

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 420**

51 Int. Cl.:

A23K 20/168 (2006.01)

A23K 50/00 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2014 PCT/EP2014/059449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14180953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2014 E 14722225 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2999352**

54 Título: **Enzimas de pienso para animales**

30 Prioridad:

08.05.2013 EP 13166956

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

25.04.2018

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**KLAUSEN, MIKKEL y
LASSEN, KLAUS SKAALUM**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 665 420 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

Enzimas de pienso para animales

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en la forma legible por ordenador.

Antecedentes de la invención

10

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a métodos de control del crecimiento de microorganismos en animales y pienso para animales.

15

En particular, la presente invención se refiere a un método de control del crecimiento de microorganismos en animales con una composición antimicrobiana, el tratamiento de pienso para animales con un aditivo antimicrobiano y composiciones antimicrobianas.

Antecedentes de la invención

20

[0003] En la cría moderna de animales, varios métodos han sido explorados para mejorar la salud animal y el rendimiento del crecimiento.

Estos incluyen una mejor gestión de la ganadería, mejor nutrición y la utilización de aditivos alimenticios.

25

Los aditivos alimenticios más comunes usados son antibióticos, probióticos, enzimas y ácidos orgánicos (Bernardeau, M., J.P. Vernoux y M. Gueguen, (2002), "Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice", Int J. Food Microbiol. 77:19-27).

[0004] Sin embargo, el uso extenso de antibióticos en el pienso puede provocar que los animales se hagan resistentes a antibióticos usados para tratar infecciones bacterianas en animales al igual que seres humanos (Mikkelsen L.L., Jensen B.B., (2000), "Effects of fermented liquid feed on the activity and composition of the microbiota in the gut of pigs", Pig News Inform. 21:59N-66N).

30

Esto llevó a una prohibición de marketing y uso de antibióticos como promotores de crecimiento en el pienso por la Comisión Europea el 1 de enero de 2006.

35

La presión de consumidor en otros países tal como US está impulsando que la producción animal elimine el uso de antibióticos como promotores de crecimiento.

La eliminación de promotores de crecimiento antimicrobiano de pienso para animales ha provocado el interés de identificar nuevas alternativas no terapéuticas con efectos de modulación de crecimiento microbiano para sostener una microflora intestinal de animal sana (Huyghebart, Ducatelle e Immerseel, (2011), Veterinary J., 187:182-188).

40

[0005] Una fuente de bacterias patogénicas en la producción animal es pienso para animales contaminado.

El pienso para animales es normalmente tratado con calor para matar bacterias nocivas y patógenos.

45

Sin embargo, el tratamiento térmico incompleto puede resultar en 10-15% de Salmonella restante, y/o el almacenamiento incorrecto de pienso para animales puede además suponer un alimento contaminado con bacterias (ver F.T. Jones, 2011, Poultry Sci. 83:384-391 para una revisión general).

Cuando el animal se come el pienso contaminado, el animal puede infectarse con las bacterias, lo que finalmente acaba con la compra de comida contaminada del consumidor en el supermercado.

50

El uso de ácidos orgánicos, frecuentemente mezclados con formaldehído ha sido usado para controlar la cantidad de Salmonella en el pienso después del proceso de granulación.

Sin embargo, el formaldehído puede dar salidas reguladoras y ácidos orgánicos solos frecuentemente necesitan diferentes días a índices de inclusión de 1% para destruir bacterias existentes.

Estos altos niveles de ácidos pueden ser costosos, ser corrosivos para molienda y equipo de alimentación y tienen efectos adversos con palatabilidad de pienso y la disponibilidad de vitaminas para animales.

55

Descripción de las técnicas relacionadas

[0006] La US4320116 describe el uso de un sistema antibacteriano capaz de ser activado en el tracto gastrointestinal de un animal que comprende una lactoperoxidasa, un tiocianato y un donador de peróxido hidrosoluble tal como un percarbonato de álcali o álcali peróxido.

60

La US 5389369 describe el uso de una haloperoxidasa y un agente intensificador de actividad antimicrobiana, tal como un ácido de alfa-amino, para matar o inhibir el crecimiento de levadura de microorganismos esporulares en el tratamiento de sujetos humanos o animales y aplicaciones de desinfección in vitro.

[0007] La WO00/21381 describe el uso de dos enzimas antimicrobianas, tal como una lisozima y una oxidasa, junto con un intensificador, tal como un ácido graso poliinsaturado, para mejorar el crecimiento e índice de conversión alimenticia (FCR) en por ejemplo aves, cerdos y vacas.

5 [0008] La US5747078 describe un método para la conservación a largo plazo de productos alimenticios, tal como queso, que incluye una oxidorreductasa que genera peróxido de hidrógeno a partir de un sustrato y una lactoperoxidasa.

10 La US5310541 describe un chicle para animales que contiene una oxidorreductasa y sustrato correspondiente (tal como glucosa-oxidasa y glucosa) que genera un agente antimicrobiano cuando se mastica para ayudar a prevenir por ejemplo la cavies y enfermedades periodontales en animales.

15 [0009] La US2002/0119136 describe un método para matar o inhibir unos microorganismos por ejemplo en la lavandería, en superficies duras, en la piel humana o en el cuidado bucal, que comprende el contacto de dicho microorganismo con una composición que contiene una peroxidasa, peróxido de hidrógeno o una fuente de peróxidos de hidrógeno tal como glucosa oxidasa/glucosa, y un intensificador tal como un derivado de fenotiazina o un derivado de siringato.

La US4726948 describe una composición antibacteriana capaz de ser activada en el GI tracto de mamíferos que comprende lactoferrina, una lactoperoxidasa y un sistema de activación tal como glucosa/glucosa oxidasa.

20 [0010] La US2011/229598 divulga un producto de leche antimicrobiana que comprende una lactoperoxidasa, una glucosa-oxidasa, glucosa y un agente oxidable para alimentar a terneros.

La EP1068871 describe un complemento de pienso antimicrobiano para terneros o pasta dental para animales domésticos que comprende una lactoperoxidasa, una glucosa-oxidasa, glucosa, tiocianato, lactoferrina, lisozima, factores de inmunoglobulina y crecimiento.

25 La EP2510944 divulga un complemento de pienso antimicrobiano para vacas que comprende una lactoperoxidasa o cloroperoxidasa, una glucosa-oxidasa, yoduro y bien glucosa o una beta-galactosidasa.

Resumen de la invención

30 [0011] La invención se define por las reivindicaciones.

[0012] En un aspecto, la invención se refiere a una composición antimicrobiana para usar en el control del crecimiento de microorganismos en un animal que comprende la alimentación del animal con una composición antimicrobiana que comprende lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio.

35 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento de pienso para animales que comprende la mezcla del pienso para animales con una o más lactosa oxidasas y una o más haloperoxidasas de vanadio.

En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de una composición que comprende lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio para controlar el crecimiento de microorganismos en un animal.

40 En el cuarto aspecto, la invención se refiere a una composición antimicrobiana que comprende una o más lactosa oxidasas y una o más haloperoxidasas de vanadio junto con una o más vitaminas y/o uno o más minerales para controlar el crecimiento de microorganismos en un animal.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método para la preparación de una composición de pienso para animales.

45 Resumen del listado de secuencias

[0013]

50 SEQ ID N.º: 1 es la secuencia de aminoácido de una lactosa oxidasa de *Microdochium nivale* CBS 100236.

SEQ ID N.º: 2 es la secuencia de aminoácido de una haloperoxidasa de vanadio de *Curvularia verruculosa* CBS 147.63.

SEQ ID N.º: 3 es la secuencia de aminoácido de una haloperoxidasa de vanadio de *Curvularia inequalis* CBS 102.42

55 SEQ ID N.º: 4 es la secuencia de aminoácido de una aminoacidoxidasa de *Trichoderma harzianum* CBS 223.93.

SEQ ID N.º: 5 es la secuencia de aminoácido de una haloperoxidasa de vanadio de *Dreschlera hartlebii*.

SEQ ID N.º: 6 es la secuencia de aminoácido de una haloperoxidasa de vanadio de *Dendryphiella salina*.

SEQ ID N.º: 7 es la secuencia de aminoácido de una haloperoxidasa de vanadio de *Phaeotrichoconis crotalariae*.

60 SEQ ID N.º: 8 es la secuencia de aminoácido de una haloperoxidasa de vanadio de *Geniculosporium sp.*

Breve descripción de las figuras

65 [0014] La Figura 1 muestra el número de *E. Coli* K12 superviviente después del tratamiento a pH 3 o pH 6 con una lactosa oxidasa (COX), una haloperoxidasa de vanadio (HAP) y/o una aminoacidoxidasa (AAO).

Definiciones

- 5 [0015] La actividad de aminoácido oxidasa: el término 'actividad de aminoácido oxidasa' se define aquí como la actividad enzimática que cataliza la reacción de un aminoácido, agua y oxígeno al ácido alfa ceto de alfa correspondiente, peróxido e ión de amonio.
Para fines de la presente invención, la actividad de aminoácido oxidasa se puede determinar de la siguiente manera.
10 Pipetear en cubetas Worthington peroxidasa (0.01 ml de 10 mg/ml solución acuosa) y 0.2 M de tampón de trietanolamina pH 7.6 que contiene 0.1% L-leucina y 0.0065% o-dianisidina (2.9 ml).
Incubar en el espectrofotómetro a 25°C durante 4-5 minutos para conseguir el equilibrio de temperatura y forma preliminar de registro.
Añadir 0.1 ml de enzima a una concentración de 0.05-0.2 unidades por mililitro y aumento de registro en la absorbancia a 436 nm durante 4-5 minutos.
15 Calcular \otimes A436 de la porción lineal inicial de la pendiente.
Actividad = unidades/mg = (\otimes A436 x 3.0 x dilución) / (8.1 x 0.1 X(mg/ml)).
- [0016] Animal: el término "animal" incluye todos los animales.
En una forma de realización, el término "animal" excluye seres humanos.
20 Los ejemplos de animales son no rumiantes y rumiantes.
Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como oveja, cabra y ganado bovino, por ejemplo vaca tal como ganado vacuno y vacas lecheras.
En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante.
Los animales no rumiantes incluyen animales domésticos, por ejemplo caballos, gatos y perros; animales monogástricos, por ejemplo cerdo o ganado porcino (incluido, pero no limitado a lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves tales como pavos, patos y pollos (incluidos pero no limitados a pollos para asar, capas); pescado (incluidos pero no limitados a salmón, trucha, tilapia, siluro y carpa); y crustáceos (incluidos pero no limitados a gamba y langostino), terneros (rumiantes jóvenes sin panza funcional o con panza en desarrollo).
25 Los animales preferidos son animales monogástricos, preferiblemente aves y puercos (definidos aquí).
- [0017] La composición antimicrobiana: el término "composición antimicrobiana" significa un polipéptido o una composición química que tiene actividad antimicrobiana.
- [0018] La actividad antimicrobiana o efecto antimicrobiano: el término "actividad antimicrobiana" o "efecto antimicrobiano" significa la capacidad de matar y/o inhibir el crecimiento de células microbianas.
35 Los ejemplos de células microbianas son las células de microorganismos.
La actividad antimicrobiana puede, por ejemplo, bactericida y/o un bacterioestático y/o fungicida y/o fungistático y/o virucida.
- [0019] Bactericida: el término "bactericida" significa un agente que es capaz de matar células bacterianas.
La actividad bactericida se mide como una reducción logarítmica (reducción log) en el número de células vivas o unidades formadoras de colonias por mL (CFU/ml), por ejemplo 1 reducción log corresponde a una reducción en el número de células vivas de *Escherichia coli* K12 o *Enterococcus faecalis* DSM2570 de $Y \times 10^X$ CFU/m (CFU: unidades formadoras de colonias; M: mL o g) a $Y \times 10^{X-1}$ CFU/m, donde X puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o
45 11 y Y puede ser cualquier número de 0 a 10.
El número de células vivas se determina como el número de *E. Coli* o *E. faecalis*, respectivamente, que puede crecer en placas de Agar de triptona de soja (#CM129, Oxoid, Inglaterra) a 30°C.
- [0020] Bacterioestático: el término "bacterioestático" significa que es capaz de la inhibición del crecimiento bacteriano, es decir, inhibición del crecimiento de células bacterianas.
- [0021] La actividad de carbohidrato oxidasa: el término "actividad de carbohidrato oxidasa" se define aquí como actividad enzimática que cataliza la oxidación del alcohol primario en varios mono- u oligosacáridos acompañados por reducción de oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno.
55 Para fines de la presente invención, la actividad de oxidasa de carbohidrato se determina según el procedimiento descrito por Blake et al. (1989) Analytical Biochemistry 177: 156-160.
Una unidad de actividad de carbohidrato oxidasa iguala la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de peróxido de hidrógeno por minuto a pH 6.0, 25 grados Celsius.
La actividad de lactosa oxidasa puede también ser determinada utilizando este método, pero donde la lactosa se usa como sustrato.
60
- [0022] Controlar el crecimiento de microorganismos: el término "controlar el crecimiento de microorganismos" significa que el microorganismo bien se mata o inhibe, de manera que los microorganismos están en un estado de no crecimiento, es decir, que ellos no son capaces de propagarse.

Controlar el crecimiento de microorganismos significa además que hay un cambio en la composición de la microflora intestinal del animal a una composición de microflora que es beneficiosa para el animal, beneficioso para el rendimiento animal, beneficioso para usos alimenticios (tal como FCR) y/o limita el crecimiento de patógenos en el sistema digestivo del animal.

5

[0023] Fungicida: el término "fungicida" significa que es capaz de matar células fúngicas.

[0024] El fungistático: el término "fungistático" significa que es capaz de inhibir el crecimiento fúngico, es decir, inhibir el crecimiento de células fúngicas.

10

[0025] Gástricamente estable: el término "gástricamente estable" significa que la enzima(s) son estables a las condiciones encontradas en el tracto gastrointestinal de un animal, o representativas en condiciones in vitro tal y como se define aquí, de manera que la enzima(s) puede reducir cálculos CFU al menos 10 veces, tal como al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces después de tal tratamiento.

15

Con motivo de la presente invención, la estabilidad gástrica se determinó utilizando jugos gástricos simulados, como se describe en el ejemplo 2.

En resumen, la enzima(s) fueron incubadas con 0.001 M HCl, 35 nM NaCl y 1.1 unidad de pepsina/ml a 40°C durante 15 minutos y luego se evaluó la actividad antimicrobiana.

20

Las enzimas(s) se clasifican como estables en las vías gástricas si estas reducen los cálculos CFU al menos 10 veces después de tal tratamiento en comparación con una muestra de control por la cual la enzima(s) no han sufrido incubación con los jugos gástricos simulados.

[0026] Intestino: el término "intestino" dignifica el tracto gastrointestinal o digestivo (también referido como el tubo digestivo) de un animal, y se refiere al sistema de órganos incluido el esófago, estómago, intestino delgado (incluido duodeno, yeyuno e íleon) e intestino grueso (incluido intestino ciego, colon y recto) dentro de animales multicelulares que absorbe la comida, la digiere para extraer energía y nutrientes, y excreta los residuos restantes.

25

La microflora del intestino se refiere a los cultivos microbianos naturales que residen en el intestino que mantienen la salud buena de un animal para ayudar a una digestión apropiada y/o soportar funciones de sistema inmunológico.

30

[0027] La actividad de haloperoxidasa: el término 'haloperoxidasa' se define aquí como actividad enzimática que cataliza la oxidación de haluros (por ejemplo Cl-, Br- o I-) en presencia de peróxido de hidrógeno al correspondiente ácido hipohaloso.

35

Para fines de la presente invención, la actividad de haloperoxidasa se puede determinar mediante la mezcla 100 µL de muestra de haloperoxidasa (aproximadamente 0.2 µg/mL) y 100 µL de tampón 0.3 M de fosfato sódico pH 7 - 0.5 M bromuro de potasio - 0.008% rojo de fenol, añadiendo la solución a 10 µL de 0.3% H₂O₂ y midiendo la absorción a 595 nm en función del tiempo.

40

[0028] Un ensayo alternativo que usa monoclorodimedona (Sigma M4632, $\Sigma = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 290 nm) como un sustrato se puede llevar a cabo por medición de la reducción en la absorción a 290 nm en función del tiempo.

El ensayo se hace en una solución acuosa de 0.1 M fosfato sódico o 0.1 M acetato sódico, 50 µM monoclorodimedona, 10 mM KBr/KCl, 1 mM H₂O₂ y aproximadamente 1 µg/mL haloperoxidasa.

45

Una unidad de haloperoxidasa (HU) se define como 1 micromol de monoclorodimedona clorurado o brominado por minuto a pH 5 y 30°C.

[0029] El microorganismo: el término "microorganismo" incluye bacterias, protozoos, algas, hongos (incluyendo levadura) y virus.

50

[0030] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia".

[0031] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) implementado en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Se usó la versión 6.1.0. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSSUM62 (versión EMBOSS de BLOSSUM62).

55

La emisión de Needle etiquetada "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

60

$$\left(\frac{\text{Residuos idénticos} \times 100}{\text{Longitud de alineamiento} - \text{número total de espacios en alineamiento}} \right)$$

[0032] Virucida: el término "virucida" significa que es capaz de inactivar o matar virus.

Descripción detallada de la invención

5 [0033] En jurisdicciones donde el objeto sobre el tratamiento del cuerpo animal o humano se considera que no es patentable o es una excepción para patentabilidad, luego dicho objeto se deniega aquí en toda la solicitud.

10 [0034] Hemos descubierto sorprendentemente que una composición antimicrobiana que comprende lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio es altamente eficaz para el control del crecimiento de microorganismos que, por ejemplo, residen en el pienso para animales contaminado.

Mientras las composiciones antimicrobianas que comprenden una lactoperoxidasa/mieloperoxidasa y glucosa-oxidasa se conocen en la técnica, la combinación de una lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio no ha sido previamente mostrada para tener propiedades antimicrobianas, al menos para condiciones pertinentes para uso como pienso para animales.

15 Además, la lactoperoxidasa/mieloperoxidasa y soluciones de glucosa-oxidasa conocidas de la necesidad de la técnica de incorporar sustratos (por ejemplo, glucosa para glucosa-oxidasa o tiocianato/bromuro/cloruro para lactoperoxidasa) en la formulación para que las enzimas tengan un efecto antimicrobiano.

20 [0035] Los inventores han mostrado sorprendentemente que la composición antimicrobiana de la invención funciona sin el requisito de que los sustratos para las enzimas se agregan a la composición.

En cambio, las enzimas pueden utilizar el sustrato requerido directamente de una amplia gama de piensos que se usa en pienso para animales, reduciendo así el coste del pienso para el agricultor.

Métodos de control del crecimiento de microorganismos en un animal

25 [0036] En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición antimicrobiana para usar en el control del crecimiento de microorganismos en un animal, que comprende la alimentación del animal con una composición antimicrobiana que comprende una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio.

30 En una forma de realización, la composición antimicrobiana para usar en el control del crecimiento de microorganismos comprende la alimentación de un animal que no es humano con una composición antimicrobiana que comprende una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio.

En un aspecto, el control del crecimiento de microorganismos con la composición antimicrobiana de la invención se produce en el intestino del animal.

35 [0037] En una forma de realización, la lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio son gástricamente estables. La composición antimicrobiana de la invención también puede comprender una o más fuentes de haluro, peróxido de hidrógeno y/o una o más fuentes de peróxido de hidrógeno, tal como celobiosa, lactosa, maltosa y/o rafinosa.

40 En otro aspecto, la composición antimicrobiana de la invención comprende además forraje, concentrados, vitaminas, minerales, aminoácidos, enzimas y/o otros constituyentes de pienso, tal y como se definen aquí.

[0038] El método para el control del crecimiento de microorganismos en un animal se puede realizar con una cantidad eficaz de la composición antimicrobiana de la invención, donde una cantidad eficaz es la cantidad adecuada para obtener el efecto antimicrobiano requerido en la aplicación elegida.

45 En un aspecto, la composición antimicrobiana para usar en el control del crecimiento de microorganismos en un animal comprende la alimentación del animal con una composición antimicrobiana de la invención que inhibe el crecimiento de células microbianas, por ejemplo la composición antimicrobiana es un bacterioestático.

50 [0039] En otra forma de realización, la composición antimicrobiana para usar en el control del crecimiento de microorganismos en un animal comprende la alimentación del animal con una composición antimicrobiana de la invención que mata el crecimiento de células microbianas, por ejemplo la composición antimicrobiana es bactericida.

55 En una forma de realización preferida, la composición antimicrobiana para usar en el control del crecimiento de microorganismos en un animal comprende la alimentación del animal con una composición antimicrobiana de la invención que mata al menos 90%, tal como al menos 99%, al menos 99.5%, al menos 99.7%, al menos 99.9%, al menos 99.95%, al menos 99.97%, al menos 99.99% del número de bacterias, donde la bacteria es del género *Salmonella*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Listeria* y/o *Clostridium*, preferiblemente de *Escherichia*, más preferiblemente de *E. Coli*, aún más preferiblemente de *E. Coli* K12.

60 [0040] En otra forma de realización, la composición antimicrobiana para usar en el control del crecimiento de microorganismos en un animal comprende la alimentación del animal un pienso para animales que comprende una o más lactosa oxidasas de la invención y una o más haloperoxidasas de vanadio de la invención junto con una o más vitaminas y/o uno o más minerales.

Una forma de realización preferida es pienso para animales que no contiene lactoferrina.

65

- [0041] En otra forma de realización, la composición antimicrobiana para usar en el control del crecimiento de microorganismos en un animal comprende alimentar al animal con una composición antimicrobiana de la invención, donde la composición antimicrobiana es un componente de pienso para animales.
El pienso para animales puede comprender además una o más vitaminas y/o uno o más minerales.
5 Una forma de realización preferida es pienso para animales que no contiene lactoferrina.
- [0042] En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.
En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.
10 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.
En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.
15 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.
En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.
- 20 Uso de las composiciones para controlar el crecimiento de microorganismos en animales
- [0043] Otro aspecto de la invención es el uso de una composición que comprende una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio para controlar el crecimiento de microorganismos en un animal.
En una forma de realización, el uso de una composición que comprende una lactosa oxidasa y una
25 haloperoxidasa de vanadio para controlar el crecimiento de microorganismos está en un animal que no es humano.
En una forma de realización, la lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio son gástricamente estables.
- [0044] La composición también puede comprender una o más fuentes de haluro, peróxido de hidrógeno y/o una o más fuentes de peróxido de hidrógeno, tal como celobiosa, lactosa, maltosa y/o rafinosa.
30 En otro aspecto, la composición antimicrobiana de la invención comprende además forraje, concentrados, vitaminas, minerales, aminoácidos, enzimas y/o otros constituyentes de pienso, tal y como se definen aquí.
- [0045] El uso de una composición que comprende una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio para controlar el crecimiento de microorganismos en un animal se puede realizar con una cantidad eficaz de la composición de la invención, donde una cantidad eficaz es la cantidad adecuada para obtener el efecto antimicrobiano requerido en la aplicación elegida.
35 En un aspecto, el uso de la composición de la invención en un animal inhibe el crecimiento de células microbianas, por ejemplo la composición antimicrobiana es un bacterioestático.
40
- [0046] En otra forma de realización, el uso de una composición que comprende una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio para controlar el crecimiento de microorganismos en un animal comprende la alimentación del animal con una composición antimicrobiana que mata el crecimiento de células microbianas, por ejemplo la composición antimicrobiana es bactericida.
45 En una forma de realización preferida, el uso de la composición de la invención en un animal comprende la alimentación del animal con una composición antimicrobiana que mata al menos 90%, tal como al menos 99%, al menos 99.5%, al menos 99.7%, al menos 99.9%, al menos 99.95%, al menos 99.97%, al menos 99.99% del número de bacterias, donde la bacteria es del género *Salmonella*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Listeria* y/o *Clostridium*, preferiblemente de *Escherichia*, más preferiblemente de *E. Coli*, aún más preferiblemente de *E. Coli* K12.
50
- [0047] En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.
En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.
55 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.
En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.
60 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.
En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.
- 65 Composiciones que comprenden lactosa oxidasas y haloperoxidasas de vanadio

[0048] Un aspecto adicional de la invención es una composición que comprende una o más lactosa oxidasas y una o más haloperoxidasas de vanadio.

5 En una forma de realización, la composición comprende además uno o más compuestos adicionales seleccionados de la lista que consiste en forraje, concentrados, vitaminas, minerales, aminoácidos, enzimas y otros constituyentes de pienso, tal y como se definen aquí.

En otra forma de realización, la composición se usa para controlar el crecimiento de microorganismos en un animal.

10 En una forma de realización, la composición controla el crecimiento de microorganismos en un animal que no es humano.

En una forma de realización, la composición no contiene ninguna lactoferrina.

En una forma de realización, la lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio son gástricamente estables.

15 [0049] En otro aspecto de la invención, la composición es un aditivo de pienso o premezcla, que comprende una o más lactosa oxidasas, una o más haloperoxidasas de vanadio y uno o más componentes seleccionados de la lista que consiste en vitaminas, minerales, aminoácidos, enzimas y otros constituyentes de pienso.

En una forma de realización, el aditivo de pienso comprende una o más oxidasas de lactosa, una o más haloperoxidasas de vanadio y una o más vitaminas.

20 En una forma de realización, el aditivo de pienso comprende una o más oxidasas de lactosa, una o más haloperoxidasas de vanadio y uno o más minerales.

En una forma de realización, el aditivo de pienso comprende una o más oxidasas de lactosa, una o más haloperoxidasas de vanadio y uno o más aminoácidos.

25 En una forma de realización, el aditivo de pienso comprende una o más oxidasas de lactosa, una o más haloperoxidasas de vanadio y una o más enzimas.

[0050] En otro aspecto de la invención, la composición es un pienso para animales, que comprende una o más lactosa oxidasas, una o más haloperoxidasas de vanadio, forraje y concentrado opcionalmente y/o una premezcla.

30 En otro aspecto de la invención, la composición es un pienso para animales, que comprende una o más oxidasas de lactosa, una o más haloperoxidasas de vanadio, concentrados y opcionalmente forraje y/o una premezcla.

La premezcla comprende uno o más componentes seleccionados de la lista que consiste en vitaminas, minerales, aminoácidos, enzimas y otros constituyentes de pienso.

35 [0051] Una forma de realización preferida es un pienso para animales que comprende una o más lactosa oxidasas, una o más haloperoxidasas de vanadio, uno o más polipéptidos seleccionados de la lista amilasas; fitasas; xilanasas; galactanasas; alfa-galactosidasas; proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas o cualquier mezcla de las mismas, junto con una o más vitaminas y/o uno o más minerales.

En una forma de realización, la composición no contiene lactoferrina.

40 [0052] En otra forma de realización, la composición que comprende una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio mata el crecimiento de células microbianas, por ejemplo la composición antimicrobiana es bactericida.

45 En una forma de realización preferida, la composición de la invención mata al menos 90%, tal como al menos 99%, al menos 99.5%, al menos 99.7%, al menos 99.9%, al menos 99.95%, al menos 99.97%, al menos 99.99% del número de bacterias, donde la bacteria es del género *Salmonella*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Listeria* y/o *Clostridium*, preferiblemente de *Escherichia*, más preferiblemente de *E. Coli*, aún más preferiblemente de *E. Coli* K12.

[0053] En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

50 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

55 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

60 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.

Métodos para el tratamiento de pienso para animales

[0054] Otro aspecto de la invención es un método para el tratamiento de pienso para animales que comprende la mezcla del pienso para animales con una o más lactosa oxidasas y una o más haloperoxidasas de vanadio.

El aditivo antimicrobiano, que comprende lactosa oxidasas y haloperoxidasas de vanadio, preferiblemente se añade al pienso triturado que luego se acondiciona, granula y enfría.

Dicho pienso para animales luego comprende una o más lactosa oxidasas y una o más haloperoxidasas de vanadio que pueden actuar como un agente antimicrobiano mientras el pienso se almacena.

5 Así cuando el animal consume el pienso, se reduce así el riesgo de que el animal consuma pienso contaminado. El pienso para animales puede actuar además como un agente antimicrobiano en el intestino del animal como se describe en la aquí en otros aspectos de la invención.

[0055] En una forma de realización, la lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio son gástricamente estables.

10 La composición también puede comprender una o más fuentes de haluro, peróxido de hidrógeno y/o una o más fuentes de peróxido de hidrógeno, tal como celobiosa, lactosa, maltosa y/o rafinosa.

En otro aspecto, la composición antimicrobiana de la invención comprende además forraje, concentrados, vitaminas, minerales, aminoácidos, enzimas y/o otros constituyentes de pienso, tal y como se definen aquí.

15 [0056] El método para el tratamiento de pienso para animales se puede realizar con una cantidad eficaz del aditivo antimicrobiano de la invención, donde una cantidad eficaz es la cantidad adecuada para obtener el efecto antimicrobiano requerido en la aplicación elegida.

20 En un aspecto, el método para el tratamiento de pienso para animales comprende la mezcla del pienso para animales con el aditivo antimicrobiano de la invención que inhibe el crecimiento de células microbianas en el pienso para animales, por ejemplo el aditivo antimicrobiano es un bacterioestático.

[0057] En otra forma de realización, el método para el tratamiento de pienso para animales comprende la mezcla del pienso para animales con un aditivo que comprende una o más lactosa oxidasas y una o más haloperoxidasas de vanadio de manera que la composición mata el crecimiento de células microbianas, por ejemplo el aditivo es bactericida.

25 En una forma de realización preferida, el método para el tratamiento de pienso para animales comprende la mezcla del pienso para animales con un aditivo antimicrobiano de la invención que mata al menos 90%, tal como al menos 99%, al menos 99.5%, al menos 99.7%, al menos 99.9%, al menos 99.95%, al menos 99.97%, al menos 99.99% del número de bacterias en el pienso para animales, donde la bacteria es del género *Salmonella*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Listeria* y/o *Clostridium*, preferiblemente de *Escherichia*, más preferiblemente de *E. Coli*, aún más preferiblemente de *E. Coli* K12.

[0058] En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

35 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

40 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

45 En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de SEQ ID N.º: 1 y la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.

Pienso para animales

[0059] En el contexto de esta invención, un pienso para animales o aditivo de pienso es una preparación enzimática que comprende una o más enzima(s) y portadores adecuados y/o excipientes, y donde la preparación de enzima está prevista en una forma que sea adecuada para añadir al pienso para animales.

50 El aditivo de pienso de la invención se puede preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y puede ser en forma de una preparación seca o líquida.

La enzima para ser incluida en la preparación puede opcionalmente ser estabilizada conforme a métodos conocidos en la técnica.

55 [0060] En un aspecto, el pienso para animales, comprende forraje y puede comprender además concentrados al igual que vitaminas, minerales, enzimas, aminoácidos y/o otros constituyentes de pienso (incorporados de por ejemplo una premezcla).

60 Tal pienso para animales es generalmente adecuado para rumiantes, tales como ovejas, cabras y ganado bovino, etc. En otro aspecto, el pienso para animales, comprende concentrados y puede comprender además vitaminas, minerales, enzimas, aminoácidos y/o otros constituyentes de pienso (incorporados por ejemplo de una premezcla) y opcionalmente forraje.

Tal pienso para animales es generalmente adecuado para no rumiantes, tales como cerdos y aves, etc.

[0061] Así otro aspecto de la invención es un método para preparación de una composición de pienso para animales, que comprende la mezcla de una lactosa oxidasa, una haloperoxidasa de vanadio y uno o más constituyentes de pienso para animales seleccionados de la lista que consiste en forraje, concentrados, vitaminas, minerales, aminoácidos y enzimas de pienso para animales.

5

Forraje

[0062] Forraje tal y como se define aquí también incluye forraje basto.

10

El forraje es material vegetal fresco tal como heno y ensilaje de plantas de forraje, césped y otras plantas de forraje, césped y otras plantas de forraje, alga, granos brotados y leguminosas o cualquier combinación de los mismos.

15

Los ejemplos de plantas de forraje son Alfalfa (alfalfa), trébol de serradella, brassica (por ejemplo col, semilla de colza (canola), colinabo (sueco); colirábano), trébol (por ejemplo trébol híbrido, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco), césped (por ejemplo pasto bermuda, bromo, hierba de avena alevada, huerto, césped de brezo, gramíneas de prados, césped de vergel, ray-grass, Timothy-grass), granos de maíz (maíz), mijo, cebada, avena, centeno, sorgo, semillas de soja y trigo y verduras tales como remolachas.

Las plantas de cultivo adecuadas para ensilaje son las hierbas ordinarias, tréboles, alfalfa, algarrobas, avena, centeno y maíz.

20

El forraje además incluye residuos de planta de cultivo de producción de grano (tal como forraje de maíz; paja de trigo, cebada, avena, centeno y otros granos); residuos de verduras como remolacha azucarera; residuos de producción oleaginosa como tallos y hojas forman alubias de soja, semilla de colza y otras leguminosas; y fracciones de la refinación de granos para consumo animal o humano o de producción de combustible u otras industrias.

25

[0063] Forraje voluminoso es material vegetal seco generalmente con altos niveles de fibra, tal como fibra, salvado, cáscaras de semillas y granos y residuos de planta de cultivo (tal como forraje, copra, paja, paja menuda, residuos de remolacha azucarera).

30

Concentrados

[0064] Los concentrados son pienso con altas concentraciones de proteína y de energía, tal como harina de pescado, melaza, oligosacáridos, sorgo, semillas y granos (bien enteros o preparados por trituración, molienda, etc. de por ejemplo maíz, avena, centeno, cebada, trigo), tortas prensadas oleaginosas (por ejemplo, de semilla de algodón, alazor, girasol, soja, semilla de colza/canola, cacahuete o cacahuete), torta de palmiste, material derivado de levadura y granos de destiladores (tales como granos destilados húmedos (WDS) y granos destilados secos con solubles (DDGS)).

35

Premezcla o aditivo de pienso

40

[0065] En una forma de realización, el pienso para animales puede incluir una premezcla (también llamada aditivo de pienso), que comprende por ejemplo vitaminas, minerales, enzimas, conservantes, antibióticos, otros constituyentes de pienso o cualquier combinación de los mismos que se mezcla en el pienso para animales.

45

Vitaminas y minerales

[0066] 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 forma de realización, el pienso para animales puede opcionalmente incluir uno o más minerales, tal como uno o más oligoelementos y/o uno o más macrominerales.

50

[0067] Vitaminas normalmente grasas e hidrosolubles, al igual que oligoelementos forman parte de una denominada premezcla destinada a la adición al pienso, mientras que los macrominerales están normalmente separadamente añadidos al pienso.

55

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

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

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

60

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

Enzimas

65

[0068] En otra forma de realización, el pienso para animales descrito aquí opcionalmente incluye una o más enzimas.

Las enzimas se pueden clasificar basándose en el manual de nomenclatura enzimática NC-IUBBM, 1992), ver también el sitio web ENZYME: <http://www.expasy.ch/enzyme/>.

La enzima es un repositorio de información relativo a la nomenclatura de enzimas.

5 Principalmente se basa en las recomendaciones del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB), Academic Press, Inc., 1992, y este describe cada tipo de enzima caracterizada para lo que un número EC (comisión enzimática) se ha previsto (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305).

Esta nomenclatura enzimática IUB-MB se basa en su especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular; tal clasificación no refleja las características estructurales de estas enzimas.

10

[0069] Otra clasificación de determinadas enzimas hidrolasa de glicósido, tales como endoglucanasa, xilanas, galactanasa, mananasa, dextranasa y alfa-galactosidasa, en familias basadas en similitudes de secuencia de aminoácidos se han propuesto hace unos años.

15

Estos actualmente se categorizan en 90 familias diferentes: ver el sitio web CAZi(ModO) (Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html> (corresponding papers: Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12; Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita and T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15-23).

20

25

[0070] Así el pienso para animales también puede comprender al menos otra enzima seleccionada del grupo que comprende fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanas (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4); fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) lisozima (EC 3.2.1.17) y beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6) o cualquier mezcla de las mismas.

30

[0071] En una forma de realización particular, el pienso para animales comprende una fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26).

Los ejemplos de fitasas disponibles comercialmente incluyen fitasa de Bio-Feed™ (Novozymes), Ronozyme® P e HiPhos™ ((DSM Nutritional Products), Natuphos™ (BASF), Finase® y Quantum® Blue (AB Enzymes), el Phyzyme® XP (Verenium/DuPont) y Axta® PHY (DuPont).

35

Otras fitasas preferidas incluyen aquellas descritas en por ejemplo WO 98/28408, WO 00/43503 y WO 03/066847.

40

[0072] En una forma de realización particular, el pienso para animales comprende una xilanas (EC 3.2.1.8).

Los ejemplos de xilanas disponibles comercialmente incluyen Ronozyme® WX y G2 (DSM productos nutricionales), Econase® XT y cebada (AB Vista), Xylathin® (Verenium) y Axta® XB (Xilanas/beta-glucanasa; DuPont)

45

[0073] En una forma de realización particular, el pienso para animales comprende una proteasa (EC 3.4). Los ejemplos de proteasas disponibles comercialmente incluyen Ronozyme® ProAct (DSM Nutritional Products).

50

Aminoácidos

[0074] El pienso para animales puede comprender además uno o más aminoácidos.

Los ejemplos de aminoácidos que se usan en pienso para animales son lisina, alanina, beta-alanina, treonina, metionina y triptófano.

55

Otros constituyentes de pienso

60

[0075] El pienso para animales puede comprender además agentes colorantes, estabilizadores, aditivos de mejora del crecimiento y compuestos aromatizantes/aromas, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); especies generadoras de oxígeno reactivo, péptidos anti-microbianos y polipéptidos anti-fúngicos.

[0076] Los ejemplos de agentes colorantes son carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina y luteína.

65

[0077] Los ejemplos de compuestos aromatizantes/aromas son creosol, anetol, deca-, undeca-y/o dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, ftálica de propilideno, ftálica de butilideno, capsaicina y tanino.

[0078] Los ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP) son CAP18, Leucocina A, Triterpticin, Protegrina-1, Tanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina y ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas

y estatinas, con los compuestos y polipéptidos descritos en la WO 03/044049 y WO 03/048148, al igual que variantes o fragmentos de las anteriores que retienen actividad antimicrobiana.

5 [0079] Los ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP) son el *Aspergillus giganteus* y péptidos de *Aspergillus niger*, al igual que variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se describe en la WO 94/01459 y la WO 02/090384.

10 [0080] Los ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos poliinsaturados C18; C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.

[0081] Los ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tal como perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tal como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

Fabricación

15 [0082] Las dietas para animales pueden por ejemplo ser fabricadas como pienso triturado (no granulado) o pienso granulado.

Típicamente, los piensos molidos se mezclan y cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales se agregan según las especificaciones para las especies en cuestión.

20 Los cultivos de bacterias y opcionalmente enzimas se pueden adicionar como formulaciones sólidas o líquidas. Por ejemplo, para pienso triturado se puede adicionar una formulación sólida o líquida de cultivo antes o durante la etapa de mezcla del ingrediente.

Para pienso granulado la preparación de cultivo (líquida o sólida) también se puede adicionar antes o durante la etapa de ingrediente de pienso.

25 Típicamente una preparación de cultivo líquida comprende el cultivo de la invención opcionalmente con un poliol, tal como glicerol, etilenglicol o propilenglicol, y se añade después del paso de granulación, tal como pulverización de la formulación líquida sobre los gránulos.

Las enzimas también se pueden incorporar en un aditivo de pienso o premezcla.

30 [0083] Las enzimas se pueden añadir a la mezcla de pienso como un gránulo, que opcionalmente se granula o se extrude.

El gránulo típicamente comprende una partícula de núcleo y uno o más recubrimientos, que típicamente son sal y/o recubrimientos de cera.

35 La partícula de núcleo puede bien ser una mezcla homogénea de un compuesto activo opcionalmente junto con sales (por ejemplo zinc orgánico o inorgánico o sal cálcica) o una partícula inerte con un compuesto activo aplicado sobre esta.

El compuesto activo es el cultivo de la invención opcionalmente combinado con las enzimas de la invención.

40 La partícula inerte puede ser de agua soluble o agua insoluble, por ejemplo almidón, un azúcar (tal como sacarosa o lactosa) o una sal (tal como NaCl, Na₂SO₄).

El recubrimiento de sal es típicamente al menos 1 µm de grosor y puede bien ser una sal particular o una mezcla de sales, tal como Na₂SO₄, K₂SO₄, MgSO₄ y/o citrato sódico.

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

[0084] Alternativamente, las enzimas de la invención se pueden preparar por congelación de una mezcla de solución de cultivo líquido con un agente de carga tal como harina de soja molida y luego liofilizando la mezcla.

Lactosa oxidasa

50 [0085] Las oxidorreductasas son enzimas que catalizan la transferencia de electrones de una molécula a otra. Las dehidrogenasas y oxidasas pertenecen a la clase enzimática de oxidorreductasas.

Generalmente, las deshidrogenasas necesitan la presencia de un cofactor, por ejemplo NAD/NADP o una coenzima de flavina tal como FAD o FMN, pero este también puede ser el caso de oxidasas.

55 A menos que se sugiera otra cosa, las enzimas descritas abajo y en toda la descripción son enzimas aisladas con cofactor, si es necesario.

[0086] Una categoría de oxidorreductasas son oxidasas de carbohidrato que catalizan una reacción de oxidación/reducción que implica oxígeno molecular (O₂) como el aceptor de electrones y un azúcar.

60 En estas reacciones, el oxígeno se reduce a agua (H₂O) o peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El esquema de reacción neto se puede describir como:



65 [0087] Una clase preferida de carbohidrato oxidasa es una lactosa oxidasa.

Según esta invención, las lactosa oxidasas son enzimas que tienen al menos una actividad de celobiosa oxidasa (también llamada deshidrogenasa de celobiosa, EC 1.1.99.18, formalmente EC 1.1.3.25), actividad de lactosa oxidasa o actividad de oxidasa de maltosa.

Así, estas son capaces de oxidar celobiosa, lactosa, maltosa, rafinosa, glucosa, lactulosa y/o xilosa, preferiblemente celobiosa, lactosa, maltosa y/o rafinosa.

[0088] Las enzimas con actividad de celobiosa oxidasa, por ejemplo oxidasas de celobiosa son capaces de la oxidación de diferentes sacáridos con celobiosa, celooligosacáridos solubles, lactosa, xilobiosa y maltosa.

Las enzimas de la clase de oxidasas de celobiosa son enzimas preferidas también en la presente invención.

La celobiosa oxidasa es una enzima extracelular producida por varios hongos que degradan la madera, tales como el hongo de podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium*, hongo de podredumbre marrón *Coniophora puteana* y hongos de pudrición blanda tales como *Monilia sp.*, *chaetomium*, *cellulolyticum*, *Myceliophthora (Sporotrichum) thermophila*, *Sclerotium rolfsii* y *Humicola insolens* (Schou et al., 1998, Biochemical Journal 330: 565-571).

[0089] Las lactosa oxidasas tienen significativamente una especificidad de sustrato más-amplia sobre otras oxidasas de carbohidrato, tales como glucosa oxidasas, lo que es ventajoso ya que existe una oportunidad más alta de hallar un sustrato pertinente en el pienso para animales para actuar sobre la enzima.

Esto puede claramente verse en la tabla 1, donde la especificidad de la lactosa oxidasa de *Microdochium nivale* depositada bajo CBS 100236 (SEQ ID N.º: 1) se compara con una glucosa-oxidasa de *Aspergillus niger* (UNIPROT: P13006)

Tabla 1: actividades relativas de una lactosa oxidasa y glucosa-oxidasa

Sustrato	% actividad para lactosa oxidasa de <i>Microdochium nivale</i>	% actividad para glucosa-oxidasa de <i>Aspergillus niger</i>
D-(+)-Cellobiosa	88	0
D-lactosa	100	0
D-maltosa	99	0
D-rafinosa	53	0
D-(+)-Glucosa	43	100
Lactulosa	31	0
D-(+)-Xilosa	22	0
2-Deoxi-D-glucosa	4	16

[0090] La actividad se fija a la actividad óptima para esa enzima a pH 7 (lactosa para lactosa oxidasa, glucosa para glucosa-oxidasa) como se ha determinado utilizando el método descrito en el ejemplo 12 de la US2003/0180416.

Todas las otras actividades relativas evaluadas están por debajo del 10% para lactosa oxidasa y 1% para glucosa-oxidasa y están excluidas de la tabla.

[0091] En otra forma de realización preferida, la lactosa oxidasa preferiblemente se obtiene a partir de un hongo del género *Microdochium*, más preferiblemente *Microdochium nivale* e incluso más preferiblemente *Microdochium nivale* depositado bajo CBS 100236.

La lactosa oxidasa aislada de CBS 100236 se describe en detalle en la WO 99/31990 (SEQ ID N.º: 2 de la WO 99/31990; mostrada también como la SEQ ID N.º: 1 de la presente solicitud).

En una forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos de la lactosa oxidasa tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 1.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la lactosa oxidasa tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 1.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la lactosa oxidasa tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 1.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la lactosa oxidasa tiene al menos un 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 1. En otra forma de realización, la lactosa oxidasa es el polipéptido de la SEQ ID N.º: 1.

[0092] En otro aspecto, la lactosa oxidasa difiere en no más de treinta aminoácidos, por ejemplo, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por doce aminoácidos, por diez aminoácidos, por nueve aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1.

[0093] Los cambios aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, que es sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que significativamente no afectan al plegado y/o actividad de la proteína; delecciones

pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido enlazador de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación por el cambio de la carga de red de cambio u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

5 [0094] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

10 Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New York. Las 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.

15 [0095] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085).

20 En la técnica anterior, las mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan en su actividad de haloperoxidasa para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.

Ver también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708.

25 El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de estructura, determinado por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo.

Ver, 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 aminoácidos esenciales también puede ser inferida de un alineamiento con un polipéptido relativo.

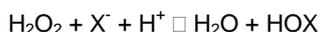
30 [0096] Las sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones y/o inserciones se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625.

35 Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; patente U.S. nº 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *ADN* 7: 127).

40 [0097] La concentración de la lactosa oxidasa es típicamente en el rango de 0.01-10000 ppm de proteína enzimática por kg de pienso, preferiblemente 0.1-5000 ppm, más preferiblemente 0.5-2500 ppm, aún más preferiblemente 2-1000 ppm y de la forma más preferible 5-500 ppm de proteína enzimática por kg de pienso, que corresponde a 5-500 mg por kg pienso.

Haloperoxidasa de vanadio

45 [0098] Las haloperoxidasas forman una clase de enzimas que son capaces de oxidar haluros ($X = Cl^-$, Br^- , o I^-) en presencia de peróxido de hidrógeno al correspondiente hipohaloso ácido (HOX) según:



50 [0099] Si un aceptor nucleofílico conveniente está presente, se producirá una reacción con HOX por la cual una diversidad de productos reactivos halogenados se puede formar.

55 [0100] Las haloperoxidasas forman una clase de enzimas que son capaces de oxidación de haluros (Cl^- , Br^- , I^-) y tiocianato (SCN^-) en presencia de peróxido de hidrógeno o un sistema generador de peróxido de hidrógeno al correspondiente ácidos hipohalosos o hipohalitas; o en el caso de tiocianato, para ácido hipotiocianoso o hipotiocianita.

[0101] Las haloperoxidasas se clasifican según su especificidad para iones de haluro.

60 Las cloroperoxidasas (E.C. 1.11.1.10) catalizan la formación de hipoclorito de iones de cloruro, hipobromita de iones de bromuro e hipiodita de iones de yoduro; y bromoperoxidasas (E.C. 1.11.1.18) catalizan la formación de hipobromita de iones de bromuro e hipiodita de iones de yoduro.

La hipiodita, sin embargo, con disproporcionatos de yoduro para formar yodo elemental y, por tanto, yodo es el producto observado.

65 Los compuestos de hipohalita pueden posteriormente reaccionar con otros compuestos que forman compuestos halogenados.

[0102] Las haloperoxidasas han sido aisladas de varios organismos: mamíferos, animales marinos, plantas, algas, líquen, hongos y bacterias.

Generalmente se acepta que las haloperoxidasas sean las enzimas responsables de la formación de compuestos halogenados en la naturaleza, aunque otras enzimas se pueden implicar.

[0103] La haloperoxidasa de la invención es una haloperoxidasa de vanadio, es decir una haloperoxidasa que contiene vanadato.

Las haloperoxidasas de vanadio pueden ser una cloroperoxidasa de vanadio o una bromoperoxidasa de vanadio, preferiblemente una cloroperoxidasa de vanadio y son diferentes de otras haloperoxidasas en las que el grupo protésico en estas enzimas tiene características estructurales similares al vanadato (vanadio V), mientras que las otras haloperoxidasas son hemeperoxidasas.

Las haloperoxidasas de vanadio han sido aisladas de varios organismos tales como mamíferos, animales marinos, plantas, algas, líquen, hongos y bacterias (ver Johannes, W.P.M. Et al, 1993, Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology 1161: 249-256).

[0104] En una forma de realización preferida, la haloperoxidasa de vanadio es derivable de unas especies de *Curvularia*.

En una forma de realización preferida, la haloperoxidasa es derivable de *Curvularia verruculosa*, tal como *C. Verruculosa* CBS 147.63 o *C. Verruculosa* CBS 444.70, como se describe en la WO 97/04102 (ver SEQ ID N.º: 2 en WO 97/04102; mostrada también como la SEQ ID N.º: 2 de la presente solicitud).

En una forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 75% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 80% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 85% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 90% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

En otra forma de realización, la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

[0105] En otro aspecto, la haloperoxidasa de vanadio difiere en no más de treinta aminoácidos, por ejemplo, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por doce aminoácidos, por diez aminoácidos, por nueve aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

[0106] En otra forma de realización preferida, la haloperoxidasa de vanadio es derivable de *Curvularia inequalis*, tal como *C. Inaequalis* CBS 102.42, como se describe en la WO 95/27046 (una haloperoxidasa de vanadio codificada por la secuencia de ADN de la WO 95/27046, la Figura 2; también mostrada como SEQ ID N.º: 3 de la presente solicitud).

En una forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos un 70% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 75% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 80% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 85% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 90% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

En otra forma de realización, la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

[0107] En otro aspecto, la haloperoxidasa de vanadio difiere en no más de treinta aminoácidos, por ejemplo, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por doce aminoácidos, por diez aminoácidos, por nueve aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido de SEQ ID N.º: 3.

[0108] En otra forma de realización preferida, la haloperoxidasa de vanadio es derivable de *Drechslera hartleibii* como se describe en la WO 01/79459 (SEQ ID N.º: 5 de la presente solicitud).

5 En una forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 70% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 75% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 80% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

10 En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 85% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 90% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

15 En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

En otra forma de realización, la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

[0109] En otro aspecto, la haloperoxidasa de vanadio difiere en no más de treinta aminoácidos, por ejemplo, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por doce aminoácidos, por diez aminoácidos, por nueve aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido de SEQ ID N.º: 5.

25 [0110] En otra forma de realización preferida, la haloperoxidasa de vanadio es derivable de *Dendryphiella salina*, como se describe en la WO 01/79458 (SEQ ID N.º: 6 de la presente solicitud).

En una forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 70% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

30 En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 75% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 80% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 85% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

35 En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 90% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

40 En otra forma de realización, la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

[0111] En otro aspecto, la haloperoxidasa de vanadio difiere en no más de treinta aminoácidos, por ejemplo, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por doce aminoácidos, por diez aminoácidos, por nueve aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido desde el polipéptido de SEQ ID N.º: 6.

50 [0112] En otra forma de realización preferida, la haloperoxidasa de vanadio es derivable de *Phaeotrichoconis crotalarie*, como se describe en la WO 01/79461 (SEQ ID N.º: 7 de la presente solicitud).

En una forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 70% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 75% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

55 En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 80% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 85% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 90% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

60 En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

En otra forma de realización, la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

[0113] En otro aspecto, la haloperoxidasa de vanadio difiere en no más de treinta aminoácidos, por ejemplo, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por doce aminoácidos, por diez aminoácidos, por nueve aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido de SEQ ID N.º: 7.

[0114] En otra forma de realización preferida, la haloperoxidasa de vanadio es derivable de *Geniculosporium sp.*, como se describe en la WO 01/79460 (SEQ ID N.º: 8 de la presente solicitud).

En una forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 75% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 90% identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de aminoácidos de la haloperoxidasa de vanadio tiene al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 8. En otra forma de realización, la haloperoxidasa de vanadio es el polipéptido de SEQ ID N.º: 8.

[0115] En otro aspecto, la haloperoxidasa de vanadio difiere en no más de treinta aminoácidos, por ejemplo, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por doce aminoácidos, por diez aminoácidos, por nueve aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido de SEQ ID N.º: 8.

[0116] Los cambios aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que significativamente no afectan al plegado y/o actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido enlazador de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación por cambio de carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0117] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos acídicos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath and R.L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, New York.

Las 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.

[0118] Los aminoácidos esenciales y sitios activos en un polipéptido se pueden identificar tal y como se describe anteriormente.

Las sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones y/o inserciones se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos como se ha descrito anteriormente.

La identidad de secuencia de SEQ ID N.º: 2, 3, 5, 6,7 y 8, cuando se ha calculado tal y como se define aquí, muestra que las secuencias están bien conservadas de manera que todas las secuencias son al menos 75% idénticas entre sí.

[0119] La concentración de la haloperoxidasa de vanadio está típicamente en el rango de 0.01-10000 proteína enzimática de ppm, preferiblemente 0.1-2500 ppm, más preferiblemente 0.5-1000 ppm, aún más preferiblemente 1-400 ppm y de la forma más preferible 2-200 proteína enzimática de ppm, que corresponde a 2-200 mg por kg de pienso.

Fuentes de peróxido de hidrógeno

[0120] El peróxido de hidrógeno requerido por la haloperoxidasa de vanadio puede estar previsto como una solución acuosa de peróxido de hidrógeno o un precursor de peróxido de hidrógeno para la producción in situ de peróxido de hidrógeno.

Cualquier entidad sólida que libera sobre la disolución de un peróxido, que es utilizable por la haloperoxidasa de vanadio, puede servir como una fuente de peróxido de hidrógeno.

Los compuestos que producen peróxido de hidrógeno sobre la disolución en el agua o un medio basado en agua apropiado incluyen pero de forma no limitativa peróxidos metálicos, percarbonatos, persulfatos, perfosfatos, peroxiácidos, alquiperóxidos, acilperóxidos, peroxiésteres, peróxido de urea, perboratos y ácidos peroxycarboxílicos o sales derivadas.

5 [0121] Otra fuente de peróxido de hidrógeno es un sistema de enzima generadora de peróxido de hidrógeno, tal como una lactosa oxidasa junto con un sustrato para la oxidasa.

Los ejemplos de sustratos con los cuales funciona la lactosa oxidasa son celobiosa, lactosa, maltosa, rafinosa, glucosa, lactulosa y/o xilosa, preferiblemente celobiosa, lactosa, maltosa y/o rafinosa.

10 [0122] Puede ser ventajoso usar peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente, ya que esta fuente produce una concentración relativamente baja de peróxido de hidrógeno bajo las condiciones pertinentes biológicamente. Las concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno suponen un aumento del índice de reacción catalizada de haloperoxidasa.

15 Fuentes de haluro

[0123] Generalmente, los haluros necesitados para reacción con la haloperoxidasa de vanadio están disponibles en cantidades suficientes en las composiciones de pienso (por ejemplo, como la sal de cloruro de un compuesto en la premezcla).

Sin embargo, si es necesario, una fuente de iones de haluro se pueden añadir a la composición tal como añadiendo una sal de haluro.

20 La sal(es) de haluro puede ser sal(es) de cloruro tal como cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl) o cloruro amónico (NH₄Cl), sal(es) de bromuro tales como bromuro sódico (NaBr), bromuro de potasio (KBr) o bromuro de amonio (NH₄Br), sal(es) de yoduro tal como yoduro sódico (NaI), yoduro potásico (KI) o yoduro amónico (NH₄I), sal(es) de tiocianato tales como tiocianato sódico (NaSCN), tiocianato potásico (KSCN) o tiocianato amónico (NH₄SCN) o cualquier mezcla derivada.

30 [0124] La concentración de cloruro, bromuro, yoduro, y/o iones de tiocianato están colectivamente o individualmente en el rango de 0.1-10000 cloruro de ppm, bromuro, yoduro y/o tiocianato por kg de pienso, preferiblemente en el rango de 1-5000 ppm de cloruro, bromuro, yoduro y/o tiocianato por kg de pienso, más preferiblemente en el rango 10 - 2000 ppm de cloruro, bromuro, yoduro y/o tiocianato por kg de pienso.

35 [0125] La presente invención posteriormente se describe por los ejemplos siguientes que no deberían ser interpretados como limitación del ámbito de la invención.

Ejemplos

40 **Ejemplo 1:** actividad antimicrobiana de una composición que comprende una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio

[0126] La lactosa oxidasa (COX) usada fue aislada de *Microdochium nivale* CBS 100236 y descrita en detalle en la WO 99/31990 (SEQ ID N.º: 2 de WO 99/31990; mostrada también como SEQ ID N.º: 1 de la presente solicitud) a una concentración de 15 mg de proteína enzimática/ml.

45 [0127] La haloperoxidasa de vanadio (HAP) usada fue aislada de *Curvularia verruculosa* CBS 147.63, como se describe en la WO 97/04102 (ver SEQ ID N.º: 2 en la WO 97/04102; mostrada también como SEQ ID N.º: 2 de la presente solicitud) a una concentración de 33 mg de proteína enzimática/ml.

50 [0128] La aminoacidoxidasa (AAO) es una L-lisina-oxidasa y fue aislada de *Trichoderma harzianum* CBS 223,93, como se describe en US 6,248,575 (mostrada también como SEQ ID N.º: 4 de la presente solicitud).

[0129] La actividad antibacteriana de lactosa oxidasa(COX), haloperoxidasa de vanadio (HAP) y aminoacidoxidasa (AAO) contra el *Escherichia coli* fue estudiada.

55 *E. Coli* K12 fue inoculada en 10mL de caldo de luria (LB) y se dejó durante toda la noche a 37°C.

El tampón tris fue diluido a 10X en agua MQ.

El tampón diluido tris fue ajustado a pH 6.3 utilizando 1M ácido clorhídrico.

60 El pienso para pollos (30:70 proporción en peso de mezcla de harina de semilla de soja y harina de maíz, 2 g) se pesó y transfirió a cada uno de dos tubos de 50mL que contienen bien 10 mL de 0.1M a pH de tampón acetato 3 o 10 mL de 0.1M tris a pH de tampón 6.3. 100µL de *E. Coli* del cultivo durante toda la noche se transfirió a cada una de las dos suspensiones de pienso. Se realizaron 5 X 1 mL partes alícuotas de cada suspensión de pienso.

Las enzimas de lactosa oxidasa, haloperoxidasa de vanadio y aminoacidoxidasa se añadieron a las partes alícuotas como se muestra en la tabla 2 en comparación con dos controles sin enzimas con pH 3 y 6 respectivamente.

65 El tratamiento enzimático del pienso se efectuó a 40°C durante una hora a 300 r.p.m..

Después del tratamiento una gama de dilución de 10^{-4} se efectuó en una solución de cloruro sódico estéril 0.9% (100µL a 900µL de cloruro sódico en el agua).

Las diluciones se marcaron con puntos en las placas de LB agar (10µL por punto) y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

- 5 Las unidades formadoras de colonias (CFU) se contaron en puntos con menos de 30 colonias. Los resultados se dan en la figura 1 y tabla 3.

Tabla 2: cantidad de lactosa oxidasa, haloperoxidasa de vanadio y aminoacidoxidasa usada

Experimento	pH	Lactosa oxidasa (µL)	Aminoacidoxidasa (µL)	Haloperoxidasa de vanadio (µL)
1	3	10	-	1
2	3	10	-	-
3	3	-	-	1
4	6	-	10	1
5	6	-	10	-
6	6	-	-	1
7	3	-	10	1
8	6	10	-	1
control 1	3	-	-	-
control 2	6	-	-	-

10

Tabla 3: *E. Coli* superviviente K12 en el pienso contaminado cuando se trata con una lactosa oxidasa, haloperoxidasa de vanadio y/o aminoacidoxidasa

Experimento	CFU	Factor de dilución	<i>E. Coli</i> superviviente K12 (CFU/ml)
1	0	100	<100
2	6	10^6	6.000.000
3	30	10^6	30.000.000
4	<100	10^6	100.000.000
5	<80	10^6	80.000.000
6	<100	10^6	100.000.000
7	23	10^6	23.000.000
8	0	100	<100
pH 3	39	10^6	39.000.000
pH 6	<50	10^6	50.000.000

- 15 [0130] Como se puede observar en la tabla 3 y la figura 1, el tratamiento de pienso contaminado con *E. Coli* K12 con una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio fue capaz de matar eficazmente sobre el 99.99% de las células *E. Coli* K12 en el caldo de pienso contaminado tanto a pH 3 como pH 6.

Sin embargo, ni una lactosa oxidasa, una haloperoxidasa de vanadio o aminoacidoxidasa y haloperoxidasa de vanadio fueron capaces de reducir el CFU de células *E. Coli* K12 en más de una unidad logarítmica.

20

Ejemplo 2: actividad antimicrobiana residual de una composición que comprende una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio después de la incubación en el jugo gástrico simulado

- 25 [0131] La lactosa oxidasa (COX) usada fue aislada de *Microdochium nivale* CBS 100236 y descrita en detalle en la WO 99/31990 (SEQ ID N.º: 2 de WO 99/31990; mostrada también como SEQ ID N.º: 1 de la presente solicitud) a una concentración de 15 mg de proteína enzimática/ml.

- 30 [0132] La haloperoxidasa de vanadio (HAP) usada fue aislada de *Curvularia verruculosa* CBS 147.63, como se describe en la WO 97/04102 (ver SEQ ID N.º: 2 en WO 97/04102; mostrada también como SEQ ID N.º: 2 de la presente solicitud) a una concentración de 33 mg de proteína enzimática/ml.

- 35 [0133] La actividad antibacteriana residual, seguida de la incubación a condiciones gástricas simuladas, de lactosa oxidasa (COX) y haloperoxidasa de vanadio (HAP) contra la *Escherichia coli* en unos antecedentes de suspensiones de pienso fue estudiada. *E. Coli* K12 fue inoculada en 10mL caldo de luria (LB) y se dejó durante toda la noche a 37°C.

[0134] La composición de jugo gástrico simulada consistía en 0.001 M HCl, 35 nM NaCl y 1.1 unidad pepsina/ml. Los volúmenes diferentes de lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio se añadieron a 9 mL de jugo gástrico simulado precalentado a 40°C como se muestra en la tabla 4.

Las incubaciones de control sin desafío gástrico 28 fueron detenidas por aumento de pH a pH 6.5 por adición de 1 mL de ácido cítrico de pH 6.5 - tampón Na₂HPO₄ a t = 0 min y antes de la adición de las enzimas.

Las muestras gástricas desafiadas fueron detenidas por adición de 1 mL de ácido cítrico de pH 6.5 - tampón Na₂HPO₄ a t = 15 min.

5 [0135] El pienso para pollos (30:70 proporción en peso de mezcla de harina de semilla de soja y harina de maíz, 2 g) se pesó y transfirió a cada incubación junto con 100 µL de *E. Coli* durante toda la noche.

La incubación con enzimas gástricas desafiadas, *E. Coli* y pienso se efectuó a 40°C durante una hora a 300 r.p.m.

10 Después del tratamiento, se efectuó un rango de dilución de 10⁻⁴ en una solución de cloruro sódico estéril de 0.9% (100 µL a 900 µL de cloruro sódico en el agua).

Las diluciones fueron marcadas en puntos en las placas de LB agar (10 µL por punto) e incubadas durante toda la noche a 37°C.

Las unidades formadoras de colonias (CFU) fueron contadas en puntos con menos de 30 colonias.

15 Los resultados se dan en la tabla 5.

Tabla 4: cantidad de lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio usada

Experimento	Desafío gástrico pH 3	Lactosa oxidasa (µL)	Haloperoxidasa de vanadio (µL)
1	No	10	1
2	No	100	10
3	No	100	1
4	No	10	10
5	Sí	10	1
6	Sí	100	10
7	Sí	100	1
8	Sí	10	10
Control 1	No	-	-
Control 2	Sí	-	-

20 Tabla 5: *E. Coli* superviviente en el pienso contaminado cuando se trata con lactosa oxidasa desafiada gástrica y haloperoxidasa de vanadio

Experimento	CFU	Factor de dilución	<i>E. Coli</i> superviviente K12 (CFU/ml)
1	13	104	130.000
2	1	10	10
3	0	<10	<10
4	6	104	60.000
5	1	105	100.000
6	0	<10	<10
7	3	10	30
8	6	104	60.000
Control 1	3	105	300.000
Control 2	2	105	200.000

25 [0136] Como se puede observar en la tabla 5, cuando el pienso contaminado con *E. Coli* K12 fue tratado con lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio, el número de células *E. Coli* K12 en el caldo de pienso contaminado se redujo por más de 10000 veces utilizando 100 µL lactosa oxidasa en combinación con 1 o 10 µL haloperoxidasa de vanadio.

30 Además, incluso después de que las enzimas fueran tratadas con un jugo gástrico simulado, la lactosa oxidasa y haloperoxidasa de vanadio todavía redujeron el número de células *E. Coli* K12 en el caldo de pienso contaminado en más de 10000 veces utilizando 100 µL de lactosa oxidasa en combinación con 10 µL de haloperoxidasa de vanadio y más de 1000 veces cuando 100 µL de lactosa oxidasa se añadió en combinación con 1 µL haloperoxidasa de vanadio.

Esto muestra que la haloperoxidasa de vanadio y lactosa oxidasa son estables bajo desafío de jugo gástrico simulado y por lo tanto estaría previsto que las enzimas sobrevivan al pasaje a través del tracto GI de un animal.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

ES 2 665 420 T3

<120> ENZYMAS DE PIENSO PARA ANIMALES
 <130> 12214-WO-PCT
 5 <150> EP13171612.8
 <151> 2013-06-12
 <160> 8
 10 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 495
 <212> PRT
 15 <213> Microdochium nivale
 <400> 1

Met Arg Ser Ala Phe Ile Leu Ala Leu Gly Leu Ile Thr Ala Ser Ala
 20 1 5 10 15

Asp Ala Leu Val Thr Arg Gly Ala Ile Glu Ala Cys Leu Ser Ala Ala
 25 20 25 30

Gly Val Pro Ile Asp Ile Pro Gly Thr Ala Asp Tyr Glu Arg Asp Val
 30 35 40 45

Glu Pro Phe Asn Ile Arg Leu Pro Tyr Ile Pro Thr Ala Ile Ala Gln
 50 55 60

Thr Gln Thr Thr Ala His Ile Gln Ser Ala Val Gln Cys Ala Lys Lys
 35 65 70 75 80

Leu Asn Leu Lys Val Ser Ala Lys Ser Gly Gly His Ser Tyr Ala Ser
 40 85 90 95

Phe Gly Phe Gly Gly Glu Asn Gly His Leu Met Val Gln Leu Asp Arg
 45 100 105 110

Met Ile Asp Val Ile Ser Tyr Asn Asp Lys Thr Gly Ile Ala His Val
 115 120 125

Glu Pro Gly Ala Arg Leu Gly His Leu Ala Thr Val Leu Asn Asp Lys
 50 130 135 140

Tyr Gly Arg Ala Ile Ser His Gly Thr Cys Pro Gly Val Gly Ile Ser
 55 145 150 155 160

ES 2 665 420 T3

Gly His Phe Ala His Gly Gly Phe Gly Phe Ser Ser His Met His Gly
 165 170 175
 5
 Leu Ala Val Asp Ser Val Val Gly Val Thr Val Val Leu Ala Asp Gly
 180 185 190
 10
 Arg Ile Val Glu Ala Ser Ala Thr Glu Asn Ala Asp Leu Phe Trp Gly
 195 200 205
 15
 Ile Lys Gly Ala Gly Ser Asn Phe Gly Ile Val Ala Val Trp Lys Leu
 210 215 220
 20
 Ala Thr Phe Pro Ala Pro Lys Val Leu Thr Arg Phe Gly Val Thr Leu
 225 230 235 240
 25
 Asn Trp Lys Asn Lys Thr Ser Ala Leu Lys Gly Ile Glu Ala Val Glu
 245 250 255
 30
 Asp Tyr Ala Arg Trp Val Ala Pro Arg Glu Val Asn Phe Arg Ile Gly
 260 265 270
 35
 Pro Glu Gln Trp Arg Ala Ala Phe Gln Pro Leu Leu Asp Thr Leu Pro
 290 295 300
 40
 Ala Gly Tyr Val Val Asn Pro Thr Thr Ser Leu Asn Trp Ile Glu Ser
 305 310 315 320
 45
 Val Leu Ser Tyr Ser Asn Phe Asp His Val Asp Phe Ile Thr Pro Gln
 325 330 335
 50
 Pro Val Glu Asn Phe Tyr Ala Lys Ser Leu Thr Leu Lys Ser Ile Lys
 340 345 350
 55
 Gly Asp Ala Val Lys Asn Phe Val Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Ser Asn
 355 360 365
 Lys Val Lys Asp Arg Phe Trp Phe Tyr Gln Leu Asp Val His Gly Gly
 370 375 380

ES 2 665 420 T3

Lys Asn Ser Gln Val Thr Lys Val Thr Asn Ala Glu Thr Ala Tyr Pro
 385 390 395 400
 5 His Arg Asp Lys Leu Trp Leu Ile Gln Phe Tyr Asp Arg Tyr Asp Asn
 405 410 415
 10 Asn Gln Thr Tyr Pro Glu Thr Ser Phe Lys Phe Leu Asp Gly Trp Val
 420 425 430
 15 Asn Ser Val Thr Lys Ala Leu Pro Lys Ser Asp Trp Gly Met Tyr Ile
 435 440 445
 20 Asn Tyr Ala Asp Pro Arg Met Asp Arg Asp Tyr Ala Thr Lys Val Tyr
 450 455 460
 25 Tyr Gly Glu Asn Leu Ala Arg Leu Gln Lys Leu Lys Ala Lys Phe Asp
 465 470 475 480
 30 Pro Thr Asp Arg Phe Tyr Tyr Pro Gln Ala Val Arg Pro Val Lys
 485 490 495
 35 <210> 2
 <211> 600
 <212> PRT
 <213> Curvularia verruculosa
 40 Met Gly Ser Val Thr Pro Ile Pro Leu Pro Thr Ile Asp Glu Pro Glu
 1 5 10 15
 45 Glu Tyr Asn Asn Asn Tyr Ile Leu Phe Trp Asn Asn Val Gly Leu Glu
 20 25 30
 50 Leu Asn Arg Leu Thr His Thr Val Gly Gly Pro Leu Thr Gly Pro Pro
 35 40 45
 55 Leu Ser Ala Arg Ala Leu Gly Met Leu His Leu Ala Ile His Asp Ala
 50 55 60
 65 Tyr Phe Ser Ile Cys Pro Pro Thr Glu Phe Thr Thr Phe Leu Ser Pro
 65 70 75 80
 Asp Ala Glu Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Pro Ser Pro Asn Gly Ala Asp

ES 2 665 420 T3

				85					90					95		
5	Asp	Ala	Arg	Gln	Ala	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Lys	Met	Leu	Ser	Ser
				100					105					110		
10	Leu	Tyr	Met	Lys	Pro	Ala	Asp	Pro	Asn	Thr	Gly	Thr	Asn	Ile	Ser	Asp
			115					120					125			
15	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Glu	Arg	Ala	Val	Val	Lys
		130					135					140				
20	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Asp	Arg	Glu	Ser	Val	Ser	Phe	Met	Phe	Gly	Glu
	145					150					155					160
25	Ala	Val	Ala	Asp	Val	Phe	Phe	Ala	Leu	Leu	Asn	Asp	Pro	Arg	Gly	Ala
				165						170					175	
30	Ser	Gln	Glu	Gly	Tyr	Gln	Pro	Thr	Pro	Gly	Arg	Tyr	Lys	Phe	Asp	Asp
				180					185					190		
35	Glu	Pro	Thr	His	Pro	Val	Val	Leu	Val	Pro	Val	Asp	Pro	Asn	Asn	Pro
			195					200					205			
40	Asn	Gly	Pro	Lys	Met	Pro	Phe	Arg	Gln	Tyr	His	Ala	Pro	Phe	Tyr	Gly
		210					215					220				
45	Met	Thr	Thr	Lys	Arg	Phe	Ala	Thr	Gln	Ser	Glu	His	Ile	Leu	Ala	Asp
	225					230					235					240
50	Pro	Pro	Gly	Leu	Arg	Ser	Asn	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp
					245					250					255	
55	Ser	Ile	Arg	Val	Ala	Ile	Ala	Met	Gly	Gly	Ala	Gln	Asp	Leu	Asn	Ser
				260					265					270		
60	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Trp	Gln	Thr	Ala	Gln	Gly	Leu	Tyr	Trp	Ala	Tyr
			275					280					285			
65	Asp	Gly	Ser	Asn	Leu	Val	Gly	Thr	Pro	Pro	Arg	Phe	Tyr	Asn	Gln	Ile
		290					295					300				
70	Val	Arg	Arg	Ile	Ala	Val	Thr	Tyr	Lys	Lys	Glu	Asp	Asp	Leu	Ala	Asn
	305					310					315					320

ES 2 665 420 T3

Ser Glu Val Asn Asn Ala Asp Phe Ala Arg Leu Phe Ala Leu Val Asn
 325 330 335
 5
 Val Ala Cys Thr Asp Ala Gly Ile Phe Ser Trp Lys Glu Lys Trp Glu
 340 345 350
 10
 Phe Glu Phe Trp Arg Pro Leu Ser Gly Val Arg Asp Asp Gly Arg Pro
 355 360 365
 15
 Asp His Gly Asp Pro Phe Trp Leu Thr Leu Gly Ala Pro Ala Thr Asn
 370 375 380
 20
 Thr Asn Asp Ile Pro Phe Lys Pro Pro Phe Pro Ala Tyr Pro Ser Gly
 385 390 395 400
 25
 His Ala Thr Phe Gly Gly Ala Val Phe Gln Met Val Arg Arg Tyr Tyr
 405 410 415
 30
 Asn Gly Arg Val Gly Thr Trp Lys Asp Asp Glu Pro Asp Asn Ile Ala
 420 425 430
 35
 Ile Asp Met Met Ile Ser Glu Glu Leu Asn Gly Val Asn Arg Asp Leu
 435 440 445
 40
 Arg Gln Pro Tyr Asp Pro Thr Ala Pro Ile Glu Asp Gln Pro Gly Ile
 450 455 460
 45
 Val Arg Thr Arg Ile Val Arg His Phe Asp Ser Ala Trp Glu Met Met
 465 470 475 480
 50
 Phe Glu Asn Ala Ile Ser Arg Ile Phe Leu Gly Val His Trp Arg Phe
 485 490 495
 55
 Asp Ala Ala Ala Ala Arg Asp Ile Leu Ile Pro Thr Asn Thr Lys Asp
 500 505 510
 Val Tyr Ala Val Asp Ser Asn Gly Ala Thr Val Phe Gln Asn Val Glu
 515 520 525
 Asp Val Arg Tyr Ser Thr Lys Gly Thr Arg Glu Gly Arg Glu Gly Leu
 530 535 540

ES 2 665 420 T3

Phe Pro Ile Gly Gly Val Pro Leu Gly Ile Glu Ile Ala Asp Glu Ile
 545 550 555 560

5

Phe Asn Asn Gly Leu Arg Pro Thr Pro Pro Glu Leu Gln Pro Met Pro
 565 570 575

10

Gln Asp Thr Pro Val Gln Lys Pro Val Gln Gly Met Trp Asp Glu Gln
 580 585 590

15

Val Pro Leu Val Lys Glu Ala Pro
 595 600

20

<210> 3
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> *Curvularia inequalis*

25

Met Gly Ser Val Thr Pro Ile Pro Leu Pro Lys Ile Asp Glu Pro Glu
 1 5 10 15

30

Glu Tyr Asn Thr Asn Tyr Ile Leu Phe Trp Asn His Val Gly Leu Glu
 20 25 30

35

Leu Asn Arg Val Thr His Thr Val Gly Gly Pro Leu Thr Gly Pro Pro
 35 40 45

40

Leu Ser Ala Arg Ala Leu Gly Met Leu His Leu Ala Ile His Asp Ala
 50 55 60

45

Tyr Phe Ser Ile Cys Pro Pro Thr Asp Phe Thr Thr Phe Leu Ser Pro
 65 70 75 80

50

Asp Thr Glu Asn Ala Ala Tyr Arg Leu Pro Ser Pro Asn Gly Ala Asn
 85 90 95

55

Asp Ala Arg Gln Ala Val Ala Gly Ala Ala Leu Lys Met Leu Ser Ser
 100 105 110

Leu Tyr Met Lys Pro Val Glu Gln Pro Asn Pro Asn Pro Gly Ala Asn
 115 120 125

Ile Ser Asp Asn Ala Tyr Ala Gln Leu Gly Leu Val Leu Asp Arg Ser

ES 2 665 420 T3

	130					135										140
5	Val 145	Leu	Glu	Ala	Pro	Gly 150	Gly	Val	Asp	Arg	Glu 155	Ser	Ala	Ser	Phe	Met 160
10	Phe	Gly	Glu	Asp	Val 165	Ala	Asp	Val	Phe	Phe 170	Ala	Leu	Leu	Asn	Asp 175	Pro
15	Arg	Gly	Ala	Ser 180	Gln	Glu	Gly	Tyr	His 185	Pro	Thr	Pro	Gly	Arg	Tyr 190	Lys
20	Phe	Asp	Asp 195	Glu	Pro	Thr	His	Pro 200	Val	Val	Leu	Ile	Pro 205	Val	Asp	Pro
25	Asn 210	Asn	Pro	Asn	Gly	Pro	Lys 215	Met	Pro	Phe	Arg	Gln 220	Tyr	His	Ala	Pro
30	Phe 225	Tyr	Gly	Lys	Thr	Thr 230	Lys	Arg	Phe	Ala	Thr 235	Gln	Ser	Glu	His	Phe 240
35	Leu	Ala	Asp	Pro	Pro 245	Gly	Leu	Arg	Ser	Asn 250	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala 255	Glu
40	Tyr	Asp	Asp	Ala 260	Val	Arg	Val	Ala	Ile 265	Ala	Met	Gly	Gly	Ala 270	Gln	Ala
45	Leu	Asn	Ser 275	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro 280	Trp	Gln	Thr	Ala	Gln 285	Gly	Leu	Tyr
50	Trp 290	Ala	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn 295	Leu	Ile	Gly	Thr	Pro 300	Pro	Arg	Phe	Tyr
55	Asn 305	Gln	Ile	Val	Arg	Arg 310	Ile	Ala	Val	Thr	Tyr 315	Lys	Lys	Glu	Glu	Asp 320
60	Leu	Ala	Asn	Ser	Glu 325	Val	Asn	Asn	Ala	Asp 330	Phe	Ala	Arg	Leu	Phe 335	Ala
65	Leu	Val	Asp	Val 340	Ala	Cys	Thr	Asp	Ala 345	Gly	Ile	Phe	Ser	Trp 350	Lys	Glu
70	Lys	Trp	Glu	Phe	Glu	Phe	Trp	Arg	Pro	Leu	Ser	Gly	Val	Arg	Asp	Asp

ES 2 665 420 T3

	355		360		365												
5	Gly	Arg	Pro	Asp	His	Gly	Asp	Pro	Phe	Trp	Leu	Thr	Leu	Gly	Ala	Pro	
	370					375						380					
10	Ala	Thr	Asn	Thr	Asn	Asp	Ile	Pro	Phe	Lys	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala	Tyr	
	385					390					395					400	
15	Pro	Ser	Gly	His	Ala	Thr	Phe	Gly	Gly	Ala	Val	Phe	Gln	Met	Val	Arg	
					405					410					415		
20	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Trp	Lys	Asp	Asp	Glu	Pro	Asp	
				420					425					430			
25	Asn	Ile	Ala	Ile	Asp	Met	Met	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Gly	Val	Asn	
			435					440					445				
30	Arg	Asp	Leu	Arg	Gln	Pro	Tyr	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Ile	Glu	Asp	Gln	
	450						455					460					
35	Pro	Gly	Ile	Val	Arg	Thr	Arg	Ile	Val	Arg	His	Phe	Asp	Ser	Ala	Trp	
	465					470					475					480	
40	Glu	Leu	Met	Phe	Glu	Asn	Ala	Ile	Ser	Arg	Ile	Phe	Leu	Gly	Val	His	
					485					490					495		
45	Trp	Arg	Phe	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Asp	Ile	Leu	Ile	Pro	Thr	Thr	
				500					505					510			
50	Thr	Lys	Asp	Val	Tyr	Ala	Val	Asp	Asn	Asn	Gly	Ala	Thr	Val	Phe	Gln	
			515					520					525				
55	Asn	Val	Glu	Asp	Ile	Arg	Tyr	Thr	Thr	Arg	Gly	Thr	Arg	Glu	Asp	Pro	
	530						535					540					
60	Glu	Gly	Leu	Phe	Pro	Ile	Gly	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Ile	Glu	Ile	Ala	
	545					550					555					560	
65	Asp	Glu	Ile	Phe	Asn	Asn	Gly	Leu	Lys	Pro	Thr	Pro	Pro	Glu	Ile	Gln	
					565					570					575		
70	Pro	Met	Pro	Gln	Glu	Thr	Pro	Val	Gln	Lys	Pro	Val	Gly	Gln	Gln	Pro	
				580					585					590			

ES 2 665 420 T3

Val Lys Gly Met Trp Glu Glu Glu Gln Ala Pro Val Val Lys Glu Ala
 595 600 605
 5
 Pro
 10
 <210> 4
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> Trichoderma harzianum
 15
 <400> 4
 Met Asp Asn Val Asp Phe Ala Glu Ser Val Arg Thr Arg Trp Ala Arg
 1 5 10 15
 20
 Arg Leu Ile Arg Glu Lys Val Ala Lys Glu Leu Asn Ile Leu Thr Glu
 20 25 30
 25
 Arg Leu Gly Glu Val Pro Gly Ile Pro Pro Pro Asn Glu Gly Arg Phe
 35 40 45
 30
 Leu Gly Gly Gly Tyr Ser His Asp Asn Leu Pro Ser Asp Pro Leu Tyr
 50 55 60
 35
 Ser Ser Ile Lys Pro Ala Leu Leu Lys Glu Ala Pro Arg Ala Glu Glu
 65 70 75 80
 40
 Glu Leu Pro Pro Arg Lys Val Cys Ile Val Gly Ala Gly Val Ser Gly
 85 90 95
 45
 Leu Tyr Ile Ala Met Ile Leu Asp Asp Leu Lys Ile Pro Asn Leu Thr
 100 105 110
 50
 Tyr Asp Ile Phe Glu Ser Ser Ser Arg Thr Gly Gly Arg Leu Tyr Thr
 115 120 125
 55
 His His Phe Thr Asp Ala Lys His Asp Tyr Tyr Asp Ile Gly Ala Met
 130 135 140
 Arg Tyr Pro Asp Ile Pro Ser Met Lys Arg Thr Phe Asn Leu Phe Lys
 145 150 155 160

ES 2 665 420 T3

Arg Thr Lys Met Pro Leu Ile Lys Tyr Tyr Leu Asp Gly Glu Asn Thr
 165 170 175
 5 Pro Gln Leu Tyr Asn Asn His Phe Phe Ala Lys Gly Val Ser Asp Pro
 180 185 190
 10 Tyr Met Val Ser Val Ala Asn Gly Gly Thr Val Pro Asp Asp Val Val
 195 200 205
 15 Asp Ser Val Gly Glu Lys Leu Gln Gln Ala Phe Gly Tyr Tyr Lys Glu
 210 215 220
 20 Lys Leu Ala Glu Asp Phe Asp Lys Gly Phe Asp Glu Leu Met Leu Val
 225 230 235 240
 25 Asp Asp Met Thr Thr Arg Glu Tyr Leu Lys Arg Gly Gly Pro Lys Gly
 245 250 255
 30 Glu Ala Pro Lys Tyr Asp Phe Phe Ala Ile Gln Trp Met Glu Thr Gln
 260 265 270
 35 Asn Thr Gly Thr Asn Leu Phe Asp Gln Ala Phe Ser Glu Ser Val Ile
 275 280 285
 40 Asp Ser Phe Asp Phe Asp Asn Pro Thr Lys Pro Glu Trp Tyr Cys Ile
 290 295 300
 45 Glu Gly Gly Thr Ser Leu Leu Val Asp Ala Met Glu Lys Thr Leu Val
 305 310 315 320
 50 His Lys Val Gln Asn Asn Lys Arg Val Asp Ala Ile Ser Ile Asp Leu
 325 330 335
 55 Asp Ala Pro Asp Asp Gly Asn Met Ser Val Arg Ile Gly Gly Lys Glu
 340 345 350
 His Ser Gly Tyr Ser Thr Val Phe Asn Thr Thr Ala Leu Gly Cys Leu
 355 360 365
 Asp Arg Met Asp Leu Arg Gly Leu Asn Leu His Pro Thr Gln Ala Asp
 370 375 380
 Ala Ile Arg Cys Leu His Tyr Asp Asn Ser Thr Lys Val Ala Leu Lys

ES 2 665 420 T3

	385				390					395						400
5	Phe	Ser	Tyr	Pro	Trp	Trp	Ile	Lys	Asp	Cys	Gly	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly
					405					410					415	
10	Ala	Ala	Ser	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Arg	Thr	Cys	Val	Tyr	Pro	Ser	Tyr
				420					425					430		
15	Asn	Leu	Ala	Asp	Thr	Gly	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Ala	Ser	Tyr	Thr	Trp
			435					440					445			
20	Ser	Gln	Asp	Ala	Thr	Arg	Ile	Gly	Ser	Leu	Val	Lys	Glu	Ala	Pro	Pro
		450					455					460				
25	Gln	Pro	Pro	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	Val	Glu	Leu	Ile	Leu	Gln	Asn	Leu
	465					470					475					480
30	Ala	Arg	Leu	His	Ala	Glu	His	Met	Thr	Tyr	Glu	Lys	Ile	Lys	Glu	Ala
					485					490					495	
35	Tyr	Thr	Gly	Val	Tyr	His	Ala	Tyr	Cys	Trp	Ala	Asn	Asp	Pro	Asn	Val
				500					505					510		
40	Gly	Gly	Ala	Phe	Ala	Leu	Phe	Gly	Pro	Gly	Gln	Phe	Ser	Asn	Leu	Tyr
			515					520					525			
45	Pro	Tyr	Leu	Met	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Lys	Phe	His	Ile	Val	Gly
		530					535					540				
50	Glu	Ala	Ser	Ser	Val	His	His	Ala	Trp	Ile	Ile	Gly	Ser	Leu	Glu	Ser
	545					550					555					560
55	Ala	Tyr	Thr	Ala	Val	Tyr	Gln	Phe	Arg	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Met	Trp	Asp
					565					570					575	
60	Tyr	Leu	Lys	Leu	Leu	Leu	Glu	Arg	Trp	Gln	Tyr	Gly	Leu	Gln	Glu	Leu
				580					585					590		
65	Glu	Thr	Gly	Lys	His	Gly	Thr	Ala	His	Leu	Gln	Phe	Ile	Leu	Gly	Ser
			595					600					605			

ES 2 665 420 T3

Leu Pro Lys Glu Tyr Gln Val Lys Ile

610

615

5

<210> 5
 <211> 605
 <212> PRT
 <213> *Dreschlera hartleбии*

10

<400> 5

Met Glu Pro Ile Thr Pro Ile Pro Leu Pro Arg Ile Asp Glu Pro Glu
 1 5 10 15

15

Glu Tyr Asn Thr Asn Tyr Val Leu Tyr Trp Asn His Val Gly Leu Glu
 20 25 30

20

Leu Asn Arg Val Thr His Thr Val Gly Gly Pro Gln Thr Gly Pro Pro
 35 40 45

25

Ile Ser Ala Arg Ala Leu Gly Met Leu His Leu Ala Ile His Asp Ala
 50 55 60

30

Tyr Phe Ala Ile Asn Pro Ser Ala Asp Ile Leu Thr Phe Leu Thr Pro
 65 70 75 80

35

Asn Ala Glu Asp Ala Ala Tyr Arg Leu Pro Asp Leu Asn Gly Ala Asp
 85 90 95

40

Asp Ala Arg Gln Ala Val Ala Gly Ala Ser Leu Lys Met Leu Ser Ser
 100 105 110

45

Leu Tyr Met Lys Pro Asp Met Pro Pro Ala Asn Ile Ser Asp Asn Ala
 115 120 125

50

Tyr Ala Gln Leu Gly Leu Val Leu Asp Arg Ser Ala Ala Glu Ala Pro
 130 135 140

55

Gly Gly Val Asp Arg Ala Ser Ala Ser Phe Leu Phe Gly Glu Ala Val
 145 150 155 160

Ala Asp Val Phe Phe Ala Leu Leu Phe His Ala Pro Gly Ala Ser Gln
 165 170 175

Glu Gly Tyr Gln Pro Thr Pro Gly Arg Tyr Arg Phe Asn Asp Glu Pro

ES 2 665 420 T3

			180					185						190		
5	Thr	His	Pro 195	Val	Val	Leu	Val	Pro 200	Val	Asp	Pro	Asn	Asn 205	Pro	Asn	Gly
10	Pro	Lys 210	Arg	Pro	Phe	Arg	Gln 215	Tyr	His	Ala	Pro	Phe 220	Tyr	Gly	Lys	Thr
15	Ala 225	Lys	Arg	Phe	Ala	Thr 230	Gln	Ser	Glu	His	Ile 235	Leu	Ala	Asp	Pro	Pro 240
20	Gly	Leu	Arg	Ser	Ala 245	Thr	Asp	Glu	Ser	Thr 250	Glu	Tyr	Asp	Asp	Ser	Ile 255
25	Arg	Val	Ala	Ile 260	Ala	Met	Gly	Gly	Ala 265	Thr	Gly	Leu	Asn	Ser	Thr	Lys 270
30	Arg	Thr	Pro 275	Tyr	Gln	Thr	Val	Gln 280	Gly	Ile	Phe	Trp	Ala 285	Tyr	Asp	Gly
35	Ser	Asn 290	Leu	Ile	Gly	Thr	Pro 295	Pro	Arg	Gln	Tyr	Asn 300	Gln	Ile	Val	Arg
40	Arg 305	Ile	Ala	Val	Thr	Tyr 310	Lys	Lys	Glu	Asp	Asp 315	Leu	Val	Asn	Ser	Glu 320
45	Val	Asn	Asn	Ala	Asp 325	Phe	Ala	Arg	Leu	Phe 330	Gly	Leu	Val	Asn	Val	Ala 335
50	Cys	Ala	Asp	Ala 340	Gly	Ile	Phe	Ser	Trp 345	Lys	Glu	Lys	Trp	Glu 350	Phe	Glu
55	Phe	Trp	Arg 355	Pro	Leu	Ser	Gly	Val 360	Arg	Glu	Asp	Gly	Arg 365	Pro	Asp	His
60	Gly	Asp 370	Pro	Phe	Trp	Leu	Thr 375	Leu	Gly	Ala	Pro	Ala 380	Thr	Asn	Thr	Asn
65	Asp 385	Ile	Pro	Phe	Lys	Pro 390	Pro	Phe	Pro	Ala	Tyr 395	Pro	Ser	Gly	His	Ala 400
70	Thr	Phe	Gly	Gly	Ala 405	Val	Phe	Gln	Met 410	Val	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Asn 415	Gly

ES 2 665 420 T3

Arg Val Gly Thr Trp Asn Asp Asp Glu Pro Asp Asn Ile Ala Ile Asp
 420 425 430
 5
 Met Val Val Ser Glu Glu Leu Asn Gly Leu Ser Arg Asp Leu Arg Gln
 435 440 445
 10
 Arg Tyr Asp Pro Thr Ala Pro Ile Glu Asp Gln Pro Gly Ile Val Arg
 450 455 460
 15
 Thr Arg Val Val Arg His Phe Asn Ser Ala Trp Glu Leu Met Phe Glu
 465 470 475 480
 20
 Asn Ala Ile Ser Arg Ile Phe Leu Gly Val His Trp Arg Phe Asp Ala
 485 490 495
 25
 Ala Ala Ala Arg Asp Val Leu Ile Pro Thr Thr Thr Lys Asp Val Tyr
 500 505 510
 30
 Ala Val Asp Ala Asn Gly Ala Thr Val Phe Gln Asn Val Glu Asp Val
 515 520 525
 35
 Arg Tyr Ser Thr Lys Gly Thr Arg Glu Gly Cys Glu Gly Leu Phe Pro
 530 535 540
 40
 Ile Gly Gly Val Pro Leu Gly Ile Glu Ile Ala Asp Glu Ile Phe Thr
 545 550 555 560
 Ser Gly Leu Arg Pro Thr Pro Pro Glu Ala Gln Pro Ala Pro Gln Glu
 565 570 575
 45
 Pro Pro Thr Val Gln Lys Pro Ile His His Lys Ala Ile Met Gly Gly
 580 585 590
 Gly Glu Glu Ala Phe Val Pro Ala Val Lys Glu Ala Pro
 595 600 605
 50
 <210> 6
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> Dendryphiella salina
 55
 <400> 6

ES 2 665 420 T3

Met Gly Pro Ile Thr Pro Ile Gln Leu Pro Lys Ile Glu Glu Pro Glu
 1 5 10 15
 5 Glu Tyr Asn Thr Asn Tyr Ile Leu Tyr Trp His His Val Gly Leu Glu
 20 25 30
 10 His Asn Arg Val Thr His Ser Val Gly Gly Pro Gln Thr Gly Pro Pro
 35 40 45
 15 Ile Ser Ala Arg Ala Leu Gly Met Leu Gln Leu Ala Val His Asp Ala
 50 55 60
 Tyr Phe Ala Ile Asn Arg Ser Cys Asp Phe Ser Thr Phe Leu Thr Pro
 65 70 75 80
 20 Gly Ala Asp Asn Ala Ala Tyr Arg Leu Pro Asn Leu Asn Cys Ala Asn
 85 90 95
 25 Asp Ala Arg Gln Ala Val Ala Gly Ala Ser Ile Lys Met Leu Ser Ser
 100 105 110
 30 Leu Tyr Ser Lys Pro Val Thr Gln Pro Cys Pro Asn Pro Gly Ala Asn
 115 120 125
 35 Ile Ser Asp Asn Ala Tyr Ala Gln Leu Gln Leu Leu Leu His Cys Ser
 130 135 140
 Ile Glu Asn Ala Pro Gly Gly Val Asp Gln Ala Ser Ala Ser Phe Val
 145 150 155 160
 40 Phe Gly Gln Ala Val Ala Lys Val Phe Phe Asn Leu Leu Phe His Pro
 165 170 175
 45 Pro Gly Ala Ser Gln Asp Gly Tyr His Pro Thr Pro Gly Arg Tyr Lys
 180 185 190
 50 Phe Asp Asp Glu Pro Thr His Pro Val Val Leu Ile Pro Val Asp Pro
 195 200 205
 55 Asn Asn Pro Asp Gly Pro Lys Met Pro Phe Arg Gln Tyr His Ala Pro
 210 215 220
 Phe Tyr Gly Thr Thr Ala Lys Arg Leu Ala Thr Gln Thr Glu His Ile

ES 2 665 420 T3

	225				230					235					240	
5	Ile	Ala	Asp	Pro	Pro	Gly	Ile	Arg	Ser	Ala	Ala	Asp	Glu	Gly	Ala	Glu
					245					250					255	
10	Tyr	Asp	Asp	Ser	Ile	Arg	Val	Ala	Ile	Ala	Met	Gly	Gly	Ala	Thr	Gly
				260					265					270		
15	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Tyr	Gln	Thr	Ala	Gln	Gly	Ile	Tyr
			275					280					285			
20	Trp	Ala	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Leu	Ile	Gly	Thr	Pro	Pro	Arg	Phe	Tyr
		290					295					300				
25	Asn	Gln	Ile	Val	Arg	Arg	Ile	Ala	Val	Thr	Tyr	Lys	Lys	Glu	Ala	Asp
		305				310					315					320
30	Leu	Ala	Thr	Ser	Glu	Val	Asn	Asn	Ala	Asp	Phe	Ala	Arg	Leu	Leu	Ala
					325					330					335	
35	Leu	Val	Asn	Val	Ala	Ser	Ala	Asp	Ala	Gly	Ile	Phe	Ser	Trp	Lys	Glu
			340					345						350		
40	Lys	Trp	Glu	Phe	Glu	Tyr	Trp	Arg	Pro	Leu	Ser	Gly	Val	Arg	Asp	Asp
			355					360					365			
45	Gly	Arg	Pro	Asp	His	Ala	Asp	Pro	Phe	Trp	Leu	Thr	Leu	Gly	Ala	Pro
		370					375					380				
50	Ala	Thr	Asn	Thr	Asn	Asp	Ile	Pro	Phe	Lys	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala	Tyr
		385				390					395					400
55	Pro	Ser	Gly	His	Ala	Thr	Phe	Gly	Ser	Ala	Val	Phe	Gln	Met	Val	Arg
					405					410					415	
60	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Trp	Lys	Lys	Asp	Glu	Pro	Asp
				420					425					430		
65	Asn	Ile	Ala	Ile	Asp	Met	Met	Val	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Gly	Leu	Ser
			435					440					445			
70	Arg	Asp	Leu	Arg	Gln	Pro	Tyr	Asn	Pro	Thr	Ala	Pro	Ile	Thr	Asp	Gln

ES 2 665 420 T3

	450		455		460												
5	Pro 465	Gly	Val	Val	Arg	Thr 470	Arg	Val	Val	Arg	His 475	Phe	Ser	Ser	Ala	Trp 480	
10	Glu	Leu	Met	Phe	Glu 485	Asn	Ala	Ile	Ser	Arg 490	Ile	Phe	Leu	Gly	Val 495	His	
15	Trp	Arg	Phe	Asp 500	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg 505	Asp	Ile	Leu	Ile	Pro 510	Thr	Thr	
20	Thr	Lys	Asp 515	Val	Tyr	Ala	Thr	Asp 520	Ala	Asn	Gly	Ala	Thr 525	Val	Phe	Gln	
25	Asn	Ile 530	Glu	Asp	Val	Arg	Tyr 535	Thr	Thr	Leu	Gly	Thr 540	Arg	Glu	Gly	His	
30	Asp 545	Gly	Leu	Leu	Pro	Ile 550	Gly	Gly	Val	Pro	Leu 555	Gly	Ile	Glu	Ile	Ala 560	
35	Asp	Asp	Ile	Phe	Glu 565	Ser	Gly	Leu	Arg 570	Pro	Thr	Pro	Pro	Glu	Arg 575	Gln	
40	Pro	Ile	Val	Asp 580	Glu	Thr	Pro	Val	Gly 585	Gln	Lys	Ala	Lys	Gly 590	Met	Trp	
45	Glu	Gly	Glu	Gln	Ala	Pro	Leu	Met 600	Asp	Gln	Ala	Pro					
50	<210>	7															
	<211>	599															
	<212>	PRT															
	<213>	Phaeotrichoconis	crotalariae														
55	<400>	7															
	Met	Thr	Ser	Val	Thr	Pro	Ile	Pro	Leu	Pro	Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Glu	
	1				5					10				15			
50	Glu	Tyr	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ile	Leu	Tyr	Trp	Asn	His	Val	Gly	Leu	Gln	
				20					25					30			
55	Leu	Asn	Arg	Val	Thr	His	Thr	Val	Gly	Gly	Pro	Leu	Thr	Gly	Pro	Pro	
			35					40					45				

ES 2 665 420 T3

Leu Ser Ala Arg Ala Leu Gly Met Leu His Leu Ala Ile His Asp Ala
 50 55 60
 5
 Tyr Phe Ser Ile Tyr Pro Ser Ala Asp Phe Ser Thr Phe Leu Ser Pro
 65 70 75 80
 10 Asp Ala Glu Asn Ala Ala Tyr Arg Leu Pro Ser Pro Asn Gly Ala Asp
 85 90 95
 15 Asp Ala Arg Gln Ala Val Ala Gly Ala Ser Leu Lys Met Leu Ser Ser
 100 105 110
 20 Leu Tyr Met Arg Pro Glu Ala Pro Ser Pro Asn Ile Ser Asp Asn Ala
 115 120 125
 Tyr Ala Gln Leu Gln Leu Ile Leu Asp Gln Ser Ala Val Glu Ala Pro
 130 135 140
 25 Gly Gly Val Asp Arg Ala Ser Ala Ser Phe Leu Phe Gly Glu Ala Val
 145 150 155 160
 30 Ala Asp Val Phe Phe Ala Leu Leu Asn Asp Pro Arg Gly Ala Ser Gln
 165 170 175
 35 Glu Gly Tyr His Pro Thr Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Asp Asp Glu Pro
 180 185 190
 40 Thr His Pro Val Val Leu Ile Pro Val Asp Pro Asn Asn Pro Ser Gly
 195 200 205
 Pro Lys Lys Pro Phe Arg Gln Tyr His Ala Pro Phe Tyr Gly Lys Thr
 210 215 220
 45 Thr Lys Arg Phe Ala Thr Gln Thr Glu His Val Leu Ala Asp Pro Pro
 225 230 235 240
 50 Gly Leu Arg Ser Asn Ala Asp Glu Thr Ala Glu Tyr Asp Asp Ser Ile
 245 250 255
 55 Arg Val Ala Ile Ala Met Gly Gly Ala Thr Asp Leu Asn Ser Thr Lys
 260 265 270

ES 2 665 420 T3

Arg Ser Pro Trp Gln Thr Ala Gln Gly Leu Phe Trp Ala Tyr Asp Gly
 275 280 285

5 Ser Asn Leu Val Gly Thr Pro Pro Arg Phe Tyr Asn Gln Ile Val Arg
 290 295 300

10 Arg Ile Ala Val Thr Tyr Lys Lys Glu Glu Asp Leu Ala Asn Ser Glu
 305 310 315 320

15 Val Asn Asn Ala Asp Phe Ala Arg Leu Phe Ala Leu Val Asp Val Ala
 325 330 335

20 Cys Thr Asp Ala Gly Ile Phe Ser Trp Lys Glu Lys Trp Glu Phe Glu
 340 345 350

25 Phe Trp Arg Pro Leu Ser Gly Val Arg Asp Asp Gly Arg Pro Asp His
 355 360 365

30 Gly Asp Pro Phe Trp Leu Thr Leu Gly Ala Pro Ala Thr Asn Thr Asn
 370 375 380

35 Asp Ile Pro Phe Lys Pro Pro Phe Pro Ala Tyr Pro Ser Gly His Ala
 385 390 395 400

40 Thr Phe Gly Gly Ala Val Phe Gln Met Val Arg Arg Tyr Tyr Asn Gly
 405 410 415

45 Arg Val Gly Thr Trp Lys Asp Asn Glu Pro Asp Asn Ile Ala Ile Asp
 420 425 430

50 Met Val Ile Ser Glu Glu Leu Asn Gly Leu Ser Arg Asp Leu Arg Gln
 435 440 445

55 Pro Tyr Asp Pro Thr Ala Pro Ile Gln Asp Gln Pro Gly Ile Val Arg
 450 455 460

60 Thr Arg Ile Val Arg His Phe Ser Ser Ala Trp Glu Met Met Phe Glu
 465 470 475 480

65 Asn Ala Ile Ser Arg Ile Phe Leu Gly Val His Trp Arg Phe Asp Ala
 485 490 495

70 Ala Ala Ala Arg Asp Ile Leu Ile Pro Thr Thr Thr Lys Asp Val Tyr

ES 2 665 420 T3

500 505 510

5 Ala Val Asp Ala Asn Gly Ala Thr Val Phe Gln Asn Val Glu Asp Val
515 520 525

10 Arg Tyr Glu Thr Lys Gly Thr Arg Glu Gly Cys Glu Gly Leu Tyr Pro
530 535 540

15 Ile Gly Gly Val Pro Leu Gly Ile Glu Ile Ala Asn Glu Ile Phe Glu
545 550 555 560

20 Ser Gly Leu Arg Pro Thr Pro Pro Glu Arg Gln Pro Met Pro Gln Asp
565 570 575

25 Thr Pro Glu Gln Lys Gly Val Lys Gly Met Trp Glu Glu Glu Gln Ala
580 585 590

30 Pro Leu Val Arg Glu Ala Pro
595

<210> 8
<211> 614
<212> PRT
<213> Geniculosporium sp.

<400> 8

35 Met Ala Thr Phe Thr Pro Ile Pro Leu Pro Gln Ile Asp Glu Pro Ala
1 5 10 15

40 Glu Tyr Asn Thr Asn Tyr Val Leu Tyr Trp His His Val Gly Leu Glu
20 25 30

45 Leu Asn Arg Val Thr His Thr Val Gly Gly Pro Gln Thr Gly Pro Pro
35 40 45

50 Ile Ser Ala Arg Ala Leu Gly Met Leu Gln Leu Ala Val His Asp Ala
50 55 60

55 Tyr Phe Ala Ile His Pro Ser Ser Ser Phe Leu Thr Phe Leu Thr Ser
65 70 75 80

60 Gly Ala Asp Asn Pro Ala Tyr Ala Leu Pro Glu Leu Ser Gly Ala Asp
85 90 95

ES 2 665 420 T3

Asp Ala Arg Gln Ala Val Ala Gly Ala Ser Val Thr Met Leu Ser Met
 100 105 110
 5
 Leu Tyr Met Lys Pro Pro Thr Asn Pro Asn Pro Asn Pro Gly Ala Thr
 115 120 125
 10
 Ile Ser Asp Asn Ala Tyr Ala Gln Leu Gln Tyr Val Ile Asp Lys Ser
 130 135 140
 15
 Val Thr Asp Ala Pro Gly Gly Val Asp Ala Ala Ser Ser Ser Phe Asn
 145 150 155 160
 20
 Phe Gly Lys Ala Val Ala Thr Val Phe Phe Asn Leu Leu Phe His Ala
 165 170 175
 25
 Pro Gly Ala Ser Gln Ala Gly Tyr His Pro Thr Pro Gly Pro Tyr Lys
 180 185 190
 30
 Phe Asp Asp Glu Pro Thr His Pro Val Val Leu Val Pro Val Asp Ala
 195 200 205
 35
 Asn Asn Pro Asp Gly Pro Lys Arg Pro Phe Arg Gln Tyr His Gly Pro
 210 215 220
 40
 Phe Tyr Gly Lys Thr Ala Lys Arg Phe Ala Thr Gln Thr Glu His Met
 225 230 235 240
 45
 Ile Ala Asp Pro Pro Ala Ile Arg Ser Ala Val Gly Glu Gln Ala Glu
 245 250 255
 50
 Tyr Asp Asp Ser Ile Arg Gln Ile Ile Ala Met Gly Gly Ala Thr Gly
 260 265 270
 55
 Leu Asn Ser Thr Lys Arg Ser Pro Phe Gln Thr Thr Gln Gly Met Phe
 275 280 285
 60
 Trp Ala Tyr Asp Gly Ser Asn Leu Val Gly Thr Pro Pro Arg Phe Tyr
 290 295 300
 65
 Asn Gln Ile Val Arg Arg Ile Ala Val Thr Tyr Lys Lys Glu Glu Asp
 305 310 315 320

ES 2 665 420 T3

Leu Thr Asn Ser Glu Val Asn Asn Ala Asp Phe Val Arg Leu Leu Ala
 325 330 335
 5 Leu Val Asn Val Ala Cys Ala Asp Ala Gly Ile Phe Ser Trp Lys Glu
 340 345 350
 10 Lys Trp Glu Phe Glu Phe Trp Arg Pro Leu Ser Gly Val Arg Asp Asp
 355 360 365
 15 Asn Phe Arg Asp Pro Asn Arg Pro Asp Arg Gly Asp Pro Phe Trp Leu
 370 375 380
 Thr Leu Gly Ala Pro Ala Thr Asn Thr Asn Asp Ile Pro Phe Lys Pro
 385 390 395 400
 20 Pro Phe Pro Ala Tyr Pro Ser Gly His Ala Thr Phe Gly Gly Ala Val
 405 410 415
 25 Phe Gln Met Val Arg Arg Tyr Tyr Asn Gly Arg Val Gly Asn Trp Lys
 420 425 430
 30 Asp Asp Glu Val Asp Asn Ile Ala Ile Asp Met Met Val Ser Glu Glu
 435 440 445
 35 Leu Asn Gly Leu Ser Arg Asp Leu Arg Gln Pro Tyr Asp Pro Lys Ala
 450 455 460
 40 Pro Ile Thr Asp Gln Pro Gly Ile Val Arg Thr Arg Val Pro Arg His
 465 470 475 480
 Phe Ser Ser Val Trp Glu Met Met Phe Glu Asn Ala Ile Ser Arg Ile
 485 490 495
 45 Phe Leu Gly Val His Trp Arg Phe Asp Ala Ala Ala Ala Lys Asp Ile
 500 505 510
 50 Leu Ile Pro Thr Thr Thr Lys Asp Val Tyr Ala Val Asp Asn Asn Gly
 515 520 525
 55 Ala Ser Leu Phe Gln Asn Val Glu Asp Ile Arg Tyr Thr Thr Met Gly
 530 535 540
 Thr Arg Glu Gly His Asp Gly Leu Leu Pro Ile Gly Gly Val Pro Leu

ES 2 665 420 T3

	545				550					555					560	
5	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala	Asn	Glu	Ile	Phe	Asp	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro	Thr
					565					570					575	
10	Pro	Pro	Glu	Lys	Gln	Pro	Val	Pro	Pro	Pro	Pro	Phe	Asn	Gln	Ser	Gly
				580					585					590		
15	Pro	Thr	Lys	Glu	Met	Leu	Glu	Glu	Ala	Gly	Ser	Glu	Glu	Gln	Val	Pro
			595					600					605			
	Met	Met	Asp	Val	Ala	Pro										
		610														

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el tratamiento de pienso para animales que comprende la mezcla del pienso para animales con una o más lactosa oxidasas y una o más haloperoxidasas de vanadio.
2. Método, según la reivindicación 1, donde la haloperoxidasa de vanadio y la lactosa oxidasa son estables en las vías gástricas.
- 10 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la concentración de lactosa oxidasa está en el rango de 0.01-200 ppm de proteína enzimática por kg de pienso.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la concentración de haloperoxidasa de vanadio está en el rango de 0.01-200 ppm de proteína enzimática por kg de pienso.
- 15 5. Composición que comprende una lactosa oxidasa y una haloperoxidasa de vanadio para usar en el control del crecimiento de microorganismos patogénicos en un animal.
6. Composición para uso según la reivindicación 5, donde el control del crecimiento de microorganismos patogénicos se produce en el intestino del animal.
- 20 7. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, donde el microorganismo patogénico es un tipo de bacteria, tal como del género *Salmonella*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Listeria* o *Clostridium*.
- 25 8. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la haloperoxidasa de vanadio y la lactosa oxidasa son estables en las vías gástricas.
9. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde la composición antimicrobiana es un componente de pienso para animales.
- 30 10. Composición antimicrobiana que comprende una o más lactosa oxidasas y una o más haloperoxidasas de vanadio.
- 35 11. Composición según la reivindicación 10, donde la haloperoxidasa de vanadio y la lactosa oxidasa son estables en las vías gástricas.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde la composición comprende además uno o más compuestos adicionales seleccionados de la lista que consiste en forraje, concentrados, vitaminas, minerales, aminoácidos, enzimas y otros constituyentes de pienso.
- 40 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, donde la composición controla el crecimiento de microorganismos patogénicos en un animal.
- 45 14. Método para la preparación de una composición de pienso para animales, que comprende la mezcla de una lactosa oxidasa, una haloperoxidasa de vanadio y uno o más constituyentes de pienso para animales seleccionados de la lista que consta de forraje, concentrados, vitaminas, minerales, aminoácidos y enzimas de pienso para animales.

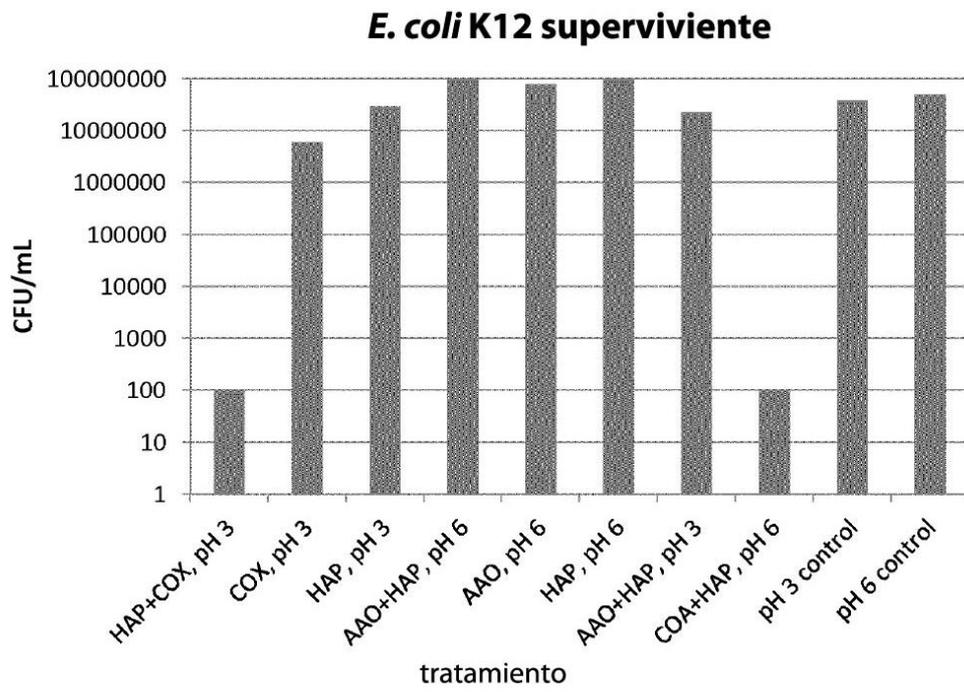


FIGURA 1