muestran en la Tabla 23.1.

Tabla 23.1: Tratamientos dietarios

	Código	Tratamientos	Producto de inclusión (por kg de alimento para animales)
1	PCC	Control positivo con suplementación DCP	

	Código	Tratamientos	Producto de inclusión (por kg de alimento para animales)
2	NCC	Control negativo – sin suplementación DCP	
3	NCC 500	NCC + 500 FTU fitasa/kg	0,05 g fitasa BP17/kg
4	NCC 750	NCC + 750 FTU fitasa/kg	0,075 g fitasa BP17 /kg
5	NCC 1000	NCC + 1000 FTU fitasa/kg	0,1 g fitasa BP17 /kg
6	NCC 2000	NCC + 2000 FTU fitasa/kg	0,2 g fitasa BP17 /kg

23.3 Preparación de la dieta

5 Todos los ingredientes se trituraron finamente, se mezclaron y se extrudieron (3 mm) por medio de la extrusora de tornillo doble CLEXTAL BC45 a escala piloto con un diámetro de tornillo de 55,5 mm y una temperatura que varía de 111-116°C. Después de la extrusión, todos los lotes de alimentos para animales extrudidos se secaron en un horno de convección (LTE OP 750-UF) durante 4 horas a 45°C. Después del secado, los pellets se dejaron enfriar a temperatura ambiente y, posteriormente, la fitasa se envolvió en la parte superior de los gránulos pos-extrudidos antes del revestimiento con aceite al vacío en un mezclador al vacío Pegasus DINNISEN (PG-10VCLAB). A lo largo de la duración del ensayo, los alimentos experimentales se almacenaron a 4°C.

Tabla 23.2: Formulación y composición de nutrientes del alimento para del alimento para la tilapia del Nilo

Ingredientes (%)	PCT	NCT	NCT500	NCT600	NCT1000	NCT1500
Harina de soja 48	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0
Harina de soja 44	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Harina de soja entera	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Harina integral	3,7	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
Salvado de trigo	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Salvado de arroz entero	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0
Aceite de colza	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Premezcla de vit y min	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Aglutinante (goma guar)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fosfato dicálcico	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L-Lisina	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
DL-Metionina	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Óxido crómico	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
fitasa BP17 (U/kg)			500,0	750,0	1000,0	2000,0
Composición						
Materia seca (DM), %	93,50	92,81	93,50	93,40	92,59	92,28
Proteína bruta, % DM	30,46	30,16	30,37	30,24	30,24	30,46
Lípidos brutos, % DM	8,38	8,34	8,41	8,28	8,35	8,33
Cenizas, % DM	10,23	8,33	8,51	8,20	8,26	8,36
Fósforo total, % DM	1,39	0,93	0,93	0,94	0,93	1,00
Energía bruta, kJ/g DM	19,17	19,42	19,38	19,31	19,28	19,32
Óxido crómico, % DM	1,01	1,01	0,99	0,99	1,01	0,99
Fitasa analítica (U/kg)	151	212	488	590	1092	1521

10 El ensayo incluyó 6 dietas experimentales sin harina de pescado (tablas 23,2 y 23,8). Se formuló una dieta de control positivo (PCT) con ingredientes prácticos para contener un 32,5% de proteína bruta DM, 8,4% de grasa bruta DM y 19,2 MJ/kg de energía bruta DM. Esta dieta contenía fosfato dicálcico para alcanzar un nivel de fósforo total (1,4%

DM) suficiente para cubrir el requerimiento de la especie. Una dieta de control negativo (NCT) no se suplementó con fosfato dicálcico y se formuló para contener un nivel total de P de 0,9%, pero en la cual se encuentra aproximadamente 0,6% en forma de P. unido a fitato. Esta dieta tenía por lo tanto una deficiencia de fósforo putativa. Otras cuatro dietas se basaron en la formulación de NCT pero suplementadas con dosis graduadas (500, 750, 1000 y 2000 U/kg de alimento para animales) de la fitasa de prueba (dietas NCT500, NCT600, NCT1000 y NCT1500). Las dietas se suplementaron con aminoácidos cristalinos (Lys y Met) para cubrir los requerimientos nutricionales de la especie. Las dietas fueron isonitrogenadas, isolipídicas e isoenergéticas. El óxido crómico (Cr₂O₃) se incorporó al 1% en todas las dietas, como un marcador inerte para las mediciones de digestibilidad aparente.

En comparación con los valores del National Research Council of the National Academies (requerimientos de nutrientes de pescados y camarones, NRC 2010), la formulación de nutrientes estuvo por encima de los requerimientos de NRC.

Los requerimientos de proteínas, energía, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales se determinaron con dietas que contienen ingredientes purificados y químicamente definidos que son altamente digeribles para los peces; por lo tanto, los valores en la tabla representan cerca del 100 por ciento de biodisponibilidad para los peces. Este hecho se debe considerar cuando se formulan dietas a partir de los productos alimenticios naturales en los que la biodisponibilidad de los nutrientes es notablemente menor que en las dietas de laboratorio.

23.4 Administración del producto de prueba y duración del tratamiento

A lo largo del ensayo, los peces se alimentaron una vez al día en un ligero exceso. Para cada replicado experimental, la duración total de la alimentación varió entre 12 y 15 días, de acuerdo con la cantidad de heces requeridas para fines analíticos. Como se mencionó antes, cada replicado experimental se probó en tres series separadas. En cada serie, antes del inicio de la recolección de heces, los peces se adaptaron a las dietas experimentales durante 8 días.

23.5 Análisis de enzimas

Las recuperaciones de enzimas fueron aceptables para dosis de 500 y 1.000 FTU/kg pero un poco bajas para 750 y 2.000 FTU/kg.

Tabla 23.3: Actividad mínima garantida de enzima en el producto (10.000 FTU/g)

Gp No	Dosis (kg/t)	Tratamiento*	Resultado (FTU/kg)	Resultado esperado(FTU/kg)**	Resultado (%)
1	0	PCC	151	<100	-
2	0	NCC	212	<100	-
3	0,05	NCC 500	488	500	97,6
4	0,075	NCC 750	590	750	78,6
5	0,1	NCC 1000	1092	1000	>100
6	0,2	NCC 2000	1521	2000	76,0

* Todos los análisis realizados en Danisco Enzyme Assay Laboratory, Brabrand, Dinamarca.
 ** Sobre lavase de la actividad mínima garantizada por el producto

23.6 Procedimientos de análisis

23.6.1. Composición próxima de dietas y heces

Las dietas y las heces liofilizadas se homogeneizaron con un molino de laboratorio antes del análisis. El análisis de la composición química de las dietas y las heces se realizó mediante los siguientes procedimientos: materia seca después del secado a 105°C durante 24 h; ceniza por combustión a 550°C durante 12 h; proteína bruta (Nx6,25) mediante una técnica de combustión instantánea seguida de una separación cromatográfica de gases y detección de conductividad térmica (LECO FP428); extracción de grasa por diclorometano (Soxhlet); energía bruta en un calorímetro de bomba adiabática (IKA). El análisis del fósforo total se realizó de acuerdo con el procedimiento ISO/DIS 6491 utilizando el reactivo de vanado-molibdato. El óxido crómico en las dietas y las heces se determinó de acuerdo con Bolin, D. W., R. P. King y E. W. Klosterman. 1952 (Un procedimiento simplificado para la determinación de óxido crómico (Cr:O~) cuando se usa como sustancia índice. Science 116: 634, después de la digestión con ácido perclórico).

23.6.2. Composición de aminoácido de dietas y heces

El perfil de aminoácidos de las dietas y heces se obtuvo después de la hidrólisis en HCl 6 M a 108°C durante 24 h en viales de vidrio lavados con nitrógeno. Se utilizó un sistema de HPLC de fase inversa Pico-Tag de Waters, usando

norleucina como estándar interno. Los cromatogramas resultantes se analizaron con el software Breeze (Waters, EE.UU.). El triptófano no se analizó, ya que se destruye por hidrólisis ácida.

23.7 Observaciones durante el estudio

23.7.1 Factores ambientales

5 Los parámetros de cría ambiental observados durante todo el período de alimentación experimental se informan en la Figura 20. El ensayo se realizó en instalaciones interiores, provistas de agua dulce termostregulada recirculada. Se adoptó un ciclo fotoperíodo luz: oscuridad de 14:10 h. La temperatura del agua se mantuvo dentro de los límites establecidos (27,8 ±0,2°C). Los niveles de oxígeno disuelto se mantuvieron por encima de 6,5 mg/l. Además, los niveles de amoníaco fueron bajos durante todo el ensayo.

10 23.7.2 Criterios de evaluación

Los coeficientes de digestibilidad aparentes (ADC) de los nutrientes dietarios y la energía se calcularon de acuerdo con la fórmula:

$$ADC(\%) = 100 - \left[\frac{\% \text{ nivel de } Y_2O_3 \text{ dietario}}{\% \text{ nivel de } Y_2O_3 \text{ fecal}} \times \frac{\% \text{ nivel de nutriente o energía fecal}}{\% \text{ nivel de nutriente o energía dietario}} \right]$$

23.7 Análisis de datos

15 Los datos se presentan como media de triplicados ± desviaciones estándar. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía y, cuando fue apropiado, las medias se compararon mediante la prueba de Newman-Keuls. Los parámetros expresados como porcentajes se sometieron a transformación de raíz cuadrada de arcoseno. La significancia estadística se probó a un nivel de probabilidad de 0,05.

Resultados

20 23.8 Digestibilidad de nutrientes

En la tilapia del Nilo, la suplementación de fitasa (500 a 2.000 FTU/kg) en grupos de NC mejoró numéricamente la digestibilidad de proteínas, lípidos y energía en comparación con NC.

Los niveles de PC se restauraron e incluso fueron más altos para CP, lípidos y energía (Tabla 23.3).

25 En los grupos de ensayo de fitasa, fue significativamente mayor que la digestibilidad del grupo de NC con todas las dosis de fitasa mayores de 750 FTU/kg (real = 590 FTU/kg).

Los niveles de PC se restauraron estadísticamente y aún más para la fitasa utilizada en dosis de hasta 750 FTU/kg (real = 590 FTU/kg).

Respecto de la digestibilidad de P, fue evidente la dosis-respuesta cuando se usaron dosis de fitasa crecientes.

30 La dosis óptima parecía estar entre 750 y 1.000 FTU/kg. Sin embargo, debido a que la dosis de fitasa específica de 750 U/kg de alimento para animales no se logró correctamente, existen dudas sobre si dichos efectos beneficiosos también se podrían hallar con una dosis entre 590 y 1000 U/kg.

Tabla 23.4: Digestibilidad de nutrientes de la tilapia del Nilo alimentada con niveles graduados de fitasa durante el estudio entero

	PC		NC		NC + 500 FTU/kg		NC + 750 FTU/kg		NC+ 1000 FTU/kg		NC+ 2000 FTU/kg	
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
Materia seca (%)	68,0	2,7	68,2	0,2	68,1	1,7	68,5	0,7	66,5	1,2	67,3	1,9
Proteína (%)	82,6	2,0	83,3	1,1	84,6	2,0	84,2	1,0	82,8	2,5	84,1	2,8

	PC		NC		NC + 500 FTU/kg		NC + 750 FTU/kg		NC+ 1000 FTU/kg		NC+ 2000 FTU/kg	
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
Lípido (%)	89,6	1,5	90,6	0,8	91,7	1,3	91,9	0,1	91,4	0,5	90,5	1,3
Energía (%)	71,4	2,2	71,6	0,6	73,3	1,6	72,2	1,7	70,0	1,4	70,4	1,7
ANOVA P<0,05 y a>b>c												
P (%)	42,8 b	4,8	30,7 a	3,5	29,5 a	4,5	31,6 a	2,4	51,8 c	6,6	56,9 c	1,4

Tabla 23.5: Digestibilidad de nutrientes de la tilapia del Nilo: % de mejora respecto del control positivo

	NC	NC + 500 FTU/kg	NC + 750 FTU/kg	NC+ 1000 FTU/kg	NC+ 2000 FTU/kg
Materia seca (%)	0,29	+0,15	+0,74	-2,21	-1,03
Proteína (%)	0,85	+2,42	+1,94	+0,24	+1,82
Lípido (%)	1,12	+2,34	+2,57	+2,01	+1,00
Energía (%)	0,28	+2,66	+1,12	-1,96	-1,40
P (%)	-28,27	-31,07	-26,17	+21,03	+32,94
Id = idéntico al control positivo					

23.9. Evaluación de los valores de liberación de nutrientes.

La suplementación con fitasa (especialmente dosis entre 500 y 750 FTU/kg) tendió a mejorar la liberación global de nutrientes.

- 5 Sin embargo, a excepción de la respuesta observada con P, ninguna de las curvas de liberación de nutrientes proporcionó una respuesta lineal clara y consistente (Tabla 23.6).

Respecto del fósforo, la suplementación con fitasa mejora clara y linealmente la liberación de P

Tabla 23.6: Valores de liberación de nutrientes de los tratamientos dietarios con niveles graduados de suplementación con fitasa administrada la tilapia del Nilo

	NC + 500	NC + 750	NC + 1000	NC + 2000
Liberación de DE (cal/kg, según se administra)	87	27	-103	-92
Liberación de lípidos (% , según se administra)	0,68	0,46	-0,16	0,29
Liberación de CP (% , según se administra)	0,14	0,17	-0,02	-0,06
Liberación de Liberación de EAA (% , según se administra)	0,20	0,10	0,05	-0,06
Liberación de Pe (% , según se administra)				
	-0,01	0,01	0,18	0,25

10 23.10 Reducción de la liberación de Fósforo en el agua

La disminución del contenido de fósforo de las heces afectado por la suplementación con fitasa dietaria se presenta en la Tabla 23.7.

Tabla 23.7: Niveles de fósforo (P) fecales en juveniles de tilapia alimentadas con dietas experimentales

Dosis de Fitasa (FTU/kg)	0	500	750	1000	2000
P fecalP	2,02	2,06	2,03	1,34	1,32
SD	0,09	0,02	0,05	0,17	0,12

1.000 U/kg de Fitasa potencialmente disminuye la liberación de P en agua en 0,6%

Discusión

5 En conclusión, el uso de la fitasa BP17 muestra buenos resultados en la digestibilidad aparente de nutrientes de los peces y la reducción de la liberación de fósforo en el agua.

La suplementación de fitasa BP17 (hasta 750 FTU/kg) mejora significativamente la digestibilidad del fósforo. La digestibilidad de P en los grupos de ensayo de fitasa es significativamente mayor que la digestibilidad del grupo de NC con todas las dosis de fitasa superiores a 500 FTU/kg.

10 Los niveles de PC se restauran estadísticamente para la fitasa utilizada en dosis de hasta 750 FTU/kg, pero la dosis óptima parece ser de 1.000 FTU/kg.

El DCP total en la dieta se puede reducir en al menos un 2,0%. La liberación de fósforo en el agua se puede reducir en 0,6%.

Ejemplo 24 –Ejemplo comparativo

15 Se ha informado que el pH de la porción ácida del tracto digestivo de las aves de corral (molleja/proventrículo) varía de 3,3 a 3,5, con un pH en el estómago de los cerdos de 2,5 a 4,5 y en peces de pH 3,3 a 3,8. Debido al bajo pH en el área de molleja/proventrículo de las aves de corral y el estómago ácido de otras especies, esta es también la región principal donde se espera que ocurran interacciones de fitato con proteínas, lo que posiblemente produzca una digestión de proteínas ineficiente (como en 002).). En consecuencia, se ha pensado que el pH óptimo de las enzimas fitasa es importante, y que las enzimas fitasas que tienen un pH óptimo más cercano a la porción gástrica del tracto
20 digestivo pueden ejercer mayores efectos beneficiosos sobre las características biofísicas de los animales que las fitasas que tienen un pH óptimo más alto.

25 El pH óptimo de 3 fuentes comerciales diferentes de fitasa y fitasa BP17 se muestra en la Figura 21. Aquí se puede ver que el pH óptimo de la fitasa BP17 de pH 4,0 es similar al pH óptimo de la fitasa de *Escherichia coli* y la fitasa de *Citrobacter braachi*, mientras que La fitasa de *Peniophora lycii* también alcanza la mayor actividad con un ~4,0, pero tiene un rango de pH óptimo más amplio de 4,0 a 5,5.

Sin embargo, lo sorprendente fue que la actividad relativa de la fitasa BP17 a pH 4,0 medida por la cantidad de liberación de fósforo in vitro en condiciones estándar fue 37%, 48% y 156% mayor que la de fitasa de *Citrobacter braachi*, fitasa de *Escherichia coli* y fitasa de *P. lycii*, respectivamente (ver Figura 22).

30 La inclusión de fitasa en el alimento para animales se estandariza sobre la base de la inclusión de una cantidad definida de unidades de fitasa (FTU/kg de alimento para animales). Típicamente, esto puede ser 500 unidades/kg de fitasa/kg de alimento para animales, o 1000 unidades/kg de alimento para animales, pero también puede estar en el intervalo de 250 FTU/kg hasta 5000, o 10.000 unidades/kg de alimento para animales. Es importante destacar que la inclusión en los alimentos para animales se estandariza en función de la actividad relativa de la fitasa a pH 5,5.

35 Como la inclusión de fitasa en slo alimentos para animales se basa en la actividad de la fitasa a pH 5,5, la actividad relativa de la fitasa a un pH más bajo en comparación con un pH de 5,5 es importante. Esto se muestra en la Figura 23.

Además, fue sorprendente que la actividad de la fitasa BP17 expresada como porcentaje de actividad a pH 5,5, fue 10,8, 4,9 y 3,9 veces mayor a pH 3,0 y 1,36: 1, 1,42: 1, y 1,97 veces mayor a pH 4,0 en comparación con la fitasa de *Citrobacter*, *E.coli*, y *P. lyciis*.

40 Sumario de párrafos

También se describe:

45 1. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en uno o más de dichas características biofísicas del animal cuando se compara con el uso equivalente de la fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli*.

2. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 1 en el que dicha fitasa produce una mejora en dichas características

biofísicas del animal como una fuente de alimento.

3. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 1 o párrafo 2 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la ganancia de peso.
- 5 4. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 3 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la ganancia de peso de al menos 2% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la relación de conversión del alimento para animales.
- 10 6. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 5 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la relación de conversión del alimento para animales de al menos 5% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo.
- 15 8. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 7 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo de al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
- 20 9. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral.
- 25 10. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 9 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral de al menos 10% durante un período de al menos 14 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
11. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio.
- 30 12. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 11 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio de al menos 10% durante un período de al menos cuatro semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
13. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención de aminoácido.
- 35 14. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 13 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal que comprende un aumento de retención de aminoácido de en promedio al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
15. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de mineralización.
- 40 16. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 15 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de mineralización de al menos 10% durante un período de al menos 14 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
17. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento del crecimiento.
- 45 18. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 17 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento del crecimiento de al menos 20% durante un período de al menos 28 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
19. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de tasa de puesta de huevos y/o peso del huevo y/o masa del huevo.
- 50 20. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 19 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de tasa de puesta de huevos de alrededor de al menos 2% y/o peso del huevo de alrededor

ES 2 736 036 T3

de al menos 2% y/o masa del huevo de alrededor de al menos 4% durante un período de al menos 23 semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.

21. Un procedimiento de cualquier párrafo precedente en el que dicho animal es un animal de granja monogástrico.
22. Un procedimiento de cualquier párrafo precedente en el que dicho animal es un animal monogástrico.
- 5 23. Un procedimiento de cualquier párrafo precedente en el que dicho animal es un pájaro o aves de corral.
24. Un procedimiento de cualquier párrafo precedente en el que dicho animal es un pollo o pato.
25. Un procedimiento de cualquier párrafo precedente en el que dicho animal es un pavo.
26. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1 a 22 en el que dicho animal es un cerdo, lechón, porcino, puerco, de crecimiento-finalización o cerda.
- 10 27. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 en el que dicho animal es un animal no monogástrico o animal rumiante.
28. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 o 27 en el que dicho animal es un animal de granja no monogástrico.
- 15 29. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 o 27-28 en el que dicho animal es un animal productor de carne.
30. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 o 27-29 en el que dicho animal es un animal productor de leche.
- 20 31. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 o 27-30 en el que dicho animal es una Alpaca, bisonte, bovino, camello, vacuno, vaca, ciervo, burro, equino, Equus, cabra, caballo, cordero, ganado, llama, mula, buey, reno, oveja, novillo yak, búfalo, jirafa, alce, ciervo canadiense, llama, antílope, antílope americano, nilgo o animal productor de carne o leche, o cualquier animal rumiante, equino, bovino, cérvido, caprino o camélido.
32. Un procedimiento de cualquier párrafo precedente en el que dicho animal es un animal domesticado.
33. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 o 32 en el que dicho animal es un pez.
34. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 o 32-33 en el que dicho animal es un pez gástrico.
- 25 35. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 o 32-34 en el que dicho animal es un pez agástrico.
36. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 o 32-35 en el que dicho animal es un camarón u otro crustáceo.
37. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 1-20 o 32-36 en el que dicho animal es un pez marino o pez de agua dulce.
- 30 38. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que dicho alimento para animales está en forma de gránulos, gránulos, harina, puré, líquido, cápsula húmeda o aerosol.
39. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que dicha fitasa se selecciona de una fitasa natural, una fitasa no natural o variante de la misma.
- 35 40. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que dicha fitasa se ha aislado previamente de una fuente.
41. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que dicha fitasa se ha preparado mediante el uso de técnicas de ADN recombinantes.
42. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o se puede derivar de un origen bacteriano.
- 40 43. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o se puede derivar de una especie de *Buttiauxella*.
44. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que dicha fitasa tiene al menos 75% de identidad con BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.
- 45 45. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que dicha fitasa tiene al menos 85% de identidad con BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.

46. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 45 en el que dicha fitasa es BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.
47. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 42 en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o se puede derivar de una especie de *Citrobacter*.
- 5 48. Un procedimiento de acuerdo con cualquier párrafo precedente en el que dicha fitasa es tolerante al pH bajo.
49. Uso de fitasa BP17 de la SEQ ID NO:1 en un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicha fitasa BP17 produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii*.
- 10 50. Un uso de acuerdo con el párrafo 49 en el que dicha fitasa produce una mejora en dichas características biofísicas del animal como una fuente de alimento.
51. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-50 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la ganancia de peso.
- 15 52. Un uso de acuerdo con el párrafo 51 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la ganancia de peso de al menos 2% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
53. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-52 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la relación de conversión del alimento para animales.
- 20 54. Un uso de acuerdo con el párrafo 53 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la relación de conversión del alimento para animales de al menos 5% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
55. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-54 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo.
- 25 56. Un uso de acuerdo con el párrafo 55 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo de al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
57. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-56 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral.
- 30 58. Un uso de acuerdo con el párrafo 57 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral de al menos 10% durante un período de al menos 14 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
- 35 59. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-58 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio.
60. Un uso de acuerdo con el párrafo 59 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio de al menos 10% durante un período de al menos seis semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
- 40 61. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-60 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención de aminoácido.
62. Un uso de acuerdo con el párrafo 61 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención de aminoácido de en promedio al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
- 45 63. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-62 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de mineralización.
64. Un uso de acuerdo con el párrafo 63 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de mineralización de al menos 10% durante un período de al menos 14 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
- 50

65. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-64 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento del crecimiento.
- 5 66. Un uso de acuerdo con el párrafo 65 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento del crecimiento de al menos 20% durante un período de al menos 28 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
67. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-66 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de tasa de puesta de huevos y/o peso del huevo y/o masa del huevo.
- 10 68. Un uso de acuerdo con el párrafo 67 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de tasa de puesta de huevos de alrededor de al menos 2% y/o peso del huevo de alrededor de al menos 2% y/o masa del huevo de alrededor de 4% durante un período de al menos 23 semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
69. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-68 en el que dicho animal es un animal de granja monogástrico.
70. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-69 en el que dicho animal es un animal monogástrico.
- 15 71. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-70 en el que dicho animal es un pájaro o aves de corral.
72. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-71 en el que dicho animal es un pollo o pato.
73. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-71 en el que dicho animal es un pavo.
74. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-70 en el que dicho animal es un cerdo, lechón, porcino, puerco, de crecimiento-finalización o cerda.
- 20 75. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 en el que dicho animal es un animal no monogástrico o animal rumiante.
76. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 o 75 en el que dicho animal es un animal de granja no monogástrico.
77. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 o 75-76 en el que dicho animal es un animal productor de carne.
78. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 o 75-77 en el que dicho animal es un animal productor de leche.
- 25 79. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 o 75-78 en el que dicho animal es una alpaca, bisonte, bovino, camello, vacuno, vaca, ciervo, burro, equino, Equus, cabra, caballo, cordero, ganado, llama, mula, buey, reno, oveja, novillo yak, búfalo, jirafa, alce, ciervo canadiense, llama, antílope, antílope americano, nilgo o animal productor de carne o leche, o cualquier animal rumiante, equino, bovino, cérvido, caprino o camélido.
80. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-79 en el que dicho animal es un animal domesticado.
- 30 81. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 o 80 en el que dicho animal es un pez.
82. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 o 80-81 en el que dicho animal es un pez gástrico.
83. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 o 80-81 en el que dicho animal es un pez agástrico.
84. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 o 80-83 en el que dicho animal es un camarón u otro crustáceo.
- 35 85. Un uso de cualquiera de los párrafos 49-68 o 80-84 en el que dicho animal es un pez marino o pez de agua dulce.
86. Un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 49-85 en el que dicho alimento para animales está en forma de gránulos, gránulos, harina, puré, líquido, cápsula húmeda o aerosol.
87. Un procedimiento para producir un alimento para animales para usar en los procedimientos de cualquiera de los párrafos 1-48 que involucra la etapa de adición de una fitasa a un animal alimento para animales.
- 40 88. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 87 en el que dicho animal es un animal de granja monogástrico.
89. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 87 o 88 en el que dicho animal es un animal monogástrico.
90. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-89 en el que dicho animal es un pájaro o aves de corral.
91. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-90 en el que dicho animal es un pollo o un pato.

ES 2 736 036 T3

92. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-90 en el que dicho animal es un pavo.
93. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-89 en el que dicho animal es un cerdo, lechón, porcino, puerco, de crecimiento-finalización o cerda.
94. Un procedimiento del párrafo 87 en el que dicho animal es un animal no monogástrico o animal rumiante.
- 5 95. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87 o 94 en el que dicho animal es un animal de granja no monogástrico.
96. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87 o 94-95 en el que dicho animal es un animal productor de carne.
- 10 97. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87 o 94-96 en el que dicho animal es un animal productor de leche.
98. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87 o 94-97 en el que dicho animal es una alpaca, bisonte, bovino, camello, vacuno, vaca, ciervo, burro, equino, Equus, cabra, caballo, cordero, ganado, llama, mula, buey, reno, oveja, novillo yak, búfalo, jirafa, alce, ciervo canadiense, llama, antílope, antílope americano, nilgo o animal productor de carne o leche, o cualquier animal rumiante, equino, bovino, cérvido, caprino o camélido.
- 15 99. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87-98 en el que dicho animal es un animal domesticado.
100. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87 o 99 en el que dicho animal es un pez.
101. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87 o 99-100 en el que dicho animal es un pez gástrico.
102. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87 o 99-100 en el que dicho animal es un pez agástrico.
- 20 103. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87 o 99-102 en el que dicho animal es un camarón u otro crustáceo.
104. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 87 o 99-103 en el que dicho animal es un pez marino o pez de agua dulce.
105. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-104 en el que dicho alimento para animales está en forma de gránulos, gránulos, harina, puré, líquido, cápsula húmeda o aerosol.
- 25 106. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-105 en el que dicha fitasa se selecciona de una fitasa natural, una fitasa no natural o variante de la misma.
107. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-106 en el que dicha fitasa se ha aislado previamente de una fuente.
- 30 108. Un procedimiento de acuerdo con los párrafos 87-107 en el que dicha fitasa se ha preparado mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.
109. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-108 en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o se puede derivar de un origen bacteriano.
110. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-109 en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o se puede derivar de una especie de *Buttiauxella*.
- 35 111. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-109 en el que dicha fitasa tiene al menos 75% de identidad con BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.
112. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-110 en el que dicha fitasa tiene al menos 85% de identidad con BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.
- 40 113. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-110 en el que dicha fitasa es BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.
114. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-110 en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o se puede derivar de una especie de *Citrobacter*.
- 45 115. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 87-114 en que dicha fitasa es tolerante al pH bajo.
116. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal; en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento

de la ganancia de peso.

117. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 116 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la ganancia de peso de al menos 2% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
- 5 118. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal; en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la relación de conversión del alimento para animales.
- 10 119. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 118 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la relación de conversión del alimento para animales de al menos 5% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
- 15 120. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal; en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo.
- 20 121. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 120 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo de al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
- 25 122. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal; en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral.
- 30 123. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 122 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral de al menos 10% durante un período de al menos 14 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
- 35 124. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal; en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de cualquiera de uno o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio.
- 40 125. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 124 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio de al menos 10% durante un período de al menos cuatro semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
- 45 126. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal; en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención de aminoácido.
- 50 127. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 126 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención de aminoácido de en promedio al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
128. 128. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal; en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de mineralización.
129. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 128 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de mineralización de al menos 10% durante un período de al menos 14 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
130. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal; en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento

del crecimiento.

131. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 130 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento del crecimiento de al menos 20% durante un período de al menos 28 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.

5 132. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-131 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de tasa de puesta de huevos y/o peso del huevo y/o masa del huevo.

10 133. Un procedimiento de acuerdo con el párrafo 132 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de tasa de puesta de huevos de alrededor de al menos 2% y/o peso del huevo de alrededor de al menos 2% y/o masa del huevo de alrededor de 4% durante un período de al menos 23 semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.

134. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-133 en el que dicho animal es un animal de granja monogástrico.

15 135. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-134 en el que dicho animal es un animal monogástrico.

136. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-135 en el que dicho animal es un pájaro o aves de corral.

137. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-136 en el que dicho animal es un pollo o pato.

138. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-136 en el que dicho animal es un pavo.

20 139. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-135 en el que dicho animal es un cerdo, lechón, porcino, puerco, de crecimiento-finalización o cerda.

140. Un procedimiento de párrafos 116-133 en el que dicho animal es un animal no monogástrico o animal rumiante.

141. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-133 o 140 en el que dicho animal es un animal de granja no monogástrico.

25 142. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-133 o 140-141 en el que dicho animal es un animal productor de carne.

143. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-133 o 140-142 en el que dicho animal es un animal productor de leche.

30 144. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-133 o 14-143 en el que dicho animal es una alpaca, bisonte, bovino, camello, vacuno, vaca, ciervo, burro, equino, Equus, cabra, caballo, cordero, ganado, llama, mula, buey, reno, oveja, novillo yak, búfalo, jirafa, alce, ciervo canadiense, llama, antílope, antílope americano, nilgo o animal productor de carne o leche, o cualquier animal rumiante, equino, bovino, cérvido, caprino o camélido.

145. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-144 en el que dicho animal es un animal domesticado.

146. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-133 o 144 en el que dicho animal es un pez.

35 147. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-133 o 145-146 en el que dicho animal es un pez gástrico.

148. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-133 o 145-146 en el que dicho animal es un pez agástrico.

149. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-133 o 145-148 en el que dicho animal es un camarón u otro crustáceo.

40 150. Un procedimiento de cualquiera de los párrafos 116-133 o 145-149 en el que dicho animal es un pez marino o pez de agua dulce.

151. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-150 en el que dicho alimento para animales está en forma de gránulos, gránulos, harina, puré, líquido, cápsula húmeda o aerosol.

152. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-151 en el que dicha fitasa se selecciona de una fitasa natural, una fitasa no natural o variante de la misma.

45 153. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-152 en el que dicha fitasa se ha aislado previamente de una fuente.

154. Un procedimiento de acuerdo con los párrafos 116-153 en el que dicha fitasa se ha preparado mediante el uso de técnicas de ADN recombinantes.
155. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-154 en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o se puede derivar de un origen bacteriano.
- 5 156. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-155 en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o se puede derivar de una especie de *Butti Xuella*.
157. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-156 en el que dicha fitasa tiene al menos 75% de identidad con BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.
- 10 158. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-156 en el que dicha fitasa tiene al menos 85% de identidad con BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.
159. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-156 en el que dicha fitasa es BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.
160. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-155 en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o se puede derivar de una especie de *Citrobacter*.
- 15 161. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 116-160 en que dicha fitasa es tolerante al pH bajo.
162. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales como se describe en la descripción, párrafos o figuras.
163. Uso de fitasa BP17 de la SEQ ID NO:1 en un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales como se describe en la descripción, párrafos o figuras.
- 20 164. Un procedimiento para producir un alimento para animales para usar en un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales como se describe en la descripción, párrafos o figuras.
165. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli*; en el que dicha fitasa es fitasa BP17 SEQ ID NO:1.
- 25 166. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento para animales comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal cuando en comparación con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli*; en el que dicha fitasa es fitasa BP17 SEQ ID NO:1; en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende uno o más de: un aumento de la ganancia de peso, preferiblemente un aumento de la ganancia de peso de al menos 2% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales; un aumento de la relación de conversión del alimento para animales, preferiblemente un aumento de la relación de conversión del alimento para animales de al menos 5% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales; un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo, preferiblemente un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo de al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales; un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral, preferiblemente un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral de al menos 10% durante un período de al menos 14 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales; un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio, preferiblemente un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio de al menos 10% durante un período de al menos cuatro semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales; un aumento de retención de aminoácido, preferiblemente un aumento de retención de aminoácido de en promedio al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales; un aumento de mineralización, preferiblemente un aumento de mineralización de al menos 10% durante un período de al menos 14 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales; un aumento del crecimiento, preferiblemente un aumento del crecimiento de al menos 20% durante un período de al menos 28 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales; un aumento de tasa de puesta de huevos y/o peso del huevo y/o masa del huevo, preferiblemente un aumento de tasa de puesta de huevos de alrededor de al menos 2% y/o peso del huevo de alrededor de al menos 2% y/o masa del huevo de alrededor de 4% durante un período de al menos 23 semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
- 55

167. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-20 en el que la mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de digestión de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio de al menos 50% durante un período de al menos cuatro semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 1000 FTU/kg de alimento para animales.

5 **Listado de secuencias**

SEQ ID NO: 1

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTQMTMRDVTPTWPEWPVKLGYYITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
YVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAWEKEAQTPIIDNLNQHYIPSLALMNT
TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWALLLKLHNV
YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAI SNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLQRLSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 2

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTQMTMRDVTPTWPEWPVKLGYYITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
YVWTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAWEKEAQTPIIDNLNQHYIPSLALMNT
TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWALLLKLHNV
YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAI SNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLQRLSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

10 **SEQ ID NO: 3**

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTQMTMRDVTPTWPEWPVKLGYYITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILPRGSCPTPNSI
YVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAWEKEAQTPIIDNLNQRYIPALMNT
ILNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQVAWGNIHSEQEWALLLKLHNV
YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAI SNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLQRLSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 4

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTQMTMRDVTPTWPEWPVKLGYYITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
YVWADVQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAWEKEAQTPIIDNLNQHYIIPFLALMNT
TLNFSSTAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNKVALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWASLLKLHNV
QFDLMARTPYIARHNGTPLLQAI SNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLQRLSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

SEQ ID NO: 5

15 **MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYA**

SEQ ID NO:6

MKAILIPFLSLIPLTPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTQMTMRDVTPTWPEWPVKLGWLT PRGGELIAYLGHYQRQRLVADGLLAKK
GCPQSGQVAIIADVDERTKTRKTGEAFAAGLAPDCAITVHTQADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIAFTGHRQTAFRELERVLNF
PQSNLCLKREKQDESCSLTQALPSELKVSADNVSLTGAVSLASMLTEIFLLQQAQGMPEPGWGRITDISHQWNTLLSLHNAQFYLLQRTPEVARSRAT
PLLDLIMAAITPHPPQKQAYGVTLPTSVLFIAGHDTNLANLGGALELNWTLPGQPDNTPPGGELVFERWRRLSDNSQWIQVSLVFTLQQMRDKTPL
SLNTPPGEVKLTLAGCEERNAQGMCSLAGFTQIVNEARI PACSLRSHHHHHH

Listado de secuencias

- <110> DuPont Nutrition Biosciences ApS
- 20 <120> Procedimiento de alimentación
- <130> P045968PCT
- <150> GB 1200132.7
- <151> 05-01-2012

ES 2 736 036 T3

<150> US 61/596.944
 <151> 09-02-2012

 <150> GB 1203868.3
 <151> 06-03-2012

 5 <150> GB 1211170.4
 <151> 22-06-2012

 <150> GB 1211168.8
 <151> 22-06-2012

 10 <150> GB 1211167.0
 <151> 22-06-2012

 <150> GB 1211169.6
 <151> 22-06-2012

 <150> GB 1211166.2
 <151> 22-06-2012

 15 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.5

 <210> 1
 <211> 413
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Variante de fitasa BP17

 <400> 1

 Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile Leu
 1 5 10 15

 Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg
 20 25 30

 Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr
 35 40 45

 Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr
 50 55 60

 Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro
 65 70 75 80

ES 2 736 036 T3

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

ES 2 736 036 T3

Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val
 340 345 350

Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro Leu
 355 360 365

Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys
 370 375 380

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

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 405 410

<210> 2

<211> 413

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante de fitasa BP11

<400> 2

Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile Leu
 1 5 10 15

Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg
 20 25 30

Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr
 35 40 45

Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr
 50 55 60

Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro
 65 70 75 80

Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Thr Asp Val Asp Gln Arg Thr Leu
 85 90 95

Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu
 100 105 110

Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His
 115 120 125

Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln
 130 135 140

ES 2 736 036 T3

Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln His
145 150 155 160

Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser Lys
165 170 175

Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu Gly
180 185 190

Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu Val
195 200 205

Ser Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe
210 215 220

Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn Ile
225 230 235 240

His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Leu Leu Leu Lys Leu His Asn Val Tyr
245 250 255

Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly Thr
260 265 270

Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr Glu
275 280 285

Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala
290 295 300

Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg
305 310 315 320

Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu
325 330 335

Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val
340 345 350

Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro Leu
355 360 365

Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys
370 375 380

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

ES 2 736 036 T3

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 405 410

<210> 3

<211> 413

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante de fitasa BP111

<400> 3

Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile Leu
 1 5 10 15

Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg
 20 25 30

Asp Val Thr Pro Tyr Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr
 35 40 45

Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr
 50 55 60

Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Pro Arg Gly Ser Cys Pro
 65 70 75 80

Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Thr Asp Val Ala Gln Arg Thr Leu
 85 90 95

Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu
 100 105 110

Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His
 115 120 125

Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln
 130 135 140

Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln Arg
 145 150 155 160

Tyr Ile Pro Glu Leu Ala Leu Met Asn Thr Ile Leu Asn Phe Ser Lys
 165 170 175

Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Pro Cys Asp Leu Ala
 180 185 190

Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu Val
 195 200 205

ES 2 736 036 T3

Ser Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe
210 215 220

Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly Asn Ile
225 230 235 240

His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Leu Leu Leu Lys Leu His Asn Val Tyr
245 250 255

Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly Thr
260 265 270

Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr Glu
275 280 285

Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala
290 295 300

Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg
305 310 315 320

Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu
325 330 335

Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val
340 345 350

Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro Leu
355 360 365

Ser Leu Asn Gln Pro Pro Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys
370 375 380

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

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
405 410

- <210> 4
- <211> 413
- <212> PRT
- <213> Buttiauxella sp.
- <400> 4

5

Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile Leu
1 5 10 15

Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg

ES 2 736 036 T3

20 25 30
 Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr
 35 40 45
 Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr
 50 55 60
 Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro
 65 70 75 80
 Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr Leu
 85 90 95
 Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu
 100 105 110
 Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His
 115 120 125
 Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln
 130 135 140
 Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln His
 145 150 155 160
 Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser Thr
 165 170 175
 Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu Gly
 180 185 190
 Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys Val
 195 200 205
 Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe
 210 215 220
 Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn Ile
 225 230 235 240
 His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val Gln
 245 250 255
 Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly Thr
 260 265 270
 Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr Glu
 275 280 285

ES 2 736 036 T3

Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala
290 295 300

Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg
305 310 315 320

Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu
325 330 335

Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val
340 345 350

Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro Leu
355 360 365

Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys
370 375 380

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

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
405 410

- <210> 5
- <211> 33
- <212> PRT
- 5 <213> Buttiauxella sp.

<400> 5

Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
1 5 10 15

Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
20 25 30

Ala

- <210> 6
- <211> 440
- 10 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Phyzyme XP

<400> 6

15 Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr
1 5 10 15

ES 2 736 036 T3

Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser
 20 25 30

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

Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val
 50 55 60

Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

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

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

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

Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
 130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160

Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175

Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190

Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu
 195 200 205

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

Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
 225 230 235 240

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

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

ES 2 736 036 T3

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

Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Met Ala Ala Leu Thr Pro His
 290 295 300

Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
 305 310 315 320

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

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

Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
 355 360 365

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

Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr
 385 390 395 400

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

Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 420 425 430

Arg Ser His His His His His His
 435 440

REIVINDICACIONES

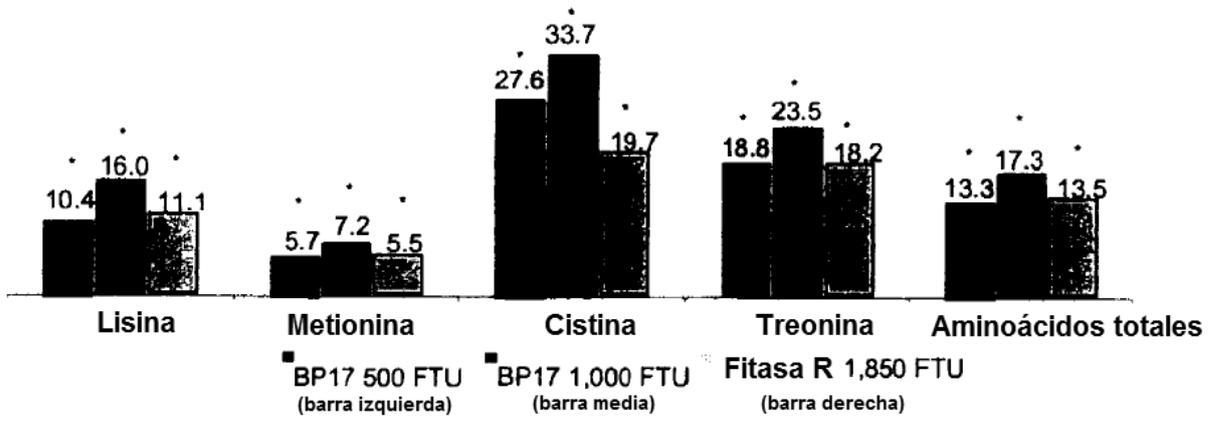
1. Un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento para animales, en el que dicho alimento comprende una fitasa, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal cuando se compara con el uso equivalente de una fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli*; en el que dicha mejora de dichas características biofísicas del animal comprende un aumento en la ganancia de peso, en el que el aumento en la ganancia de peso es al menos 2% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales, además en el que dicha fitasa es o se puede obtener de o es derivable de una especie de *Buttiauxella*.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, además en el que dicha mejora de dichas características biofísicas del animal se selecciona de una lista que consiste en:
- a) un aumento de la relación de conversión del alimento para animales;
 - b) un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo;
 - c) un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral;
 - d) un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio;
 - e) un aumento de retención de aminoácido;
 - f) un aumento de crecimiento.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mejora de dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la relación de conversión del alimento para animales cuando se compara con el uso equivalente de la fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli* en el que el aumento de la relación de conversión del alimento para animales es al menos 5% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli*, en el que el aumento de la densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo es al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales .
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli* en el que el aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral es al menos 10% durante un período de al menos 14 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales .
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli* en el que el aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio es al menos 10% durante un período de al menos cuatro semanas cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de retención de aminoácido cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli* en el que el aumento de retención de aminoácido es en promedio al menos 10% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mejora en dichas características biofísicas del animal comprende un aumento del crecimiento cuando se compara con el uso equivalente de fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli* en el que el aumento del crecimiento es al menos 20% durante un período de al menos 28 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 250 FTU/kg de alimento para animales.
9. Un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho animal se selecciona de los siguientes: un animal de granja monogástrico; un animal monogástrico; un pájaro; un ave de corral; un pollo; un pato; un pavo; un cerdo; un lechón; una cerda; un puerco; un animal de engorde-finalización; una cerda; un animal no monogástrico; un animal rumiante; un animal de granja no monogástrico; un animal productor de carne; un animal productor de lácteos; una alpaca; un bisonte; un animal bovino; un camello; un animal de la familia del ganado vacuno; una vaca; un ciervo; un burro; un animal equus; una cabra; un caballo; un cordero; cualquier animal considerado

ganadero; una llama; una mula; un buey; un reno; una oveja; un novillo; un yak; un búfalo una jirafa; un alce americano; un ciervo canadiense; una llama; un antílope; un antílope americano; un nilgó; un animal equino, bovino, cérvido, caprino, camélido; un pez; un pez gástrico; un pez agástrico; un camarón u otro crustáceo; un pez marino o un pez de agua dulce; preferiblemente en el que dicho animal es un animal domesticado

- 5 10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el que dicha fitasa tiene al menos 75, 80, 85, 90, o 95% de identidad con BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1, preferiblemente en el que dicha fitasa es BP17 como se muestra en la SEQ ID NO:1.
11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en que dicha fitasa es tolerante al pH bajo.
- 10 12. Uso de una fitasa en un procedimiento de alimentación de un animal con un alimento, en el que dicha fitasa produce una mejora en una o más de dichas características biofísicas del animal cuando se compara con el uso equivalente de una fitasa de *Peniophora lycii* y/o una fitasa de *E. coli*, en el que dicha fitasa es fitasa BP17 de la SEQ ID NO:1 o una fitasa que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la misma; en el que dicha mejora de dichas características biofísicas del animal comprende un aumento de la ganancia de peso, en el que el aumento de la ganancia de peso es al menos 2% durante un período de al menos 21 días cuando la fitasa se administra en una cantidad de al menos 500 FTU/kg de alimento para animales.
- 15 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, además en el que dicha mejora of dichas características biofísicas del animal se selecciona de una lista que consiste en:
- a) un aumento de la relación de conversión del alimento para animales;
- 20 b) un aumento de densidad ósea y/o resistencia ósea y/o depósito de calcio y/o depósito de fósforo;
- c) un aumento de la retención de un mineral y/o una disminución de la secreción de un mineral;
- d) un aumento de retención y/o una disminución de la secreción de uno cualquiera o más de cobre, sodio, fósforo, nitrógeno y calcio;
- e) un aumento de retención de aminoácido;
- 25 f) un aumento del crecimiento;

Figura 1

Mejora de la digestibilidad de aminoácidos (% de control)



Los valores son significativamente diferentes a la NC (P<0.05)

Figura 2

abc

Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

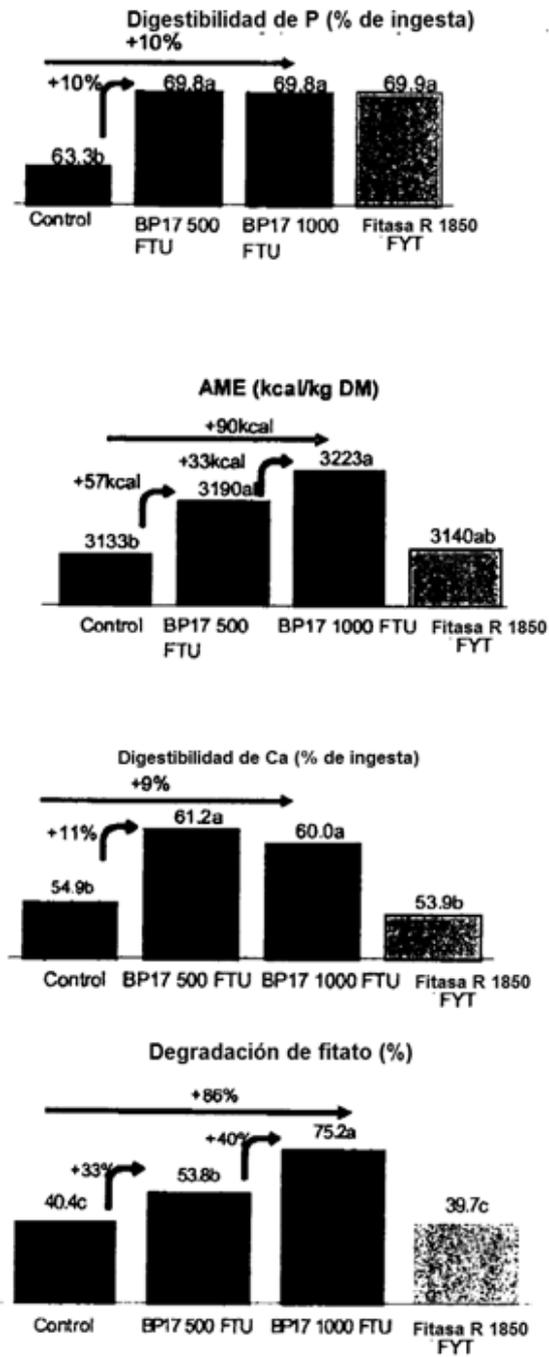
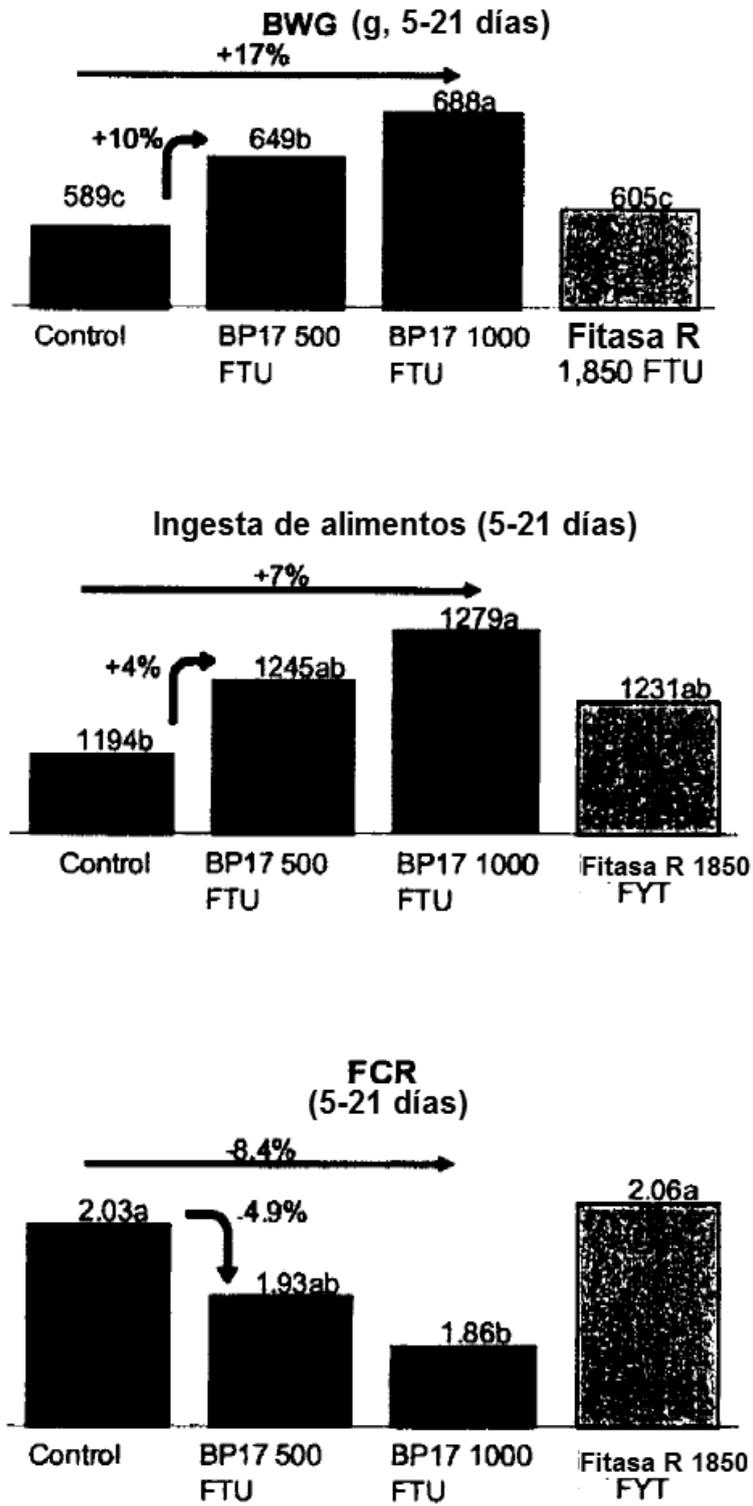


Figura 3



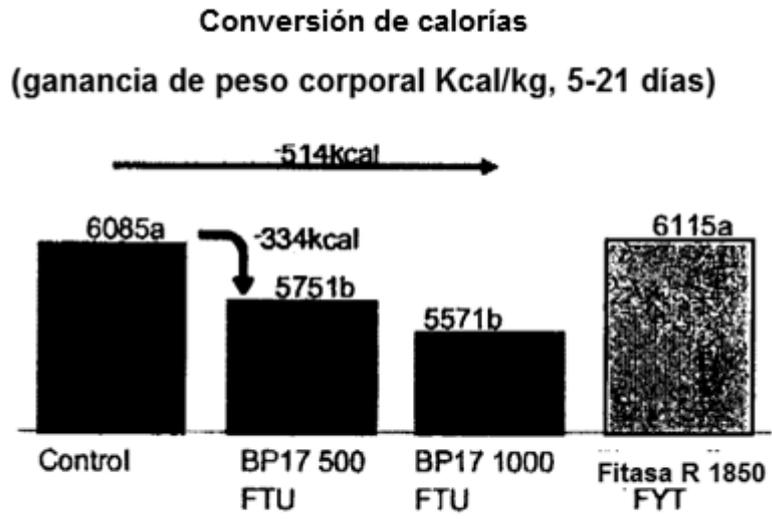
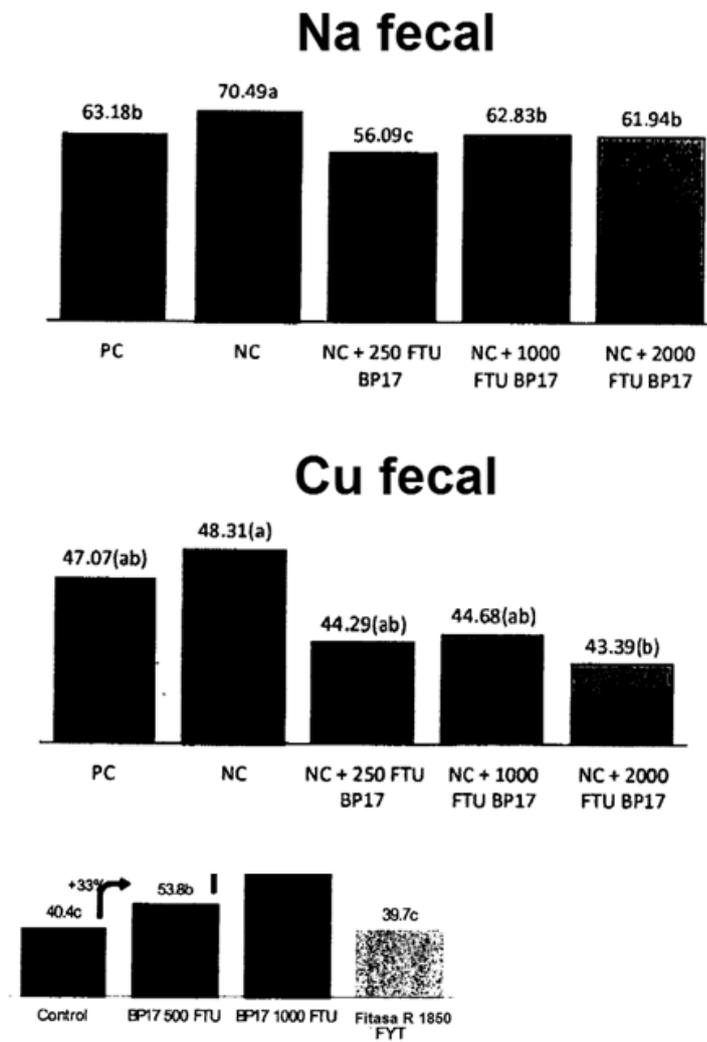


Figura 4

abc
 Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes ($P < 0,05$)



Zn fecal

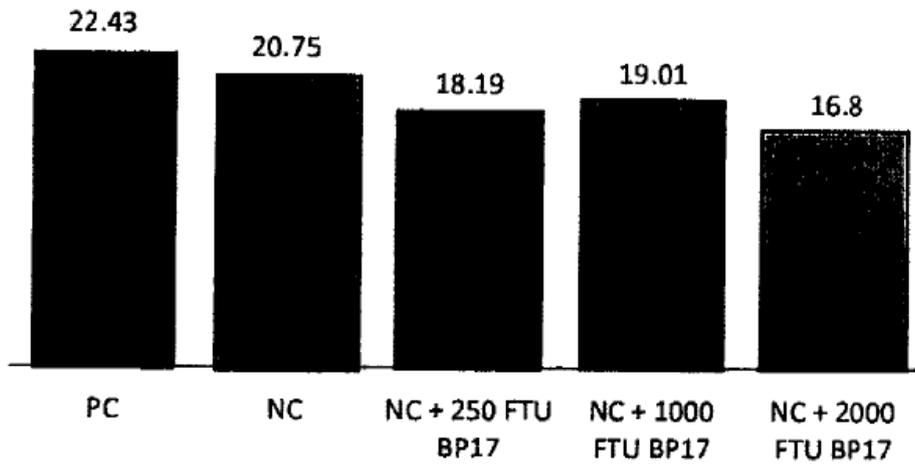
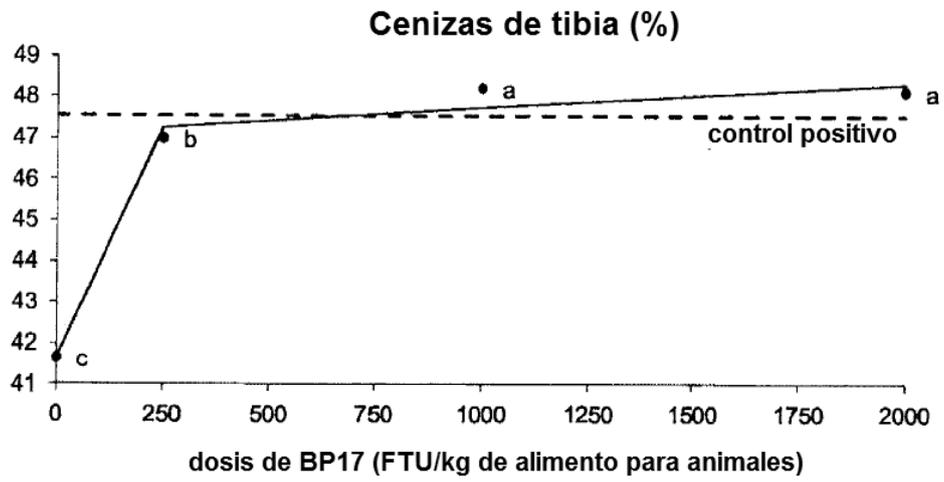
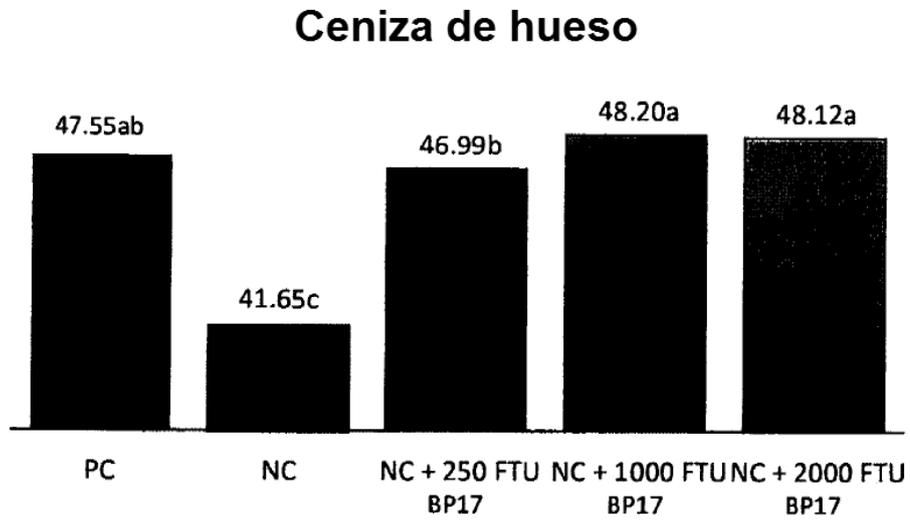


Figura 5



^{abc} Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Figura 6



^{abc} Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Figura 7

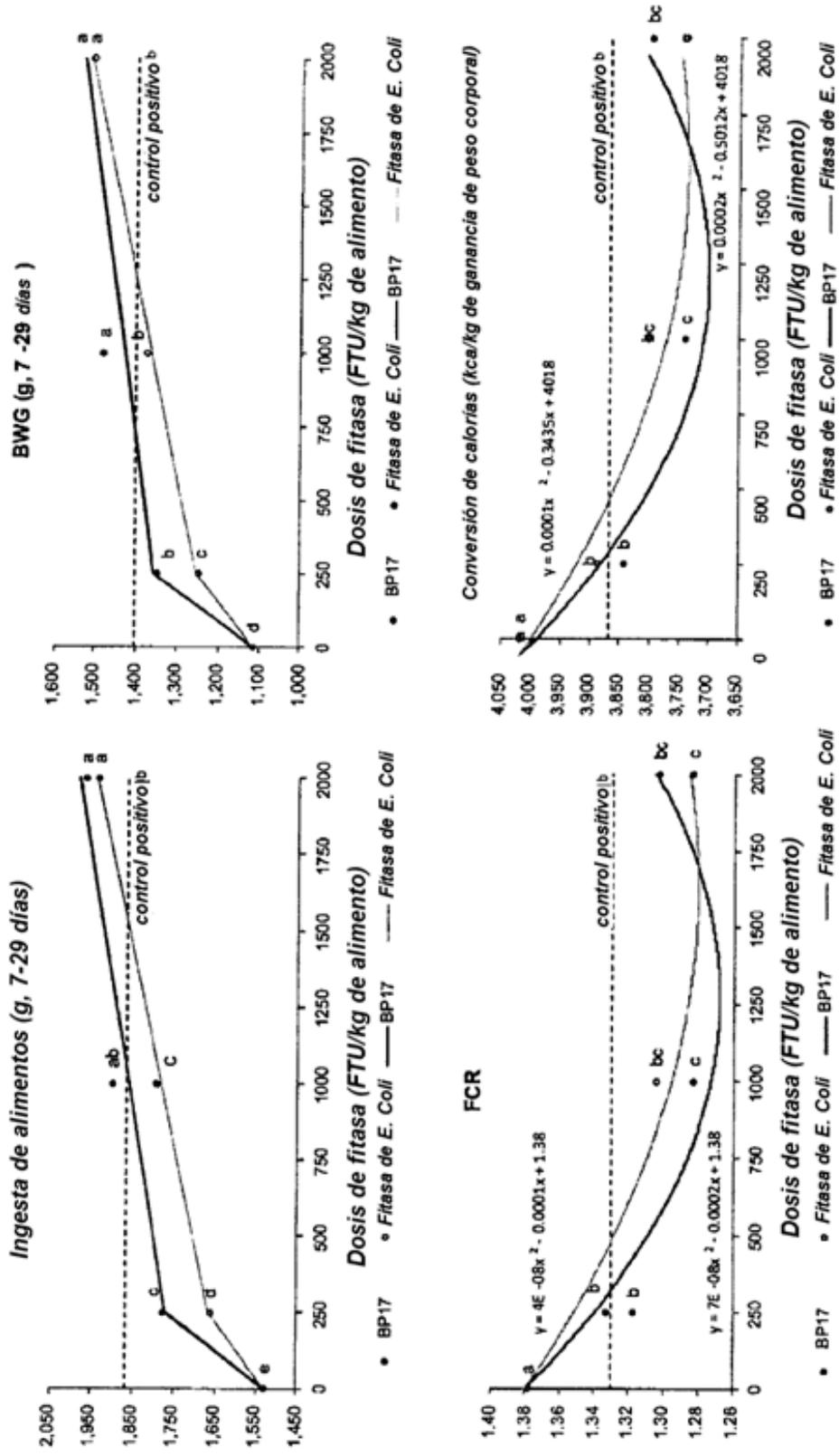


Figura 8

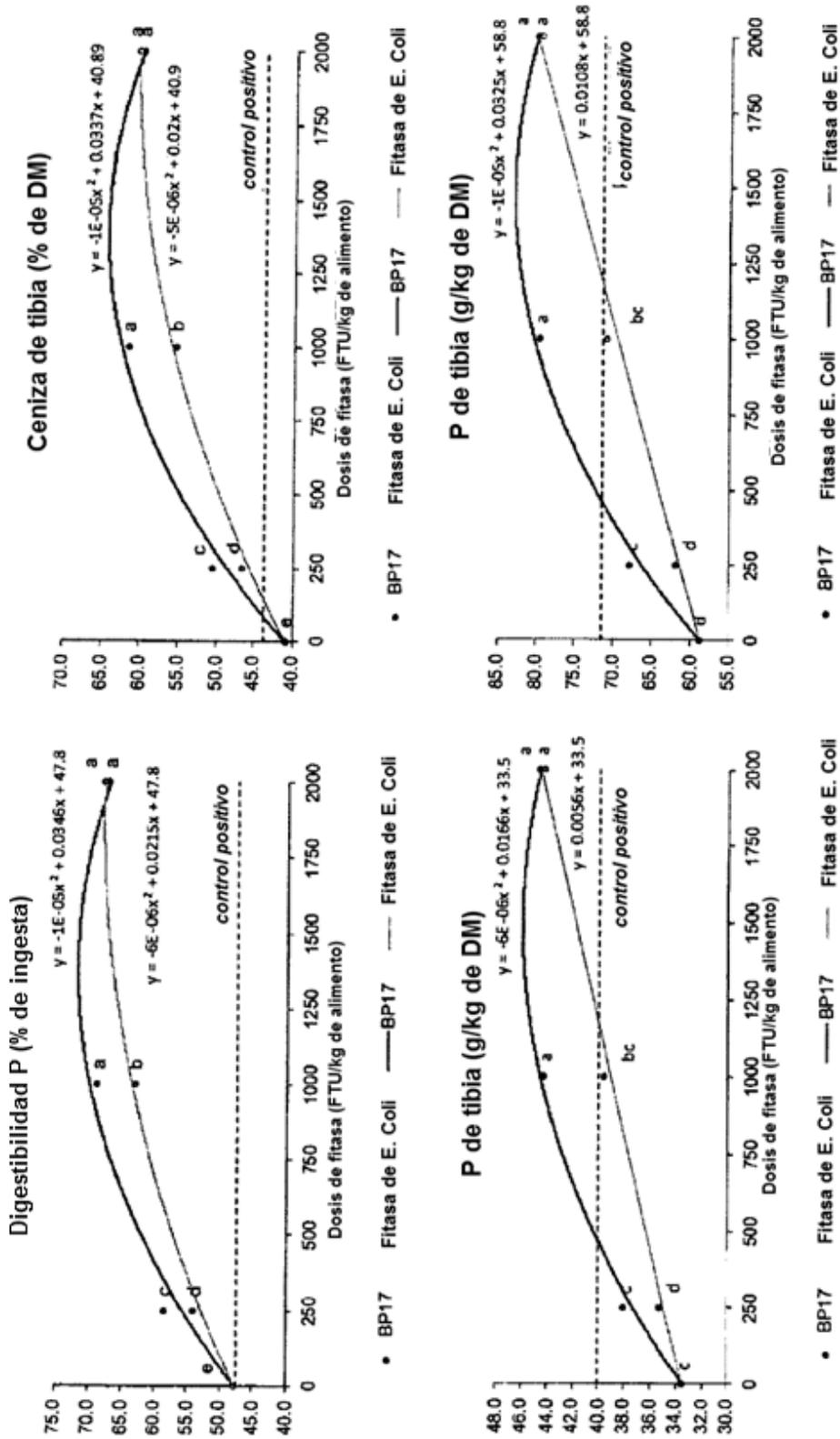


Figura 9

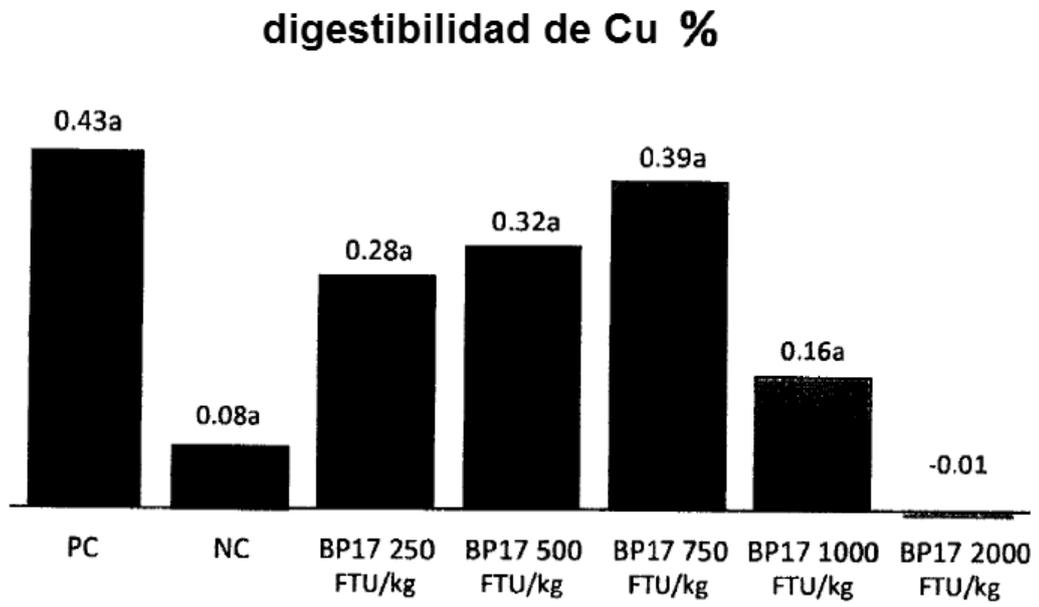


Figura 10

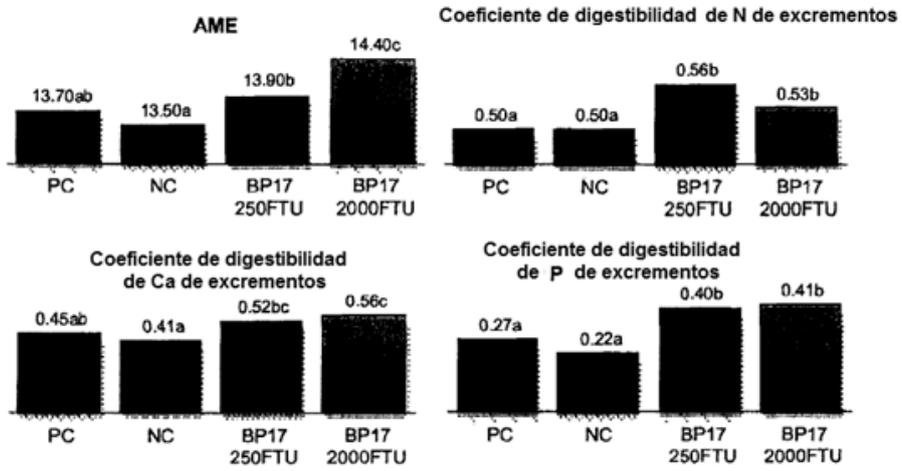


Figura 11

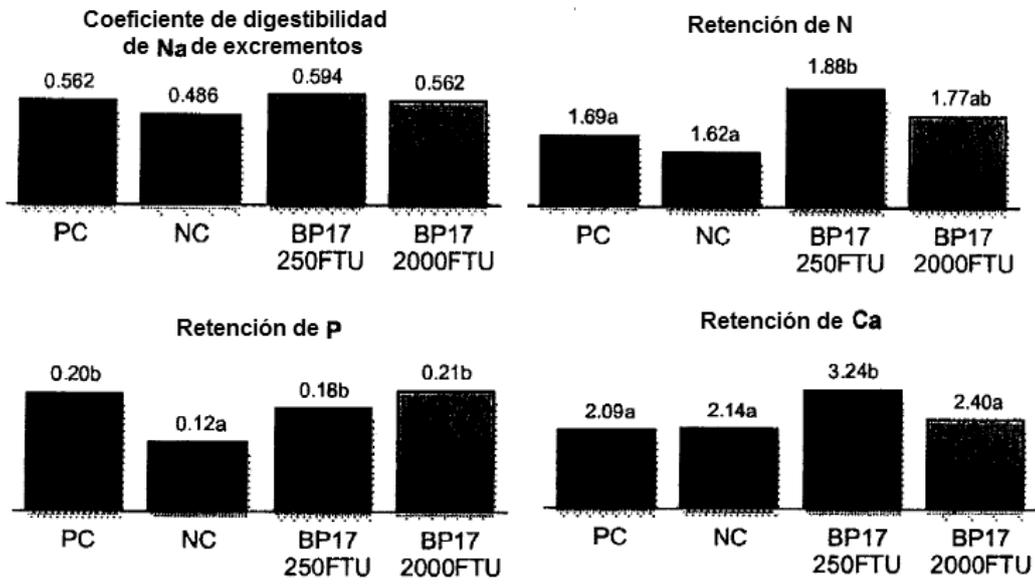
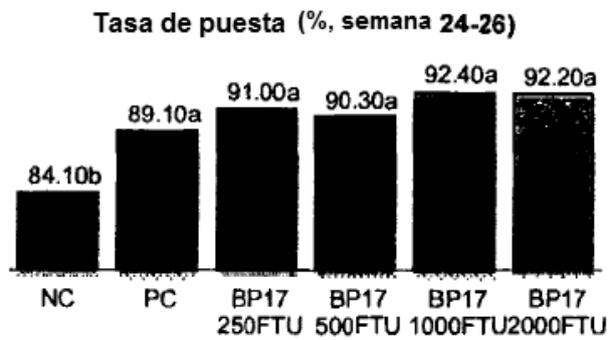
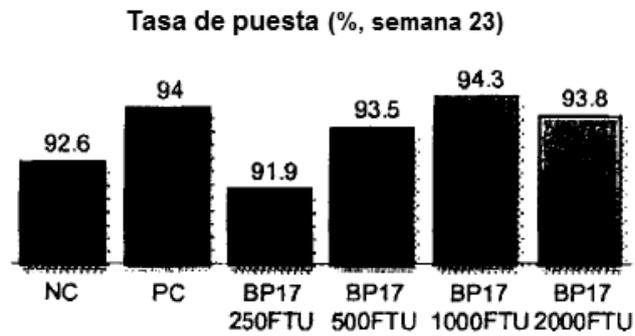
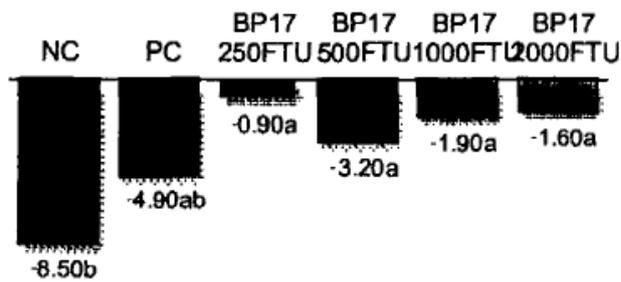


Figura 12



Diferencia de tasa de puesta (% , semana 24-26)



Peso del huevo (% , semana 23-26)

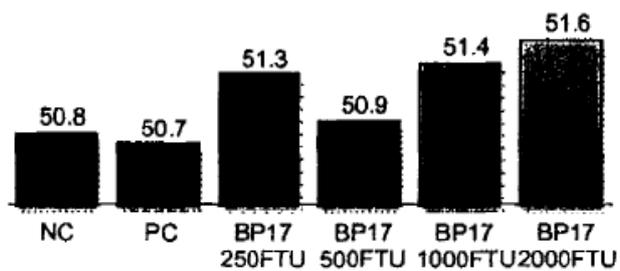


Figura 13

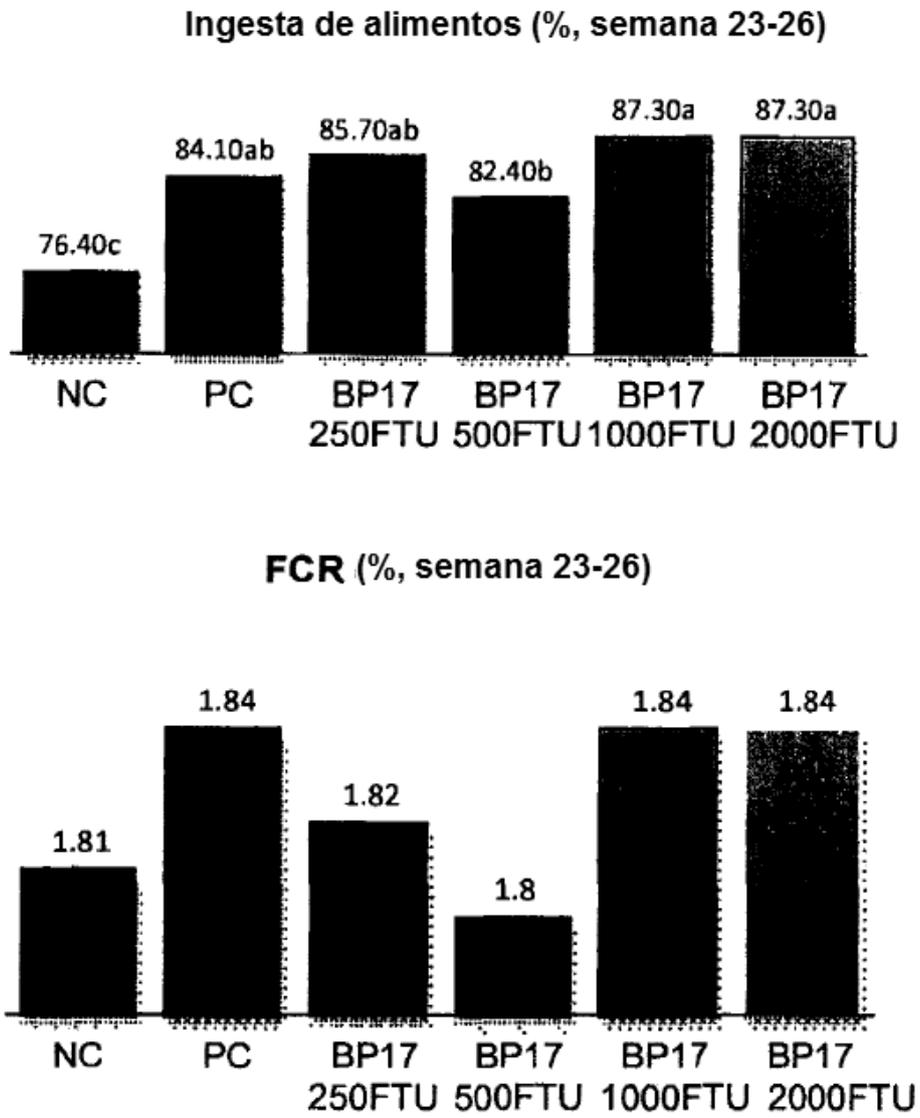
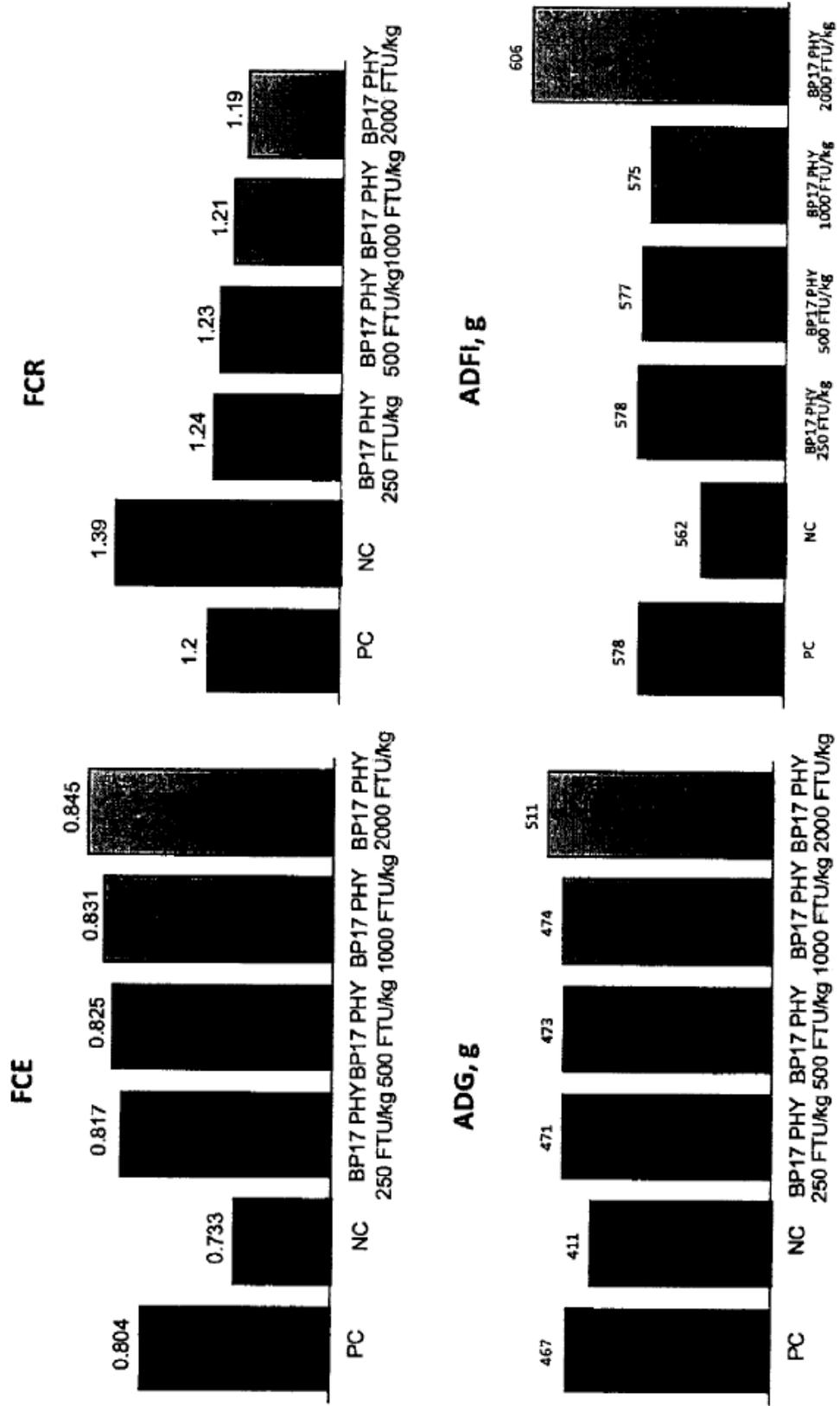


Figura 14
fitasa BP17



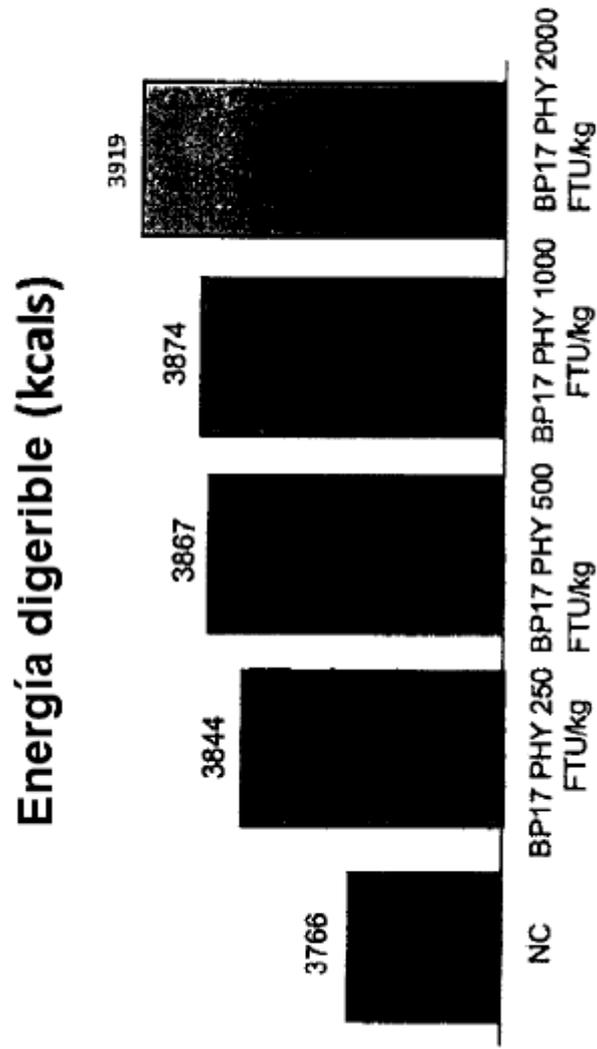
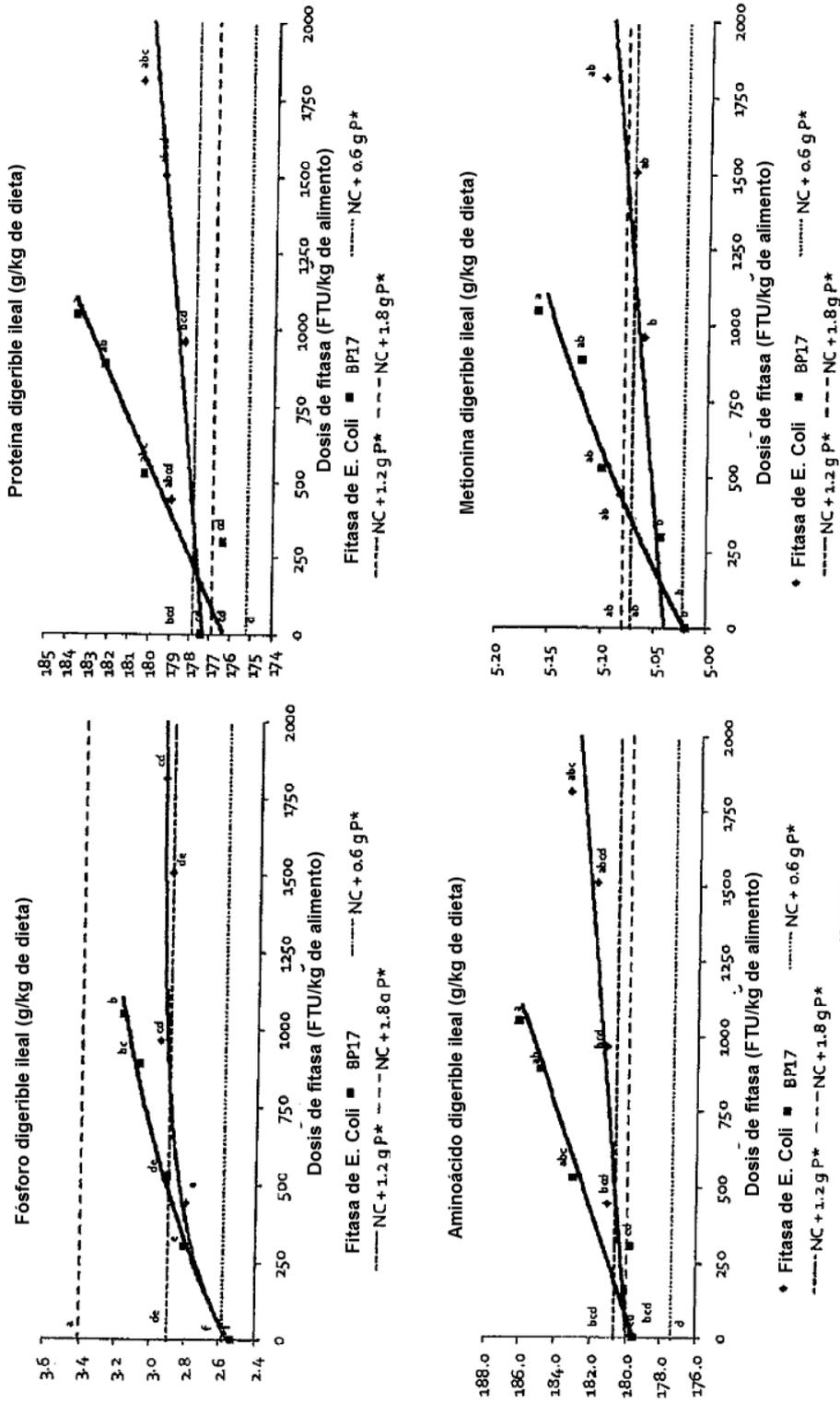


Figura 15

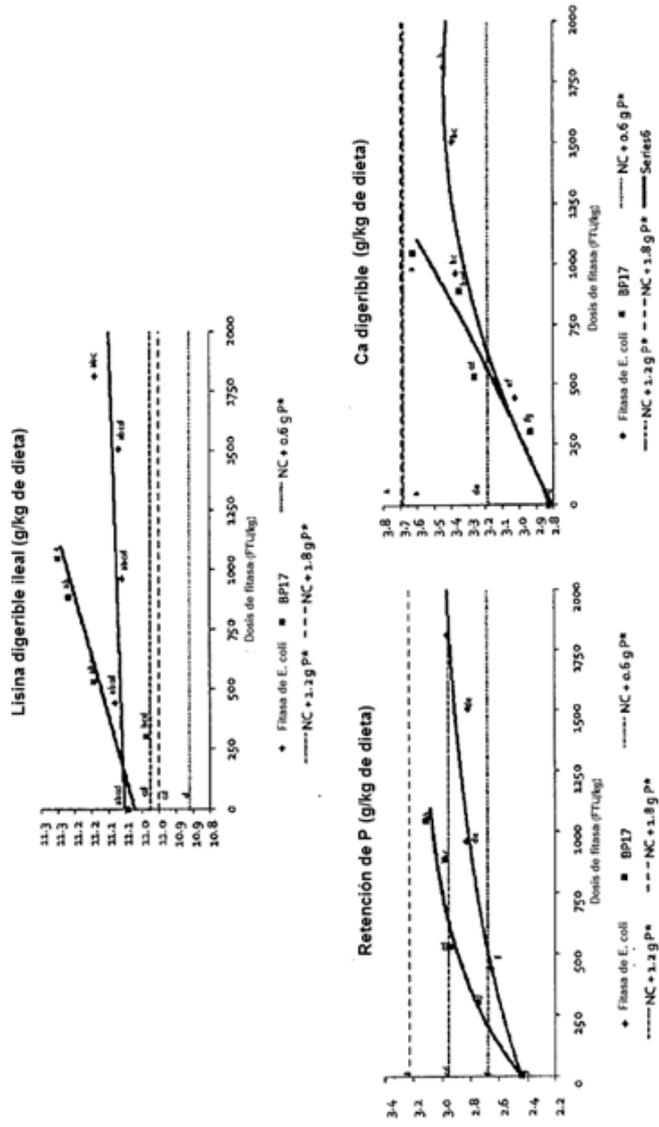
Resultados: Digestibilidad ileal de pollos de engorde (20 días)



a,b,c,1 Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)

* Suministrado de MCP

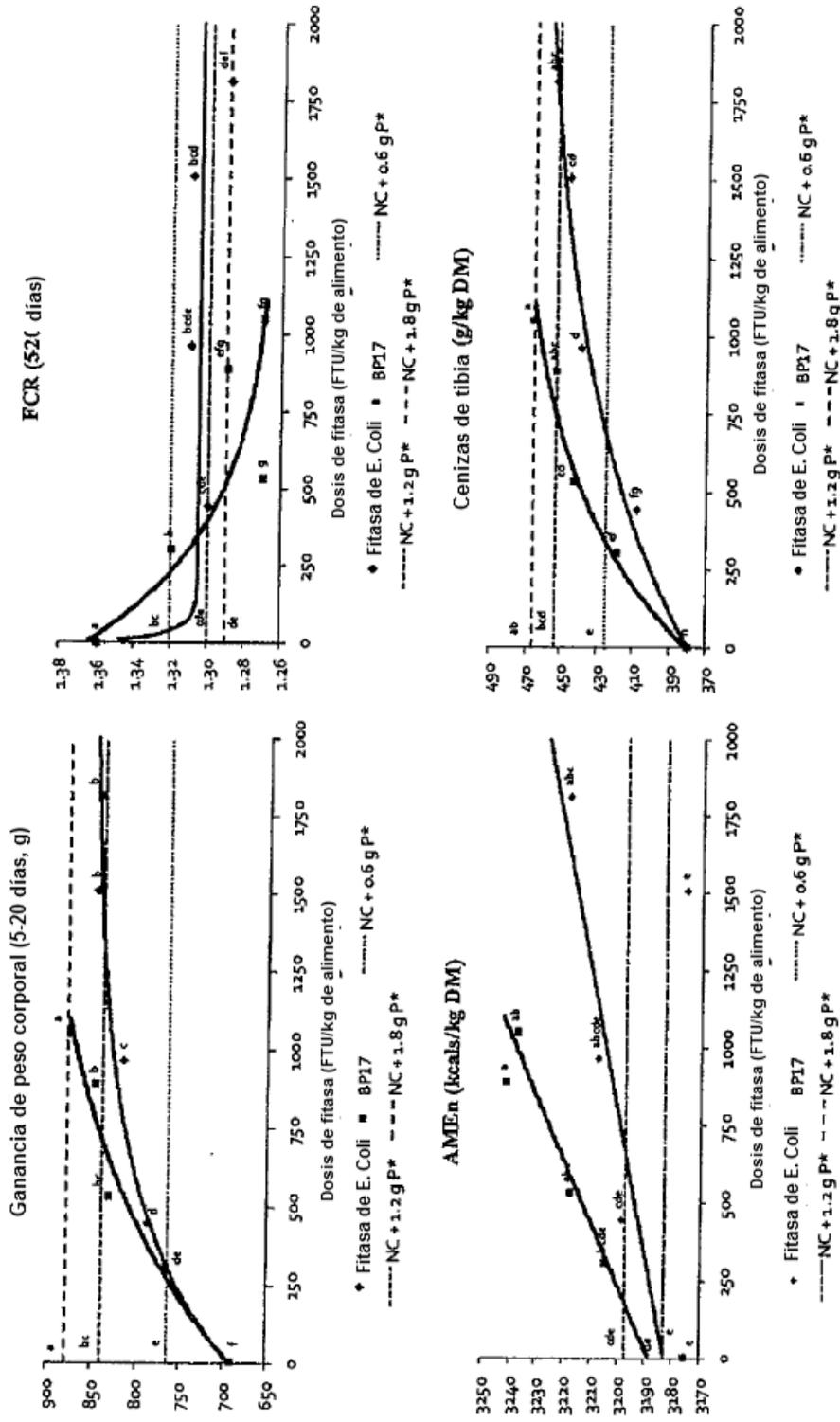
Resultados: lisina digerible ileal, Ca digerible del tracto total y retención de P en pollos de engorde



Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)
 * Suministrado de MCP

Figura 16

Resultados: Rendimiento, AMEn y cenizas de tibia de pollos de engorde

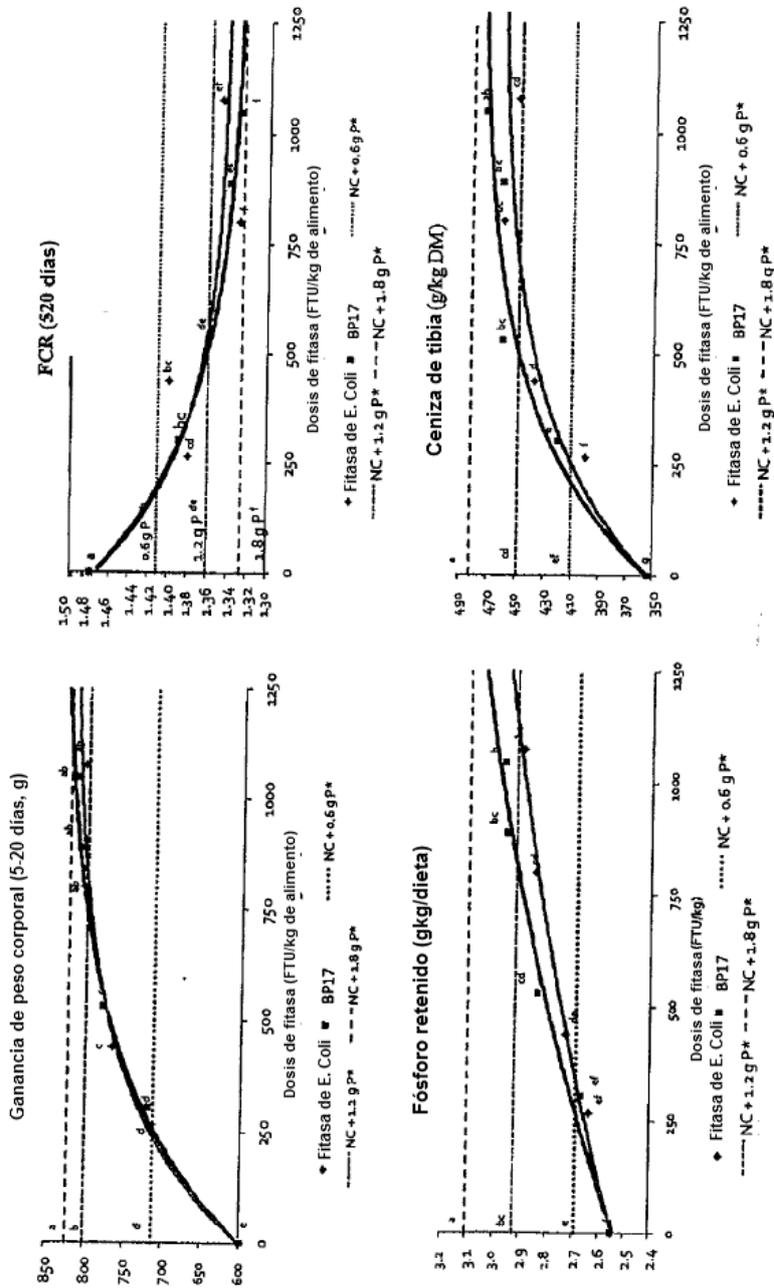


a,b,c Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)

*Suministrado de MCP, DM = materia seca

Figura 17

Resultados: Rendimiento, fósforo retenido y ceniza de tibia de pollos de engorde

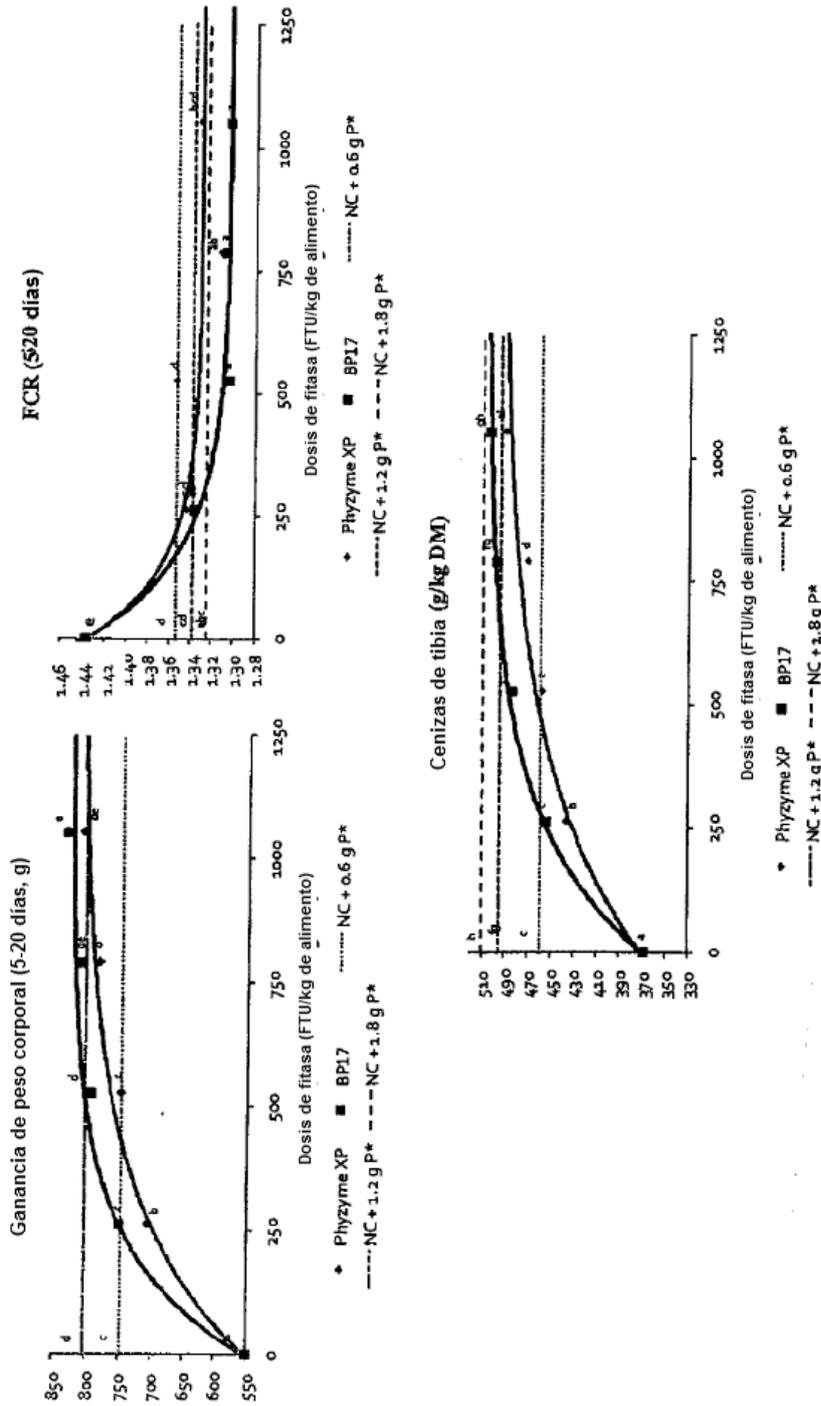


abc Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)

*Suministrado de MCP₁

Figura 18

Resultados: Rendimiento y ceniza de tibia de pollos de engorde (5-20 días)



ab,c Los valores sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05)

* Suministrado de MCP, DM = materia seca

Figura 19

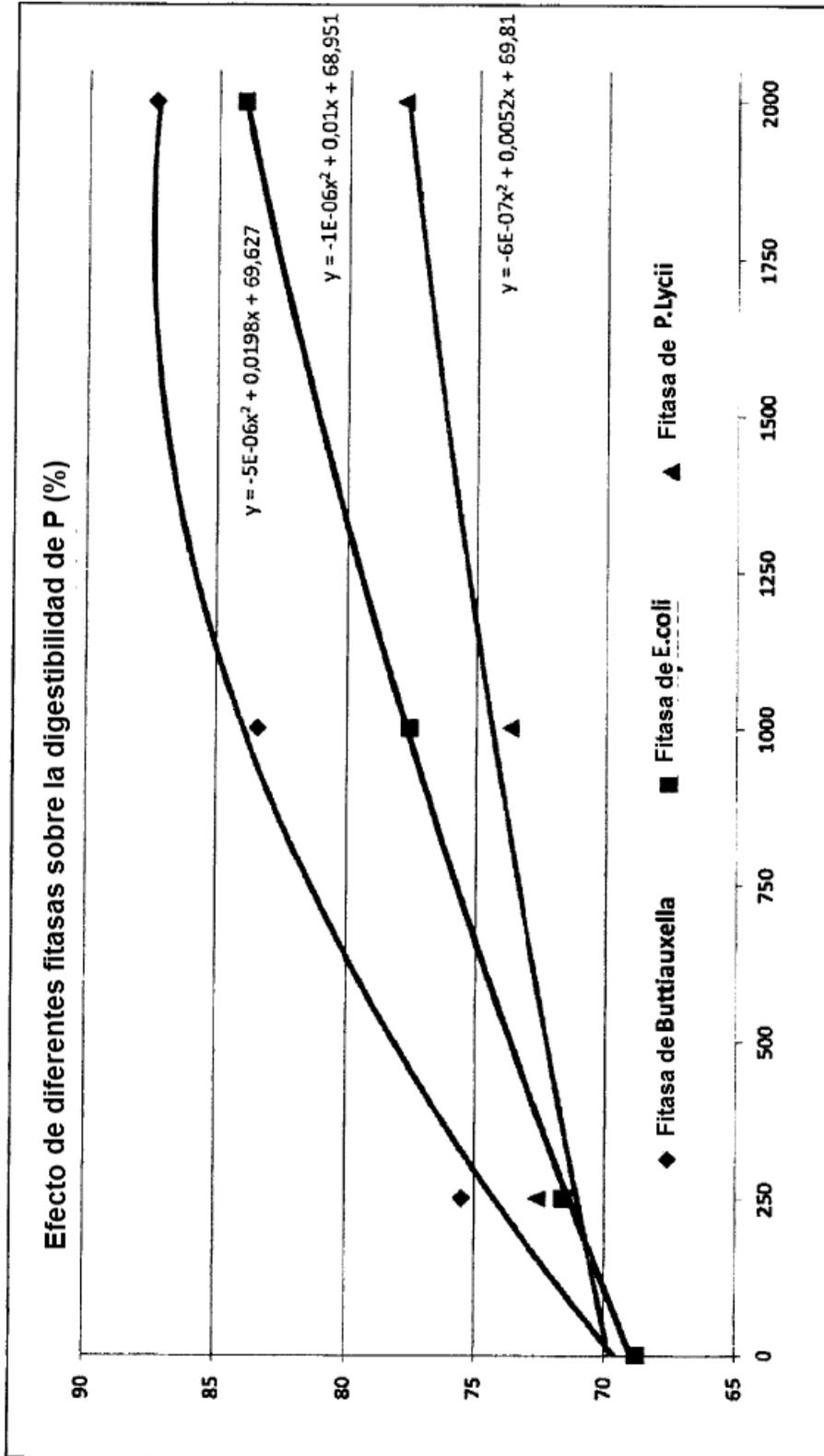


Figura 20
 Criterios de calidad de agua a lo largo del Ejemplo 21

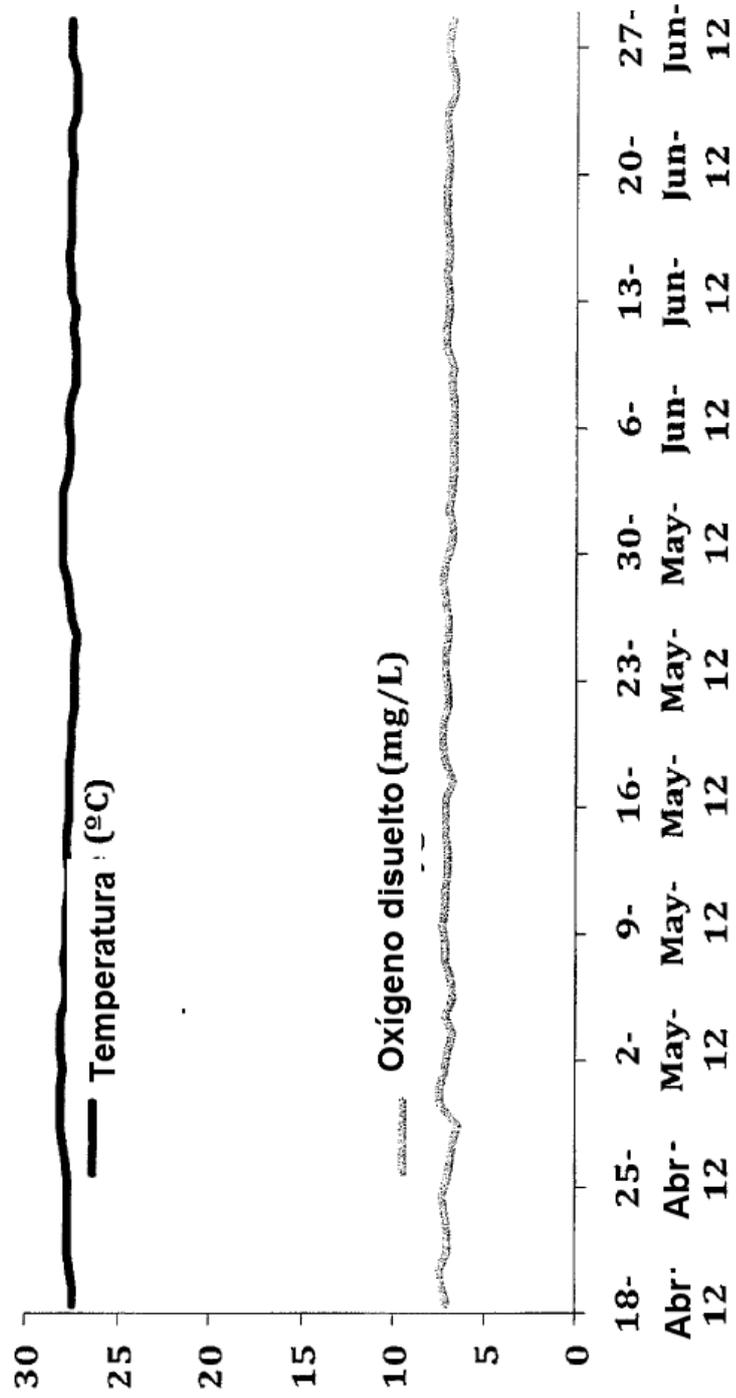


Figura 21

Determinación del pH óptimo de fitasa BP17 en comparación con 3 diferentes fuentes de fitasa comercial

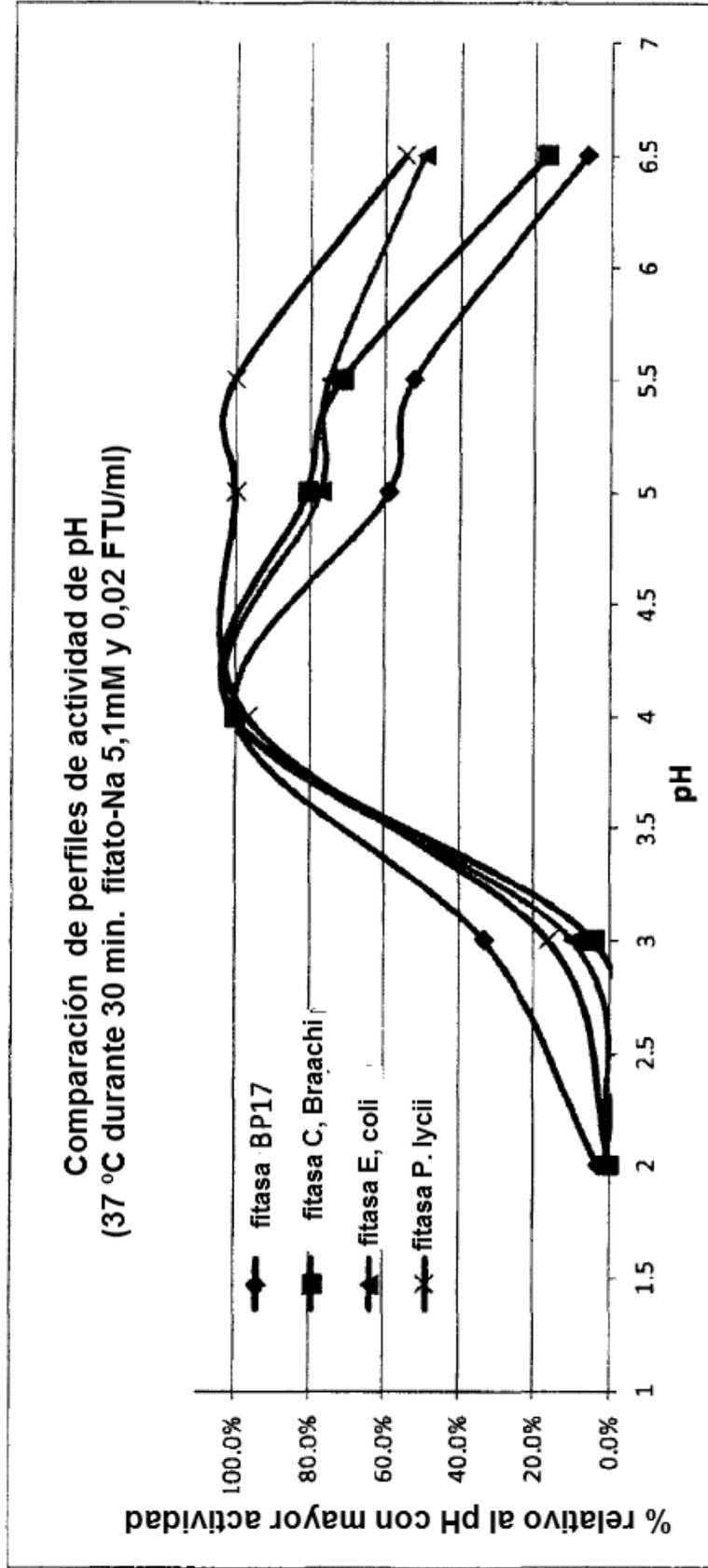


Figura 22

Actividad de fitasa BP17 a diferente pH, medido por la cantidad de fósforo liberado de fitato Na en varios pH

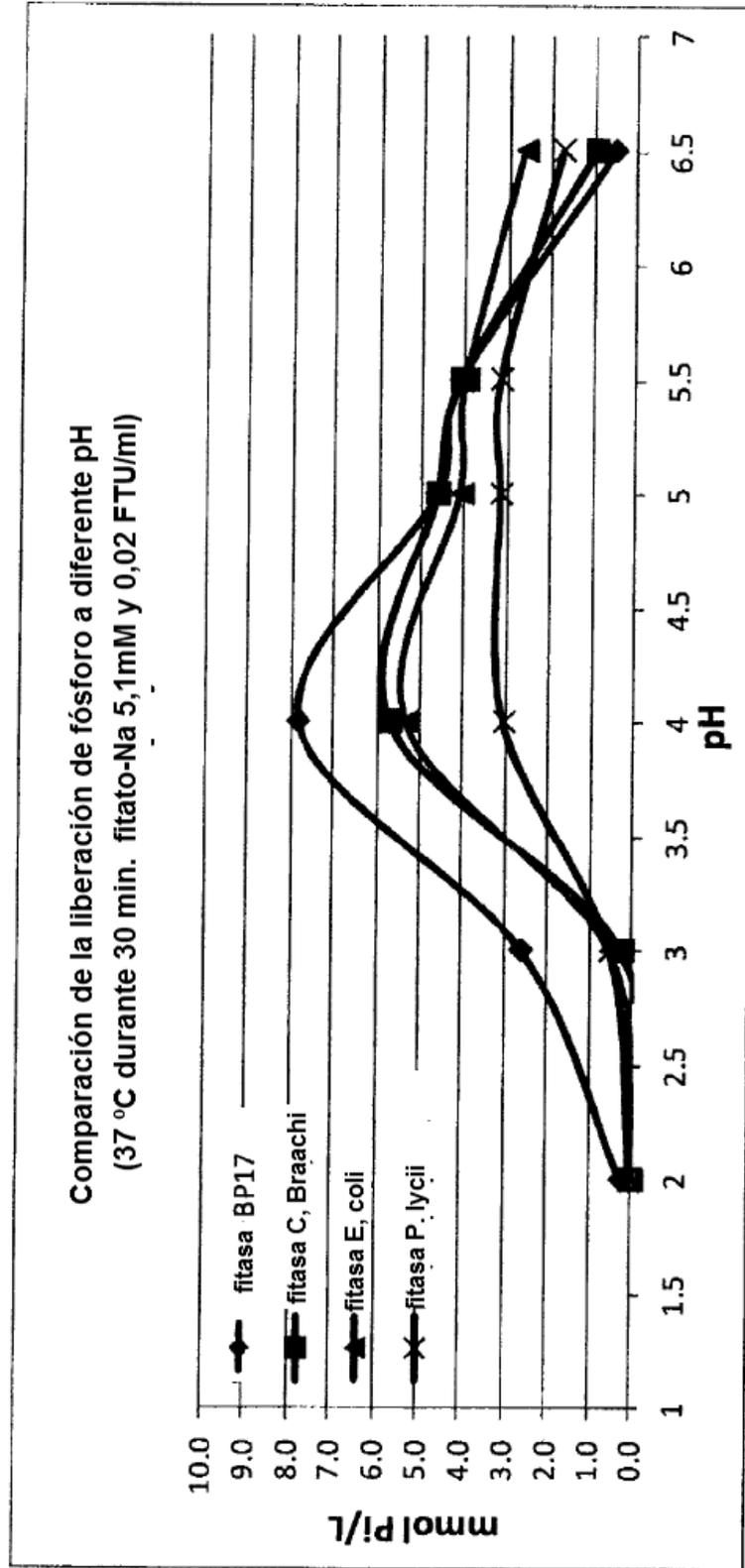


Figura 23
 Actividad relativa de fitasa BP17 en la liberación de fósforo de fitato a diferente pH, con la actividad de cada fitasa a pH 5,5 ajustada a 100%

