(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 755 988**

(51) Int. Cl.:

A23K 20/174 (2006.01)
A23K 20/189 (2006.01)
A23K 20/20 (2006.01)
A23K 50/75 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2014** **PCT/EP2014/076097**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015** **WO15079063**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2014** **E 14808914 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 3073840**

(54) Título: **Uso de amilasas bacterianas en piensos para aves de corral**

(30) Prioridad:

29.11.2013 EP 13194992

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

KNAP, INGE;
SORBARA, JOSE-OCTAVIO, B. y
HERMES, RAFAEL GUSTAVO

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 755 988 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de amilasas bacterianas en piensos para aves de corral

Referencia a una lista de secuencias

[0001] Esta aplicación contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador, que se incorpora aquí como referencia.

Antecedentes de la invención

[0002] La presente invención se refiere a métodos y usos de al menos una amilasa bacteriana en alimentos para aves de corral para mejorar el aumento de peso y/o el índice de conversión alimenticia de aves de corral. La invención está estrictamente definida por las reivindicaciones.

Descripción de la técnica relacionada

[0003] La WO 03/068256 A1 describe un suplemento alimenticio de amilasa para mejorar la nutrición de los rumiantes. La amilasa utilizada es una amilasa fúngica producida por Aspergillus oryzae. Tricarico et al, en Animal Science 2005, 81: 365-374, describen los efectos del extracto de Aspergillus oryzae, que contiene actividad de alfa-amilasa sobre la fermentación ruminal y la producción de leche en vacas Holstein lactantes.

[0004] La patente estadounidense nº. 3.250.622 describe el uso de un aditivo específico que contiene enzimas proteolíticas y amilolíticas, así como gumasa, íntimamente asociado con un portador de malta molida, para estimular la producción de leche en vacas lecheras. La fuente de la enzima no está especificada.

[0005] Rojo et al (Animal Feed Science and Technology, 123-124 (2005), 655-665) estudiaron los efectos de las amilasas exógenas de Bacillus licheniformis y Aspergillus niger en la digestión ruminal de almidón y el rendimiento del cordero.

[0006] La WO 01/41795 A1 se refiere al uso de una combinación de una proteasa y una sal interna de un ácido carboxílico de amina cuaternaria en el tratamiento y/o profilaxis de coccidiosis e infecciones bacterianas. Una alfa-amilasa es una enzima opcional que se puede agregar.

[0007] Gracia et al (Animal Feed Sci Tech, 150: 3-4, (2009), 303-315) mostraron que un complejo de múltiples enzimas con actividad de xilanasa, proteasa y alfa-amilasa mejoró el aumento de peso corporal y el ICA en pollos de engorde de 1 a 4 4 dias de edad.

[0008] Onderci et al (Poultry Sci, 85: 1 (2006), 505-510) mostraron una mejora en el aumento de peso corporal (BWG: body weight gain) y el índice de conversión alimenticia (ICA) en aves de corral alimentadas con células de E. coli que producen un gen de α-amilasa de Bacillus stearothermophilus.

[0009] WO 2008/006881 A1 describe el uso de la α-amilasa de la presente invención para mejorar el rendimiento de animales bovinos.

[0010] La US 2013/171296 A1, Gracia et al (Poultry Sci, 82:1 (2003); 436-442) y la US 2011/183032 A1 describen el uso de α-amilasa obtenida de Bacillus amyloliquefaciens y Bacillus subtilis para mejorar el aumento de peso corporal y el ICA en aves de corral. Es un objeto de la presente invención proporcionar amilasas alternativas, preferiblemente mejoradas, que mejoran la utilización del alimento y/o el aumento de peso en aves de corral.

Resumen de la invención

[0011] La presente invención se refiere al uso de al menos una amilasa bacteriana en la alimentación de aves de corral para mejorar el aumento de peso y/o el índice de conversión alimenticia de aves, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID n.º: 2, y donde la amilasa bacteriana se añade a la alimentación de las aves de corral en una dosis de alimentación entre 20 y 400 KNU/kg.

[0012] La invención también se refiere a un método para mejorar el aumento de peso y/o el índice de conversión alimenticia de aves de corral, el método comprende el paso de añadir al menos una amilasa bacteriana a la alimentación, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID n.º: 2, y donde la amilasa bacteriana se añade a la alimentación de las aves de corral en una dosis de alimentación de entre 20 y 400 KNU/kg.

Definiciones

[0013] **Amilasa:** en el presente contexto, una amilasa es una enzima que cataliza la endohidrólisis del almidón y otros oligosacáridos y polisacáridos lineales y ramificados. En una forma de realización particular, la amilasa para su uso según la invención tiene actividad alfa-amilasa, a saber. cataliza la endohidrólisis de enlaces enlaces glucosídicos alfa 1,4 en oligosacáridos y polisacáridos. Las alfa-amilasas actúan, por ejemplo, sobre almidón, glucógeno y polisacáridos y oligosacáridos relacionados de manera aleatoria, liberando grupos reductores en la configuración alfa.

[0014] Las amilasas pertenecen al grupo EC 3.2.1.-, como EC 3.2.1.1 (alfa-amilasa, 1,4-alfa-D-glucano glucanohidrolasa), EC 3.2.1.2 (beta-amilasa), EC 3.2.1.3 (glucano 1,4-alfa-glucosidasa, amiloglucosidasa o glucoamilasa), EC 3.2.1.20 (alfa-glucosidasa), EC 3.2.1.60 (glucano 1,4-alfa-maltotetraohidrolasa), EC 3.2.1.68 (isoamilasa), EC 3.2 .1.98 (glucano 1,4-alfa-maltohexosidasa), o EC 3.2.1.133 (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa). La amilasa de la invención es una alfa-amilasa que pertenece al grupo EC 3.2.1.1. Los números CE se refieren a la nomenclatura enzimática 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluidos los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; EUR. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; EUR. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; EUR. J. Biochem. 1997, 250, 1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente. La nomenclatura se complementa y actualiza regularmente; ver p. http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html.

[0015] La actividad amilasa se puede determinar por cualquier ensayo adecuado. Generalmente, el pH de ensayo y la temperatura de ensayo se pueden adaptar a la enzima en cuestión. Los ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12. Los ejemplos de temperatura de ensayos son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, o 95 °C. Los valores de pH preferidos y las temperaturas están en el rango fisiológico, como valores de pH de 3, 4, 5, 6, 7, o 8, y temperaturas de 30, 35, 37, o 40 °C. Un ensayo preferido es el ensayo de azúcar reductor de ejemplo 4 aquí. Alternativamente, se pueden usar el siguiente ensayo de amilasa: sustrato: comprimidos de Phadebas (farmacia diagnostica; polímero de almidón reticulado insoluble coloreado de azul, que se mezcla con albúmina de suero de aves de corral y una sustancia tampón, y fabricado en comprimidos). Temperatura de ensayo: 37 °C. PH de ensayo: 4.3 (o 7.0, si se desea). Tiempo de reacción: 20 min. Después de la suspensión en agua el almidón se hidroliza por la alfa-amilasa, lo que produce fragmentos de azul soluble. La absorbancia de la solución azul resultante, medida en 620 nm, es una función de la actividad alfa-amilasa. Una unidad de alfa-amilasa fúngica (1 FAU) es la cantidad de enzima que descompone 5,26 g de almidón por hora en las condiciones de ensayo estándar. Un almidón preferido es Merck, Amylum soluble Erg. B. 6, Lote 9947275. Una descripción de ensayo más detallada, APTSMYQI-3207, está disponible previa solicitud de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

[0016] **Concentrados:** el término "concentrado" significa alimentación con altas concentraciones de proteína y energía, tal como harina de pescado, melaza, oligosacáridos, sorgo, semillas y granos (o enteras o preparadas por trituración, fresado, etc., de por ejemplo maíz, avena, centeno, cebada, trigo), torta oleaginosa de prensa (por ejemplo de semilla de algodón, alazor, girasol, soja, colza/canola, cacahuete o chufa), torta de almendra de palma, material derivado de levadura y granos de destilador (tales como granos de destilador mojados (WDS: *wet distiller grains*) y granos de destiladores secos con solubles (DDGS: *dried distillers grains*)).

[0017] **Índice de conversión alimenticia**: el término "índice de conversión alimenticia" (ICA) es indicativo de cómo eficazmente se utiliza un alimento. Cuanto más bajo es el ICA, mejor se utiliza el alimento. El ICA se puede determinar sobre la base de un ensayo en animales que comprende un primer tratamiento en el que la amilasa, para el uso según la invención, se añade al pienso de animales en una concentración deseada (por ejemplo, 100 a 400 mg de proteína enzimática por kg de alimento) y un segundo tratamiento (de control) sin adición de la amilasa al pienso de animales. En formas de realización particulares, el ICA se mejora (es decir, se reduce) en comparación con el control en al menos 1,0 %, preferiblemente al menos 1,5%, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 %, 2,0 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, o al menos 2,5 %. En ejemplos de realización particulares adicionales, el ICA se mejora (es decir, se reduce) en comparación con el control en al menos 2,6%, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, o en al menos 3,0 %. En todavía ejemplos de realización particulares adicionales, el ICA se mejora (es decir, se reduce), en comparación con el control en al menos 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7%, o en al menos 3,8 %.

[0018] **Aves de corral:** El término "aves de corral" significa aves domesticadas mantenidas por humanos para los huevos que producen y/o su carne y/o sus plumas. Las aves de corral incluyen pollos de engorde y capas. Las aves de corral incluyen miembros del superorden Galloanserae (aves de caza), especialmente el orden Galliformes (que incluye pollos, gallinas de Guinea, codornices y pavos) y la familia Anatidae, en orden Anseriformes, comúnmente conocidos como "aves acuáticas" e incluyen patos domésticos y gansos domésticos. Las aves de corral también incluyen otras aves que son asesinadas por su carne, como las crías de palomas. Los ejemplos de aves de corral incluyen pollos (incluidas las capas, los pollos de engorde y los polluelos), patos, gansos, palomas (incluidas, entre otras, el pichón), gallinas de Guinea, pavos y codornices.

[0019] **Pienso para aves de corral**: el término "pienso para aves de corral" significa un alimento que se da a aves de corral, tales como pollos (incluidos capas, pollos de engorde y polluelos), patos, gansos, palomas

(incluido, entre otros, el pichón), gallina de Guinea, pavos y codorniz. El pienso a menudo comprende una premezcla que se añade, por ejemplo, al concentrado y posteriormente alimenta a las aves de corral.

[0020] **Aditivo de pienso para aves de corral**: el término "aditivo de pienso para aves de corral" significa una premezcla que comprende, por ejemplo, vitaminas y/o minerales. Las premezclas son términos reconocidos en la técnica para aditivos de pienso determinados. Estas pueden ser sólidas o líquidas. Por ejemplo, una premezcla de oligoelementos es una composición que se destina a añadirse al pienso para animales y que comprende los tipos y cantidades deseados de oligoelementos. Una premezcla vitamínica es una composición que se destina a añadirse al pienso para animales y que comprende los tipos y cantidades deseados de vitaminas. Algunas premezclas incluyen tanto vitaminas como oligoelementos y, opcionalmente, agentes de formulación, conservantes, antibióticos, otros ingredientes alimenticios o cualquier combinación de esta, que se mezcla con alimentos ricos en proteína y/o energía (tales como concentrados) antes de ser administrados a las aves de corral.

[0021] **Identidad de secuencia**: la relación entre dos secuencias de aminoácido es descritas por el parámetro "identidad de secuencia".

[0022] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina al usar el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Se utilizó la versión 6.1.0. Los parámetros opcionales usados son la penalización por apertura de hueco de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustituciónEBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). La producción de Needle, etiquetada como "la identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief), se usa como la identidad de porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100)/(longitud de alineación - número total de espacios en la alineación)

[0023] **Aumento de peso**: el término "aumento de peso" significa cuánto tanto peso ha ganado un animal durante un cierto periodo de tiempo. Un aumento de peso mejorado significa un aumento de peso mejorado diaria, semanal, bisemanal, o mensualmente (en g o kg por el período de tiempo pertinente), con respecto a un control sin amilasa añadida. Esto se determina preferiblemente en un ensayo, como se describe en el párrafo de ICA anterior.

Descripción detallada de la invención

[0024] Ha sido sorprendentemente descubierto que añadiendo una amilasa a pienso para aves de corral mejora el valor nutricional del alimento. Si la energía metabolizable aparente (EMA) del pienso para aves de corral se reduce en 100 kcal/kg, posteriormente la ganancia de peso corporal y de ICA de aves de corral empeora en comparación con aves de corral en una dieta estándar. Sin embargo, los inventores han descubierto sorprendentemente que con la amilasa de la invención en esta dieta EMA reducida mejora el aumento de peso corporal y el ICA de las aves de corral.

[0025] Se describe un método para mejorar el valor nutricional de pienso para aves de corral, el método comprende el paso de añadir al menos una amilasa bacteriana al pienso, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 85 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. La amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 91 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 92 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID n.º: 2. Además. se describe una amilasa bacteriana que es un polipéptido con al menos 93 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. También se describe una amilasa bacteriana que es un polipéptido con al menos 94 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 95 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. La amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 96 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. Además, una amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 97 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID n.º: 2. Se describe una amilasa bacteriana que es un polipéptido con al menos 98 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. Además, se describe una amilasa bacteriana que es un polipéptido con al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. Finalmente se describe el polipéptido que comprende o consiste en los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2.

[0026] En el primer aspecto de la invención, la invención se refiere a un método para mejorar el valor nutricional de pienso para aves de corral, el método comprende el paso de añadir al menos una amilasa bacteriana al pienso, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2, donde la amilasa bacteriana se añade al pienso para aves de corral en una dosis entre

20 y 400 KNU/kg de pienso y donde la amilasa bacteriana mejora el aumento de peso y/o el índice de conversión alimenticia de aves. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 85 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID n.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 91 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 92 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 93 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 94 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 95 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 96 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 97 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 98 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, el polipéptido comprende o consiste en aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2.

[0027] En una forma de realización del primer aspecto, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia. En una forma de realización, la amilasa bacteriana mejora el aumento de peso corporal. En otra forma de realización, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia y mejora el aumento de peso corporal. En una forma de realización preferida, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia de aves de corral en una dieta donde el pienso de aves tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar de aves de corral. En una forma de realización preferida, la amilasa bacteriana mejora el aumento de peso corporal de aves en una dieta donde el pienso de aves tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar de aves de corral. En una forma de realización preferida, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia y el aumento de peso corporal de aves de corral en una dieta donde el pienso de aves tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar de aves de corral.

[0028] En otra forma de realización del primer aspecto de la invención, el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar de aves de corral. En una forma de realización, la energía metabolizable aparente de un pienso de aves estándar se encuentra entre 85 % e 99,9 %, así como entre 90 % y 99,5%, entre 91 % y 99 %, entre 92 % y 99 %, entre 93 % y 98,5 %, o entre 94 % y 98 %, de un pienso estándar de aves de corral, donde la energía de un pienso estándar de aves de corral es de 3050 kcal/kg para los días 1-21 y 3170 kcal/kg para los días 22-40.

[0029] En otra forma de realización del primer aspecto de la invención, la amilasa bacteriana se añade al pienso para aves de corral en una dosis de entre 0,01 y 200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, tal como 0,05-100, 0,1-50, 0,2-35, 0,4-20, 0,5-25, 0,6-15, 0,8-8, 1-10 o 1-6 mg con proteína enzimática/kg. En el primer aspecto de la invención, la amilasa bacteriana se añade al pienso para aves de corral en una dosis de entre 20-400 KNU/kg de pienso.

[0030] En el segundo aspecto de la invención, la invención se refiere a método para mejorar el valor nutricional de pienso para aves de corral, el método comprende el paso de añadir al menos una amilasa bacteriana al pienso, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2, donde la amilasa bacteriana se añade al pienso para aves de corral en una dosis de entre 20 y 400 KNU/kg de pienso y donde la amilasa bacteriana mejora el aumento de peso y/o el índice de conversión alimenticia de aves. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 85 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 91 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 92 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 93 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 94 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 95 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 96 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 97 % identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 98 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2.

[0031] En una forma de realización del segundo aspecto, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia. En una forma de realización, la amilasa bacteriana mejora el aumento de peso corporal. En otra forma de realización, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia y mejora el aumento de peso corporal. En una forma de realización preferida, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia de aves en una dieta donde el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar para aves de corral. En una forma de realización preferida, la amilasa bacteriana mejora la ganancia de peso corporal de aves en una dieta donde el pienso de aves tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar para aves de corral. En una forma de realización preferida, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia y el aumento de peso corporal de aves de corral en una dieta donde el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar para aves de corral.

[0032] En otra forma de realización del segundo aspecto de la invención, el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar para aves de corral. En una forma de realización, la energía metabolizable aparente de un pienso de aves estándar se ubica entre 85 % y 99,9 %, tal como entre 90 % y 99,5 %, entre 91 % y 99%, entre 92 % y 99 %, entre 93 % y 98,5%, o entre 94 % y 98 % de un pienso estándar para aves de corral, donde la energía de un pienso estándar para aves de corral es de 3050 kcal/kg para los días 1-21 y 3170 kcal/kg para los días 22-40.

[0033] La amilasa bacteriana se añade al pienso para aves de corral en una dosis de entre 20-400 KNU/kg de pienso.

[0034] Se describe un aditivo de pienso para aves de corral que comprende al menos una amilasa bacteriana, junto con (i) al menos una vitamina, (ii) al menos un mineral, o (iii) al menos una vitamina y al menos un mineral, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. La amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 85 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID NO:2. La amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. Además la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 91 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. Se describe la amilasa bacteriana que es un polipéptido con al menos 92 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. También se describe una amilasa bacteriana que es un polipéptido con al menos 93 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. La amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 94 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. La amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 95 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. Además la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 96 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. También se describe la amilasa bacteriana que es un polipéptido con al menos 97 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 98 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. La amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. El polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. Además. se describe el aditivo de pienso para aves de corral que mejora el valor nutricional de un pienso para aves de corral.

[0035] En una forma de realización del primer aspecto de la presente invención se usa un aditivo de pienso de aves que comprende al menos una amilasa bacteriana, junto con (i) al menos una vitamina, (ii) al menos un mineral, o (iii) al menos una vitamina y al menos un mineral, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2, donde la amilasa bacteriana se añade al pienso para aves de corral en una dosis de entre 20 y 400 KNU/kg de pienso, y donde el aditivo de pienso para aves de corral mejora el aumento de peso o el índice de conversión alimenticia de aves de corral. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 85 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 91 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 92 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 93 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 94 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 95 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 96 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 97 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 98 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización preferida, el aditivo de pienso para aves de corral mejora el valor nutricional de un pienso para aves de corral.

[0036] Además, se describe un pienso para aves de corral que comprende el aditivo de pienso para aves de corral del tercer aspecto y 10 p% - 40 p% de harina de soja. El pienso para aves de corral comprende el aditivo de pienso para aves de corral del tercer aspecto y 10 p% - 40 p% de harina de soja, que mejora el índice de conversión alimenticia de aves de corral. El pienso para aves de corral comprende el aditivo de pienso para aves de corral del tercer aspecto y 10 p% - 40 p% de harina de soja, que mejora el aumento de peso de aves. Además, el pienso para aves de corral comprende el aditivo de pienso para aves de corral del tercer aspecto y 10 p% - 40 p% de harina de soja, que mejora el aumento de peso y/o el índice de conversión alimenticia de aves de corral.

[0037] En la presente invención la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia. En una forma de realización, la amilasa bacteriana mejora el aumento de peso corporal. En otra forma de realización, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia y mejora aumento de peso corporal. En una forma de realización preferida, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia de aves de corral en una dieta donde el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar para aves de corral. En una forma de realización preferida, la amilasa bacteriana mejora el aumento de peso corporal para aves de corral en una dieta donde el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar para aves de corral. En una forma de realización preferida, la amilasa bacteriana mejora el índice de conversión alimenticia y el aumento de peso corporal de aves en una dieta donde el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar para aves de corral.

[0038] En otra forma de realización del cuarto aspecto de la invención, el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida, en comparación con un pienso estándar para aves de corral. En una forma de realización, la energía metabolizable aparente de un pienso estándar para aves de corral es de entre 85 % y 99,9%, tal como entre 90 % y 99,5%, entre 91 % e 99 %, entre 92 % y 99 %, entre 93 % y 98,5%, o entre 94 % y 98 % de un pienso estándar para aves de corral, donde la energía de un pienso estándar para aves de corral es de 3050 kcal/kg para los días 1-21 y 3170 kcal/kg para los días 22-40.

[0039] La amilasa bacteriana se añade al pienso para aves de corral en una dosis de entre 20-400 KNU/kg de pienso.

[0040] En una forma de realización particular, la amilasa, en la forma en la que se añade al pienso, o cuando se incluye en un aditivo de pienso, está bien definida. Bien definida significa que la preparación de amilasa es al menos de 50 % pura en una base de proteína. En otros ejemplos de realización particulares la preparación de amilasa es de al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos de 95 % pura. La pureza se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo por SDS-PAGE, o por cromatografía de exclusión por tamaño (véase ejemplo 12 de la WO 01/58275).

[0041] Una preparación de amilasa bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es más fácil dosificar correctamente al pienso una amilasa que es esencialmente libre de interferir o contaminar otras enzimas. El término dosis se refiere correctamente en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación basada en el efecto deseado.

[0042] Las preparaciones de amilasa con purezas de este orden de magnitud se pueden obtener en particular utilizando métodos de producción recombinantes, considerando que no solo se obtienen tan fácilmente, sino que también están sujetas a una variación de lote a lote mucho mayor cuando se producen por métodos de fermentación tradicionales.

[0043] La amilasa bacteriana para el uso según la invención se incluye en dietas para aves de corral o en aditivos de pienso para aves de corral en una cantidad eficaz. Se contempla actualmente que una cantidad eficaz está por debajo de 400 mg de proteína enzimática por kg de materia seca de dieta, preferiblemente por debajo de 350, 300, 250, 200, 150,100 o por debajo de 50 mg de proteína enzimática por kg de (ppm) de materia seca de dieta. Por otro lado, una cantidad eficaz puede estar por encima de 0,01 mg de proteína enzimática por kg de materia seca de dieta, preferiblemente por encima de 0,5; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50; 0,75 o por encima de 1 mg de proteína enzimática por kg de (ppm) de materia seca de dieta. Por consiguiente, los ejemplos no limitativos de rangos de dosis preferidos son: 0,01-200 mg de proteína enzimática/kg, preferiblemente 0,05-100;0,1-50;0,5-25 o 1-10 mg de proteína enzimática/kg. Los ejemplos adicionales de rangos de dosis preferidos, todos en mg de proteína enzimática/kg, son: 0,2-35;0,4-20;0,6-15;0,8-8, y 1-6. En otros ejemplos no limitativos, los rangos de dosis preferidos de la amilasa bacteriana de la invención están entre 1 y 5000 KNU/kg de pienso, tal como 5-2500,10-1000,15-600,20-400,25-300,30-200,40-160 KNU/kg de pienso.

[0044] Para determinar los mg de proteína de amilasa por kg de pienso, la amilasa se purifica de la composición de pienso, y la actividad específica de la amilasa purificada se determina al usar el ensayo de amilasa deseado. La actividad amilasa de la composición de pienso como tal también se determina al usar el mismo ensayo, y,

basándose en estas dos determinaciones, la dosis se calcula en mg de proteína enzimática de amilasa por kg de pienso.
Evidentemente, si hay una muestra disponible de la amilasa utilizada para preparar el aditivo o el pienso, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (no es necesario purificar la amilasa de la composición del pienso o del aditivo).

[0046] Para una clasificación taxonómica y una identificación de bacterias se hace referencia a Manual de Bergey's de bacteriología sistemática (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (1986), vol 2; ISBN0-683-0783. Alternativamente, el análisis de secuencias 16SrRNA conocido se puede usar (véase, por ejemplo, Johansen et al, Int. J. Syst. Bacteriol, 1999, 49,1231-1240, en particular la sección de métodos en p. 1233, 2ª columna); o se pueden consultar a expertos de taxonomía , por ejemplo de DSMZ u otros institutos depositarios reconocidos.

[0047] Como se emplea aquí, el término bacteriano designa amilasas derivadas de bacterias. El término "derivado de" incluye enzimas obtenibles, u obtenidas de cepas bacterianas de tipo salvaje, al igual que variantes de las mismas. Las variantes pueden tener al menos una sustitución, inserción, y/o supresión de al menos un residuo de aminoácido. El término variante incluye también barajados, híbridos, enzimas quiméricas y enzimas consenso. Las variantes pueden ser producidas por cualquier método conocido en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, procesos de derivación de consenso (EP 897985), y transposición de genes (WO 95/22625, WO 96/00343), etc. Para los propósitos actuales, una variante de amilasa se califica como bacteriana cuando se ha utilizado al menos una amilasa bacteriana para su diseño, derivación o preparación. El término bacteriano no se refiere solo a un posible receptor de producción recombinante potencial, sino también al origen del gen que codifica la amilasa, que está alojado en él.

[0048] La amilasa para el uso según la invención se deriva preferiblemente a partir de una cepa de Bacillus, tal como cepas de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus circulans, Bacillus halmapalus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus sp, Bacillus stearothermophilus, y Bacillus subtilis; preferiblemente de cepas de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus halmapalus, Bacillus licheniformis, esp. de Bacillus, Bacillus subtilis, y Bacillus stearothermophilus.

[0049] Los ejemplos de amilasas de tipo salvaje son aquellos derivados de Bacillus licheniformis, tal como el nombre de registro Swissprot AMY BACLI, el número de registro primario P06278 (SEQ ID N.º: 8), y la amilasa comercial vendida por Novozymes A/S, bajo el nombre comercial de DURAMiLo; Bacillus amyloliquefaciens, tal como el nombre de registro Swissprot AMY BACAM, el número de registro primario P00692 (SEQ ID N.º: 7), y la amilasa comercial vendida por Novozymes A/S bajo el nombre comercial de BAN; Bacillus megaterium, tal como el nombre de registro Swissprot AMY BACME, el número de registro primario P20845; Bacillus circulans, tal como el nombre de registro Swissprot AMY BACCI, el número de registro primario P08137; Bacillus stearothermophilus, tal como el nombre de registro Swissprot AMY BACST, el número de registro primario P06279 (SEQ ID N.º: 9), y la amilasa comercial vendida por Novozymes A/S bajo el nombre comercial de TERMAMYL SC. Otro ejemplo es de Bacillus subtilis, tal como el nombre de registro Swissprot AMY BACSU, el número de registro primario P00691.

[0050] Los ejemplos de amilasas contenidas en productos comerciales son: BAN, Stainzyme, Termamyl SC, Natalasa, y Duramyl (todo de Novozymes), y en los productos de Validase BAA y Validase HT (de Valley Research). Los ejemplos particulares adicionales de amilasas para el uso según la invención son las amilasas contenidas en los siguientes productos comerciales: Clarase, DexLo, GC 262 SP, G-Zime G990, G-Zime G995, G-Zime G997, G-Zime G998, HTAA, Optimax 7525, Purastar OxAm, Purastar ST, Spezyme AA, Spezyme alpha, Spezyme BBA, Spezyme Delta AA, Spezyme DBA, Spezyme Ethyl, Spezyme Fred (GC521), Spezyme HPA, y Ultraphlow (todos de Genencor); Validase HT340L, Valley Thin 340L (todo de VAlley Research); Avizyme 1500, Dextro 300 L, Kleistase, Maltazyme, Maxamyl, termozima, Thermatex, Starzyme HT 120 L, Starzyme Super Conc, y Ultraphlo.

[0051] Los ejemplos no limitativos adicionales de amilasas son:

Amilasas que tienen, que comprenden o que consisten en aminoácidos 1-481,1-484,1-486, o 1-513 de la SEQ ID N.º: 2 (donde "1" se refiere al aminoácido de inicio del péptido maduro, Ala, cf. El listado de secuencias);
Amilasas que tienen, que comprenden o que consisten en los aminoácidos 1-483 de la SEQ ID N.º: 4;
Amilasas que tienen, que comprenden o que consisten en los aminoácidos 1-483 de la SEQ ID N.º: 5;
Amilasas que tienen, que comprenden o que consisten en los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 6 (donde "1" se refiere al aminoácido inicial del péptido maduro, Val, cf. el listado de secuencias);
Amilasas que tienen, que comprenden o que consisten en los aminoácidos 1-483 de la SEQ ID N.º: 7 (donde "1" se refiere al aminoácido inicial del péptido maduro, Val cf. el listado de secuencias);
Amilasas que tienen, que comprenden o que consisten en los aminoácidos 1-483 de la SEQ ID N.º: 8 (donde "1" se refiere al aminoácido inicial del péptido maduro, Ala, cf. el listado de secuencia); y

Amilasas que tienen, que comprenden o que consisten en los aminoácidos 1-515 de la SEQ ID N.º: 9 (donde "1" se refiere al aminoácido inicial del péptido maduro, Ala, cf. el listado de secuencias);
al igual que los fragmentos o las variantes de cualquiera de las amilasas específicas anteriores que retienen la actividad amilasa.

[0052] Un fragmento es un polipéptido con uno o más aminoácidos eliminados del amino y/o del carboxilo terminal. Preferiblemente, un fragmento contiene al menos 450 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 460 residuos de aminoácidos, aún más preferiblemente al menos 470 residuos de aminoácidos, y de la manera más preferible al menos 480 residuos de aminoácidos. Los fragmentos preferidos adicionales contienen al menos 481, 483, 484, o al menos 513 residuos de aminoácidos. Los ejemplos de los fragmentos enzimáticamente activos de la amilasa de la SEQ ID N.º: 2 son las secuencias que tienen aminoácidos 1-481,1-484, y 1-486 de los mismos.

[0053] En una forma de realización particular, la amilasa para el uso según la invención es granulablemente estable, y/o termoestable. La temperatura de fusión (Tf) de una enzima es una medida de su termoestabilidad. La amilasa de la invención puede tener una Tf de al menos 75 °C, 76 °C, 77 °C, 78 °C, 79 °C, 80 °C, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C o al menos de 95 °C, como se determina por calorimetría diferencial de barrido (CDB). La CDB se realiza en un fosfato sódico de 10 mM, tampón de cloruro sódico de 50 mM, a pH 7.0. El intervalo escaneado es constante, por ejemplo 1.5 °C/min. El intervalo escaneado puede ser de 20 a 100 °C. Se puede seleccionar otro tampón para el escaneado, por ejemplo un tampón a pH 5.0, 5.5, 6.0, o pH 6.5. En formas de realización alternativas adicionales se puede usar un intervalo escenado superior o inferior, por ejemplo, uno inferior de 1,4 °C/min; 1,3 °C/min ;1,2 °C/min; 1,1 °C/min; 1,0 °C/min, o 0,9 °C/min.

[0054] En otra forma de realización preferida, la amilasa para el uso según la invención tiene una actividad a pH 7.0 y de 37 °C, de al menos 35 %, relativa a la actividad al pH óptimo y de 37 °C. Más preferiblemente, la actividad a pH 7.0 y de 37 °C es al menos de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, o al menos de 75 % de la actividad al pH óptimo y de 37 °C (cf. tabla 1 del ejemplo 2).

[0055] En otra forma de realización preferida, la amilasa de la invención tiene una actividad a pH 7.0 y de 37 °C y en presencia de sales biliares de 5mM de al menos 25 %, relativas a la actividad al pH óptimo y de 37 °C en ausencia de sales biliares. Más preferiblemente, la actividad a pH 7.0 y de 37 °C y, en presencia de sales biliares de 5mM es al menos de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, o al menos 65 % de la actividad al pH óptimo y de 37 °C en ausencia de sales biliares (cf. tabla 2 del ejemplo 2).

[0056] En aún otra forma de realización preferida adicional, la actividad específica de la amilasa de la invención, a pH 7.0 y de 37 °C, es al menos de 10 %, más preferiblemente al menos de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, o al menos 70 %, relativa a la actividad específica de la amilasa de TERMAMYL SC a pH 5.0 y de 37 °C (cf. tabla 3 del ejemplo 2).

[0057] En otra forma de realización preferida, la actividad específica de la amilasa de la invención, a pH 7.0 yde 37 °C y, en presencia de sales biliares de5mM, es al menos de 10 %, más preferiblemente al menos de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, o al menos de 75 %, relativa a la actividad específica de la amilasa de TERMAMYL SC a pH 5.0 y de 37 °C y ,en presencia de sales biliares de 5mM (cf. tabla 4 del ejemplo 2).

[0058] Las actividades referidas a las formas de realización preferidos anteriores se pueden determinar utilizando adecuadamente un ensayo de azúcar reductor, por ejemplo como se describe en el ejemplo 2, usando preferiblemente maíz ceroso como sustrato. Un procedimiento detallado se describe en el ejemplo 2.

[0059] En otra forma de realización particular, la amilasa para el uso según la invención es estable en presencia de proteasa. Los ejemplos de proteasas son las proteasas digestivas, y proteasas de pienso, tales como las proteasas descritas en, por ejemplo, la WO 01/58275, la WO 01/58276, la WO 2004/111220 2004/111221, la WO 2004/072221, y la WO 2005/035747. Los ejemplos de proteasas digestivas son la pancreatina y la pepsina. La estabilidad de proteasa se puede determinar al incubar 0,5 mg de enzima de proteína de amilasa purificada/ml en un tampón a un pH deseado (por ejemplo pH 2, 3, 4, o 5), para el tiempo deseado (por ejemplo 30, 45, 60, 90, o 120 minutos) en presencia de proteasa (por ejemplo, pepsina, 70 mg/l), y posteriormente aumentar el pH al pH deseado (por ejemplo pH 4, 5, 6, o 7) y medir la actividad residual usando, por ejemplo, el ensayo de azúcar reductor del ejemplo 2 aquí. La actividad amilasa residual es preferiblemente al menos de 20 %, preferiblemente al menos de 30, 40, 50, 60, 70, 80, o al menos de 90 % relativa al control (una muestra no tratada con proteasa).

Pienso para aves de corral y aditivos de pienso para aves de corral

[0060] La presente invención también se refiere a pienso para aves de corral y a aditivos de pienso para aves de corral para el uso y el método según la invención, que comprende la amilasa de la presente invención. Preferiblemente, el pienso para aves de corral o el aditivo de pienso para aves de corral se enriquecen con la amilasa de la invención. El término "enriquecido" indica que la actividad amilasa de la composición ha sido

aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1, tal como al menos de 1,2, al menos de 1,3; al menos de 1,4; al menos de 1,5; al menos de 2,0; al menos de 3,0; al menos de 4,0; al menos de 5,0; al menos 10.

[0061] En una forma de realización, el pienso para aves de corral o pienso para aves de corral según el uso y el método de la invención comprende el polipéptido de la invención y uno o más agentes de formulación. En una forma de realización, el pienso para aves de corral o el aditivo de pienso para aves de corral comprende el polipéptido de la invención junto con (i) al menos una vitamina, (ii) al menos un mineral, o (iii) al menos una vitamina y al menos un mineral. En una forma de realización, el pienso para aves de corral o el aditivo de pienso para aves de corral comprende el polipéptido de la invención junto con uno o más agentes de formulación y (i) al menos una vitamina, (ii) al menos un mineral, o (iii) al menos una vitamina y al menos un mineral. En una forma de realización, el pienso para aves de corral o el aditivo de pienso para aves de corral comprende además uno o más aminoácidos. En una forma de realización, el pienso para aves de corral o el aditivo de pienso para aves de corral comprende además uno o más ingredientes de piensos. En una forma de realización, el pienso para aves de corral o el aditivo de pienso para aves de corral comprende además uno o más aminoácidos y uno o más ingredientes de piensos.

[0062] En una forma de realización, el aditivo de pienso para aves de corral consiste en el polipéptido de la invención y uno o más componentes del grupo que consiste en vitaminas, minerales, agentes de formulación y otros ingredientes de piensos. En una forma de realización, el aditivo de pienso para aves de corral consiste en el polipéptido de la invención, una o más vitaminas y uno o más agentes de formulación. En una forma de realización, el aditivo de pienso de aves consiste en el polipéptido de la invención, uno o más minerales y uno o más agentes de formulación. En una forma de realización, el aditivo de pienso para aves de corral consiste en el polipéptido de la invención, uno o más minerales, una o más vitaminas y uno o más agentes de formulación. En una forma de realización, el aditivo de pienso para aves de corral consiste en el polipéptido de la invención, uno o más minerales, una o más vitaminas, unos o más otros ingredientes de piensos y uno o más agentes de formulación.

[0063] En una forma de realización, el pienso para ves de corral consiste en el polipéptido de la invención, uno o más concentrados y uno o más componentes del grupo que consiste en vitaminas, minerales, agentes de formulación y otros ingredientes de piensos. En una forma de realización, el pienso para aves de corral consiste en el polipéptido de la invención, uno o más concentrados, una o más vitaminas y uno o más agentes de formulación. En una forma de realización, el pienso para aves de corral consiste en el polipéptido de la invención, uno o más concentrados, uno o más minerales y uno o más agentes de formulación. En una forma de realización, el pienso para aves de corral consiste en el polipéptido de la invención, uno o más concentrados, uno o más minerales, una o más vitaminas y uno o más agentes de formulación. En una forma de realización, el pienso para aves de corral consiste en el polipéptido de la invención, uno o más concentrados, uno o más minerales, una o más vitaminas, unos o más otros ingredientes de piensos y uno o más agentes de formulación.

[0064] El pienso para aves de corral tiene un contenido bruto de proteínas de 50-800 g/kg, y comprende además al menos una amilasa, como se reivindica aquí.

[0065] Las composiciones de pienso para aves de corral según el uso y el método de la invención comprenden, además de la amilasa para el uso según la invención como se describe anteriormente, al menos harina de soja y un oligoelemento y/o premezcla vitamínica como se específica anteriormente. Por ejemplo, la composición de pienso contiene 10 p% - 40 p% de comida de soja y 0,5 p% - 2 p% de oligoelementos y vitaminas.

[0066] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas completas para animales se calcula basándose en tablas de pienso, tal como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6,8219 pk lelistad. ISBN 90-72839-13-7.

[0067] En ejemplos preferidos, la composición de pienso para aves de corral contiene por kg de pienso: vit. A, 7.000 - 9.000 UI; vit. D3, 2.000 - 2.500 UI; vit. E, 15 - 20 mg; vit. K3, 1, 5 - 2,5 mg; tiamina, 1 - 2 mg; riboflavina, 6 - 7 mg; piridoxina, 2 - 3 mg; ácido pantoténico, 10- 12 mg; ácido fólico, 0,5 - 1,5 mg; biotina, 0,1 - 1 mg; hierro, 100 - 150 mg; zinc, 100- 150 mg; manganeso, 100 - 150 mg; cobalto, 1 - 2 mg; cobre, 10 - 20 mg.

[0068] La proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicada por un factor 6,25, es decir, proteína cruda (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, métodos oficiales de análisis 14º ed., Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, Washington DC).

[0069] La energía metabolizable se puede calcular basándose en la tabla europea de valores de energía para materiales de pienso para aves de corral, Spelderholt center para la investigación y extensión de aves de corral, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

[0070] El pienso para aves de corral del uso y el método de la invención también puede contener proteína animal, tal como harina de carne y huesos, harina de plumas, y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25 %. El pienso para aves de corral de la invención también puede comprender granos de destiladores secos con solubles (DDGS), típicamente en cantidades de 0-30 %.

[0071] En todavía más formas de realización particulares, el uso y el método del pienso para aves de corral de la invención contiene 0-80 % de maíz; y/o 0-80 % de sorgo; y/o 0-70 % de trigo; y/o 0-70 % de cebada; y/o 0-30 % de avena; y/o 10-40 % de harina de soja; y/o 0-25 % de harina de pescado; y/o 0-25 % de harina de carne y huesos; y/o 0-20 % de suero de leche.

[0072] El pienso para animales puede comprender proteínas vegetales. En formas de realización particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es al menos de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90 % (p/p). Las proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, tal como legumbres y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias Fabaceae (leguminosae), Cruciferaceae, Chenopodiaceae, y Poaceae, tal como harina de soja, harina de lupino, harina de colza, y combinaciones de los mismos.

[0073] En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia Fabaceae, por ejemplo, soja, lupino, guisante, o judía. En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia Chenopodiaceae, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa. Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son la colza, y el repollo. En otra forma de realización particular, la soja es una fuente de proteína vegetal preferida. Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son los cereales, tales como cebada, trigo, centeno, maíz, arroz, arroz, y sorgo.

Agente de formulación

[0074] El uso y el método de aditivo de pienso para aves de corral de la invención se pueden formular como un líquido o un sólido. Para una formulación líquida, el agente de formulación puede comprender un poliol (tal como, por de sodio, sorbato de potasio) o un azúcar o derivado de azúcar (tal como, por ejemplo, dextrina, glucosa, sacarosa, y sorbitol). Por lo tanto, en una forma de realización, el aditivo de pienso para aves de corral es una composición líquida que comprende el polipéptido de la invención y uno o más agentes de formulación seleccionados de la lista que consiste en glicerol, etilenglicol, 1,2-propilenglicol, 1,3-propilenglicol, cloruro de sodio, benzoato de sodio, sorbato de potasio, dextrina, glucosa, sacarosa y sorbitol.

[0075] Para una formulación sólida, la formulación puede ser, por ejemplo, como un gránulo, polvo secado atomizado o aglomerado. El agente de formulación puede comprender una sal (zinc orgánico o inorgánico, sodio, sales de potasio o calcio, tales como, por ejemplo, tal como acetato de calcio, benzoato de calcio, carbonato cálcico, cloruro de calcio, citrato de calcio, sorbato de calcio, sulfato de calcio, acetato de potasio, benzoato de potasio, carbonato potásico, cloruro de potasio, citrato de potasio, sorbato de potasio, sulfato de potasio, acetato sódico, benzoato sódico, carbonato de sodio, cloruro sódico, citrato sódico, sulfato de sodio, acetato de zinc, benzoato de zinc, carbonato de zinc, cloruro de zinc, citrato de zinc, sorbato de zinc, sulfato de zinc), almidón o un azúcar o derivado de azúcar (tal como, por ejemplo, sacarosa, dextrina, glucosa, lactosa, sorbitol).

[0076] En una forma de realización, el aditivo sólido de pienso para aves de corral se encuentra en forma granulada. El gránulo puede tener una estructura matricial, donde los componentes se mezclan homogéneamente. Sin embargo, el gránulo comprende típicamente una partícula de núcleo y uno o más recubrimientos, que son típicamente recubrimientos de sal y/o cera. La partícula de núcleo puede ser o una mezcla homogénea de amilasa de la invención, y opcionalmente junto con una o más sales, o una partícula inerte con la amilasa de la invención aplicado sobre ella.

[0077] En una forma de realización, el material de las partículas de núcleo se selecciona del grupo que consta de sales inorgánicas (tal como acetato de calcio, benzoato de calcio, carbonato cálcico, cloruro de calcio, citrato de calcio, sorbato de calcio, sulfato de calcio, acetato de potasio, benzoato de potasio, carbonato de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, sorbato de potasio, sulfato de potasio, acetato sódico, benzoato de sodio, carbonato de sodio, cloruro sódico, citrato sódico, sulfato de sodio, acetato de zinc, benzoato de zinc, carbonato de zinc, cloruro de zinc, citrato de zinc, sorbato de zinc, sulfato de zinc), almidón o un azúcar o derivado de azúcar (tal como, por ejemplo, sacarosa, dextrina, glucosa, lactosa, sorbitol), azúcar o derivado de azúcar o (tal como, por ejemplo, sacarosa, dextrina, glucosa, lactosa, sorbitol), moléculas orgánicas pequeñas, almidón, harina, celulosa y minerales.

[0078] El recubrimiento de sal es típicamente al menos 1 μm grueso y puede o ser una sal particular o una mezcla de sales, tales como Na_2SO_4, K_2SO_4, $MgSO_4$ y/o citrato de sodio. Otros ejemplos son aquellos

descritos, por ejemplo, en la WO 2008/017659, WO 2006/034710, WO 1997/05245, WO 1998/54980, WO 1998/55599, WO 2000/70034 o recubrimiento de polímero tal como se descriibe en la WO 2001/00042.

[0079] En otra forma de realización, el aditivo de pienso para aves de corral es una composición sólida que comprende la amilasa de la invención y uno o más agentes de formulación seleccionados de la lista que consiste en cloruro de sodio, benzoato de sodio, sorbato de potasio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de magnesio, tiosulfato de sodio, carbonato de calcio, citrato de sodio, dextrina, glucosa, sacarosa, sorbitol, lactosa, almidón y celulosa. En una forma de realización preferida, el agente de formulación se selecciona de uno o varios de los siguientes compuestos: sulfato de sodio, dextrina, celulosa, tiosulfato de sodio y carbonato de calcio. En una forma de realización preferida, la composición sólida tiene forma granulada. En una forma de realización, la composición sólida tiene forma granulada y comprende una partícula de núcleo, una capa con enzima que comprende la amilasa de la invención y un recubrimiento de sal.

[0080] En una realización adicional, el agente de formulación se selecciona de uno o más de los siguientes compuestos: glicerol, etilenglicol, 1, 2-propilenglicol o 1, 3-propilenglicol, cloruro de sodio, benzoato de sodio, sorbato de potasio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de magnesio, tiosulfato de sodio, carbonato de calcio, citrato de sodio, dextrina, glucosa, sacarosa, sorbitol, lactosa, almidón y celulosa. En una realización preferida, el agente de formulación se selecciona de uno o más de los siguientes compuestos: 1, 2-propilenglicol, 1, 3-propilenglicol, sulfato de sodio, dextrina, celulosa, tiosulfato de sodio y carbonato de calcio.

Vitaminas y minerales

[0081] En otra forma de realización, el pienso para aves de corral o el aditivo de pienso para aves de corral puede incluir una o más vitaminas, tales como una o más vitaminas liposolubles y/o una o más vitaminas hidrosolubles. En otra forma de realización, el pienso para aves de corral o el aditivo de pienso para aves de corral puede incluir opcionalmente uno o más minerales, tales como uno o más oligoelementos y/o uno o más macrominerales.

[0082] Normalmente, las vitaminas lipo e hidrosolubles, al igual que los oligoelementos, forman parte de una premezcla denominada, destinada a añadirse al pienso, mientras que los macrominerales se añaden normalmente por separado al pienso.

[0083] Los ejemplos no limitativos de vitaminas liposolubles incluyen vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, por ejemplo, vitamina K3.

[0084] Los ejemplos no limitativos de vitaminas hidrosolubles incluyen vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo, ca-D-pantotenato.

[0085] Los ejemplos no limitativos de oligoelementos incluyen boro, cobalto, cloruro, cromo, cobre, fluoruro, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio y zinc.

[0086] Los ejemplos no limitativos de macrominerales incluyen calcio, magnesio, potasio y sodio.

[0087] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla A de la WO 01/58275. El requisito nutricional significa que estos componentes deberían proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas

[0088] Como alternativa, el aditivo de pienso para animales comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la tabla A de la WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de, uno, o dos, o tres, o cuatro y así sucesivamente hasta los trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención, en una cantidad tal que proporcione una concentración en el pienso dentro del intervalo indicado en la columna cuatro, o la columna cinco, o la columna seis de la tabla A.

Aminoácidos

[0089] La composición puede comprender además uno o más aminoácidos. Los ejemplos de aminoácidos que se usan en pienso para animales son lisina, alanina, beta-alanina, treonina, metionina y triptófano.

Otros ingredientes de pienso

[0090] El pienso para aves de corral o el aditivo de pienso para aves de corral que comprende la amilasa de la invención puede comprender además agentes colorantes, estabilizadores, aditivos de mejora de crecimiento y compuestos/aromatizantes de aroma, ácidos grasos poliinsaturados (AGP); especias generadoras de oxígeno reactivo, péptidos antimicrobianos y polipéptidos antifúngicos.

[0091] Los ejemplos de agentes colorantes son los carotenoides, tales como betacaroteno, astaxantina, y luteína.

[0092] Los ejemplos de compuestos/aromatizantes son creosol, anetol, deca-, undeca- y/ o dodeca-lactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, fataluro de propilideno, fataluro de butilideno, capsaicina y tanino.

[0093] Los ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAMs) son CAP18, Leucocina A, Tritrpticina, Protegrina-1, tanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina, y ovispirina, tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), Las plectasinas, y estatinas, incluidos los compuestos y los polipéptidos descritos en la WO 03/044049 y la WO 03/048148, así como las variantes o los fragmentos de los anteriores que retienen la actividad antimicrobiana.

[0094] Los ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP's) son el Aspergillus giganteus, y péptidos de Aspergillus niger, así como las variantes y los fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se describe en la WO 94/01459 y la WO 02/090384.

[0095] Los ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18; C20 y C22, tales como el ácido araquidónico, el ácido docosahexaenoico, el ácido eicosapentanoico y el ácido gamma-linolénico.

[0096] Los ejemplos de especias generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos, tales como perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

Ejemplos

Ejemplo 1: Actividad de alfa-amilasa

[0097] La actividad alfa-amilasa se midió usando el AMYL-kit, que está comercialmente disponible en Roche Diagnostics, Cat. Nº. 11876473. El sustrato es 4,6-etilideno (G7)-p-nitrofenil(G1)-alfa, D-maltoheptaósido (etilideno-G7PNP). La alfa-amilasa divide el etilideno-Gn y el Gn-p-nitrofenilo resultante y, por lo tanto, se escinde por la enzima alfa-glucosidasa (parte del kit) en formación de glucosa y el p-nitrofenol de color amarillo.

[0098] La velocidad de formación de p-nitrofenol, que es una medida de la velocidad de reacción y, por lo tanto, de la actividad alfa-amilasa, se observa a 405 nm, por ejemplo, por un analizador Konelab 30 (disponible comercialmente de Thermo Electron Corporation), por ejemplo, usando un tiempo de medición de 2 min.

[0099] Las condiciones de reacción son: temperatura de 37 °C, pH: 7.0, tiempo de reacción: 5 min. El cloruro de calcio 0.03M con Brij 0,0025 % (Sigma B 4184) se usa preferiblemente como un estabilizador. La actividad alfa-amilasa se puede dar con respecto a un estándar, por ejemplo, en las unidades de KNU(S), que se determinan con respecto a una alfa-amilasa estándar de una actividad declarada de KNU(S).

[0100] Una descripción de ensayo más detallada (EB-SM-0221.02), así como un KNU(S) TERMAMYL SC estándar está disponible previa solicitud de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd.

Ejemplo 2: Perfiles de pH de amilasa, con y sin sales biliares

[0101] Este experimento sirve para determinar los perfiles de pH de tres alfa-amilasas, dos amilasas bacterianas de la invención y una amilasa de Aspergillus oryzae fúngico de la técnica anterior, con y sin sales biliares añadida.

[0102] Las amilasas usadas fueron una variante de amilasa purificada de Bacillus stearothermophilus (de TERMAMYL SC), una variante purificada de amilasa de esp. de Bacillus (de STAINZiME), y, en comparación, una amilasa purificada de Aspergillus oryzae (de fungamil). Todas estas preparaciones enzimáticas están disponibles comercialmente en Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

<u>Ensayo de azúcar reductor</u>

[0103] Tampón de enzima: 50 mM de acetato, 50 mM de imidazol, 50 mM de ácido malónico, 1 mM de CaCl2, 0,01% de Tritón X-100. Ajustar a pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, o 7.0 con HCl/NaOH.

[0104] Tampón de sustrato: 1,5 mg/ml de amilopectina (maíz ceroso, por ejemplo, maíz ceroso 04201 de Cerestar, lote WM5671), 50 mM de acetato, 50 mM de imidazol, 50 mM de ácido malónico, 1 mM de CaCl2. Ajustar al pH deseado (como anteriormente) con HCl/NaOH. Incubar durante 5 min a 100 °C. El tampón de sustrato fue realizaco con o sin 5 mM de sales biliares (es decir, taurocolato de sodio disponible comercialmente de, por ejemplo, LGC promochem, 500g/mol).

[0105] La actividad amilasa fue detectada por reducción de ensayo de azúcar. Brevemente, 50µl de enzima (diluida en el tampón de enzima para caer en el rango lineal del ensayo) se mezcló con 100µl de tampón de sustrato en PCR-MTP (Thermo-Fast 96, ABgene, cat. nº. AB-0600). Los MTP se incubaron a 37 °C durante 15 min, después de lo cual se añadieron 75µl solución de parada (100 mM de hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico, 180 mM de K-Na-tartrate, 2 % de NaOH), y las placas se incubaron a 95 °C durante 10 min. Posteriormente, 150µl de cada pocillo fue transferido a MTP de 96 pocillos, y la absorbancia se monitorizó a 410 nm como una medida de actividad amilasa.

[0106] Los resultados (promedio de determinaciones de duplicado) se muestran abajo en las tablas 1-4. La tabla 1 muestra la actividad de cada enzima al pH indicado en ausencia de sales biliares. Para cada enzima, la actividad máxima fue establecida en 100 %. La tabla 2 muestra lo mismo que la tabla 1, pero en presencia de 5mM de sales biliares. La tabla 3 muestra la actividad de cada enzima por mg de proteína enzimática al pH indicado en ausencia de sales biliares, en relación con la actividad enzimática máxima medida en este experimento, que fue la actividad de la enzima TERMAMYL SC a pH 5.0 (100 %). En consecuencia, la actividad de cada enzima se ha normalizado en relación con esta actividad. La cantidad de proteína enzimática para cada enzima fue determinada basándose en la actividad específica. La tabla 4 muestra lo mismo que la tabla 3, pero en presencia de 5mM de sales biliares. Aquí la actividad de la enzima TERMAMYL SC a pH 5.0 en presencia de 5mM sales biliares es el valor de referencia (100 %).

Tabla 1: actividad relativa sin sales biliares

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

Tabla 2: actividad relativa con sales biliares

Enzima / pH	2	3	4	5	6	7
FUNGAMYL	0,0	0,0	53,5	71,8	68,6	16,1
STAINZYME	0,0	0,0	0,8	2,5	61,4	78,1
TERMAMYL SC	0,0	0,0	10,4*	76,0	68,6	59,7
* Una medición descartada por ser claramente errónea						

Tabla 3: actividades absolutas normalizadas relativas a TERMAMYL SC sin sales biliares

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

Tabla 4: actividades absolutas normalizadas relativas a TERMAMYL SC, con sales biliares

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

TERMAMYL SC	0,0	0,0	13,7	100,0	90,2	78,6

[0107] Estos resultados muestran que aunque las sales biliares parecen reducir ligeramente la actividad amilasa, la actividad en presencia de 5 mM de sales biliares sigue siendo satisfactoria. Los resultados muestran también que esas sales biliares no conducen a un cambio del pH óptimo.

[0108] Además, los resultados muestran que cada una de las amilasas de Bacillus de la invención tienen más del 50 % de actividad relativa a pH 7, que no es el caso para la amilasa fúngica comparativa.

[0109] Finalmente, las tablas 3 y 4 demuestran que, al menos bajo estas condiciones, la amilasa de TERMAMYL SC tiene una actividad significativamente más alta por mg de enzima que las otras dos amilasas evaluadas.

Ejemplo 3: Un pienso para pollos de engorde ("inicio")

[0110] Un pienso para pollos de engorde ("inicio") que contiene una mezcla de compuestos según la invención se puede preparar mezclando los ingredientes siguientes juntos usando un equipo de mezclado convencional a temperatura ambiente.

Ingrediente	Cantidad (kg)
Harina de soja	34,50
Maíz	20,00
Trigo	37,80
Aceite de soja	3,13
Minerales	2,90
Premezcla de aminoácidos sintéticos	0,17
Premezcla de vitaminas y oligoelementos	1,00
Alfa-amilasa	40-160 KNU/kg de pienso

Ejemplo 4: Un pienso para pollos de engorde ("crecimiento")

[0111] Un pienso para pollos de engorde ("crecimiento"), que contiene una mezcla de compuestos según la invención, se puede preparar mezclando los ingredientes siguientes juntos usando un equipo de mezclado convencional a temperatura ambiente.

Ingredientes	Cantidad (kg)
Harina de soja	31,20
Maíz	20,00
Trigo	41,30
Aceite de soja	3,40
Minerales	2,50
Premezcla de aminoácidos sintéticos	0,10
Premezcla de vitaminas y oligoelementos	1,00
Alfa-amilasa	40-160 KNU/kg de pienso

Ejemplo 5: energía metabolizable aparente de dietas

[0112] Se realizó un seguimiento in vivo para el rendimiento en vivo de pollos de engorde que se han alimentado con dietas basales, como se especifica en los ejemplos 3 y 4, basados en harina de soja y suplementadas con TERMAMYL SC.

[0113] El estudio fue llevado a cabo con una dieta basal y con una dieta de maíz/soja que contenía un reemplazo del 40 % de harina de soja con maíz. En el ensayo, se usó TERMAMYL SC en inclusiones graduadas de 40 KNU/kg de pienso, 80 KNU/kg de pienso, 120 KNU/kg de pienso y 160 KNU/kg de pienso.

Tabla 5: Esquema de tratamientos experimentales (tratamientos con 9 réplicas de 7 aves por jaula)

Tratamiento	**Descripción**
T1	Dieta basal
T2	60 % de dieta basal + 40 % de dieta de maíz (harina de soja sustituida por maíz)
T3	T1 + 40 KNU/kg de pienso de RZ TERMAMYL SC
T4	T1 + 80 KNU/kg de pienso de RZ TERMAMYL SC
T5	T1 + 120 KNU/kg de pienso de RZ TERMAMYL SC
T6	T1 + 160 KNU/kg de pienso de RZ TERMAMYL SC
T7	T2 + 40 KNU/kg de pienso de RZ TERMAMYL SC
T8	T2 + 80 KNU/kg de pienso de RZ TERMAMYL SC
T9	T2 + 120 KNU/kg de pienso de RZ TERMAMYL SC
T10	T2 + 160 KNU/kg de pienso de RZ TERMAMYL SC

Animales

[0114] El número total de 630 aves fue entregado como polluelos machos Cobb500 pde un día. Para el ensayo, los grupos de tratamiento se asignaron a las jaulas metálicas utilizando un diseño completamente al azar que comprendía 10 tratamientos con 9 repeticiones por tratamiento (7 aves cada uno).

Alojamiento

[0115] El experimento se realizó en las instalaciones experimentales de la UFPR. El número de tratamiento que se muestra en las jaulas o corrales, el número de replicas y el grupo de tratamiento deben estar visibles en cada corral. El número máximo de aves por corral y el espacio por ave seguían la legislación vigente. Se suministraron pienso y agua para el consumo ad libitum. Las aves fueron alojadas en jaulas de metal equipadas con bebederos y comederos de canaletas. El régimen de temperatura y de iluminación estaba de acuerdo con la recomendación del pollo de engorde. Todos los corrales fueron revisados diariamente para aves enfermas y muertas. El número de identificación, los corrales, la edad y el peso corporal de cada ave muerta se registraron en una hoja de registro del corral. Se registraron el estado general de salud, el peso, la mortalidad y la causa de la muerte y el grado de llenado, así como las alteraciones/síntomas morfológicos de las aves muertas.

Mediciones

[0116] Los animales consumieron la misma dieta hasta los 14 días de edad y posteriormente se formuló una dieta experimental mediante la adición de cenizas insolubles en ácido (CIA) como un marcador, utilizando ambas basadas en Rostagno et al. (2011) Después del período experimental de adaptación de la dieta, el muestreo de excretas se realizó durante cuatro días (21 a 24 días) mediante el método de recolección parcial. Hubo dos recogidas por día, una por la mañana y otra por la tarde, aproximadamente a las 9:00 a.m. y a las 17:30 respectivamente, con espátulas de plástico para evitar recolectar excretas cerca de la jaula cercana, el comedero y los bebedores. Posteriormente, las muestras se colocaron en un congelador y, justo después del muestreo, se limpió la excreta restante para evitar la contaminación del siguiente muestreo. Con posterioridad, las muestras fecales se secaron en un horno de ventilación forzada a 65 °C hasta el peso constante.

[0117] Los polluelos estuvieron en ayunas durante dos horas, y fueron alimentados durante 1 hora y media hasta que el tracto digestivo se llenó para medir la digestibilidad ileal. Las aves fueron degolladas mediante dislocación cervical y el contenido ileal se tomó en 4 cm por debajo del divertículo de Meckel y 4 cm por encima de la unión ileocecal. Las muestras de contenido se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron en el congelador. Con posterioridad, se realizaó la liofilización del contenido.

[0118] Se analizaron los contenidos de dietas, excretas e íleos para la materia seca (MS), la proteína cruda (PC), la energía bruta (EB), la grasa (G) y las cenizas insolubles en ácido (CIA). Antes de calcular la metabolizabilidad

y digestibilidad, los datos se corrigieron para la materia seca (MS a 105 ºC), luego se calculó la energía metabolizable y digestible y metabolizable por el método de recogida parcial, utilizando ceniza insoluble en ácido (CIA) como un marcador. El cálculo de la digestibilidad se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación: digestibilidad = 100 - (100 * (% en el marcador de dieta/marcador de heces%) * (% de nutriente de las heces/% de nutriente de la dieta)).

[0119] Después de calcular el coeficiente de dieta de digestibilidad y metabolizable, calculamos la digestibilidad de maíz según Matterson et al. (1965) mediante la fórmula siguiente: ingrediente de CD = CD Ref + (inclusión de CD 40 - CD Ref%) / (% de inclusión de maíz de MS *)).

Análisis estadístico

[0120] Los datos fueron analizados por el investigador del estudio y se consideró la mortalidad en el análisis de datos. El análisis estadístico de la energía metabolizable aparente y los parámetros de digestibilidad se realizaron de acuerdo con los procedimientos estándar de mínimos cuadrados apropiados para el diseño del estudio y las características del conjunto de datos y que comprenden un control atípico.

Resultados

[0121] Los datos fueron valorados como los más adecuados para la interpretación biológica. Cuando los resultados no fueron satisfactorios para la regresión lineal, los datos se analizaron mediante el método de regresión Linear Plato para obtener la mejor respuesta enzimática. Los resultados se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: Energía metabolizable aparente (EMA) de las dietas, dietas con maíz y maíz con diferentes niveles de TERMAMYL SC.

Niveles (Amilasa KNU/kg de pienso)		**Dietas de EMA**	**Dietas de EMA con maíz**
0		3711	3705
40		3736	3750
80		3775	3843
120		3779	3875
160		3762	3846
P	Linear	0,0167	<0,0001
	Cuadrático	0,0951	0,0043
	RLP	0,0552	0,0383*
	Contraste	0,1833	<0,0001
**I=3860 R=158 **I=4023 r=183; I= EMA máxima r= nivel óptimo*			

[0122] Los resultados muestran que añadir la alfa-amilasa de la invención al pienso para aves de corral mejoró la energía metabolizable aparente de las dietas, y especialmente la dieta donde el 40 % de la harina de soja fue sustituida por maíz.

Ejemplo 6: Ensayo animal en pollo

[0123] Se realizó un segundo ensayo in vivo para el rendimiento en vivo de pollos de engorde que se han alimentado con dietas basales, como se especifica a continuación.

[0124] El estudio es una investigación de los efectos de suplementación de Termamyl SC (alfa-amilasa bacteriana, IUB Nº. 3.2.1.1.) en el rendimiento de los pollos de engorde utilizando un modelo con una dieta de maíz/soja.

[0125] Los parámetros de rendimiento se realizaron semanalmente y de 1 a 7, 1 a 14, 1 a 21 d, 1 a 28, 1 a 35 d, 1 a 40 d y 22 a 40 d.

Tabla 7: Esquema de tratamientos experimentales

Tratamiento	Descripción	1 a 21 d, kcal/kg de EMA	22 a 40 d, kcal/kg
T1	- 100 kcal/kg	2.950	3.070
T2*	- 50 kcal/kg	3.000	3.120
T3*	niveles usuales	3.050	3.170
T4*	+ 50 kcal/kg	3.100	3.220
T5	+ 100 kcal/kg	3.150	3.270
T6	Trt 1 + amilasa	2.950	3.070
**Los tratamientos T2, T3 y T4 se obtuvieron mezclando las dietas T1 y T5.* *Amilasa: Termamyl SC (SEQ ID N.º: 2), 80 KNU/kg de pienso*			

Tabla 8: Composición de ingredientes

Composición (como DM), %	Maíz	Harina de soja
Materia seca, %	87,70	88,24
Proteína cruda	7,84	47,01
Extracto de éter	3,32	1,31
Fibra cruda	0,88	3,92
Ceniza	1,11	5,46
Calcio	0,04	0,34
Fósforo	0,25	0,67
Arg dig.	0,343	3,249
Cys dig.	0,240	1,932
His dig.	0,869	3,259
Ile dig.	0,203	2,676
Leu dig.	0,145	0,583
Lys dig.	0,334	2,209
Met + Cis dig.	0,239	1,631
Met dig.	0,307	1,992
Phe dig.	0,211	1,170
Thr dig.	0,297	1,180
Trp dig.	0,054	0,585
Val dig.	0,343	3,249
[1]Determinado usando NIR.		

Tabla 9: Composición estimada de las dietas basales

Ingredientes	Dieta de inicio (1 a 21 d)		Dieta de finalización (22 a 40 d)	
	T1	T5	T1	T5
Maíz	53,65	54,12	57,72	58,37
Harina de soja	37,90	37,81	33,10	33,00
Aceite de soja	2,57	4,69	3,66	5,71
Fosfato dicálcico	0,87	0,87	0,56	0,56
Piedra caliza	1,33	1,33	1,18	1,18

Sal	0,47	0,47	0,45	0,45
DL-Metionina 99,9 %	0,27	0,27	0,24	0,24
L-lisina HCl 76 %	0,14	0,14	0,17	0,17
L-treonina 98,5 %	0,04	0,04	0,04	0,04
Cloruro de colina 60 %	0,08	0,08	0,10	0,10
Premezcla de min. y vit.[1]	0,15	0,15	0,15	0,15
Caolín	2,50	0,00	2,60	0,00
Avilamicina	0,01	0,01	0,01	0,01
Monensina	0,01	0,01	0,01	0,01
RONOZYME HiPhos 1.000 FYT/kg	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Nutrientes, %				
EMA (kcal/kg)[2]	2.950	3.150	3.070	3.270
Proteína cruda	22,386	22,376	20,406	22,376
Calcio	0,889	0,891	0,761	0,760
P. med.	0,440	0,440	0,371	0,371
P. total	0,520	0,521	0,459	0,460
Sodio	0,202	0,202	0,202	0,198
Potasio	0,846	0,845	0,865	0,864
Cloruro	0,352	0,352	0,359	0,354
Extracto de éter	5,169	7,285	5,940	7,285
Fibra cruda	2,402	2,407	2,227	2,407
Lys dig.	1,229	1,227	1,128	1,131
Met + Cys dig.	0,896	0,897	0,825	0,826
Thr dig.	0,788	0,786	0,723	0,723
Trp dig.	0,238	0,238	0,214	0,214
Arg dig.	1,411	1,409	1,268	1,267
Val dig.	0,931	0,931	0,847	0,847
Ile dig.	0,895	0,894	0,807	0,806

[1]Composición por kg de pienso: vit. A, 9.000 UI; vit. D3, 2.500 UI; vit. E, 20 mg; vit. K3,2,5 mg; tiamina, 2 mg; riboflavina, 6 mg; piridoxina, 3 mg; cianocobalamina, 0,015 mg, ácido pantoténico, 12 mg; niacina, 35 mg; ácido fólico, 1,5 mg; biotina, 0,1 mg; hierro, 100 mg; zinc, 130 mg; manganeso, 130 mg; cobalto, 2 mg; cobre, 20 mg; yodo, 2 selenio, 0,25 mg.

[2] Energía metabolizable aparente.

Aves y alojamiento

[0126] Se usó un número total de 1.800 polluelos de un día de edad Cobb x Cobb 500 de plumas lentas. Los grupos de tratamiento fueron asignados a corrales usando una disposición completamente al azar que comprende 8 tratamientos con 9 réplicas y 25 aves por replicación.

[0127] Se suministraron pienso y agua fueron para el consumo ad libitum. Se controló la temperatura ambiental para mantener la comodidad de las aves con el uso de una lámpara de calentamiento infrarroja. Se ajustó la temperatura ambiente a 32 °C en el primer día, y se redujo a 1 °C cada dos días hasta que se alcanzara la temperatura de confort. Las aves fueron colocadas en lechos de cáscaras de arroz.

Dietas experimentales

[0128] Todas las dietas se produjeron en un mezclador de 400 kg de capacidad. Los mezcladores se limpiaron y se aspiraron entre cada lote de alimentación. Las dietas se proporcionaron como puré. La composición química de la harina de maíz y soja se analizó antes de comenzar el estudio.

Diseño de experimentos

[0129] El diseño fue completamente aleatorizado con 8 tratamientos y 9 replicaciones de 25 aves cada uno.

Respuestas a las mediciones

[0130] El peso corporal, el aumento de peso corporal y la conversión de pienso se evaluaron a los 7, 14, 21, 28, 35 y 40 días de edad. La conversión de pienso se calculó como corregida para el peso de las aves muertas. Las respuestas se registraron en un formulario disponible individualmente en cada casilla.

Análisis estadístico

[0131] El investigador del estudio analizó los datos. El análisis estadístico se realizó después de un procedimiento apropiado (SAS Institute, 2009).

Resultados

[0132]

Tabla 10: aumento de peso corporal de pollos de engorde alimentados de dietas enzimáticas de 1 a 40 días de edad, g

Tratamientos	**1-7 d**	**8-14 d**	**15-21 d**	**2-28 d**	**29-35 d**	**36-40 d**
- 100 kcal/kg de EMA (dieta de control)	135	256 ^{d}	587 ^{b}	646	784	481
- 50 kcal/kg de EMA	137	267 ^{abc}	589 ^{b}	641	785	488
Niveles usuales	138	265 ^{bcd}	602 ^{ab}	664	797	488
+ 50 kcal/kg de EMA	141	272 ^{ab}	604 ^{ab}	660	796	493
+ 100 kcal/kg de EMA	144	277 ^{a}	611 ^{a}	664	815	501
Media	138	266	597	656	798	493
CV, %	5,13	2,71	2,67	4,93	5,88	7,44
Probabilidad	0,1245	0,0001	0,0423	0,4306	0,7798	0,9454
Las medias de $^{a-d}$ con letras superíndice diferentes difieren significativamente (P < 0,05) - prueba de Tukey						

Tabla 11: velocidad de conversión de pollos de engorde alimentados de dietas enzimáticas de 1 a 40 días de edad, g:g

Tratamientos	**1-7 d**	**8-14 d**	**15-21 d**	**22-28 d**	**29- 35 d**	**36-40 d**
- 100 kcal/kg de EMA (dieta de control)	1,166 ^{a}	1,391 ^{a}	1,338 ^{a}	1,405 ^{a}	1,696	1,984
- 50 kcal/kg de EMA	1,152 ^{ab}	1,290 ^{ab}	1,340 ^{a}	1,400 ^{ab}	1,675	1,891
Niveles usuales	1,167 ^{a}	1,298 ^{ab}	1,304 ^{bc}	1,363 ^{abc}	1,650	1,888
+ 50 kcal/kg de EMA	1,078 ^{ab}	1,265 ^{b}	1,291 ^{cd}	1,357 ^{bc}	1,649	1,864
+ 100 kcal/kg de EMA	1,037 ^{b}	1,248 ^{b}	1,270 ^{d}	1,334 ^{c}	1.652	1,857
Dieta de control + amilasa	1,149 ^{ab}	1,305 ^{ab}	1,332 ^{ab}	1,387 ^{ab}	1,676	1,887
Media	1,128	1,302	1,318	1,375	1,667	1,889
CV, %	7,77	5,27	1,51	2,31	4,10	5,22
Probabilidad	0,0074	0,0037	0,0001	0,0002	0,8167	0,1855
Las medias de $^{a-d}$ con letras superíndice diferentes difieren significativamente (P < 0,05) - Prueba de Tukey.						

Tabla 12: aumento de peso corporal acumulativo de 1 a 40 días de edad, g

Tratamientos	1-7 d	1-14 d	1-21 d	1-28 d	1-35 d	1-40 d
- 100 kcal/kg de EMA (dieta de control)	135	391 [c]	978 [c]	1.624 [b]	2.409 [b]	2.889 [b]
- 50 kcal/kg de EMA	137	403 [bc]	995 [bc]	1.625 [b]	2.417 [ab]	2.897 [b]
Niveles usuales	138	403 [bc]	1.006 [ab]	1.670 [ab]	2.449 [ab]	2.925 [ab]
+ 50 kcal/kg de EMA	141	414 [ab]	1.018 [ab]	1.678 [ab]	2.474 [ab]	2.968 [ab]
+ 100 kcal/kg de EMA	144	421 [a]	1.029 [a]	1.696 [a]	2.495 [a]	2.983 [a]
Dieta de control + amilasa	138	397 [c]	995 [bc]	1.664 [ab]	2.444 [ab]	2.931 [ab]
Media	138	404	1.002	1.656	2.448	2.933
CV, %	5,13	2,35	1,73	2,34	2,46	2,18
Probabilidad	0,1245	0,0001	0,0001	0,0023	0,0509	0,0363
Las medias de [a-c] con letras superíndice diferente difieren significativamente (P < 0,05) - Prueba de Tukey.						

Tabla 13: tasa de conversión acumulativa de pienso de 1 a 40 días de edad, g:g

Tratamientos	1-7 d	1-14 d	1-21 d	1-28 d	1-35 d	1-40 d
- 100 kcal/kg de EMA (dieta de control)	1,166 [a]	1,300 [a]	1,316 [a]	1,345 [a]	1,450 [a]	1,535 [a]
- 50 kcal/kg de EMA	1,152 [ab]	1,242 [abc]	1,299 [a]	1,335 [a]	1.420 [abc]	1.518 [ab]
Niveles usuales	1,167 [a]	1,255 [ab]	1,284 [ab]	1.309 [ab]	1,381 [bc]	1,484 [bc]
+ 50 kcal/kg de EMA	1,078 [ab]	1,209 [bc]	1,256 [ab]	1,278 [bc]	1,374 [bc]	1,467 [c]
+ 100 kcal/kg de EMA	1,037 [b]	1,172 [c]	1,232 [c]	1,259 [c]	1,368 [c]	1,453 [c]
Dieta de control + amilasa	1,149 [ab]	1,294 [abc]	1,299 [a]	1,321 [ab]	1,433 [ab]	1,516 [ab]
Media	1,128	1,240	1,286	1,313	1,413	1,501
CV, %	7,77	4,01	1,75	2,37	2,84	1,69
Probabilidad	0,0074	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Las medias de [a-c] con letras superíndice diferentes difieren significativamente (P < 0,05) - Prueba de Tukey.						

Tabla 14: ecuaciones de regresión de las mediciones evaluadas con respecto al nivel de energía de dietas que alimentan a los pollos de engorde de 1 a 40 d

Artículo	Ecuaciones de regresión	r^2	Valor P[2]	Bioequivalencia relativa[3]
				Amilasa
BWG 1-21 d, g	Y = 0,2491x + 980,33	0,5010	0,0001	59
BWG 22-40 d, g	Y = 0,2084x + 1,905	0,0840	0,0606	168
BWG 1-40 d, g	Y = 0,5158x + 2,880	0,2654	0,0003	99
FCR 1-21 d, g	Y = - 0,00042x + 1,319	0,6851	0,0001	48
FCR 22-40 d, g	Y = - 0,00037x + 1,650	0,3413	0,0001	37
FCR 1-40 d, g	Y = - 0,00043x + 1,534	0,5494	0,0001	42
[1] Ecuaciones de regresión para niveles de energía de 1 a 21 d (2.950, 3.000, 3.050, 3.100 y 3.150 kcal/kg) y de 22 a 40 d (3.070, 3.120, 3.170, 3.220 y 3.270 kcal/kg). El coeficiente de determinación (r2) se obtuvo usando todos los datos.				

[2] *Efecto linear (P<0,10).*

[3] *Determinado basado en la respuesta de las medias para la adición graduada de energía para cada parámetro. Se usó la diferencia entre los niveles de energía (0, 50, 100,150 y 200 kcal/kg) para obtener esta bioequivalencia relativa.*

[0133] En resumen, los ensayos funcionaron bien con la adición de la amilasa de la invención, especialmente con respecto al aumento de peso mejorado y FCR durante la fase de crecimiento y finalización.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0134]

```
<110>  Novozymes A/S
       DSM IP Assets B.V.

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

<130>  12847-WO-PCT

<150>  EP13194992.7
<151>  2013-11-29

<160>  9

<170>  Versión de PatentIn 3.5

<210>  1
<211>  1620
<212>  ADN
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Variante de ADN de Bacillus stearothermophilus

<220>
<221>  sig_peptide
<222>  (1)..(81)

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

<220>
<221>  mat_peptide
<222>  (82)..(1620)

<400>  1
atg aaa caa caa aaa cgg ctt tac gcc cga ttg ctg acg ctg tta ttt         48
Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
        -25                 -20                 -15

gcg ctc atc ttc ttg ctg cct cat tct gca gcc gcg gca ccg ttt aac         96
Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Pro Phe Asn
    -10                 -5              -1  1               5

ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg tac ttg ccg gat gat ggc acg        144
Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr
                10                  15                  20

tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc aac aac tta tcc agc ctt ggc        192
Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn Leu Ser Ser Leu Gly
            25                  30                  35
```

```
atc acc gct ctt tgg ctg ccg ccc gct tac aaa gga aca agc cgc agc        240
Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser Arg Ser
        40                  45                  50

gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg tat gac ctc ggc gaa ttc aat        288
Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn
    55                  60                  65

caa aaa ggg acc gtc cgc aca aaa tac gga aca aaa gct caa tat ctt        336
Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Tyr Leu
70                  75                  80                  85

caa gcc att caa gcc gcc cac gcc gct gga atg caa gtg tac gcc gat        384
Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp
                90                  95                  100

gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct gac ggc acg gaa tgg gtg gac        432
Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly Thr Glu Trp Val Asp
            105                 110                 115

gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc aac caa gaa atc tcg ggc acc        480
Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr
        120                 125                 130

tat caa atc caa gca tgg acg aaa ttt gat ttt ccc ggg cgg ggc aac        528
Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn
    135                 140                 145

acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tac cat ttt gac ggc gtt gat        576
Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe Asp Gly Val Asp
150                 155                 160                 165

tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc att tac aaa ttc cgt ggc aag        624
Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys
                170                 175                 180

gct tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa ttc gga aac tat gac tac tta        672
Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Phe Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu
            185                 190                 195

atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat ccc gaa gtc gtg acc gag ctg        720
Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro Glu Val Val Thr Glu Leu
        200                 205                 210

aaa aac tgg ggg aaa tgg tat gtc aac aca acg aac att gat ggg ttc        768
Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe
    215                 220                 225

cgg ctt gat gcc gtc aag cat att aag ttc agt ttt ttt cct gat tgg        816
Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp
230                 235                 240                 245

ttg tcg tat gtg cgt tct cag act ggc aag ccg cta ttt acc gtc ggg        864
Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly
                250                 255                 260

gaa tat tgg agc tat gac atc aac aag ttg cac aat tac att acg aaa        912
Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys
            265                 270                 275

aca gac gga acg atg tct ttg ttt gat gcc ccg tta cac aac aaa ttt        960
Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Lys Phe
        280                 285                 290

tat acc gct tcc aaa tca ggg ggc gca ttt gat atg cgc acg tta atg       1008
Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala Phe Asp Met Arg Thr Leu Met
    295                 300                 305
```

acc aat act ctc atg aaa gat caa ccg aca ttg gcc gtc acc ttc gtt 1056
Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Thr Leu Ala Val Thr Phe Val
310 315 320 325

gat aat cat gac acc gaa ccc ggc caa gcg ctg caa tca tgg gtc gac 1104
Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp
330 335 340

cca tgg ttc aaa ccg ttg gct tac gcc ttt att cta act cgg cag gaa 1152
Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu
345 350 355

gga tac ccg tgc gtc ttt tat ggt gac tat tat ggc att cca caa tat 1200
Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr
360 365 370

aac att cct tcg ctg aaa agc aaa atc gat ccg ctc ctc atc gcg cgc 1248
Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg
375 380 385

agg gat tat gct tac gga acg caa cat gat tat ctt gat cac tcc gac 1296
Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp
390 395 400 405

atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc act gaa aaa cca gga tcc gga 1344
Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly
410 415 420

ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg gga gga agc aaa tgg atg tac 1392
Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr
425 430 435

gtt ggc aaa caa cac gct gga aaa gtg ttc tat gac ctt acc ggc aac 1440
Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn
440 445 450

cgg agt gac acc gtc acc atc aac agt gat gga tgg ggg gaa ttc aaa 1488
Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys
455 460 465

gtc aat ggc ggt tcg gtt tcg gtt tgg gtt cct aga aaa acg acc gtt 1536
Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp Val Pro Arg Lys Thr Thr Val
470 475 480 485

tct acc atc gct cgg ccg atc aca acc cga ccg tgg act ggt gaa ttc 1584
Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe
490 495 500

gtc cgt tgg acc gaa cca cgg ttg gtg gca tgg cct 1620
Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val Ala Trp Pro
505 510

<210> 2
<211> 540
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción sintética

<400> 2

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

Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Pro Phe Asn

```
    -10                 -5              -1  1               5

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

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

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

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

Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Tyr Leu
70                  75                  80                  85

Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp
                90                  95                  100

Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly Thr Glu Trp Val Asp
            105                 110                 115

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

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

Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe Asp Gly Val Asp
150                 155                 160                 165

Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys
                170                 175                 180

Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Phe Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu
            185                 190                 195

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

Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe
    215                 220                 225

Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp
230                 235                 240                 245

Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly
                250                 255                 260

Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys
            265                 270                 275

Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Lys Phe
        280                 285                 290

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

Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Thr Leu Ala Val Thr Phe Val
310                 315                 320                 325

Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp
                330                 335                 340

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 1449
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

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

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

<400> 3
cac cat aat ggt acg aac ggc aca atg atg cag tac ttt gaa tgg tat 48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1 5 10 15

cta cca aat gac gga aac cat tgg aat aga tta agg tct gat gca agt 96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser
20 25 30

aac cta aaa gat aaa ggg atc tca gcg gtt tgg att cct cct gca tgg 144
Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35 40 45

aag ggt gcc tct caa aat gat gtg ggg tat ggt gct tat gat ctg tat 192
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60

gat tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc att cgt aca aaa tat gga 240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly

65 70 75 80

acg cgc aat cag tta caa gct gcg gtt aac gcc ttg aaa agt aat gga 288
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly
85 90 95

att caa gtg tat ggc gat gtt gta atg aat cat aaa ggg gga gca gac 336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
100 105 110

gct acc gaa atg gtt aaa gca gtc gaa gta aac ccg aat aat aga aat 384
Ala Thr Glu Met Val Lys Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
115 120 125

caa gaa gtg tcc ggt gaa tat aca att gag gct tgg aca aag ttt gac 432
Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
130 135 140

ttt cca gga cga ggt aat act cat tca aac ttc aaa tgg aga tgg tat 480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145 150 155 160

cac ttt gat gga gta gat tgg gat cag tca cgt aag ctg aac aat cga 528
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg
165 170 175

att tat aaa ttc cgc ggt aaa ggg tgg gat tgg gaa gtc gat aca gaa 576
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
180 185 190

ttc ggt aac tat gat tac cta atg tat gca gat att gac atg gat cac 624
Phe Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His
195 200 205

cca gag gta gtg aat gag cta aga aat tgg ggt gtt tgg tat acg aat 672
Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn
210 215 220

aca tta ggc ctt gat ggt ttt aga ata gat gca gta aaa cat ata aaa 720
Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys
225 230 235 240

tac agc ttt act cgt gat tgg att aat cat gtt aga agt gca act ggc 768
Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala Thr Gly
245 250 255

aaa aat atg ttt gcg gtt gcg gaa ttt tgg aaa aat gat tta ggt gct 816
Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala
260 265 270

att gaa aac tat tta aac aaa aca aac tgg aac cat tca gtc ttt gat 864
Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe Asp
275 280 285

gtt ccg ctg cac tat aac ctc tat aat gct tca aaa agc gga ggg aat 912
Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly Gly Asn
290 295 300

tat gat atg agg caa ata ttt aat ggt aca gtc gtg caa aag cat cca 960
Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Lys His Pro
305 310 315 320

atg cat gct gtt aca ttt gtt gat aat cat gat tcg caa cct gaa gaa 1008
Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Glu Glu
325 330 335

gct tta gag tct ttt gtt gaa gaa tgg ttc aaa cca tta gcg tat gct 1056

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

ttg aca tta aca cgt gaa caa ggc tac cct tct gta ttt tat gga gat 1104
Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp
355 360 365

tat tat ggc att cca acg cat ggt gta cca gcg atg aaa tcg aaa att 1152
Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser Lys Ile
370 375 380

gac ccg att cta gaa gcg cgt caa aag tat gca tat gga aga caa aat 1200
Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg Gln Asn
385 390 395 400

gac tac tta gac cat cat aat atc atc ggt tgg aca cgt gaa ggg aat 1248
Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asn
405 410 415

aca gca cac ccc aac tcc ggt tta gct act atc atg tcc gat ggg gca 1296
Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp Gly Ala
420 425 430

gga gga aat aag tgg atg ttt gtt ggg cgt aat aaa gct ggt caa gtt 1344
Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly Gln Val
435 440 445

tgg acc gat atc act gga aat aaa gcc ggt act gtt acg att aat gct 1392
Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala
450 455 460

gat gga tgg ggt aat ttt tct gta aat gga gga tca gtt tct att tgg 1440
Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp
465 470 475 480

gta aac aaa 1449
Val Asn Lys

<210> 4
<211> 483
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 4

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser
20 25 30

Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35 40 45

Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80

Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly
85 90 95

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

Ala Thr Glu Met Val Lys Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
115 120 125

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

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

His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg
165 170 175

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
180 185 190

Phe Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His
195 200 205

Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn
210 215 220

Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys
225 230 235 240

Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala Thr Gly
245 250 255

Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala
260 265 270

Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe Asp
275 280 285

Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly Gly Asn
290 295 300

Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Lys His Pro
305 310 315 320

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

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

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

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

Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg Gln Asn
385 390 395 400

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

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

Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly Gln Val
435 440 445

Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala

450 455 460

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

Val Asn Lys

<210> 5
<211> 483
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de enzima de Bacillus halmapalus

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(483)

<400> 5

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser
20 25 30

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

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

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80

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

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

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

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

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

His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg
165 170 175

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Ser Glu
180 185 190

Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met Asp His
195 200 205

Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr Thr Asn
210 215 220

Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys
225 230 235 240

Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala Thr Gly
245 250 255

Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala
260 265 270

Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe Asp
275 280 285

Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly Gly Asn
290 295 300

Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys His Pro
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Arg

<210> 6
<211> 510
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de enzima de Bacillus licheniformis

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(29)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (30)..(510)

<400> 6

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe

-25 -20 -15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Thr
180 185 190 195

Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Ala Ala Glu Ile Lys
200 205 210

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

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

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

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

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

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

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

Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr

325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 514
<212> PRT
<213> Bacillus amyloliquefaciens (SWISSPROT:P00692)

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(31)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (32)..(514)

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met Phe
245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys

<210> 8
<211> 512
<212> PRT
<213> Bacillus licheniformis (SWISSPROT:P06278)

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(29)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (30)..(512)

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Ala Ala Glu

200 205 210

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 549
<212> PRT
<213> Bacillus stearothermophilus (SWISSPROT:P06279)

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(34)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (35)..(549)

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
175 180 185 190

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met
195 200 205

Asp His Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Ser Trp Gly Lys Trp Tyr
210 215 220

Val Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His
225 230 235

Ile Lys Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Asp Val Arg Ser Gln
240 245 250

Thr Gly Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile
255 260 265 270

Asn Lys Leu His Asn Tyr Ile Met Lys Thr Asn Gly Thr Met Ser Leu
275 280 285

Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly
290 295 300

Gly Thr Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp
305 310 315

Gln Pro Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro
320 325 330

Gly Gln Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala
335 340 345 350

Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr
355 360 365

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser
370 375 380

Lys Ile Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr
385 390 395

Gln His Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
400 405 410

Gly Val Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp
415 420 425 430

Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly
435 440 445

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

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

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

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

Leu Val Ala Trp Pro
515

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos una amilasa bacteriana en pienso para aves de corral para mejorar el valor nutricional del pienso, para la mejora del aumento de peso y/o el índice de conversión alimenticia de aves de corral, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2, y donde la amilasa bacteriana se añade al piendo para aves de corral en una dosis de entre 20 y 400 KNU/kg de pienso.

2. Uso de la reivindicación 1, donde el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida en comparación con un pienso estándar para aves de corral.

3. Método para mejorar el valor nutricional del pienso para aves de corral, para mejorar el aumento de peso y/o el índice de conversión alimenticia de las aves de corral, el método comprende el paso de añadir al menos una amilasa bacteriana al pienso, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2, y donde la amilasa bacteriana se añade al pienso para aves de corral en una dosis de entre 20 y 400 KNU/kg de pienso.

4. Método según la reivindicación 3, donde el pienso para aves de corral tiene una energía metabolizable aparente reducida en comparación con un pienso estándar para aves de corral.

5. Uso según la reivindicación 1, donde el pienso para aves de corral comprende un aditivo de pienso para aves de corral, que comprende dicho al menos una amilasa bacteriana, junto con (i) al menos una vitamina, (ii) al menos un mineral, o (iii) al menos una vitamina y al menos un mineral, donde la amilasa bacteriana es un polipéptido con al menos 80 % de identidad con los aminoácidos 1-481 de la SEQ ID N.º: 2.

6. Uso según la reivindicación 5, donde el aditivo de pienso para aves de corral es un gránulo.

7. Uso según la reivindicación 6, donde el gránulo comprende una partícula de núcleo y uno o más recubrimientos.

8. Uso según la reivindicación 5 a 7, que comprende el aditivo de pienso para aves de corral y 10 p% - 40 p% de harina de soja y donde la amilasa bacteriana se añade al pienso para aves de corral en una dosis de entre 20 y 400 KNU/kg de pienso.