

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 983**

51 Int. Cl.:

A23K 10/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2018** **PCT/EP2018/073529**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2019** **WO19043191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2018** **E 18759968 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024** **EP 3675647**

54 Título: **Aditivos para pienso para animales que comprenden un polipéptido que tiene actividad proteasa y usos de los mismos**

30 Prioridad:

01.09.2017 EP 17189061

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

15.01.2025

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.00%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**HAAHR, LAERKE TVEDEBRINK;
HOFF, TINE y
OESTERGAARD, PETER RAHBEK**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 993 983 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

Aditivos para pienso para animales que comprenden un polipéptido que tiene actividad proteasa y usos de los mismos

Referencia a un Listado de secuencias

- 5 La presente solicitud contiene un Listado de secuencias en un soporte de lectura informático, que se incorpora a la presente por referencia.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere a pienso para animales o aditivos para pienso para animales que comprenden polipéptidos que tienen actividad proteasa y usos de estos. También se refiere a los métodos para producir las proteasas y para usar las proteasas para mejorar el rendimiento del animal y el valor nutricional de un pienso para animales.

Antecedentes de la invención

- 15 En el uso de proteasas en pienso para animales (in vivo) y/o el uso de dichas proteasas para tratar proteínas vegetales (in vitro), se observa que las proteínas son factores nutricionales esenciales para los animales y los seres humanos. La mayor parte del ganado y muchos seres humanos obtienen las proteínas necesarias a partir de fuentes de proteínas vegetales. Son fuentes de proteínas vegetales importantes, por ejemplo, los cultivos de colza, legumbres y cereales.

- 20 Cuando se incluye una fuente de proteínas, tal como harina de soja, en el pienso para animales monogástricos, tales como cerdos y aves de corral, una proporción significativa de la harina de soja no se digiere de forma eficiente (la digestibilidad ileal aparente del nitrógeno en los lechones, cerdos de engorde y aves de corral, tales como pollos de engorde, gallinas ponedoras y gallos, es de tan solo aproximadamente del 80 %). Al mejorar la digestibilidad de las proteínas, el animal puede captar más de la proteína, mejorando de esta manera su rendimiento, tal como con una mayor ganancia de peso corporal.

- 25 El tubo gastrointestinal de los animales consiste en una serie de segmentos, cada uno de los cuales representa entornos de pH diferente. En los animales monogástricos, tales como cerdos y aves de corral y muchos tipos de peces, el estómago es sumamente ácido con un pH potencialmente de tan solo 2-3, mientras que el intestino tiene un pH más neutro de aproximadamente 6-7,5. Además del estómago y el intestino, las aves de corral también tienen un buche que precede al estómago. El pH en el buche está determinado principalmente por el pienso ingerido y, por tanto, normalmente se encuentra en el intervalo de pH 4-6. La digestión de proteínas por una proteasa puede tener lugar a lo largo de todo el tubo digestivo, siempre que la proteasa sea activa y sobreviva en las condiciones del tubo digestivo. Por lo tanto, las proteasas que son estables a pH muy ácido que pueden sobrevivir en el entorno gástrico y al mismo tiempo ser activas de un modo eficiente en el intervalo amplio del pH fisiológico del tubo digestivo del animal diana son especialmente deseables.

- 35 Una manera de determinar si una proteasa puede mejorar la captación de las proteínas es investigando si la digestibilidad del nitrógeno ileal mejora cuando se añade la proteasa a la dieta del animal. La realización de ensayos in vivo puede confirmar tanto la estabilidad gástrica de la proteasa como la efectividad de la proteasa en degradar la proteína. Es un objetivo de la presente invención proporcionar proteasas que muestren un aumento de la mejora del rendimiento de crecimiento, tal como por una digestibilidad ileal aparente del nitrógeno.

- 40 El documento de patente WO 2015/014790 describe variantes de proteasa de una proteasa aislada de *Bacillus* sp. El documento de patente DE 10 2007 036756 describe variantes de proteasa de una proteasa. Los documentos de patente WO 2015/197871 y WO 2016/071302 describen proteasas para su uso en un pienso para animales.

Sumario de la invención

- 45 La invención se refiere a un aditivo para pienso para animales que comprende uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, en donde el polipéptido es una proteasa S8 seleccionada a partir del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 1;

- 50 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 2;

- [illegible]

8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

5 (q) una variante de la SEQ ID NO: 9, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más deleciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

(r) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) o (i) y una etiqueta de His y/o etiqueta HQ en el extremo N y/o extremo C;

10 (s) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) o (i) y una extensión del extremo N y/o el extremo C de hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos; y

(t) un fragmento del polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) o (i) que tiene actividad proteasa y que tiene al menos un 90 % de la longitud del polipéptido maduro.

15 La invención se refiere además a un pienso para animales y a una formulación líquida que comprenden el aditivo para pienso para animales; métodos para mejorar no terapéuticamente uno o más parámetros de rendimiento de un animal; métodos para preparar un pienso para animales; métodos para el tratamiento de proteínas, en donde dicho tratamiento es para ejercer una influencia hidrolizante sobre las proteínas; métodos para aumentar la digestibilidad y/o solubilidad de proteínas y métodos para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales usando el aditivo para pienso para animales y usos de estos. La presente invención se refiere además a métodos para producir un polipéptido de la invención en una célula hospedadora de *Bacillus* recombinante.

20 La invención se refiere además a un uso del aditivo para pienso para animales de la invención o la formulación líquida en la preparación de una composición para uso en pienso para animales; para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales; para incrementar la proteína digerible y/o soluble en pienso para animales; para incrementar el grado de hidrólisis de proteínas en dietas para animales; para mejorar no terapéuticamente uno o más parámetros de rendimiento en un animal; y/o para el tratamiento de proteínas, en donde dicho tratamiento es para ejercer una
25 influencia hidrolizante sobre las proteínas.

Resumen del Listado de secuencias

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S8 madura de *Bacillus horneckiae*.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S8 madura de *Bacillus* sp. TY145.

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de una proteasa S8 variante de *Bacillus* sp. TY145.

30 La SEQ ID NO: 4 es el motivo conservado TGXK[V/T][I/V]X[N/S]MSLG.

La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S8 madura de *Bacillus* sp. 13380 (también divulgada en el documento de patente WO2017064253) y tiene una identidad de aproximadamente un 78 % respecto a la SEQ ID NO: 1.

35 La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S8 madura de *Bacillus idriensis* (también divulgada en el documento de patente WO2015091989) y tiene una identidad de aproximadamente un 80 % respecto a la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S8 madura de *Bacillus* sp. 13380 (también divulgada en el documento de patente WO2015091989) y tiene una identidad de un 89 % respecto a la SEQ ID NO: 1.

40 La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S8 madura de *Bacillus* sp. 62451 (también divulgada en el documento de patente WO2015091989) y tiene una identidad de un 90 % respecto a la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S8 madura de *Bacillus oceanisediminis* y tiene una identidad de un 87 % respecto a la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 10 La secuencia de ADN que codifica las proteasas S8 de *Bacillus oceanisediminis*.

Definiciones

45 Actividad del polipéptido en harina de soja-maíz: La expresión "actividad del polipéptido en harina de soja-maíz" significa que la actividad proteasa de la enzima se determinó en harina de soja-harina de maíz mezcladas en una proporción de 30:70 usando el ensayo de o-ftaldialdehído (OPA) tal como se describe en el presente documento. Son ejemplos de valores de pH de ensayo pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 y 7,0. Son ejemplos de las temperaturas de ensayo 30, 35, 40, 45 y 50 °C. Son ejemplos de tiempos de ensayo 2, 3 y 4 horas. Son ejemplos de concentraciones enzimáticas 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mg de proteína enzimática/kg de materia seca de sustrato.
50

En una realización preferida, la actividad del polipéptido en harina de soja-maíz se determinó añadiendo harina de soja-harina de maíz mezcladas en una proporción de 30:70 (2 g) a tampones que contienen ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CAPS 100 mM, CaCl₂ 12,5 mM, KCl 150 mM, 0,01 % de Triton X-100 (10 ml) que se habían preparado y ajustado usando HCl o NaOH hasta un valor de pH tal que después de haber mezclado el sustrato de harina de soja-maíz con tampón de ensayo, el pH final de la suspensión espesa era pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 o 7,0; a continuación, mezclando una alícuota de la suspensión espesa de sustrato (2 ml) durante 30 min a 40 °C; añadiendo proteasa (200 mg de proteína enzimática/kg de sustrato) disuelta en 100 µl de tampón de acetato de sodio 100 mM (9,565 g/l de NaOAc, 1,75 g/l de ácido acético, CaCl₂ 5 mM, 0,01 % de BSA, 0,01 % de Tween20, pH 6,0); incubando las muestras durante 3 horas a 40 °C (agitación magnética); centrifugando las muestras (10 min, 4000 rpm, 0 °C); y recogiendo los sobrenadantes para el análisis usando el ensayo de o-ftaldialdehído (OPA) (denominado en la presente "ensayo de harina de soja-maíz"). En otra realización preferida, la actividad del polipéptido en harina de soja-maíz se determina tal como se describe en el ejemplo 4 en el presente documento.

En una realización, los polipéptidos de la presente invención tienen al menos un 50 %, por ejemplo, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 100 % de la actividad en harina de soja-maíz a pH 4 del polipéptido de la SEQ ID NO: 1.

Variante alélica: La expresión "variante alélica" se refiere a dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica aparece de manera natural debido a una mutación y puede generar polimorfismo en las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

Animal: La expresión "pienso para animales" se refiere a todos los animales excepto los seres humanos. Son ejemplos de animales los rumiantes y los no rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras, ganado, por ejemplo, ganado vacuno, vacas y terneros jóvenes, ciervos, yaks, camellos, llamas y canguros. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo, cerdos o puercos (incluidos, sin carácter limitante, lechones, cerdos de engorde y cerdas); aves de corral, tales como pavos, patos y pollos (incluidos, sin carácter limitante, pollos de engorde, ponedoras); caballos (incluidos, sin carácter limitante, caballos de carreras, caballos de trabajo y caballos de competiciones), terneros jóvenes; peces (incluidos, sin carácter limitante, serviolas, paiche, barbo, lubina, anjova, bocachico, besugo, siluro, cachama, carpa, pez gato, catla, chanos, char, cíclidos, cobia, bacalao, Pomoxis, Sparatus aurata, corvina, anguila, gobio, carpa dorada, gurami, mero, guapote, halibut, java, Labeo, lai, locha, caballa, sabalote, mojarra, Neochanna, mujol, paco, Etropus suratensis, pejerrey, perca, lucio, jurel, rutilo, salmón, vundu, Sander canadensis, róbalo, dorada, Notropis, peces de la familia Eleotridae, pez cabeza de serpiente, pargo, Centropomus undecimalis, lenguado, sigano, esturión, pez luna, ayu, tenca, terror, tilapia, trucha, atún, rodaballo, corégono blanco, Sander vitreus y pez blanco); y crustáceos (incluidos, sin carácter limitante, camarones y langostinos).

Pienso para animales: La expresión "pienso para animales" se refiere a cualquier compuesto, preparado, o mezcla adecuados para la ingesta por parte de un animal o destinados a esta. El pienso para animales para un animal monogástrico comprende normalmente concentrados, así como también vitaminas, minerales, enzimas, agentes microbianos para la administración directa, aminoácidos y/u otros ingredientes para pienso (tal como en una premezcla), mientras que el pienso para rumiantes comprende generalmente forraje (incluidos el forraje rico en material indigerible y ensilado) y puede comprender además concentrados, así como también vitaminas, minerales, enzimas agentes microbianos para la administración directa, aminoácidos y/u otros ingredientes para pienso (tales como en una premezcla).

Aumento del peso corporal: La expresión "aumento del peso corporal" significa un aumento en el peso vivo de un animal durante un período de tiempo dado, por ejemplo, el aumento de peso desde el día 1 hasta el día 21.

ADNc: El término "ADNc" se refiere a una molécula de ADN que se puede preparar mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm maduro, cortado y empalmado, obtenido de una célula eucariota o procariota. El ADNc carece de secuencias intrónicas que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de etapas, que incluyen el corte y empalme, antes de aparecer como un ARNm maduro cortado y empalmado.

Secuencia codificante: La expresión "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente mediante un marco de lectura abierta que comienza con un codón de iniciación tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de estos.

Composición: El término "composición" se refiere a una composición que comprende un portador y al menos una enzima de la presente invención. Las composiciones descritas en el presente documento pueden mezclarse con un pienso para animales y denominarse "pienso molido".

Concentrados: El término "concentrados" significa pienso con altas concentraciones de proteína y energía, tales como harina de pescado, melazas, oligosacáridos, sorgo, semillas y granos (ya sea enteros o preparados mediante trituración, molienda, etc. a partir de, por ejemplo, maíz, avena, centeno, cebada, trigo), torta prensada de semillas oleaginosas (por ejemplo, de semillas de algodón, cártamo, girasol, soja, colza/canola, cacahuete o maní), torta de palmiste, material derivado de levaduras y granos de destilería (tales como granos de destilería húmedos (WDS) y granos de destilería secos con solubles (DDGS)).

Secuencias de control: La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención. Cada una de las secuencias de control puede ser nativa (es decir, proceder del mismo gen) o exógena (es decir, proceder de un gen diferente) respecto al polinucleótido que codifica el polipéptido, o nativas o exógenas entre sí. Las secuencias de control de este tipo incluyen, sin carácter limitante, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, un promotor, una secuencia de un péptido señalizador y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores a fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

Factor de eficacia de producción europeo (EPEF): La expresión "factor de eficacia de producción europeo" es una expresión que determina la eficiencia de producción y tiene en cuenta la conversión del pienso, la mortalidad y la ganancia diaria. El EEF se calcula como $[(\text{tasa de supervivencia (\%)} \times \text{ganancia de peso corporal (kg)}) / (\text{duración del estudio en días} \times \text{FCR})] \times 100$.

Expresión: El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de un polipéptido incluidas, sin carácter limitante, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

Vector de expresión: La expresión "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está unida operativamente a secuencias de control que hacen posible su expresión.

Tasa de conversión del pienso: La expresión "tasa de conversión del pienso" es la cantidad de pienso con el que se alimenta a un animal para incrementar el peso del animal en una cantidad especificada. Una tasa de conversión del pienso mejorada significa una menor tasa de conversión del pienso. Con "menor tasa de conversión del pienso" o "tasa de conversión del pienso mejorada" se quiere decir que el uso de una composición de aditivo para pienso en el pienso da como resultado que se requiera una menor cantidad de pienso para alimentar a un animal con el fin de incrementar el peso del animal en una cantidad especificada en comparación con la cantidad de pienso requerida para incrementar el peso del animal en la misma cantidad cuando el pienso no comprende dicha composición de aditivo para pienso.

Eficiencia del pienso: La expresión "eficiencia del pienso" se refiere a la cantidad de ganancia de peso por unidad de pienso cuando el animal se alimenta a voluntad o con una cantidad especificada de alimento durante un periodo de tiempo. Con "aumento de la eficiencia del pienso" se quiere decir que el uso de una composición de aditivo para pienso según la presente invención en pienso da como resultado un incremento de la ganancia de peso por unidad de ingesta de pienso en comparación con un animal alimentado sin que dicha composición de aditivo para pienso esté presente.

Forraje: El término "forraje" tal como se define en el presente documento también incluye el forraje rico en material indigerible. El forraje es material vegetal reciente tal como heno y ensilado de plantas de forraje, hierba y otras plantas de forraje, algas, legumbres y granos germinados, o cualquier combinación de estos. Son ejemplos de plantas de forraje la alfalfa, loto corniculado, Brassica (por ejemplo, col rizada, colza (canola), colinabo (nabo sueco), nabo), trébol (por ejemplo, Trifolium hybridum, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco), hierba (por ejemplo, grama común, Bromus, Arrhenatherum elatius, Festuca, Danthonia decumbens, Poa, Dactylis glomerata, Lolium, Phleum pratense), maíz, mijo, cebada, avena, centeno, sorgo, soja y trigo y verduras tales como remolachas. El forraje incluye además residuos de cultivo de la producción de grano (tal como rastrojo de maíz; paja de trigo, cebada, avena, centeno y otros granos); residuos de hortalizas como las coronas de la remolacha; residuos de la producción de semillas oleaginosas como tallos y hojas de soja, colza y otras legumbres; y fracciones del refinado de granos para consumo humano o animal, o de la producción de combustibles u otras industrias.

Fragmento: El término "fragmento" se refiere a un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del extremo amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad proteasa.

En un aspecto, el fragmento comprende al menos un 90 % de la longitud del polipéptido maduro, tal como al menos 283 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, al menos 279 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o al menos 279 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, el fragmento comprende al menos un 92 % de la longitud del polipéptido maduro, tal como al menos 290 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, al menos 286 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o al menos 286 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

5 En un aspecto, el fragmento comprende al menos un 94 % de la longitud del polipéptido maduro, tal como al menos 295 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, al menos 292 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o al menos 292 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, el fragmento comprende al menos un 96 % de la longitud del polipéptido maduro, tal como al menos 301 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, al menos 298 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o al menos 298 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

10 En un aspecto, el fragmento comprende al menos un 98 % de la longitud del polipéptido maduro, tal como al menos 308 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, al menos 304 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o al menos 304 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

15 En un aspecto, el fragmento comprende al menos un 99 % de la longitud del polipéptido maduro, tal como al menos 311 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, al menos 307 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o al menos 307 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

20 Célula hospedadora: La expresión "célula hospedadora" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción o similares con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. La expresión "célula hospedadora" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

25 Digestibilidad ileal aparente del nitrógeno: La expresión "digestibilidad ileal aparente el nitrógeno" (o AIDN) es la diferencia porcentual en la concentración de nitrógeno entre el material que se está digiriendo en el íleon y el pienso, cuando se tiene en cuenta la desaparición aparente de materia seca al final del intestino delgado (íleon). Se usa la AIDN como una estimación de la digestibilidad de proteína cruda del intestino delgado, sin tener en cuenta la liberación proteica endógena del intestino delgado. Esto significa que la digestibilidad real de la proteína cruda es siempre mayor cuando se compara con la AIDN. Por lo general, un aumento de la AIDN se correlaciona con un aumento de la absorción de aminoácidos en el intestino delgado y es un marcador de la mejora del rendimiento en animales. La digestibilidad ileal aparente del nitrógeno (AIDN) se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\text{AIDN (\%)} = 100 - [(\text{CMf/CMe}) \times (\text{CNe/CNf})] \times 100;$$

30 en donde

CMf = concentración del marcador en el pienso; CMe = concentración del marcador en el material que se está digiriendo en el íleon;

CNf = concentración de nutrientes en el pienso; CNe = concentración de nutrientes en el material que se está digiriendo en el íleon.

35 La expresión "mejora la digestibilidad ileal del nitrógeno en al menos un x % (por ejemplo, 4 %) en comparación con un control negativo" significa que si la digestibilidad ileal aparente del nitrógeno porcentual para el control negativo (es decir, el mismo pienso pero sin añadir una proteasa a la dieta) es y % (por ejemplo, 75 %), entonces la digestibilidad ileal aparente del nitrógeno porcentual para el grupo con la proteasa es de al menos y % + x % (así pues, en este ejemplo >79 %).

40 Aislado: El término "aislado" significa una sustancia en una forma o entorno que no se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos no limitantes de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no tenga un origen natural, (2) cualquier sustancia, incluidos, sin carácter limitante, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se haya separado, al menos en parte, de uno o más o de todos los constituyentes de origen natural con los que está asociado en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por el hombre con respecto a la sustancia que se encuentra en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada incrementando la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los que está asociada de manera natural (por ejemplo, producción recombinante en una célula hospedadora; copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; y uso de un promotor más potente que el promotor asociado de manera natural con el gen que codifica la sustancia).

50 Polipéptido maduro: La expresión "polipéptido maduro" se refiere a un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualesquiera modificaciones postraduccionales, tales como procesamiento del extremo N, truncamiento del extremo C, glucosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro está constituido por los aminoácidos 1 a 314 de la SEQ ID NO: 1 que se basa en los datos de secuenciación de EDMAN del extremo N y datos de EM intactos. En un aspecto, el polipéptido maduro está constituido por los aminoácidos 1 a 311 de la SEQ ID NO: 2 que se basa en los datos de secuenciación de EDMAN del extremo N y datos de EM intactos. En un aspecto, el polipéptido

maduro está constituido por los aminoácidos 1 a 311 de la SEQ ID NO: 3 que se basa en los datos de secuenciación de EDMAN del extremo N y datos de EM intactos.

Existe constancia en la técnica de que una célula hospedadora puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es, con un aminoácido del extremo C y/o del extremo N diferente) expresados por el mismo polinucleótido. Se tiene constancia también en la técnica de que diferentes células hospedadoras procesan los polipéptidos de manera diferente y, por tanto, una célula hospedadora que exprese un polinucleótido puede producir un polipéptido maduro diferente (por ejemplo, que tenga un aminoácido del extremo C y/o del extremo N diferente) en comparación con otra célula hospedadora que exprese el mismo polinucleótido.

Construcción de ácido nucleico: La expresión "construcción de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ya sea mono- o bicatenario, que se aísla a partir de un gen de origen natural o se modifica para que contenga segmentos de ácidos nucleicos de tal forma que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

Obtenido o que se puede obtener a partir de: La expresión "obtenido o que se puede obtener a partir de" significa que el polipéptido puede encontrarse en un organismo de un rango taxonómico específico. En una realización, el polipéptido se obtiene o se puede obtener del orden Bacillales en donde el término orden es el rango taxonómico. En otra realización preferida, el polipéptido se obtiene o se puede obtener de la familia Bacillaceae, Planococcaceae o Paenibacillaceae, en donde el término familia es el rango taxonómico. En otra realización preferida, el polipéptido se obtiene o se puede obtener del género Bacillus, en donde el término género es el rango taxonómico.

Si el rango taxonómico de un polipéptido no se conoce, puede ser determinado fácilmente por un experto en la materia realizando una búsqueda mediante BLASTP del polipéptido (usando, por ejemplo, la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y comparándolo con los homólogos más cercanos. Un polipéptido desconocido que es un fragmento de un polipéptido conocido se considera que es de la misma especie taxonómica. Un polipéptido natural desconocido o variante artificial que comprende una sustitución, delección y/o inserción en hasta 10 posiciones se considera que es de la misma especie taxonómica que el polipéptido conocido.

Unido operativamente: La expresión "unido operativamente" se refiere a una configuración en la que se coloca una secuencia de control en una posición adecuada con respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de modo que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante.

Microgránulo: Los términos "microgránulo" y/o "microgranulación" se refieren a comprimidos o microgránulos sólidos redondeados, esféricos y/o cilíndricos y a los procesos para formar dichas formas sólidas, particularmente microgránulos de pienso y pienso para animales extruido sólido. Tal como se usan en el presente documento, los términos "extrusión" o "extruir" son términos muy conocidos en la técnica y se refieren a un proceso para forzar el paso de una composición, tal como se describe en el presente documento, a través de un orificio a presión.

Parámetros de rendimiento: La expresión "parámetros de rendimiento" se refiere a uno o más de los términos seleccionados a partir de la lista constituida por aumento del peso corporal, factor de eficiencia de producción europeo (EPEF), factor de eficacia de producción europeo (EFF) y FCR. La expresión "mejorar uno o más parámetros de rendimiento" significa que existe un incremento en la ganancia de peso corporal, un incremento en el factor de eficiencia de producción europeo (EPEF), un incremento en el factor de eficacia de producción europeo (EFF) y/o un descenso en la FCR en uno o más animales.

Proteasa: El término "proteasa" se define en el presente documento como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Incluye cualquier enzima que pertenezca al grupo de enzimas EC 3.4 (incluida cada una de las trece subclases de este, en wikipedia.org/wiki/Category:EC_3.4). El número de EC se refiere a la Nomenclatura de Enzimas 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluidos los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 223: 1-5 (1994); Eur. J. Biochem. 232: 1-6 (1995); Eur. J. Biochem. 237: 1-5 (1996); Eur. J. Biochem. 250: 1-6 (1997); y Eur. J. Biochem. 264: 610-650 (1999); respectivamente. El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de proteasas de serina de acuerdo con Siezen et al., 1991, Protein Engng. 4: 719-737 y Siezen et al., 1997, Protein Science 6: 501-523. Las proteasas de serina o peptidasas de serina son un subgrupo de proteasas caracterizado por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Además, las subtilasas (y las proteasas de serina) se caracterizan por tener dos restos aminoácidos en el sitio activo aparte de la serina, concretamente, un residuo de histidina y de ácido aspártico. Las subtilasas se pueden dividir en 6 subdivisiones, es decir, la familia Subtilisina, la familia Termitasa, la familia Proteinasa K, la familia Lantibiótico peptidasa, la familia Kexina y la familia Pirolisina.

Actividad proteasa: La expresión "actividad proteasa" se refiere a la actividad proteolítica (EC 3.4). Los polipéptidos que tienen actividad proteasa, o las proteasas, también se denominan a veces peptidasas, proteinasas, péptido-hidrolasas o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser del tipo exo, que hidrolizan péptidos empezando en cualquiera de sus extremos, o bien del tipo endo, que actúan internamente en las cadenas polipeptídicas (endopeptidasas). Las endopeptidasas presentan actividad en sustratos peptídicos bloqueados en los extremos N y C que son relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión.

Existen varios tipos de actividad proteasa, tales como proteasas de tipo tripsina que escinden en el lado carboxiterminal de los restos de Arg y Lys y proteasas de tipo quimotripsina que escinden en el lado carboxiterminal de restos de aminoácidos hidrófobos. Las proteasas de la invención son endopeptidasas de serina (EC 3.4.21) con un óptimo de pH ligeramente alcalino (pH óptimo de 8-9,5).

5 La actividad proteasa se puede medir usando cualquier ensayo, en el que se emplee un sustrato, que incluya enlaces peptídicos relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El pH del ensayo y la temperatura del ensayo también se tienen que adaptar a la proteasa en cuestión. Son ejemplos de los valores de pH del ensayo un pH de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. Son ejemplos de temperaturas del ensayo 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 o 95 °C. Son ejemplos de sustratos de proteasa generales la caseína, albúmina de suero bovina y hemoglobina. En el método clásico de Anson y Mirsky, se usa como sustrato la hemoglobina desnaturalizada y después de la incubación del ensayo con la proteasa en cuestión, se determina la cantidad de hemoglobina soluble en ácido tricloroacético como una medida de la actividad proteasa (Anson y Mirsky, 1932, J. Gen. Physiol. 16: 59 y Anson, 1938, J. Gen. Physiol. 22: 79).

15 A efectos de la presente invención, se determinó la actividad proteasa usando ensayos que se describen en "Materiales y métodos", tal como el ensayo de Suc-AAPF-pNA y el ensayo de Protazyme AK. En el ensayo con Protazyme AK, el sustrato Protazyme AK insoluble (caseína reticulada con azurina) libera un color azul cuando se incuba con la proteasa y se determina el color como una medición de la actividad proteasa. Para el ensayo de Suc-AAPF-pNA, el sustrato Suc-AAPF-pNA incoloro libera paranitroanilina amarilla cuando se incuba con la proteasa y se determina el color amarillo como una medición de la actividad proteasa.

20 Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos un 20 %, por ejemplo, al menos un 40 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % y al menos un 100 % de la actividad proteasa del polipéptido de la SEQ ID NO: 1.

Forraje rico en materia indigerible: El término "forraje rico en materia indigerible" se refiere a material vegetal seco con niveles elevados de fibra, tal como fibra, salvado, cáscaras de semillas y granos y residuos de cultivo (tales como rastrojos, copra, paja, paja fina o residuos de remolacha azucarera).

25 Identidad de secuencias: El grado de relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencias".

A los efectos de la presente invención, el grado de identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según 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), preferentemente la versión 3.0.0 o posterior. Se usó la versión 6.1.0. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de hueco de 10, penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62). El resultado de Needle denominado la "identidad más larga" (obtenido usando la opción no resumida) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula del siguiente modo:

$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento})$$

40 A los efectos de la presente invención, el grado de identidad de secuencias entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, mencionado anteriormente) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite", Rice et al., 2000, mencionado anteriormente), preferentemente la versión 3.0.0 o versiones posteriores. Se usó la versión 6.1.0. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de hueco de 10, penalización por la extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle denominado "identidad más larga" (obtenido usando la opción no resumida) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula del siguiente modo: $(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento})$

45 Ensilado: El término "ensilado" significa forraje almacenado con una humedad elevada fermentado con el que se puede alimentar a rumiantes (animales con segunda masticación tales como ganado y ovejas) o usado como materia prima de biocombustible para digestores anaeróbicos. Se fermenta y almacena en un proceso denominado ensilado, ensilamiento o ensilaje, y se compone habitualmente de cultivos de hierba o cereales (por ejemplo, maíz, sorgo, avena, centeno, Phleum pratense etc., plantas de pasto forrajero), o cultivos de legumbres como tréboles, alfalfa, algarroba, usando la planta verde completa (no solo el grano). El ensilado puede componerse de muchos cultivos de campo, y pueden usarse términos especiales dependiendo del tipo (ensilado de avena para avena, henolaje para alfalfa). El ensilado se genera bien colocando vegetación verde cortada en un silo, apilándola en un gran cúmulo cubierto con lámina de plástico, o bien envolviendo grandes fardos en película de plástico.

55 Polipéptido sustancialmente puro: La expresión "polipéptido sustancialmente puro" significa un preparado que contiene como máximo un 10 %, como máximo un 8 %, como máximo un 6 %, como máximo un 5 %, como máximo un 4 %, como máximo un 3 %, como máximo un 2 %, como máximo un 1 % y como máximo un 0,5 % en peso de otro material polipeptídico con el que está asociado de manera natural o recombinante. Preferentemente, el polipéptido

tiene una pureza de al menos un 92 %, por ejemplo, una pureza de al menos un 94 %, una pureza de al menos un 95 %, una pureza de al menos un 96 %, una pureza de al menos un 97 %, una pureza de al menos un 98 %, al menos un 99 %, una pureza de al menos un 99,5 %, y una pureza de un 100 % en peso del material polipeptídico total presente en el preparado. Los polipéptidos de la presente invención se encuentran preferentemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes muy conocidos o por métodos clásicos de purificación.

Variante: El término "variante" se refiere a un polipéptido que tiene actividad proteasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o delección de uno o más (varios) residuos aminoácidos en una o más (varias) posiciones. Una sustitución se refiere al reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una delección se refiere a la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción se refiere a una adición de 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición. Las variantes de la presente invención tienen al menos un 20 %, por ejemplo, al menos un 40 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 100 % de la actividad proteasa de la SEQ ID NO: 1.

Nomenclatura

A efectos de la presente invención, la nomenclatura [E/Q] significa que el aminoácido en esta posición puede ser un ácido glutámico (Glu, E) o una glutamina (Gln, Q). Asimismo la nomenclatura [V/G/A/I] significa que el aminoácido en esta posición puede ser una valina (Val, V), glicina (Gly, G), alanina (Ala, A) o isoleucina (Ile, I), y así sucesivamente para otras combinaciones como las descritas en el presente documento. Salvo que se limite adicionalmente de otro modo, el aminoácido X se define de manera que puede ser cualquiera de los 20 aminoácidos naturales.

Descripción detallada de la invención

Aditivos para pienso para animales que comprenden polipéptidos que tienen actividad proteasa

Las proteasas actúan degradando las proteínas en fragmentos más pequeños que el animal puede digerir y utilizar más fácilmente. Las dietas para animales comprenden principalmente una fuente de hidratos de carbono (por ejemplo, maíz, trigo, centeno) y una fuente de proteínas (normalmente harina de soja) que se complementan con una pequeña cantidad de grasa y una premezcla que contiene, por ejemplo, vitaminas y minerales. La proteasa ayudará principalmente a digerir la fuente de proteínas y una manera de medir esta utilización es determinar la digestibilidad ileal del nitrógeno en un animal, tal como pollos de engorde. Cuanto mayor sea la digestibilidad ileal del nitrógeno, mejor es la degradación de la proteína lo que normalmente conlleva una mejora de la ganancia del peso corporal y FCR en el animal.

Con el fin de determinar si la proteasa ha mejorado realmente la digestibilidad ileal del nitrógeno, es deseable realizar el ensayo in vivo con un control tanto positivo como negativo. La enzima se añade además del control negativo mientras que el control positivo reemplaza parte de la harina de soja con una fuente proteica más digerible, tal como concentrado proteico de soja. El PC normalmente mostrará una mejor digestibilidad ileal del nitrógeno en comparación con el NC, aunque si el contenido proteico en el NC es muy digerible, entonces la diferencia puede que sea bastante pequeña. Sin embargo, las proteasas de interés, tales como las de la presente invención, mostrarán una mejor digestibilidad ileal del nitrógeno en comparación con el NC y preferentemente también el PC.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un aditivo para pienso para animales que comprende uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, en donde el polipéptido es una proteasa S8 y tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 % con respecto a la SEQ ID NO: 1. En una realización, los polipéptidos difieren en hasta 50 aminoácidos, por ejemplo, entre 1 y 50 aminoácidos, tal como 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 aminoácidos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos respecto a la SEQ ID NO: 1.

El aditivo para pienso para animales comprende o está constituido preferentemente por la SEQ ID NO: 1 o una variante alélica de esta; comprende la SEQ ID NO: 1 y una etiqueta de His y/o etiqueta HQ en el extremo N y/o el extremo C; comprende la SEQ ID NO: 1 y una extensión en el extremo N y/o el extremo C de entre 1 y 10 aminoácidos; o es un fragmento de esta que tiene actividad proteasa y que tiene al menos un 90 % tal como al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de la longitud de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el aditivo para pienso para animales comprende o está constituido por los aminoácidos 1 a 314 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el aditivo para pienso para animales comprende o está constituido por los aminoácidos 2 a 314 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el aditivo para pienso para animales comprende o está constituido por los aminoácidos 4 a 314 de la SEQ ID NO: 1. En una realización, el polipéptido se ha aislado.

En una continuación del primer aspecto, la invención se refiere a un aditivo para pienso para animales que comprende una o más variantes de la SEQ ID NO: 1, en donde la variante es una proteasa S8 que tiene actividad proteasa y

comprende una o más sustituciones, y/o deleciones, y/o inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones. En una realización, el número de posiciones que comprenden una sustitución y/o deleción y/o inserción o cualquier combinación de estas en la SEQ ID NO: 1 está entre 1 y 50, tal como 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 posiciones. En una realización, el número de posiciones que comprenden una sustitución y/o deleción y/o inserción o cualquier combinación de estas en la SEQ ID NO: 1 no es superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra realización, el número de sustituciones y/o deleciones y/o inserciones en la SEQ ID NO: 1 no es superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una realización adicional, el número de sustituciones, preferentemente sustituciones conservadoras, en la SEQ ID NO: 1 no es superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

Tal como se ha mencionado, una realización de la invención se refiere a un pienso para animales o aditivo para pienso para animales que comprende una variante de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más deleciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones. Se han preparado varias variantes con una mutación única y mutaciones múltiples de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 9. Los Ejemplos 12, 14 y 15 ilustran la estabilidad gástrica y el rendimiento in vivo de la SEQ ID NO: 1. Se estudiaron las variantes con una mutación única (datos que no se muestran) y mutaciones múltiples y se observó que tenían una mejor estabilidad en ácidos, estabilidad gástrica y actividad residual en comparación con el polipéptido original de la SEQ ID NO: 1. En consecuencia, una realización de la invención se refiere a un aditivo para pienso para animales o composición para pienso para animales que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, o una variante de estas donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más deleciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones, habitualmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 posiciones, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 posiciones, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 posiciones.

La variante con la combinación de las mutaciones S173P, S175P, T297P mejoró la estabilidad en ácidos en comparación con la SEQ ID NO: 1 y se usó como punto de partida para mutaciones posteriores. En consecuencia, en una realización de la invención, el polipéptido tiene una identidad de secuencias de al menos un 80 %, tal como de al menos un 85 % tal como de al menos un 90 %, tal como de al menos un 95 %, tal como de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 que comprenden las mutaciones S173P, S175P, T297P. Resulta interesante señalar que la SEQ ID NO: 3, que es una forma mutada de la SEQ ID NO: 2, comprende las mutaciones S173P, S175P, T297P. Tal como se muestra en los Ejemplos, el aditivo para pienso para animales comprende convenientemente una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, en donde el polipéptido comprende ninguna, una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en S173P, S175P, T297P; L61P, V124A, R130D, S173P, S175P, T297P; H390D, L61P, S173P, S175P, T297P; L61P, H83T, S173P, S175P, T297P; L61P, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; H123W, V124A, R130D, S173P, S175P, T297P; N59D, H83T, S173P, S175P, T297P; N59D, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; L61Y, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; N59D, L61P, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; I43P, L61P, H123W, V124A, S173P, S175P, T297P; I43P, L61P, H83T, S173P, S175P, T297P; H39D, N59D, H83T, S173P, S175P, T297P; H39D, N59D, L61Y, S173P, S175P, T297P; H39D, H83T, H123W, V124A, S173P, S175P, T297P; H39D, L61Y, H123W, V124A, S173P, S175P, T297P; H39D, H83T, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; H39D, L61Y, H83T, S173P, S175P, T297P; L61Y, H83T, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; H39D, N59D, L61Y, H83T, S173P, S175P, T297P; I43P, L61P, S173P, S175P, T297P; H83T, V124A, R130D, S173P, S175P, T297P; L61Y, V124A, R130D, S173P, S175P, T297P; I43P, N59D, S173P, S175P, T297P; H83T, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; L61P, H123W, V124A, R130D, S173P, S175P, T297P; I43P, L61P, V124A, R130D, S173P, S175P, T297P; H39D, N59D, L61P, S173P, S175P, T297P; I43P, L61P, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; L61P, H83T, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; I43P, H83T, V124A, R130D, S173P, S175P, T297P; I43P, L61Y, V124A, R130D, S173P, S175P, T297P; I43P, N59D, H123W, V124A, S173P, S175P, T297P; N59D, H83T, H123W, V124A, S173P, S175P, T297P; N59D, L61Y, H123W, V124A, S173P, S175P, T297P; H39D, N59D, E127N, S129M, S173P, S175P, T297P; I43P, L61Y, H123W, V124A, S173P, S175P, T297P; H39D, N59D, L61P, H83T, S173P, S175P, T297P; I43P, N59D, L61P, H83T, S173P, S175P, T297P; H39D, I43P, N59D, L61Y, S173P, S175P, T297P y L61Y, H83T, S173P, S175P, T297P.

El aditivo para pienso para animales, en una realización de la invención, comprende habitualmente un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9, o una variante de estas, en donde la variante tiene

actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas donde una o más sustituciones son mutaciones múltiples que comprenden mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en

5 S173P, S175P, T297P; L61P,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; H39D,L61P, S173P, S175P, T297P; L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; L61P,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; H123W,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; N59D,H83T, S173P, S175P, T297P; N59D,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; L61Y,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P;

10 N59D,L61P,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,H83T, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61Y, S173P, S175P, T297P; H39D,H83T,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P;

15 H39D,L61Y,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; H39D,L61Y,H83T, S173P, S175P, T297P; L61Y,H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61Y,H83T, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P, S173P, S175P, T297P; H83T,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; L61Y,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,N59D, S173P, S175P, T297P; H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P;

20 L61P,H123W,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61P, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; L61P,H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; I43P,H83T,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,L61Y,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,N59D,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; N59D,H83T,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; N59D,L61Y,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; I43P,L61Y,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; I43P,N59D,L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; H39D,I43P,N59D,L61Y, S173P, S175P, T297P y L61Y,H83T, S173P, S175P, T297P.

25 Además, se prepararon varios homólogos. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 son homólogas entre sí.

SEQ ID NO: 5	S8, Bacillus sp-13380 (78 % respecto a la SEQ ID NO: 1)
SEQ ID NO: 6	S8, Bacillus idriensis (80 % respecto a la SEQ ID NO: 1)
SEQ ID NO: 7	S8, Bacillus sp-13380 (89 % respecto a la SEQ ID NO: 1)
SEQ ID NO: 8	S8, Bacillus sp-62451 (90 % respecto a la SEQ ID NO: 1)
SEQ ID NO: 9	S8, Bacillus oceanisediminis (87 % respecto a la SEQ ID NO: 1)

30 Una realización de la invención se refiere a un aditivo para pienso para animales de la invención en donde el polipéptido es una proteasa S8 seleccionada a partir del grupo que consiste en una proteasa S8 de Bacillus sp-13380 que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, tal como de al menos un 76 %, al menos un 77 %, tal como de al menos un 78 % respecto a la SEQ ID NO: 1, una proteasa S8 de Bacillus idriensis que tiene una identidad de secuencias de al menos un 80 % respecto a la SEQ ID NO: 1, una proteasa S8 de Bacillus sp-62451 que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 % respecto a la SEQ ID NO: 1, y una proteasa S8 de Bacillus oceanisediminis que tiene al menos un 85 %, tal como al menos un 86 %, tal como al menos un 87 % de la SEQ ID NO: 1. Una realización adicional de la invención se refiere a un aditivo para pienso que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9.

40 En una realización de cualquier parte del primer aspecto, el polipéptido (o variante) comprende uno o más motivos TGXK[V/T][I/V]X[N/S]MSLG (SEQ ID NO: 4). En una realización de cualquier parte del primer aspecto, el polipéptido (o variante) se obtiene o se puede obtener a partir del orden taxonómico Bacillales, preferentemente la familia taxonómica Bacillaceae, o más preferentemente el género taxonómico Bacillus.

45 En una realización de cualquier parte del primer aspecto, el polipéptido (o variante) tiene al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % de la actividad proteasa del polipéptido de la SEQ ID NO: 1. En una realización de cualquier parte del primer aspecto, el polipéptido (o variante) mejora la digestibilidad ileal del nitrógeno en al menos un 1 %, tal como al menos un 1,5 %, al menos un 2,0 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3,0 %, al menos un 3,5 % o al menos un 4,0 % en comparación con el control negativo en el que no se añade proteasa (variante) a la dieta.

Los cambios de los aminoácidos pueden ser poco relevantes, es decir, inserciones o sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; delecciones pequeñas,

normalmente de 1-30 aminoácidos; extensiones pequeñas amino- o carboxiterminales, tales como un resto de metionina aminoterminal; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación al cambiar la carga neta u otra función, tal como una región de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

- 5 Son ejemplos de sustituciones conservadoras las que se encuentran dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). En la técnica existe constancia de sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica y se describen, por ejemplo, en H.
- 10 Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Algunas sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly. Otros ejemplos de sustituciones conservadoras son G a A; A a G, S; V a I, L, A, T, S; I a V, L, M; L a I, M, V; M a L, I, V; P a A, S, N; F a Y, W, H; Y a F, W, H; W a Y, F, H; R a K, E, D; K a R, E, D; H a Q, N, S; D a N, E, K, R, Q; E a Q, D, K, R, N; S a T, A; T a S, V, A; C a S, T, A; N a D, Q, H, S; Q a E, N, H, K, R.
- 15 Los aminoácidos esenciales de un polipéptido pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de una única alanina en cada resto de la molécula y las moléculas mutadas resultantes se evalúan para determinar su actividad de proteasa con el fin de identificar los residuos aminoacídicos que son cruciales para la actividad de la molécula. Remítase también a
- 20 Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar mediante el análisis físico de la estructura, que se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje de fotoafinidad, junto con la mutación de posibles aminoácidos del sitio de contacto. Remítase a, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también se puede deducir a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado.
- 25

La familia de peptidasas S8 contiene endopeptidasas de serina y es la segunda familia más grande de peptidasas de serina, tanto en lo que se refiere al número de secuencias como peptidasas caracterizadas. En la subfamilia S8A, los residuos del sitio activo se producen frecuentemente en los motivos Asp-Thr/Ser-Gly, His-Gly-Thr-His and Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Xaa-Pro. A partir de esto se identificaron como residuos catalíticos Asp-35, His-72 y Ser-251 y se identificó como el cuarto aminoácido del sitio activo Asn-170 para la SEQ ID NO: 1, 2 y 3. La mutación de cualquiera de los aminoácidos de los residuos catalíticos provocará un cambio o pérdida de la actividad enzimática.

- 35 Las sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos únicos o múltiples pueden realizarse y estudiarse usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o transposición, seguidos de un procedimiento de cribado relevante, tales como los divulgados por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; el documento de patente WO 95/17413 o el documento de patente WO 95/22625. Otros métodos que pueden usarse incluyen PCR propensa a errores, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; patente de EE. UU. n.º 5 223 409; documento de patente WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a una región (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *ADN* 7: 127).

- 40 Los métodos de mutagénesis/reordenamiento pueden combinarse con métodos de cribado automáticos ultrarrápidos para detectar la actividad de polipéptidos mutados, clonados expresados por células hospedadoras (Ness et al., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse a partir de las células hospedadoras y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de residuos aminoacídicos individuales en un polipéptido.
- 45

El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el cual una región de un polipéptido se fusiona en el extremo N o en el extremo C de una región de otro polipéptido.

- 50 El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión escindible en el cual otro polipéptido se fusiona en el extremo N o extremo C del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido con un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son de uso común en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en fase y que la expresión del polipéptido de fusión esté controlada por el mismo promotor(es) y el mismo terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir usando la tecnología de inteínas en la que los polipéptidos de fusión se crean después de la traducción (Cooper et al., 1993, *EMBO J.* 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, *Science* 266: 776-779).
- 55

Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Al secretar la proteína de fusión, el sitio es escindido y se liberan los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, sin carácter limitante, los sitios divulgados en Martin et al., 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3: 568-576; Svetina et al., 2000, *J. Biotechnol.* 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3488-3493; Ward

et al., 1995, *Biotechnology* 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, *Biotechnology* 9: 378-381; Eaton et al., 1986, *Biochemistry* 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, *Biotechnology* 13: 982-987; Carter et al., 1989, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 6: 240-248; y Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4: 35-48.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un aditivo para pienso para animales que comprende uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, en donde el polipéptido es una proteasa S8 y tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 % con respecto a la SEQ ID NO: 2. En una realización, los polipéptidos difieren en hasta 50 aminoácidos, por ejemplo, entre 1 y 50 aminoácidos, tal como 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 aminoácidos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos respecto a la SEQ ID NO: 2.

El aditivo para pienso para animales comprende o está constituido preferentemente por la SEQ ID NO: 2 o una variante alélica de esta; comprende la SEQ ID NO: 2 y una etiqueta de His y/o etiqueta HQ en el extremo N y/o el extremo C; comprende la SEQ ID NO: 2 y una extensión en el extremo N y/o el extremo C de entre 1 y 10 aminoácidos; o es un fragmento de esta que tiene actividad proteasa y que tiene al menos un 90 % tal como al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de la longitud de SEQ ID NO: 2. En otra realización, el aditivo para pienso para animales comprende o está constituido por los aminoácidos 1 a 311 de la SEQ ID NO: 2. En una realización, el polipéptido se ha aislado.

En una continuación del segundo aspecto, la invención se refiere a un aditivo para pienso para animales que comprende una o más variantes de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante es una proteasa S8 que tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o deleciones, y/o inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones. En una realización, el número de posiciones que comprenden una sustitución y/o deleción y/o inserción o cualquier combinación de estas en la SEQ ID NO: 2 está entre 1 y 50, tal como 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 posiciones. En una realización, el número de posiciones que comprenden una sustitución y/o deleción y/o inserción o cualquier combinación de estas en la SEQ ID NO: 2 no es superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra realización, el número de sustituciones y/o deleciones y/o inserciones en la SEQ ID NO: 2 no es superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una realización adicional, el número de sustituciones, preferentemente sustituciones conservadoras, en la SEQ ID NO: 2 no es superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Se describen ejemplos de cambios de aminoácidos, sustituciones conservadoras y péptidos de fusión en el segundo aspecto en el presente documento.

En una realización de cualquier parte del segundo aspecto, el polipéptido (o variante) comprende uno o más motivos TGXK[V/T][I/V]X[N/S]MSLG (SEQ ID NO: 4). En una realización de cualquier parte del segundo aspecto, el polipéptido (o variante) se obtiene o se puede obtener a partir del orden taxonómico Bacillales, preferentemente la familia taxonómica Bacillaceae, o más preferentemente el género taxonómico *Bacillus*.

En una realización de cualquier parte del segundo aspecto, el polipéptido (o variante) tiene al menos un 40 %, tal como al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % de la actividad proteasa del polipéptido de la SEQ ID NO: 1. En una realización de cualquier parte del segundo aspecto, el polipéptido (o variante) mejora la digestibilidad ileal del nitrógeno en al menos un 1 %, tal como al menos un 1,5 %, al menos un 2,0 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3,0 %, al menos un 3,5 % o al menos un 4,0 % en comparación con el control negativo en el que no se añade proteasa (variante) a la dieta.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un aditivo para pienso para animales que comprende uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, en donde el polipéptido es una proteasa S8 y tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % con respecto a la SEQ ID NO: 3. En una realización, los polipéptidos difieren en hasta 50 aminoácidos, por ejemplo, entre 1 y 50 aminoácidos, tal como 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 aminoácidos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos respecto a la SEQ ID NO: 3.

El aditivo para pienso para animales comprende o está constituido preferentemente por la SEQ ID NO: 3 o una variante alélica de esta; comprende la SEQ ID NO: 3 y una etiqueta de His y/o etiqueta HQ en el extremo N y/o el extremo C; comprende la SEQ ID NO: 3 y una extensión en el extremo N y/o el extremo C de entre 1 y 10 aminoácidos; o es un fragmento de esta que tiene actividad proteasa y que tiene al menos un 90 % tal como al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de la longitud de SEQ ID NO: 3. En otra realización, el aditivo para

pienso para animales comprende o está constituido por los aminoácidos 1 a 311 de la SEQ ID NO: 3. En una realización, el polipéptido se ha aislado.

En una continuación del tercer aspecto, la invención se refiere a un aditivo para pienso para animales que comprende una o más variantes de la SEQ ID NO: 3, en donde la variante es una proteasa S8 que tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o deleciones, y/o inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones. En una realización, el número de posiciones que comprenden una sustitución y/o deleción y/o inserción o cualquier combinación de estas en la SEQ ID NO: 3 está entre 1 y 50, tal como 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 posiciones. En una realización, el número de posiciones que comprenden una sustitución y/o deleción y/o inserción o cualquier combinación de estas en la SEQ ID NO: 3 no es superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra realización, el número de sustituciones y/o deleciones y/o inserciones en la SEQ ID NO: 3 no superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una realización adicional, el número de sustituciones, preferentemente sustituciones conservadoras, en la SEQ ID NO: 3 no es superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Se describen ejemplos de cambios de aminoácidos, sustituciones conservadoras y péptidos de fusión en el segundo aspecto en el presente documento.

Un aspecto interesante más de la invención se refiere a un aditivo para pienso que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 %, tal como una identidad de secuencias de al menos un 95 %, tal como de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. Las secuencias aminoácidas de la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3 difieren en 13 posiciones. En consecuencia, una realización de la invención se refiere a un aditivo para pienso que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 % tal como una identidad de secuencias de al menos un 95 %, tal como de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, especialmente las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido comprende una mutación en ninguna, una o más de las posiciones 27, 109, 111, 171, 173, 174, 175, 180, 182, 184, 198, 199 y 297. El aditivo para pienso para animales de la invención comprende preferentemente una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, o donde la proteasa S8 es un polipéptido que comprende una mutación en ninguna, una o más de las posiciones 27, 109, 111, 171, 173, 174, 175, 180, 182, 184, 198, 199 y 297 de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Una realización de la invención se refiere a un aditivo para pienso que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 % tal como una identidad de secuencias de al menos un 95 %, tal como de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, habitualmente las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido comprende ninguna, una o más de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en S27K, N109K, S111E, S171E, S173P, G174K, S175P, F180Y, G182A, L184F, Q198E, N199K y T297P.

Una realización de la invención se refiere a un aditivo para pienso que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 %, tal como una identidad de secuencias de al menos un 95 %, tal como de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, habitualmente las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, donde el polipéptido comprende ninguna, una o más de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en S27K+N109K, S27K+S111E, S27K+S171E, S27K+S173P, S27K+G174K, S27K+S175P, S27K+F180Y, S27K+G182A, S27K+L184F, S27K+Q198E, S27K+N199K, N109K+S111E, N109K+S171E, N109K+S173P, N109K+G174K, N109K+S175P, N109K+F180Y, N109K+G182A, N109K+L184F, N109K+Q198E, N109K+N199K, S111E+S171E, S111E+S173P, S111E+G174K, S111E+S175P, S111E+F180Y, S111E+G182A, S111E+L184F, S111E+Q198E, S111E+N199K, S171E+S173P, S171E+G174K, S171E+S175P, S171E+F180Y, S171E+G182A, S171E+L184F, S171E+Q198E, S171E+N199K, S173P+G174K, S173P+S175P, S173P+F180Y, S173P+G182A, S173P+L184F, S173P+Q198E, S173P+N199K, G174K+S175P, G174K+F180Y, G174K+G182A, G174K+L184F, G174K+Q198E, G174K+N199K, S175P+F180Y, S175P+G182A, S175P+L184F, S175P+Q198E, S175P+N199K, F180Y+G182A, F180Y+L184F, F180Y+Q198E, F180Y+N199K, G182A+L184F, G182A+Q198E, G182A+N199K, L184F+Q198E, L184F+N199K y Q198E+N199K.

Una realización de la invención se refiere a un aditivo para pienso que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, habitualmente las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido comprende ninguna, una o más de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en S27K+N109K+S111E, S27K+N109K+S171E, S27K+N109K+S173P, S27K+N109K+G174K, S27K+N109K+S175P, S27K+N109K+F180Y, S27K+N109K+G182A, S27K+N109K+L184F, S27K+N109K+Q198E, S27K+N109K+N199K, S27K+S111E+S171E, S27K+S111E+S173P, S27K+S111E+G174K, S27K+S111E+S175P, S27K+S111E+F180Y, S27K+S111E+G182A, S27K+S111E+L184F, S27K+S111E+Q198E, S27K+S111E+N199K, S27K+S171E+S173P, S27K+S171E+G174K, S27K+S171E+S175P, S27K+S171E+F180Y, S27K+S171E+G182A, S27K+S171E+L184F, S27K+S171E+Q198E, S27K+S171E+N199K, S27K+S173P+G174K, S27K+S173P+S175P, S27K+S173P+F180Y, S27K+S173P+G182A, S27K+S173P+L184F, S27K+S173P+Q198E, S27K+S173P+N199K, S27K+G174K+S175P,

	S27K+G174K+F180Y, S27K+G174K+G182A, S27K+G174K+L184F, S27K+G174K+Q198E, S27K+G174K+N199K, S27K+S175P+F180Y, S27K+S175P+G182A, S27K+S175P+L184F, S27K+S175P+Q198E, S27K+S175P+N199K, S27K+F180Y+G182A, S27K+F180Y+L184F, S27K+F180Y+Q198E, S27K+F180Y+N199K, S27K+G182A+L184F, S27K+G182A+Q198E, S27K+G182A+N199K, S27K+L184F+Q198E, S27K+L184F+N199K, S27K+Q198E+N199K,
5	N109K+S111E+S171E N109K+S111E+S173P, N109K+S111E+G174K, N109K+S111E+S175P, N109K+S111E+F180Y, N109K+S111E+G182A, N109K+S111E+L184F, N109K+S111E+Q198E, N109K+S111E+N199K, N109K+S171E+S173P, N109K+S171E+G174K, N109K+S171E+S175P, N109K+S171E+F180Y, N109K+S171E+G182A, N109K+S171E+L184F, N109K+S171E+Q198E, N109K+S171E+N199K, N109K+S173P+G174K, N109K+S173P+S175P, N109K+S173P+F180Y,
10	N109K+S173P+G182A, N109K+S173P+L184F, N109K+S173P+Q198E, N109K+S173P+N199K, N109K+G174K+S175P, N109K+G174K+F180Y, N109K+G174K+G182A, N109K+G174K+L184F, N109K+G174K+Q198E, N109K+G174K+N199K, N109K+S175P+F180Y, N109K+S175P+G182A, N109K+S175P+L184F, N109K+S175P+Q198E, N109K+S175P+N199K, N109K+F180Y+G182A, N109K+F180Y+L184F, N109K+F180Y+N199K, N109K+G182A+Q198E, N109K+G182A+N199K, N109K+L184F+Q198E, N109K+L184F+N199K,
15	N109K+Q198E+N199K, S111E+S171E+S173P, S111E+S171E+G174K, S111E+S171E+S175P, S111E+S171E+F180Y, S111E+S171E+G182A, S111E+S171E+L184F, S111E+S171E+Q198E, S111E+S171E+N199K, S111E+S173P+G174K, S111E+S173P+S175P, S111E+S173P+F180Y, S111E+S173P+G182A, S111E+S173P+L184F, S111E+S173P+Q198E, S111E+S173P+N199K, S111E+G174K+S175P, S111E+G174K+F180Y, S111E+G174K+G182A, S111E+G174K+L184F, S111E+G174K+Q198E, S111E+G174K+N199K, S111E+S175P+F180Y, S111E+S175P+G182A, S111E+S175P+L184F, S111E+S175P+Q198E, S111E+S175P+N199K, S111E+F180Y+L184F, S111E+F180Y+Q198E, S111E+F180Y+N199K, S111E+G182A+L184F, S111E+G182A+Q198E, S111E+G182A+N199K, S111E+L184F+Q198E, S111E+L184F+N199K,
20	S171E+S173P+G174K, S171E+S173P+S175P, S171E+S173P+F180Y, S171E+S173P+G182A, S171E+S173P+L184F, S171E+S173P+Q198E, S171E+S173P+N199K, S171E+G174K+S175P, S171E+G174K+F180Y, S171E+G174K+G182A, S171E+G174K+L184F, S171E+G174K+Q198E, S171E+G174K+N199K, S171E+S175P+F180Y, S171E+S175P+G182A, S171E+S175P+L184F, S171E+S175P+Q198E, S171E+S175P+N199K, S171E+F180Y+L184F, S171E+F180Y+Q198E, S171E+F180Y+N199K, S171E+G182A+L184F, S171E+G182A+Q198E, S171E+G182A+N199K, S171E+L184F+Q198E, S171E+L184F+N199K,
25	S171E+Q198E+N199K, S173P+G174K+S175P, S173P+G174K+F180Y, S173P+G174K+G182A, S173P+G174K+L184F, S173P+G174K+Q198E, S173P+G174K+N199K, S173P+S175P+F180Y, S173P+S175P+G182A, S173P+S175P+L184F, S173P+S175P+Q198E, S173P+S175P+N199K, S173P+F180Y+L184F, S173P+F180Y+Q198E, S173P+F180Y+N199K, S173P+G182A+L184F, S173P+G182A+Q198E, S173P+G182A+N199K, S173P+L184F+Q198E, S173P+L184F+N199K, S173P+Q198E+N199K, G174K+S175P+F180Y, G174K+S175P+G182A, G174K+S175P+L184F, G174K+S175P+Q198E, G174K+S175P+N199K, G174K+F180Y+L184F, G174K+F180Y+Q198E, G174K+F180Y+N199K, G174K+G182A+L184F, G174K+G182A+Q198E, G174K+G182A+N199K, G174K+L184F+Q198E, G174K+L184F+N199K,
30	S175P+F180Y+G182A, S175P+F180Y+L184F, S175P+F180Y+Q198E, S175P+F180Y+N199K, S175P+G182A+L184F, S175P+G182A+Q198E, S175P+G182A+N199K, S175P+L184F+Q198E, S175P+L184F+N199K, S175P+Q198E+N199K, F180Y+G182A+L184F, F180Y+G182A+Q198E, F180Y+G182A+N199K, F180Y+L184F+Q198E, F180Y+L184F+N199K,
35	F180Y+Q198E+N199K, G182A+L184F+Q198E, G182A+L184F+N199K, G182A+Q198E+N199K y
40	
45	

Una realización de la invención se refiere a un aditivo para pienso que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, habitualmente las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido comprende ninguna, una o más de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en

S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F,

S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+Q198E,

S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+N199K,

55 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F,

S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+Q198E,

S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+N199K,

S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+L184F+Q198E,

S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+L184F+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+Q198E,
5 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+L184F+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+G182A+L184F+Q198E,
10 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+G182A+L184F+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+G182A+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+Q198E,
15 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+L184F+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+G182A+L184F+Q198E,
20 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+G182A+L184F+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+G182A+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
25 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F,
S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E,
30 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+L184F+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E,
35 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+G182A+L184F+N199K,
S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+G182A+Q198E+N199K,

S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 5 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 10 S27K+N109K+S111E+S171E+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E,
 15 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E,
 20 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 25 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 30 S27K+N109K+S111E+S173P+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 35 S27K+N109K+S111E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,

S27K+N109K+S111E+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S111E+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
5 S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+N199K,
10 S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+L184F+Q198E+N199K,
15 S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+G182A+L184F+Q198E+N199K,
20 S27K+N109K+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+S173P+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
25 S27K+N109K+S171E+S173P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
S27K+N109K+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
30 S27K+N109K+S171E+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S171E+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+N109K+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
35 S27K+N109K+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,

- S27K+N109K+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+N109K+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
5 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+N199K,
10 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+L184F+Q198E+N199K,
15 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+G182A+L184F+Q198E+N199K,
20 S27K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+S173P+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
25 S27K+S111E+S171E+S173P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
S27K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
30 S27K+S111E+S171E+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S171E+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
35 S27K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,

S27K+S111E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S111E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S111E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
5 S27K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S27K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
S27K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S27K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
10 S27K+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S27K+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F,
15 N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+Q198E+N199K,
20 N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
25 N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
30 N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+S173P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
35 N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,

N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S171E+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
5 N109K+S111E+S171E+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
10 N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S111E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
15 N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
20 N109K+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
N109K+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
25 S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
30 S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K y
S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K.

Una realización de la invención se refiere a un aditivo para pienso que comprende una proteasa S8 que tiene una
identidad de al menos un 90 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las
35 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, habitualmente las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en donde el poli-
péptido comprende ninguna, una o más de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F,
S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E,

ES 2 993 983 T3

S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+Q198E+N199K,
 5 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 10 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 15 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 20 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 25 S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 30 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 35 S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,

- S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 5 S27K+N109K+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 10 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 15 S27K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 20 N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 25 N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K y
 S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K.

- 30 Una realización de la invención se refiere a un aditivo para pienso que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, habitualmente las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido comprende ninguna, una o más de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+N199K,
 35 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+G182A+L184F+Q198E+N199K,
 S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,

S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,

S27K+N109K+S111E+S171E+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,

S27K+N109K+S111E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,

S27K+N109K+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K,

5 S27K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K y

N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199K.

En una realización de cualquier parte del tercer aspecto, el polipéptido (o variante) comprende uno o más motivos TGXX[V/T][I/V]X[N/S]MSLG (SEQ ID NO: 4). En una realización de cualquier parte del tercer aspecto, el polipéptido (o variante) se obtiene o se puede obtener a partir del orden taxonómico Bacillales, preferentemente la familia taxonómica Bacillaceae, o más preferentemente el género taxonómico *Bacillus*.

En una realización de cualquier parte del tercer aspecto, el polipéptido (o variante) tiene al menos un 40 %, tal como al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % de la actividad proteasa del polipéptido de la SEQ ID NO: 1. En una realización de cualquier parte del tercer aspecto, el polipéptido (o variante) mejora la digestibilidad ileal del nitrógeno en al menos un 1 %, tal como al menos un 1,5 %, al menos un 2,0 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3,0 %, al menos un 3,5 % o al menos un 4,0 % en comparación con el control negativo en el que no se añade proteasa (variante) a la dieta.

El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además uno o más componentes seleccionados de la lista constituida por: uno o más agentes de formulación; una o más enzimas adicionales; uno o más microbios; una o más vitaminas; uno o más minerales; uno o más aminoácidos; uno o más prebióticos; uno o más fitógenos; uno o más ácidos orgánicos; y uno o más ingredientes para pienso adicionales.

El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además uno o más agentes de formulación, tal como se analiza más adelante en la sección de formulación. Los agentes de formulación preferidos son 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 o cualquier combinación de estos.

El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además una o más enzimas, tal como se analiza más adelante en la sección de enzimas. Las enzimas preferidas son acetilxilano-esterasa, acilglicerol-lipasa, amilasa, alfa-amilasa, beta-amilasa, arabinofuranosidasa, celobiohidrolasas, celulasa, feruloil-esterasa, galactanasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, beta-glucanasa, beta-glucosidasa, lisofosfolipasa, lisozima, alfa-manosidasa, beta-manosidasa (mananasa), fitasa, fosfolipasa A1, fosfolipasa A2, fosfolipasa D, proteasa, pululanasa, pectinesterasa, triacilglicerol-lipasa, xilanasa, beta-xilosidasa o cualquier combinación de estas.

El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además uno o más microbios, tal como se analiza más adelante en la sección de microbios. Los microbios preferidos son *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Megasphaera elsdenii*, *Megasphaera sp.*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus sp.*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium sp.*, *Streptococcus sp.* o cualquier combinación de estos.

El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además una o más vitaminas, tal como se analiza más adelante en la sección de vitaminas y minerales. El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además uno o más minerales, tal como se analiza más adelante en la sección de vitaminas y minerales. El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además uno o más aminoácidos, tal como se analiza más adelante en la sección de aminoácidos. El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además uno o más prebióticos, tal como se analiza más adelante en la sección de prebióticos. El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además uno o más fitógenos, tal como se analiza más adelante en la sección de fitógenos. El aditivo para pienso para animales de cualquiera de los aspectos uno, dos o tres puede comprender además uno o más ácidos orgánicos, tal como se analiza más adelante en la sección de ácidos orgánicos.

En una realización, la proteasa S8 en el aditivo para pienso para animales se formula como un gránulo. En una realización, la proteasa S8 en el aditivo para pienso para animales se formula como un gránulo, en donde el gránulo

comprende una partícula central y uno o más recubrimientos. En una realización, la proteasa S8 en el aditivo para pienso para animales se formula como un gránulo que comprende una partícula central y uno o más recubrimientos, en donde el recubrimiento comprende una sal y/o cera y/o harina.

5 En una realización, el aditivo para pienso para animales está en forma de una formulación líquida. En una realización, el aditivo para pienso para animales está en forma de una formulación líquida, en donde la proteasa S8 se administra en una dosis de entre un 0,001 % y un 25 % p/p de la formulación líquida, preferentemente de un 0,01 % a un 25 % p/p, más preferentemente de un 0,05 % a un 20 % p/p, más preferentemente de un 0,2 % a un 15 % p/p, incluso más preferentemente de un 0,5 % a un 15 % p/p o de la manera más preferente de un 1,0 % a un 10 % p/p de polipéptido.

10 En una realización, el aditivo para pienso para animales está en forma de una formulación líquida, en donde la formulación líquida comprende de un 20 % a un 80 % p/p de poliol. En una realización, el aditivo para pienso para animales está en forma de una formulación líquida que comprende de un 20 % a un 80 % p/p de poliol, donde el poliol se selecciona a partir del grupo que consiste en glicerol, sorbitol, propilenglicol (MPG), etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, 1,2-propilenglicol o 1,3-propilenglicol, dipropilenglicol, polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 600 y polipropilenglicol (PPG) que tiene un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 600 o cualquier combinación de estos.

15 En una realización, el aditivo para pienso para animales está en forma de una formulación líquida, en donde la formulación líquida comprende de un 0,01 % a un 2,0 % p/p de conservante. En una realización, el aditivo para pienso para animales está en forma de una formulación líquida que comprende de un 0,01 % a un 2,0 % p/p de conservante, donde el conservante se selecciona a partir del grupo que consiste en sorbato de sodio, sorbato de potasio, benzoato de sodio y benzoato de potasio o cualquier combinación de estos.

En una realización, el aditivo para pienso para animales está en forma de una formulación líquida que comprende:

(A) de un 0,001 % a un 25 % p/p de una proteasa S8 de la invención (tal como se describe en los aspectos uno, dos o tres anteriormente);

25 (B) de un 20 % a un 80 % p/p de poliol;

(C) de un 0,001 % a un 2,0 % p/p de conservante; y

(D) agua.

En los siguientes párrafos se describen ejemplos preferidos de polioles y conservantes.

En una realización adecuada, el aditivo para pienso para animales no comprende un tensioactivo.

30 Gránulos que comprenden polipéptidos que tienen actividad proteasa

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un gránulo que comprende uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, donde el polipéptido es una proteasa S8 seleccionada a partir del grupo que consiste en:

35 (a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 1;

40 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 2;

(c) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 3;

45 (d) una variante de la SEQ ID NO: 1, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

50 (e) una variante de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

(f) una variante de SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más deleciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

5 (g) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) y una etiqueta de His y/o etiqueta HQ en el extremo N y/o el extremo C;

(h) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) y una extensión del extremo N y/o el extremo C de hasta 10 aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos; y

10 (i) un fragmento del polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) que tiene actividad proteasa y que tiene al menos un 90 % de la longitud del polipéptido maduro.

En una realización de cualquier parte del cuarto aspecto, el polipéptido (o variante) comprende uno o más motivos TGXK[V/T][I/V]X[N/S]MSLG (SEQ ID NO: 4). En una realización de cualquier parte del cuarto aspecto, el polipéptido (o variante) se obtiene o se puede obtener a partir del orden taxonómico Bacillales, preferentemente la familia taxonómica Bacillaceae, o más preferentemente el género taxonómico *Bacillus*.

15 En una realización de cualquier parte del cuarto aspecto, el polipéptido (o variante) tiene al menos un 40 %, tal como al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % de la actividad proteasa del polipéptido de la SEQ ID NO: 1. En una realización de cualquier parte del cuarto aspecto, el polipéptido (o variante) mejora la digestibilidad ileal del nitrógeno en al menos un 1 %, tal como al menos un 1,5 %, al menos un 2,0 %, al menos un 2,5 %, 20 al menos un 3,0 %, al menos un 3,5 % o al menos un 4,0 % en comparación con el control negativo en el que no se añade proteasa (variante) a la dieta.

En una realización del cuarto aspecto, el gránulo comprende una partícula central y uno o más recubrimientos. En una realización, el gránulo comprende una partícula central y uno o más recubrimientos, donde el recubrimiento comprende una sal y/o cera y/o harina.

25 El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además uno o más componentes seleccionados a partir del grupo que consiste en: uno o más agentes de formulación; una o más enzimas adicionales; uno o más microbios; una o más vitaminas; uno o más minerales; uno o más aminoácidos; uno o más prebióticos; uno o más fitógenos; uno o más ácidos orgánicos; y uno o más ingredientes para pienso adicionales.

30 El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además uno o más agentes de formulación, tal como se analiza más adelante en la sección de formulación. Los agentes de formulación preferidos son 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 o cualquier combinación de estos.

35 El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además una o más enzimas adicionales, tal como se analiza más adelante en la sección de enzimas. Las enzimas preferidas son acetilxilano-esterasa, acilglicerol-lipasa, amilasa, alfa-amilasa, beta-amilasa, arabinofuranosidasa, celobiohidrolasas, celulasa, feruloil-esterasa, galactanasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, beta-glucanasa, beta-glucosidasa, lisofosfolipasa, lisozima, alfa-manosidasa, beta-manosidasa (mananasa), fitasa, fosfolipasa A1, fosfolipasa A2, fosfolipasa D, proteasa, pululanasa, pectinesterasa, triacilglicerol-lipasa, xilanasas, beta-xilosidasa o cualquier combinación de estas.

40 El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además uno o más microbios, tal como se analiza más adelante en la sección de probióticos. Los microbios preferidos son *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Megasphaera elsdenii*, *Megasphaera sp.*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus sp.*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium sp.*, *Streptococcus sp.* o cualquier combinación de estos.

45 El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además una o más vitaminas, tal como se analiza más adelante en la sección de vitaminas y minerales. El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además uno o más minerales, tal como se analiza más adelante en la sección de vitaminas y minerales. El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además uno o más aminoácidos, tal como se analiza más adelante en la sección de aminoácidos. El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además uno o más prebióticos, tal como se analiza más adelante en la sección de prebióticos. El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además uno o más fitógenos, tal como se analiza más adelante en la sección de fitógenos. El gránulo del cuarto aspecto puede comprender además uno o más ácidos orgánicos, tal como se analiza más adelante en la sección de ácidos orgánicos.

55 Formulaciones líquidas que comprenden polipéptidos que tienen actividad proteasa

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a formulaciones líquidas que comprenden:

(A) de un 0,001 % a un 25 % de uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, en donde el polipéptido es una proteasa S8 seleccionada a partir del grupo que consiste en:

- 5 (a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 1;
- 10 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 2;
- 15 (c) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 3;
- (d) una variante de la SEQ ID NO: 1, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;
- 20 (e) una variante de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;
- 25 (f) una variante de la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;
- (g) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) y una etiqueta de His y/o una etiqueta HQ en el extremo N y/o en el extremo C;
- 30 (h) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) y una extensión del extremo N y/o del extremo C de hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos; y
- (i) un fragmento del polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) que tiene actividad proteasa y que tiene al menos un 90 % de la longitud del polipéptido maduro; y

(B) agua.

- 35 En una realización del quinto aspecto, la invención se refiere a formulaciones líquidas que comprenden:

(A) de un 0,001 % a un 25 % p/p de uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, en donde el polipéptido es una proteasa S8 seleccionada a partir del grupo que consiste en:

- 40 (a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 1;
- 45 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 2;
- (c) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 3;
- 50 (d) una variante de la SEQ ID NO: 1, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

5 (e) una variante de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

10 (f) una variante de la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

(g) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) y una etiqueta de His y/o una etiqueta HQ en el extremo N y/o en el extremo C;

(h) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) y una extensión del extremo N y/o del extremo C de hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos; y

15 (i) un fragmento del polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) que tiene actividad proteasa y que tiene al menos un 90 % de la longitud del polipéptido maduro;

(B) de un 20 % a un 80 % p/p de poliol;

(C) opcionalmente de un 0,001 % a un 2,0 % p/p de conservante; y

(D) agua.

20 En una realización del quinto aspecto, la invención se refiere a formulaciones líquidas que comprenden:

(A) de un 0,001 % a un 25 % p/p de uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, en donde el polipéptido es una proteasa S8 seleccionada a partir del grupo que consiste en:

25 (a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 1;

30 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 2;

(c) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 3;

35 (d) una variante de la SEQ ID NO: 1, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

40 (e) una variante de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

45 (f) una variante de la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

(g) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) y una etiqueta de His y/o etiqueta HQ en el extremo N y/o el extremo C;

50 (h) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) y una extensión del extremo N y/o el extremo C de hasta 10 aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos; y

(i) un fragmento del polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) que tiene actividad proteasa y que tiene al menos un 90 % de la longitud del polipéptido maduro;

(B) de un 0,001 % a un 2,0 % p/p de conservante;

(C) opcionalmente de un 20 % a un 80 % p/p de poliol; y

5 (D) agua.

En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, el polipéptido (o variante) comprende uno o más motivos TGXX[V/T][I/V]X[N/S]MSLG (SEQ ID NO: 4). En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, el polipéptido (o variante) se obtiene o se puede obtener a partir del orden taxonómico Bacillales, preferentemente la familia taxonómica Bacillaceae, o más preferentemente el género taxonómico *Bacillus*.

10 En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, el polipéptido (o variante) tiene al menos un 40 %, tal como al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % de la actividad proteasa del polipéptido de la SEQ ID NO: 1. En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, el polipéptido (o variante) mejora la digestibilidad ileal del nitrógeno en al menos un 1 %, tal como al menos un 1,5 %, al menos un 2,0 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3,0 %, al menos un 3,5 % o al menos un 4,0 % en comparación con el control negativo en el que no se añade proteasa (variante) a la dieta.

15 En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, la formulación líquida comprende uno o más polioles, preferentemente un poliol seleccionado a partir del grupo que consiste en glicerol, sorbitol, propilenglicol (MPG), etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, 1,2-propilenglicol o 1,3-propilenglicol, dipropilenglicol, polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 600 y polipropilenglicol (PPG) que tiene un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 600, más preferentemente seleccionado a partir del grupo que consiste en glicerol, sorbitol y propilenglicol (MPG) o cualquier combinación de estos.

20 En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, la formulación líquida comprende un 20 %-80 % de poliol (es decir, cantidad total de poliol), preferentemente un 25 %-75 % de poliol, más preferentemente un 30 %-70 % de poliol, más preferentemente un 35 %-65 % de poliol o de la manera más preferente un 40 %-60 % de poliol. En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, la formulación líquida comprende un 20 %-80 % de poliol, preferentemente un 25 %-75 % de poliol, más preferentemente un 30 %-70 % de poliol, más preferentemente un 35 %-65 % de poliol o de la manera más preferente un 40 %-60 % de poliol, donde el poliol se selecciona a partir del grupo que consiste en glicerol, sorbitol, propilenglicol (MPG), etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, 1,2-propilenglicol o 1,3-propilenglicol, dipropilenglicol, polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 600 y polipropilenglicol (PPG) que tiene un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 600. En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, la formulación líquida comprende un 20 %-80 % de poliol (es decir, cantidad total de poliol), preferentemente un 25 %-75 % de poliol, más preferentemente un 30 %-70 % de poliol, más preferentemente un 35 %-65 % de poliol o de la manera más preferente un 40 %-60 % de poliol, en donde el poliol se selecciona a partir del grupo que consiste en glicerol, sorbitol y propilenglicol (MPG).

25 En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, el conservante se selecciona a partir del grupo que consiste en sorbato de sodio, sorbato de potasio, benzoato de sodio y benzoato de potasio o cualquier combinación de estos. En una realización, la formulación líquida comprende de un 0,02 % a un 1,5 % p/p de conservante, más preferentemente de un 0,05 % a un 1,0 % p/p de conservante o de la manera más preferente de un 0,1 % a un 0,5 % p/p de conservante. En una realización, la formulación líquida comprende de un 0,001 % a un 2,0 % p/p de conservante (es decir, cantidad total de conservante), preferentemente de un 0,02 % a un 1,5 % p/p de conservante, más preferentemente de un 0,05 % a un 1,0 % p/p de conservante o de la manera más preferente de un 0,1 % a un 0,5 % p/p de conservante, donde el conservante se selecciona a partir del grupo que consiste en sorbato de sodio, sorbato de potasio, benzoato de sodio y benzoato de potasio o cualquier combinación de estos.

30 En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, la proteasa S8 se administra en una dosis de entre un 0,001 % y un 25 % p/p de formulación líquida, preferentemente de un 0,01 % a un 25 % p/p, más preferentemente de un 0,05 % a un 20 % p/p, más preferentemente de un 0,2 % a un 15 % p/p, incluso más preferentemente de un 0,5 % a un 15 % p/p o de la manera más preferente de un 1,0 % a un 10 % p/p de polipéptido.

35 La formulación líquida de cualquier parte del quinto aspecto puede comprender además uno o más componentes seleccionados a partir de la lista que consiste en: uno o más agentes de formulación; una o más enzimas adicionales; uno o más microbios; una o más vitaminas; uno o más minerales; uno o más aminoácidos; uno o más prebióticos; uno o más fitógenos; uno o más ácidos orgánicos; y uno o más ingredientes para pienso adicionales.

40 En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, la formulación líquida comprende uno o más agentes de formulación (tales como los descritos en el presente documento), preferentemente un agente de formulación seleccionado a partir de la lista que consiste en 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, PVA, acetato y

fosfato, preferentemente seleccionado a partir de la lista que consiste en 1,2-propilenglicol, 1,3-propilenglicol, sulfato de sodio, dextrina, celulosa, tiosulfato de sodio, caolín y carbonato de calcio.

En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, la formulación líquida comprende una o más enzimas adicionales. La una o más enzimas adicionales se seleccionan preferentemente a partir del grupo que consiste en acetilxilano-esterasa, acilglicerol-lipasa, amilasa, alfa-amilasa, beta-amilasa, arabinofuranosidasa, celobiohidrolasas, celulasa, feruloil-esterasa, galactanasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, beta-glucanasa, beta-glucosidasa, lisofosfolipasa, lisozima, alfa-manosidasa, beta-manosidasa (mananasa), fitasa, fosfolipasa A1, fosfolipasa A2, fosfolipasa D, proteasa, pululanasa, pectino-esterasa, triacilglicerol-lipasa, xilanasas, beta-xilosidasa o cualquier combinación de estas.

En una realización de cualquier parte del quinto aspecto, la formulación líquida comprende uno o más probióticos. El uno o más probióticos se seleccionan preferentemente a partir del grupo que consiste en *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Megasphaera elsdenii*, *Megasphaera sp.*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus sp.*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium sp.* y *Streptococcus sp.* o cualquier combinación de estos.

La formulación líquida de cualquier parte del quinto aspecto puede comprender además una o más vitaminas, tal como se analiza más adelante en la sección de vitaminas y minerales. La formulación líquida de cualquier parte del quinto aspecto puede comprender además uno o más minerales, tal como se analiza más adelante en la sección de vitaminas y minerales. La formulación líquida de cualquier parte del quinto aspecto puede comprender además uno o más aminoácidos, tal como se analiza más adelante en la sección de aminoácidos. La formulación líquida de cualquier parte del quinto aspecto puede comprender además uno o más prebióticos, tal como se analiza más adelante en la sección de prebióticos. La formulación líquida de cualquier parte del quinto aspecto puede comprender además uno o más fitógenos, tal como se analiza más adelante en la sección de fitógenos. La formulación líquida de cualquier parte del quinto aspecto puede comprender además uno o más ácidos orgánicos, tal como se analiza más adelante en la sección de ácidos orgánicos.

En una realización adecuada, la formulación comprende de un 20 % a un 80 % p/p de poliol.

Propiedades

pH-actividad

El perfil de pH-actividad de la proteasa se puede determinar tal como se describe en el ensayo cinético con Suc-AAPF-pNA. La actividad a un pH más bajo (por ejemplo, 4-7) puede ser beneficiosa para la digestión de proteínas en un animal.

pH-estabilidad

El perfil de pH-estabilidad de la proteasa se puede determinar tal como se describe en el ensayo cinético con Suc-AAPF-pNA. La estabilidad a un pH más bajo (por ejemplo, pH 3) puede ser beneficiosa para que la proteasa sobreviva en las condiciones del tubo GI del animal.

Termoestabilidad

La termoestabilidad se puede determinar tal como se describe en el Ejemplo 5, es decir, usando mediciones de CDB para determinar la temperatura de desnaturalización, T_d, de la proteína proteasa purificada. La T_d es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: Cuanto mayor sea la T_d, mayor será la termoestabilidad. Por consiguiente, en una realización preferida, la proteasa de la invención posee una T_d que es mayor que la T_d de una proteasa de referencia, en donde la T_d se determina en muestras de proteasa purificada (preferentemente con una pureza de al menos un 90 % o un 95 %, según se determina mediante SDS-PAGE).

En realizaciones preferidas, las propiedades térmicas tales como la estabilidad térmica, la estabilidad con la temperatura, la termoestabilidad, la estabilidad frente al vapor y/o la estabilidad frente a la microgranulación, según las proporciona la actividad residual, la temperatura de desnaturalización T_d u otro parámetro de la proteasa de la invención es mayor que el valor correspondiente, como la actividad residual o T_d, de la proteasa de la SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 101 % de esta, o al menos un 102 %, 103 %, 104 %, 105 %, 106 %, 107 %, 108 %, 109 %, o al menos un 110 % de esta. Incluso más preferentemente, el valor del parámetro, tal como la actividad residual o T_d, de la proteasa de la invención es al menos un 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, o al menos un 190 % del valor para la proteasa de la SEQ ID NO: 1.

En otras realizaciones particulares adicionales, la proteasa termoestable de la invención tiene una temperatura de fusión T_f (o una temperatura de desnaturalización, T_d), según se determina mediante calorimetría diferencial de

barrido (CDB) tal como se describe en el Ejemplo 5 (es decir, en acetato de sodio 20 mM, pH 4,0) de al menos 50 °C. En otras realizaciones particulares adicionales, la Tf es de al menos 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o de al menos 100 °C.

5 Estabilidad frente al vapor

La estabilidad frente al vapor se puede determinar tal como se describe en el Ejemplo 6 determinando la actividad residual de las moléculas de proteasa después de un tratamiento con vapor a 85 °C o 90 °C durante un período corto.

Estabilidad frente a la microgranulación

- 10 La estabilidad frente a la microgranulación se puede determinar tal como se describe en el Ejemplo 7 usando granulado enzimático premezclado con pienso. Al salir de la mezcladora, el pienso se acondiciona con vapor a 95 °C. Una vez acondicionado, el pienso se comprime en forma de microgránulos y se determina la actividad residual.

Fuentes de polipéptidos que tienen actividad proteasa

- 15 Un polipéptido que tiene actividad proteasa según la presente invención se puede obtener de microorganismos de cualquier género. A los efectos de la presente invención, la expresión "obtenido a partir de", tal como se usa en el presente documento con relación a una fuente determinada, significará que el polipéptido codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado el polinucleótido procedente de la fuente. En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente determinada se secreta extracelularmente.

- 20 El polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido que tiene actividad proteasa procedente de una bacteria grampositiva dentro de un filo como Actinobacteria o procedente de una bacteria gramnegativa dentro de un filo tal como Proteobacteria.

En un aspecto, el polipéptido es una proteasa procedente de una bacteria del orden Bacillales o procedente de la familia Bacillaceae o procedente del género Bacillus.

- 25 Se entenderá que, para las especies mencionadas anteriormente, la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de la especie con el cual se los conoce. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

- 30 El público puede acceder fácilmente a cepas de estas especies en varias colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

- 35 El polipéptido se puede identificar y obtener a partir de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, composts, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente a partir de materiales naturales (por ejemplo, tierra, composts, agua, etc.) usando las sondas mencionadas anteriormente. En la materia son muy conocidas las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente a partir de hábitats naturales. Un polinucleótido que codifica el polipéptido se puede obtener entonces cribando de manera similar una colección de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o una muestra de ADN mixto. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica el polipéptido con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia (remítase, por ejemplo, a Sambrook et al., 1989, mencionado anteriormente).

Polinucleótidos

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican un polipéptido de la presente invención tal como se describe en el presente documento. En una realización, se ha aislado el polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención.

- 45 Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido son conocidas en la materia e incluyen el aislamiento a partir de ADN genómico o ADNc, o una combinación de estos. La clonación de los polinucleótidos a partir de ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la conocidísima reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cribando con anticuerpos colecciones de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Remítase, por ejemplo, a Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden usar otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada por ligamiento (LAT) y amplificación basada en polinucleótido (NASBA). Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de Bacillus o un organismo relacionado de Bacillales y, por tanto, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región que codifica el polipéptido del polinucleótido.

Construcciones de ácido nucleico

La presente invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido de la presente invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula hospedadora adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

- 5 El polinucleótido se puede manipular de diferentes maneras para hacer posible la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos que utilizan métodos de ADN recombinante son muy conocidas en la materia.

- 10 La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula hospedadora para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. El promotor contiene secuencias de control de la transcripción que regulan la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora, incluidos promotores mutantes, truncados e híbridos y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sean homólogos o heterólogos respecto a la célula hospedadora.

- 15 Son ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula hospedadora bacteriana los promotores obtenidos a partir del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyA4), gen de levansacarasa de *Bacillus subtilis* (sacB), genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, gen cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, *Molecular Microbiology* 13: 97-107), operón lac de *E. coli*, promotor trc de *E. coli* (Egon et al., 1988, *Gene* 69: 301-315), gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA) y gen de beta-lactamasa procariota (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25). Se describen más promotores en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, *Scientific American* 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, mencionado anteriormente. En el documento de patente WO 99/43835 se divulgan ejemplos de promotores en tándem.

- 30 Son ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula hospedadora de tipo hongo filamentoso los promotores obtenidos a partir de los genes de la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (glaA), TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* y factor de elongación de la traducción de *Trichoderma reesei*, así como también el promotor de NA2-tpi (un promotor modificado procedente de un gen de la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* en el que la secuencia líder no traducida se ha remplazado con una secuencia líder no traducida procedente de un gen de la triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus*; los ejemplos no limitantes incluyen promotores modificados procedentes de un gen de la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el que la secuencia líder no traducida se ha remplazado con una secuencia líder no traducida procedente de un gen de la triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores híbridos, truncados y mutados de estos. Se describen otros promotores en la patente de EE. UU. n.º 6 011 147.

- 45 En un hospedador de tipo levadura, los promotores útiles se obtienen a partir de los genes de la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactocinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol-deshidrogenasa/glicer aldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triosa-fosfato-isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y 3-fosfoglicerato-cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células hospedadoras de tipo levadura se describen en Romanos et al., 1992, *Yeast* 8: 423-488.

- 50 La secuencia de control también puede ser un terminador de la transcripción, que es reconocido por una célula hospedadora para terminar la transcripción. El terminador está unido operativamente al extremo 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. En la presente invención se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula hospedadora.

- 55 Los terminadores preferidos para las células hospedadoras bacterianas se obtienen a partir de los genes de la proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (aprH), alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL) y ARN ribosómico de *Escherichia coli* (rrnB).

- Los terminadores preferidos para las células hospedadoras de tipo hongo filamentoso se obtienen a partir de los genes de la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y el factor de elongación de la traducción de *Trichoderma reesei*.
- Los terminadores preferidos para las células hospedadoras de tipo levadura se obtienen a partir de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células hospedadoras de tipo levadura se describen en Romanos et al., 1992, mencionado anteriormente.
- La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm en dirección 3' respecto a un promotor y en dirección 5' respecto a la secuencia codificante de un gen que incrementa la expresión del gen.
- Se obtienen ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas a partir de un gen cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471).
- La secuencia de control también puede ser una secuencia líder, una región no traducida de un ARNm que sea importante para la traducción por parte de la célula hospedadora. La secuencia líder está unida operativamente al extremo 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Se puede usar cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula hospedadora.
- Las secuencias líder preferidas para las células hospedadoras de tipo hongo filamento se obtienen a partir de los genes de TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- Las secuencias líder adecuadas para las células hospedadoras de tipo levadura se obtienen a partir de los genes de la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol-deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.
- La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia unida operativamente al extremo 3' del polinucleótido y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula hospedadora como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula hospedadora.
- Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células hospedadoras de tipo hongo filamentoso se obtienen a partir de los genes para la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- Se describen secuencias de poliadenilación útiles para células hospedadoras de tipo levadura en Guo y Sherman, 1995, *Mol. Cellular Biol.* 15: 5983-5990.
- La secuencia de control también puede ser una región que codifique un péptido señalizador, que codifique un péptido señalizador unida al extremo N de un polipéptido y dirija el polipéptido a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener de manera intrínseca una secuencia que codifique un péptido señalizador unida de manera natural en el marco de lectura de la traducción al segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. Como alternativa, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia que codifica un péptido señalizador que es exógena respecto a la secuencia codificante. Puede ser necesaria una secuencia que codifica un péptido señalizador exógena cuando la secuencia codificante no contenga de manera natural una secuencia que codifica un péptido señalizador. Como alternativa, una secuencia que codifica un péptido señalizador exógena puede simplemente remplazar la secuencia que codifica el péptido señalizador natural con el fin de potenciar la secreción del polipéptido. Sin embargo, se puede usar cualquier secuencia que codifica el péptido señalizador que dirija al polipéptido expresado a la ruta secretora de una célula hospedadora.
- Las secuencias que codifican un péptido señalizador eficaces para células hospedadoras bacterianas son las secuencias que codifican un péptido señalizador obtenidas a partir de los genes de la amilasa maltogénica NCIB 11837 de *Bacillus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y prsA de *Bacillus subtilis*. Se describen péptidos señalizadores adicionales en Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.
- Son secuencias que codifican los péptidos señalizadores eficaces para las células hospedadoras de tipo hongo filamentoso las secuencias que codifican el péptido señalizador obtenidas a partir de los genes de amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola*

insolens, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

Los péptidos señalizadores útiles para las células hospedadoras de tipo levadura se obtienen a partir de los genes del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y de la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se describen otras secuencias que codifican un péptido señalizador útiles en Romanos et al., 1992, mencionada anteriormente.

La secuencia de control también puede ser una secuencia que codifica un propéptido, la cual codifica un propéptido situado en el extremo N de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o un propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Generalmente, un propolipéptido es inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo mediante la escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La secuencia que codifica el propéptido se puede obtener a partir de los genes de proteasa alcalina (aprE) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (nprT) de *Bacillus subtilis*, lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cuando están presentes las secuencias del péptido señalizador y del propéptido, la secuencia del propéptido se sitúa junto al extremo N de un polipéptido y la secuencia del péptido señalizador se sitúa junto al extremo N de la secuencia de propéptido.

También puede desearse la incorporación de secuencias reguladoras que regulen la expresión del polipéptido en relación con el crecimiento de la célula hospedadora. Son ejemplos de secuencias reguladoras aquellas que provocan que se active o desactive la expresión del gen como respuesta a un estímulo físico o químico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Las secuencias reguladoras en sistemas procariotas incluyen los sistemas operadores lac, tac, y trp. En levaduras, se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En los hongos filamentosos, se pueden usar el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de la TAKA-alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*, el promotor de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* y el promotor de la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En los sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la dihidrofolato-reductasa, que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de las metalotioneínas, que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido estaría unido operativamente a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales terminadoras de la transcripción y la traducción. Los diversos nucleótidos y secuencias de control pueden unirse entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción del o la sustitución con el polinucleótido que codifica el polipéptido en dichos sitios. Como alternativa, el polinucleótido se puede expresar insertando el polinucleótido o una construcción de ácido nucleico que comprenda el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Cuando se crea el vector de expresión, la secuencia codificante se sitúa en el vector de modo que la secuencia codificante esté unida operativamente a las secuencias de control adecuadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o un virus) que se pueda someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y que pueda propiciar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá habitualmente de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que se va a introducir el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para garantizar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el (los) cromosoma(s) en el (los) que ha sido integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que contengan de forma conjunta el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula hospedadora o un transposón.

El vector contiene preferentemente uno o más marcadores de selección que permiten una selección sencilla de las células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador de selección es un gen cuyo producto proporciona resistencia a virus o biocidas, resistencia a metales pesados, prototrofia a los auxótrofos y similares.

Son ejemplos de marcadores de selección bacterianos los genes dal de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomicina o tetraciclina. Algunos marcadores adecuados para células hospedadoras de tipo levadura incluyen, sin carácter limitante, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores de selección para uso en una célula hospedadora de tipo hongo filamentoso incluyen, sin carácter limitante, adeA (fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa), adeB (fosforribosil-aminoimidazol sintasa), amdS (acetamidasa), argB (ornitina-carbamoyltransferasa), bar (fosfinotricina-acetiltransferasa), hph (higromicina-fosfotransferasa), niaD (nitrato-reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), sC (sulfato-adeniltransferasa) y trpC (antranilato sintasa), así

como equivalentes de estos. Para su uso en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*. Para su uso en una célula de *Trichoderma* se prefieren los genes *adeA*, *adeB*, *amdS*, *hph* y *pyrG*.

5 El marcador de selección puede ser un sistema marcador de selección dual como el descrito en el documento de patente WO 2010/039889. En un aspecto, el marcador de selección dual es un sistema marcador de selección dual *hph-tk*.

El vector contiene preferentemente un elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

10 Para la integración en el genoma de la célula hospedadora, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Como alternativa, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora en una ubicación (ubicaciones) concreta(s) en el (los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación concreta, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 15 10.000 pares de bases, de 400 a 10.000 pares de bases y de 800 a 10.000 pares de bases, que poseen un grado de identidad de secuencias elevado respecto a la secuencia diana correspondiente para potenciar la probabilidad de una recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga respecto a la secuencia diana en el genoma de la célula hospedadora. Además, los elementos de integración pueden ser polinucleótidos codificantes o no codificantes. Por otra parte, el vector puede integrarse en el genoma de la 20 célula hospedadora mediante recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita que el vector se replique de manera autónoma en la célula hospedadora en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plasmídico que medie en la replicación autónoma que esté en funcionamiento en una célula. La expresión "origen de replicación" o "replicador plasmídico" se refiere a un polinucleótido que hace posible que un 25 plásmido o vector se replique in vivo.

Son ejemplos de orígenes de replicación bacterianos los orígenes de replicación de los plásmidos *pBR322*, *pUC19*, *pACYC177* y *pACYC184* que permiten la replicación en *E. coli*, y *pUB110*, *pE194*, *pTA1060*, y *pAM β 1* que permiten la replicación en *Bacillus*.

30 Son ejemplos de orígenes de replicación que se pueden usar en células hospedadoras de tipo levadura los orígenes de replicación de 2 micrómetros *ARS1*, *ARS4*, la combinación de *ARS1* y *CEN3* y la combinación de *ARS4* y *CEN6*.

Son ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula de tipo hongo filamentoso *AMA1* y *ANS1* (Gems et al., 1991, *Gene* 98: 61-67; Cullen et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen *AMA1* y la construcción de plásmidos o vectores que comprendan el gen se pueden lograr de acuerdo con los métodos divulgados en el documento de patente WO 00/24883.

35 Puede insertarse más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula hospedadora para incrementar la producción de un polipéptido. Se puede conseguir un incremento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora o incluyendo un gen marcador de selección que se puede amplificar con el polinucleótido, donde las células que contengan copias amplificadas del gen marcador de selección y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, se puedan 40 seleccionar cultivando las células en presencia del agente de selección adecuado.

Los expertos en la técnica estarán muy familiarizados con los procedimientos usados para unir los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinante de la presente invención (remítase, por ejemplo, a Sambrook et al., 1989, mencionado anteriormente).

Células hospedadoras

45 La presente invención también se refiere a células hospedadoras recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Se introduce una construcción o vector que comprende un polinucleótido en una célula hospedadora, de tal forma que la construcción o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante, tal como se ha descrito anteriormente. La expresión "célula 50 hospedadora" abarca cualquier progenie de una célula precursora que no sea idéntica a la célula precursora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula hospedadora dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y de su fuente.

La célula hospedadora puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

La célula hospedadora procariota puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, sin carácter limitante, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, sin carácter limitante, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

La célula hospedadora bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* que incluye, sin carácter limitante, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

La célula hospedadora bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*, que incluye, sin carácter limitante, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

La célula hospedadora bacteriana puede ser cualquier célula de *Streptomyces* que incluye, sin carácter limitante, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede efectuarse mediante transformación de protoplastos (remítase, por ejemplo, a Chang y Cohen, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115), transformación de células competentes (remítase, por ejemplo, a, Young y Spizizen, 1961, *J. Bacteriol.* 81: 823-829 o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *J. Mol. Biol.* 56: 209-221), electroporación (remítase, por ejemplo, a Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), o conjugación (remítase, por ejemplo, a, Koehler y Thorne, 1987, *J. Bacteriol.* 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede efectuarse por transformación de protoplastos (remítase, por ejemplo, a Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580) o electroporación (remítase, por ejemplo, a Dower et al., 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede efectuarse mediante transformación de protoplastos, electroporación (remítase, por ejemplo, a Gong et al., 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405), conjugación (remítase, por ejemplo, a Mazodier et al., 1989, *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585) o transducción (remítase, por ejemplo, a Burke et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede efectuarse mediante electroporación (remítase, por ejemplo, a Choi et al., 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) o conjugación (remítase, por ejemplo, a Pinedo y Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede efectuarse mediante competencia natural (remítase, por ejemplo, a Perry y Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (remítase, por ejemplo, a Catt y Jollick, 1991, *Microbios* 68: 189-207) o electroporación (remítase, por ejemplo, a Buckley et al., 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3800-3804) o conjugación (remítase, por ejemplo, a Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45: 409-436). Sin embargo, puede usarse cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula hospedadora.

La célula hospedadora también puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica.

La célula hospedadora puede ser una célula fúngica. El término "hongos", tal como se usa en el presente documento, incluye los filos de ascomicetos, basidiomicetos, quitridiomicetos y zigomicetos, así como también los oomicetos y todos los hongos mitospóricos (como se definen en Hawksworth et al., En, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8.^a edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

La célula hospedadora fúngica puede ser una célula de tipo levadura. El término "levadura", tal como se usa en el presente documento, incluye levaduras que se reproducen por ascosporas (endomicetales), levaduras que se reproducen por basidiosporas y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (blastomicetos). Dado que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, a efectos de esta invención, la levadura se definirá tal como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, Passmore y Davenport, editores, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series n.º 9, 1980).

La célula hospedadora de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* o *Yarrowia lipolytica*.

La célula hospedadora de tipo hongo puede ser una célula de tipo hongo filamentoso. La expresión "hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión de los eumicetos y oomicetos (tal como se definen por Hawksworth et al., 1995, mencionado anteriormente). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por tener una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo tiene lugar mediante el alargamiento de la hifa y el catabolismo del carbono es estrictamente aerobio. Por el contrario, el crecimiento vegetativo en levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* tiene lugar mediante gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

La célula hospedadora de tipo hongo filamentoso puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

Por ejemplo, la célula hospedadora de tipo hongo filamentoso puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocincta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que conlleva la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera de por sí conocida. Se describen procedimientos adecuados para la transformación de células hospedadoras de *Aspergillus* y *Trichoderma* en el documento de patente EP 238023, Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474 y Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Se describen métodos adecuados de transformación de especies de *Fusarium* en Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y el documento de patente WO 96/00787. Las levaduras pueden transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

Métodos de producción

La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula, que en su forma no modificada produce el polipéptido, en condiciones propicias para la producción del polipéptido; (b) opcionalmente aislar el polipéptido; y (c) recuperar el polipéptido. En un aspecto, la célula es una célula de *Bacillus*. En otro aspecto, la célula es una célula de *Bacillus horneckiae*.

La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) cultivar una célula hospedadora de *Bacillus* que comprende un polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido de la presente invención, donde se expresa el polinucleótido y se produce el polipéptido;
- (b) opcionalmente aislar el polipéptido; y
- (c) opcionalmente recuperar el polipéptido.

En una realización, la célula hospedadora *Bacillus* se selecciona a partir de la lista que consiste en *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*. En una realización preferida, la célula hospedadora *Bacillus* recombinante se selecciona a partir de la lista que consiste en *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*.

Las células hospedadoras se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden cultivarse mediante cultivo en matraz agitado o fermentación a pequeña o a gran escala (incluidas fermentaciones continuas, discontinuas, semicontinuas o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión y/o aislamiento del polipéptido. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados se pueden adquirir de proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con las composiciones publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la Colección de Cultivos Tipo Estadounidense). Si el polipéptido se secreta en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se secreta, se puede recuperar a partir de los lisados celulares.

El polipéptido se puede detectar usando métodos comunes en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección incluyen, sin carácter limitante, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un

producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido.

5 El polipéptido se puede recuperar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, sin carácter limitante, recogida, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. En un aspecto, se recupera un caldo de fermentación que comprende el polipéptido.

10 El polipéptido se puede purificar mediante varios procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, sin carácter limitante, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (remítase, por ejemplo, a Protein Purification, Janson y Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

En un aspecto alternativo, el polipéptido no se recupera, sino que en su lugar se usa una célula hospedadora de la presente invención que expresa el polipéptido como una fuente del polipéptido.

Plantas

15 La presente invención también se refiere a plantas aisladas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de una planta o célula vegetal, que comprende un polinucleótido de la presente invención para expresar y producir así un polipéptido o dominio en cantidades recuperables. El polipéptido o dominio se puede recuperar de la planta o parte de una planta. Como alternativa, la planta o parte de una planta que contiene el polipéptido o dominio se puede usar tal cual para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorando el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

20 La planta transgénica puede ser una dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). Son ejemplos de plantas monocotiledóneas las gramíneas, tales como la espiguilla (pasto azul, Poa), pasto forrajero tal como Festuca, Lolium, pasto de zonas templadas, tal como Agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

25 Son ejemplos de plantas dicotiledóneas el tabaco, legumbres, como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tales como la coliflor, semilla de colza y el organismo modelo estrechamente relacionado Arabidopsis thaliana.

30 Son ejemplos de partes de una planta el tallo, callos, hojas, raíces, frutos, semillas y tubérculos, así como también los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas.

Las células vegetales y compartimientos de células vegetales específicos, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondrias, vacuolas, peroxisomas y citoplasma también se consideran parte de una planta.

También se incluyen dentro del alcance de la presente invención la progenie de dichas plantas, partes de una planta y células vegetales.

35 La planta transgénica o célula vegetal que expresa el polipéptido o dominio se puede construir según métodos conocidos en la técnica.

40 La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido o dominio de la presente invención que comprenden (a) cultivar una planta o célula vegetal transgénica que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido o dominio en condiciones propicias para la producción del polipéptido o dominio; y (b) recuperar el polipéptido o dominio, en donde el polinucleótido exógeno se integra en el cromosoma de las células hospedadoras y se une operativamente con un promotor.

Formulaciones de caldos de fermentación o composiciones celulares

45 La presente invención también se refiere a una formulación de un caldo de fermentación o una composición celular que comprende un polipéptido de la presente invención. El producto de tipo caldo de fermentación comprende, además, ingredientes adicionales usados en el proceso de fermentación tales como, por ejemplo, células (incluidas las células hospedadoras que contienen el gen que codifica el polipéptido de la presente invención que se usan para producir el polipéptido de interés), desechos celulares, biomasa, medio de fermentación y/o productos de fermentación. En algunas realizaciones, la composición es un caldo completo de células inertes que contiene uno o más ácidos orgánicos, células inertes y/o desechos celulares, y medio de cultivo.

50 La expresión "caldo de fermentación", tal como se usa en la presente, se refiere a un preparado producido mediante fermentación celular que se somete a una recuperación y/o purificación mínima o nula. Por ejemplo, se producen caldos de fermentación cuando se cultivan cultivos microbianos hasta la saturación, se incuban en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas (por ejemplo, la expresión de enzimas por parte de las células hospedadoras) y la secreción al medio de cultivo celular. El caldo de fermentación puede contener contenidos no

fraccionados o fraccionados de los materiales de fermentación obtenidos al final de la fermentación. Normalmente, el caldo de fermentación no está fraccionado y comprende el medio de cultivo agotado y desechos celulares presentes después de haber retirado las células microbianas (por ejemplo, células de tipo hongo filamentoso), por ejemplo, mediante centrifugación. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación contiene medio de cultivo celular agotado, enzimas extracelulares y células microbianas viables y/o no viables.

En una realización, la formulación del caldo de fermentación y las composiciones celulares comprenden un primer componente de tipo ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1-5 carbonos y/o una sal de este y un segundo componente de tipo ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 6 o más carbonos y/o una sal de este. En una realización específica, el primer componente de tipo ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal de estos o una mezcla de dos o más de los anteriores, y el segundo componente de tipo ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal de estos o una mezcla de dos o más de los anteriores.

En un aspecto, la composición contiene uno o más ácidos orgánicos y opcionalmente contiene además células inertes y/o desechos celulares. En una realización, las células inertes y/o desechos celulares se retiran de un caldo completo de células inertes para proporcionar una composición que esté exenta de estos componentes.

Las formulaciones de caldos de fermentación o las composiciones celulares pueden comprender además un agente conservante y/o antimicrobiano (por ejemplo, bacteriostático), incluidos, sin carácter limitante, sorbitol, cloruro de sodio, sorbato de potasio y otros conocidos en la técnica.

La composición o caldo completo de células inertes puede contener los contenidos no fraccionados de los materiales de fermentación obtenidos al final de la fermentación. Normalmente, la composición o caldo completo de células inertes contiene el medio de cultivo agotado y los desechos celulares presentes después de que las células microbianas (por ejemplo, células de tipo hongo filamentoso) se hayan cultivado hasta la saturación, incubadas en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas. En algunas realizaciones, la composición o caldo completo de células inertes contiene el medio de cultivo celular agotado, enzimas extracelulares y células de tipo hongo filamentoso inertes. En algunas realizaciones, las células microbianas presentes en la composición o caldo completo de células inertes se pueden permeabilizar y/o lisar usando métodos conocidos en la técnica.

Una composición celular o caldo completo según se describe en la presente es normalmente un líquido, pero puede contener componentes insolubles tales como células inertes, desechos celulares, componentes de medios de cultivo y/o enzima(s) insoluble(s). En algunas realizaciones, se pueden retirar los componentes insolubles para proporcionar una composición líquida aclarada.

Las formulaciones de caldo completo y composiciones celulares de la presente invención se pueden producir mediante un método descrito en el documento de patente WO 90/15861 o WO 2010/096673.

Composiciones enzimáticas

La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención. Preferentemente, las composiciones están enriquecidas en el polipéptido de la invención. El término "enriquecido" indica que la actividad proteasa de la composición se ha incrementado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1, tal como de al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 2,0, al menos 3,0, al menos 4,0, al menos 5,0, al menos 10.

Formulación

La enzima de la invención se puede formular como un líquido o un sólido. Para una formulación líquida, el agente de formulación puede comprender un poliol (tal como, por ejemplo, glicerol, etilenglicol o propilenglicol), una sal (tal como, por ejemplo, cloruro de sodio, benzoato de sodio, sorbato de potasio) o un azúcar o derivado de azúcar (tal como, por ejemplo, dextrina, glucosa, sacarosa y sorbitol). Por tanto, en una realización, la composición es una composición líquida que comprende el polipéptido de la invención y uno o más agentes de formulación seleccionados a partir 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. La formulación líquida se puede pulverizar sobre el pienso después de que se haya granulado o se puede añadir al agua de beber proporcionada a los animales.

Para una formulación sólida, la formulación puede estar, por ejemplo, en forma de un gránulo, polvo secado por pulverización o aglomerado (por ejemplo, tal como se divulga en el documento de patente WO00/70034). El agente de formulación puede comprender una sal (sales orgánicas o inorgánicas de cinc, sodio, potasio o calcio tales como, por ejemplo, acetato de calcio, benzoato de calcio, carbonato de calcio, 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 de sodio, benzoato de sodio, carbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, sulfato de sodio, acetato de cinc, benzoato de cinc, carbonato de cinc, cloruro de cinc, citrato de cinc, sorbato de cinc o sulfato de cinc), almidón o un azúcar o derivado de azúcar (tal como, por ejemplo, sacarosa, dextrina, glucosa, lactosa o sorbitol).

En una realización, la composición es una composición sólida, tal como una composición secada por pulverización, que comprende la proteasa de la invención y uno o más agentes de formulación seleccionados a partir 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 realización preferida, el agente de formulación se selecciona a partir de uno o más de los siguientes compuestos: sulfato de sodio, dextrina, celulosa, tiosulfato de sodio, sulfato de magnesio y carbonato de calcio.

La presente invención también se refiere a gránulos/partículas enzimáticos que comprenden la lisozima de la invención, opcionalmente combinados con una o más enzimas adicionales. El gránulo se compone de un núcleo y opcionalmente uno o más recubrimientos (capas externas) que rodean al núcleo.

Normalmente, el tamaño de gránulo/partícula, medido como el diámetro esférico equivalente (tamaño promedio de partícula basado en el volumen), del gránulo es de 20-2000 μm , particularmente 50-1500 μm , 100-1500 μm o 250-1200 μm .

El núcleo se puede preparar granulando una mezcla de los ingredientes, por ejemplo, mediante un método que comprende técnicas de granulación tales como cristalización, precipitación, recubrimiento en cubeta, recubrimiento en lecho fluido, aglomeración en lecho fluido, atomización rotatoria, extrusión, compresión, esferonización, métodos de reducción del tamaño, granulación en tambor y/o granulación de alta cizalladura.

Se pueden consultar métodos de preparación del núcleo en Handbook of Powder Technology; Particle size enlargement de C. E. Capes; volumen 1; 1980; Elsevier. Los métodos de preparación incluyen tecnologías conocidas de formulación de piensos y gránulos, por ejemplo:

a) productos secados por pulverización, en donde una disolución líquida que contiene la enzima se atomiza en una torre de secado por pulverización para formar microgotas que durante su trayecto descendente por la torre de secado se secan para formar un material particulado que contiene la enzima;

b) productos estratificados, en donde la enzima está en forma de una capa que recubre una partícula central inerte preformada, donde una disolución que contiene la enzima se atomiza, habitualmente en un aparato de lecho fluido donde las partículas centrales preformadas están fluidificadas, y la disolución que contiene la enzima se adhiere a las partículas centrales y se seca para dejar una capa de enzima seca sobre la superficie de la partícula central. Se pueden obtener partículas de un tamaño deseado de esta manera si se puede encontrar una partícula central útil del tamaño deseado. Este tipo de producto se describe en, por ejemplo, el documento de patente WO 97/23606;

c) partículas centrales absorbidas, en donde en lugar de tener la enzima como una capa que recubre el núcleo, la enzima se absorbe sobre y/o en el interior de la superficie del núcleo. Dicho proceso se describe en el documento de patente WO 97/39116;

d) productos de extrusión o granulados, en donde una pasta que contiene la enzima se prensa para obtener mini-gránulos o se extruye a presión a través de una pequeña abertura y se corta en partículas que posteriormente se secan. Dichas partículas habitualmente tienen un tamaño considerable debido a que el material en el que se realiza la apertura de extrusión (habitualmente una placa con orificios perforados) fija un límite sobre la caída de presión que se puede permitir sobre la apertura de extrusión. Además, las presiones de extrusión muy elevadas cuando se usa una apertura pequeña aumentan la generación de calor en la pasta enzimática, lo que es dañino para la enzima;

e) productos aglomerados, en donde un polvo que contiene la enzima se suspende en cera fundida y la suspensión se pulveriza, por ejemplo, a través de un atomizador de disco giratorio, en una cámara de refrigeración donde las microgotas solidifican rápidamente (Michael S. Showell (editor); Powdered detergents; Surfactant Science Series; 1998; vol. 71; página 140-142; Marcel Dekker). El producto obtenido es uno en donde la enzima está distribuida uniformemente por todo el material inerte en lugar de concentrarse sobre su superficie. Los documentos US 4 016 040 y US 4 713 245 también se refieren a esta técnica;

f) productos de granulación en mezcladora, en donde un líquido se añade a una composición de polvo seco de, por ejemplo, componentes de granulación convencionales, introduciéndose la enzima mediante el líquido o el polvo o ambos. El líquido y el polvo se mezclan y según se absorbe la humedad del líquido en el polvo seco, los componentes del polvo seco empiezan a adherirse y aglomerarse y se acumulan partículas, con lo que se forman gránulos que comprenden la enzima. Dicho proceso se describe en el documento US 4 106 991 y los documentos relacionados EP 170360, EP 304332, EP 304331, WO 90/09440 y WO 90/09428. En un producto particular de este proceso, donde pueden usarse diversas mezcladoras de alto corte como granuladores, se mezclan gránulos constituidos por la enzima, rellenos y aglutinantes, etc., con fibras de celulosa para reforzar las partículas para obtener el denominado granulado en T. Las partículas reforzadas, que son más robustas, liberan menos polvo enzimático.

g) reducción del tamaño, en donde los núcleos se producen por molienda o trituración de partículas más grandes, minigránulos, comprimidos, briquetas, etc., que contienen la enzima. La fracción de partículas centrales deseada se obtiene por tamizado del producto molido o triturado. Las partículas de tamaño excesivo e insuficiente pueden

reciclarse. La reducción de tamaño se describe en (Martin Rhodes (editor); Principles of Powder Technology; 1990; Capítulo 10; John Wiley & Sons);

5 h) granulación en lecho fluido, que conlleva suspender particulados en una corriente de aire y pulverizar un líquido sobre las partículas fluidificadas mediante boquillas. Las partículas golpeadas por las microgotas de pulverización quedan humedecidas y se vuelven pegajosas. Las partículas pegajosas colisionan con otras partículas, se adhieren a ellas y forman un gránulo;

10 i) los núcleos pueden someterse a secado, tal como en una secadora de lecho fluido. Los expertos en la materia pueden usar otros métodos conocidos para secar gránulos en la industria de piensos o detergentes. El secado preferentemente tiene lugar a una temperatura del producto de 25 a 90 °C. Para algunas enzimas, es importante que los núcleos que comprenden la enzima contengan una cantidad baja de agua antes del recubrimiento. Si se usan para recubrir enzimas sensibles al agua antes de retirar el exceso de agua, quedará atrapada dentro del núcleo y puede afectar a la actividad de la enzima de manera negativa. Después del secado, los núcleos contienen preferiblemente un 0,1-10 % p/p de agua.

15 El núcleo puede incluir materiales adicionales tales como rellenos, materiales fibrosos (fibras de celulosa o sintéticas), agentes estabilizantes, agentes solubilizantes, agentes de suspensión, agentes que regulan la viscosidad, esferas ligeras, plastificantes, sales, lubricantes y fragancias.

El núcleo puede incluir un aglutinante, tal como polímero sintético, cera, grasa o hidrato de carbono.

El núcleo puede incluir una sal de un catión multivalente, un agente reductor, un antioxidante, un catalizador de la descomposición de peróxido y/o un componente de tampón ácido, habitualmente como una mezcla homogénea.

20 En una realización, el núcleo comprende un material seleccionado a partir del grupo que consiste en sales (tales como acetato de calcio, benzoato de calcio, carbonato de calcio, 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 de sodio, benzoato de sodio, carbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, sulfato de sodio, acetato de cinc, benzoato de cinc, carbonato de cinc, cloruro de cinc, citrato de cinc, sorbato de cinc, sulfato de cinc), almidón o un azúcar o derivado de azúcar (tal como, por ejemplo, sacarosa, dextrina, glucosa, lactosa, sorbitol), azúcar o derivado de azúcar (tal como, por ejemplo, sacarosa, dextrina, glucosa, lactosa, sorbitol), moléculas orgánicas de bajo peso molecular, almidón, harina, celulosa y minerales y minerales arcillosos (también conocidos como filosilicatos de aluminio hidratados). En una realización, el núcleo comprende un mineral arcilloso tal como caolinita o caolín.

30 El núcleo puede incluir una partícula inerte con la enzima absorbida sobre ella, o aplicada sobre la superficie, por ejemplo, por recubrimiento en lecho fluido.

El núcleo puede tener un diámetro de 20-2000 µm, particularmente 50-1500 µm, 100-1500 µm o 250-1200 µm.

35 El núcleo puede estar rodeado por al menos un recubrimiento, por ejemplo, para mejorar la estabilidad en el almacenamiento, para reducir la formación de polvo durante la manipulación, o para colorear el gránulo. El (Los) recubrimiento(s) opcional(es) puede(n) incluir un recubrimiento salino y/o céreo y/o de harina, u otros materiales de recubrimiento adecuados.

El recubrimiento puede aplicarse en una cantidad de al menos un 0,1 % en peso del núcleo, por ejemplo, de al menos un 0,5 %, 1 % o 5 %. La cantidad puede ser de como máximo un 100 %, 70 %, 50 %, 40 % o un 30 %.

40 El recubrimiento tiene preferentemente un grosor de al menos 0,1 µm, particularmente de al menos 0,5 µm, de al menos 1 µm o de al menos 5 µm. En algunas realizaciones, el grosor del recubrimiento es inferior a 100 µm, tal como inferior a 60 µm o inferior a 40 µm.

45 El recubrimiento debe encapsular la unidad central formando una capa sustancialmente continua. Se debe entender que una capa sustancialmente continua es un recubrimiento que tiene pocos o ningún orificio, de modo que la unidad central se encapsule o encierre con pocas o ninguna zona no recubierta. En una realización particular, la capa o recubrimiento debe tener un grosor homogéneo.

El recubrimiento puede contener además otros materiales tal como existe constancia en la técnica, por ejemplo, rellenos, agentes antiadherentes, pigmentos, tintes, plastificantes y/o aglutinantes, tales como dióxido de titanio, caolín, carbonato de calcio o talco.

50 Un recubrimiento salino puede comprender al menos un 60 % en peso de una sal, por ejemplo, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % en peso.

La sal puede añadirse a partir de una solución salina donde la sal está completamente disuelta o a partir de una suspensión salina donde las partículas finas son menores de 50 µm, tal como menores de 10 µm o menores de 5 µm.

El recubrimiento salino puede comprender una única sal o una mezcla de dos o más sales. La sal puede ser hidrosoluble, en particular tener una solubilidad de al menos 0,1 g en 100 g de agua a 20 °C, preferentemente al menos 0,5 g por 100 g de agua, por ejemplo, al menos 1 g por 100 g de agua, por ejemplo, al menos 5 g por 100 g de agua.

La sal puede ser una sal inorgánica, por ejemplo, sales de sulfato, sulfito, fosfato, fosfonato, nitrato, cloruro o carbonato, o sales de ácidos orgánicos simples (menos de 10 átomos de carbono, por ejemplo, 6 o menos átomos de carbono) tales como citrato, malonato o acetato. Son ejemplos de cationes en estas sales los iones de metales alcalinos o alcalinotérreos, el ion amonio o iones de metales de la primera serie de transición, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio, cinc o aluminio. Los ejemplos de aniones incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, sulfito, bisulfito, tiosulfato, fosfato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, hipofosfito, dihidrogenopirofosfato, tetraborato, borato, carbonato, bicarbonato, metasilicato, citrato, malato, maleato, malonato, succinato, sorbato, lactato, formiato, acetato, butirato, propionato, benzoato, tartrato, ascorbato o gluconato. En particular se pueden usar sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de sulfato, sulfito, fosfato, fosfonato, nitrato, cloruro o carbonato, o sales de ácidos orgánicos simples tales como citrato, malonato o acetato.

La sal en el recubrimiento puede tener una humedad constante a 20 °C superior a un 60 %, particularmente superior a un 70 %, superior a un 80 % o superior a un 85 %, o puede ser otra forma hidratada de una sal de este tipo (por ejemplo, anhidrato). El recubrimiento salino puede ser tal como se describe en los documentos de patente WO 97/05245, WO 98/54980, WO 98/55599, WO 00/70034, WO 2006/034710, WO 2008/017661, WO 2008/017659, WO 00/20569, WO 01/004279, WO 97/05245, WO 00/01793, WO 2003/059086, WO 2003/059087, WO 2007/031483, WO 2007/031485, WO 2007/044968, WO 2013/192043, WO 2014/014647 y WO 2015/197719, o un recubrimiento polimérico tal como se describe en el documento de patente WO 01/00042.

Son ejemplos específicos de sales adecuadas NaCl (CH20°C=76 %), Na2CO3 (CH20°C=92 %), NaNO3 (CH20°C=73 %), Na2HPO4 (CH20°C=95 %), Na3PO4 (CH25°C=92 %), NH4Cl (CH20°C = 79,5 %), (NH4)2HPO4 (CH20°C = 93,0 %), NH4H2PO4 (CH20°C = 93,1 %), (NH4)2SO4 (CH20°C=81,1 %), KCl (CH20°C=85 %), K2HPO4 (CH20°C=92 %), KH2PO4 (CH20°C=96,5 %), KNO3 (CH20°C=93,5 %), Na2SO4 (CH20°C=93 %), K2SO4 (CH20°C=98 %), KHSO4 (CH20°C=86 %), MgSO4 (CH20°C=90 %), ZnSO4 (CH20°C=90 %) y citrato de sodio (CH25°C=86 %). Otros ejemplos incluyen NaH2PO4, (NH4)H2PO4, CuSO4, Mg(NO3)2, acetato de magnesio, acetato de calcio, benzoato de calcio, carbonato de calcio, 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, acetato de sodio, benzoato de sodio, citrato de sodio, sulfato de sodio, acetato de cinc, benzoato de cinc, carbonato de cinc, cloruro de cinc, citrato de cinc y sorbato de cinc.

La sal puede estar en una forma anhidra, o puede ser una sal hidratada, es decir, una sal cristalina hidratada con agua(s) de cristalización unida(s), tal como se describe en el documento de patente WO 99/32595. Los ejemplos específicos incluyen sulfato de sodio anhidro (Na2SO4), sulfato de magnesio anhidro (MgSO4), sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO4.7H2O), sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO4.7H2O), fosfato dibásico de sodio heptahidratado (Na2HPO4.7H2O), nitrato de magnesio hexahidratado (Mg(NO3)2(6H2O)), citrato de sodio dihidratado y acetato de magnesio tetrahidratado.

Preferentemente, la sal se aplica como una disolución de la sal, por ejemplo, usando un lecho fluido.

Un recubrimiento céreo puede comprender al menos un 60 % en peso de una cera, por ejemplo, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % en peso.

Son ejemplos específicos de ceras los polietilenglicoles; polipropilenos; cera de carnauba; cera de candelilla; cera de abejas; aceite vegetal o sebo animal hidrogenados, tales como polietilenglicol (PEG), metilhidroxipropilcelulosa (MHPC), alcohol polivinílico (PVA), sebo de buey hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, semillas de algodón hidrogenadas y/o aceite de soja hidrogenado; alcoholes de ácido graso; monoglicéridos y/o diglicéridos, tales como estearato de glicerilo, en donde el estearato es una mezcla de ácido esteárico y palmítico; cera microcristalina; parafina; y ácidos grasos, tales como ácidos grasos de cadena larga lineal hidrogenados y derivados de los estos. Una cera preferida es aceite de palma o aceite de palma hidrogenado.

El gránulo puede comprender un núcleo que comprende la proteasa de la invención, uno o más recubrimientos salinos y uno o más recubrimientos céreos. Se muestran ejemplos de gránulos enzimáticos con múltiples recubrimientos en los documentos de patente WO 93/07263, WO 97/23606 y WO 2016/149636.

Pueden producirse granulados que no generan polvo, por ejemplo, tal como se divulga en las patentes de EE. UU. n.º 4.106.991 y 4.661.452 y pueden recubrirse opcionalmente mediante los métodos conocidos en la técnica. Los materiales de recubrimiento pueden ser materiales de recubrimiento céreos y materiales de recubrimiento que forman películas. Algunos ejemplos de materiales de recubrimiento céreos son los productos de tipo polióxido de etileno (polietilenglicol, PEG) con pesos moleculares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono-, di- y trigli-

céridos de ácidos grasos. En el documento de patente GB 1483591 se proporcionan ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuados para la aplicación mediante técnicas de lecho fluido.

El granulado puede comprender además una o más enzimas adicionales. Cada enzima estará entonces presente en más gránulos, lo que asegura una distribución más uniforme de las enzimas, y también reduce la segregación física de diferentes enzimas debido a diferentes tamaños de partícula. Los métodos para producir cogranulados de múltiples enzimas se divulgan en la divulgación ip.com IPCOM000200739D.

Otro ejemplo de formulación de enzimas mediante el uso de cogranulados se divulga en el documento de patente WO 2013/188331.

La presente invención también se refiere a enzimas protegidas preparadas de acuerdo con el método divulgado en el documento de patente EP 238 216.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un gránulo, que comprende:

- (a) un núcleo que comprende una proteasa de acuerdo con la invención, y
- (b) un recubrimiento que consiste en una o más capas que rodean el núcleo.

En una realización, el recubrimiento comprende un recubrimiento salino como se describe en el presente documento. En una realización, el recubrimiento comprende un recubrimiento céreo tal como se describe en el presente documento. En una realización, el recubrimiento comprende un recubrimiento salino y después un recubrimiento céreo como se describe en el presente documento.

Pienso para animales

La presente invención también se refiere a pienso para animales que comprende una o más proteasas de la invención. En una realización, la invención se refiere a pienso para animales que comprende el aditivo para pienso para animales del aspecto uno, dos o tres y material vegetal. En una realización, la invención se refiere a pienso para animales que comprende el gránulo del aspecto cuatro y material vegetal. En una realización, la invención se refiere a pienso para animales que comprende la formulación líquida del aspecto cinco y material vegetal.

La invención se refiere además a pienso para animales en microgránulos. El pienso para animales en microgránulos se puede preparar microgranulando el pienso para animales tal como se ha descrito en el párrafo anterior. Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a pienso para animales en microgránulos que comprende el aditivo para pienso para animales del aspecto uno, dos o tres y material vegetal. En una realización, la invención se refiere a pienso para animales en microgránulos que comprende el gránulo del aspecto cuatro y material vegetal. En una realización, la invención se refiere a pienso para animales en microgránulos que comprende la formulación líquida del aspecto cinco y material vegetal.

En una realización, el material vegetal comprende legumbres, cereales, avena, centeno, cebada, trigo, maíz, sorgo, pasto varilla, mijo, mijo perla, mijo cola de zorro, soja, soja silvestre, judías, altramuza, frijol tépari, frijol escarlata, frijol slimjim, frijol lima, frijol francés, haba (fava bean), garbanzo, lenteja, cacahuete, cacahuete español, canola, colza (colza oleaginosa), arroz, remolacha, col, remolacha azucarera, espinacas, quinoa o guisantes, en una forma procesada de estos (tal como harina de soja, harina de colza) o cualquier combinación de estos. En una realización preferida, el material vegetal es harina de soja.

Las composiciones de pienso o dietas para animales tienen un contenido de proteína relativamente alto. Las dietas para aves de corral y cerdos se pueden caracterizar tal como se indica en la Tabla B del documento de patente WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas para peces se pueden caracterizar tal como se indica en la columna 4 de esta Tabla B. Además, estas dietas para peces normalmente tienen un contenido de grasa cruda de 200-310 g/kg.

Una composición para pienso para animales de acuerdo con la invención tiene un contenido de proteína cruda de 50-800 g/kg y comprende además al menos una proteasa como la reivindicada en el presente documento.

Además o como alternativa (al contenido de proteína cruda indicado anteriormente), la composición para pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

En realizaciones particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está comprendido dentro de cualquiera de los intervalos 2, 3, 4 o 5 de la Tabla B del documento de patente WO 01/58275 (R. 2-5).

La proteína cruda se calcula como el nitrógeno (N) multiplicado por un factor de 6,25, es decir, proteína cruda (g/kg) = N (g/kg) × 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14.^a ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

- La energía metabolizable se puede calcular basándose en la publicación de NRC Nutrient requirements in swine, novena edición revisada de 1988, subcomité de la nutrición de suidos, comité de la nutrición de animales, consejo de agricultura y consejo nacional de investigación. National Academy Press, Washington, D.C., págs. 2-6, y la European Table of Energy Values for Poultry Feedstuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & Iooijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.
- El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en las dietas completas para animales se calcula en función de tablas de piensos tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.
- En una realización particular, la composición para pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal tal como se ha definido anteriormente.
- La composición para pienso para animales de la invención también puede contener proteína de origen animal, tal como harina de huesos y carne, harina de plumas y/o harina de pescado, normalmente en una cantidad de un 0-25 %. La composición para pienso para animales de la invención también puede comprender granos secos de destilería con solubles (DDGS), habitualmente en cantidades de un 0-30 %.
- En otras realizaciones particulares adicionales, la composición para pienso para animales contiene un 0-80 % de maíz; y/o un 0-80 % de sorgo; y/o un 0-70 % de trigo; y/o un 0-70 % de cebada; y/o un 0-30 % de avena; y/o un 0-40 % de harina de soja; y/o un 0-25 % de harina de pescado; y/o un 0-25 % de harina de huesos y carne; y/o un 0-20 % de suero lácteo.
- El pienso animal puede comprender proteínas vegetales. En realizaciones particulares, el contenido proteico de las proteínas vegetales es de al menos un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % (p/p). Las proteínas vegetales pueden proceder de fuentes de proteínas vegetales tales como legumbres y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias Fabaceae (Leguminosae), Cruciferae, Chenopodiaceae y Poaceae tales como harina de soja, harina de altramu, harina de colza y combinaciones de estas.
- En una realización, la fuente de proteínas vegetales es material de una o más plantas de la familia Fabaceae, por ejemplo, soja, altramu, guisante o judía. En otra realización, la fuente de proteínas vegetales es un material procedente de una o más plantas de la familia Chenopodiaceae, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa. Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son la colza y la col. En otra realización particular, la soja es una fuente de proteínas vegetales preferida. Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz y sorgo.
- Las dietas para animales se pueden fabricar, por ejemplo, como un pienso en puré (no en microgránulos) o pienso en microgránulos. Habitualmente, los piensos molidos se mezclan y se añaden cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales de acuerdo con las especificaciones para las especies en cuestión. Se pueden añadir enzimas como formulaciones enzimáticas líquidas o sólidas. Por ejemplo, para los alimentos en forma de puré se puede añadir una formulación enzimática líquida o sólida antes o durante la etapa de mezcla de los ingredientes. Para los piensos en microgránulos, el preparado de proteasa/enzima (líquido o sólido) también se puede añadir antes o durante la etapa de los ingredientes del pienso. Normalmente un preparado de proteasa/enzima líquido comprende la proteasa de la invención opcionalmente con un poliol, tal como glicerol, etilenglicol o propilenglicol, y se añade después de la etapa de microgranulación, tal como pulverizando la formulación líquida sobre los microgránulos. La enzima también se puede incorporar en una premezcla o aditivo para pienso.
- Como alternativa, la proteasa se puede preparar congelando una mezcla de disolución enzimática líquida con un agente espesante tal como harina de soja molida y liofilizando a continuación la mezcla.
- La concentración enzimática final en la dieta está comprendida en el intervalo de 0,01-200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, preferentemente entre 0,05-100 mg/kg de dieta, más preferentemente de 0,1-50 mg, incluso más preferentemente de 0,2-20 mg de proteína enzimática por kg de dieta para animales.
- En la actualidad, se contempla que la enzima se administre en una o más de las siguientes cantidades (intervalos posológicos): 0,01-200; 0,05-100; 0,1-50; 0,2-20; 0,1-1; 0,2-2; 0,5-5; o 1-10; siendo todos estos intervalos en mg de proteína proteasa por kg de pienso (ppm).
- Para determinar los mg de proteína proteasa por kg de pienso, la proteasa se purifica a partir de la composición para pienso, y se determina la actividad específica de la proteasa purificada usando un ensayo relevante (remítase a la actividad proteasa). La actividad proteasa de la composición para pienso como tal también se determina usando el mismo ensayo y, basándose en estas dos determinaciones, se calcula la dosis en mg de proteína proteasa por kg de pienso.
- En una realización particular, el aditivo para pienso para animales de la invención está destinado a ser incluido (o se prescribe para que sea incluido) en dietas o piensos para animales en niveles de un 0,01 a un 10,0 %; más particu-

lamente de un 0,05 a un 5,0 %; o de un 0,2 a un 1,0 % (el % se refiere a los g de aditivo por 100 g de pienso). Esto es así en particular para las premezclas.

Los mismos principios se aplican para determinar los mg de proteína proteasa en aditivos para pienso. Naturalmente, si se dispone de una muestra de la proteasa empleada para preparar el aditivo para pienso o el pienso, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (sin necesidad de purificar la proteasa a partir del aditivo o la composición para pienso).

Enzimas adicionales

En otra realización, las composiciones descritas en el presente documento incluyen opcionalmente una o más enzimas. Las enzimas se pueden clasificar basándose en el manual Enzyme Nomenclature de NC-IUBMB, 1992), remítase también a la página ENZYME de internet: www.expasy.ch/enzyme/. ENZYME es un repositorio de información relativa a la nomenclatura de enzimas. Se basa principalmente en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUB-MB), Academic Press, Inc., 1992, y describe cada tipo de enzima caracterizada para la que se ha proporcionado un número EC (Comisión Enzimática) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305). Esta nomenclatura de enzimas de la IUB-MB se basa en su especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular; una clasificación de este tipo no refleja las características estructurales de estas enzimas.

Otra clasificación de ciertas enzimas glucósido-hidrolasa, tales como endoglucanasa, galactanasa, mananasa, dextranasa, lisozima y galactosidasa se describe en Henrissat et al., "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013", Nucl. Acids Res. (1 de enero de 2014) 42 (D1): D490-D495; remítase también a www.cazy.org.

Por lo tanto, la composición de la invención también puede comprender al menos otra enzima seleccionada a partir del grupo que comprende acetilxilano-esterasa (EC 3.1.1.23), acilglicerol-lipasa (EC 3.1.1.72), alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), beta-amilasa (EC 3.2.1.2), arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), celulasa (EC 3.2.1.4), feruloil-esterasa (EC 3.1.1.73), galactanasa (EC 3.2.1.89), alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22), beta-galactosidasa (EC 3.2.1.23), beta-glucanasa (EC 3.2.1.6), beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21), triacilglicerol-lipasa (EC 3.1.1.3), lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5), lisozima (EC 3.2.1.17), alfa-manosidasa (EC 3.2.1.24), beta-manosidasa (mananasa) (EC 3.2.1.25), fitasa (EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.26, EC 3.1.3.72), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32), fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4), fosfolipasa D (EC 3.1.4.4), proteasa (EC 3.4), pululanasa (EC 3.2.1.41), pectino-esterasa (EC 3.1.1.11), xilanasa (EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.136), beta-xilosidasa (EC 3.2.1.37) o cualquier combinación de estas.

En una realización, la composición de la invención comprende una galactanasa (EC 3.2.1.89) y una beta-galactosidasa (EC 3.2.1.23).

En una realización, la composición de la invención comprende una fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26). Los ejemplos de fitasas comercializadas incluyen fitasa Bio-Feed™ (Novozymes), Ronozyme® P, Ronozyme® NP y Ronozyme® HiPhos (DSM Nutritional Products), Natuphos™ (BASF), Natuphos™ E (BASF), Finase® y Quantum® Blue (AB Enzymes), OptiPhos® (Huvepharma), fitasa AveMix® (Aveve Biochem), Phyzyme® XP (Verenium/DuPont) y Aextra® PHY (DuPont). Otras fitasas preferidas incluyen las descritas en, por ejemplo, los documentos de patente WO 98/28408, WO 00/43503 y WO 03/066847.

En una realización, la composición de la invención comprende una xilanasa (EC 3.2.1.8). Los ejemplos de xilanasas comercializadas incluyen Ronozyme® WX (DSM Nutritional Products), Econase® XT y Barley (AB Vista), Xylathin® (Verenium), Hostazym® X (Huvepharma), Aextra® XB (xilanasa/beta-glucanasa, DuPont) y Aextra® XAP (xilanasa/amilasa/proteasa, DuPont), AveMix® XG 10 (xilanasa/glucanasa) y AveMix® 02 CS (xilanasa/glucanasa/pectinasa, Aveve Biochem) y Naturgrain (BASF).

En una realización, la composición de la invención comprende una proteasa (EC 3.4). Los ejemplos de proteasas comercializadas incluyen Ronozyme® ProAct (DSM Nutritional Products), Winzyme Pro Plus® (Suntaq International Limited) y Cibenza® DP100 (Novus International).

En una realización, la composición de la invención comprende una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1). Los ejemplos de alfa-amilasas comercializadas incluyen Ronozyme® A y RONOZYME® RumiStar™ (DSM Nutritional Products).

En una realización, la composición de la invención comprende un producto enzimático multicomponente, tal como FRA® Octazyme (Framelco), Ronozyme® G2, Ronozyme® VP y Ronozyme® MultiGrain (DSM Nutritional Products), Rovabio® Excel o Rovabio® Advance (Adisseo), Endofeed® DC (endo-1,3(4)-β-glucanasa y endo-1,4-β-xilanasa, Andres Pinaluba SA) o Amylofeed® (endo-1,3(4)-β-glucanasa y endo-1,4-β-xilanasa y α-amilasa, Andres Pinaluba SA).

Eubióticos

Los eubióticos son compuestos que están diseñados para proporcionar un equilibrio saludable de la microflora en el tubo gastrointestinal. Los eubióticos engloban varios aditivos para pienso diferentes, tales como probióticos, prebióticos, fitógenos (aceites esenciales) y ácidos orgánicos que se describen con más detalle a continuación.

Probióticos

- En una realización, la composición para pienso para animales comprende además uno o más probióticos adicionales. En una realización particular, la composición para pienso para animales comprende además una bacteria de uno o más de los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Megasphaera*, o cualquier combinación de estos.
- En una realización, la composición para pienso para animales comprende además una bacteria de una o más de las siguientes cepas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus* spp. y *Pediococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Propionibacterium thoenii*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacteria* sp.
- En una realización, la composición, el aditivo para pienso para animales o el pienso para animales comprende además una bacteria de una o más de las siguientes cepas de *Bacillus subtilis*: 3A-P4 (PTA-6506), 15A-P4 (PTA-6507), 22C-P1 (PTA-6508), 2084 (NRRL B-500130), LSSA01 (NRRL-B-50104), BS27 (NRRL B-501 05), BS 18 (NRRL B-50633), BS 278 (NRRL B-50634), DSM 29870, DSM 29871, DSM 32315, NRRL B-50136, NRRL B-50605, NRRL B-50606, NRRL B-50622 y PTA-7547.
- En una realización, la composición, el aditivo para pienso para animales o el pienso para animales comprende además una bacteria de una o más de las siguientes cepas de *Bacillus pumilus*: NRRL B-50016, ATCC 700385, NRRL B-50885 o NRRL B-50886.
- En una realización, la composición, el aditivo para pienso para animales o el pienso para animales comprende además una bacteria de una o más de las siguientes cepas de *Bacillus licheniformis*: NRRL B-50015, NRRL B-50621 o NRRL B-50623.
- En una realización, la composición, el aditivo para pienso para animales o el pienso para animales comprende además una bacteria de una o más de las siguientes cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*: DSM 29869, DSM 29869, NRRL B 50607, PTA-7543, PTA-7549, NRRL B-50349, NRRL B-50606, NRRL B-50013, NRRL B-50151, NRRL B-50141, NRRL B-50147 o NRRL B-50888.
- El recuento de bacterias de cada una de las cepas bacterianas en la composición para pienso para animales está entre 1×10^4 y 1×10^{14} UFC/kg de materia seca, preferentemente entre 1×10^6 y 1×10^{12} UFC/kg de materia seca y más preferentemente entre 1×10^7 y 1×10^{11} UFC/kg de materia seca. En una realización, el recuento de bacterias de cada una de las cepas bacterianas en la composición para pienso para animales está entre 1×10^8 y 1×10^{10} UFC/kg de materia seca.
- El recuento de bacterias de cada una de las cepas bacterianas en la composición para pienso para animales está entre 1×10^5 y 1×10^{15} UFC/animal/día, preferentemente entre 1×10^7 y 1×10^{13} UFC/animal/día, y más preferentemente entre 1×10^8 y 1×10^{12} UFC/animal/día. En una realización, el recuento de bacterias de cada una de las cepas bacterianas en la composición para pienso para animales está entre 1×10^9 y 1×10^{11} UFC/animal/día. En una realización, la cantidad de probióticos es de un 0,001 % a un 10 % en peso de la composición.
- En otra realización, la una o más cepas bacterianas están presentes en forma de una spora estable.
- Son ejemplos de productos comerciales Cylactin® (DSM Nutritional Products), Alterion (Adisseo), Enviva PRO (DuPont Animal Nutrition), Syncra® (mezcla enzima + probiótico, DuPont Animal Nutrition), Ecobiol® y Fecinor® (Norel/Evonik) y GutCare® PY1 (Evonik).

Prebióticos

- Los prebióticos son sustancias que inducen el crecimiento o la actividad de microorganismos (por ejemplo, bacterias y hongos) que contribuyen al bienestar de su hospedador. Los prebióticos habitualmente son compuestos de fibra no digeribles que pasan sin digerir a través de la parte superior del tubo gastrointestinal y estimulan el crecimiento o la actividad de bacterias ventajosas que colonizan el intestino grueso actuando como sustrato para ellas. Normalmente, los prebióticos aumentan la cantidad o actividad de las bifidobacterias y las bacterias ácido lácticas en el tubo GI.
- Los derivados de levadura (levaduras completas inactivadas o paredes celulares de levadura) también pueden considerarse prebióticos. A menudo comprenden oligosacáridos de manano, beta-glucanos de levadura o contenidos proteicos y se obtienen normalmente de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- En una realización, la cantidad de prebióticos es de un 0,001 % a un 10 % en peso de la composición. Son ejemplos de productos de levadura Yang® y Agrimos (Lallemand Animal Nutrition).

Fitógenos

Los fitógenos son un grupo de promotores del crecimiento naturales o promotores del crecimiento no antibióticos usados como aditivos para pienso para animales, obtenidos a partir de hierbas, especias u otras plantas. Los fitógenos pueden ser sustancias sencillas preparadas a partir de aceites esenciales/extractos, plantas individuales y mezcla de plantas (productos de herbolario) o mezcla de aceites esenciales/extractos/plantas (productos especializados).

Son ejemplos de agentes fitógenos el romero, salvia, orégano, tomillo, clavo y cedrón. Son ejemplos de aceites esenciales el timol, eugenol, meta-cresol, vainillina, salicilato, resorcina, guajacol, gingerol, aceite de lavanda, iononas, irona, eucaliptol, mentol, aceite de menta, alfa-pineno; limoneno, anetol, linalool, dihidrojasmonato de metilo, carvacrol, ácido propiónico/propionato, ácido acético/acetato, ácido butírico/butirato, aceite de romero, aceite de clavo, geraniol, terpineol, citronelol, salicilato de amilo y/o bencilo, cinamaldehído, polifenol vegetal (tanino), cúrcuma y extracto de cúrcuma.

En una realización, la cantidad de fitógenos es de un 0,001 % a un 10 % en peso de la composición. Son ejemplos de productos comerciales Crina® (DSM Nutritional Products); CinergyTM, BiacidTM, ProHacidTM Classic y ProHacidTM AdvanceTM (todos Promivi/Cargill) y Envivo EO (DuPont Animal Nutrition).

Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos (C1-C7) están ampliamente distribuidos en la naturaleza como constituyentes normales de plantas o tejidos animales. También se forman mediante la fermentación microbiana de hidratos de carbono principalmente en el intestino grueso. A menudo se usan en la producción de cerdos y aves de corral como remplazo de promotores del crecimiento antibióticos ya que tienen un efecto preventivo sobre los problemas intestinales como enteritis necrótica en pollos e infección por *Escherichia coli* en cerdos jóvenes. Los ácidos orgánicos se pueden vender como un monocomponente o mezclas de habitualmente 2 o 3 ácidos orgánicos diferentes. Son ejemplos de ácidos orgánicos los ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico), ácidos grasos de cadena media (por ejemplo, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico), ácidos di/tricarboxílicos (por ejemplo, ácido fumárico), hidroxiacidos (por ejemplo, ácido láctico), ácidos aromáticos (por ejemplo, ácido benzoico), ácido cítrico, ácido sórbico, ácido málico y ácido tartárico o su sal (habitualmente sal de sodio o potasio, tal como diformiato de potasio o butirato de sodio).

En una realización, la cantidad de ácido orgánico es de un 0,001 % a un 10 % en peso de la composición. Son ejemplos de productos comerciales VevoVital® (DSM Nutritional Products), Amasil®, Luprisil®, Lupro-Grain®, Lupro-Cid®, Lupro-Mix® (BASF), ácido n-butírico AF (OXEA) y Adimix Precision (Nutriad).

Premezcla

La incorporación de la composición de aditivos para pienso para animales tal como se ha ejemplificado anteriormente en el presente documento para pienso para animales, por ejemplo, aves de corral, en la práctica se realiza usando un concentrado o una premezcla. Una premezcla designa una mezcla preferentemente uniforme de uno o más microingredientes con diluyente y/o portador. Las premezclas se usan para facilitar una dispersión uniforme de los microingredientes en una mezcla mayor. Se puede añadir una premezcla de acuerdo con la invención a los ingredientes del pienso o al agua de bebida como sólidos (por ejemplo, como un polvo hidrosoluble) o líquidos.

Aminoácidos

La composición de la invención puede comprender además uno o más aminoácidos. Son ejemplos de aminoácidos que se usan en el pienso para animales la lisina, alanina, beta-alanina, treonina, metionina y triptófano. En una realización, la cantidad de aminoácido es de un 0,001 % a un 10 % en peso de la composición.

Vitaminas y minerales

En otra realización, el pienso para animales puede incluir una o más vitaminas, tal como una o más vitaminas liposolubles y/o una o más vitaminas hidrosolubles. En otra realización, el piensos para animales puede incluir opcionalmente uno o más minerales, tales como uno o más oligominerales y/o uno o más macrominerales.

Normalmente las vitaminas lipo- e hidrosolubles, así como los oligominerales, forman parte de la denominada premezcla destinada a añadirse al pienso, mientras que los macrominerales se suelen añadir por separado al pienso.

Los ejemplos no limitantes de vitaminas liposolubles incluyen la vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, por ejemplo, vitamina K3.

Los ejemplos no limitantes de vitaminas hidrosolubles incluyen la vitamina C, vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo, Ca-D-pantotenato.

Los ejemplos no limitantes de oligominerales incluyen boro, cobalto, cloruro, cromo, cobre, fluoruro, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, yodo, selenio y cinc.

Ejemplos no limitantes de macrominerales incluyen calcio, magnesio, fósforo, potasio y sodio.

En una realización, la cantidad de vitaminas es de un 0,001 % a un 10 % en peso de la composición. En una realización, la cantidad de minerales es de un 0,001 % a un 10 % en peso de la composición.

Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) se enumeran en la Tabla A del documento de patente WO 01/58275. La expresión "requisito nutricional" quiere decir que estos componentes se deben proporcionar en la dieta en las concentraciones indicadas.

Como alternativa, el aditivo para pienso para animales de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A del documento de patente WO 01/58275. La expresión "al menos uno" se refiere a uno o más, uno o dos o tres o cuatro y así sucesivamente hasta un total de trece o hasta un total de 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 comprendida en el intervalo indicado en la columna cuatro o la columna cinco o la columna seis de la Tabla A.

En otra realización adicional, el aditivo para pienso para animales de la invención comprende al menos una de las siguientes vitaminas, preferentemente para proporcionar una concentración en el pienso dentro de los intervalos indicados a continuación en la Tabla 1 (para dietas para lechones y dietas para pollos de engorde, respectivamente).

Tabla 1: Recomendaciones típicas de vitaminas

Vitamina	Dieta para lechones	Dieta para pollos de engorde
Vitamina A	10.000-15.000 UI/kg de alimento	8-12 500 UI/kg de alimento
Vitamina D3	1800-2000 UI/kg de pienso	3000-5000 UI/kg de pienso
Vitamina E	60-100 mg/kg de pienso	150-240 mg/kg de pienso
Vitamina K3	2-4 mg/kg de pienso	2-4 mg/kg de pienso
Vitamina B1	2-4 mg/kg de pienso	2-3 mg/kg de pienso
Vitamina B2	6-10 mg/kg de pienso	7-9 mg/kg de pienso
Vitamina B6	4-8 mg/kg de pienso	3-6 mg/kg de pienso
Vitamina B12	0,03-0,05 mg/kg de pienso	0,015-0,04 mg/kg de pienso
Niacina (Vitamina B3)	30-50 mg/kg de pienso	50-80 mg/kg de pienso
Ácido pantoténico	20-40 mg/kg de pienso	10-18 mg/kg de pienso
Ácido fólico	1-2 mg/kg de pienso	1-2 mg/kg de pienso
Biotina	0,15-0,4 mg/kg de pienso	0,15-0,3 mg/kg de pienso
Cloruro de colina	200-400 mg/kg de pienso	300-600 mg/kg de pienso

Otros ingredientes del pienso

La composición de la invención puede comprender además agentes colorantes, estabilizantes, aditivos que mejoran el crecimiento y compuestos de aroma/aromatizantes, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); especies que generan oxígeno reactivo, antioxidantes, péptidos antimicrobianos, polipéptidos antifúngicos y compuestos de control de micotoxinas.

Son ejemplos de agentes de coloración los carotenoides, tales como beta-caroteno, astaxantina y luteína.

Son ejemplos de compuestos de aroma/aromatizantes el creosol, anetol, deca-, undeca- y/o dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, propilidennftalida, butilidennftalida, capsaicina y tanina.

Son ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP) CAP18, leucocina A, tripticina, protegrina-1, tanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina y ovispirina, tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas y estatinas, incluidos los compuestos y los polipéptidos descritos en los documentos de patente WO 03/044049 y WO 03/048148, así como también las variantes o los fragmentos de los péptidos anteriores que retienen la actividad antimicrobiana.

Son ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP) los péptidos de *Aspergillus giganteus* y *Aspergillus niger*, así como también variantes y fragmentos de estos que retienen la actividad antifúngica, tal como se divulga en los documentos de patente WO 94/01459 y WO 02/90384.

Son ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como el ácido araquidónico, ácido docosahexanoico, ácido eicosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

Son ejemplos de especies que generan oxígeno reactivo los agentes químicos tales como el perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

- 5 Se pueden usar antioxidantes para limitar la cantidad de especies de oxígeno reactivo que pueden generarse de modo que el nivel de especies de oxígeno reactivo esté en equilibrio con los antioxidantes.

Se pueden encontrar micotoxinas, tales como desoxinivalenol, aflatoxina, zearalenona y fumonisina en piensos para animales y pueden provocar un rendimiento negativo en el animal o enfermedad. Los compuestos que pueden controlar los niveles de micotoxina, tal como mediante desactivación de la micotoxina o mediante unión de la micotoxina, pueden añadirse al pienso para animales para mejorar estos efectos negativos. Son ejemplos de compuestos de control de micotoxinas Vitafix®, Vitafix Ultra (Nuscience), Mycofix®, Mycofix® Secure, FUMzyme®, Biomin® BBSH, Biomin® MTV (Biomin), Mold-Nil®, Toxi-Nil® y Unike® Plus (Nutriad).

Métodos de preparación de un pienso para animales

15 La invención se refiere a un método de preparación de un pienso para animales que comprende mezclar el aditivo para pienso para animales del aspecto uno, dos o tres con al menos una proteína o fuente de proteínas. La invención se refiere además a un método de preparación de un pienso para animales que comprende mezclar el gránulo del aspecto cuatro con al menos una proteína o fuente de proteínas. La invención se refiere además a un método de preparación de un pienso para animales que comprende mezclar la formulación líquida del aspecto cinco con al menos una proteína o fuente de proteínas.

20 En una realización, la proteína o fuente de proteínas comprende legumbres, cereales, avena, centeno, cebada, trigo, maíz, sorgo, pasto varilla, mijo, mijo perla, mijo cola de zorro, soja, soja silvestre, judías, altramuza, frijol tépari, frijol escarlata, frijol slimjim, frijol lima, frijol francés, haba (fava bean), garbanzo, lenteja, cacahuete, cacahuete español, canola, colza (colza oleaginosa), arroz, remolacha, col, remolacha azucarera, espinacas, quinoa o guisantes, en una forma procesada de estos (tal como harina de soja, harina de colza) o cualquier combinación de estos. En una realización preferida, la proteína o fuente de proteínas es harina de soja.

30 La invención se refiere además a un método de preparación de un pienso para animales que comprende aplicar la formulación líquida del aspecto cinco a material vegetal. En una realización, la formulación líquida se aplica mediante un pulverizado. En una realización adicional, el material vegetal comprende legumbres, cereales, avena, centeno, cebada, trigo, maíz, sorgo, pasto varilla, mijo, mijo perla, mijo cola de zorro, soja, soja silvestre, judías, altramuza, frijol tépari, frijol escarlata, frijol slimjim, frijol lima, frijol francés, haba (fava bean), garbanzo, lenteja, cacahuete, cacahuete español, canola, colza (colza oleaginosa), arroz, remolacha, col, remolacha azucarera, espinacas, quinoa o guisantes, en una forma procesada de estos (tal como harina de soja, harina de colza) o cualquier combinación de estos. En una realización preferida, el material vegetal es harina de soja.

Métodos de mejora del rendimiento del animal

35 La invención se refiere además a un método de mejora de uno o más parámetros de rendimiento de un animal, que comprende administrar a uno o más animales el aditivo para pienso para animales del aspecto uno, dos o tres. La invención se refiere además a un método de mejora de uno o más parámetros de rendimiento de un animal, que comprende administrar a uno o más animales el gránulo del aspecto cuatro. La invención se refiere además a un método de mejora de uno o más parámetros de rendimiento de un animal, que comprende administrar a uno o más animales la formulación líquida del aspecto cinco.

45 En una realización, se prepara un pienso para animales a partir del aditivo para pienso para animales, el gránulo o la formulación líquida tal como se describe en el presente documento y se administra al animal. La invención se refiere además a un método de mejora de uno o más parámetros de rendimiento de un animal, que comprende administrar a uno o más animales un pienso para animales o pienso para animales en microgránulos que comprende la proteasa S8 de la invención.

50 En una realización, "mejora del rendimiento de un animal" se refiere a que hay un incremento de la ganancia de peso corporal. En otra realización, "mejora del rendimiento de un animal" se refiere a que hay una tasa de conversión de pienso mejorada. En una realización adicional, "mejorar del rendimiento de un animal" se refiere a que hay una mayor eficiencia del pienso. En una realización adicional, "mejorar del rendimiento de un animal" se refiere a que hay un incremento de la ganancia de peso corporal y/o una tasa de conversión de pienso mejorada y/o una mayor eficiencia del pienso.

Según una realización adecuada, la mejora del rendimiento de un animal significa la mejora de la ganancia de peso corporal, la mejora del factor de eficiencia de producción europeo (EPEF) y/o la mejora de FCR.

Método de mejora del valor nutritivo del pienso para animales

La expresión mejorar el valor nutricional de un alimento para animales se refiere a la mejora de la disponibilidad de los nutrientes en el alimento. En esta invención, "mejorar los valores nutricionales" se refiere en particular a la mejora de la disponibilidad de la fracción proteica del pienso, lo que da lugar a un aumento de la extracción de proteínas, mayores rendimientos proteicos y/o mejora de la utilización de proteínas. Cuando el valor nutricional del pienso aumenta, aumenta la digestibilidad de las proteínas y/o los aminoácidos, y puede mejorar la velocidad de crecimiento y/o la ganancia de peso y/o la conversión del pienso (es decir, el peso de pienso ingerido relativo a la ganancia de peso) del animal.

Por lo tanto, la invención se refiere además a un método de mejora del valor nutricional de un pienso para animales, que comprende añadir el aditivo para pienso para animales del aspecto uno, dos o tres al pienso. Por lo tanto, la invención se refiere además a un método de mejora del valor nutricional de un pienso para animales, que comprende añadir el gránulo del aspecto cuatro al pienso. Por lo tanto, la invención se refiere además a un método de mejora del valor nutricional de un pienso para animales, que comprende añadir la formulación líquida del aspecto cinco al pienso. Una realización de la invención se refiere al método de mejora del valor nutricional de un pienso para animales, que comprende añadir el aditivo para pienso para animales de la invención, el gránulo de la invención o la formulación líquida de la invención al pienso.

Una realización adecuada de la invención se refiere a un método de aumento de la digestibilidad y/o solubilidad de proteína, que comprende mezclar el aditivo para pienso para animales de la invención, el gránulo de la invención o la formulación líquida de la invención con al menos una proteína o fuente de proteína.

En una realización, el pienso comprende legumbres, cereales, avena, centeno, cebada, trigo, maíz, sorgo, pasto varilla, mijo, mijo perla, mijo cola de zorro, soja, soja silvestre, judías, altramuza, frijol tépary, frijol escarlata, frijol slimjim, frijol lima, frijol francés, haba (fava bean), garbanzo, lenteja, cacahuete, cacahuete español, canola, colza (colza oleaginosa), arroz, remolacha, col, remolacha azucarera, espinacas, quinoa o guisantes, en una forma procesada de estos (tal como harina de soja, harina de colza) o cualquier combinación de estos. En una realización preferida, el pienso comprende harina de soja.

Usos

La presente invención también se refiere a métodos de uso de los polipéptidos que tienen actividad proteasa o las composiciones de estos para, por ejemplo, pienso para animales.

Uso en pienso para animales

También se puede usar una proteasa de la invención en pienso para animales. En una realización, la presente invención proporciona un método de preparación de una composición para pienso para animales que comprende añadir una o más proteasas de la presente invención a uno o más ingredientes del pienso para animales.

Una realización adecuada incluye el uso del aditivo para pienso para animales de la invención, el gránulo de la invención o la formulación líquida de la invención:

en la preparación de una composición para uso en pienso para animales;

para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales;

para incrementar la proteína digerible y/o soluble en pienso para animales;

para incrementar el grado de hidrólisis de proteínas en dietas para animales;

para mejorar no terapéuticamente uno o más parámetros de rendimiento en un animal; y/o

para el tratamiento de proteínas, en donde dicho tratamiento es para ejercer una influencia hidrolizante sobre las proteínas.

La una o más proteasas de la presente invención también se pueden usar en pienso para animales como enzimas potenciadoras del pienso que mejoran la digestibilidad del pienso aumentando la eficiencia de su utilización según los documentos de patente WO 00/21381 y WO 2004/026334.

En una realización adicional, se puede usar una proteasa de la presente invención en un pienso para animales o como un aditivo para pienso, donde puede proporcionar un efecto positivo sobre el tubo digestivo del animal y de este modo mejorar el rendimiento del animal según la ganancia de peso, la tasa de conversión de pienso (FCR), el factor de eficiencia de producción europeo (EPEF), el factor de eficacia de producción europeo (EFF) o la mejora en la salud del animal tal como un descenso de la tasa de mortalidad. La FCR se calcula como la ingesta de pienso en g/animal en relación con la ganancia de peso en g/animal.

En el uso según la invención, las proteasas pueden administrarse al animal antes, después o junto con la dieta. Se prefiere este último caso.

En una realización, la forma de la proteasa cuando se añade al pienso o cuando se incluye en un aditivo para pienso está bien definida. La expresión "bien definida/o" significa que el preparado de proteasa tiene una pureza de al menos un 50 % según se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño (remítase al Ejemplo 12 del documento de patente WO 01/58275). En otras realizaciones particulares, el preparado de proteasa tiene una pureza de al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 o al menos un 95 % según se determina mediante este método.

Un preparado de proteasa bien definido es conveniente. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente en el pienso una proteasa que esté esencialmente exenta de otras proteasas interferentes o contaminantes. La expresión "dosificar correctamente" se refiere en particular al objetivo de obtener resultados constantes y coherentes, y a la capacidad de optimizar la dosis en función del efecto deseado.

Sin embargo, para el uso en pienso para animales, la proteasa no necesita ser pura; puede incluir, por ejemplo, otras enzimas, en cuyo caso podría denominarse preparado de proteasa.

El preparado de proteasa se puede (a) añadir directamente al pienso, o (b) se puede usar en la producción de una o más composiciones intermedias, tales como aditivos de piensos o premezclas que se añaden posteriormente al pienso (o se usan en un procedimiento de tratamiento). El grado de pureza descrito anteriormente se refiere a la pureza del preparado de proteasa original, independientemente de que se utilice según el apartado (a) o (b) anteriores.

Los preparados de proteasa con purezas de este orden de magnitud se pueden obtener en particular usando métodos de producción recombinantes, mientras que cuando la proteasa se produce mediante métodos de fermentación tradicionales no se obtienen tan fácilmente y además están supeditados a una variación de lote a lote mucho mayor.

Naturalmente, estos preparados de proteasa se pueden mezclar con otras enzimas.

La proteína puede ser una proteína de origen animal, tal como harina de huesos y carne, harina de plumas y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.

La expresión "proteínas vegetales", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto, composición, preparado o mezcla que incluya al menos una proteína procedente de una hortaliza u originada a partir de esta, incluidas las proteínas modificadas y los derivados proteicos. En las realizaciones, el contenido proteico de las proteínas vegetales es de al menos un 10, 20, 30, 40, 50 o un 60 % (p/p).

Las proteínas vegetales pueden obtenerse de fuentes de proteínas vegetales tales como legumbres y cereales, por ejemplo, materiales procedentes de plantas de las familias Fabaceae (Leguminosae), Cruciferaeae, Chenopodiaceae y Poaceae, tales como harina de soja, harina de altramuza y harina de colza.

En una realización, la fuente de proteínas vegetales es material de una o más plantas de la familia Fabaceae, por ejemplo, soja, altramuza, guisante o judía.

En otra realización, la fuente de proteínas vegetales es un material procedente de una o más plantas de la familia Chenopodiaceae, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.

Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son la colza, la semilla de girasol, la semilla de algodón y la col.

La soja es una fuente de proteínas vegetales preferida.

Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son los cereales, tales como la cebada, el trigo, el centeno, la avena, el maíz, el arroz, el triticale y el sorgo.

En una realización de un proceso de tratamiento, la(s) proteasa(s) en cuestión afecta(n) a (o actúa(n) o ejerce(n) su influencia hidrolizante o degradante sobre) las proteínas, tales como proteínas vegetales o fuentes de proteínas. Para conseguir esto, la proteína o la fuente de proteínas normalmente se suspende en un disolvente, por ejemplo, un disolvente acuoso tal como el agua, y se ajustan los valores de pH y temperatura teniendo en cuenta las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede tener lugar a un valor de pH en el que la actividad de la presente proteasa sea de al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o al menos un 90 %. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede tener lugar a una temperatura en la que la actividad de la presente proteasa sea de al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o al menos un 90 %. Las indicaciones de actividad porcentual anteriores son relativas a las actividades máximas. La reacción enzimática continúa hasta obtener el resultado deseado, después de lo cual puede detenerse o no mediante la inactivación de la enzima, por ejemplo, mediante una etapa de tratamiento con calor.

En una realización adecuada, el método para el tratamiento de proteínas comprende la etapa de añadir el aditivo para pienso para animales de la invención, el gránulo de la invención o la formulación líquida de la invención a al menos una proteína o fuente de proteína.

En otra realización de un proceso de tratamiento de la invención, la acción de la proteasa se mantiene, lo que quiere decir que, por ejemplo, la proteasa se añade a las proteínas, pero su influencia hidrolizante no se activa, por así

decirlo, hasta más tarde cuando se desee, una vez que se hayan establecido las condiciones hidrolizantes adecuadas o una vez que se hayan inactivado los posibles inhibidores enzimáticos o cualesquiera otros medios que se hayan podido aplicar para posponer la acción de la enzima.

- 5 En una realización, el tratamiento es un pretratamiento de pienso para animales o proteínas que pueden usarse en pienso para animales, es decir, las proteínas se hidrolizan antes de su consumo.

- 10 La expresión "mejorar el valor nutricional de un pienso para animales" se refiere a la mejora de la disponibilidad de los nutrientes en el pienso. En esta invención, "mejorar los valores nutricionales" se refiere en particular a la mejora de la disponibilidad de la fracción proteica del pienso, lo que da lugar a un aumento de la extracción de proteínas, mayores rendimientos proteicos y/o mejora de la utilización de proteínas. Cuando el valor nutricional del pienso aumenta, aumenta la digestibilidad de las proteínas y/o los aminoácidos, y puede mejorar la velocidad de crecimiento y/o la ganancia de peso y/o la conversión del pienso (es decir, el peso de pienso ingerido relativo a la ganancia de peso) del animal.

- 15 La proteasa puede añadirse a los piensos en cualquier forma, ya sea como una proteasa relativamente pura o mezclada con otros componentes destinados a añadirse a los piensos para animales, es decir, en forma de aditivos para pienso para animales, tales como las denominadas premezclas para pienso para animales.

Ejemplos

Cepas

Se aisló una cepa de *Bacillus horneckiae* a partir de una muestra ambiental en Turquía en o antes de 1995 tal como se divulga en el documento de patente WO 2015/091990.

- 20 Se aisló *Bacillus* sp. TY145 a partir de una muestra de tierra antártica aproximadamente en 1989 tal como se divulga en el documento de patente WO 92/17577.

Ensayos de proteasas

1) Ensayo cinético con Suc-AAPF-pNA:

Sustrato pNA:	Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).
Temperatura:	Temperatura ambiente (25 °C)
Tampones de ensayo:	Ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl ₂ 1 mM, KCl 150 mM, 0,01 % de Triton X-100 ajustado a valores de pH de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0 con HCl o NaOH.

- 25 Se mezclaron 20 µl de proteasa (diluidos en Triton X-100 al 0,01 %) con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100 µl de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluidos adicionalmente 45x con Triton X-100 al 0,01 %). El incremento en la DO405 se controló como una medición de la actividad proteasa.

2) Ensayo de punto final con Suc-AAPF-pNA:

Sustrato pNA:	Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).
Temperatura:	Controlada (temperatura del ensayo)
Tampones de ensayo:	Ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl ₂ 1 mM, KCl 150 mM, 0,01 % de Triton X-100, pH 7,0.

200 µl del sustrato pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluidos adicionalmente 50x con los tampones de ensayo) se añadieron con pipetas en un tubo Eppendorf y se pusieron sobre hielo. Se añadieron 20 µl de muestra de peptidasa (diluida en Triton X-100 al 0,01 %). El ensayo se inició transfiriendo el tubo Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, que se fijó a la temperatura del ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a la mayor velocidad de agitación (1400 rpm). La incubación se detuvo transfiriendo el tubo nuevamente al baño de hielo e incorporando 600 µl de ácido succínico 500 mM, pH 3,5. Se transfirieron 200 µl de sobrenadante a una placa de microvaloración. Se leyó la DO405 como una medida de la actividad peptidasa. Se incluyó un tampón como control negativo en el ensayo (en lugar de la enzima).

2) Ensayo de Protazyme AK:

Sustrato: comprimido de Protazyme AK (caseína teñida y reticulada, de Megazyme)

Temperatura: controlada (temperatura del ensayo).

Tampón de ensayo: Ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, 0,01 % de Triton X-100, pH 9,0.

Se suspendió un comprimido de Protazyme AK en 2,0 ml de Triton X-100 al 0,01 % mezclando suavemente. Se dispensaron 500 µl de esta suspensión y 500 µl del tampón de ensayo en un tubo Eppendorf y se colocaron en hielo. Se añadieron 20 µl de la muestra de proteasa (diluida en Triton X-100 al 0,01 %). El ensayo se inició transfiriendo el tubo Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, que se fijó a la temperatura del ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a la mayor velocidad de agitación (1400 rpm). La incubación se detuvo transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo. A continuación, el tubo se centrifugó en una centrifugadora enfriada con hielo durante unos pocos minutos y se transfirieron 200 µl del sobrenadante a una placa de microvaloración. Se leyó la DO650 como una medición de la actividad proteasa. Se incluyó un tampón como control negativo en el ensayo (en lugar de la enzima).

3) Ensayo de o-ftaldialdehído (OPA):

Este ensayo detecta aminas primarias y, por lo tanto, puede medirse la escisión de enlaces peptídicos por una proteasa como la diferencia en absorbancia entre la muestra tratada con proteasa y una muestra de control. El ensayo se realizó esencialmente de acuerdo con Nielsen et al. (Nielsen et al., 2001, "Improved method for determining food protein degree of hydrolysis", J. Food Sci. 66: 642-646).

Se filtraron 0,5 ml de muestra a través de una placa de filtro PN8175 de 96 pocillos PALL (10 min, 2700 rpm, 5 °C). Las muestras se diluyeron adecuadamente (por ejemplo, 10, 50 o 100 veces) en agua desionizada y se colocaron 25 µl de cada muestra en una placa de microvaloración de 96 pocillos (5 réplicas). Se dispensaron 200 µl de reactivo OPA (tetaborato disódico decahidratado 100 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 3,5 mM, ditiotreitól (DDT) 5,7 mM, o-ftaldialdehído 6 mM) en todos los pocillos, la placa se agitó (60 segundos, 650 rpm) y se midió la absorbancia a 340 nm.

Ejemplo 1: Expresión y purificación de la proteasa S8 de *Bacillus horneckiae*

La proteasa S8 de *Bacillus horneckiae* (SEQ ID NO: 1) se expresó y purificó como se describe en el Ejemplo 1 del documento de patente WO 2015/091990. Se usó un ensayo de Suc-AAPF-pNA cinético para obtener el perfil de pH-actividad y el perfil de pH-estabilidad. Se usó un ensayo de Suc-AAPF-pNA de punto final para obtener el perfil de temp-actividad a pH 7.

Características de la proteasa S8 de *Bacillus horneckiae* (SEQ ID NO: 1).

El peso molecular relativo según se determina por SDS-PAGE fue aproximadamente Mr = 35 kDa.

La secuencia del extremo N determinada mediante la degradación de EDMAN fue: EVTATPS.

El peso molecular del pico principal (aprox. 50 %) determinado por el análisis de peso molecular intacto fue de 32132,0 Da.

La secuencia madura del pico principal (de los datos de secuenciación EDMAN del extremo N y datos de EM intacta):

EVTATPSTQTPWGIKSIYNDQSITKTTGGSGIKVAVLDTGVHTGHIDLAGSSEQCKDFTQSNPL
VNGSCTDRQGHGTHVAGTVLAHGGSDGQGVYGVAPQAKLWAYKVLGDNGSGYSDDIAAAIR
HVADEASRTGSKVVINMSLGSSGKDSLIAVADYAYGKGV LIVAAAGNSGSGSNTIGYPAALVN
AVAVAALENVQQNGTYRVANFSSRGNPATAGDFRIQERDVEVSAPGASVESTWYNGGYNTIS
GTSMATPHVAGLAAKIWSSNSSLSHSQLRTELQNRKVDIKGGIGAGTGDDYASGFGYPRVK
(SEQ ID NO: 1)

El peso molecular calculado de esta secuencia madura es de 32132,0 Da.

- 5 El análisis del peso molecular intacto mostró que aprox. un 10 % del producto fueron los aminoácidos 2-314 y aprox. un 40 % del producto fueron los aminoácidos 4-314.

Ejemplo 2.1: Expresión y purificación de la proteasa S8 de *Bacillus* sp TY145.

- 10 La proteasa S8 de *Bacillus* sp TY145 (SEQ ID NO: 2) se expresó y purificó como se describe en el Ejemplo 1 del documento de patente WO 92/17577. Se usó un ensayo de Suc-AAPF-pNA cinético para obtener el perfil de pH-actividad y el perfil de pH-estabilidad. Se usó un ensayo con Protazyme AK para obtener el perfil temp-actividad a un pH de 9.

Características de la proteasa S8 de *Bacillus* sp. TY145 (SEQ ID NO: 2).

El peso molecular relativo según se determina por SDS-PAGE fue aproximadamente Mr = 34 kDa.

La secuencia del extremo N determinada mediante la degradación de EDMAN fue: AVPSTQT.

- 15 El peso molecular determinado por el análisis de peso molecular intacto fue de 31784 Da.

La secuencia madura (de los datos de la secuenciación EDMAN del extremo N y datos de EM intacta):

AVPSTQTPWGIKSIYNDQSITKTTGGSGIKVAVLDTGVYTSHLDLAGSAEQCKDFTQSNPLVDG
SCTDRQGHGTHVAGTVLAHGGSDGQGVYGVAPQAKLWAYKVLGDNGSGYSDDIAAAIRHVA
DEASRTGSKVVINMSLGSSAKDSLIAVADYAYGKGV LIVAAAGNSGSGSNTIGFPGGLVNAVA
VAALENVQQNGTYRVADFSSRGNPATAGDYIIQERDIEVSAPGASVESTWYTGGYNTISGTSM
ATPHVAGLAAKIWSANTSLSHSQLRTELQNRKVDIKGGIGAGTGDDYASGFGYPRVK
(SEQ ID NO: 2)

El peso molecular calculado de esta secuencia madura es de 31783,7 Da.

- 20 El análisis del peso molecular intacto también mostró que aprox. un 10 % del producto comprendía un EVT extra en el extremo N.

Ejemplo 2.2 Ejemplo de expresión para cinco proteasas S8 de *Bacillus* (homólogas de la SEQ ID NO: 1).

- 25 Se expresaron cinco proteasas S8 adicionales en *Bacillus subtilis*. La expresión de la SEQ ID NO: 5: la proteasa S8 1 de *Bacillus* sp-13380 (*Bacillus* sp-1, GENESEQP:BDV61032) se describe en el documento de patente WO2017064253-A1. La expresión de la SEQ ID NO: 6, la proteasa S8 de *Bacillus idriensis* (GENESEQP:BCB40142). La expresión de la SEQ ID NO: 7: la proteasa S8 2 de *Bacillus* sp-13380 (*Bacillus* sp-1, GENESEQP:BCB40140); la expresión de la SEQ ID NO: 8: la proteasa S8 de *Bacillus* sp-62451 (*Bacillus* sp-2, GENESEQP:BCB40144) se describen en la patente WO2015091989-A1.

- 30 La expresión de la proteasa S8 de *Bacillus oceanisediminis* (SEQ ID NO: 9) se realizó de la siguiente manera. El gen que codifica las proteasas S8 de *Bacillus oceanisediminis* (SEQ ID NO: 10) se sometió a una optimización de codones y fue sintetizado por Integrated DNA Technologies (Interleuvenlaan 12A, B-3001 Lovaina, Bélgica). El gen se expresó como una enzima secretada donde la señal de secreción nativa de los genes se reemplazó con una señal de secreción de *Bacillus clausii* (con la siguiente secuencia aminoácidos: MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA). Se realizó la construcción como una construcción de integración lineal, donde los genes sintéticos se fusionaron por PCR entre dos regiones cromosómicas homólogas de *Bacillus subtilis* junto con un promotor fuerte y un marcador de la resistencia a cloranfenicol. La fusión se realizó mediante SOE PCR (Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen,

J.K. y Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes, gene splicing by overlap extension, *Gene* 77: 61-68). El método SOE PCR también se describe en la solicitud de patente WO 2003095658. En ambas construcciones el gen se expresó bajo el control de un sistema promotor triple (tal como se describe en el documento de patente WO 99/43835) constituido por los promotores del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ) y el promotor cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* que incluye la secuencia estabilizante. *Bacillus subtilis* se transformó con la construcción de PCR lineal. Se seleccionaron los transformantes en placas LB complementadas con 6 µg de cloranfenicol por ml. Se cultivó un clon de *Bacillus subtilis* recombinante en un cultivo líquido. La enzima recombinante se acumuló en el sobrenadante después de la lisis celular natural. Se recolectó el sobrenadante que contenía la enzima y las enzimas se purificaron tal como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3: Construcción, expresión y purificación de la variante de proteasa S8 (SEQ ID NO: 3).

Una variante de la proteasa TY145 (SEQ ID NO: 3) se construyó, expresó y purificó como se describe en el Ejemplo 1 del documento de patente WO 2016/097354. Se usó un ensayo de Suc-AAPF-pNA cinético para obtener el perfil de pH-actividad y el perfil de pH-estabilidad. Se usó un ensayo con Protazyme AK para obtener el perfil temp-actividad a un pH de 9.

Características de la variante de proteasa S8 (SEQ ID NO: 3)

El peso molecular relativo según se determina por SDS-PAGE fue aproximadamente $M_r = 37$ kDa.

La secuencia del extremo N determinada mediante la degradación de EDMAN fue: AVPSTQT.

El peso molecular determinado por el análisis de peso molecular intacto fue de 32089,1 Da.

La secuencia madura (de los datos de la secuenciación EDMAN del extremo N y datos de EM intacta):

AVPSTQTPWGIKSIYNDQSITKTTGGKGIKVAVLDTGVYTSHLDLAGSAEQCKDFTQSNPLVDG
SCTDRQGHGTHVAGTVLAHGGSSNGQGVYGVAPQAKLWAYKVLGDKGEGYSDDIAAAIRHVA
DEASRTGSKVWINMSLGSSAKDSLIAVADYAYGKGV LIVAAAGNEGPKPNTIGYPAGFVNAVA
VAALENVQEKGTYRVADFSSRGNPATAGDYIIQERDIEVSAPGASVESTWYTGGYNTISGTSM
ATPHVAGLAAKIWSANTSLSHSQLRTELQNRKVYDIKGGIGAGPGDDYASGFGYPRVK
(SEQ ID NO: 3)

El peso molecular calculado de esta secuencia madura es de 32089,3 Da.

El análisis del peso molecular intacto también mostró que aprox. un 10 % del producto comprendía un EVT extra en el extremo N.

Ejemplo 4: curvas de pH de suspensiones espesas de SBM-maíz

Las curvas de pH-actividad de la proteasa S8 de la invención en una suspensión espesa de harina de soja-maíz se determinaron de acuerdo con el siguiente método.

Sustrato: SBM-maíz (30:70)

Temperatura: 40 °C

Tampones de ensayo: Ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, tampón CABS 100 mM, CaCl₂ 12,5 mM, KCl 150 mM, 0,01 % de Triton X-100, ajustado al pH deseado (3, 4, 5, 6, 7) con NaOH o HCl.

A 2 g del sustrato SBM-maíz (30:70) se añadieron 20 ml del tampón de ensayo que se ajustó hasta el pH deseado con NaOH o HCl. La suspensión espesa se agitó durante 5 min y se transfirieron 2 ml de la suspensión espesa a cada pocillo de una placa de 24 pocillos en una mezcladora de placas con calefacción y mezcla magnéticas combinadas. Las muestras se preincubaron durante 30 min a 40 °C. La proteasa se diluyó hasta 100 µl en tampón de acetato de sodio 100 mM (9,565 g/l de NaOAc, 1,75 g/l de ácido acético, CaCl₂ 5 mM, 0,01 % de BSA, 0,01 % de Tween20, pH 6,0) para conseguir una concentración final de 200 mg EP/kg de sustrato, y se añadió a los pocillos. Después de 3 horas a 40 °C con agitación magnética, la placa se centrifugó (10 min, 4000 rpm, 0 °C) y el sobrenadante se analizó usando el ensayo de OPA (o-ftaldialdehído). La actividad de las proteasas es la cantidad de extremos α-amino libres tal como se determina mediante la absorbancia a 340 nm menos el blanco (muestra procesada sin enzima) y se proporciona en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: pH-actividad de diferentes proteasas en maíz-SBM

Proteasa	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Bacillus horneckiae (SEQ ID NO: 1).	0,01	0,15	1,38	1,5	0,94
Bacillus sp. TY145 (SEQ ID NO: 2).	0,00	0,77	2,08	3,26	4,54
Variante de Bacillus sp. (SEQ ID NO: 3).	0,00	0,69	1,28	1,96	2,76

Ejemplo 5: Termoestabilidad

- 5 Una alícuota de la muestra proteica de la proteasa se desaliniza o se sustituye su tampón por acetato-Na 20 mM, pH 4,0 usando una columna PD-10 preempaquetada o se dializa frente a 2 × 500 ml de acetato-Na 20 mM, pH 4,0 a 4 °C en una etapa de 2-3 h seguido de una etapa que dura toda la noche. La muestra se filtra a través de un filtro de 0,45 µm y se diluye con tampón hasta aproximadamente 2 unidades de A280. El tampón de diálisis se usa como referencia en la calorimetría diferencial de barrido (CDB). Las muestras se desgasifican usando succión al vacío y agitando durante aproximadamente 10 minutos.
- 10 Se realiza un barrido de CDB en un MicroCal VP-DSC con una velocidad de barrido constante de 1,5 °C/min desde 20-90 °C. Se realiza un estudio de los datos usando el software MicroCal Origin (versión 4,10), y la temperatura de desnaturalización, Td (denominada también temperatura de fusión, Tf), se define como la temperatura en el ápice del pico en el termograma.

Ejemplo 6: Estabilidad frente al vapor

- 15 La actividad residual de la proteasa después del tratamiento con vapor se puede evaluar usando el siguiente ensayo.
- 20 En estos experimentos, se usa una configuración modificada mediante la cual el vapor se obtiene de un generador de vapor y se dirige a la caja. Las muestras colocadas en una placa se insertan en la caja a través de un cajón cuando la temperatura ha alcanzado aproximadamente 93-94 °C. Tras insertar las muestras, la temperatura cae hasta 4 °C. Se realiza la incubación durante 30 segundos mientras la temperatura permanece aproximadamente constante a 90 °C. Posteriormente, se retira rápidamente la placa de la caja, se colocan las muestras en hielo se resuspenden y se evalúan con respecto a la actividad proteasa usando, por ejemplo, el ensayo de Suc-AAPF-pNA o de o-ftaldialdehído (OPA). Cada muestra enzimática se compara con una muestra similar que no ha sido tratada con vapor con el fin de calcular la actividad residual.

Ejemplo 7: Pruebas de estabilidad frente a la microgranulación

- 25 La granulación enzimática se lleva a cabo de la manera que se describe en el Ejemplo 1 de la patente de EE. UU. n.º 4 106 991. El granulado obtenido se seca en un lecho fluido hasta un contenido de agua inferior a un 1 % y se criba para obtener un producto con un tamaño de partícula comprendido entre 250 µm y 850 µm. Por último, el producto se recubre con aceite de palma y carbonato de calcio la manera que se describe en el Ejemplo 22 de la patente de EE. UU. n.º 4 106 991.
- 30 Se premezclan aproximadamente 50 g de granulado enzimático con 10 kg de pienso durante 10 minutos en una mezcladora horizontal pequeña. Esta premezcla se mezcla con 90 kg de pienso durante 10 minutos en una mezcladora horizontal más grande. Desde la mezcladora, el pienso se dirige al acondicionador (una mezcladora en cascada con inyección de vapor) a una velocidad de aproximadamente 300 kg/hora. El acondicionador calienta el pienso hasta 95 °C (medido a la salida) inyectando vapor. El tiempo de permanencia en el acondicionador es de 30 segundos. Desde el acondicionador el alimento se dirige a una prensa Simon Heesen equipada con un troquel horizontal de 3,0 × 35 mm y se prensa en forma de microgránulos con una longitud de aproximadamente 15 mm. Después de prensar, los microgránulos se colocan en un refrigerador por aire y se enfrían durante 15 minutos.

- 35 La actividad proteasa se mide usando el ensayo de Suc-AAPF-pNA antes de la microgranulación y en los microgránulos de pienso después de la microgranulación. La estabilidad de la microgranulación se determina comparando la actividad proteasa en el pienso microgranulado en relación con la actividad en pienso no microgranulado.

Ejemplo 8: Ensayo de digestibilidad ileal del nitrógeno en pollos de engorde usando la proteasa S8 de Bacillus horneckiae (SEQ ID NO: 1).

Animales y alimentación

- 45 Se usaron pollos de un día de edad (Cobb500) obtenidos de un criadero comercial (Accouvoir multiplicateur Grelier, La Bohardiére, Francia). Los pollos se alojaron en jaulas en batería con suelo de alambre (0,75 m²/jaula, 6 pollos/jaula) con acceso ilimitado al pienso y al agua. La alimentación se dividió en dos fases, Inicial y de Engorde (1-7 y 8-21, respectivamente) de acuerdo con las necesidades nutricionales de los pollos. La distribución de los pollos en

las jaulas dependió del peso corporal del día 1, con el fin de minimizar las variaciones de peso corporal entre las jaulas. Todas las aves se sometieron a la misma estrategia de alimentación durante los primeros 16 días de vida, a lo que siguió un periodo experimental de cinco días en los días 17-21. Durante el periodo experimental, las jaulas se distribuyeron en una dieta de control negativo (CN), dieta de control positivo (CP) o tratamiento enzimático, que se construyó a partir del CN pulverizado con disolución de proteasa líquida, remítase a la Tabla 5. El CP se formuló para contener la misma energía metabolizable, proteína cruda, concentración de lisina y metionina que el CN, sin embargo, se usaron fuentes proteicas con una mayor digestibilidad en comparación con el CN. Todas las dietas contuvieron TiO₂ como un marcador de la digestibilidad.

Tabla 5: Composición y análisis químico de las dietas

g de ingrediente/100 g de pienso	CN	CN + proteasa	CP
Maíz	55,73	55,73	57,79
Harina de soja	37,30	37,30	30,89
Concentrado proteico de soja	-	-	4,50
Aceite vegetal	2,00	2,00	2,00
Caliza	1,00	1,00	1,00
Fosfato de dicalcio	1,86	1,86	1,74
Premezcla de vitaminas	1,00	1,00	1,00
TiO ₂	0,10	0,10	0,10
Avatec® (coccidiostático)	0,06	0,06	0,06
NaCl	0,50	0,50	0,50
DL-Metionina	0,28	0,28	0,28
Lisina·HCl	0,15	0,15	0,14
Treonina	0,01	0,01	-
Proteasa, ppm	-	15	-
EM, Kcal/kg de pienso	3085	3085	3085
PC	22,0	22,0	22,0
D-lisina	1,19	1,19	1,19
D-metionina	0,55	0,55	0,55
Calcio	0,90	0,90	1,18
Fósforo	0,75	0,75	0,73
Fósforo disponible	0,45	0,45	0,45

Recogida de datos y muestras

Se obtuvieron el peso corporal y consumo de pienso por jaula totales entre los días 16 y 21. En el día 21 se sacrificaron todos los pollos mediante dislocación cervical. Los pollos se diseccionaron y se recogió el contenido del íleon terminal. Se definió el íleon terminal como los 17 cm próximos a un punto 2 cm anterior a la unión del íleon y el ciego tal como se describe en Jallier et al. (2003, Influence of the methodology of sampling content from different parts of the ileum on the values of apparent ileal digestibility in broiler chickens, Br. Poult. Sci. 44: 807-809). Se combinaron los materiales que se estaban digiriendo en el íleon de una jaula, se liofilizaron y se molieron para el análisis químico. Se determinaron la concentración de TiO₂ y proteína cruda tanto en el material que se estaba digiriendo como en las muestras de pienso para una estimación posterior de la digestibilidad ileal aparente del nitrógeno, AIDN (%) que se proporciona en la Tabla 6:

$$\text{AIDN (\%)} = 100 - [(CMf/CMe) \times (CNe/CNf)] \times 100$$

donde

CMf = concentración del marcador en el pienso; CMe = concentración del marcador en el material que está digiriendo en el íleon;

- 5 CNf = concentración de nutrientes en el pienso; CNe = concentración de nutrientes en el material que se está digiriendo en el íleon.

Se determinó el contenido de nitrógeno mediante un aparato FP-528 de LECO (LECO® Corporation) de acuerdo con el método Dumas (Dumas, 1831, *Procedes de l'Analyse Organique*, Ann. Chim. Phys. 247: 198-213). El contenido de nitrógeno se transformó en proteína cruda usando un factor de 6,25.

- 10 Se determinaron las concentraciones de dióxido de titanio en el pienso y material que se estaba digiriendo mediante un aparato de plasma de acoplamiento inductivo (ICP, por sus siglas en inglés) ICP-OES 5100 (Agilent Technologies) de acuerdo con la norma DIN EN ISO 11885:1997 (DIN EN ISO 1998) después de mineralización con H₂SO₄ de las muestras.

Tabla 6: Resultados de AIDN a partir del ensayo in vivo en pollos de engorde

Tratamiento	% de digestibilidad ileal aparente del nitrógeno, promedio
CN	75,8
CP	78,8
Bacillus horneckiae (SEQ ID NO: 1)	84,2

- 15 La proteasa de Bacillus horneckiae incrementó de manera significativa (P<0,01 en comparación con el CN) la digestibilidad ileal aparente de nitrógeno en comparación tanto con el CN como con el CP.

Ejemplo 9: Ensayo de digestibilidad ileal del nitrógeno en pollos de engorde usando la proteasa S8 de Bacillus horneckiae (SEQ ID NO: 1) y una proteasa S8 variante de Bacillus sp.

- 20 Se realizó el ensayo tal como se describe en el Ejemplo 8 y los resultados de AIDN se presentan en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Resultados de AIDN a partir del ensayo in vivo en pollos de engorde

Tratamiento	% de digestibilidad ileal aparente del nitrógeno, promedio
CN	80,4
CP	80,5
Bacillus horneckiae (SEQ ID NO: 1).	83,3
Variante de Bacillus sp. (SEQ ID NO: 3).	81,9

- 25 Tanto la proteasa de Bacillus horneckiae como la variante de proteasa de Bacillus sp. incrementaron la digestibilidad ileal aparente de nitrógeno en comparación tanto con el CN como con el CP. En este ensayo in vivo, la digestibilidad proteica intrínseca de los ingredientes del pienso fue inesperadamente elevada, lo que significa que el CP solamente mostró un incremento mínimo en la digestibilidad en comparación con el CN. Aun así, las proteasas incrementaron la digestibilidad ileal aparente de nitrógeno en comparación con el CP, lo que muestra que las proteasas pueden actuar incluso en dietas de buena calidad.

- 30 Ejemplo 10: Pienso para animales y aditivos para pienso

Gránulo

El gránulo se prepara granulando una proteasa de la invención con un relleno tal como sulfato de sodio, sulfato de magnesio, carbonato de calcio y/o celulosa y a continuación, recubriendo opcionalmente el gránulo con un recubrimiento de cera (por ejemplo, aceite de palma hidrogenado) o un recubrimiento de sal (por ejemplo, sulfato de sodio y/o sulfato de magnesio).

35

Como alternativa, el gránulo se prepara absorbiendo una disolución líquida de una proteasa de la invención en un núcleo inerte y a continuación, recubriendo opcionalmente el gránulo con un recubrimiento de cera (por ejemplo, aceite de palma hidrogenado) o un recubrimiento de sal (por ejemplo, sulfato de sodio y/o sulfato de magnesio).

Formulación líquida

- 5 Una formulación líquida de una proteasa de la invención comprende de un 0,1 % a un 10 % p/p de proteína enzimática, un 40-60 % de glicerol, de un 0,1 a un 0,5 % de benzoato de sodio y agua. La formulación líquida se pulveriza sobre el pienso para animales en microgránulos descrito anteriormente o sobre un pienso en forma de puré.

Aditivo para pienso para animales

- 10 Se añade una formulación de premezcla de una proteasa de la invención que contiene de 0,01 g a 10 g de proteína enzimática por kilo de premezcla (formulada opcionalmente como un gránulo revestido) a la siguiente premezcla:

5000000	IE	Vitamina A
1000000	IE	Vitamina D3
13333	mg	Vitamina E
1000	mg	Vitamina K3
750	mg	Vitamina B1
2500	mg	Vitamina B2
1500	mg	Vitamina B6
7666	mcg	Vitamina B12
12333	mg	Niacina
33333	mcg	Biotina
300	mg	Ácido fólico
3000	mg	Ca-D-Pantotenato
1666	mg	Cu
16666	mg	Fe
16666	mg	Zn
23333	mg	Mn
133	mg	Co
66	mg	I
66	mg	Se
5,8	%	Calcio
25	%	Sodio

Ejemplos de pienso para animales

Este es un ejemplo de un pienso para pollos de engorde que comprende el aditivo para pienso para animales tal como se ha descrito anteriormente:

- 15 62,55 % de maíz
33,8 % de harina de soja (50 % de proteína cruda)
1,0 % de aceite de soja
0,2 % de DL-metionina

0,22 % de DCP (fosfato dicálcico)

0,76 % de CaCO₃ (carbonato de calcio)

0,32 % de arena

0,15 % de NaCl (cloruro de sodio)

- 5 1 % del aditivo para pienso para animales anterior (premezcla).

Los ingredientes se mezclan, y el pienso se microgranula a la temperatura deseada, por ejemplo, 60, 65, 75, 80, 85, 90 o incluso 95 °C.

- 10 Únicamente a modo de ejemplo, un pienso para pollos, por ejemplo, pollos de engorde, puede comprender uno o más de los ingredientes enumerados en los porcentajes de ejemplo que se proporcionan en la Tabla 8.1 a continuación.

Tabla 8.1: Ejemplo de dieta para pollos de engorde en la fase de iniciación y finalización

Ingredientes	Iniciación (%)	Finalización (%)
Maíz	46,2	46,7
Trigo molido	6,7	10,0
DDGS de maíz	7,0	7,0
Harina de soja 48 % PC	32,8	26,2
Combinación de grasa animal/veg	3,0	5,8
L-Lisina·HCl	0,3	0,3
DL-Metionina	0,3	0,3
L-treonina	0,1	0,1
Sal	0,3	0,4
Caliza	1,1	1,1
Fosfato dicálcico	1,2	1,2
Premezcla de vitaminas y minerales	0,3	0,3

Únicamente a modo de ejemplo, las especificaciones de la dieta para pollos, tales como pollos de engorde, pueden ser como se exponen como se proporcionan en la Tabla 8.2 a continuación.

- 15 Tabla 8.2: Ejemplo de especificaciones de la dieta para pollos en la fase de iniciación y finalización

Especificaciones de la dieta	Iniciación	Finalización
Proteína cruda (%)	23,00	20,40
Energía metabolizable (kcal/kg)	2950	3100
Calcio (%)	0,85	0,85
Fósforo disponible (%)	0,38	0,38
Sodio (%)	0,18	0,19
Lisina digerible (%)	1,21	1,07
Metionina digerible (%)	0,62	0,57
Metionina + cisteína digeribles (%)	0,86	0,78

Especificaciones de la dieta	Iniciación	Finalización
Treonina digerible (%)	0,76	0,68

Únicamente a modo de ejemplo, un pienso para gallinas ponedoras puede comprender uno o más de los ingredientes enumerados en los porcentajes de ejemplo que se proporcionan en la Tabla 8.3 a continuación.

Tabla 8.3: Ejemplo de la dieta para ponedoras en la fase de puesta

Ingrediente	Fase de puesta (%)
Maíz	10,0
Trigo	53,6
DDGS de maíz	5,0
Harina de soja 48 % PC	14,9
Trigo molido	3,0
Aceite de soja	1,8
L-Lisina · HCl	0,2
DL-Metionina	0,2
L-Treonina	0,1
Sal	0,3
Fosfato dicálcico	1,6
Caliza	8,9
Premezcla de vitaminas y minerales	0,6

5

Únicamente a modo de ejemplo, las especificaciones de la dieta para gallinas ponedoras pueden ser como se exponen se proporcionan en la Tabla 8.4 a continuación.

Tabla 8.4: Ejemplo de especificaciones de la dieta para gallinas ponedoras en la fase de puesta

Especificaciones de la dieta	Fase de puesta
Proteína cruda (%)	16,10
Energía metabolizable (kcal/kg)	2700
Lisina (%)	0,85
Metionina (%)	0,42
Metionina + cisteína (%)	0,71
Treonina (%)	0,60
Calcio (%)	3,85
Fósforo disponible (%)	0,42
Sodio (%)	0,16

10 Únicamente a modo de ejemplo, un pienso para pavos puede comprender uno o más de los ingredientes enumerados en los porcentajes de ejemplo que se proporcionan en la Tabla 8.5 a continuación.

Tabla 8.5: Ejemplo de dieta para pavos en las fases 1 a 4

Ingrediente	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)	Fase 3 (%)	Fase 4 (%)
Trigo	33,6	42,3	52,4	61,6
DDGS de maíz	7,0	7,0	7,0	7,0
Harina de soja 48 % PC	44,6	36,6	27,2	19,2
Harina de colza	4,0	4,0	4,0	4,0
Aceite de soja	4,4	4,2	3,9	3,6
L-Lisina·HCl	0,5	0,5	0,4	0,4
DL-Metionina	0,4	0,4	0,3	0,2
L-Treonina	0,2	0,2	0,1	0,1
Sal	0,3	0,3	0,3	0,3
Caliza	1,0	1,1	1,1	1,0
Fosfato dicálcico	3,5	3,0	2,7	2,0
Premezcla de vitaminas y minerales	0,4	0,4	0,4	0,4

Únicamente a modo de ejemplo, las especificaciones de la dieta para pavos pueden ser como se exponen se proporcionan en la Tabla 8.6 a continuación.

5 Tabla 8.6: Ejemplo de especificaciones de la dieta para pavos en las fases 1 a 4

Especificaciones de la dieta	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Proteína cruda (%)	29,35	26,37	22,93	20,00
Energía metabolizable (kcal/kg)	2,850	2,900	2,950	3,001
Calcio (%)	1,43	1,33	1,22	1,02
Fósforo disponible (%)	0,80	0,71	0,65	0,53
Sodio (%)	0,16	0,17	0,17	0,17
Lisina digerible (%)	1,77	1,53	1,27	1,04
Metionina digerible (%)	0,79	0,71	0,62	0,48
Metionina + cisteína digeribles (%)	1,12	1,02	0,90	0,74
Treonina digerible (%)	1,03	0,89	0,73	0,59

Únicamente a modo de ejemplo, un pienso para lechones puede comprender uno o más de los ingredientes enumerados en los porcentajes de ejemplo que se proporcionan en la Tabla 8.7 a continuación.

Tabla 8.7: Ejemplo de dieta para lechones en las fases 1 y 2

Ingrediente	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)
Maíz	20,0	7,0
Trigo	25,9	46,6
Centeno	4,0	10,0
Trigo molido	4,0	4,0
DDGS de maíz	6,0	8,0
Harina de soja 48 % PC	25,7	19,9
Suero seco	10,0	0,0
Aceite de soja	1,0	0,7
L-Lisina·HCl	0,4	0,5
DL-Metionina	0,2	0,2
L-Treonina	0,1	0,2
L-Triptófano	0,03	0,04
Caliza	0,6	0,7
Fosfato dicálcico	1,6	1,6
Premezcla de vitaminas y minerales	0,2	0,2
Sal	0,2	0,4

Únicamente a modo de ejemplo, las especificaciones de la dieta para lechones pueden ser como se exponen se proporcionan en la Tabla 8.8 a continuación.

5 Tabla 8.8: Ejemplo de especificaciones de la dieta para lechones en las fases 1 a 2

Especificaciones de la dieta	Fase 1	Fase 2
Proteína cruda (%)	21,50	20,00
Energía digerible (kcal/kg)	3380	3320
Energía neta para los suidos (kcal/kg)	2270	2230
Calcio (%)	0,80	0,75
Fósforo digerible (%)	0,40	0,35
Sodio (%)	0,20	0,20
Lisina digerible (%)	1,23	1,14
Metionina digerible (%)	0,49	0,44
Metionina + cisteína digeribles (%)	0,74	0,68
Treonina digerible (%)	0,80	0,74

Únicamente a modo de ejemplo, un pienso para cerdos en fase de engorde/final puede comprender uno o más de los ingredientes enumerados en los porcentajes de ejemplo que se proporcionan en la Tabla 8.9 a continuación.

Tabla 8.9: Ejemplo de dieta de engorde/final

Ingrediente	Engorde/final (%)
Maíz	27,5
Harina de soja 48 % PC	15,4
DDGS de maíz	20,0
Salvado de trigo	11,1
Salvado de arroz	12,0
Harina de semillas de canola	10,0
Caliza	1,6
Fosfato dicálcico	0,01
Sal	0,4
Premezcla de vitaminas y minerales	0,3
Lisina·HCl	0,2
Aceite vegetal	0,5

Únicamente a modo de ejemplo, las especificaciones de la dieta para cerdos en fase de engorde/final pueden ser como se exponen se proporcionan en la Tabla 8.10 a continuación.

5 Tabla 8.10: Ejemplo de especificaciones de la dieta para cerdos en fase de engorde/finalización

Especificaciones de la dieta	Engorde/finalización
Proteína cruda (%)	22,60
Energía metabolizable (kcal/kg)	3030
Calcio (%)	0,75
Fósforo disponible (%)	0,29
Lisina digerible (%)	1,01
Metionina + cisteína digeribles (%)	0,73
Treonina digerible (%)	0,66

Ejemplo 11: Ensayo de digestibilidad en el yeyuno aparente del nitrógeno en pollos de engorde para nuevas proteasas en comparación con la referencia (Cibenza)

Animales y alimentación

- 10 Se usaron pollos de un día de edad (Cobb500) obtenidos de un criadero comercial (Accouvoir multiplicateur Grelier, La Bohardiére, Francia). Los pollos se alojaron en jaulas en batería con suelo de alambre (0,75 m²/jaula, 6 pollos/jaula). Se les proporcionó acceso ilimitado al pienso proporcionado en la Tabla 9 y agua hasta el día 7. Las aves se pesaron en el día 7 y se distribuyeron en uno de los 6 tratamientos usando el peso corporal como criterio. Se usó la misma dieta para alimentar a las aves hasta el día 16. El periodo experimental transcurrió a continuación desde los días 16 a 21 de la vida del pollo. Durante el periodo experimental, se alimentó a las aves con una dieta de control positivo (CP), dieta de control negativo (CN) o CN + enzima de prueba (Tabla 9). Las enzimas de prueba usadas en el experimento son la SEQ ID NO: 1 (S8, *B. hornechiae*) y la SEQ ID NO: 3 (S8, *Bacillus* sp-11238).

- 20 Las enzimas se proporcionaron en forma líquida y se aplicaron a los tratamientos mediante pulverización usando un sistema de presión un trabaja acoplado con una mezcladora Forberg F60. El CP se formuló para proporcionar la misma energía metabolizable, proteína cruda, concentración de lisina y metionina que el CN, sin embargo, contuvo

fuentes proteicas con una mayor digestibilidad en comparación con el CN. Todas las dietas contuvieron TiO₂ como un marcador de la digestibilidad.

Tabla 9: Composición y análisis químico de las dietas

g de ingrediente/100 g de pienso	CN	CN + proteasa	CP
Maíz	55,73	55,73	57,79
Harina de soja	37,30	37,30	30,89
Concentrado proteico de soja	-	-	4,50
Aceite vegetal	2,00	2,00	2,00
Caliza	1,00	1,00	1,00
Fosfato de dicalcio	1,86	1,86	1,74
Premezcla de vitaminas	1,00	1,00	1,00
TiO ₂	0,10	0,10	0,10
Avatec® (coccidiostático)	0,06	0,06	0,06
NaCl	0,50	0,50	0,50
DL-Metionina	0,28	0,28	0,28
Lisina-HCl	0,15	0,15	0,14
Treonina	0,01	0,01	-
Proteasa, ppm	-	15	-
Valores objetivo de energía, aminoácidos y minerales			
EM, Kcal/kg de pienso	3085	3085	3085
PC	22,0	22,0	22,0
D-lisina	1,19	1,19	1,19
D-metionina	0,55	0,55	0,55
Calcio	0,90	0,90	1,18
Fósforo	0,75	0,75	0,73
Disponibilidad de fósforo	0,45	0,45	0,45

5 Recogida de datos y muestras

Se obtuvieron el peso corporal y consumo de pienso promedio por jaula y por tratamiento entre los días 16 y 21. En el día 21 se sacrificaron todos los pollos mediante dislocación cervical. Los pollos se diseccionaron y se recogió el contenido del yeyuno. Se define el yeyuno como el segmento del intestino delgado que comienza al final del bucle pancreático (duodeno) y termina en su parte distal a 1 cm de proximidad del divertículo de Meckel. Se combinaron los materiales que se estaban digiriendo en el yeyuno de una jaula, se liofilizaron y se molieron para el análisis químico. Se determinaron la concentración de TiO₂ y proteína cruda tanto en el material que se estaba digiriendo como en las muestras de pienso para una estimación posterior de la digestibilidad en el yeyuno aparente del nitrógeno, AJDN (%) que se proporciona en la Tabla 10:

$$\text{AJDN (\%)} = 100 - [(\text{CMf/CMe}) \times (\text{CNe/CNf})] \times 100$$

15 donde

CMf = concentración del marcador en el pienso; CMe = concentración del marcador en el material que está digiriendo en el yeyuno;

CNf = concentración de nutrientes en el pienso; CNe = concentración de nutrientes en el material que se está digiriendo en el yeyuno.

- 5 Se determinó el contenido de nitrógeno usando un aparato FP-528 de LECO (LECO® Corporation) de acuerdo con el método Dumas (Dumas, 1831, *Procédés de l'Analyse Organique*, Ann. Chim. Phys. 247:198–213). El contenido de nitrógeno se transformó en proteína cruda usando un factor de 6,25.

- 10 Se determinaron las concentraciones de dióxido de titanio en el pienso y material que se estaba digiriendo usando un instrumento ICP-OES 5100 (Agilent Technologies) de acuerdo con la norma DIN EN ISO 11885:1997 (DIN EN ISO 1998) después de mineralización con H₂SO₄ de las muestras.

Tabla 10: Resultados del primer ensayo in vivo

Tratamiento	% de digestibilidad en el yeyuno aparente del nitrógeno, promedio
CN	57,88
CP	60,44
SEQ ID NO: 1	62,61
SEQ ID NO: 2	61,26
SEQ ID NO: 3	62,04
Cibenza	57,18

Los resultados demuestran que las proteasas incrementaron la digestibilidad en el yeyuno aparente del nitrógeno en comparación tanto con el CN y CP como con la referencia (Cibenza).

- 15 Ejemplo 12: Ensayo de digestibilidad en el yeyuno aparente del nitrógeno en pollos de engorde para nuevos homólogos de proteasas en comparación con la referencia (Cibenza)

Animales y alimentación

- 20 Se usaron pollos de un día de edad (Cobb500) obtenidos de un criadero comercial (Accouvoir multiplicateur Grelier, La Bohardière, Francia). Los pollos se alojaron en jaulas en batería con suelo de alambre (0,75 m²/jaula, 6 pollos/jaula). Se les proporcionó acceso ilimitado al pienso [¿Qué tipo de pienso?] y agua hasta el día 7. Las aves se pesaron en el día 7 y se distribuyeron en uno de los 8 tratamientos usando el peso corporal como criterio. Se usó una dieta similar [¿Describir dieta?] para alimentar a las aves hasta el día 16. El periodo experimental transcurrió a continuación desde los días 16 a 21 de la vida del pollo. Durante el periodo experimental, se alimentó a las aves con una dieta de control positivo (CP), dieta de control negativo (CN) o CN + enzima de prueba (Tabla 11). Las enzimas de prueba usadas en el experimento fueron:

SEQ ID NO: 5	S8, <i>Bacillus</i> sp-13380 (78 % respecto a la SEQ ID NO: 1)
SEQ ID NO: 6	S8, <i>Bacillus idriensis</i> (80 % respecto a la SEQ ID NO: 1)
SEQ ID NO: 7	S8, <i>Bacillus</i> sp-13380 (89 % respecto a la SEQ ID NO: 1)
SEQ ID NO: 8	S8, <i>Bacillus</i> sp-62451 (90 % respecto a la SEQ ID NO: 1)
SEQ ID NO: 9	S8, <i>Bacillus oceanisediminis</i> (87 % respecto a la SEQ ID NO: 1)

- 30 Las enzimas se proporcionaron en forma líquida y se aplicaron a los tratamientos mediante pulverización usando un sistema de presión ultrabaja acoplado con una mezcladora Forberg F60. El CP se formuló para proporcionar la misma energía metabolizable, proteína cruda, concentración de lisina y metionina que el CN, sin embargo, contuvo fuentes proteicas con una mayor digestibilidad en comparación con el CN. Todas las dietas contuvieron TiO₂ como un marcador de la digestibilidad.

Tabla 11: Composición y análisis químico de las dietas

g de ingrediente/100 g de pienso	CN	CN + proteasa	CP
Maíz	55,73	55,73	57,79
Harina de soja	37,30	37,30	30,89
Concentrado proteico de soja	-	-	4,50
Aceite vegetal	2,00	2,00	2,00
Caliza	1,00	1,00	1,00
Fosfato de dicalcio	1,86	1,86	1,74
Premezcla de vitaminas	1,00	1,00	1,00
TiO ₂	0,10	0,10	0,10
Avatec® (coccidiostático)	0,06	0,06	0,06
NaCl	0,50	0,50	0,50
DL-Metionina	0,28	0,28	0,28
Lisina-HCl	0,15	0,15	0,14
Treonina	0,01	0,01	-
Proteasa, ppm	-	15	-
Valores objetivo de energía, aminoácidos y minerales			
EM, Kcal/kg de pienso	3085	3085	3085
PC	22,0	22,0	22,0
D-lisina	1,19	1,19	1,19
D-metionina	0,55	0,55	0,55
Calcio	0,90	0,90	1,18
Fósforo	0,75	0,75	0,73
Disponibilidad de fósforo	0,45	0,45	0,45

Recogida de datos y muestras

- 5 Se obtuvieron el peso corporal y consumo de pienso promedio por jaula y por tratamiento entre los días 16 y 21. En el día 21 se sacrificaron todos los pollos mediante dislocación cervical. Los pollos se diseccionaron y se recogió el contenido del yeyuno. Se define el yeyuno como el segmento del intestino delgado que comienza al final del bucle pancreático (duodeno) y termina en su parte distal a 1 cm de proximidad del divertículo de Meckel. Se combinaron los materiales que se estaban digiriendo en el yeyuno de una jaula, se liofilizaron y se molieron para el análisis químico. Se determinaron la concentración de TiO₂ y proteína cruda tanto en el material que se estaba digiriendo como en las muestras de pienso para una estimación posterior de la digestibilidad en el yeyuno aparente del nitrógeno, AJDN (%) que se proporciona en la Tabla 12:

$$AJDN (\%) = 100 - [(CMf/CMe) \times (CNe/CNf)] \times 100$$

donde

- 15 CMf = concentración del marcador en el pienso; CMe = concentración del marcador en el material que está digiriendo en el yeyuno;

CNf = concentración de nutrientes en el pienso; CNe = concentración de nutrientes en el material que se está digiriendo en el yeyuno.

Se determinó el contenido de nitrógeno usando un aparato FP-528 de LECO (LECO® Corporation) de acuerdo con el método Dumas (Dumas, J.B.A., *Procédés de l'Analyse Organique*, Ann. Chim. Phys. 247:198–213 (1831). El contenido de nitrógeno se transformó en proteína cruda usando el factor 6,25.

Se determinaron las concentraciones de dióxido de titanio en el pienso y material que se estaba digiriendo usando un instrumento ICP-OES 5100 (Agilent Technologies) de acuerdo con la norma DIN EN ISO 11885:1997 (DIN EN ISO 1998) después de mineralización con H₂SO₄ de las muestras.

Tabla 12: Resultados del primer ensayo in vivo

Tratamiento	% de digestibilidad en el yeyuno aparente del nitrógeno, promedio
CN	53,50
SEQ ID NO: 5	55,67
SEQ ID NO: 7	54,23
SEQ ID NO: 6	54,14
SEQ ID NO: 9	53,83
Cibenza	53,82

Los resultados demuestran que las proteasas incrementaron la digestibilidad en el yeyuno aparente del nitrógeno en comparación tanto con el CN como con la referencia (Cibenza).

La invención descrita y reivindicada en el presente documento no debe estar limitada en cuanto a su alcance por los aspectos específicos que se describen en el presente documento, ya que se pretende que estos aspectos sean ilustraciones de varios aspectos de la invención. Se pretende que cualesquiera aspectos equivalentes queden incluidos en el alcance de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica teniendo en cuenta la descripción anterior. También se pretende que dichas modificaciones queden incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. En caso de conflicto, prevalecerá la presente divulgación, incluidas las definiciones.

Ejemplo 12. Actividad de 10 PE-variantes de la SEQ ID NO: 1 en material relevante de pienso (SBM/maíz) a pH 7

Las proteasas se incuban con una suspensión espesa de SBM-maíz pH 7 a 40 °C con agitación. Después de la incubación se mide el efecto de la proteasa mediante el método de OPA.

Se prepara una disolución madre de tampón (ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, tampón CAPS 100 mM, CaCl₂·2H₂O 12,5 mM, KCl 306 mM, 0,01 % de Triton X-100) y se ajusta a pH de 7,36 con NaOH 10 M o HCl al 37 %. La mezcla de 1,4 g de SBM (siglas en inglés de harina de soja) molida, 0,6 g de maíz molido con 20 ml de la disolución madre de tampón proporciona una suspensión espesa con un pH resultante de 7. La suspensión espesa se premezcla durante 5 min a temperatura ambiente en un agitador magnético.

Se colocan placas de 24 pocillos (con imanes cruzados) en un dispositivo con calefacción y agitación combinadas para precalentar a 40 °C. Se transfieren 2 ml de la suspensión espesa con pH 7 a cada pocillo y la placa se cierra con cinta para precintar y se preincuban durante 30 min. Se añaden 100 µl de tampón (blanco) o disolución enzimática a los pocillos (correspondiente a 200 mg de enzima/kg de pienso), se cierra la cinta para precintar y las placas incuban durante 3 horas. La placa se centrifuga durante 10 min a 4000 rpm (2500 x g) a 0 °C. El sobrenadante se transfiere a tubos Eppendorf y se analiza usando la metodología de OPA descrita anteriormente.

Todas las variantes de PE estudiadas tuvieron una actividad más elevada que la no modificada a pH 7 en SBM:maíz.

SEQ ID NO: 1, Variante	Actividad (pH 7)	Desv. est.
S173P,S175P,T297P H39D,N59D,L61Y	2,74	0,33
S173P,S175P,T297P H39D,L61P	2,74	0,60
S173P,S175P,T297P I43P,L61P,H123W,V124A	2,28	0,28
S173P,S175P,T297P H39D,N59D,L61Y,H83T	2,53	0,02
S173P,S175P,T297P L61Y,V124A,R130D	2,79	0,50
S173P,S175P,T297P H39D,I43P,N59D,L61Y	2,79	0,35
S173P,S175P,T297P H83T,V124A,R130D	2,00	0,51
S173P,S175P,T297P I43P,L61P,E127N,S129M	3,03	0,10
S173P,S175P,T297P I43P,L61P,V124A,R130D	1,62	0,07
S173P,S175P,T297P I43P,N59D,H123W,V124A	1,89	0,05
(ninguna) SEQ ID NO: 1	0,85	0,04

Ejemplo 13. SEQ ID NO: 3. Datos in vitro del material relevante de pienso

Mismo procedimiento que anteriormente.

Proteasa	Actividad a pH 7
ProAct	3,27
SEQ ID NO: 3	4,25

5

A pH 7, la SEQ ID NO: 3 tiene una actividad más elevada en SBM:maíz que ProAct®.

Ejemplo 14 . Ejemplos de clonación y expresión para variantes de PE de la SEQ ID NO 1

Ejemplo 14.1: Construcción de variantes mediante mutagénesis dirigida al sitio

10 Se construyeron variantes dirigidas al sitio de la proteasa de serina S8A de *Bacillus horneckiae* (SEQ ID NO: 1), que comprenden sustituciones específicas de acuerdo con la invención. Las variantes se prepararon mediante clonación tradicional de fragmentos de ADN (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989) usando PCR junto con oligonucleótidos mutagénicos diseñados adecuadamente que introducían las mutaciones deseadas en la secuencia resultante y cualquier experto en la técnica las puede repetir.

15 Se diseñaron los oligonucleótidos mutagénicos correspondientes a la secuencia de ADN que flanquea el(los) sitio(s) de mutación deseado(s), se separaron según los pares de bases de ADN que definen las inserciones/deleciones/sustituciones, y se adquirieron de un proveedor de oligonucleótidos tal como Integrated DNA Technologies (IDT). Para estudiar las variantes de proteasa de la invención, se integra el ADN mutado que comprende una variante de la invención en una cepa competente de *B. subtilis* mediante recombinación homóloga, se fermenta usando protocolos estándar (medio a base de extracto de levadura, 4 días, 30 °C) y se criba mediante un ensayo de actividad.

20

Ejemplo 14.2: Expresión para el ensayo de actividad

25 Las variantes construidas se sembraron en placas en agar LB complementado con 6 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 37 °C durante un día. Después del cultivo, se recogieron colonias y se transfirieron a pocillos individuales de placas estándar de 24 pocillos profundos (DWP, por sus siglas en inglés) que contenían 3 ml de caldo TBgly complementado con 6 µg/ml de cloranfenicol y oligometales (FeCl₃ 50 mM, CaCl₂ 20 mM, MnCl₂ 10 mM, ZnSO₄ 10 mM, CuCl₂ 2 mM y NiCl₂ 2 mM, (F. William Studier, "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures", *Protein Expression and Purification*, 41 (2005) 207-234).

La proteasa de serina S8A de *Bacillus horneckiae* no modificada también se inoculó como referencia en cuatro pocillos de cada placa. Las placas DWP se cultivaron durante cuatro días a 30 °C con agitación a 220 rpm. Después del cultivo, las placas se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se redistribuyeron en cuadrícula en placas de microvaloración de 96 pocillos que se usaron a continuación para el cribado de la actividad residual.

Ejemplo 14.3: Fermentación para la purificación

La fermentación se puede realizar mediante métodos muy conocidos en la técnica o de la siguiente forma. Las diferentes cepas de *B. subtilis* que albergaban las variantes se extendieron en líneas en placas de agar LB, y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Se transfirieron las colonias a 100 ml de medio PS-1 (PS-1: 100 g/l de sacarosa (n.º de cat. de Danisco 109-0429), 40 g/l de corteza de soja (harina de soja), 10 g/l de Na₂HPO₄·12H₂O (n.º de cat. de Merck 6579), 0,1 ml/l de reemplazo- Dowfax63N10 (Dow) en matraces agitados de 500 ml. El cultivo dura habitualmente 4 días a 30 °C con agitación a 270 rpm. Se retiraron las células y otro material no disuelto del caldo de fermentación centrifugando a 4500 rpm durante 20-25 minutos.

Ejemplo 15. Descripción del ensayo para cribar las variantes de la SEQ ID NO 1 para detectar una mejora en la estabilidad gástrica

Medios y disolución

Un litro de tampón acetato/MES/HEPES/glicina 100 mM estuvo compuesto de 8,2 g de acetato de sodio, 19,5 g de MES, 23,8 g de HEPES y 7,5 g de glicina. Este tampón se complementó con 1 ml de CaCl₂ (1 M), 50 ml de SDS al 20 %, 1 ml de Triton-X al 10 % y el pH se ajustó a pH 7 con NaOH 5 N.

Se preparó tampón de provocación gástrica pH 3,4 mezclando 715 ml de ácido cítrico 0,1 M y 285 ml de Na₂HPO₄ 0,2 M.

El reactivo de parada estuvo compuesto de Na₂HPO₄ 0,2 M.

Se preparó la placa de ensayo Protazyme AK a pH 7 en placas de 96 pocillos de 0,5 ml Nunc U96PP con fondo en V. Se disolvieron cien comprimidos de Protazyme AK (Megazyme T-PRAK-200T) (aproximadamente 10,825 g) en 200 ml de acetato/MES/HEPES/glicina/CaCl₂/SDS/Triton-X100 agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se separaron en alícuotas 180 µl de esta disolución en las placas de 96 pocillos con fondo en V MTP (Nunc U96PP 0,5 ml) usando una pipeta de 8 canales y puntas de pipeta con un orificio amplio. Las placas de ensayo se sellaron y congelaron hasta su uso.

Se separaron en alícuotas caldos de *Bacillus* de las variantes de la SEQ ID NO: 1 en dos cuadrículas idénticas. Cada cuadrícula contuvo muestras duplicadas y también estuvieron presentes dos ejes de referencia en cada cuadrícula para todas las placas.

Descripción del ensayo

El ensayo se ejecutó en un Biomek FXp (Beckman Coulter). El ensayo consistió en una caída de pH hasta pH 3,4 (provocación gástrica) durante 10 minutos (cribado primario) y 15 minutos (cribado secundario realizado en mutaciones combinadas del cribado primario) a 23 °C para las diferentes variantes de la SEQ ID NO: 1. Durante ese tiempo de incubación, la estabilidad de los ejes de las diferentes variantes se vio afectada de manera diferente por la caída del pH. El ensayo de provocación gástrica se detuvo añadiendo el reactivo de parada para neutralizar la reacción en la cuadrícula de provocación. Para evitar variaciones entre placas, las muestras estudiadas para este ensayo de provocación gástrica se dividieron en dos cuadrículas dentro de una placa de 96 pocillos: una cuadrícula de control, que no se sometió a la caída de pH y una cuadrícula de provocación que sufrió la agresión de la caída de pH.

La segunda parte del ensayo consistió en revelar la actividad residual mediante una incubación en placas de Protazyme AK a pH 7 después del ensayo de provocación gástrica. El ensayo de Protazyme AK se incubó durante 15 minutos a 23 °C con agitación a 500 rpm. La reacción se detuvo por centrifugación y los sobrenadantes se transfirieron a una placa espectrofotométrica de lectura. Se calculó la relación de la actividad residual (AR) para cada variante calculando la relación de (absorbancia promedio variante respecto a la cuadrícula de provocación)/(absorbancia promedio variante respecto a la cuadrícula de control)*100. Se usó este número de AR para clasificar las variantes según su mejora de la estabilidad gástrica. Se realizaron dos ciclos de cribado: un primer ciclo para identificar las mutaciones primarias más prometedoras y un segundo para identificar las variantes más estabilizadas generadas a partir de las mutaciones primarias combinadas. Se analizó la absorbancia de las placas espectrofotométricas a 590 nm.

Ejemplo 16 Purificación de PE-variantes de proteasa

Ensayo de actividad

Ensayo de Suc-AAPF-pNA:

Sustrato pNA: Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).

Temperatura: Temperatura ambiente (25 °C)

Tampón de ensayo : ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, 0,01 % de Triton X-100, pH 9,0.

- 5 Se mezclaron 20 µl de proteasa (diluidos en Triton X-100 al 0,01 %) con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100 µl de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluidos adicionalmente 45x con Triton X-100 al 0,01 %). El incremento en la OD₄₀₅ se monitorizó como una medición de la actividad proteasa.

Purificación de las PE-variantes de la SEQ ID NO 1

- 10 Se expresaron las PE-variantes en *B. subtilis*. Se centrifugó el caldo de cultivo (26000 x g, 20 min) y se decantó cuidadosamente el sobrenadante del precipitado. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración Nalgene de 0,2 µm para retirar los restos de células hospedadoras de *Bacillus*. El filtrado de 0,2 µm se mezcló 1:1 con (NH₄)₂SO₄ 3,0 M y la mezcla se aplicó a una columna de fenil-Sepharose FF (sustitución elevada) (de GE Healthcare) equilibrada en H₃BO₃ 50 mM, MES/NaOH 10 mM, CaCl₂ 2 mM, (NH₄)₂SO₄ 1,5 M, pH 6,0. Después de lavar la columna con el tampón de equilibrio, la proteasa se eluyó por etapas con H₃BO₃ 50 mM, MES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6,0. El pico eluido (que contenía la actividad proteasa, se recogió y se aplicó sobre una columna de bicitracina-agarosa (de Upfront chromatography) equilibrada con H₃BO₃ 50 mM, MES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6,0. Tras lavar exhaustivamente la columna con el tampón de equilibrio, se eluyó la proteasa con H₃BO₃ 50 mM, MES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 1 M, pH 6,0 con 2-propanol al 25 % (v/v). El pico de elución (que contenía la actividad proteasa) se transfirió a MES 20 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6,0 en una columna de sephadex G25 (de GE Healthcare). El pico transferido constituyó el preparado purificado y se usó para experimentos adicionales.

Cuando los preparados purificados de PE-proteasa variante se analizaron mediante SDS-PAGE no reductora y el gel se tiñó con coomassie, las PE-proteasas variante se visualizaron como una banda dominante principal a aprox. 34-37 kDa.

Ejemplo 17. Ensayo in vivo con pollos de engorde

25 Material y métodos

Se realizaron cuatro ensayos independientes en gallineros con suelo y un estudio con pollos de engorde en un gallinero tipo jaula para evaluar el rendimiento de crecimiento y la digestibilidad ileal aparente del nitrógeno.

Animales y alojamiento

- 30 El día de la llegada (día 1), los pollos (Ross 308/708, Cobb 500) se dividieron por peso en grupos de 18-25 aves. Cada grupo se colocó en un gallinero con suelo cubierto de virutas de madera y se le asignó uno de los diferentes tratamientos. En el ensayo en gallinero tipo jaula, se han usado 5 aves por réplica.

Cada tratamiento se replicó con 8-12 grupos. Los pollos se alojaron en una habitación con ambiente controlado. La temperatura ambiental se adaptó a la edad de las aves. Los pollos tuvieron libre acceso al pienso y al agua.

Composición del pienso, tratamientos y duración de la alimentación

35 Fase de alimentación:

- Iniciación (0-14)
- De engorde (días 14-28)
- Finalización (días 28-35)

Dieta experimental complementada con enzimas: Días 0-35

40 Distribución del pienso: Después de la microgranulación o puré

Las enzimas se proporcionaron en forma líquida y se aplicaron después de la microgranulación o en un puré.

Volumen final de la disolución producto: de 300 a 500 ml para ~200 kg de dieta.

- 45 Las dietas experimentales (Inicial y de Engorde) fueron a base de harina de maíz-soja (remítase a la siguiente Tabla). Las dietas se formularon para contener 215 - 220 g de proteína cruda y 12,9 MJ/kg de MEN para el período inicial y 190 - 195 g de proteína cruda y 13,4 MJ/kg de MEN para el período de engorde. Las dietas basales sí contuvieron coccidiostático según la práctica local.

Ingredientes (%)	Iniciación (d 1-14)	De engorde (d 14-35)
Maíz 8,0 %	51,30 – 52,70	58,76 – 60,20
Soja O/C 44 %	38,50 - 39,70	31,00 - 32,30
Aceite de soja	3,70 – 3,90	4,20 – 4,50
Premezcla ¹	1,00	1,00
Otros	2,7 – 5,5	2,0 - 5,04
Contenido calculado		
Proteína cruda (g/kg)	215 - 220	190-195
Energía metabolizable (MJ/kg) ²	12,9	13,4
¹ Premezcla de vitaminas-minerales proporcionada por kilogramo de dieta: Vitamina A: 10.000 U.I.; vitamina E: 40 U.I.; vitamina K3: 3,0 mg; vitamina C: 100 mg; vitamina B1: 2,50 mg; vitamina B2: 8,00 mg; vitamina B6: 5,00 mg; vitamina B12: 0,03 mg; niacina: 50,0 mg; pantotenato de calcio: 12,0 mg; ácido fólico: 1,50 mg; biotina 0,15 mg; colina: 450 mg; etoxiquina: 54 mg; Na: 1,17 g; Mg: 0,8 g; Mn: 80 mg; Fe: 60 mg; Cu: 30 mg; Zn: 54 mg; I: 1,24 mg; Co: 0,6 mg; Se: 0,3 mg.		

Las dietas se usaron en la alimentación sin complementar (control negativo, C) o complementadas con

1. SEQ ID NO: 1 con 10 de proteína enzimática por kg de pienso o

2. SEQ ID NO: 2 con 10 de proteína enzimática por kg de pienso o

5 3. aminoácidos sintéticos en un control positivo.

Para las aplicaciones posteriores a la microgranulación, se diluyó la cantidad apropiada de los preparados líquidos de las proteasas en agua y se pulverizó sobre el respectivo pienso en microgránulos para obtener las concentraciones finales en el pienso correspondientes a los diferentes tratamientos. Para el equilibrio de procedimiento de todos los tratamientos, también se pulverizó el mismo volumen de agua en los microgránulos de las dietas de control.

10 Parámetros experimentales y análisis

Para los experimentos, las aves se pesaron (como grupo replicado) los días 1, 14, 28 y 35. Se determinó el consumo de pienso para los períodos intermedios. Se calculó la ganancia de peso corporal y la tasa de conversión del pienso (pienso/ganancia). Además, el contenido ileal se recogió al final del ensayo (día 35) para la determinación de la digestibilidad ileal aparente del nitrógeno.

15 Resultados y conclusión

Los resultados obtenidos en los estudios mostraron que la inclusión de las proteasas fue eficaz para mejorar la tasa de conversión del pienso en las dietas de pienso para pollos de engorde. En particular, los resultados mostraron que los tratamientos enzimáticos mejoran de manera constante el rendimiento en todas las enzimas estudiadas de la invención. Esta constancia y el nivel de mejora es algo buscado en la industria.

20

REIVINDICACIONES

1. Un aditivo para pienso para animales que comprende uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, en donde el polipéptido es una proteasa S8 seleccionada a partir del grupo que consiste en:

- 5 (a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 1;
- 10 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 2;
- 15 (c) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 3;
- (d) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 4;
- 20 (e) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 5;
- 25 (f) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 6;
- 30 (g) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 7;
- 35 (h) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 8;
- (i) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 9;
- 40 (j) una variante de la SEQ ID NO: 1, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;
- 45 (k) una variante de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;
- 50 (l) una variante de la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;
- (m) una variante de la SEQ ID NO: 5, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

5 (n) una variante de la SEQ ID NO: 6, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

10 (o) una variante de la SEQ ID NO: 7, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

(p) una variante de la SEQ ID NO: 8, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

15 (q) una variante de la SEQ ID NO: 9, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones;

20 (r) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) o (i) y una etiqueta de His y/o etiqueta HQ en el extremo N y/o extremo C;

(s) un polipéptido que comprende el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) o (i) y una extensión del extremo N y/o el extremo C de hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos; y

(t) un fragmento del polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) o (i) que tiene actividad proteasa y que tiene al menos un 90 % de la longitud del polipéptido maduro.

25 2. El aditivo para pienso para animales de la reivindicación 1, en donde la proteasa S8 comprende el motivo TGXK[V/T][I/V]X[N/S]MSLG (SEQ ID NO: 4).

3. El aditivo para pienso para animales de la reivindicación 1 o 2 que comprende además una o más vitaminas.

30 4. El aditivo para pienso para animales de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 que comprende uno o más polipéptidos que tienen actividad proteasa, en donde el polipéptido es una proteasa S8 seleccionada a partir del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 1;

35 (b) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 2;

(c) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 3;

40 (d) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 4;

45 (e) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 5;

(f) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 6;

50 (g) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 7;

- (h) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 8;
- 5 (i) un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % respecto a la SEQ ID NO: 9;
- (j) una variante de la SEQ ID NO: 1, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 posiciones;
- 10 (k) una variante de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 posiciones;
- 15 (l) una variante de la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 posiciones;
- (m) una variante de la SEQ ID NO: 5, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 posiciones;
- 20 (n) una variante de la SEQ ID NO: 6, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 posiciones;
- (o) una variante de la SEQ ID NO: 7, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 posiciones;
- 25 (p) una variante de la SEQ ID NO: 8, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 30 posiciones;
- (q) una variante de la SEQ ID NO: 9, en donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 posiciones.
- 30 5. El aditivo para pienso para animales de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9, o una variante de estas donde la variante tiene actividad proteasa y comprende una o más sustituciones, y/o una o más delecciones, y/o una o más inserciones o cualquier combinación de estas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 posiciones, habitualmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, más habitualmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 posiciones, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 posiciones, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 posiciones.
- 35 6. El aditivo para pienso para animales de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, donde las sustituciones son mutaciones múltiples que comprenden mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en
- 40 S173P, S175P, T297P; L61P,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; H39D,L61P, S173P, S175P, T297P; L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; L61P,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; H123W,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; N59D,H83T, S173P, S175P, T297P; N59D,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; L61Y,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; N59D,L61P,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,H83T, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61Y, S173P, S175P, T297P; H39D,H83T,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,L61Y,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; H39D,L61Y,H83T, S173P, S175P, T297P; L61Y,H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61Y,H83T, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P, S173P, S175P, T297P; H83T,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; L61Y,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,N59D, S173P, S175P, T297P; H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; L61P,H123W,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61P, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; L61P,H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; I43P,H83T,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,L61Y,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,N59D,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; N59D,H83T,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P;
- 45 50 55

N59D,L61Y,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; I43P,L61Y,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; I43P,N59D,L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; H39D,I43P,N59D,L61Y, S173P, S175P, T297P; y L61Y,H83T, S173P, S175P, T297P.

- 5 7. El aditivo para pienso para animales de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteasa S8 tiene una identidad de al menos un 90 %, tal como una identidad de secuencias de al menos un 95 %, tal como de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, donde el polipéptido comprende ninguna, una o más de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en S27K, N109K, S111E, S171E, S173P, G174K, S175P, F180Y, G182A, L184F, Q198E, N199K y T297P.

- 10 8. El aditivo para pienso para animales de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de al menos un 90 %, tal como una identidad de secuencias de al menos un 95 %, tal como de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, donde el polipéptido comprende ninguna, una o más de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en

15 S173P, S175P, T297P; L61P,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; H39D,L61P, S173P, S175P, T297P; L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; L61P,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; H123W,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; N59D,H83T, S173P, S175P, T297P; N59D,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; L61Y,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; N59D,L61P,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,H83T, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61Y, S173P, S175P, T297P; H39D,H83T,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,L61Y,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; H39D,L61Y,H83T, S173P, S175P, T297P; L61Y,H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61Y,H83T, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P, S173P, S175P, T297P; H83T,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; L61Y,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,N59D, S173P, S175P, T297P; H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; L61P,H123W,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61P, S173P, S175P, T297P; I43P,L61P,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; L61P,H83T,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; I43P,H83T,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,L61Y,V124A,R130D, S173P, S175P, T297P; I43P,N59D,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; N59D,H83T,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; N59D,L61Y,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,E127N,S129M, S173P, S175P, T297P; I43P,L61Y,H123W,V124A, S173P, S175P, T297P; H39D,N59D,L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; I43P,N59D,L61P,H83T, S173P, S175P, T297P; H39D,I43P,N59D,L61Y, S173P, S175P, T297P y L61Y,H83T, S173P, S175P, T297P.

- 20 9. El aditivo para pienso para animales de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, tal como de al menos un 95 %, tal como de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, donde el polipéptido comprende una mutación en ninguna, una o más de las posiciones 27, 109, 111, 171, 173, 174, 175, 180, 182, 184, 198, 199 y 297 de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. j

- 25 10. El aditivo para pienso para animales de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende una proteasa S8 que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, tal como de al menos un 95 %, tal como de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3, o donde la proteasa S8 es un polipéptido que comprende una mutación en ninguna, una o más de las posiciones 27, 109, 111, 171, 173, 174, 175, 180, 182, 184, 198, 199 y 297 de las SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3.

- 30 11. El aditivo para pienso para animales de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el polipéptido es una proteasa S8 seleccionada a partir del grupo que consiste en una proteasa S8 de *Bacillus* sp-13380 que tiene una identidad de secuencias de al menos un 75 %, tal como de al menos un 76 %, al menos un 77 %, tal como de al menos un 78 % respecto a la SEQ ID NO: 1, una proteasa S8 de *Bacillus* idriensis que tiene una identidad de secuencias de al menos un 80 % respecto a la SEQ ID NO: 1, una proteasa S8 de *Bacillus* sp-62451 que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 % respecto a la SEQ ID NO: 1, y una proteasa S8 de *Bacillus* oceanisediminis que tiene al menos un 85 %, tal como al menos un 86 %, tal como al menos un 87 % de la SEQ ID NO: 1.

- 35 12. El aditivo para pienso para animales de las reivindicaciones 1 a 11, donde el aditivo para pienso para animales no comprende un surfactante.

13. El aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende uno o más componentes seleccionados a partir de la lista que consiste en:

- uno o más agentes de formulación;
- una o más enzimas adicionales;
- uno o más microbios;
- una o más vitaminas;
- 5 uno o más minerales;
- uno o más aminoácidos;
- uno o más prebióticos;
- uno o más fitógenos;
- uno o más ácidos orgánicos; y
- 10 uno o más componentes para pienso distintos.
- 14. El aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la proteasa S8 se formula como un gránulo.
- 15. Una formulación líquida que comprende el aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y de un 20 % a un 80 % p/p de poliol.
- 15 16. Un pienso para animales que comprende el aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la formulación líquida de la reivindicación 15 y material vegetal.
- 17. Un método no terapéutico de mejora de uno o más parámetros de rendimiento de un animal que comprende administrar a uno o más animales el aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, la formulación líquida de la reivindicación 15 o el pienso para animales de la reivindicación 16.
- 20 18. Un método no terapéutico de preparación de un pienso para animales que comprende mezclar el aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la formulación líquida la reivindicación 15 con al menos una proteína o fuente de proteínas.
- 19. Un método para el tratamiento de proteínas, que comprende añadir el aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la formulación líquida la reivindicación 15 a al menos una proteína o fuente de proteínas, en donde dicho tratamiento es para ejercer una influencia hidrolizante sobre las proteínas.
- 25 20. Método para incrementar la digestibilidad y/o solubilidad de proteínas, que comprende mezclar el aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la formulación líquida de la reivindicación 15 con al menos una proteína o fuente de proteínas.
- 21. Un método de mejora del valor nutricional de un pienso para animales, que comprende añadir el aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la formulación líquida de la reivindicación 15 al pienso.
- 30 22. Uso del aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la formulación líquida de la reivindicación 15:
- en la preparación de una composición para uso en pienso para animales;
- 35 para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales;
- para incrementar la proteína digerible y/o soluble en pienso para animales;
- para incrementar el grado de hidrólisis de proteínas en dietas para animales;
- para mejorar no terapéuticamente uno o más parámetros de rendimiento en un animal; y/o
- para el tratamiento de proteínas, en donde dicho tratamiento es para ejercer una influencia hidrolizantes sobre las proteínas.
- 40 23. Un método de producción de un polipéptido, que comprende las etapas de:
- (a) cultivar una célula hospedadora de *Bacillus* que comprende un polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde se expresa el polinucleótido y se produce el polipéptido; y, opcionalmente
- 45 (b) recuperar el polipéptido.