

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 498**

51 Int. Cl.:

<b>A23K 10/30</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/33</b>	(2006.01)
<b>A23K 20/189</b>	(2006.01)
<b>A23K 40/10</b>	(2006.01)
<b>A23K 40/20</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/30</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/75</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/80</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/24</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2012 PCT/EP2012/072307**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068550**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012 E 12810110 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2775857**

54 Título: **Composición de pienso suplementada con una xilanasa**

30 Prioridad:

**09.11.2011 EP 11188480**

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

**02.09.2020**

73 Titular/es:

**PURATOS N.V. (100.0%)  
Industrialaan 25  
1702 Groot Bijgaarden, BE**

72 Inventor/es:

**BRUYER, DENIS;  
GEORIS, JACQUES y  
DORGEO, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 781 498 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composición de pienso suplementada con una xilanasa

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un pienso para animales suplementado con una xilanasa hipertermoestable e hipertermófila.

10 **Antecedentes de la invención y estado de la técnica**

Las xilanasas se han utilizado como aditivos para piensos durante varios años. De hecho, se ha demostrado que algunas de las xilanasas, pero no todas, mejoran uno o ambos del aumento de peso corporal absoluto del animal (BWG) y el índice de transformación del alimento (FCR) de un pienso dado.

15 Las xilanasas utilizadas en piensos pueden, por ejemplo, permitir a los nutricionistas reducir las necesidades energéticas de las dietas sin afectar al rendimiento zootécnico de los animales.

20 Las xilanasas aumentan la energía metabolizable o neta de las materias primas y por tanto aumentan el contenido energético metabolizable o neto total de las dietas. Por tanto, los rendimientos zootécnicos pueden mantenerse con menos energía bruta en dietas menos costosas (menos grasa/aceite; más fibra).

25 Un posible beneficio vinculado con el uso de xilanasa es una mejor liberación de (micro)nutrientes atrapados dentro de las paredes celulares del pienso. Tal atrapamiento se debe a la presencia de polisacáridos no amiláceos que son resistentes a la digestión por parte del animal.

Para ser eficaces, las xilanasas que se utilizan como aditivos para piensos deben ser tanto estables como activas a un pH y una temperatura cercanos a las condiciones que se encuentran en el tracto gastrointestinal del animal.

30 El documento WO 95/29997 describe xilanasas termoestables y menciona su incorporación en pienso para animales. La termoestabilidad se define como la resistencia a un minuto a 95°C, acoplada a la capacidad de hidrolizar posteriormente una disolución de arabinoxilano de trigo a 40°C. Sin embargo, después de un tratamiento térmico de cinco minutos, las xilanasas dadas a conocer pierden significativamente su actividad. El documento DE 195 31 994 describe las endoxilanasas termoestables A y B derivadas de *Thermotoga neapolitana* y menciona que estas endoxilanasas pueden añadirse a pienso para animales. El documento US 5 902 581 A da a conocer una xilanasa obtenida de *Acidothermus cellulolyticus* con pH ácido óptimo. El documento WO 2010/083518 da a conocer las enzimas TH1 y TH4 que tienen actividad xilanasa. Se ha descrito que varias especies y cepas de *Thermotoga* producen una o más endoxilanasas hipertermófilas y termoestables. *Thermotoga maritima* produce dos endoxilanasas termoestables, designadas XynA y XynB. XynA y XynB se producen como proteínas con masas moleculares aparentes de alrededor de 120 y 40 kDa. La actividad máxima al pH óptimo (pH 6,2 y pH 5,4 para XynA y XynB, respectivamente) se mide a aproximadamente 92°C para XynA y a aproximadamente 105°C para XynB (Winterhalter y Liebl, 1995, Appl. Env. Microbiol., 61, 1810-1815).

45 **Sumario de la invención**

Un primer aspecto de la presente invención es un pienso para animales que se selecciona del grupo que consiste en ensilado, pienso granulado y pienso en harina, estando dicho pienso para animales suplementado con una composición que comprende una xilanasa, en el que dicha xilanasa es hipertermófila e hipertermoestática, en el que la temperatura óptima de la actividad xilanolítica presente en esta composición es superior a 80°C, más preferiblemente superior a 85°C, aún más preferiblemente superior a 90°C, en el que la razón de actividad de la actividad xilanolítica presente en esta composición a temperatura óptima y a 40°C es superior a 10, más preferiblemente superior a 20, y en el que más del 70% de la actividad xilanolítica presente en esta composición es resistente a 30 minutos de calentamiento a 90°C.

55 Más preferiblemente, la xilanasa hipertermófila e hipertermoestable tiene más del 80% de identidad y/o más del 90% de similitud con una xilanasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.ID.NO:4, SEQ.ID.NO:5, aminoácidos 21-332 de SEQ.ID.NO:1, de SEQ.ID. NO:2, de SEQ.ID.NO:3, de SEQ.ID.NO:4 y de SEQ.ID.NO:5 y posiblemente este pienso para animales comprende entre 0,08 y 40 mg/kg de dicha xilanasa (pura) hipertermófila e hipertermoestable.

60 Posiblemente, este pienso para animales es líquido y comprende, preferiblemente, entre 0,08 y 40 mg/l de la xilanasa (pura) hipertermófila e hipertermoestable.

65 Preferiblemente, el pienso para animales comprende al menos el 50% (en peso seco) de material vegetal, que se selecciona más preferiblemente del grupo que consiste en cereales, legumbres, melaza de remolacha, pulpa de patata y harina de cacahuete.

Preferiblemente, el pienso para animales comprende al menos el 5% (en peso seco) de proteínas y/o al menos el 2% (en peso seco) de grasa.

5 Un aspecto relacionado es un pienso para animales que comprende entre 0,08 y 40 mg/kg (peso seco) de un polipéptido que tiene más del 80% de identidad y/o más del 90% de similitud con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.Q.ID.NO:4, SEQ.ID.NO:5, aminoácidos 21-332 de SEQ.ID.NO:1, de SEQ.ID.NO:2, de SEQ.ID.NO:3, de SEQ.ID.NO:4 y de SEQ.ID.NO:5.

10 Otro aspecto relacionado es el uso (no terapéutico) del pienso para animales para mejorar el aumento de peso corporal y/o el índice de transformación del alimento en un animal que es preferiblemente un vertebrado no rumiante o un crustáceo y más preferiblemente un pez, cerdo o ave de corral. Otro aspecto relacionado es el uso (no terapéutico) de una xilanasa hipertermófila e hipertermoestable para mejorar el aumento de peso corporal y/o el índice de transformación del alimento en un animal, preferiblemente un vertebrado no rumiante o un crustáceo y más preferiblemente un pez, cerdo o ave de corral, en el que dicha xilanasa hipertermófila e hipertermoestable tiene una temperatura óptima superior a 80°C, en el que más del 70% de la actividad xilanolítica de dicha xilanasa hipertermófila e hipertermoestable es resistente a 30 minutos de calentamiento a 90°C y en el que la razón de actividad a temperatura óptima y a 40°C de dicha xilanasa hipertermófila e hipertermoestable es superior a 10.

20 Todavía otro aspecto relacionado es un método para producir el pienso para animales que comprende las etapas de

a) seleccionar un pienso que comprende hemicelulosa;

b) añadir una composición que comprende xilanasa hipertermófila e hipertermoestable, en el que

25 más del 70% de la actividad xilanolítica presente en la composición añadida en la etapa b) de este método es resistente a 30 minutos de calentamiento de dicha composición a 90°C y la temperatura óptima de la actividad xilanolítica presente en esta composición es superior a 80°C (preferiblemente superior a 85°C, más preferiblemente superior a 90°C), y en el que la razón de actividad de la actividad xilanolítica presente en dicha composición a temperatura óptima y a 40°C es superior a 10. Preferiblemente, la actividad xilanasa presente en dicha composición se mide usando xilano al 3% (p:v), más preferiblemente usando xilano de madera de abedul al 3%, como sustrato y/o la actividad xilanasa presente en dicha composición se mide después de una reacción de 15 minutos.

### 35 Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto que la adición de una xilanasa hipertermófila (e hipertermoestable) a un pienso dio como resultado un índice de transformación del alimento mejorado por parte de los animales.

40 Aunque la temperatura de funcionamiento óptima de las (endo)xilanasas hipertermófilas es mucho más alta que la temperatura del tracto intestinal del animal, los inventores han encontrado que estas enzimas mejoraron el aumento de peso corporal y/o índice de transformación del alimento, incluso cuando se comparan con las (endo)xilanasas de pienso usadas normalmente. Más particularmente, los inventores han encontrado incluso que las xilanasas que son tanto hipertermófilas (como hipertermoestables) muestran mejores resultados que las xilanasas termófilas (y termoesestables).

45 Se mejoró tanto el aumento de peso corporal absoluto del animal (BWG) como el índice de transformación del alimento (FCR), en el caso de los animales alimentados con pienso en harina suplementado con xilanasa hipertermófila e hipertermoestable, en comparación con los animales alimentados con pienso en harina no suplementado y con animales en los que el pienso en harina se ha suplementado con una xilanasa mayoritariamente activa a 37-50°C.

El FCR se refiere a la razón entre las cantidades de pienso consumidas por un animal en relación con su aumento de peso. Un índice FCR menor indica una utilización más eficiente del pienso.

55 Estos resultados contrastan, en el caso de la xilanasa hipertermófila e hipertermoestable usada, con la actividad xilanasa extremadamente baja medida a 37°C.

60 Un primer aspecto de la presente invención es un pienso (un pienso para animales) seleccionado del grupo que consiste en ensilado, pienso granulado y pienso en harina, suplementándose dicho pienso para animales con (y/o comprendiendo) una composición que comprende una xilanasa hipertermófila (es decir, la temperatura óptima de la actividad xilanolítica (total) está por encima de 80°C, preferiblemente por encima de 90°C o 95°C y la razón de actividad a temperatura óptima y a 40°C está por encima de 10 o incluso por encima de 15 o 20) e hipertermoestable (es decir, la actividad xilanolítica (total) de esta composición es muy resistente a la inactivación térmica (desnaturalización), en el que más del 70% de la actividad resiste a 30 minutos de calentamiento a 90°C del aditivo que contiene la xilanasa en un baño de aceite).

El pienso puede comprender entre 0,08 mg/kg de pienso y 40 mg/kg de pienso de la xilanasa hipertermófila e hipertermoestable, más preferiblemente entre 0,2 mg/kg de pienso y 20 mg/kg de pienso, aún más preferiblemente entre 0,4 mg/kg de pienso y 16 mg/kg de pienso de la enzima (pura).

5 Preferiblemente, el pienso comprende entre 10 DXU/kg de pienso y 5000 DXU/kg de pienso de la xilanasa hipertermófila e hipertermoestable, más preferiblemente entre 25 DXU/kg de pienso y 2500 DXU/kg de pienso, aún más preferiblemente entre 50 DXU/kg de pienso y 2000 DXU/kg de pienso.

10 En el contexto de la presente invención, una unidad de las xilanasas (DXU) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 pmol de azúcar reductor (expresado como xilosa) por minuto a partir de una disolución de xilano de madera de abedul al 3% a pH 6 y a 70°C, a menos que se mencionen explícitamente otros valores.

15 También se dan a conocer en el presente documento un aditivo para pienso (un aditivo para pienso para animales) que comprende una xilanasa hipertermófila e hipertermoestable tal como se define en otra parte del presente documento.

20 En el contexto de la presente invención, "xilanasas hipertermoestables" se refiere a una xilanasa en la que más del 70% de la actividad xilanolítica (total) (presente en esta composición) es resistente a (capaz de resistir a y/o capaz de mantenerse después de) 30 minutos de calentamiento (de esta composición) a 90°C. El término "actividad xilanolítica total" se refiere a la actividad xilanolítica de la xilanasa hipertermófila e hipertermoestable, y también a la actividad de otras xilanasas (contaminantes) que están preferiblemente menos presentes en la composición, añadidas al pienso para animales, tal como se da a conocer en la presente invención.

25 Preferiblemente, al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso hasta el 100% de la actividad xilanolítica (total) presente en este pienso y/o en este aditivo para pienso puede mantenerse después de 30 minutos (o 45 minutos o 1 hora) de calentamiento (de este pienso y/o este aditivo para pienso) a 90°C (o 95°C).

30 La temperatura óptima (óptimo de temperatura) para la actividad xilanolítica (total) presente en la composición añadida al pienso de la presente invención es superior a 80°C, más preferiblemente superior a 85°C, 90°C o incluso superior a 95°C.

35 La razón de actividad de la actividad xilanolítica (total) presente en la composición añadida al pienso de la presente invención (que comprende la xilanasa hipertermófila e hipertermoestable) a temperatura óptima (por ejemplo, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C o incluso unos 100°C) y a 40°C (o 37°C) es superior a 10, más preferiblemente superior a 20.

40 En el contexto de la presente invención, el término "enzima con actividad xilanolítica", "endoxilanasa" o "xilanasas" se refiere a una enzima (por ejemplo, una xilanasa recombinante al menos parcialmente purificada o, menos preferiblemente, a una mezcla de enzimas) que es (son) capaz (capaces) de hidrolizar los enlaces glicosílicos internos que unen los residuos de xilosa en polisacáridos que contienen xilosa. Tales enlaces glicosílicos pueden ser, por ejemplo, el enlace beta-1,4-glicosílico en unidades de beta-D-xilopiranosil-1,4-beta-D-xilopiranosilo de tales polisacáridos.

45 Las enzimas preferidas con actividad xilanolítica son las endoxilanasas (EC 3.2.1.8.).

Las enzimas preferidas con actividad xilanolítica son las endoxilanasas de la familia 10 de glicósido hidrolasas.

50 Entre las enzimas más preferidas con actividad xilanolítica (xilanasas hipertermófilas e hipertermoestables) se encuentran las enzimas derivadas de una cepa de *Thermotoga maritima* y es aún más preferiblemente XyNB (SEQ.ID.NO:1) o variantes cercanas de la misma (por ejemplo, SEQ.ID.NO:2-5), o comprenden la región más conservada de las mismas secuencias (SEQ.ID.NOs:1-5), preferiblemente en las que esta región más conservada abarca el motivo de xilanasa de la familia 10 de glicósido hidrolasas (una parte conservada del motivo de xilanasa de la familia 10 de glicósido hidrolasas se extiende sobre las regiones 21-332 de SEQ.ID.NO:1-5, o desde el aminoácido 21 hasta el último aminoácido 344, 346 o 347 de estas SEQ.ID.NO:1-5) o comparten una identidad significativa (o similitud) con estas SEQ.ID.NO.1-5 o las regiones 21-332 (o 21 al último aminoácido 344, 346 o 347) de estas SEQ.ID.NO:1-5. La(s) enzima(s) añadida(s) con actividad xilanolítica (xilanasas hipertermófilas e hipertermoestables) también puede(n) ser una proteína de fusión que comprende SEQ.ID.NO:1-5 o una proteína de fusión que comprende un péptido que comparte una identidad significativa (o similitud) con estas SEQ.ID.NO:1-5 o con las regiones 21-332 de estas SEQ.ID.NO: 1-5.

60 "Identidad significativa", en el contexto de la presente invención, se refiere a al menos el 75% de identidad, preferiblemente a al menos el 80%, más preferiblemente a al menos el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o incluso a al menos el 99%. Preferiblemente, la identidad se mide en toda la longitud de la secuencia (o fragmento) (mencionada), tal como en toda la longitud de SEQ.ID.NO:1-5 o en toda la longitud del péptido que consiste en los aminoácidos 21-332 (o en los aminoácidos 21 al último aminoácido) de SEQ.ID.NO:1-5. "Similitud significativa" en el contexto de la presente invención se refiere a al menos el 85% de similitud, preferiblemente a al

menos el 90%, más preferiblemente a al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o incluso a al menos el 99%. Preferiblemente, la similitud se mide en toda la longitud de la secuencia (o fragmento) (mencionada), tal como en toda la longitud de SEQ.ID.NO:1-5 o en toda la longitud del péptido que consiste en los aminoácidos 21-332 (o en los aminoácidos 21 al último aminoácido) de SEQ.ID.NO: 1-5.

La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad" o "similitud". A efectos de la presente invención, el grado de similitud (y de identidad) entre dos secuencias de aminoácidos se determina como en el documento WO 2010/0142 697 usando el algoritmo de Needleman-Wunsch tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS, preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de hueco de 10, penalización de extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución de EBOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle marcada como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera: (Residuos idénticos x 100)/(Longitud de la alineación - Número total de huecos en la alineación). La salida de Needle marcada como "similitud más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como porcentaje de similitud y se calcula de la siguiente manera: (Residuos similares x 100)/(Longitud de alineación - Número total de huecos en la alineación). Se añaden ventajosamente xilanasas (y/o la composición que comprende la xilanasas hipertermófila e hipertermoestable) durante la preparación del pienso, que es una preparación sólida tal como harina o gránulos, o que es un líquido.

El proceso de granulación incluye habitualmente etapas a temperatura elevada, tal como inyección de vapor.

Por el contrario, el pienso para animales puede producirse sin el uso de etapas de calentamiento (por ejemplo, por encima de 50°C), por ejemplo, para pienso que no se granula.

Un aspecto relacionado es un pienso (para animales) (y/o una premezcla (de pienso)) que comprende por kg entre 0,08 mg y 400 mg (preferiblemente entre 0,2 mg/kg y 40 mg/kg, más preferiblemente entre 0,4 mg/kg y 20 mg/kg) de un polipéptido que tiene más del 75% (preferiblemente más del 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso el 100%) de identidad (o similitud) con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.ID.NO:4, SEQ.ID.NO:5, aminoácidos 21-332 (o del aminoácido 21 al último aminoácido 344, 346 o 347) de SEQ.ID.NO:1, de SEQ.ID.NO:2, de SEQ.ID.NO:3, de SEQ.ID.NO:4 y de SEQ.ID.NO:5, siendo dicho polipéptido hipertermoestable y teniendo actividad xilanasas hipertermófila.

Preferiblemente, el pienso (para animales) de la presente invención comprende al menos el 50% (en peso seco) de material vegetal, más preferiblemente al menos el 55% o incluso al menos el 60%.

Preferiblemente, este material vegetal se selecciona del grupo que consiste en cereales, legumbres, melaza de remolacha, pulpa de patata y harina de cacahuate y también puede incluir mezclas de los mismos tales como cereales y legumbres.

Preferiblemente (o además), el pienso de la presente invención (que comprende al menos el 50% de material vegetal) comprende al menos el 5% (en peso seco) de proteínas, más preferiblemente al menos el 10%, al menos el 15% o incluso al menos el 20% de proteínas.

Preferiblemente (o, además), el pienso de la presente invención (que comprende al menos el 50% de material vegetal y/o al menos el 5% de proteínas) comprende al menos el 2% (en peso seco) de grasa, más preferiblemente al menos el 5% o incluso al menos el 8% de grasa.

El pienso de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en ensilado, pienso granulado y pienso en harina.

Otro aspecto relacionado de la presente invención es el uso (no terapéutico) del pienso para animales de la presente invención (y/o el uso de una premezcla (de pienso) y/o el uso de un aditivo para pienso) y/o el uso de la xilanasas hipertermófila e hipertermoestable de la presente invención para mejorar el aumento de peso corporal y/o el índice de transformación del alimento de un animal (en crecimiento) (y más preferiblemente no para producir un aumento de peso patológico excesivo).

La xilanasas hipertermófila e hipertermoestable preferida para mejorar (no terapéuticamente) el aumento de peso corporal (BWG) y/o el índice de transformación del alimento (FCR) de un animal (en crecimiento) tiene más del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o incluso más del 99% de la actividad xilanolítica (total) que es resistente a 1 hora de calentamiento a 90°C (o 95°C).

Alternativamente o, además, la xilanasas hipertermófila e hipertermoestable preferida utilizada para mejorar (no terapéuticamente) el aumento de peso corporal (BWG) y/o el índice de transformación del alimento (FCR) de un animal (en crecimiento) es de la familia 10 de glicosido hidrolasas.

Las xilanasas hipertermófilas e hipertermoestables más preferidas usadas para mejorar (no terapéuticamente) el

aumento de peso corporal (BWG) y/o el índice de transformación del alimento (FCR) de un animal (en crecimiento) son de *Thermotoga* y, aún más preferiblemente, comparten una homología (similitud) significativa con SEQ.ID.NO 1-5, o con los fragmentos 21-332 de SEQ.ID.NO 1-5, o comprenden (como proteína de fusión) un péptido que comparte una homología (similitud) significativa con los fragmentos 21-332 de SEQ.ID.NO 1-5.

En el contexto de la presente invención, "animales" se refiere preferiblemente a animales no humanos y/o son animales que no tienen patologías (evidentes) y/o que no tienen patologías relacionadas con un déficit de peso.

Los animales de la presente invención son animales preferiblemente no rumiantes y/o son animales monogástricos.

Más preferiblemente, los animales se seleccionan del grupo que consiste en cerdos, aves de corral, peces y crustáceos, aún más preferiblemente son cerdos y/o aves de corral.

#### Origen y preparación de la enzima

Se ha descrito que varias especies y cepas de *Thermotoga* producen una o más endoxilanasas hipertermófilas y termoestables. *Thermotoga maritima* produce dos endoxilanasas termoestables, designadas XynA y XynB. XynA y XynB se producen como proteínas con masas moleculares aparentes de aproximadamente 120 y 40 kDa. La actividad máxima al pH óptimo (pH 6,2 y pH 5,4 para XynA y XynB, respectivamente) se ha medido a aproximadamente 92°C para XynA y a aproximadamente 105°C para Xyn B (Winterhalter y Liebl, 1995, Appl. Env. Microbiol., 61, 1810-1815). El documento WO93/19171 describe un procedimiento para obtener xilanasas de *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana* y *T. termarum*.

Se han publicado secuencias de ADN y proteínas de endoxilanasas de varias cepas y especies de xilanasas de *Thermotoga*. Estas xilanasas pueden agruparse en dos tipos por homología de secuencias con XynA y XynB de *T. maritima*.

Ninguna de las referencias, al menos ninguna de las referencias que dan a conocer un óptimo de temperatura muy alto y casi ninguna actividad a 40°C, describe el uso de una xilanasas de *Thermotoga* aislada, tal como XynB, como aditivo para pienso.

Las xilanasas pueden obtenerse de diferentes fuentes. Las xilanasas pueden aislarse/purificarse después de haber hecho crecer una cepa de *Thermotoga* seleccionada en un medio de cultivo adecuado.

Las xilanasas pueden obtenerse cultivando una cepa recombinante que expresa un gen que codifica para la proteína correspondiente (por ejemplo, XynB).

Pueden elegirse genes adecuados entre aquellos que codifican para la endo-1,4-beta-xilanasas de *Thermotoga sp.* RQ2 (GenBank: ACB09229.1), la endo-1,4-beta-xilanasas de *Thermotoga naphthophila* RKU-10 (GenBank: ADA66795.1), la xilanasas de *Thermotoga neapolitana* (GenBank: CAA90235.1), la endo-1,4-beta-xilanasas de *Thermotoga sp.* FjSS3-B.1 (GenBank: AAA90913.1) o la endo-1,4-beta-xilanasas B de *Thermotoga maritima* MSB8 (GenBank: AAD35164.1 - figura 1 - SEQ ID NO 1).

Además, pueden obtenerse variantes de estas enzimas que muestran una temperatura óptima de actividad (termoactividad) y una termoestabilidad que se encuentran en los intervalos descritos anteriormente modificando la secuencia codificante de estos genes.

Las modificaciones de secuencia pueden incluir, pero no se limitan a, la(s) sustitución/sustituciones, eliminación/eliminaciones y/o inserción/inserciones de aminoácidos. Modificaciones de secuencia preferidas son sustituciones conservativas (por ejemplo, marcadas como positivas después de un análisis BLASTp).

Preferiblemente las enzimas variantes tienen al menos el 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con XynB de *Thermotoga maritima* MSB8, más preferiblemente al menos el 90%, incluso más preferiblemente al menos el 95% o tienen al menos el 90% de similitud de secuencia de aminoácidos con XynB de *Thermotoga maritima* MSB8, más preferiblemente al menos el 93%, 94%, 95% aún más preferiblemente al menos el 98%.

La xilanasas recombinante puede expresarse en cualquier organismo huésped adecuado. Huéspedes particularmente adecuados son bacterias, levaduras y hongos. Huéspedes bacterianos preferidos son cepas de *Escherichia coli* y *Bacillus (subtilis, licheniformis, amyloliquefaciens, megaterium...)* o *Streptomyces (coelicolor, lividans,...)*.

Huéspedes de levadura preferidos son cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* o *Yarrowia lipolytica*. Huéspedes fúngicos preferidos son cepas de *Aspergillus (nidulans, niger,...)*, *Penicillium* y *Trichoderma*.

Las xilanasas pueden obtenerse además en forma de planta y/o semilla transgénica que expresa la enzima correspondiente o de un animal transgénico.

La xilanasa puede prepararse cultivando la *Thermotoga* o la cepa microbiana recombinante en un medio adecuado para el crecimiento y la expresión de la xilanasa. Preferiblemente, las cepas se cultivan en fermentadores.

5 Después del cultivo, la xilanasa puede recuperarse como un sobrenadante de cultivo o extracto celular. El sobrenadante o extracto celular se purifica preferiblemente de manera adicional para obtener una preparación semipurificada o purificada. Los métodos de purificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, microfiltración, ultrafiltración, precipitación, cromatografía...

10 Las xilanasas puede proporcionarse como una preparación líquida o seca (en polvo). Las preparaciones líquidas se estabilizan preferiblemente mediante la adición de un componente adecuado tal como sal (NaCl) o glicerol. Las preparaciones en polvo pueden obtenerse, por ejemplo, mediante secado por pulverización o liofilización. Las xilanasas pueden estar recubiertas.

#### 15 Determinación de la actividad enzimática

Existen varios métodos para determinar la actividad enzimática de las endoxilanasas en preparaciones líquidas. Un método particularmente adecuado es uno que usa la propiedad de las endoxilanasas para hidrolizar xilano como sustrato. La reacción de hidrólisis libera azúcares reductores que provocan que se desarrolle un color típico mediante reacción con ácido dinitrosalicílico (DNS). La intensidad del color a 570 nm es directamente proporcional a la actividad de la xilanasa en la muestra, siempre que la concentración del sustrato siga siendo suficiente (es decir, se mantenga no más del 10% de degradación y/o una concentración de saturación del sustrato durante toda la prueba).

25 Una DXU de xilanasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 pmol de azúcares reductores (como equivalente de xilosa) por minuto a partir de una disolución del 3% (p:v) de xilano de madera de abedul y en tampón citrato-fosfato 100 mM a pH 6 a 70°C. La reacción se realiza durante 15 minutos en un volumen de 0,8 ml (0,7 ml de sustrato + 0,1 ml de xilanasa diluida). Después de la incubación, la reacción se termina mediante la adición de 1 ml de reactivo DNS (composición: NaOH 400 mM, ácido 3,5-dinitrosalicílico 40 mM, tartrato de potasio y sodio 1 M). Posteriormente, la mezcla se mantiene a 95°C durante 15 min y luego se enfría a 25°C durante 5 min. Finalmente, se mide la absorbancia a 570 nm frente a un control.

30 Para evaluar la actividad xilanasa (DXU/ml) en cuanto a formación de azúcar reductor, se prepara una curva patrón de xilosa con xilosa en lugar de la preparación de dilución enzimática. Todas las incubaciones de sustrato y posteriores mediciones se realizan por triplicado.

#### 35 Determinación de la temperatura de actividad óptima y la termoestabilidad de la endoxilanasas

La dependencia de la temperatura de la actividad xilanasa se analiza con una variante del método de azúcar reductor de ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito anteriormente. El método de DNS se realiza sobre mezclas de enzima/sustrato incubadas en un baño de aceite a temperaturas que oscilan entre 20 y 100°C. Todos los demás parámetros del método se mantienen sin cambios.

40 La estabilidad de la temperatura se controla mediante la incubación previa de las preparaciones enzimáticas en un baño a temperaturas que oscilan entre 50 y 100°C. Se toman muestras después de 0, 10, 30, 60 (y 90) minutos y se enfrían en un baño de hielo durante 10 minutos. La actividad residual se evalúa por triplicado con el método descrito anteriormente.

#### 45 Composición de pienso

50 Los piensos para animales (incluyendo ensilados) pueden comprender cereales tales como trigo, cebada, centeno, maíz, arroz, sorgo, espelta, triticale o avena o subproductos de cereales tales como salvado de trigo, paja de cebada, mazorcas de maíz, moliendas de avena, harinillas de trigo, gluten de trigo, gérmenes de arroz o salvado de maíz, u otros materiales vegetales tales como soja u otras legumbres, colza, altramuz, guisantes, harina de tapioca, melaza de remolacha, pulpa de patata, harina de cacahuete. Los cereales preferidos son trigo, cebada y centeno.

55 Preferiblemente, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal o fuente proteica. Ejemplos de proteínas vegetales o fuentes proteicas son soja y cereales tales como cebada, maíz, avena, arroz, centeno, sorgo y trigo.

60 La composición de pienso para animales de la invención contiene ventajosamente el 0-80% de maíz; y/o el 0-80% de sorgo; y/o el 0-70% de trigo; y/o el 0-70% de cebada; y/o el 0-30% de avena; y/o el 0-40% de harina de soja; y/o el 0-10% de harina de pescado; y/o el 0-20% de suero de leche.

65 La composición de pienso para animales de la invención contiene ventajosamente ingredientes o aditivos de pienso adicionales tales como enzimas, prebióticos, probióticos, minerales y oligoelementos, vitaminas y provitaminas, proteínas vegetales, microbianas o animales, aminoácidos, sus sales y análogos, almidón, fibras, hidratos de

5 carbono y azúcares o edulcorantes, aceites y harinas oleaginosas, grasas vegetales o animales, tintes y otros colorantes, agentes emulsionantes y estabilizantes, agentes espesantes y gelificantes, aglutinantes, agentes antiaglomerantes y coagulantes, conservantes, reguladores de la acidez, carotenoides y xantofilos, urea y sus derivados, potenciadores de la digestibilidad, estabilizadores de la flora intestinal, coccidiostáticos y otras sustancias médicas.

Se seleccionan enzimas adicionales preferidas del grupo que consiste en fitasas, amilasas, celulasas, glucanasas, proteasas, mananasas, pectinasas, hemicelulasas y (menos preferiblemente) (otras) xilanasas.

10 Se seleccionan minerales preferidos del grupo que consiste en sales (cloruros, sulfatos, fluoruros, carbonatos, óxidos...), calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, manganeso, zinc, níquel, molibdeno, cobre, hierro, selenio, cobalto y yodo.

15 Se seleccionan vitaminas preferidas del grupo que consiste en vitamina A, caroteno, ácido ascórbico, vitamina D, D3, E, K, B1 tiamina, B6 piridoxina, biotina, colina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, B2 riboflavina, cianocobalamina...

Se seleccionan proteínas adecuadas del grupo que consiste en proteínas vegetales, microbianas o animales.

20 Se seleccionan aminoácidos adecuados del grupo que consiste en metionina, cisteína, lisina, treonina, triptófano, isoleucina, leucina, valina, histidina, arginina, glicina, serina, fenilalanina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, prolina.

25 Microorganismos adecuados pertenecen, pero no se limitan, a *Aspergillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*.

Pueden utilizarse otros posibles aditivos, y pueden encontrarse, por ejemplo, en el Registro comunitario de aditivos para alimentación animal de la Unión Europea de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1831/2003 - Apéndices 3a&4 - Anexo: Lista de aditivos, y sus actualizaciones.

### 30 Fabricación de piensos

Las dietas para animales pueden fabricarse como pienso en harina (no granulado) o pienso granulado. Normalmente, el material de pienso molido se mezcla y se añade una cantidad suficiente de vitaminas y minerales esenciales según las especificaciones de la especie animal en cuestión.

La composición de la invención puede añadirse en forma de formulación enzimática sólida o líquida, o en forma de aditivo para pienso, como una premezcla.

40 Una composición sólida se añade normalmente antes o durante la etapa de mezclado; y una composición líquida se añade normalmente después de la etapa de granulación.

45 Sin embargo, la composición de enzima líquida hipertermoestable e hipertermoactiva también puede añadirse antes de la etapa de granulación.

La dosificación de la xilanasas de la invención en el pienso puede optimizarse usando métodos de ensayo y error tal como se conoce en la técnica. Diferentes xilanasas pueden tener diferentes intervalos de dosificación óptimos.

### 50 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la xilanasas XynB de *Thermotoga maritima* MSB8. El péptido señal está subrayado.

55 La figura 2 muestra geles de SDS-poliacrilamida teñidos con azul Coomassie de las endoxilanasas recuperadas después de las sucesivas etapas de purificación. Figura 2a: XynAΔNC; figura 2b: XynB.

La figura 3 muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad de las endoxilanasas XynAΔNC y XynB. La actividad máxima se ha establecido en el 100%.

60 La figura 4 muestra la actividad residual de las endoxilanasas después de la preincubación a diversas temperaturas.

### **Ejemplos**

#### Ejemplo 1: Preparación de endoxilanasas de *Thermotoga*.

65 *Clonación de los dominios catalíticos de las xilanasas XynA y XynB de *Thermotoga maritima**

Basándose en las secuencias publicadas de los genes de *Thermotoga xynA* (registro de GenBank/Genpept™ Z46264) y *xynB* (registro de GenBank/GenPept™ AAD35164), todo el gen *xynB* y el fragmento de ADN correspondiente al dominio catalítico del gen *xynA* (*xynA*ΔNC) se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico de *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM3109/ATCC43589) siguiendo protocolos clásicos.

Los productos de PCR se clonaron en el sistema de vector pGEM-T (Promega), usando el procedimiento recomendado por el proveedor, y se usaron para transformar células ultracompetentes *E. coli* DH5®. La selección azul-blanco permitió la selección de colonias blancas que llevaban el fragmento de PCR. Las preparaciones de plásmidos purificadas (plásmido Nucleospin, Macherey-Nagel) se secuenciaron en un secuenciador de ADN ALF (Pharmacia Biotech). La secuenciación del fragmento insertado se llevó a cabo usando los cebadores universales T7 y RP, así como cebadores correspondientes a secuencias de ADN internas. Las secuencias obtenidas eran idénticas a las secuencias publicadas (número de registro de GenBank/GenPept™ Z46264 para *xynA* y número de registro AAD35164 para *xynB*).

El fragmento de ADN correspondiente al derivado del dominio catalítico del *XynA* (*XynA*ΔNC) modular y el gen *xynB* completo se subclonaron en el vector de clonación pET 22b (+) (Novagen). Los plásmidos recombinantes resultantes se transformaron en células *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene).

#### *Cultivo de las cepas recombinantes y producción de las xilanasas XynA*ΔNC *y XynB de Thermotoga maritima*

Se centrifugaron 15 ml de un precultivo de 5 horas (37°C) de las células *E. coli* BL21 (DE3) que llevaban los genes de xilanasas a 10000 g durante 1 minuto y se resuspendió el sedimento en 900 ml de caldo Terrific (triptona Bacto 12 g/l (Difco), extracto de levadura 24 g/l (Difco), glicerol 4 ml/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,54g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,31 g/l) que contenía ampicilina 200 μg/ml en un matraz de agitación de 3 litros. Los cultivos se incubaron a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una absorbancia a 550 nm de entre 3 y 4, tras lo cual se indujo la expresión de la enzima con isopropil-1-tio-β-galactopiranosido 1 mM.

Después de 15 horas de incubación a 37°C, se recogieron las células por centrifugación a 18000 g durante 30 minutos a 4°C, se resuspendieron en BICINE 50 mM que contenía NaCl 10 mM, se rompieron en un disruptor celular enfriado previamente (Constant Systems Ltd., Warwick, RU) a 28 Kpsi y se centrifugaron a 40.000 g durante 30 minutos. El ADN cromosómico se extrajo de los lisados celulares en bruto mediante tratamiento con sulfato de protamina al 0,2% (Calbiochem) y centrifugación a 40.000 g durante 30 minutos. Entonces, se añadieron 25 unidades de benzonasa (Merck, Darmstadt, Alemania) a la disolución.

#### *Recuperación de las xilanasas recombinantes XynA*ΔNC *y XynB*

Las preparaciones enzimáticas en bruto de *XynA*ΔNC y de *XynB* de *Thermotoga maritima* expresadas en *Escherichia coli* se han concentrado por ultrafiltración mediante recirculación de las preparaciones líquidas sobre una membrana Biomax de polietersulfona UF (corte = 5 kDa) en un sistema Proflux (Millipore). Las disoluciones enzimáticas concentradas se filtraron en un sistema de filtración estéril, incluyendo varias etapas con diferentes cortes y finalmente un filtro absoluto (corte = 0,22 μM) (Millipore).

Las enzimas líquidas concentradas se secaron usando un secado en lecho fluidizado ProCell LabSystem (Glatt) donde se pulveriza sobre un portador (harina de trigo), dando una preparación enzimática granulada de baja deposición de polvo.

#### *Purificación de las xilanasas recombinantes XynA*ΔNC *y XynB*

Se purificó *XynA*ΔNC usando un procedimiento de tres etapas. El extracto en bruto se dializó 2500x frente a tampón cromatográfico (Tris-HCl 20 mM pH 8,0) y se cargó en una Q HP XK 16/20 (GE Healthcare), una columna de intercambio aniónico fuerte y se eluyó con un gradiente lineal (NaCl 0 - 1 M). La preparación semipurificada se dializó entonces 2500x frente a tampón cromatográfico (Tris-HCl 20 mM pH 8,0) y se cargó en una Sephacryl S-100 HR 120 ml XK 16/70 (GE Healthcare), una columna de cromatografía de exclusión molecular. Las fracciones activas se agruparon, se dializaron 2500x frente a tampón cromatográfico (Tris-HCl 20 mM pH 8,0) y se cargaron en una Mono-Q GL 5/50 (GE Healthcare), una columna de intercambio aniónico fuerte y se eluyeron con gradiente lineal (NaCl 0 - 1 M). Las fracciones purificadas se han agrupado y su pureza se ha comprobado en SDS-PAGE (figura 2a).

Se purificó *XynB* usando un procedimiento de dos etapas. La mayoría de las proteínas del huésped se retiraron mediante tratamiento térmico de la preparación enzimática (30 min a 75°C) seguido por centrifugación (12000 x g a 4°C). El sobrenadante se dializó 2500x frente a tampón cromatográfico (Bis-Tris 20 mM pH 6,2, cargado en una columna de intercambio iónico Q-Sepharose FF (GE Healthcare) y se eluyó con un gradiente lineal (NaCl 0 - 1 M). La pureza de la xilanasas recombinante se ha comprobado en SDS-PAGE (figura 2b).

*Caracterización de las enzimas recombinantes*

La actividad xilanasa de xynAΔNC y xynB se determinó a diversas temperaturas usando las condiciones de prueba descritas. Las actividades máximas fueron 70°C y 90-95°C, respectivamente (figura 3). Se evaluó la estabilidad de las enzimas recombinantes usando el protocolo descrito anteriormente. Los resultados (figura 4) mostraron que XynAΔNC mantiene el 30% de su actividad después de la incubación a 60°C durante 60 min. XynB mantiene el 100% de su actividad después de una incubación a 90°C durante 60 min.

Ejemplo 2: Uso de las xilanasas de *Thermotoga maritima* (XynAΔNC y XynB) en pienso para animales

Se realizó un ensayo usando pollos de engorde macho o hembra (Belgabroed). Desde 1 hasta 42 días de edad se mantuvieron en corrales de suelo y se les ofreció un pienso comercial para pollos de engorde suplementado o no con xilanasas exógenas. A la edad de 1 día, los animales (768 aves - 384 machos/384 hembras) se distribuyeron aleatoriamente en 24 corrales (4 tratamientos x 2 sexos x 3 réplicas) de 32 aves/corral, 0,8 m<sup>3</sup>/corral. A la edad de 14 días, los animales se distribuyeron en 48 corrales (4 tratamientos x 2 sexos x 6 réplicas) de 16 aves. Cada corral está dotado de 2 boquillas para beber y una bandeja de alimentación. La temperatura era de 35°C al inicio, y luego se redujo en 0,5°C cada día; a los 22 días, la temperatura se mantuvo a 22°C. El esquema de luz fue 23 h 30 min de luz y 30 min de oscuridad para el primer período y 18 h de luz y 6 h de oscuridad para el segundo período. Se vacunó a las aves contra la enfermedad de Newcastle el día 1 (en la planta de incubación) y contra la enfermedad de Gumboro + Newcastle el día 14 (a través del agua potable).

En este ensayo se incluyeron cuatro tratamientos. A una dieta basada en trigo (tabla 1), o bien no se le añadió enzima (control) o bien una cantidad igual a 500 DXU de XynAΔNC de *Thermotoga maritima*/kg de pienso o una cantidad igual a 400 DXU de Xynb de *Thermotoga maritima*/kg de pienso o una xilanasa de *Bacillus subtilis* (Belfeed™ B1100MP (E1606), una endo-1,4-betaxilanasa comercialmente disponible en Beldem, una división de Puratos, Groot-Bijgaarden, Bélgica) suplementada en la dosis recomendada de 10 UI/kg de pienso (control positivo).

Los inventores compararon diferentes niveles del control positivo (la xilanasa comercial Belfeed), tal como 50 UI/kg de pienso y encontraron que ambos parámetros (BWG y FCR) alcanzaron una meseta a 10 UI/kg de pienso. Por tanto, los inventores usaron esta cantidad para el control positivo.

Las enzimas se añadieron al pienso como líquidos (XynAΔNC y XynB) o polvo (Belfeed) incorporados a una premezcla antes de mezclarlo en la dieta. Las dietas se ofrecieron a voluntad a los animales en forma de una harina. También estaba disponible libremente agua.

Los pesos corporales se registraron el día 1, el día 14 y el día 42. Se registró el suministro de pienso y se midió el pienso restante en la bandeja inmediatamente después de los pesajes 2 y 3.

Se determinó el aumento de peso corporal (BWG) y el índice de transformación del alimento (FCR) para los períodos 1-14 días, 14-42 días y 1-42 días de edad.

TABLA 1

Composición de pienso y contenido de nutrientes principales.	
Materias primas	Contenido
Trigo	57,20%
Harina de soja	18,73%
Soja tratada térmicamente	13,00%
Grasa animal	4,00%
Gluten de trigo	2,00%
Aceite de soja	0,467%
NaCl	0,250%
Biolys	0,283%
DL-metionina	0,233%
Treonina	0,083%
CaCO <sub>3</sub>	0,533%
Fosfato monocalcico	0,933%
Bicarbonato de sodio	0.100%
Premezcla de vitaminas/minerales	1,500%

Premezcla Natuphos	0,500%
Betacid GM	0,188%
Proteína en bruto	20,50%
Grasa en bruto	8,50%
Cenizas en bruto	6,00%
Fibra en bruto	3,00%
Metionina	0,53%
Fósforo tot.	0,61%
Vitamina A	15100 UI/kg
Vitamina D3	3000 UI/kg
Vitamina E	30 mg/kg
Fitasa (EC 3.1.3.8) E1600	500 FtU/kg

Los resultados de este ensayo se presentan en la tabla 2, que muestra el promedio de BWG y FCR de los pollos de engorde en dos períodos.

5

TABLA 2

	BWG (g/ave)			FCR (g/g)			FCR estándar
	1-14 d	14-42d	1-42d	1-14d	14-42d	1-42d	
Control	315,0	1638,0	1961,4	1,394	1,819	1,691	1,737
Belfeed	330,4	1811,6	2146,2	1,368	1,728	1,626	1,587
XynAΔNC	327,6	1789,2	2129,4	1,368	1,775	1,659	1,667
XynB	319,2	1884,4	2205,0	1,361	1,720	1,624	1,562

10

Tanto el crecimiento como el FCR mejoraron para las dietas que contenían XynAΔNC y XynB, ambos después de 14 d. del período de inicio o después del total de 42 d. del período de engorde. XynB mostró un mejor rendimiento que XynAΔNC.

### Ejemplo 3: Uso de xilanasas *Thermotoga maritima* (XynB) en pienso para animales

15

Se realizó un ensayo usando pollos de engorde macho o hembra (Belgabroed). Desde 1 hasta 42 días de edad se mantuvieron en corrales en suelo y se les ofreció un pienso comercial para pollos de engorde suplementado o no con xilanasas exógenas. A la edad de 1 día, los animales (768 aves - 384 machos/384 hembras) se distribuyeron aleatoriamente en 24 corrales (4 tratamientos x 2 sexos x 3 réplicas) de 32 aves/corral, 0,8 m<sup>3</sup>/corral. A la edad de 14 días, los animales se distribuyeron en 48 corrales (4 tratamientos x 2 sexos x 6 réplicas) de 16 aves. Cada corral está dotado de 2 boquillas para beber y una bandeja de alimentación. La temperatura era de 35°C al inicio, y luego se redujo en 0,5°C cada día; a los 22 días, la temperatura se mantuvo a 22°C. El esquema de luz fue 23 h 30 min de luz y 30 min de oscuridad para el primer período y 18 h de luz y 6 h de oscuridad para el segundo período. Se vacunó a las aves contra la enfermedad de Newcastle el día 1 (en la planta de incubación) y contra la enfermedad de Gumboro + Newcastle el día 14 (a través del agua potable).

20

25

En este ensayo se incluyeron cuatro tratamientos. A una dieta basada en trigo (tabla 3), se le añadieron o bien una cantidad igual a 200 DXU de Xynb/kg de pienso o una cantidad igual a 400 DXU de Xynb/kg de pienso o bien una xilanasas fúngica disponible comercialmente Hostazym® X (Huvepharma; EC N°E1617) suplementada a la dosis recomendada de 100 ppm o una xilanasas de *Bacillus subtilis* (Belfeed™ B1100MP (E1606), una endo-1,4-beta-xilanasas comercialmente disponible de Beldem, una división de Puratos, Groot-Bijgaarden, Bélgica) suplementada a la dosis recomendada 10 UI/kg de pienso o 100 ppm.

30

Las enzimas se añadieron al pienso como polvos incorporados a una premezcla antes de mezclarlo en la dieta. Las dietas se ofrecieron a voluntad a los animales en forma de una harina. También estaba disponible libremente agua.

35

Los pesos corporales se registraron el día 1, el día 14 y el día 42. Se registró el suministro de pienso y se midió el pienso restante en el comedero inmediatamente después de los pesajes 2 y 3.

Se determinó el aumento de peso corporal (BWG) y el índice de transformación del alimento (FCR) para los períodos 1-14 días, 14-42 días y 1-42 días de edad.

TABLA 3

Composición de pienso y contenido de nutrientes principales.	
Materias primas	Contenido
Trigo	58,19%
Harina de soja	20,16%
Soja tratada térmicamente	10,00%
Grasa animal	4,00%
Harina de colza	2,00%
Aceite de soja	1,13%
NaCl	0,233%
Bioly	0,283%
DL-metionina	0,233%
Treonina	0,083%
CaCO <sub>3</sub>	0,500%
Fosfato monocálcico	0,968%
Bicarbonato de sodio	0,134%
Premezcla de vitaminas/minerales	1,500%
Premezcla Natuphos	0,500%
Cloruro de colina	0,083%

- 5 Los resultados de este ensayo se presentan en la tabla 4, que muestra el promedio de BWG y FCR de los pollos de engorde en dos períodos.

TABLA 4

	BWG (g/ave)			FCR (g/g)			FCR estándar
	1-14d	14-42d	1-42d	1-14 d	14-42d	1-42d	
Hostazyme	308,0	2004,8	2318,4	1,492	1,787	1,714	1,604
Belfeed	315,0	2035,6	2339,4	1,462	1,727	1,660	1,537
XynB 200u	347,2	2088,8	2452,8	1,344	1,720	1,615	1,460
XynB 400u	334,6	2108,4	2469,6	1,342	1,708	1,611	1,454

- 10 Tanto el crecimiento como el FCR mejoraron significativamente para las dietas que contenían las enzimas XynB, ambos después de 14 d. del período de inicio o después del total de 42 d. del período de engorde. XynB mostró un mejor BWG y FCR que otras xilanasas comerciales.

15 **Lista de secuencias**

- <110> Puratos NV
- <120> Composición de pienso suplementada con una xilanasas
- 20 <130> BPPura0052PC00
- <160> 5
- 25 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 347
- <212> PRT
- 30 <213> *Thermotoga maritima*
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1).. (347)

ES 2 781 498 T3

<223> Cepa MSB8; GeneBank AAD35164.1

<220>

<221> SEÑAL

5 <222> (1).. (20)

<223> Péptido señal predicho

<400> 1

Met Lys Ile Leu Pro Ser Val Leu Ile Leu Leu Leu Gly Cys Val Pro  
1 5 10 15

Val Phe Ser Ser Gln Asn Val Ser Leu Arg Glu Leu Ala Glu Lys Leu  
20 25 30

Asn Ile Tyr Ile Gly Phe Ala Ala Ile Asn Asn Phe Trp Ser Leu Ser  
35 40 45

Asp Ala Glu Lys Tyr Met Glu Val Ala Arg Arg Glu Phe Asn Ile Leu  
50 55 60

Thr Pro Glu Asn Gln Met Lys Trp Asp Thr Ile His Pro Glu Arg Asp  
65 70 75 80

Arg Tyr Asn Phe Thr Pro Ala Glu Lys His Val Glu Phe Ala Glu Glu  
85 90 95

Asn Asp Met Ile Val His Gly His Thr Leu Val Trp His Asn Gln Leu  
100 105 110

Pro Gly Trp Ile Thr Gly Arg Glu Trp Thr Lys Glu Glu Leu Leu Asn  
115 120 125

Val Leu Glu Asp His Ile Lys Thr Val Val Ser His Phe Lys Gly Arg

ES 2 781 498 T3

130		135		140
Val Lys Ile Trp Asp	Val Val Asn Glu Ala Val Ser Asp Ser Gly Thr			
145	150	155		160
Tyr Arg Glu Ser Val Trp Tyr Lys Thr Ile Gly Pro Glu Tyr Ile Glu				
	165	170		175
Lys Ala Phe Arg Trp Ala Lys Glu Ala Asp Pro Asp Ala Ile Leu Ile				
	180	185		190
Tyr Asn Asp Tyr Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala Lys Ser Asn Phe Val				
	195	200		205
Tyr Asn Met Ile Lys Glu Leu Lys Glu Lys Gly Val Pro Val Asp Gly				
	210	215		220
Ile Gly Phe Gln Met His Ile Asp Tyr Arg Gly Leu Asn Tyr Asp Ser				
225	230	235		240
Phe Arg Arg Asn Leu Glu Arg Phe Ala Lys Leu Gly Leu Gln Ile Tyr				
	245	250		255
Ile Thr Glu Met Asp Val Arg Ile Pro Leu Ser Gly Ser Glu Glu Tyr				
	260	265		270
Tyr Leu Lys Lys Gln Ala Glu Val Cys Ala Lys Ile Phe Asp Ile Cys				
	275	280		285
Leu Asp Asn Pro Ala Val Lys Ala Ile Gln Phe Trp Gly Phe Thr Asp				
	290	295		300
Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu				
305	310	315		320
Leu Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Tyr Ala Ile Lys				
	325	330		335
Glu Val Leu Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys				
	340	345		

<210> 2  
 <211> 347  
 5 <212> PRT  
 <213> *Thermotoga sp.*

<220>  
 <221> MISC\_CHARACTERÍSTICA

10

ES 2 781 498 T3

<223> Cepa RQ2; GeneBank ACB09229.1

<220>

<221> SEÑAL

5 <222> (1).. (20)

<223> Péptido señal predicho

<400> 2

Met Lys Ile Leu Pro Ser Val Leu Ile Leu Leu Leu Gly Cys Val Pro  
1 5 10 15

Val Phe Ser Ser Gln Asn Val Ser Leu Arg Glu Leu Ala Glu Lys Leu  
20 25 30

Asn Ile Tyr Val Gly Phe Ala Ala Ile Asn Asn Phe Trp Ser Leu Ser  
35 40 45

Asp Ala Glu Lys Tyr Met Glu Val Ala Arg Arg Glu Phe Asn Ile Leu  
50 55 60

Thr Pro Glu Asn Gln Met Lys Trp Asp Thr Ile His Pro Glu Arg Asp  
65 70 75 80

Arg Tyr Asn Phe Thr Pro Ala Glu Lys His Val Glu Phe Ala Glu Glu  
85 90 95

Asn Asn Met Ile Val His Gly His Thr Leu Val Trp His Asn Gln Leu  
100 105 110

Pro Gly Trp Ile Thr Gly Arg Glu Trp Thr Lys Glu Glu Leu Leu Asn  
115 120 125

Val Leu Glu Asp His Ile Lys Thr Val Val Ser His Phe Lys Gly Arg  
130 135 140

Val Lys Ile Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Val Ser Asp Ser Gly Thr  
145 150 155 160

Tyr Arg Glu Ser Ile Trp Tyr Lys Thr Ile Gly Pro Glu Tyr Ile Glu  
165 170 175

Lys Ala Phe Arg Trp Ala Lys Glu Ala Asp Pro Asp Ala Ile Leu Ile  
180 185 190

Tyr Asn Asp Tyr Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala Lys Ser Asn Phe Val  
195 200 205

Tyr Asn Met Ile Lys Glu Leu Lys Glu Lys Gly Val Pro Val Asp Gly  
210 215 220

10

ES 2 781 498 T3

Ile Gly Phe Gln Met His Ile Asp Tyr Arg Gly Leu Asn Tyr Asp Ser  
 225 230 235 240

Phe Arg Arg Asn Leu Glu Arg Phe Ala Lys Leu Gly Leu Gln Ile Tyr  
 245 250 255

Ile Thr Glu Met Asp Val Arg Ile Pro Leu Ser Gly Ser Glu Glu Tyr  
 260 265 270

Tyr Leu Lys Lys Gln Ala Glu Val Cys Ala Lys Ile Phe Asp Ile Cys  
 275 280 285

Leu Asp Asn Pro Ala Val Lys Ala Ile Gln Phe Trp Gly Phe Thr Asp  
 290 295 300

Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu  
 305 310 315 320

Leu Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Tyr Ala Ile Lys  
 325 330 335

Glu Val Leu Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys  
 340 345

<210> 3  
 <211> 344  
 5 <212> PRT  
 <213> *Thermotoga naphthophila*

<220>  
 <221> MISC\_CHARACTERÍSTICA  
 10 <222> (1).. (344)  
 <223> Cepa RKU-10; GeneBank ADA66795.1

<220>  
 <221> SEÑAL  
 15 <222> (1).. (20)  
 <223> Péptido señal predicho

<400> 3  
 Met Lys Ile Leu Pro Ser Val Leu Ile Leu Leu Leu Gly Cys Val Pro  
 1 5 10 15

Val Phe Ser Ser Gln Asn Val Ser Leu Arg Glu Leu Ala Glu Lys Leu  
 20 25 30

Asn Ile Tyr Ile Gly Phe Ala Ala Val Asn Asn Phe Trp Ser Leu Pro  
 35 40 45

ES 2 781 498 T3

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

ES 2 781 498 T3

Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu  
305 310 315 320

Leu Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Tyr Ala Ile Lys  
325 330 335

Glu Val Leu Glu Lys Lys Arg Lys  
340

<210> 4

<211> 346

5 <212> PRT

<213> *Thermotoga napolitana*

<220>

<221> MISC\_CARACTERÍSTICA

10 <222> (1).. (346)

<223> GeneBank CAA90235.1

<220>

<221> SEÑAL

15 <222> (1).. (20)

<223> Péptido señal predicho

<400> 4

Met Lys Gly Leu Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ile Gly Cys Val Ser  
1 5 10 15

Ser Phe Gly Ser Gln Asp Val Pro Leu Arg Val Leu Ala Glu Lys Leu  
20 25 30

Asn Ile His Ile Gly Phe Ala Ala Gly Asn Asn Phe Trp Ser Leu Pro  
35 40 45

Asp Ala Glu Lys Tyr Met Glu Val Ala Lys Arg Glu Phe Asn Ile Leu  
50 55 60

Thr Pro Gly Asn Gln Met Lys Trp Asp Thr Ile His Pro Glu Arg Asn  
65 70 75 80

Arg Tyr Asn Phe Glu Pro Ala Glu Lys His Val Glu Phe Ala Leu Lys  
85 90 95

Asn Asp Met Ile Val His Gly His Thr Leu Val Trp His Asn Gln Leu  
100 105 110

20 Pro Gly Trp Leu Thr Gly Gln Glu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Leu Asn  
115 120 125

ES 2 781 498 T3

Ile Leu Glu Asp His Val Lys Thr Val Val Ser His Phe Arg Gly Arg  
 130 135 140

Val Lys Ile Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Val Ser Asp Ser Gly Thr  
 145 150 155 160

Tyr Arg Glu Ser Ile Trp Tyr Arg Thr Ile Gly Pro Glu Tyr Ile Glu  
 165 170 175

Lys Ala Leu Ile Trp Ala Lys Glu Ala Asp Pro Asp Ala Ile Leu Ile  
 180 185 190

Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile Glu Glu Ile Asn Ala Lys Ser Asn Phe Val  
 195 200 205

Tyr Asn Met Ile Lys Asn Leu Arg Glu Lys Gly Val Pro Ile Asp Gly  
 210 215 220

Ile Gly Phe Gln Met His Ile Asp Tyr Arg Gly Ile Asn Tyr Glu Ser  
 225 230 235 240

Phe Lys Lys Asn Leu Glu Arg Phe Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ile Tyr  
 245 250 255

Ile Thr Glu Met Asp Arg Gly Phe Pro Leu Gly Gly Ser Val Gly Tyr  
 260 265 270

Tyr Leu Lys Lys Gln Ala Glu Val Tyr Arg Arg Ile Phe Glu Ile Cys  
 275 280 285

Leu Asp Asn Pro Ala Val Arg Ala Ile Gln Phe Trp Gly Phe Thr Asp  
 290 295 300

Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu  
 305 310 315 320

Ile Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Phe Ala Ile Arg  
 325 330 335

Glu Leu Met Glu Glu Lys Leu Lys Glu Arg  
 340 345

<210> 5

<211> 346

5 <212> PRT

<213> *Thermotoga sp.* cepa FjSS3-B.1

<220>

10 <221> MISC\_CHARACTERÍSTICA

ES 2 781 498 T3

<222> (1).. (346)  
 <223> GeneBank AAA90913.1

<220>  
 <221> SEÑAL  
 <222> (1).. (20)  
 <223> Péptido señal predicho

<400> 5

10

```

Met Lys Gly Leu Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ile Gly Cys Val Ser
1          5          10          15

Ser Phe Gly Ser Gln Asp Val Pro Leu Arg Val Leu Ala Glu Lys Leu
20          25          30

Asn Ile His Ile Gly Phe Ala Ala Gly Asn Asn Phe Trp Ser Leu Pro
35          40          45

Asp Ala Glu Lys Tyr Met Glu Val Ala Lys Arg Glu Phe Asn Ile Leu
50          55          60

Thr Pro Glu Asn Gln Met Lys Trp Asp Thr Ile His Pro Glu Arg Asn
65          70          75          80

Arg Tyr Asn Phe Glu Pro Ala Glu Lys His Val Glu Phe Ala Leu Lys
85          90          95

Asn Asp Met Ile Val His Gly His Thr Leu Val Trp His Asn Gln Leu
100         105         110

Pro Gly Trp Leu Thr Gly Gln Glu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Leu Asn
115        120        125

Ile Leu Glu Asp His Val Lys Thr Val Val Ser His Phe Arg Gly Arg
130        135        140

Val Lys Ile Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Val Ser Asp Ser Gly Thr
145        150        155        160

Tyr Arg Glu Ser Ile Trp Tyr Lys Thr Ile Gly Pro Glu Tyr Ile Glu
165        170        175

Lys Ala Phe Ile Trp Ala Arg Glu Ala Asp Pro Asp Ala Val Leu Ile
180        185        190

Tyr Asn Asp Tyr Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala Lys Ser Asn Phe Val
195        200        205
  
```

ES 2 781 498 T3

Tyr Asn Met Ile Lys Asn Leu Lys Glu Lys Gly Val Pro Ile Asp Gly  
 210 215 220

Ile Gly Phe Gln Met His Ile Asp Tyr Arg Gly Leu Asn Tyr Glu Ser  
 225 230 235 240

Phe Lys Lys Asn Leu Glu Arg Phe Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ile Tyr  
 245 250 255

Ile Thr Glu Met Asp Val Arg Ile Pro Leu Gly Gly Ser Glu Glu Tyr  
 260 265 270

Tyr Leu Lys Lys Gln Ala Glu Val Tyr Arg Arg Ile Phe Glu Ile Cys  
 275 280 285

Leu Asp Asn Pro Ala Val Arg Ala Ile Gln Phe Trp Gly Phe Thr Asp  
 290 295 300

Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu  
 305 310 315 320

Ile Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Phe Ala Ile Arg  
 325 330 335

Glu Leu Met Glu Glu Lys Leu Lys Glu Arg  
 340 345

**REIVINDICACIONES**

1. Pienso para animales que se selecciona del grupo que consiste en ensilado, pienso granulado y pienso en harina, estando dicho pienso para animales suplementado con una composición que comprende una xilanasa, en el que dicha xilanasa es hipertermófila e hipertermoestable, en el que la temperatura óptima de la actividad xilanolítica presente en dicha composición es superior a 80°C, en el que más del 70% de la actividad xilanolítica presente en dicha composición es resistente a 30 minutos de calentamiento a 90°C y en el que la razón de actividad de la actividad xilanolítica presente en dicha composición a temperatura óptima y a 40°C es superior a 10.
2. Pienso para animales según la reivindicación 1, en el que la temperatura óptima de la actividad xilanolítica presente en dicha composición es superior a 85°C, preferiblemente superior a 90°C.
3. Pienso para animales según la reivindicación 1 o 2, en el que la razón de actividad de la actividad xilanolítica presente en dicha composición a temperatura óptima y a 40°C es superior a 20.
4. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la xilanasa hipertermófila e hipertermoestable tiene más del 80% de identidad y/o el 95% de similitud con una xilanasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.Q.NO:4, SEQ.ID.NO:5, aminoácidos 21-332 de SEQ.ID.NO:1, de SEQ.ID.NO:2, de SEQ.ID.NO:3, de SEQ.ID.NO:4 y de SEQ.ID.NO:5.
5. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la xilanasa hipertermófila e hipertermoestable tiene más del 99% de identidad con una xilanasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.ID.NO:4, SEQ.ID.NO:5, aminoácidos 21-332 de SEQ. ID.NO:1, de SEQ.ID.NO:2, de SEQ.ID.NO:3, de SEQ.ID.NO:4 y de SEQ.ID.NO:5.
6. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende entre 0,08 y 40 mg/kg de dicha xilanasa hipertermófila e hipertermoestable.
7. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos el 50% (en peso seco) de material vegetal.
8. Pienso para animales según la reivindicación 7, en el que el material vegetal se selecciona del grupo que consiste en cereales, legumbres, melaza de remolacha, pulpa de patata y harina de cacahuete.
9. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos el 5% (en peso seco) de proteínas y/o al menos el 2% (en peso seco) de grasa.
10. Uso de una xilanasa hipertermófila e hipertermoestable para mejorar el aumento de peso corporal y/o el índice de transformación del alimento en un animal, en el que dicha xilanasa hipertermófila e hipertermoestable tiene un óptimo de temperatura superior a 80°C, en el que más del 70% de la actividad xilanolítica de dicha xilanasa hipertermófila e hipertermoestable es resistente a 30 minutos de calentamiento a 90°C y en el que la razón de actividad a temperatura óptima y a 40°C de dicha xilanasa hipertermófila e hipertermoestable es superior a 10, en el que el uso es un uso no terapéutico.
11. Uso del pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9 para mejorar el aumento de peso corporal y/o el índice de transformación del alimento en un animal, en el que el uso es un uso no terapéutico.
12. Uso de una xilanasa hipertermófila e hipertermoestable o un pienso para animales según la reivindicación 10 u 11, en el que el animal es un vertebrado no rumiante, o un crustáceo y es preferiblemente un pez, un cerdo o un ave de corral, más preferiblemente cerdo o ave de corral.
13. Método para producir el pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9, que comprende las etapas de
  - a) seleccionar un pienso que comprende hemicelulosa;
  - b) añadir una composición que comprende xilanasa hipertermófila e hipertermoestable, en el que más del 70% de la actividad xilanolítica presente en dicha composición es resistente a 30 minutos de calentamiento de dicha composición a 90°C, en el que la temperatura óptima de la actividad xilanolítica presente en dicha composición es superior a 80°C, y en el que la razón de actividad de la actividad xilanolítica presente en dicha composición a temperatura óptima y a 40°C es superior a 10.
14. Método según la reivindicación 13, en el que la actividad xilanasa presente en dicha composición se mide

usando xilano al 3% (p:v), preferiblemente usando xilano de madera de abedul al 3%, como sustrato.

15. Método según la reivindicación 13 o 14, en el que se mide la actividad xilanasa presente en dicha composición después de una reacción de 15 minutos.

5

# ES 2 781 498 T3

MKILPSVLILLGCVPFSSQNVSLRELAEKLNYIGFAAINNFWSLSDAEK<sup>Y</sup>MEVARREFN<sup>I</sup>LTPENQMK  
WDTIHPERDRYNFTPAEKHVEFAEENDMIVHGHTLVWHNQLPGWITGREWTKEELLN<sup>V</sup>LEDHIKT<sup>V</sup>VSHFK  
GRVKIWDVVNEAVSDSGTYRESVWYKTIGPEYIEKAFRWAKEADPDAILIYNDYSIEEINAKSNFVYNMIK  
ELKEKGV<sup>P</sup>VDGIGFQM<sup>H</sup>IDYRGLNYDSFRNLERFAKLGLQIYITEMDVRIPLSGSEEY<sup>L</sup>LKKQAEVCAKI  
FDICLDNPAVKAIQFWGFTDKYSWVPGFFKGYGKALLFDENYNPKPCYYAIKEVLEKKIEERK

FIGURA 1

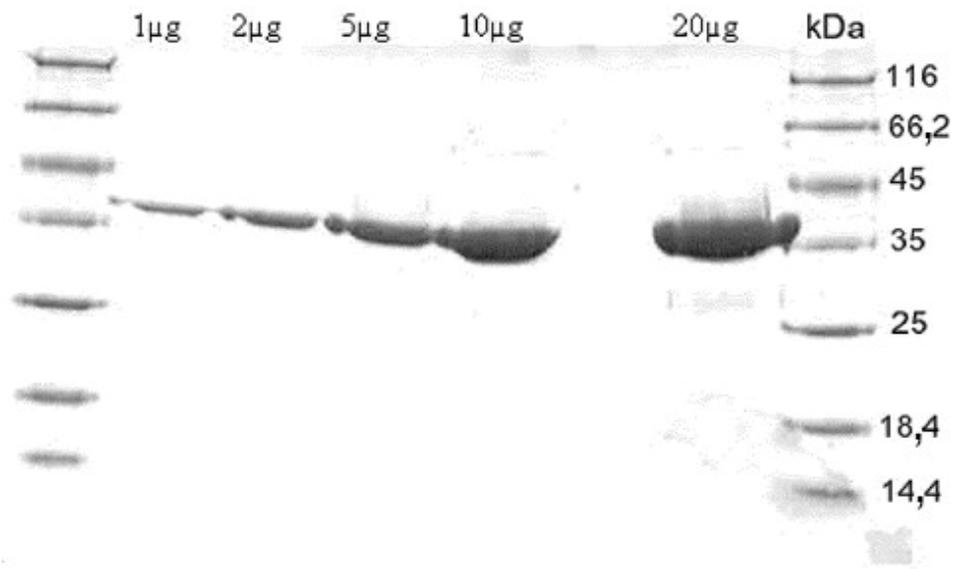


Figura 2a

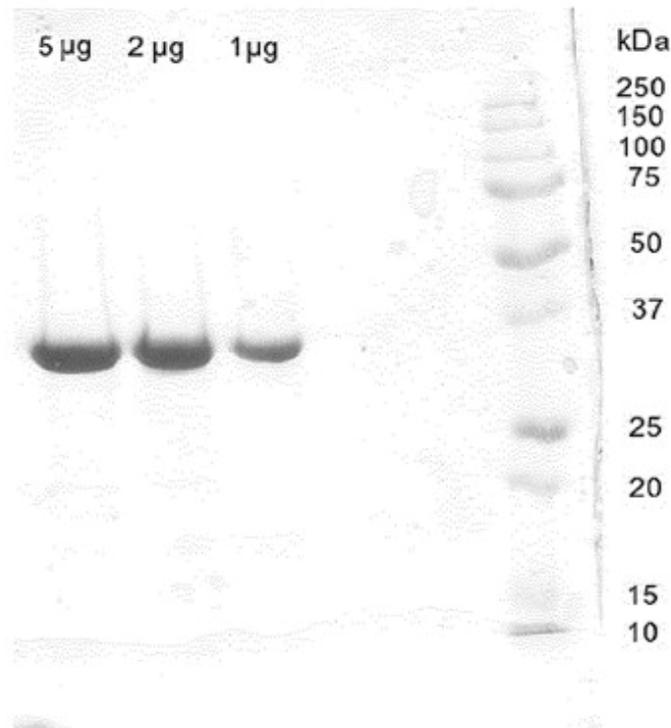


Figura 2b

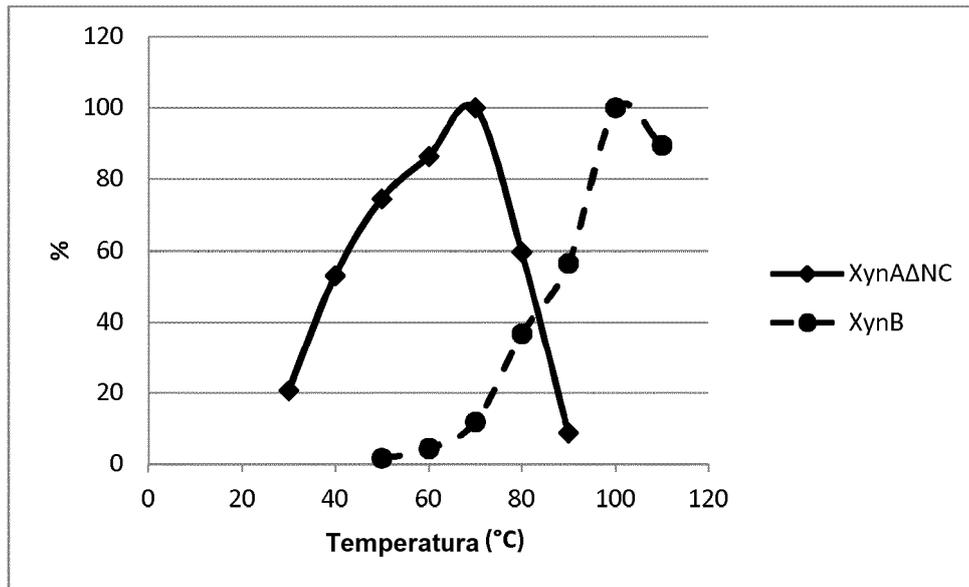


Figura 3

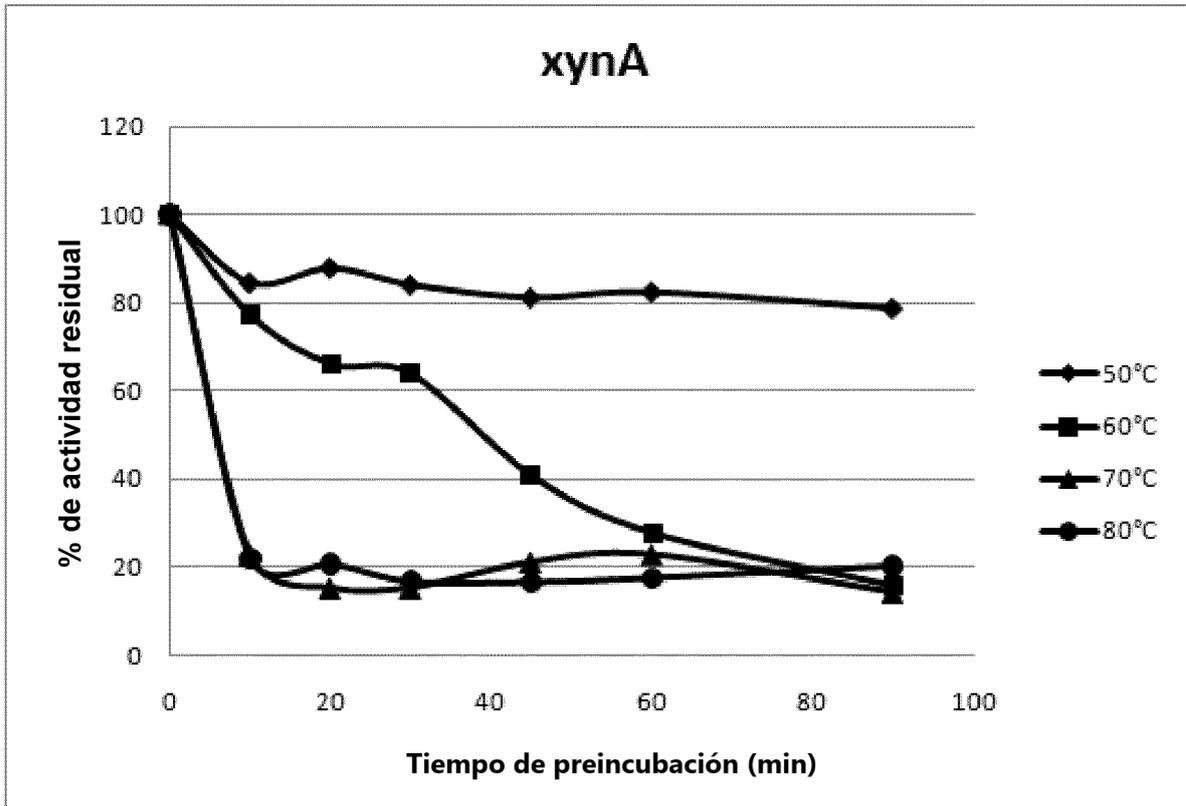


Figura 4a

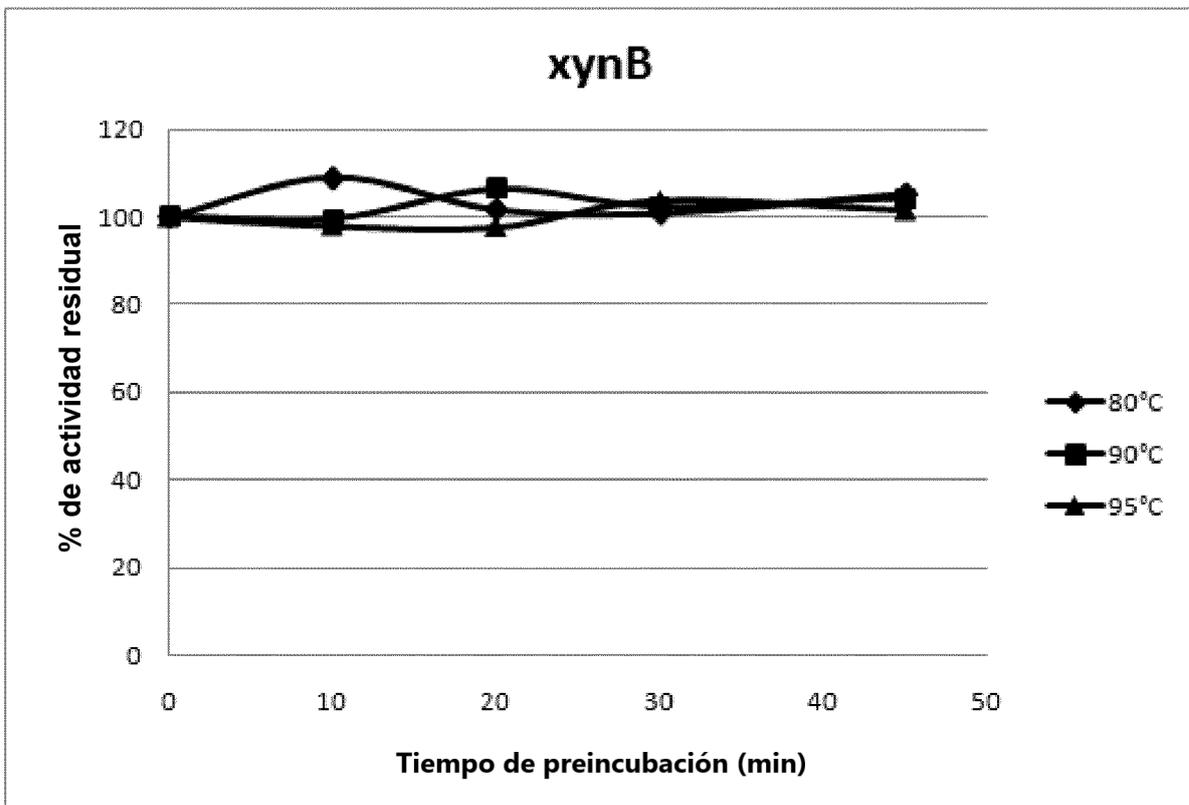


Figura 4b