

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 204**

51 Int. Cl.:

C12N 9/14 (2006.01)

A23K 10/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2014** E 19152573 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020** EP 3495477

54 Título: **Procedimiento para la disociación hidrolítica de zearalenona y/o derivados de zearalenona mediante un polipéptido, así como el uso**

30 Prioridad:

28.08.2013 AT 6672013

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

16.07.2021

73 Titular/es:

**ERBER AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
Erber Campus 1
3131 Getzersdorf bei Traismauer, AT**

72 Inventor/es:

**FRUHAUF, SEBASTIAN;
THAMHESL, MICHAELA;
PFEFFER, MARTIN;
MOLL, DIETER;
SCHATZMAYR, GERD y
BINDER, EVA MARIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 843 204 T3

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

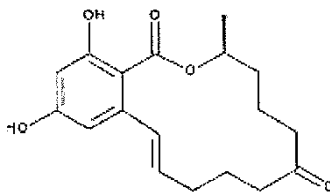
DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la disociación hidrolítica de zearalenona y/o derivados de zearalenona mediante un polipéptido, así como el uso

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la disociación hidrolítica de zearalenona y/o de al menos un derivado de zearalenona con un polipéptido, así como un aditivo que contiene un polipéptido de ese tipo y también a un uso de un polipéptido de ese tipo.

10 Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos. Un representante importante de las mismas es la zearalenona (ZEN), difundida por todo el mundo, anteriormente conocida como toxina F-2, que es producida por una pluralidad de hongos del género *Fusarium*. Estos hongos infectan, entre otros, plantas de cultivo tales como distintos tipos de cereales, manifestándose la micosis del hongo por norma general antes de la cosecha, en donde el crecimiento del hongo o bien la producción de micotoxinas puede tener lugar antes y/o, en el caso de un almacenamiento no apropiado, también después de la cosecha. La FAO estima que el 25% de los productos agrícolas en todo el mundo están contaminados con micotoxinas, lo que provoca pérdidas económicas considerables. En un estudio global realizado recientemente, se analizaron un total de 23.781 muestras entre enero de 2009 y diciembre de 2011, con un 81% de pruebas positivas para al menos una micotoxina y un 45% positivas para ZEN. ZEN se puede encontrar en todas las regiones del mundo, así como en todas las clases de cereales y alimentos para animales analizados, como maíz, harina de soja, trigo, salvado de trigo, DDGS (granos secos de destilería con solubles) y en mezclas de alimentos para animales ya preparados con una frecuencia de hasta el 100%.

20 ZEN es una lactona macrocíclica, estrogénica, no esteroidea, sintetizada a través de la vía metabólica de los policétidos, con la fórmula estructural:



y el nombre de la nomenclatura IUPAC (2E,11S)-15,17-dihidroxi-11-metil-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(18),2,14,16-tetraeno-7,13-diona.

25 Sin embargo, también se encuentran en la naturaleza una gran cantidad de derivados de ZEN, que están formados por modificaciones enzimáticas o químicas de ZEN. Ejemplos de los mismos son conjugados de ZEN glucosídicos o que contienen sulfato, que se forman en hongos, plantas o el metabolismo de mamíferos, así como metabolitos de ZEN, que se forman en el organismo humano o animal, entre otros. A continuación, por derivados de ZEN se entienden conjugados de ZEN o metabolitos de ZEN que se presentan en la naturaleza o están preparados mediante síntesis química o bioquímica, pero en especial α -zearalenol (α -ZEL; (2E,7R,11S)-7,15,17-trihidroxi-11-metil-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(18),2,14,16-tetraeno-13-ona), β -zearalenol (β -ZEL; (2E,7S,11S)-7,15,17-trihidroxi-11-metil-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(18),2,14,16-tetraeno-13-ona), α -zearalanol (α -ZAL; (7R,11S)-7,15,17-trihidroxi-11-metil-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(18),14,16-trieno-13-ona), β -zearalanol (β -ZAL; (7S,11S)-7,15,17-trihidroxi-11-metil-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(14),15,17-trieno-13-ona), zearalenon-14-sulfato (Z14S; [(2E,11S)-15-hidroxi-11-metil-7,13-dioxo-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(18),2,14,16-tetraeno-17-il]hidrogenosulfato), zearalenon-14-glucósido (Z14G; (2E,11S)-15-hidroxi-11-metil-17-[(3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxi-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(18),2,14,16-tetraeno-7,13-diona), así como zearalanona (ZAN; (11S)-15,17-dihidroxi-11-metil-12-oxa-bicyclo[12.4.0]octadeca-1(18),14,16-trieno-7,13-diona).

40 ZEN, así como los derivados de ZEN, especialmente α -ZEL, β -ZEL, Z14S, α -ZAL, β -ZAL, Z14G y ZAN, pueden detectarse también, en virtud de su elevada estabilidad química y física, en alimentos o alimentos para animales procesados, tales como, p. ej., pan o cerveza.

45 ZEN se une al receptor de estrógenos y puede causar alteraciones hormonales, por lo que es absorbida inmediatamente después de la ingestión y se transforma en los mamíferos en los dos metabolitos estereoisoméricos α -ZEL y β -ZEL. En este caso, p. ej., α -ZEL, pero también α -ZAL o ZAN, tienen un efecto estrogénico mucho más fuerte que ZEN. Los derivados de ZEN conjugados a veces tienen una estrogénicidad menor que ZEN, pero a partir de estos derivados de ZEN se puede liberar de nuevo ZEN en el tracto digestivo.

50 Aunque ZEN tiene una toxicidad aguda relativamente baja y un valor de DL50 oral de hasta 20.000 mg/kg de peso corporal, en caso de una ingesta prolongada pueden aparecer efectos tóxicos subagudos y/o subcrónicos, como por ejemplo, efectos teratogénicos, carcinógenos, estrogénicos e inmunosupresores en animales o seres humanos. Los alimentos para animales contaminados con ZEN provocan trastornos del desarrollo en mamíferos, siendo los cerdos y, especialmente los animales jóvenes, extremadamente sensibles a ZEN. Concentraciones de ZEN en alimento para animales superiores a 0,5 ppm conducen a trastornos del desarrollo, p. ej., concentraciones superiores a 1,5 ppm pueden provocar hiperestrogenicidad en los cerdos y concentraciones de 12 ppm de ZEN se han hecho responsables

de abortos en el ganado vacuno. Dado que la zearalenona se absorbe rápidamente a través de las membranas mucosas, en particular a través de la mucosa gástrica pero también la oral, es necesaria una desactivación inmediata y, sobre todo, cuantitativa. Tan solo 30 minutos después de la administración oral de ZEN, ésta ya se puede detectar en la sangre. En este caso, el uso de enzimas aisladas tiene ventajas sobre los microorganismos, como una mayor actividad específica o un efecto más rápido. Debido a los efectos nocivos de ZEN, en la Unión Europea existen límites superiores de ZEN, que son vinculantes para los alimentos, así como recomendaciones para límites superiores de ZEN en los alimentos para animales (EC NO: 1881/2006).

La estrategia principal para reducir la contaminación de los alimentos o piensos con ZEN, es restringir el crecimiento de los hongos, por ejemplo, cumpliendo las "buenas prácticas agrícolas". Esto incluye, entre otras cosas, que las semillas estén exentas de agentes patógenos e infecciones con hongos, o que los productos de desecho agrícolas se eliminen a tiempo de los campos. Además, a través del uso de fungicidas se puede reducir el crecimiento de los hongos en el campo. Después de la cosecha, el material cosechado se debe almacenar con una humedad residual inferior al 15% y una temperatura baja para evitar el crecimiento de los hongos. Cualquier material contaminado por hongos también se debe eliminar antes de continuar con el tratamiento posterior. A pesar de esta lista de medidas, I. Rodrigues y K. Naehrer (2012) informaron que incluso en regiones con los más altos estándares agrícolas, como Estados Unidos y Europa Central, en los años 2009 a 2011 el 29% o el 39%, respectivamente, de las muestras de maíz analizadas estaban contaminadas con ZEN.

Otras opciones para eliminar ZEN de los piensos o los alimentos son la adsorción o la transformación de la micotoxina. Para ello, es necesario que la unión de la micotoxina al adsorbente sea fuerte y específica en un intervalo amplio de pH y se conserve estable en la zona gastrointestinal durante todo el proceso digestivo. Aunque algunos agentes de adsorción no biológicos, p. ej., el carbón activado, los silicatos o los polímeros sintéticos, como la colestiramina, se pueden utilizar eficazmente para las aflatoxinas; su uso para otras micotoxinas está limitado. La principal desventaja de los agentes de adsorción es la unión inespecífica de otras moléculas, algunas de las cuales son esenciales para la alimentación. Los agentes de adsorción biológicos, p. ej., extractos de levadura o levadura también se describen en las publicaciones, pero tienen una limitación similar a la de los agentes de adsorción no biológicos.

La eliminación de la toxicidad de ZEN mediante tratamientos físicos y químicos también está limitada. Mediante un tratamiento térmico, ZEN no puede ser desactivada de manera efectiva, no obstante, el contenido en ZEN se puede reducir en un 83,9% mediante extrusión y tratamiento con agentes oxidantes, p. ej., durante 16 h a 80°C con una solución de peróxido de hidrógeno al 10%. El empleo de procedimientos de extrusión y agentes oxidantes, tales como ozono o peróxido de hidrógeno, en la preparación de piensos y alimentos está limitado en virtud de los elevados costes, la pérdida de calidad, la eficiencia parcialmente baja y la escasa especificidad.

También la biotransformación de ZEN mediante microorganismos tales como, p. ej., cepas de *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Gliocladium roseum* o *Bacillus subtilis* o enzimas aisladas a partir de las mismas, tales como hidrolasas o peroxidases, se ha descrito, p. ej., en E. Vekiru et al., en Appl. and Environ. Microb. 2010, 76, 7, 2353-2359.

A partir del documento EP 0 938 575 B1 se han dado a conocer propiedades para la degradación de ZEN que poseen bacterias del género *Rhodococcus* y *Nocardia*, especialmente *R. globerulus*, *R. erythropolis* y *N. globerula*.

A partir del documento WO 02/076205 se puede deducir el efecto de degradación de ZEN a partir de enzimas aisladas a partir de *Gliocladium roseum*, entre otras la hidrolasa α/β , la zearalenona hidrolasa 1 (ZHD1), que catalizan la degradación de ZEN mediante una tríada catalítica.

A partir del documento WO 2012/113827 se extraen zonasas recombinantes, es decir, enzimas degradantes de ZEN, que permanecen estables en el tracto gastrointestinal, en particular se describen microorganismos tales como *Thermobifidia fusca*, *Streptomyces exfoliatus*, *Acidovorans delafieldii* y *Streptomyces sp.*

A partir de la base de datos UniProt del 16 de noviembre de 2011, "SubName: Full=Alpha/beta hydrolase fold containing protein {ECO:0000313|EMBL:AEM80235.1}", que se encuentra con el número de orden de EBI. UNIPROT:G2P9U4, se puede deducir una secuencia proteica de una hidrolasa α/β , pero sobre la que no se da ninguna información sobre sus posibles usos o propiedades.

Los polipéptidos o enzimas que son capaces de hidrolizar ZEN y/o al menos un derivado de ZEN, también se pueden denominar zonasas.

Los términos y expresiones utilizados a continuación se han tomado de la terminología técnica y se utilizan con los significados convencionales, a menos que se indique lo contrario. Por tanto, el término "polinucleótido" se refiere a cualquier tipo de material genético de cualquier longitud y secuencia, como p. ej., moléculas de ADN y ARN monocatenario y bicatenario, incluyendo elementos reguladores, elementos estructurales, grupos de genes, plásmidos, genomas completos y fragmentos de los mismos. El término "polipéptido" incluye proteínas, como por ejemplo, enzimas, anticuerpos así como polipéptidos con hasta 500 aminoácidos, como por ejemplo, inhibidores de péptidos, dominios de proteínas, pero también polipéptidos cortos con longitudes de secuencia cortas, por ejemplo, menos de 10 aminoácidos, tales como receptores, ligandos, hormonas peptídicas, marcadores y similares. El término "posición" en un polinucleótido o un polipéptido se refiere a una base o un aminoácido único y específico en la secuencia del polinucleótido o del polipéptido.

La presente invención tiene como objeto proporcionar un procedimiento con el que sea posible una disociación hidrolítica rápida y fiable de ZEN y/o de al menos un derivado de ZEN.

5 Para resolver esta tarea, la presente invención se caracteriza esencialmente porque la zearalenona y/o al menos un derivado de la zearalenona se hidroliza a través del polipéptido que es una hidrolasa con una secuencia de aminoácidos de la secuencia ID nº 13, o una variante funcional de la misma, en donde una identidad de secuencia entre la variante funcional y la secuencia de aminoácidos, es de al menos el 70%.

10 La expresión "identidad de secuencia" de acuerdo con la presente invención, se refiere a un porcentaje de identidad de secuencia. Para las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos, la identidad de secuencia se puede determinar visualmente, pero preferiblemente se calcula con un programa informático. La comparación de secuencias también se lleva a cabo dentro de segmentos de una secuencia, entendiéndose que un segmento es una secuencia continua de la secuencia de referencia y que preferiblemente comprende una región conservada de la secuencia.

15 En el presente caso, la identidad de secuencia se determinó con la ayuda del programa NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), en particular con BLASTP para polipéptidos y BLASTN para polinucleótidos, que está disponible en la página principal del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este permite comparar dos o más secuencias entre sí según el algoritmo de Altschul et al., 1997 (Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). Para los fines de esta invención, se utilizaron los programas con la versión del 15 de mayo de 2013. Como ajustes del programa se utilizó la configuración básica, pero en particular para la comparación de secuencias de aminoácidos: "secuencia diana máxima" = 100; "umbral esperado" = 10; "tamaño de palabra" = 3; "matriz" = BLOSUM62; "costes por hueco" = "Existencia: 11; Extensión: 1"; "ajuste informático" = "Ajuste de la matriz de puntuación composicional condicional"; así como para la comparación de secuencias de nucleótidos, tamaño de palabra: 11; valor esperado: 10; costes por hueco: Existencia = 5, Extensión = 2; Filtro = baja complejidad activada; puntuaciones de coincidencia/no coincidencia: 2, -3; cadena de filtro: L; m.

25 Las expresiones "variante funcional del polipéptido" o "variante funcional" se refieren, por un lado, a "variantes alélicas" del polipéptido y a "fragmentos funcionales" del polipéptido, y por otro lado a una "modificación" del polipéptido, en donde la función enzimática permanece esencialmente sin alterar. La expresión "variante alélica" se refiere a un polipéptido que ha surgido por una o varias mutaciones de la secuencia de nucleótidos que ocurren de forma aleatoria en la naturaleza y que provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos, sin que ello influya en la función enzimática. Las "modificaciones" pueden ser, por ejemplo, fusiones del extremo C-terminal o N-terminal con polipéptidos o polipéptidos mutados, en donde se pueden obtener mutaciones mediante sustitución, inserción o deleción de al menos un aminoácido, en particular mediante mutagénesis específica del sitio o mutagénesis aleatoria, recombinación y/o cualquier otro método de modificación genética de proteínas. Los términos sustitución, inserción y deleción se utilizan en el sentido habitual en la tecnología genética y con los que está familiarizado el experto en la materia. La expresión "fragmento funcional" se refiere a una parte o una secuencia parcial de un polipéptido o una parte o una secuencia parcial de una variante funcional del mismo, en donde se conserva esencialmente la función enzimática. Una función enzimática se conserva esencialmente cuando el mecanismo de reacción enzimática permanece sin cambios, es decir, la micotoxina se hidroliza en el mismo lugar y la actividad residual específica "variante funcional" asciende al menos al 5%, preferiblemente al menos al 10%, en particular al menos al 50%, con respecto al polipéptido original.

40 Mediante la elección de una secuencia de aminoácidos de ese tipo, o una variante funcional de la misma, se constató una hidrólisis sorprendentemente rápida y completa de ZEN y/o de al menos un derivado de ZEN.

45 Como corresponde a un desarrollo adicional preferido de la invención, la disociación hidrolítica se lleva a cabo con un polipéptido que contiene al menos un segmento de la secuencia de aminoácidos conservada o una variante funcional de la misma, en donde la variante funcional del segmento de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos un 70%, preferiblemente al menos un 84%, más preferiblemente al menos un 92% y lo más preferiblemente al menos un 98% y al menos un segmento de secuencia de aminoácidos conservada se selecciona a partir del grupo de secuencias de aminoácidos +89 a +145, +223 a +228, +257 a +261, +263 a +270, de la secuencia con la secuencia ID nº 1. A través de la presencia de al menos uno de tales segmentos de secuencia de aminoácidos conservada, es posible proporcionar un polipéptido que, además de la hidrólisis rápida y completa de ZEN y/o de al menos un derivado de ZEN, también tiene un valor de actividad particularmente elevado, en comparación con los polipéptidos degradadores de ZEN conocidos hasta la fecha.

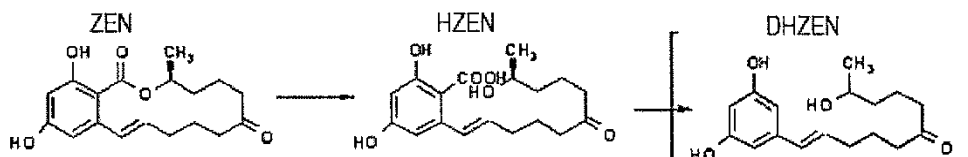
50 Se podrían lograr resultados igualmente buenos si la variante funcional mostrase al menos una modificación de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en una sustitución, deleción e inserción de uno o varios aminoácidos.

55 Dado que el polipéptido muestra una actividad específica de al menos 0,01 U/mg, preferiblemente al menos 0,1 U/mg, en particular al menos 1 U/mg; y/o un valor K_M de disociación hidrolítica de ZEN de como máximo 50 μM , preferiblemente como máximo 3,5 μM , en particular como máximo 0,5 μM ; y/o posee un valor K_{cat} de disociación hidrolítica de ZEN de al menos 0,05 s^{-1} , preferiblemente al menos 0,6 s^{-1} , en particular al menos 5 s^{-1} y/o posee un valor $V_{m\acute{a}x}$ de disociación hidrolítica de ZEN de al menos 0,00001 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, preferiblemente al menos 0,0001 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, en particular al menos 0,001 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, ZEN y/o los derivados de ZEN se pueden hidrolizar, en particular eliminar la

toxicidad, de una manera particularmente rápida y completa.

5 El polipéptido se puede seleccionar de modo que sea una hidrolasa α/β adecuada para una disociación hidrolítica sin necesidad de oxígeno y exenta de cofactores, de la agrupación éster de zearalenona y/o de los derivados de ZEN, que presenta una tríada de aminoácidos que cataliza la disociación hidrolítica que consiste en serina, un aminoácido ácido seleccionado a partir de ácido glutámico y ácido aspártico, en particular ácido aspártico, así como histidina, y que es la tríada catalítica, por ejemplo, S128, D264 y H303, en donde el posicionamiento es con relación a la secuencia ID nº 1.

La hidrólisis de ZEN y de los derivados de ZEN se realiza con éxito con cada uno de los polipéptidos de secuencias ID nº 1 a 15, en el grupo éster de la zearalenona o de sus derivados, de acuerdo con el siguiente mecanismo de reacción:



10 La hidrólisis de ZEN para proporcionar zearalenona hidrolizada no tóxica (HZEN) o a derivados de ZEN hidrolizados, se lleva a cabo a través de los polipéptidos de acuerdo con la invención, en particular las hidrolasas α/β . La descarboxilación adicional de HZEN a ZEN descarboxilada, hidrolizada (DHZEN) o a derivados de ZEN hidrolizados, descarboxilados generalmente tiene lugar de forma espontánea.

15 En particular, es posible hidrolizar completamente ZEN y los derivados de ZEN por medio de la tríada catalítica mencionada anteriormente, en donde la reacción de degradación tiene una buena estabilidad frente al pH, en particular a valores de pH en el intervalo ácido.

20 Además, se ha encontrado que con un polipéptido que contiene en uno de los 3 aminoácidos antes de la serina y 3 aminoácidos después de la serina del segmento de secuencia que consiste en la tríada catalítica mencionada anteriormente, al menos un aminoácido polar seleccionado a partir de Y, Q, N, T, K, R, E, D y al menos un aminoácido no polar seleccionado a partir de F, M, L, I, V, A, G, P, se consiguen buenos resultados constantes y como mínimo también mejorar un parámetro de la cinética enzimática.

25 En un desarrollo adicional preferido de la invención, el procedimiento se lleva a cabo con un polipéptido que tiene al menos una mutación de la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia ID nº 1, en al menos una de las siguientes posiciones 22, 23, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 35, 37, 42, 43, 46, 51, 53, 54, 57, 60, 69, 72, 73, 78, 80, 84, 88, 95, 97, 99, 114, 118, 119, 123, 132, 141, 146, 148, 149, 154, 163, 164, 165, 169, 170, 172, 176, 180, 182, 183, 190, 191, 194, 196, 197, 198, 201, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 212, 213, 214, 216, 217, 220, 221, 222, 229, 231, 233, 238, 240, 244, 245, 246, 248, 249, 251, 254, 256, 260, 262, 263, 266, 269, 271, 277, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 292, 296, 298, 302, 307, 308, 309, 311, 314, 317, 319, 321, 323, 325 y 326.

30 De acuerdo con un desarrollo adicional de la invención, el procedimiento se lleva a cabo con un polipéptido que tiene al menos una mutación seleccionada a partir del grupo: D22A, S23Q, S23L, N25D, I26V, F27Y, F27H, S29P, R31A, F32Y, R35K, R35Q, V37A, V42I, V43T, F46Y, S51E, S51D, D53G, N54M, N54R, L57V, L60I, S69G, P72E, V73A, A78S, N80H, F84Y, I88L, T95S, T97A, R99K, I114M, I118V, K119R, V123I, L132V, A141S, I146V, I146L, A148G, A149V, A154P, P163T, A164T, Y165C, Y165H, V169I, L170R, A172G, A176M, A176V, Y180F, D182T, F183Y, I190V, G191S, K194T, K194E, F196Y, V197C, V197R, E198R, E198S, K201D, K201G, P204S, P204A, A205S, K206P, A207M, M208A, Q209R, L210A, L210S, Δ P212, T213V, P214A, E216T, E216G, A217I, N220H, L221M, K222R, K222Q, G229A, A231V, F233W, F233Y, F233H, A238G, H240N, H240S, D244E, R245Q, M246L, S248T, S248N, S248G, Q249R, K251N, I254V, I256L, A260M, T262D, T262G, I263T, E266D, E269H, E269N, L271V, L277E, E280A, E280L, H281R, H281Q, A282V, Q283R, D284L, D284R, I285L, I286M, R287E, R287D, R292K, R292T, Q296A, Q296E, H298V, L302S, L307Q, F308S, D309A, A311P, A314V, L317F, S319Q, S319P, S319R, S321A, S321T, T323A, P325A, A326P en la secuencia de aminoácidos en relación con la secuencia ID nº 1. Con un polipéptido de ese tipo, ZEN se puede hidrolizar completamente, en particular perder la toxicidad, en poco tiempo, en donde la actividad específica del polipéptido es de al menos 6,00 U/mg, preferiblemente de al menos 7,00 U/mg, en particular de al menos 8,00 U/mg. La unidad "U" o también "unidad" es una medida de la actividad catalítica absoluta y se define por la hidrólisis de 1 μ Mol de ZEN por minuto a 32°C en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), en donde: por "actividad catalítica" se entiende la conversión enzimática de un sustrato en condiciones de reacción definidas y por "actividad específica" se entiende la relación entre la actividad catalítica y la concentración en masa de polipéptido (masa por unidad de volumen).

50 Finalmente, el polipéptido puede contener al menos una sustitución de aminoácidos conservadora en al menos una posición, en donde la sustitución de aminoácidos conservadora se selecciona a partir de sustituciones de G a A; o de A a G, S; o de V a I, L, A, T, S; o de I a V, L, M; o de L a I, M, V; o de M a L, I, V; o de P a A, S, N; o de F a Y, W, H; o de Y a F, W, H; o de W a Y, F, H; o de R a K, E, D; o de K a R, E, D; o de H a Q, N, S; o de D a N, E, K, R, Q; o de E a Q, D, K, R, N; o de S a T, A; o de T a S, V, A; o de C a S, T, A; o de N a D, Q, H, S; o de Q a E, N, H, K, R. En donde la denominación sustitución conservadora de aminoácidos se refiere a la sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos que un experto en la técnica considera conservadora, es decir, que tiene propiedades específicas

similares. Tales propiedades específicas son, por ejemplo, el tamaño, la polaridad, la hidrofobicidad, la carga o el valor pKa del aminoácido. Por mutación conservadora se entiende, por ejemplo, una sustitución de un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido polar por otro aminoácido polar.

- 5 Con tales sustituciones conservadoras de aminoácidos, es posible preparar variantes polipeptídicas funcionales, cuya actividad específica es aproximadamente igual de fuerte que la del polipéptido original, pero preferiblemente aumenta en al menos 0,1 U/mg.

10 Al llevar a cabo el procedimiento de tal manera que el polipéptido se emplea en un aditivo que contiene un adyuvante para la disociación hidrolítica de zearalenona y/o al menos un derivado de zearalenona, para alimentos para animales para cerdos, aves de corral y acuicultura, en alimentos o granos secos de destilería con solubles, tiene lugar la conversión bioquímica de ZEN y/o de al menos un derivado de ZEN a ZEN hidrolizada y/o a un derivado de ZEN hidrolizado. El procedimiento también se puede usar, por ejemplo, para la hidrólisis estereoselectiva de ZEN y/o de derivados de ZEN en procesos industriales.

15 En un desarrollo adicional preferido de la invención, el procedimiento se desarrolla de tal manera que los aditivos se seleccionan al menos a partir de un vehículo inerte así como, dado el caso, de otros componentes como vitaminas y/o minerales y/o enzimas y/u otros componentes para eliminar la toxicidad de las micotoxinas. De esta forma se puede garantizar, por ejemplo, en piensos o alimentos, que las cantidades posiblemente contenidas de ZEN y/o derivados de ZEN se hidrolizan con seguridad, en particular dejan de ser tóxicas, hasta tal punto que no existe ningún efecto nocivo sobre el organismo del sujeto que ingiere ese pienso o alimento.

20 Para ello, también puede estar presente un polipéptido en una preparación enzimática que, además de contener al menos un polipéptido, también contiene al menos una enzima que está implicada, por ejemplo, en la degradación de proteínas, como por ejemplo, proteasas, o que está implicada en el metabolismo del almidón o de fibra o grasa o glucógeno, como por ejemplo, una amilasa, celulasa o glucanasa, así como, por ejemplo, hidrolasas, enzimas lipolíticas, manosidasas, oxidasas, oxidorreductasas, fitasas, xilanasas y/o combinaciones de las mismas.

25 Otras áreas de aplicación son preparaciones enzimáticas que, además de al menos un polipéptido, también contienen al menos un componente para eliminar la toxicidad de las micotoxinas, tal como una enzima que degrada micotoxinas, como por ejemplo, alfatoxina oxidasa, ergotamina hidrolasas, ergotamina amidasas, zearalenona esterases, zearalenona lactonasas, ocratoxina amidasas, fumonisina carboxilesterasas, fumonisina aminotransferasas, aminopoliol aminoxidasas, desoxinivalenol epóxido hidrolasas; y/o al menos un microorganismo que degrada micotoxinas, como *Bacillus subtilis*; y/o que contienen al menos un componente que se une a las micotoxinas, por ejemplo, paredes celulares de microbios o materiales inorgánicos como bentonitas.

30 De acuerdo con un desarrollo adicional particularmente preferido de la invención, el procedimiento se lleva a cabo de tal manera que se emplea al menos un polipéptido en el aditivo en una concentración de como máximo 10.000 U/g, preferiblemente como máximo 1.000 U/g, más preferiblemente como máximo 100 U/g y lo más preferiblemente como máximo 10 U/g, con lo que es posible convertir rápidamente ZEN y/o derivados de ZEN en metabolitos no tóxicos o menos tóxicos, en particular HZEN y DHZEN, antes de su resorción en el organismo de un sujeto consumidor de pienso o alimentos contaminados, en particular un mamífero.

35 De acuerdo con un desarrollo adicional de la invención, el aditivo está en forma encapsulada o recubierta, pudiéndose recurrir para la encapsulación o el recubrimiento a métodos convencionales, como se describen por ejemplo, en el documento WO 92/12645. Mediante la encapsulación o el recubrimiento se puede transportar el polipéptido a su lugar de uso sin cambios, en particular sin una degradación ni deterioro, de modo que el polipéptido solo comienza a actuar después de que la cubierta protectora se ha disuelto, por ejemplo, en el tracto digestivo de los animales, con lo cual se puede conseguir una degradación todavía más dirigida, rápida y completa de ZEN y/o de los derivados de ZEN, también en un medio ácido, rico en proteasas y anaerobio. Además, mediante la encapsulación o el recubrimiento se consigue aumentar la estabilidad térmica de los polipéptidos en el aditivo.

40 De acuerdo con un desarrollo adicional preferido, el procedimiento se lleva a cabo de tal manera que el polipéptido o el aditivo se mezcla con un alimento o pienso contaminado con zearalenona y/o con al menos un derivado de zearalenona, de manera que el alimento o el pienso contaminado entra en contacto con humedad, y el polipéptido o el aditivo hidroliza la zearalenona y/o al menos un derivado de zearalenona contenidos en el pienso o el alimento contaminado. En el caso de piensos o alimentos húmedos, tales como caldos fermentados o papillas, la hidrólisis de la zearalenona y/o del al menos un derivado de zearalenona tiene lugar antes de la ingestión oral del pienso o el alimento húmedo. Con este procedimiento se asegura que se eliminan en gran medida los efectos nocivos de la zearalenona y de los derivados de la zearalenona sobre los seres humanos y los animales. En este contexto, se entiende que humedad significa la presencia de agua o de líquidos con contenido en agua, estando incluidos entre ellos también, p. ej., la saliva u otros líquidos presentes en el tracto digestivo. Como tracto digestivo se define la cavidad bucal, la faringe (garganta), el esófago y el tracto gastrointestinal o equivalentes de los mismos, pudiéndose presentar diferentes denominaciones en el caso de animales o bien pudiendo no estar presentes componentes individuales en el tracto digestivo de animales.

El procedimiento inventivo también se puede llevar a cabo de tal manera que el pienso o el alimento se granula antes de la ingestión oral.

De acuerdo con un desarrollo adicional de la invención, el procedimiento se lleva a cabo de tal manera que se hidroliza al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, en particular al menos el 90% de la zearalenona y/o al menos un derivado de zearalenona. De este modo se pueden evitar efectos tóxicos subagudos y/o subcrónicos, tales como efectos teratogénicos, carcinógenos, estrogénicos e inmunosupresores en animales o seres humanos.

La presente invención tiene como objeto además el uso de un aditivo que contiene al menos un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de la secuencia ID nº 13 o una variante funcional de las mismas, en donde una identidad de secuencia entre la variante funcional y la secuencia de aminoácidos es de al menos el 70%, para la disociación hidrolítica de zearalenona y/o al menos un derivado de zearalenona en piensos, en particular para cerdos, aves y acuicultura, en alimentos o en granos secos de destilería con solubles. Mediante el uso del aditivo de acuerdo con la invención, se consigue hidrolizar o eliminar la toxicidad de ZEN y/o de los derivados de ZEN contenidos en el alimento o pienso o en granos secos de destilería con solubles, en donde se produce una pérdida de toxicidad de este tipo ya con concentraciones de polipéptido de aproximadamente 1 U/g de pienso o alimento contaminado.

La invención se explica a continuación con mayor detalle con ayuda de ejemplos de realización, así como dibujos. En estos, se muestra:

Fig. 1, que no forma parte de la invención, la degradación a lo largo del tiempo de ZEN y el aumento de los metabolitos HZEN y DHZEN a través del polipéptido con la secuencia ID nº 1, en donde en la Fig. 1A el polipéptido no está marcado, en la Fig. 1B el polipéptido tiene un marcador 6xHis C-terminal y en la Fig. 1C un marcador 6xHis N-terminal,

Fig. 2, que no forma parte de la invención, la cinética de Michaelis-Menten del polipéptido con la secuencia ID nº 1.

Ejemplo 1: Modificación, clonación y expresión de polinucleótidos que codifican polipéptidos que pueden disociar hidrolíticamente ZEN y/o al menos un derivado de ZEN.

Las sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos se llevaron a cabo mediante una mutación de las secuencias de nucleótidos con una PCR, utilizando el "kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick-change" (Stratagene) siguiendo las instrucciones. Alternativamente, se obtuvieron también secuencias de nucleótidos completas (GeneArt). Las secuencias de nucleótidos generadas mediante mutagénesis con PCR u obtenidas en GeneArt contenían además opcionalmente un marcador 6xHis C-terminal o N-terminal a nivel de aminoácidos y se integraron mediante métodos convencionales en vectores de expresión para una expresión en *E. coli* o *P. pastoris*, se transformaron en *E. coli* o *P. pastoris* y se expresaron en *E. coli* o *P. pastoris* (J.M. Cregg, Pichia Protocols, segunda edición, ISBN-10: 1588294293, 2007; J. Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4ª edición, Cold Spring Harbor), en donde para este estudio también se podía recurrir a cualquier otra célula hospedadora adecuada.

La expresión "vector de expresión" se refiere a una estructura artificial de ADN que es capaz de expresar un gen *in vivo* o *in vitro*. En particular, bajo esa denominación se entienden estructuras artificiales de ADN que son adecuadas para transferir la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido a la célula hospedadora, con el fin de integrarla allí en el genoma o dejarla libre en el espacio extracromosómico y expresar la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de forma intracelular y, si es necesario, expulsar el polipéptido desde la célula.

La expresión "célula hospedadora" se refiere a todas las células que contienen o bien una secuencia de nucleótidos que se va a expresar o bien un vector de expresión y son capaces de producir un polipéptido de acuerdo con la invención. En particular, se entienden células procariontas y/o eucariotas, preferentemente *P. pastoris*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Hansenula*, *Trichoderma*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, células vegetales y/o esporas de *Bacillus*, *Trichoderma* o *Aspergillus*.

El lisado celular soluble en el caso de *E. coli* o el material sobrenadante del cultivo en el caso de *P. pastoris*, se utilizaron para determinar las propiedades catalíticas de los polipéptidos. Para determinar el valor K_M , $V_{m\acute{a}x}$, K_{cat} y la actividad específica, los polipéptidos se enriquecieron selectivamente usando métodos convencionales de forma cromatográfica sobre columnas de níquel-sefarosa. La concentración de proteína se determinó usando métodos convencionales, ya fuera con el método BCA (Pierce BCA Protein Assay KitProd nº 23225), pero preferiblemente fotométricamente con los coeficientes de extinción específicos para las respectivas proteínas, que se calcularon con el programa "ProtParam" disponible en línea en <http://web.expasy.org/protparam> (Gasteiger E. et al.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server; (In) John M. Walker (compilador): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 2005, pp. 571-607).

Ejemplo 2: Determinación de la identidad de secuencia así como los segmentos de secuencias de aminoácidos conservados

La determinación del porcentaje de identidad de secuencia a lo largo de toda longitud de los polipéptidos con las secuencias de aminoácidos con las secuencias ID nº 1 a 15 relativamente entre sí (Tabla 1), se llevó a cabo con ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), en particular con BLASTP que está disponible en la página principal del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con ello es posible

comparar dos o más secuencias entre sí según el algoritmo de Altschul et al., 1997 (Nucleic Acids Res. (1997) 25:3389-3402). Como ajustes del programa se recurrió a la configuración básica, pero en particular a “secuencia diana máx” = 100; “umbral esperado” = 10; “tamaño de la palabra” = 3; “matriz” = BLOSUM62; “costes por hueco” = “Existencia: 11; Extensión: 1”; “ajuste computacional” = “ajuste de la matriz de puntuación composicional condicional”.

- 5 Para determinar los segmentos de secuencias de aminoácidos conservados, se determinaron los polipéptidos con las secuencias ID nº 1 a 6, que tenían una identidad de secuencia de al menos un 70% entre sí, utilizando el programa informático COBALT (J.S. Papadopoulos y R. Agarwala, 2007, COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences, Bioinformatics 23:1073-79), utilizando los parámetros convencionales, en particular los parámetros (“Penalizaciones por hueco”: -11, -1; “Penalizaciones por hueco terminal”: -5, -1; “Uso de RPS BLAST”: activado; “valor Blast E”: 0,003; “Encontrar columnas conservadas y volver a calcular”: activado, “utilizar búsqueda de agrupaciones”: activado; “tamaño de la palabra”: 4; “distancia de posible agrupación”: 0,8; “Alfabeto”: regular; “Ajuste de la conversación de homologías”: 3 bits). El resultado de este análisis representa los aminoácidos conservados. Como segmentos de secuencias de aminoácidos conservados se definieron las siguientes regiones con al menos 5 aminoácidos conservados consecutivos, a saber, en relación con la secuencia ID nº 1, los segmentos A desde la posición +24 a la posición +50, B desde la posición +52 a la posición +77, C desde la posición +79 a la posición +87, D desde la posición +89 a la posición +145, E desde la posición +150 a la posición +171, F desde la posición +177 a la posición +193, G desde la posición +223 a la posición +228, H desde la posición +230 a la posición +237, I desde la posición +239 a la posición +247, J desde la posición +249 a la posición +255, K desde la posición +257 a la posición +261, L desde la posición +263 a la posición +270, M desde la posición +272 a la posición +279, N desde la posición +297 a la posición +301 y O desde la posición +303 a la posición +313.

Las determinaciones del porcentaje de identidad de secuencia de los polipéptidos entre sí y de los segmentos de secuencias de aminoácidos conservados de los polipéptidos individuales con respecto a los segmentos de secuencia de aminoácidos conservados de la secuencia ID nº 1, se llevaron a cabo a modo de ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2.

25

ES 2 843 204 T3

Tabla 1: Porcentaje de identidad de secuencia de los polipéptidos entre sí

	SEQ ID- Nr 1	SEQ ID- Nr 2	SEQ ID- Nr. 3	SEQ ID- Nr. 4	SEQ ID- Nr. 5	SEQ ID- Nr. 6	SEQ ID- Nr. 7
SEQ ID- Nr. 1	-	70%	71%	71%	71%	71%	64%
SEQ ID- Nr. 2	70%	-	81%	83%	81%	83%	63%
SEQ ID- Nr. 3	71%	81%	-	95%	99%	92%	60%
SEQ ID- Nr. 4	71%	83%	95%	-	95%	95%	60%
SEQ ID- Nr. 5	71%	81%	99%	95%	-	93%	60%
SEQ ID- Nr. 6	71%	83%	92%	95%	93%	-	61%
SEQ ID- Nr. 7	64%	63%	60%	60%	60%	61%	-
SEQ ID- Nr. 8	57%	54%	54%	53%	53%	53%	53%
SEQ ID- Nr. 9	50%	50%	53%	53%	53%	55%	51%
SEQ ID- Nr. 10	55%	52%	55%	54%	55%	53%	52%
SEQ ID- Nr. 11	53%	51%	53%	51%	51%	52%	54%
SEQ ID- Nr. 12	50%	49%	50%	50%	50%	49%	51%
SEQ ID- Nr. 13	55%	49%	51%	51%	51%	52%	54%
SEQ ID- Nr. 14	73%	65%	69%	70%	69%	68%	80%

ES 2 843 204 T3

SEQ ID- Nr. 15	79%	68%	71%	71%	71%	72%	63%
-------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	SEQ ID- Nr. 8	SEQ ID- Nr. 9	SEQ ID- Nr. 10	SEQ ID- Nr. 11	SEQ ID- Nr. 12	SEQ ID- Nr. 13	SEQ ID- Nr. 14	SEQ ID- Nr. 15
SEQ ID- Nr. 1	57%	50%	55%	53%	50%	55%	73%	79%
SEQ ID- Nr. 2	54%	50%	52%	51%	49%	49%	65%	68%
SEQ ID- Nr. 3	54%	53%	55%	53%	50%	51%	69%	71%
SEQ ID- Nr. 4	53%	53%	54%	51%	50%	51%	70%	71%
SEQ ID- Nr. 5	53%	53%	55%	51%	50%	51%	69%	71%
SEQ ID- Nr. 6	53%	55%	53%	52%	49%	52%	68%	72%
SEQ ID- Nr. 7	53%	51%	52%	54%	51%	54%	80%	63%
SEQ ID- Nr. 8	-	50%	49%	51%	49%	48%	83%	51%
SEQ ID- Nr. 9	50%	-	51%	52%	69%	51%	67%	51%
SEQ ID- Nr. 10	49%	51%	-	76%	52%	52%	63%	56%
SEQ ID Nr. 11	41%	50%	76%	-	52%	51%	58%	52%
SEQ ID Nr. 12	49%	52%	52%	52%	-	49%	71%	51%
SEQ ID Nr. 13	48%	51%	52%	51%	49%	-	54%	53%
SEQ ID No. 14	83%	67%	63%	58%	71%	55%	-	72%
SEQ ID	51%	51%	56%	52%	51%	53%	72%	-
Nr. 15								

Tabla 2: Porcentaje de identidad de secuencia de los segmentos de secuencia de aminoácidos conservados A a O.

Polipéptido	Identidad de secuencia en relación con la Secuencia ID Nr. 1					
	Segmento A	Segmento B	Segmento C	Segmento D	Segmento E	Segmento F
SEQ ID-Nr. 1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
SEQ ID-Nr. 2	59,6 %	76,9 %	88,9 %	87,7 %	77,3 %	76,5 %
SEQ ID-Nr. 3	63,0 %	76,9 %	77,8 %	89,5 %	86,4 %	76,5 %
SEQ ID-Nr. 4	63,0 %	80,8 %	77,8 %	91,2 %	86,4 %	76,5 %
SEQ ID-Nr. 5	63,0 %	76,9 %	77,8 %	87,7 %	86,4 %	76,5 %
SEQ ID-Nr. 6	63,0 %	80,8 %	77,8 %	91,2 %	86,4 %	76,5 %
SEQ ID-Nr. 7	44,7 %	69,2 %	77,8 %	78,9 %	68,2 %	64,7 %
SEQ ID-Nr. 8	40,7 %	50,0 %	66,7 %	82,5 %	59,1 %	64,7 %
SEQ ID-Nr. 9	51,9 %	57,7 %	55,6 %	73,7 %	45,5 %	58,8 %
SEQ ID-Nr. 10	44,4 %	61,5 %	77,8 %	75,4 %	47,8 %	76,5 %
SEQ ID-Nr. 11	44,4 %	50,0 %	66,7 %	71,9 %	43,5 %	58,8 %
SEQ ID-Nr. 12	51,9 %	53,8 %	55,6 %	71,9 %	50,0 %	58,8 %
SEQ ID-Nr. 13	18,5 %	61,5 %	55,6 %	77,2 %	54,5 %	52,9 %
SEQ ID-Nr. 14	55,6 %	69,2 %	77,8 %	84,2 %	54,5 %	52,9 %
SEQ ID-Nr. 15	74,1 %	86,7 %	88,9 %	89,0 %	77,3 %	88,2 %

Polipéptido	Identidad de secuencia en relación con SEQ ID-Nr: 1					
	Segmento G	Segmento H	Segmento I	Segmento J	Segmento K	Segmento L
SEQ ID-Nr. 1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
SEQ ID-Nr. 2	100 %	87,5 %	66,7 %	85,7 %	80,0 %	75,0 %
SEQ ID-Nr. 3	100 %	87,5 %	77,8 %	57,1 %	80,0 %	75,0 %
SEQ ID-Nr. 4	100 %	87,5 %	77,8 %	57,1 %	80,0 %	75,0 %
SEQ ID-Nr. 5	100 %	87,5 %	77,8 %	57,1 %	80,0 %	75,0 %
SEQ ID-Nr. 6	100 %	75,0 %	77,8 %	85,7 %	80,0 %	87,5 %
SEQ ID-Nr. 7	100 %	87,5 %	66,7 %	71,4 %	100 %	50,0 %
SEQ ID-Nr. 8	100 %	62,5 %	44,4 %	57,1 %	80,0 %	62,5 %

SEQ ID-Nr. 9	100 %	12,5 %	44,4 %	42,9 %	60,0 %	62,5 %
SEQ ID-Nr. 10	100 %	62,5 %	55,6 %	71,4 %	80,0 %	50,0 %
SEQ ID-Nr. 11	100 %	50,0 %	55,6 %	57,1 %	80,0 %	50,0 %
SEQ ID-Nr. 12	100 %	12,5 %	22,2 %	57,1 %	80,0 %	52,5 %
SEQ ID-Nr. 13	100 %	50,0 %	44,4 %	57,1 %	80,0 %	75,0 %
SEQ ID-Nr. 14	0 %	8,3 %	0 %	14,3 %	0 %	25,0 %
SEQ ID-Nr. 15	100 %	87,5 %	100 %	85,7 %	100 %	75,0 %

Polipéptido	Identidad de secuencia en relación con SEQ ID-Nr. 1		
	Segmento M	Segmento N	Segmento O
SEQ ID-Nr. 1	100 %	100 %	100 %
SEQ ID-Nr. 2	87,5 %	80,0 %	81,8 %
SEQ ID-Nr. 3	87,0 %	80,0 %	81,8 %
SEQ ID-Nr. 4	87,5 %	80,0 %	81,8 %
SEQ ID-Nr. 5	87,5 %	80,0 %	81,8 %
SEQ ID-Nr. 6	87,5 %	80,0 %	72,7 %
SEQ ID-Nr. 7	75,0 %	40,0 %	36,4 %
SEQ ID-Nr. 8	75,0 %	60,0 %	54,5 %
SEQ ID-Nr. 9	62,5 %	40,0 %	54,5 %
SEQ ID-Nr. 10	62,5 %	40,0 %	54,5 %
SEQ ID-Nr. 11	75,0 %	40,0 %	54,5 %
SEQ ID-Nr. 12	100 %	40,0 %	54,5 %
SEQ ID-Nr. 13	50,0 %	40,0 %	63,6 %
SEQ ID-Nr. 14	6,2 %	0 %	0 %
SEQ ID-Nr. 15	87,5 %	80,0 %	63,6 %

Ejemplo 3: Hidrólisis de ZEN mediante polipéptidos en lisados celulares

5 Para determinar su capacidad para degradar ZEN en los metabolitos no tóxicos o menos tóxicos HZEN y DHZEN, se preparó el polipéptido con la secuencia ID nº 1, codificada por la secuencia de nucleótidos con el nº de secuencia ID 17, como tal y con un marcador 6xHis en el extremo C-terminal o N-terminal en *E. coli*, como se ha descrito en el Ejemplo 1. El polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la secuencia ID nº 13, que se codificaba con la secuencia de nucleótidos con la secuencia ID nº 29, se marcó con 6xHis solo en los extremos C-terminales. Se recogieron 100 ml de cada cultivo de *E. coli* con una densidad óptica (DO600 nm) de 2,0-2,5 mediante centrifugación a 4°C y se resuspendieron en 20 ml de medio mineral Brunner (medio para microorganismos de DSMZ número 462, 2012). Las suspensiones celulares se lisaron mediante un tratamiento con una prensa francesa, 3 veces a 20.000 psi. Los lisados celulares obtenidos de ese modo se utilizaron en una dilución 1:10, 1:100 o 1:1.000, que se había preparado en medio mineral Brunner que incluía 0,1 mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino). Para los experimentos de degradación de ZEN se utilizaron 9,9 ml de medio mineral Brunner que incluía 0,1 mg/ml de BSA, 0,1 ml de lisado celular diluido y 31 µl de solución madre de sustrato ZEN. En total, los lisados celulares se diluyeron de este modo 1:1.000, 1:10.000 o 1:100.000. Una solución de ZEN 2,08 mM (40% en volumen de ACN + 60% en volumen de H₂O) servía como solución madre de sustrato ZEN. Para preparar esta solución, se pesó y se disolvió adecuadamente ZEN en forma cristalina

(Biopure Standard de Romer Labs, Art. nº 001109, al menos 98% de pureza). Cada lote de degradación se llevó a cabo en viales de vidrio de 25 ml y se incubó a 25°C con agitación a 100 rpm durante un total de 120 h. En los puntos temporales 0; 0,5; 1; 2; 5; 24; 47; 72 y 120 h se tomó en cada caso una muestra de 1 ml, los polipéptidos se inactivaron con calor durante 10 min a 99°C y se almacenaron a -20°C. Después de la descongelación, se separaron de las muestras los componentes insolubles mediante centrifugación. Se analizaron ZEN, HZEN y DHZEN mediante LC/MS/MS. Para ello, los metabolitos se separaron cromatográficamente utilizando una columna Phenomenex Luna C18(2) con unas dimensiones de 250 mm x 3 mm y un tamaño de partícula de 5 µm. Una mezcla de acetonitrilo-agua con una concentración de ácido fórmico de 1 ml/l servía como fase móvil. Se registró la señal UV a 270 nm. La ionización mediante electropulverización (ESI) sirvió como fuente de ionización. Se cuantificaron ZEN, HZEN y DHZEN usando QTrap/LC/MS/MS (triple cuadrupolo, Applied Biosystems) en "modo mejorado". Después de 24 horas como máximo, ya no se podían detectar cantidades significativas de ZEN en ninguno de los lotes. La mayoría, más del 80%, de ZEN se había convertido en HZEN o DHZEN.

En la Fig. 1, que no forma parte de la invención, se observa a modo de ejemplo la degradación temporal de ZEN y el aumento de HZEN y DHZEN para una solución de lisado celular diluido 1:10.000, tanto para un polipéptido con SEQ ID nº 1 sin marcar (Fig. 1A), como uno marcado con 6xHis en el extremo C-terminal (Fig. 1B) y uno marcado con 6xHis en el extremo N-terminal (Fig. 1C). De esto se desprende claramente, 1º que la conversión de ZEN tiene lugar de forma inmediata y completa, ya que casi no se pudo detectar ZEN en la primera muestra (0 h), que se tomó inmediatamente después del inicio de la prueba, y 2º a través de la adición de un marcador, C-terminal o N-terminal, no había pérdidas significativas de la actividad.

Ejemplo 4: Hidrólisis de derivados de ZEN mediante polipéptidos en lisados celulares

Para determinar la capacidad de los polipéptidos para transformar tanto ZEN como derivados de ZEN en metabolitos no tóxicos o menos tóxicos, se prepararon los polipéptidos con las secuencias ID nº 1 y 13, tal y como se describe en el Ejemplo 3, con un marcador His C-terminal y como lisados celulares en la degradación se emplearon las respectivas secuencias de nucleótidos sintéticos con las secuencias ID nº 17 y 29.

Los experimentos de degradación se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 3, sometiendo a ensayo cada polipéptido con cada derivado de ZEN seleccionado a partir del grupo α-ZEL, β-ZEL, α-ZAL, β-ZAL, Z14G, Z14S y ZAN. Los lisados celulares se utilizaron en una dilución total de 1:10.000. Como solución madre de sustrato, en lugar de una solución de ZEN 2,08 mM (40% en volumen de ACN + 60% en volumen de H₂O), se utilizaron soluciones equimolares, es decir, soluciones 2,08 mM de los derivados de ZEN. α-ZEL, β-ZEL, α-ZAL, β-ZAL y ZAN se adquirieron en Sigma y se utilizaron como patrones para el análisis. Z14G y Z14S se obtuvieron con una pureza de al menos el 90% de acuerdo con los procedimientos tal y como se describen en P. Krenn et al., 2007 (Micotoxin Research, 23, 4, 180-184 y M. Sulyok et al., 2007 (Anal. Bioanal. Chem., 289, 1505-1523) y se emplearon como patrones para el análisis. Otra diferencia con el Ejemplo 3 es que únicamente se tomó una muestra después de 24 h. La reducción de la concentración de los derivados de ZEN durante el ensayo de degradación se cuantificó mediante LC/MS/MS. α-ZEL, β-ZEL, Z14G y Z14S se midieron según el método de M. Sulyok et al. (2010, Food Chemistry, 119, 408-416); α-ZAL, β-ZAL y ZAN se midieron según el método de P. Songsermaskul et al. (2011, J. of Animal Physiol. and Animal Nutr., 97, 155-161). Sorprendentemente, se ha comprobado que después de 24 h de incubación solo estaba presente desde 0 a como máximo un 13% de las cantidades de partida de derivados de ZEN.

Ejemplo 5: Actividad específica así como parámetros de cinética enzimática de los polipéptidos y de sus variantes

La determinación de la actividad específica de los polipéptidos así como de variantes de los mismos tuvo lugar fotométricamente, presentando todos los polipéptidos empleados un marcador 6xHis C-terminal. La preparación, el enriquecimiento y la purificación de los polipéptidos o bien de variantes de los mismos, se realizaron tal y como se describe en el Ejemplo 1. La degradación de ZEN en HZEN se midió a través de la disminución de la adsorción con una longitud de onda de 315 nm. Los coeficientes de extinción molar [ε] de ZEN y HZEN se determinaron experimentalmente y ascendían a 0,0078895 L µmol⁻¹ cm⁻¹ y a 0,0030857 L µmol⁻¹ cm⁻¹. Los coeficientes de extinción son fuertemente dependientes del pH y, por lo tanto, la medición de la actividad debe llevarse a cabo siempre exactamente con el mismo valor del pH y, preferiblemente, también en la misma matriz. Las mediciones se llevaron a cabo en una solución tampón Tris-HCl 50 mM pH = 8,2, en cubetas de cuarzo, en un intervalo de longitudes de onda de 200 a 2500 nm, en un fotómetro UV-VIS (Hitachi U-2001) a 32°C.

Como solución madre de sustrato ZEN servía una solución de ZEN 2,08 mM (40% en vol. de ACN + 60% en vol. de H₂O). Para la preparación de esta solución, ZEN se pesó y se disolvió de manera correspondiente en forma cristalina (Biopure Standard de Romer Labs, Art. nº 001109, al menos 98% de pureza). Las diluciones del sustrato ZEN (0,79 µM, 1,57 µM, 2,36 µM, 3,14 µM, 4,71 µM, 6,28 µM, 7,85 µM, 9,42 µM, 10,99 µM, 12,56 µM, 14,13 µM, 15,71 µM, 17,28 µM, 18,85 µM) se prepararon con Tris-HCl 50 mM pH = 8,2. Las soluciones polipeptídicas se diluyeron con tampón Tris-HCl 50 mM pH = 8,2, hasta tener una concentración final de aprox. 70 ng/ml. Las diluciones de sustrato ZEN se calentaron previamente en un baño de agua a 32°C.

Se mezclaron 100 µl de la dilución de sustrato ZEN respectiva con 0,2 µl de la solución polipeptídica, y la absorción se midió durante 5 min, midiéndose cada una de las combinaciones a base de solución polipeptídica - dilución de sustrato ZEN al menos dos veces.

Teniendo en cuenta los coeficientes de extinción de ZEN y HZEN, a través del aumento de la absorción a lo largo del tiempo, se calculó la velocidad de la reacción para cada una de las concentraciones de sustrato.

Las expresiones “valor K_M ” o “constante de Michaelis-Menten” se refieren a un parámetro para describir la afinidad enzimática que poseen las unidades $[\mu\text{M}]$ o $[\text{mM}]$ y se calcula con ayuda del diagrama lineal de Hanes según H. Bisswang (2002, Enzyme Kinetics, ISBN 3-527-30343-X, página 19), utilizándose para ello preferiblemente la función “Cinética Enzimática, Sustrato Individual” del programa SigmaPlot 12.0. Las expresiones “constante catalítica de la reacción enzimática” o el “valor k_{cat} ” se refieren a un parámetro para describir la tasa de conversión de un polipéptido o bien una enzima, que se indica en $[\text{s}]^{-1}$ y preferiblemente se calcula con ayuda de la función “Cinética Enzimática, Sustrato Individual” del programa SigmaPlot 12.0. La “velocidad enzimática máxima” o el “valor $v_{\text{máx}}$ ” se indica en las unidades $[\mu\text{M}/\text{s}]$ o $[\text{mM}/\text{s}]$ y se determina de forma análoga al valor K_M con ayuda del diagrama lineal de Hanes, utilizando para ello preferiblemente la función “Cinética Enzimática, Sustrato Individual” del programa SigmaPlot 12.0.

Por medio de $v_{\text{máx}}$ y la concentración de enzima utilizada, se calculó la actividad específica según la fórmula

$$\text{Actividad específica [U/mg]} = \frac{v_{\text{máx}} [\mu\text{M}/\text{s}] \times 60 [\text{s}/\text{min}]}{\text{Concentración de enzima [mg/l]}}$$

en donde una unidad se define como la hidrólisis de ZEN 1 μmol por minuto a 32°C en solución tampón Tris-HCl 50 mM, pH = 8,2.

A continuación, se indican los datos sin procesar para la determinación de los parámetros enzimáticos K_M , $v_{\text{máx}}$, k_{cat} , así como la actividad específica, a modo de ejemplo para el polipéptido con la secuencia ID nº 1. La Tabla 3 muestra las velocidades de reacción con las concentraciones de sustrato ZEN respectivas, la Fig. 2 muestra las gráficas de Michaelis-Menten respectivas y en la Tabla 4 se indican los parámetros de cinética enzimática correspondientes. La solución enzimática empleada tenía una concentración de 68 ng/l.

Tabla 3: Velocidades de reacción del polipéptido con la SEQ ID nº: 1 con diferentes concentraciones de ZEN.

Dilución del sustrato ZEN $[\mu\text{M}]$	Medición 1 Velocidad de reacción $[\mu\text{M}/\text{s}]$	Medición 2 Velocidad de reacción $[\mu\text{M}/\text{s}]$
0,79	0,0073	0,0071
1,57	0,0087	0,0082
2,36	0,0095	0,0080
3,14	0,0101	0,0073
4,71	0,0103	0,0087
6,28	0,0096	0,0088
7,85	0,0084	0,0088
9,42	0,0111	0,0087
10,99	0,0093	0,0081
12,56	0,0100	0,0086
14,13	0,0089	0,0101
15,71	0,0089	0,0090
17,28	0,0100	0,0074
18,85	0,0100	0,0085

Tabla 4: Parámetros de la cinética enzimática del polipéptido con la secuencia ID nº 1.

	$v_{\text{máx}} [\mu\text{M}/\text{s}]$		$K_M [\mu\text{M}]$		$k_{\text{cat}} [\text{s}^{-1}]$		Actividad esp. [U/mg]	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Valor	0,00993	0,008756	0,2172	0,1898	5,44	4,79	8,76	7,73
Promedio	0,009343		0,2035		5,12		8,25	

Las actividades específicas de los polipéptidos examinados son para la secuencia ID nº 1, 8,25 U/mg, para la secuencia ID nº 13, 6,43 U/mg.

Ejemplo 6: Degradación de ZEN y derivados de ZEN en maíz contaminado

5 Para la determinación de la capacidad de los polipéptidos para degradar ZEN y derivados de ZEN que se presentan de forma natural en una matriz compleja y a un valor de pH bajo, se mezcló maíz contaminado a modo de ejemplo con diferentes concentraciones de, en cada caso, uno de los polipéptidos con las secuencias ID nº 1 a 6 y se controló la degradación de ZEN y derivados de ZEN.

10 El maíz contaminado se molió y se empleó en el ensayo de degradación, consistiendo cada lote en 1 g de maíz molido y contaminado, 8,9 ml de tampón acetato 100 mM, pH = 4,0 y 0,1 ml de solución polipeptídica. Se prepararon soluciones polipeptídicas enriquecidas y purificadas, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 5, diluyéndose éstas hasta una concentración de 10 mU/ml, 100 mU/ml o bien 1.000 mU/ml. En el lote se empleó, por consiguiente, de forma absoluta 1 mU (= 1 mU/g de maíz), 10 mU (= 10 mU/g de maíz) o bien 100 mU (= 100 mU/g de maíz). Cada lote de degradación se llevó a cabo en 25 ml y se incubó a 37°C con agitación a 100 rpm. Antes de la adición de la enzima o bien después de incubar durante 1 hora, se tomó en cada caso una muestra de 1 ml, el polipéptido se inactivó térmicamente durante 10 min a 99°C y la muestra se almacenó a -20 °C. Después de la descongelación de la muestra, los componentes no solubles se separaron mediante centrifugación. Se midieron las concentraciones de ZEN, así como de los derivados de ZEN mediante LC/MS/MS tal y como se describe en M. Sulyok et al. (2007, Anal. Bioanal. Chem., 289, 1505-1523). El contenido en ZEN y derivados de ZEN en ese maíz ascendía para ZEN a 238 ppb, para α-ZEL a 15 ppb, para β-ZEL a 23 ppb, para Z14G a 32 ppb y para Z14S a 81 ppb. En la Tabla 5 se presenta el porcentaje de disminución del contenido en ZEN y derivados de ZEN en el ensayo de degradación.

Tabla 5: Porcentaje de reducción de ZEN y de los derivados de ZEN referido al contenido inicial del ensayo de degradación de diferentes polipéptidos y cantidades de polipéptidos.

Polipéptido	Cantidad en el lote	ZEN	α-ZEL	β-ZEL	Z14G	Z14S
SEQ ID Nr. 1	0,1 mU	83%	≥ 80%	70%	78%	80 %
	1 mU	96%	≥ 80 %	76 %	≥ 80%	92%
	10 mU	97%	≥ 80%	≥ 85%	≥ 80 %	94%
SEQ ID Nr. 2	0,1 mU	87%	≥ 80%	73%	≥ 80%	84%
	1 mU	97%	≥ 80 %	78 %	≥ 80%	90%
	10 mU	99%	≥ 80%	≥ 85 %	≥ 80%	96%
SEQ ID Nr. 3	0,1 mU	79%	79%	67%	73%	75%
	1 mU	85 %	≥ 80%	72 %	79%	82 %
	10 mU	92%	≥ 80%	78%	≥ 80%	88%
SEQ ID Nr. 4	0,1 mU	82%	78%	65 %	76 %	80 %
	1 mU	89 %	≥ 80%	73 %	≥ 80 %	86 %
	10 mU	93%	≥ 80%	82 %	≥ 80%	91 %
SEQ ID Nr. 5	0,1 mU	79%	76 %	66 %	78 %	80 %
	1 mU	83 %	≥ 80%	73 %	≥ 80%	81 %
	10 mU	91 %	≥ 80%	79 %	≥ 80 %	86%
SEQ ID Nr. 6	0,1 mU	93 %	≥ 80%	75 %	≥ 80 %	90%
	1 mU	95 %	≥ 80%	82 %	≥ 80%	92 %
	10 mU	98 %	≥ 80 %	≥ 85%	≥ 80 %	96 %

Ejemplo 7: Aditivos que contienen polipéptido para la disociación hidrolítica de ZEN y/o de derivados de ZEN

25 Para la preparación de los aditivos para la disociación hidrolítica de ZEN, se purificaron a modo de ejemplo materiales sobrenadantes de la fermentación de polipéptidos expresados mediante *P. pastoris* con las secuencias ID nº 1, 2, 6 y 13, mediante microfiltración y ultrafiltración (límite de exclusión: 10 kDa) en condiciones convencionales y se concentraron hasta tener una concentración de sustancia seca de aproximadamente 9% en peso. A continuación, esas soluciones con contenido en polipéptidos se continuaron elaborando con un secador de pulverización (Mini B290 de Büchi), asimismo en condiciones convencionales, para formar polvos secos. Esos cuatro polvos se denominaron

30

5 sucesivamente Z1, Z2, Z6 y Z13. Z1, Z2, Z6 o bien Z13 se mezclaron, además, con bentonita con un tamaño medio de grano de aprox. 1 μm , en una relación de 1% en peso de aditivo Z1, Z2, Z6 o bien Z13 y 99% en peso de bentonita, en un agitador rotatorio. Los aditivos, así contenidos, se denominaron aditivo Z1.B, Z2.B, Z6.B y Z13.B. Además, Z1, Z2, Z6 y Z13 se mezclaron con bentonita y un concentrado de elementos traza y vitaminas en una relación de 0,1% en peso de aditivo Z1, Z2, Z6 o bien Z13, 0,9% en peso de concentrado de elementos traza y vitaminas y 99% en peso de bentonita en un agitador rotario. Los aditivos, así contenidos, se denominaron aditivo Z1.BVS, Z2.BVS, Z6.BVS y Z13.BVS. En 100 g de los aditivos Z1.BVS, Z2.BVS, Z6.BVS y Z13.BVS estaban contenidos 200 mg de sulfato de hierro, 50 mg de sulfato de cobre, 130 mg de óxido de estaño, 130 mg de óxido de manganeso, 2,55 mg de carbonato de calcio, 160 mg de vitamina E, 6,5 mg de vitamina K3, 6,5 mg de vitamina B1, 14 mg de vitamina B2, 15 mg de vitamina B6, 0,15 mg de vitamina B12, 150 mg de ácido nicotínico, 30 mg de ácido pantoténico y 5,3 mg de ácido fólico.

Los aditivos se extrajeron en un tampón Tris-HCl 50 mM pH = 8,2 durante 30 minutos y se continuaron diluyendo en el mismo tampón, de modo que la concentración final de polipéptido era de aprox. 70 ng/ml.

15 A continuación, se determinó el efecto degradante de la zearalenona de esas soluciones, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 5. Las correspondientes actividades eran para Z1 8,230 U/g, para Z2 9,310 U/g, para Z6 9,214 U/g, para Z1.B 83 U/g, para Z2.B 92 U/g, para Z2.C 90 U/g, para Z13.B 57 U/g, para Z1.BVS 8 U/g, para Z2.BVS 9 U/g, para Z6.BVS 9 U/g y para Z13.BVS 6 U/g.

20 La capacidad para degradar los derivados de ZEN, α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL, Z14G, Z14S y ZAN mediante los aditivos Z1, Z2, Z6, Z13, Z1.B, Z2.B, Z6.B, Z13.B, Z1.BVS, Z2.BVS, Z6.BVS y Z13.BVS, se llevó a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 4, pero en lugar de 100 μl de un lisado celular, se emplearon 100 μl de una solución polipeptídica con una concentración de polipéptido de aprox. 70 ng/ml. Después de incubar durante 6 horas, solo estaba presente como máximo un 15% de la cantidad de partida en forma de un derivado de ZEN no hidrolizado.

* μM significa micromolar y se corresponde con la unidad $\mu\text{Mol/l}$

Listado de secuencias

25 <110> Erber Aktiengesellschaft

<120> Procedimiento para la disociación hidrolítica de zearalenona y/o derivados de zearalenona mediante un polinucleótido, así como el uso

<130> P05341PCT

30 <150> EP 3 039 134

<151> 06-07-2016

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 328

35 <212> PRT

<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 1

ES 2 843 204 T3

Met Ala Glu Glu Gly Thr Arg Ser Glu Ala Ala Asp Ala Ala Thr Gln
 1 5 10 15

Ala Arg Gln Leu Pro Asp Ser Arg Asn Ile Phe Val Ser His Arg Phe
 20 25 30

Pro Glu Arg Gln Val Asp Leu Gly Glu Val Val Met Asn Phe Ala Glu
 35 40 45

Ala Gly Ser Pro Asp Asn Pro Ala Leu Leu Leu Leu Pro Glu Gln Thr
 50 55 60

Gly Ser Trp Trp Ser Tyr Glu Pro Val Met Gly Leu Leu Ala Glu Asn
 65 70 75 80

Phe His Val Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Gln Gly Arg Ser Thr Trp
 85 90 95

Thr Pro Arg Arg Tyr Ser Leu Asp Asn Phe Gly Asn Asp Leu Val Arg
 100 105 110

Phe Ile Ala Leu Val Ile Lys Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser
 115 120 125

Ser Gly Gly Leu Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ala Met Pro Gly
 130 135 140

Gln Ile Arg Ala Ala Leu Cys Glu Asp Ala Pro Phe Phe Ala Ser Glu
 145 150 155 160

ES 2 843 204 T3

Leu Val Pro Ala Tyr Gly His Ser Val Leu Gln Ala Ala Gly Pro Ala
 165 170 175

Phe Glu Leu Tyr Arg Asp Phe Leu Gly Asp Gln Trp Ser Ile Gly Asp
 180 185 190

Trp Lys Gly Phe Val Glu Ala Ala Lys Ala Ser Pro Ala Lys Ala Met
 195 200 205

Gln Leu Phe Pro Thr Pro Asp Glu Ala Pro Gln Asn Leu Lys Glu Tyr
 210 215 220

Asp Pro Glu Trp Gly Arg Ala Phe Phe Glu Gly Thr Val Ala Leu His
 225 230 235 240

Cys Pro His Asp Arg Met Leu Ser Gln Val Lys Thr Pro Ile Leu Ile
 245 250 255

Thr His His Ala Arg Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Glu Leu Leu Gly
 260 265 270

Ala Leu Ser Asp Leu Gln Ala Glu His Ala Gln Asp Ile Ile Arg Ser
 275 280 285

Ala Gly Val Arg Val Asp Tyr Gln Ser His Pro Asp Ala Leu His Met
 290 295 300

Met His Leu Phe Asp Pro Ala Arg Tyr Ala Glu Ile Leu Thr Ser Trp
 305 310 315 320

Ser Ala Thr Leu Pro Ala Asn Asp
 325

<210> 2

<211> 308

<212> PRT

5 <213> Streptomyces violaceusniger

<400> 2

Met Ala Asp Pro Ala Gln Arg Asp Val Tyr Val Pro His Ala Tyr Pro
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Ala Asp Leu Gly Glu Ile Thr Met Asn Tyr Ala Glu Ala
 20 25 30

Gly Glu Pro Asp Met Pro Ala Val Leu Leu Ile Pro Glu Gln Thr Gly
 35 40 45

ES 2 843 204 T3

Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Glu Ala Met Gly Leu Leu Ala Glu Asn Phe
50 55 60

His Val Tyr Ala Val Asp Leu Arg Gly Gln Gly Arg Ser Ser Trp Ala
65 70 75 80

Pro Lys Arg Tyr Ser Leu Asp Asn Phe Gly Asn Asp Leu Val Arg Phe
85 90 95

Ile Ala Leu Val Val Lys Arg Pro Val Ile Val Ala Gly Asn Ser Ser
100 105 110

Gly Gly Val Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Met Pro Gly Gln
115 120 125

Val Arg Gly Ala Leu Cys Glu Asp Ala Pro Phe Phe Ala Ser Glu Leu
130 135 140

Val Thr Thr Cys Gly His Ser Ile Arg Gln Ala Ala Gly Pro Met Phe
145 150 155 160

Glu Leu Phe Arg Thr Tyr Leu Gly Asp Gln Trp Ser Val Gly Asp Trp
165 170 175

Thr Gly Tyr Cys Arg Ala Ala Asp Ala Ser Ser Ser Pro Met Ala Arg
180 185 190

Tyr Phe Val Ala Asp Glu Ile Pro Gln His Met Arg Glu Tyr Asp Pro
195 200 205

Glu Trp Ala Arg Ala Phe Trp Glu Gly Thr Val Ala Leu His Cys Pro
210 215 220

His Glu Gln Leu Leu Thr Gln Val Lys Thr Pro Val Leu Leu Thr His
225 230 235 240

His Met Arg Asp Ile Asp Pro Asp Thr Gly His Leu Val Gly Ala Leu
245 250 255

Ser Asp Glu Gln Ala Ala Arg Ala Arg Leu Leu Met Glu Ser Ala Gly
260 265 270

Val Lys Val Asp Tyr Ala Ser Val Pro Asp Ala Leu His Met Met His
275 280 285

Gln Phe Asp Pro Pro Arg Tyr Val Glu Ile Phe Thr Gln Trp Ala Ala
290 295 300

Thr Leu Ala Ala

305

<210> 3

5 <211> 309

<212> PRT

<213> Streptomyces coelicolor

<400> 3

ES 2 843 204 T3

Met Val Thr Ser Pro Ala Leu Arg Asp Val His Val Pro His Ala Tyr
 1 5 10 15

Pro Glu Gln Gln Val Asp Leu Gly Glu Ile Thr Met Asn Tyr Ala Glu
 20 25 30

Ala Gly Asp Pro Gly Arg Pro Ala Val Leu Leu Ile Pro Glu Gln Thr
 35 40 45

Gly Ser Trp Trp Ser Tyr Glu Glu Ala Met Gly Leu Leu Ala Glu His
 50 55 60

Phe His Val Tyr Ala Val Asp Leu Arg Gly Gln Gly Arg Ser Ser Trp
 65 70 75 80

Thr Pro Lys Arg Tyr Ser Leu Asp Asn Phe Gly Asn Asp Leu Val Arg
 85 90 95

Phe Ile Ala Leu Val Val Arg Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser
 100 105 110

Ser Gly Gly Val Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Met Pro Gly
 115 120 125

Gln Ile Arg Gly Val Leu Cys Glu Asp Pro Pro Phe Phe Ala Ser Glu
 130 135 140

Leu Val Pro Ala His Gly His Ser Val Arg Gln Gly Ala Gly Pro Val
 145 150 155 160

Phe Glu Leu Phe Arg Thr Tyr Leu Gly Asp Gln Trp Ser Val Gly Asp
 165 170 175

Trp Glu Gly Phe Arg Ser Ala Ala Asp Ala Ser Ala Ser Pro Met Ala
 180 185 190

Arg Ser Phe Val Ala Asp Thr Ile Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp
 195 200 205

ES 2 843 204 T3

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

Pro His Glu Arg Met Leu Asn Arg Val Asn Thr Pro Val Leu Leu Thr
 225 230 235 240

His His Met Arg Gly Thr Asp Pro Glu Thr Gly Asn Leu Leu Gly Ala
 245 250 255

Leu Ser Asp Glu Gln Ala Ala Gln Val Arg Arg Leu Met Glu Ser Ala
 260 265 270

Gly Val Lys Val Asp Tyr Glu Ser Val Pro Asp Ala Ser His Met Met
 275 280 285

His Gln Ser Asp Pro Ala Arg Tyr Ala Glu Ile Leu Thr Pro Trp Thr
 290 295 300

Ala Ala Leu Ala Pro
 305

<210> 4

<211> 309

<212> PRT

5 <213> Streptomyces rapamycinicus

<400> 4

Met Val Thr Ser Pro Ala Leu Arg Asp Val His Val Pro His Ala Tyr
 1 5 10 15

Pro Glu Gln Gln Val Asp Leu Gly Glu Ile Thr Met Asn Tyr Ala Glu
 20 25 30

Ala Gly Asp Pro Asp Arg Pro Ala Val Leu Leu Ile Pro Glu Gln Thr
 35 40 45

Gly Ser Trp Trp Ser Tyr Glu Glu Ala Met Gly Leu Leu Ala Glu His
 50 55 60

Phe His Val Tyr Ala Val Asp Leu Arg Gly Gln Gly Arg Ser Ser Trp
 65 70 75 80

Thr Pro Lys Arg Tyr Ser Leu Asp Asn Phe Gly Asn Asp Leu Val Arg
 85 90 95

Phe Ile Ala Leu Val Val Lys Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser
 100 105 110

ES 2 843 204 T3

Ser Gly Gly Val Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Met Pro Gly
 115 120 125

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

Leu Val Pro Ala His Gly His Ser Val Arg Gln Gly Ala Gly Pro Val
 145 150 155 160

Phe Glu Leu Phe Arg Thr Tyr Leu Gly Asp Gln Trp Ser Val Ser Asp
 165 170 175

Trp Glu Gly Phe Cys Arg Ala Ala Gly Ala Ser Ala Ser Pro Met Ala
 180 185 190

Arg Ser Phe Val Ala Asp Gly Ile Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp
 195 200 205

Pro Glu Trp Ala Arg Ala Phe His Glu Gly Thr Val Gly Leu Asn Cys
 210 215 220

Pro His Glu Arg Met Leu Gly Arg Val Asn Thr Pro Val Leu Leu Thr
 225 230 235 240

His His Met Arg Gly Thr Asp Pro Glu Thr Gly Asn Leu Leu Gly Ala
 245 250 255

Leu Ser Asp Glu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Leu Met Glu Ser Ala
 260 265 270

Gly Val Arg Val Asp Tyr Glu Ser Val Pro Asp Ala Ser His Met Met
 275 280 285

His Gln Ser Asp Pro Ala Arg Tyr Ala Glu Ile Phe Thr Arg Trp Ala
 290 295 300

Ala Ala Leu Ala Pro
 305

<210> 5

<211> 309

<212> PRT

5 <213> Streptomyces lividans

<400> 5

Met Val Thr Ser Pro Ala Leu Arg Asp Val His Val Pro His Ala Tyr
 1 5 10 15

ES 2 843 204 T3

Pro Glu Gln Gln Val Asp Leu Gly Glu Ile Thr Met Asn Tyr Ala Glu
 20 25 30

Ala Gly Asp Pro Gly Arg Pro Ala Val Leu Leu Ile Pro Glu Gln Thr
 35 40 45

Gly Ser Trp Trp Ser Tyr Glu Glu Ala Met Gly Leu Leu Ala Glu His
 50 55 60

Phe His Val Tyr Ala Val Asp Leu Arg Gly Gln Gly Arg Ser Ser Trp
 65 70 75 80

Thr Pro Lys Arg Tyr Ser Leu Asp Asn Phe Gly Asn Asp Leu Val Arg
 85 90 95

Phe Met Ala Leu Val Val Arg Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser
 100 105 110

Ser Gly Gly Val Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Met Pro Gly
 115 120 125

Gln Ile Arg Gly Val Leu Cys Glu Asp Pro Pro Phe Phe Ala Ser Glu
 130 135 140

Leu Val Pro Ala His Gly His Ser Val Arg Gln Gly Ala Gly Pro Val
 145 150 155 160

Phe Glu Leu Phe Arg Thr Tyr Leu Gly Asp Gln Trp Ser Val Gly Asp
 165 170 175

Trp Glu Gly Phe Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ser Ala Ser Pro Met Ala
 180 185 190

Arg Ser Phe Val Ala Asp Thr Ile Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp
 195 200 205

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

Pro His Glu Arg Met Leu Asn Arg Val Asn Thr Pro Val Leu Leu Thr
 225 230 235 240

His His Met Arg Gly Thr Asp Pro Glu Thr Gly Asn Leu Leu Gly Ala
 245 250 255

Leu Ser Asp Glu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Arg Leu Met Glu Ser Ala
 260 265 270

Gly Val Lys Val Asp Tyr Glu Ser Val Pro Asp Ala Ser His Met Met
 275 280 285

His Gln Ser Asp Pro Ala Arg Tyr Ala Glu Ile Leu Thr Pro Trp Ala
 290 295 300

Ala Ala Leu Ala Pro
 305

ES 2 843 204 T3

<210> 6
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicoflavus

5 <400> 6
 Met Val Thr Ser Pro Ala Leu Arg Asp Val His Val Pro His Ala Tyr
 1 5 10 15
 Pro Glu Gln Gln Val Asp Leu Gly Glu Ile Thr Met Asn Tyr Ala Glu
 20 25 30
 Ala Gly Asp Pro Asp Arg Pro Ala Val Leu Leu Ile Pro Glu Gln Thr
 35 40 45
 Gly Ser Trp Trp Ser Tyr Glu Glu Ala Met Gly Leu Leu Ser Glu His
 50 55 60
 Phe His Val Tyr Ala Val Asp Leu Arg Gly Gln Gly Arg Ser Ser Trp
 65 70 75 80
 Thr Pro Lys Arg Tyr Ser Leu Asp Asn Phe Gly Asn Asp Leu Val Arg
 85 90 95
 Phe Ile Ala Leu Val Val Lys Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser
 100 105 110
 Ser Gly Gly Val Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Met Pro Gly
 115 120 125
 Gln Leu Arg Gly Val Leu Cys Glu Asp Pro Pro Phe Phe Ala Ser Glu
 130 135 140
 Leu Val Pro Ala His Gly His Ser Val Arg Gln Gly Ala Gly Pro Val
 145 150 155 160
 Phe Glu Leu Phe Arg Thr Tyr Leu Gly Asp Gln Trp Ser Val Gly Asp
 165 170 175

ES 2 843 204 T3

Trp Glu Gly Phe Cys Arg Ala Ala Gly Ala Ser Ala Ser Pro Met Ala
 180 185 190

Arg Ser Phe Val Ala Asp Gly Ile Pro Gln His Leu Gln Glu Tyr Asp
 195 200 205

Pro Glu Trp Ala Arg Val Phe Tyr Glu Gly Thr Val Gly Leu Ser Cys
 210 215 220

Pro His Glu Arg Met Leu Gly Gln Val Lys Thr Pro Val Leu Leu Thr
 225 230 235 240

His His Met Arg Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Leu Leu Gly Ala
 245 250 255

Leu Ser Asp Glu Gln Ala Leu Arg Ala Arg Arg Leu Met Asp Ser Ala
 260 265 270

Gly Val Thr Val Asp Tyr Glu Ser Val Pro Asp Ala Ser His Met Met
 275 280 285

His Gln Ser Ala Pro Ala Arg Tyr Val Glu Ile Phe Thr Arg Trp Ala
 290 295 300

Ala Ala Leu Ala Pro
 305

<210> 7

<211> 300

<212> PRT

5 <213> Rhodococcus triatome

<400> 7

Met Pro His Asp Tyr Glu Glu Lys Leu Val Asp Leu Gly Glu Ile Asp
 1 5 10 15

Leu Asn Tyr Ala Glu Ala Gly Ser Pro Asp Lys Pro Ala Leu Leu Leu
 20 25 30

Ile Pro Ser Gln Ser Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Glu Ala Met Gly
 35 40 45

Leu Leu Ala Glu Asp Tyr His Val Phe Ala Val Asp Met Arg Gly Gln
 50 55 60

Gly Arg Ser Thr Trp Thr Pro Gly Arg Tyr Ser Leu Asp Asn Phe Gly
 65 70 75 80

ES 2 843 204 T3

Asn Asp Leu Val Arg Phe Ile Asp Leu Val Ile Gly Arg Thr Val Ile
85 90 95

Val Ser Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val Val Ala Ala Trp Leu Ala Ala
100 105 110

Phe Ser Leu Pro Gly Gln Val Arg Ala Ala Leu Ala Glu Asp Ala Pro
115 120 125

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

Ala Ala Gly His Ile Phe Val Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Gly Asp Gln
145 150 155 160

Trp Ser Val Gly Asp Tyr Ala Gly Phe Leu Lys Ala Met Lys Ser Ser
165 170 175

Glu Val Pro Met Leu Arg Gln Val Pro Leu Pro Glu Thr Ala Pro Gln
180 185 190

Asn Leu Leu Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Ala Arg Ala Phe Tyr Glu Gly
195 200 205

Thr Val Ala Gln Thr Cys Pro His Asp Tyr Met Leu Ser Gln Val Lys
210 215 220

Val Pro Met Leu Val Thr His His Ala Arg Met Ile Asp Glu Ala Thr
225 230 235 240

Ser Gly Leu Val Gly Ala Met Ser Asp Leu Gln Val Gln Lys Ala Ala
245 250 255

Glu Ile Ile Arg Gly Thr Gly Val Gln Val Asp Val Val Asp Leu Pro
260 265 270

Glu Ala Pro His Ile Leu His Gln Leu Ala Pro Lys Glu Tyr Val Glu
275 280 285

Ile Leu Asn Asn Trp Val Glu Lys Leu Pro Pro Val
290 295 300

<210> 8

<211> 307

<212> PRT

5 <213> *Hirschia baltica*

<400> 8

ES 2 843 204 T3

Met Ile Gln Asn Asn Lys Thr Ala Pro Tyr Lys Tyr Lys Glu Lys Leu
 1 5 10 15

Val Asp Leu Gly Glu Ile Lys Met Asn Tyr Ile Val Ala Gly Ala Asp
 20 25 30

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

Gly Phe Glu Ala Ala Ile Glu Lys Leu Glu Ser Asn Phe Gln Val Phe
 50 55 60

Ala Ile Asp Leu Arg Gly Gln Gly Lys Ser Thr Gln Thr Pro Gly Arg
 65 70 75 80

Tyr Ser Leu Asn Leu Met Gly Asn Asp Leu Val Arg Phe Ile Ser Leu
 85 90 95

Val Ile Lys Arg Pro Val Ile Val Ser Gly Asn Ser Ser Gly Gly Leu
 100 105 110

Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ala Met Pro Asn Gln Ile Arg Ala
 115 120 125

Ile His Cys Glu Asp Ala Pro Phe Phe Thr Ala Glu Lys Ala Pro Leu
 130 135 140

Tyr Gly His Ala Ile Gln Gln Ala Ala Gly Pro Ile Phe Ser Leu Met
 145 150 155 160

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

Lys Ala Ala Gln Ala Lys Asp Thr His Pro Ala Asn Lys Met Ile Ser
 180 185 190

Gln Val Glu Gln Pro Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp Pro Glu Trp
 195 200 205

Gly Arg Ala Phe Ile Glu Gly Lys Phe Asn Leu Asn Ser Pro His His
 210 215 220

Thr Leu Leu Ser Asp Ile Lys Thr Pro Met Leu Tyr Thr His His Met
 225 230 235 240

Arg Phe Glu Asp Pro Gln Thr Gly Leu Leu Ile Gly Ala Thr Ser Asp

ES 2 843 204 T3

145 150 155 160

Pro Ile Phe Val Leu Trp Ala Lys Trp Leu Gly Pro Gln Trp Ser Val
165 170 175

Gly Asp Trp Asp Gly Met Val Ala Ala Ala Pro Arg Glu Leu Pro Glu
180 185 190

Phe Leu His Pro Gly Ile Ala Phe Leu Phe Gly Asp Gly Thr Gly Glu
195 200 205

Gly Ala Ala Ala Thr Pro Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp Pro Glu
210 215 220

Trp Ala Gln Ala Trp Ala Thr Asp Val Ala Asn Ala Gly Cys Asp His
225 230 235 240

Ala Thr Met Leu Ala Gln Asn Arg Val Pro Val Leu Leu Thr His His
245 250 255

Phe His Leu Thr Asp Pro Asp Thr Gly Gln Leu Met Gly Ala Met Thr
260 265 270

Asp Ile Gln Ala Gln Gln Ala Arg Arg Leu Leu Ala Ala Thr Gly Gln
275 280 285

Pro Val Thr Phe Thr Ala Leu Asp Ala Pro His Thr Met His Asp Pro
290 295 300

Glu Pro Glu Arg Tyr Phe Glu Val Leu Thr Glu Trp Ala Ser Ala Leu
305 310 315 320

Asp

<210> 10

<211> 319

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium vaccae

<400> 10

Met Gly Arg Tyr Ala Gly Val Phe Gly Pro His Ala Pro Glu Ser Thr
1 5 10 15

Tyr Val Gly His Ala Tyr Pro Glu Gln Leu Phe Asp Thr Gly Glu Val
20 25 30

Arg Leu Asn Tyr Ala Val Ala Gly Asp Ala Ser Ala Ser Pro Leu Leu

ES 2 843 204 T3

<400> 11

Met Gly Arg Tyr Ala Gly Val Phe Gly Pro His Ala Pro Glu Ala Thr
1 5 10 15

Tyr Val Glu His Gly Tyr Pro Glu Arg Leu Phe Asp Thr Gly Glu Val
20 25 30

Gln Leu Asn Tyr Val Val Ala Gly Asp Ala Ala Ala Pro Pro Leu Leu
35 40 45

Leu Ile Pro Gly Gln Ser Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Ala Ala Ile
50 55 60

Pro Leu Leu Ala Arg His Phe His Val His Ala Val Asp Leu Arg Gly
65 70 75 80

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

Gly Asn Asp Leu Val Arg Phe Leu Asp Gly Val Ile Gly Arg Pro Ala
100 105 110

Phe Val Ser Gly Leu Ser Ser Gly Gly Leu Ala Ser Ala Trp Leu Ser
115 120 125

Ala Phe Ala Lys Pro Gly Gln Val Val Ala Ala Cys Trp Glu Asp Pro
130 135 140

Pro Phe Phe Ser Ser Glu Thr Ala Pro Ile Val Gly Pro Pro Ile Thr
145 150 155 160

Asp Ser Ile Gly Pro Leu Phe Gly Met Trp Ala Arg Tyr Leu Gly Asp
165 170 175

Gln Trp Ser Val Gly Asp Trp Asp Gly Phe Val Ala Ala Val Pro Thr
180 185 190

ES 2 843 204 T3

Glu Leu Ala Asp Trp Gln Ala His Val Ala Leu Val Val Gly Thr Ala
 195 200 205

Asp Pro Pro Gln Asn Leu Arg Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Gly Lys Ala
 210 215 220

Phe Ile Thr Gly Thr Phe Ala Ala Ser Cys Pro His His Val Met Leu
 225 230 235 240

Ser Lys Val Lys Val Pro Val Leu Tyr Thr His His Phe Arg Met Ile
 245 250 255

Asp Glu Gly Ser Gly Gly Leu Ile Gly Ala Cys Ser Asp Ile Gln Ala
 260 265 270

Gly Arg Val Thr Gln Leu Ala Lys Ser Gly Gly Arg Ser Val Thr Tyr
 275 280 285

Arg Ser Phe Pro Met Met Ala His Ser Met His Gly Gln Asp Pro Ala
 290 295 300

Leu Phe Ser Glu Thr Leu Val Glu Trp Phe Ser Arg Phe Thr Gly
 305 310 315

<210> 12
 <211> 322
 <212> PRT
 5 <213> *Gordonia effusa*

<400> 12
 Met Pro Lys Ser Glu Ala Ala Asp Arg Ala Asp Ser Phe Val Ser His
 1 5 10 15

Asp Phe Lys Glu Asn Ile Val Asp Leu Gly Glu Ile Arg Met Asn Tyr
 20 25 30

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

Gln Gly Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Ala Ala Ile Pro Leu Leu Ala
 50 55 60

Lys His Phe Gln Val Phe Ala Ile Asp Leu Arg Gly Gln Gly Arg Thr
 65 70 75 80

Thr Trp Thr Pro Gly Arg Tyr Thr Leu Asp Ile Phe Gly Asn Asp Val
 85 90 95

ES 2 843 204 T3

Val Arg Phe Ile Asp Leu Val Ile Gly Arg Glu Thr Leu Ile Ala Gly
 100 105 110

Asn Ser Ser Gly Gly Leu Ile Gly Ala Trp Leu Ala Ala Phe Ala Lys
 115 120 125

Pro Gly Gln Val Arg Ala Val Met Leu Glu Asp Pro Pro Leu Phe Ala
 130 135 140

Ser Glu Ile Arg Pro Pro Tyr Gly Pro Gly Ile Trp Gln Gly Leu Gly
 145 150 155 160

Pro Met Phe Ala Ala Trp Ala Lys Trp Leu Gly Pro Gln Trp Ser Ile
 165 170 175

Gly Asp Trp Asp Gly Met Val Lys Ala Leu Pro Asp Glu Leu Pro Glu
 180 185 190

Asp Leu Leu Pro Gly Ile Gly Phe Met Leu Gly Asp Gly Glu Ser Asp
 195 200 205

Gly Ala Ala Pro Thr Pro Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp Pro Glu
 210 215 220

Trp Gly Ala Ser Trp Ala Ser Gly Phe Ala Asn Thr Gly Cys Glu His
 225 230 235 240

Glu Ala Val Ile Ser Gln Val Arg Val Pro Val Leu Leu Thr His His
 245 250 255

Phe Arg Gln Ile Asn Glu Glu Thr Gly His Leu Met Gly Ala Leu Ser
 260 265 270

Asp Leu Gln Ala Ala Gln Val Arg His Ile Ile Glu Glu Val Ala Gly
 275 280 285

Gln Glu Val Thr Tyr Val Ser Leu Asp Ala Pro His Thr Met His Glu
 290 295 300

Pro Gln Pro Glu Arg Tyr Thr Asp Val Leu Leu Asp Trp Val Lys Lys
 305 310 315 320

Leu Gly

<210> 13

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Togninia minima

<400> 13

ES 2 843 204 T3

Met Asn Tyr Ala Thr Ala Gly Ser Ser Asp Lys Pro Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Val Pro Gly Gln Ser Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Met Ala Met Trp
 20 25 30

Leu Leu Lys Asp Asp Tyr Gln Val Phe Ala Val Asp Met Arg Gly Gln
 35 40 45

Gly Gln Ser Thr Trp Thr Pro Gly Arg Tyr Ser Leu Asp Thr Phe Gly
 50 55 60

Asn Asp Leu Val Lys Phe Ile Asp Ile Val Ile Lys Arg Pro Val Val
 65 70 75 80

Val Ser Gly Leu Ser Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Trp Leu Ser Ala
 85 90 95

Phe Ala Lys Pro Gly Gln Ile Arg Ala Ala Val Tyr Glu Asp Pro Pro
 100 105 110

Leu Phe Ala Ser Gln Ser Lys Pro Ala Ile Gly Gln Ser Val Met Gln
 115 120 125

Thr Val Ala Gly Pro Phe Phe Asn Leu Trp Tyr Lys Trp Leu Gly Ala
 130 135 140

Gln Trp Thr Ile Gly Asp Gln Ala Gly Met Val Ala Ala Met Pro Lys
 145 150 155 160

Glu Ile Pro Ala Trp Ile Leu Gln Tyr Leu Gly Asn Thr Thr Ser Gly
 165 170 175

Pro Thr Gly Leu Asp Leu Thr Leu Asn Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Gly
 180 185 190

His Gly Phe Val Ser Gly Thr Val Asp Ala Thr Cys Asp His Glu Ala
 195 200 205

Met Leu Thr His Val Lys Val Pro Val Leu Phe Thr His His Ser Arg
 210 215 220

Ala Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Asn Leu Ile Gly Ser Val Ser Asp Thr
 225 230 235 240

ES 2 843 204 T3

Gln Val Ser Tyr Ala Gln Gly Leu Ile Thr Thr Asn Gly Asn Gln Ser
245 250 255

Phe Thr Leu Lys Asn Phe Pro Leu Ala Ser His Asp Met His Asn Ser
260 265 270

Asp Pro Ala Thr Tyr Val Ser Ala Ile Thr Thr Trp Met Ala Ser Leu
275 280 285

Gly Ile Gly Ser Ala Val Ile Pro Gly Pro Val Lys Val Ala Ser Ala
290 295 300

Ser Ala Gln Val Ser Ala Ala Ser Thr Ala Pro Pro Ser Cys Thr Ser
305 310 315 320

Thr Ser Ala Pro Ser Thr Gly His
325

<210> 14

<211> 280

<212> PRT

5 <213> Actinosynnema mirum

<400> 14

Met Thr Val Val Asp Pro Pro Ala Pro Arg Asp Phe Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Leu Gly Glu Val Val Leu Asn His Ala Glu Ala Gly Ser Pro
20 25 30

Asp Arg Pro Ala Leu Val Pro Val Pro Glu Gln Gly Gly Ser Trp Trp
35 40 45

Ser Tyr Glu Arg Val Met Pro Leu Pro Ala Arg Asp Phe His Val Phe
50 55 60

Ala Val Asp Leu Arg Gly Arg Gly Arg Ser Thr Arg Thr Pro Arg Arg
65 70 75 80

Tyr Ser Leu Asp Asp Phe Gly Asn Asp Leu Val Arg Phe Leu Ala Leu
85 90 95

Val Val Arg Arg Pro Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val
100 105 110

Leu Ala Ala Trp Ser Ser Ala Tyr Ala Met Pro Gly Gln Val Arg Ala
115 120 125

ES 2 843 204 T3

Val Leu Leu Glu Asp Pro Pro Leu Phe Ser Ser Glu Leu Thr Pro Val
 130 135 140

Cys Gly Pro Gly Val Arg Gln Ala Ala Gly Pro Leu Phe Glu Leu Leu
 145 150 155 160

Ser Thr His Leu Gly Asp Gln Trp Gly Gly Gly Arg Pro Gly Arg Val
 165 170 175

His Gly Gly Val Pro Arg Leu Gly Leu Ala Ala Ala Ala Val Arg
 180 185 190

Val Ala Arg Arg Ala Ala Ala Thr Asp Ala Arg Gly Arg Pro Gly Ala
 195 200 205

Ala Arg Gly Arg Pro Ala Gly Val Gly Gly Ala Ala Arg Arg Gly Arg
 210 215 220

Gly Gly Arg Glu Arg Thr Gly Thr Thr Thr Val Leu Ser Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Gly Ser Arg Thr Ser Gly Thr Gly Arg Cys Arg Lys Pro Phe Arg Leu
 245 250 255

Arg Gln Trp Trp Ala Gly Gly Ala Arg Gly Pro Pro Pro Pro Arg Gln
 260 265 270

Ile Arg Ala Asp Val Arg Thr Arg
 275 280

<210> 15

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Kutzneria albida

<400> 15

Met Ser Val Pro Val Thr Pro Ser Ala Arg Asn Val Phe Val Pro His
 1 5 10 15

Ala Phe Pro Glu Lys Gln Ile Asp Leu Gly Glu Val Val Leu Asn Tyr
 20 25 30

Ala Glu Ala Gly Thr Pro Asp Lys Pro Ala Leu Leu Leu Leu Pro Glu
 35 40 45

Gln Thr Gly Ser Trp Trp Ser Tyr Glu Pro Ala Met Gly Leu Leu Ala
 50 55 60

ES 2 843 204 T3

Glu His Phe His Val Phe Ala Val Asp Leu Arg Gly Gln Gly Arg Ser
 65 70 75 80
 Thr Trp Thr Pro Gly Arg Tyr Ser Leu Asp Asn Phe Gly Asn Asp Leu
 85 90 95
 Val Arg Phe Ile Ala Leu Ala Ile Arg Arg Pro Val Val Val Ala Gly
 100 105 110
 Cys Ser Ser Gly Gly Val Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ala Leu
 115 120 125
 Pro Gly Gln Ile Arg Gly Ala Leu Cys Glu Asp Ala Pro Leu Phe Ala
 130 135 140
 Ser Glu Leu Thr Pro Ala His Gly His Gly Val Arg Gln Gly Ala Gly
 145 150 155 160
 Pro Val Phe Glu Leu Tyr Arg Asp Tyr Leu Gly Asp Gln Trp Ser Val
 165 170 175
 Gly Asp Trp Ala Gly Leu Val Ala Ala Ala Gln Ala Ser Pro Ala Lys
 180 185 190
 Met Met Ser Leu Phe Lys Met Pro Gly Glu Pro Pro Gln Asn Leu Arg
 195 200 205
 Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Ala Arg Val Phe Phe Glu Gly Thr Val Gly
 210 215 220
 Leu His Cys Pro His Asp Arg Met Leu Ser Gln Val Lys Thr Pro Val
 225 230 235 240
 Leu Ile Thr His His Ala Arg Thr Thr Asp Pro Glu Thr Gly Glu Phe
 245 250 255
 Leu Gly Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ala Glu Arg Ala Gln Ala Ile Ile
 260 265 270
 Arg Ala Ala Gly Val Pro Val Asp Tyr Gln Ser Phe Pro Asp Ala Ala
 275 280 285
 His Ala Met His Thr Thr Glu Pro Ala Arg Tyr Ala Ala Val Leu Thr
 290 295 300
 Ala Trp Ala Ala Lys Leu Pro Pro Val Ala Asp Thr Ser Pro Ser Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Ser Ala His Val
 325

- 5
- <210> 16
 - <211> 987
 - <212> ADN
 - <213> Rhodococcus erythropolis
 - <220>
 - <221> característica_misc

ES 2 843 204 T3

<223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 1

<400> 16

```

atggcgaag aaggaactag gtccgaagca gcggatgctg ccacacaagc gagacagcta      60
cccgattcgc ggaacatctt tgtctcgcac cgatttcgag aaaggcaggt cgatctcggg      120
gaagtgggta tgaacttcgc ggaggcgggc tctccggaca acccggcact gtcctctctc      180
cccgagcaga ccgggtcgtg gtggagtac gagccagtga tgggtcttct ggagagaaac      240
tttcatgtct ttgccgtcga tatccgtggg caaggctcga gtacctggac gccacggcga      300
tacagcctgg acaacttcgc caatgatctg gtgcgtttca tcgctctggt catcaagcgc      360
cctgtcgtcg tggcagggaa ctctctcggg gggctgctgg ccgctcggct ctcggcgtac      420
gcgatgcccg gccagatccg tgcagcattg tgtgaggacg caccgttctt tgcgtcggag      480
ttggtccccg catacggta ctcggttctg caggcggcgg gtccggcatt cgagttgtac      540
cgggacttcc tcggggacca gtggctcatt ggggactgga aagggttcgt tgaggcagcc      600
aaagcgtcgc cggcaaaggc tatgcaatta tttccgacct cggatgaggc gccgcagaat      660
ctcaaggaat acgaccgga atgggggcgc gcattcttcg aagggactgt ggcactgcac      720
tgcccacacg acaggatgct ctgcgaagtc aagacaccaa ttctcatcac tcaccacggg      780
cggacgatcg accccgagac gggcgagctg ttggcgcgcc tctccgacct tcaggcagag      840
catgcgcagg acatcattcg gtctgcgggc gttcgggtgg actatcagtc gcaccccgac      900
gcgcttcaca tgatgcatct gttcgatccc gctcgttacg cggagatctt gacatcctgg      960
tccgcaacac tgctcgcgaa cgactag      987
    
```

<210> 17

5 <211> 987

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> ORF era un codón optimizado y por tanto se diferencia de la secuencia de ADN que se produce de forma natural

<400> 17

```

atggcagaag aaggcaccg tagcgaagca gcagatgcag caaccaggc acgtcagctg      60
    
```

ES 2 843 204 T3

ccgatagcc gtaacatttt tgtagccat cgttttccgg aacgtcaggt tgatctgggt 120
 gaagttgta tgaattttgc agaagcaggt agtccggata atccggcatt actgctgctg 180
 ccggaacaga ccggtagttg gtggtcttat gaaccggta tgggtctgct ggcagaaac 240
 tttcatgttt ttgcagttga tattcgtggt cagggtcgta gcacctggac accgctgctg 300
 tatagcctgg ataattttgg taatgatctg gtgcgtttta ttgccctggt tattaacgt 360
 ccggttggtt ttgcaggtaa tagcagcggg ggcctgctgg ctgcatggct gagcgcctat 420
 gcaatgcctg gtcagattcg tgcagcactg tgtgaagatg caccgttttt tgcaagcгаа 480
 ctggttctcg cctatggtca tagcgttctg caggcagcag gtccggcatt tgaactgtat 540
 cgtgattttc tgggtgatca gtggtcaatt ggtgattgga aaggttttgt tgaagcagca 600
 aaagcaagtc cggctaaagc aatgcagctg tttccgacac cggatgaagc accgcagaat 660
 ctgaaagaat atgatccgga atggggctcg gcattttttg aaggcaccgt tgcactgcat 720
 tgtccgcatg atcgtatgct gagccaggtt aaaaccccga ttctgattac ccatcatgca 780
 cgtaccatcg atccggaaac cgggtgaactg ctgggtgcac tgagtgatct gcaggccгаа 840
 catgcacagg atattattcg tagtgccggg gttcgtggtg attatcagag ccatcctgat 900
 gcactgcaca tgatgcacct gtttgatccg gcacgttatg cagaaattct gaccagtggg 960
 agcgcacacc tgcctgcaaa tgattaa 987

<210> 18

<211> 927

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>

<221> característica_misc

10 <223> La secuencia de ADN artificial codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 2

<400> 18

atggcagatc cggcacagcg tgatgtttat gttccgcatg catatccgga aaaacaggca 60
 gatctgggtg aaattacat gaattatgcc gaagccgggtg aacctgatat gcctgcagtt 120
 ctgctgattc cggaacagac cggtagttgg tggggttatg aagaagcaat gggctctgctg 180
 gcagaaaact ttcattgtta tgcagttgat ctgcgtggtc agggctcgtag cagctgggca 240
 ccgaaacggt atagcctgga taattttggt aatgatctgg tgcgttttat tgccttggtt 300
 gttaaacgtc cggttattgt tgcaggtaat agcagcgggtg gtgttctggc agcatggctg 360
 agcgcataata gcatgcctgg tcaggttcgt ggtgcactgt gtgaagatgc accgtttttt 420

ES 2 843 204 T3

gcaagcgaac tggttaccac ctgtggatcat agcattcgtc aggcagcagg tccgatgttt 480
 gaactgtttc gtacctatct gggcgatcag tggtcagttg gtgattggac cggctattgt 540
 cgtgcagcag atgcaagcag cagcccgatg gcacgttatt ttgttgca gaataattccg 600
 cagcacatgc gtgaatatga tccggaatgg gcacgtgcat tttgggaagg caccgttgca 660
 ctgcattgtc cgcataaaca gctgctgacc caggttaaaa caccggtgct gctgacacat 720
 cacatgcgcg atattgatcc tgataccggg catctggttg gtgccctgag tgatgaacag 780
 gcagcccgtg cacgtctgct gatggaaagt gccggtgta aagttgatta tgcaagcgtt 840
 ccggatgcac tgcacatgat gcaccagttt gatccgcctc gttatgttga aatctttacc 900
 cagtgggcag caaccctggc agcataa 927

<210> 19
 <211> 930
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>
 <221> característica_misc
 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 3

10

<400> 19
 atggttacca gtccggcact gcgtgatgtt catgttcgc atgcatatcc ggaacagcag 60
 gttgatctgg gtgaaattac catgaattat gccgaagccg gtgatccggg tcgtccggca 120
 gttctgctga tcccgaaca gaccgtagt tgggtgctt atgaagaagc aatgggtctg 180
 ctggcagaac attttcatgt ttatgcagtt gatctgcgtg gtcagggctg tagcagctgg 240
 accccgaaac gttatagcct ggataatfff ggtaatgatc tgggtgcgtt tattgccctg 300
 gttgttcgtc gtccggttgt tggtgcaggt aatagcagcg gtggtgttct ggcagcatgg 360
 ctgagcgcac atagcatgcc tggtcagatt cgtggtgtgc tgtgtgaaga tccgcctttt 420
 tttgcaagcg aactggttcc ggcacatggt catagcgttc gtcaggggtc aggtccggtt 480
 tttgaaactgt ttcgtaccta tctgggcgat cagtggtcag ttggtgattg ggaaggtttt 540
 cgtagcgcag cagatgcaag cgcaagcccg atggcacgta gctttgttgc agataccatt 600
 ccgcagcatc tgaagaata tgatccggaa tgggcacgtg cattttatga aggcaccgtt 660
 ggtctgaatt gtccgcatga acgtatgctg aatcgtgta atacaccggt gctgctgacc 720
 catcacatgc gtggcaccga tccggaacc ggtaatctgc tgggtgcact gaggatgaa 780
 caggcagcac aggtgcgtcg tctgatggaa agtgccggtg ttaaagttga ttatgaaagc 840
 gttccggatg caagccacat gatgcaccag agcgatccgg cacgttatgc agaaattctg 900
 accccgtgga ccgcagcact ggcaccgtaa 930

<210> 20
 <211> 930
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

20

ES 2 843 204 T3

<220>

<221> característica_misc

<223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 4

<400> 20

atggttacca	gtccggcact	gcgtgatgtt	catgttccgc	atgcatatcc	ggaacagcag	60
gttgatctgg	gtgaaattac	catgaattat	gccgaagccg	gtgatcctga	tcgtccggca	120
gttctgctga	tcccggaaca	gaccggtagt	tggtggcat	atgaagaagc	aatgggtctg	180
ctggcagaac	attttcatgt	ttatgcagtt	gatctcgtg	gtcagggctc	tagcagctgg	240
accccgaaac	gttatagcct	ggataatttt	ggtaatgac	tggtgcgttt	tattgccctg	300
gttgttaaac	gtccggttgt	tggtgcaggt	aatagcagcg	gtggtgttct	ggcagcatgg	360
ctgagcgcac	atagcatgcc	tggtcagctg	cgtggtgtgc	tgtgtgaaga	tccgcctttt	420
tttgcaagcg	aactggttcc	ggcacatggt	catagcgttc	gtcaggggtc	aggtccggtt	480
tttgaactgt	ttcgtaccta	tctgggcgat	cagtggtcag	ttagcgattg	ggaaggtttt	540
tgtcgtgcag	ccggtgcaag	cgcaagccc	atggcacgta	gctttggttc	agatggtatt	600
ccgcagcatc	tgaagaata	tgatccgga	tgggcacgtg	catttcatga	aggcaccgtt	660
ggctctgaatt	gtccgcatga	acgtatgctg	ggctcgtgta	atacaccggt	gctgctgacc	720
catcatatgc	gtggcaccga	tccggaaacc	ggtaatctgc	tggtgact	gagtgatgaa	780
caggcagcac	aggcacgtct	gctgatggaa	agtgcgggtg	ttcgtgttga	ttatgaaagc	840
gttccggatg	caagccatat	gatgcaccag	agcgatccgg	cacgttatgc	agaaatcttt	900
5	accggtggg	cagcagccct	ggcaccgtaa			930

<210> 21

<211> 930

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>

<221> característica_misc

<223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO : 5

15

<400> 21

ES 2 843 204 T3

```

atggttacca gtccggcact gcgtgatggt catgttccgc atgcatatcc ggaacagcag      60
gttgatctgg gtgaaattac catgaattat gccgaagccg gtgatccggg tcgtccggca      120
gttctgctga tcccggaaca gaccggtagt tgggtgtctt atgaagaagc aatgggtctg      180
ctggcagaac attttcatgt ttatgcagtt gatctgcgtg gtcagggtcg tagcagctgg      240
accccgaaac gttatagcct ggataatfff ggtaatgatc tgggtgcgttt tatggcactg      300
gttgttcgtc gtccgggttg tgttgcaggt aatagcagcg gtggtgttct ggcagcatgg      360
ctgagcgcac atagcatgcc tggtcagatt cgtggtgtgc tgtgtgaaga tccgcctfff      420
tttgcaagcg aactggttcc ggcacatggt catagcgttc gtcagggtcg aggtccggtt      480
tttgaactgt ttcgtaccta tctgggcat cagtggtcag ttggtgattg ggaaggtfff      540
cgtagcgcag ccggtgcaag cgcaagcccg atggcacgta gctttgttgc agataccatt      600
ccgcagcacc tgaagaata tgatccgga tgggcacgtg cattttatga aggcaccgtt      660
ggtctgaatt gtccgcatga acgtatgctg aatcgtgta atacaccggt gctgctgacc      720
catcacatgc gtggcaccga tccggaaacc ggtaatctgc tgggtgcact gaggatgaa      780
caggcagcac aggcacgtcg tctgatggaa agtgccggtg ttaaagttga ttatgaaagc      840
gttccggatg caagccacat gatgcaccag agcgatccgg cacgttatgc agaaattctg      900
accccgtagg cagcagccct ggcaccgtaa                                     930

```

<210> 22

<211> 930

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>

<221> característica_misc

10 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO : 6

<400> 22

```

atggttacca gtccggcact gcgtgatggt catgttccgc atgcatatcc ggaacagcag      60
gttgatctgg gtgaaattac catgaattat gccgaagccg gtgatcctga tcgtccggca      120
gttctgctga tcccggaaca gaccggtagt tgggtgtctt atgaagaagc aatgggtctg      180
ctgagcgaac attttcatgt ttatgcagtt gatctgcgtg gtcagggtcg tagcagctgg      240
accccgaaac gttatagcct ggataatfff ggtaatgatc tgggtgcgttt tattgccctg      300
gttgttaaac gtccgggttg tgttgcaggt aatagcagcg gtggtgttct ggcagcatgg      360

```

ES 2 843 204 T3

```

ctgagcgcac atagcatgcc tggtcagctg cgtggtgtgc tgtgtgaaga tccgcctttt 420
tttgcaagcg aactggttcc ggcacatggt catagcggtc gtcaggggtgc aggtccgggt 480
tttgaactgt ttcgtaccta tctgggggat cagtggtcag ttggtgattg ggaaggtttt 540
tgtcgtgcag ccggtgcaag cgcaagcccg atggcacgta gctttgttgc agatggtatt 600
ccgcagcatc tgcaagaata tgatccggaa tgggcacgtg ttttttatga aggcaccggt 660
ggtctgagct gtccgcatga acgtatgctg ggtcagggtta aaacaccggt gctgctgacc 720
catcacatgc gtggtatcga tccggaaacc ggtaactctg tgggtgcact gagtgatgaa 780
caggccctgc gtgcacgtcg tctgatggat agtgccggtg ttaccgttga ttatgaaagc 840
gttccggatg caagccacat gatgcaccag agcgcaccgg cacgttatgt tgaaatcttt 900
acccttggg cagcagccct ggcaccgtaa 930

```

<210> 23
 <211> 903
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>
 <221> característica_misc
 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO : 7

10

```

<400> 23
atgccgcacg attatgaaga aaaactgggt gatctgggcg aaatcgatct gaattatgca 60
gaagcaggta gtccggataa accggcactg ctgctgattc cgagccagag cgaaagtgg 120
tggggctatg aagaagcaat gggctctgctg gccgaagatt atcatgtttt tgcagttgat 180
atgctgggtc agggctcgtag cacctggaca ccgggtcgtt atagcctgga taattttggt 240
aatgatctgg tgcgctttat cgatctggtt attggtogta ccgttattgt tagcggtaat 300
agcagcggtg gtgttgttgc agcatggctg gcagcattta gcctgcctgg tcaggttcgt 360
gcagcactgg cagaagatgc accgtttttt gcaagcgaac tggaccgaa agtgggtcat 420
accattcgtc aggcagcagg tcatattttt gttaactggc gtgattatct gggatgatcag 480
tggtcagttg gtgattatgc aggttttctg aaagcaatga aaagcagcga agttccgatg 540
ctgctcaggg ttccgctgcc ggaaaccgca ccgcagaatc tgctggaata tgatccggaa 600
tgggcacgtg ctttttatga aggcaccggt gcacagacct gtccgcatga ttatatgctg 660
agccaggtta aagtgcctat gctggttacc catcatgcac gtatgattga tgaagcaacc 720
agcggctcgg ttggtgcaat gagcgtctg caggttcaga aagcagcaga aattattcgt 780
ggcaccggtg ttcaggttga tgttggtgat ctgccggaag caccgcatat tctgcatcag 840
ctggcaccga aagaatatgt ggaaattctg aataactggg tggaaaaact gcctccgggt 900
taa 903

```

15

<210> 24
 <211> 924
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>

<221> característica_misc

5 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 8

<400> 24

```

atgatccaga acaataaaac cgcaccgtat aaatacaaag aaaaactggt tgatctgggc      60
gaaatcaaaa tgaactatat tgttgccggt gcagatgta gtccggcact gctgctgatt    120
ccgggtcaga ccgaaagttg gtggggtttt gaagcagcaa ttgagaaact ggaaagcaac    180
tttcaggtgt ttgcaattga tctgctggt cagggtaaaa gcaccagac accgggtcgt    240
tatagcctga atctgatggg taatgatctg gttcgtttta ttagcctggt tattaaacgt    300
ccggttattg ttagcggtaa tagcagcggg ggtctgctgg cagcatgget gagcgcctat    360
gcaatgccga atcagattcg tgcaattcat tgtgaagatg caccgttttt taccgcagaa    420
aaagcaccgc tgtatggtca tgcaattcag caggcagcag gtccgatttt tagcctgatg    480
agcaaatttc tgggtgatca gtggtcaatt aacaattggg aaggctctgaa agcagcacag    540
gcaaaagata cccatccggc aaacaaaatg attagccagg ttgaacagcc tccgcagcat    600
ctgaaagaat atgatccgga atggggctcg gcatttattg aaggcaaatt taacctgaac    660
agtccgcata ataccctgct gagcgacatt aaaacccgga tgctgtatac ccatcacatg    720
cgttttgaag atccgcagac aggtctgctg attggtgcaa ccagcgattt tcaggcaagc    780
aaaatcaaag aaattgccct gaaaaccggc aatagcttcg aactgattga tgcaccggat    840
gcatttcata gtatgcatga agccgatccg cagcgttttg ttgatattct gaccagctgg    900
attgaacgtc tgaatctgca gtaa                                     924
    
```

<210> 25

<211> 966

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>

15 <221> característica_misc

<223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 9

<400> 25

ES 2 843 204 T3

atgggtatta gogaagcagc agatcgtgca gatacctttg ttgcacataa atttgaagaa 60
cagctggttg atctgggtga aattcgtatg aattatgttg cagccgggtga tccgaccagt 120
ccggcactgc tgctgattcc ggcacagggt gaaagttggt ggggttatga aaatgcaatt 180
accctgctgg caaatgattt tcgtgttttt gcaattgatc tgcgtggtca gggctgtagc 240
acctggacac cgggtcgtta taatctgaat acctggggta atgatgtgga acgctttatt 300
gatctggtta ttggtcgtcc gaccctggtt gcagtaata gcagcgggtg tgttattgca 360
gcatggctgg cagcctatgc aaaaccgggt cagattcgtg gtgcaatgct ggaagatccg 420
cctctgtttg caagccaggc agcaccgcct tatggtccgg gtattatgca gaccctgggt 480
ccgatttttg ttctgtgggc aaaatggctg ggtcccagcgt ggtcagttgg tgattgggat 540
ggtatggttg cagcggcacc gcgtgaactg ccggaatttc tgcacccggg taccgcattt 600
ctgtttggtg atggcaccgg tgaaggtgca gcagcaaccc ctccgcagca tctgaaagaa 660
tatgatccgg aatgggcaca ggcattggca accgatggtg caaatgcagg ttgtgatcat 720
gcaacctatg tggcacagaa tcgtgttccg gttctgctga cccatcattt tcatctgacc 780
gatccgata caggccagct gatgggtgca atgaccgata ttcaggcaca gcaggcacgt 840
cgtctgctgg cagcaaccgg tcagccggtt accttaccg cactggatgc accgcatacc 900
atgatgatc ctgaacctga acgttatttt gaagttctga ccgaatgggc aagtgcactg 960
gattaa 966

<210> 26

<211> 960

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>

<221> característica_misc

10 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 10

<400> 26

atgggtcgtt atgccggtgt ttttgggtccg catgcaccgg aaagcaccta tgttggtcat 60
gcatatccgg aacaactggt tgataccggt gaagttcgtc tgaattatgc agttgccggt 120
gatgcaagcg caagtccgct gctgctgatt ccgggtcaga ccgaaagttg gtggggttat 180

ES 2 843 204 T3

gaaccggcaa tgggtctgct ggcagaacat tttcatgttc atgcagttga tctgctggt 240
 cagggtcgta gcacccttac accgctcgt tataccctgg ataatttgg taatgatctg 300
 gtgctgttcc tggatggtgt tattggtcgt ccggcatttg ttagcggctct gagcagcgg 360
 ggtctgctga gcgcatggct gagcgccttt gcagaaccgg gtcaggttct ggcagcatgt 420
 tatgaagatc cgcctttttt tagcagcga ctggaccgg tgattggtcc gggctctgatg 480
 agcaccgttg gtcgctgtt tgcactgtat gttaaatc tgggtgatca gtggtcaatt 540
 ggtgattggg atggttttgt tgcaggcga ccgcaagaac tggcaggttg gcaggcacat 600
 gttgcaactg caggcgttac agcagaaccg cctcagcatc tgaagaata tgatccggaa 660
 tggggtcgtg catttgttgg tggcaccttt accaccggtt gtcgcatca ggttatgctg 720
 agccaggtta aagttccggt tctgtttacc catcattttc gtatgctgga tgatgaaagc 780
 ggtagctga ttggtgcagc aaccgatgat caggcagcac gtgttgttga actggtttaa 840
 aatagtggg caccgctgac ctatcgtagc tttccgatga tgggtcatag tatgcatgca 900
 caagatccgg cactgtttgc aggcaccctg gttgattggt ttaccgcagc acgtagctaa 960

<210> 27
 <211> 960
 <212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>
 <221> característica_misc
 10 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 11

<400> 27
 atgggtcgtt atgcccgtgt ttttggccg catgcaaccg aagcaaccta tgttgaacat 60
 ggttatccgg aacgtctgtt tgataccggt gaagtgcagc tgaattatgt tgttgcgggt 120
 gatgcagcag caccgcctct gctgctgatt ccgggtcaga gcgaaagttg gtggggttat 180
 gaagcagcaa tccgctgct ggcacgtcat tttcatgttc atgcagttga tctgctggt 240
 cagggtcgta gcacccttac accgggtcgc tataccctgg ataatttgg taatgatctg 300
 gtgctgttcc tggatggtgt tattggtcgt ccggcatttg ttagcggctct gagcagcgg 360
 ggtctggcaa gcgcatggct gagcgcattt gcaaaaaccg gtcaggttgt tgcagcatgt 420
 tgggaagatc cgcctttttt tagcagcga accgcaccga ttgttggctc gcctattacc 480
 gatagcattg gtcgctgtt tggatgtgg gcacgttacc tgggtgatca gtggtcagtt 540
 ggtgattggg atggttttgt tgccgcagtt ccgaccgaac tggcagattg gcaggcacat 600
 gttgcaactg ttgttggcac cgcagatcct ccgcagaatc tgcgtgaata tgatccggaa 660
 tggggtaaag catttattac cggcaccttt gcagcaagct gtcgcatca tgttatgctg 720
 agcaaagtta aagttccggt tctgtatacc catcactttc gcatgattga tgaaggtagt 780
 ggtggtctga ttggtgcatg tagcgatatt caggcaggtc gtgttaccga gctggcaaaa 840
 tcaggtggtc gtagcgttac ctatcgtagc tttccgatga tggcacatag catgcatggt 900
 caagatccgg cactgtttag cgaaaccctg gttgaatggt ttagccgttt taccggttaa 960

ES 2 843 204 T3

<210> 28
 <211> 969
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>
 <221> característica_misc
 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 12

10 <400> 28
 atgccgaaaa gcgaagcagc agatcgtgca gatagctttg ttagccatga tttcaaagaa 60
 aacattgtgg atctgggcga aatccgcatg aattatgttg ttcagggcaa caaaaaagt 120
 ccggcactgc tgcgtattcc ggcacagggt gaaagttggt ggggttatga agcagcaatt 180
 ccgctgctgg caaaacattt tcagggtttt gcaattgatc tgcgtggtca gggctgtacc 240
 acctggacac cgggtcgta taccctggat atttttgta atgatgtggt gcgctttatc 300
 gatctggta ttggtcgtga aaccctgatt gcagtaata gcagcggtyg tctgattggt 360
 gcatggctgg cagcatttgc aaaaccgggt caggttcgtg cagttatgct ggaagatccg 420
 cctctgtttg caagcgaaat tcgtccgcct tatggccgg gtatttgca gggctctgggt 480
 ccgatgtttg cagcatgggc aaaatggctg ggtccgcagt ggtcaattgg tgattgggat 540
 ggtatggta aagcactgcc ggtgaactg ccggaagatc tgctgcctgg tattggtttt 600
 atgctgggtg atggtgaaag tgatggtgca gcaccgacc ctccgcagca tctgaaagaa 660
 tatgatccgg aatggggtgc aagctgggca agcggttttg ccaataccgg ttgtgaacat 720
 gaagcagta ttagccaggt gcgtgttccg gttctgctga cccatcattt tcgtcagatt 780
 aatgaagaaa ccggtcatct gatgggtgca ctgagcgatc tgcaggcagc acaggttcgt 840
 catatcattg aagaagttgc aggtcaagag gttacctatg ttagcctgga tgcaccgcat 900
 accatgcatg aaccgcagcc ggaacgttat accgatgttc tgctggattg ggttaaaaaa 960
 ctgggttaa 969

<210> 29
 <211> 987
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>
 <221> característica_misc
 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 13

20 <400> 29

ES 2 843 204 T3

atgaattatg caaccgcagg tagcagcgat aaaccggcac tgctgctggt tccgggtcag 60
 agcgaagtt ggtgggggta tgaaatggca atgtggctgc tgaaagatga ttatcagggtt 120
 tttgcagttg atatgcgtgg tcagggtcag agtacctgga caccgggtcg ttatagcctg 180
 gatacctttg gtaatgatct ggtgaaattc atcgatatcg tgattaaacg tccggttgtt 240
 gttagcggtc tgagcagcgg tgggtgttgtg agcgcattggc tgagcgcatt tgcaaacct 300
 ggtcagattc gtgcagcagt ttatgaagat ccgcctctgt ttgcaagcca gagcaaaccc 360
 gcaattggtc agagtgttat gcagaccgtt gcaggtccgt tttttaacct gtggtataaa 420
 tggctgggtg cacagtggac cattggtgat caggcaggta tggttgcagc aatgccgaaa 480
 gaaattccgg catggattct gcagtatctg ggtaatacca ccagtggccc gaccggtctg 540
 gatctgacac tgaatgaata tgatccggaa tggggtcattg gttttgttag tggcaccgtt 600
 gatgcaacct gtgatcatga agcaatgctg acccatgtta aagttccggt tctgtttacc 660
 catcatagcc gtgcaattga tccgtatacc ggtaatctga ttggtagcgt tagcgatacc 720
 caggttagct atgcacaggg tctgattacc accaatggca atcagagctt taccctgaaa 780
 aactttccgc tggcaagcca tgatatgcat aattctgac cggcaacctg tgttagcgcg 840
 attaccacct ggatggcaag cctgggtatt ggtagtgcag ttattccggg tccggttaaa 900
 gttgcaagcg caagcgcaca ggttagcgca gcaagcaccg caccgcctag ctgtaccagc 960
 accagcgcac cgagcaccgg tcattaa 987

<210> 30

<211> 843

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ORF se optimizó en codones y, por tanto, difiere de la secuencia de ADN natural.

<220>

<221> característica_misc

10 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 14

<400> 30

ES 2 843 204 T3

atgaccggtg ttgatccgcc tgcaccgCGT gattttccgg aactgctggt tgatctgggt 60
 gaagttgttc tgaatcatgc agaagcaggt agtccggatc gtccggcact ggttccgggtg 120
 ccggaacagg gtggtagttg gtggtcttat gaacgtgta tgccgctgcc tgcacgcgat 180
 tttcatgttt ttgcagttga tctgctggtt cgtggctgta gcacccgtac accgctcgt 240
 tatagcctgg atgattttgg taatgatctg gttcgttttc tggccctggt tgttcgcctg 300
 ccggcagttg ttgcaggtaa tagcagcggg ggtgttctgg cagcatggtc aagcgcctat 360
 gcaatgcctg gtcaggttcg tgcagttctg ctggaagatc cgcctctgtt tagcagcгаа 420
 ctgacaccgg tttgtggtcc ggggtttcgt caggcagcag gtccgctggt tgaactgctg 480
 agcaccatc tggggcatca gtgggggtgt ggtcgtccgg gtcgtgttca tgggtggcgtt 540
 ccgctctggt gctctggcagc cgcagcagca gttcgtgttg cacgtcgtgc agcagcaacc 600
 gatgcaagtg gtcgcccctg tgcagcagct ggacgtcctg ccggtgttgg tgggtgcagct 660
 cgtcgcggtc gcggtggctg tgaacgcacc ggtacaacca ccgttctgag cggctctgacc 720
 ggtagccgta ccagcggcac cggtcgttgt cgtaaaccgt ttcgtctgctg tcagtgggtg 780
 gcagcgggtg cccgtggtcc tctccgcct cgtcagattc gcgcagatgt tcgtaccctg 840
 taa 843

<210> 31
 <211> 981
 <212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> característica_misc
 <223> La secuencia artificial de ADN codifica el polipéptido con SEQ ID NO: 15

<400> 31
 atgagcgttc cgtttacccc gagcgcacgt aatgtttttg ttccgcatgc atttccagag 60
 aaacaaattg atctgggtga agtggttctg aattatgcag aagcaggtac accggataaa 120
 ccggcattac tgctgctgcc ggaacagacc ggtagttggt ggtcttatga accggcaatg 180
 ggtctgctgg cagaacattt tcatgttttt gcagttgatc tgcgtggtca gggctcgtagc 240
 acctggacac cgggtcgtta tagcctggat aattttggtg atgatctggt gcgttttatt 300
 gcactggcaa ttcgtcgtcc ggttgttgtt gcaggttgta gcagcgggtg tgttctggca 360
 gcatggctga gcgcctatgc actgcctggt cagattcgtg gtgcactgtg tgaagatgca 420
 ccgctgtttg caagcgaact gacaccggca catggtcatg gtgttcgtca ggggtcaggt 480
 ccggtttttg aactgtatcg tgattatctg ggcgatcagt ggtcagttggt tgattgggca 540
 10 ggtctggttg cagcagcaca ggcaagtccg gcaaaaatga tgagcctggt taaaatgcct 600

ES 2 843 204 T3

```

gggtgaaccgc ctcaaatct gcgtgaatat gatccggaat gggcacgtgt tttttttgaa      660
ggcaccggtg gtctgcattg tccgcatgat cgtatgctga gccaggttaa aacaccggtt      720
ctgattacc c atcatgcacg taccaccgat ccggaaccg gtgaatttct gggtgactg      780
agcgaactgc aggcagaacg tgcacaggcc attattcgtg cagccggtgt tccggtgat      840
tatcagagct ttccggatgc agcacatgca atgcatacca cagaaccggc acgttatgca      900
gcagttctga ccgcatgggc agcaaaactg cctccggttg cagataccag cccgtcagca      960
gcagcaagcg cacatgttta a                                             981

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> resto de aminoácido

<220>
<221> PÉPTIDO
10 <222> (1)..(7)

<400> 32
Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly
1           5

<210> 33
<211> 7
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> resto de aminoácido

<220>
<221> PÉPTIDO
20 <222> (1)..(7)

<400> 33
Arg Thr Ile Asp Pro Glu Thr
1           5

<210> 34
<211> 7
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> resto de aminoácido

<220>
<221> PÉPTIDO
30 <222> (1)..(7)

<400> 34
Asp Ala Leu His Met Met His
1           5

<210> 35
<211> 7
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <223> resto de aminoácido

```

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

 <400> 35
 Ala Gly Asp Ser Ser Gly Gly
 5 1 5

 <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> resto de aminoácido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

 15 <400> 36
 Ala Gly Asp Ser Ser Leu Gly
 1 5

 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> resto de aminoácido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 25 <222> (1)..(7)

 <400> 37
 Ala Gly Gln Ser Ser Gly Gly

 1 5

 30 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> resto de aminoácido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

 <400> 38
 Ala Gly His Ser Ser Gly Gly
 40 1 5

 <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> resto de aminoácido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

<400> 39
Ala Gly Ser Ser Ser Gly Gly
 1 5

<210> 40
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 10 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

<400> 40
Ser Gly Asn Ser Ser Gly Gly
 1 5

<210> 41
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 20 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

<400> 41
Ser Gly Asp Ser Ser Gly Gly
 1 5

25 <210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

<400> 42
Ser Gly Gln Ser Ser Gly Gly
 35 1 5

<210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

45 <400> 43
Ser Gly His Ser Ser Gly Gly
 1 5

<210> 44
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> resto de aminoácido

 5 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

 <400> 44
Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly
 1 5

 10 <210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> resto de aminoácido

 15 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

 <400> 45
Arg Thr Ile Asp Pro Glu Thr
 20 1 5

 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> resto de aminoácido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

 30 <400> 46
Arg Asp Ile Asp Pro Asp Thr
 1 5

 <210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> resto de aminoácido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 40 <222> (1)..(7)

 <400> 47
Arg Gly Thr Asp Pro Glu Thr
 1 5

 <210> 48
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

 <400> 48
Arg Gly Ile Asp Pro Glu Thr
 5 1 5

 <210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> resto de aminoácido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

 15 <400> 49
 Asp Ala Leu His Met Met His
 1 5

 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> resto de aminoácido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 25 <222> (1)..(7)

 <400> 50
 Asp Ala Ser His Met Met His
 1 5

 <210> 51
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> resto de aminoácido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 35 <222> (1)..(11)

 <400> 51
 Val Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Leu Leu
 1 5 10

 <210> 52
 <211> 11
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> resto de aminoácido

 45 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(11)

 <400> 52

Ile Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val Leu
 1 5 10

<210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 10 <222> (1)..(11)

<400> 53
 His Ala Arg Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Glu
 1 5 10

<210> 54
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 20 <222> (1)..(11)

<400> 54
 His Met Arg Asp Ile Asp Pro Asp Thr Gly His
 1 5 10

<210> 55
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 30 <222> (1)..(11)

<400> 55
 His Met Arg Gly Thr Asp Pro Glu Thr Gly Asn
 1 5 10

<210> 56
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 40 <222> (1)..(11)

<400> 56
 His Pro Asp Ala Leu His Met Met His Leu Phe
 45 1 5 10

<210> 57
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 843 204 T3

<210> 61
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(21)

10 <400> 61
 Val Arg Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Trp Leu Ser
 20

<210> 62
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(21)

20 <400> 62
 Val Lys Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Trp Leu Ser
 20

<210> 63
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(21)

30 <400> 63
 Ile Leu Ile Thr His His Ala Arg Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Glu
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Ala Leu
 20

<210> 64
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO

40

ES 2 843 204 T3

<222> (1)..(21)

<400> 64

Val Leu Leu Thr His His Met Arg Asp Ile Asp Pro Asp Thr Gly His
1 5 10 15

Leu Val Gly Ala Leu
20

<210> 65

5 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> resto de aminoácido

10 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(21)

<400> 65

Val Leu Leu Thr His His Met Arg Gly Thr Asp Pro Glu Thr Gly Asn
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ala Leu
20

15 <210> 66

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> resto de aminoácido

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(21)

<400> 66

Val Leu Leu Thr His His Pro Asp Ala Leu His Met Met His Leu Phe
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ala Leu
20

25 <210> 67

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> resto de aminoácido

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(21)

<400> 67

35 Val Asp Tyr Gln Ser His Pro Asp Ala Leu His Met Met His Leu Phe
1 5 10 15

Asp Pro Ala Arg Tyr
20

<210> 68

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> resto de aminoácido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(21)

<400> 68
 Val Asp Tyr Ala Ser Val Pro Asp Ala Leu His Met Met His Gln Phe
 1 5 10 15

10 Asp Pro Pro Arg Tyr
 20

<210> 69
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(21)

<400> 69
 Val Asp Tyr Glu Ser Val Pro Asp Ala Ser His Met Met His Gln Ser
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Arg Tyr
 20

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la disociación hidrolítica de zearalenona y/o al menos un derivado de zearalenona por medio de un polipéptido que disocia hidrolíticamente, caracterizado porque se hidroliza la zearalenona y/o al menos un derivado de zearalenona mediante el polipéptido, que es una hidrolasa con una secuencia de aminoácidos de la secuencia ID nº 13 o una variante funcional de la misma, en donde hay una identidad de secuencia de al menos el 70% entre la variante funcional y la secuencia de aminoácidos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido contiene al menos un segmento de secuencia de aminoácidos conservado o una variante funcional del mismo, en donde la variante funcional del segmento de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos un 70%, preferiblemente al menos un 84%, más preferiblemente al menos un 92% y lo más preferiblemente al menos un 98%, y el al menos un segmento de secuencia de aminoácidos conservado se selecciona a partir del grupo de secuencias de aminoácidos +89 a +145, +223 a +228, +257 a +261, +263 a +270 de la secuencia con la secuencia ID nº 1.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el polipéptido tiene al menos una mutación de la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia ID nº 1 en al menos una de las siguientes posiciones seleccionadas a partir del grupo: 22, 23, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 35, 37, 42, 43, 46, 51, 53, 54, 57, 60, 69, 72, 73, 78, 80, 84, 88, 95, 97, 99, 114, 118, 119, 123, 132, 141, 146, 148, 149, 154, 163, 164, 165, 169, 170, 172, 176, 180, 182, 183, 190, 191, 194, 196, 197, 198, 201, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 212, 213, 214, 216, 217, 220, 221, 222, 229, 231, 233, 238, 240, 244, 245, 246, 248, 249, 251, 254, 256, 260, 262, 263, 266, 269, 271, 277, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 292, 296, 298, 302, 307, 308, 309, 311, 314, 317, 319, 321, 323, 325 y 326.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1, 2 o 3, caracterizado porque el polipéptido tiene al menos una mutación de la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia ID nº 1 seleccionada a partir del grupo D22A, S23Q, S23L, N25D, I26V, F27Y, F27H, S29P, R31A, F32Y, R35K, R35Q, V37A, V42I, V43T, F46Y, S51E, S51D, D53G, N54M, N54R, L57V, L60I, S69G, P72E, V73A, A78S, N80H, F84Y, I88L, T95S, T97A, R99K, I114M, I118V, K119R, V123I, L132V, A141S, I146V, I146L, A148G, A149V, A154P, P163T, A164T, Y165C, Y165H, V169I, L170R, A172G, A176M, A176V, Y180F, D182T, F183Y, I190V, G191S, K194T, K194E, F196Y, V197C, V197R, E198R, E198S, K201D, K201G, P204S, P204A, A205S, K206P, A207M, M208A, Q209R, L210A, L210S, ΔP212, T213V, P214A, E216T, E216G, A217I, N220H, L221M, K222R, K222Q, G229A, A231V, F233W, F233Y, F233H, A238G, H240N, H240S, D244E, R245Q, M246L, S248T, S248N, S248G, Q249R, K251N, I254V, I256L, A260M, T262D, T262G, I263T, E266D, E269H, E269N, L271V, L277E, E280A, E280L, H281R, H281Q, A282V, Q283R, D284L, D284R, I285L, I286M, R287E, R287D, R292K, R292T, Q296A, Q296E, H298V, L302S, L307Q, F308S, D309A, A311P, A314V, L317F, S319Q, S319P, S319R, S321A, S321T, T323A, P325A, A326P.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el polipéptido se utiliza en un aditivo que contiene un adyuvante que disocia la zearalenona y/o al menos un derivado de zearalenona para piensos para cerdos, aves de corral y acuicultura, en alimentos o en granos secos de destilería con solubles.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque los adyuvantes contenidos en el aditivo se seleccionan a partir de al menos un vehículo inerte, así como ingredientes adicionales opcionales, tales como vitaminas y/o minerales y/o enzimas y/u otros componentes para eliminar la toxicidad de las micotoxinas.
7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, caracterizado porque el polipéptido está contenido en el aditivo en una concentración de como máximo 10.000 U/g, preferiblemente como máximo 1000 U/g, más preferiblemente como máximo 100 U/g y lo más preferiblemente como máximo 10 U/g.
8. Procedimiento según la reivindicación 5, 6 o 7, caracterizado porque el aditivo se emplea en forma encapsulada o recubierta.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el polipéptido o el aditivo se mezcla con un producto alimenticio o pienso contaminado con zearalenona y/o con al menos un derivado de zearalenona, porque el producto alimenticio o el pienso contaminado se pone en contacto con humedad y porque el polipéptido o el aditivo hidroliza la zearalenona y/o al menos un derivado de zearalenona presente en el producto alimenticio o el pienso contaminado.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se hidroliza al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, en particular al menos el 90% de la zearalenona y/o de al menos un derivado de zearalenona.
11. Uso de un aditivo que contiene al menos un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de la secuencia ID nº 13 o una variante funcional de la misma, en donde una identidad de secuencia entre la variante funcional y la secuencia de aminoácidos es de al menos el 70%, para la disociación hidrolítica de zearalenona y/o al menos un derivado de zearalenona en piensos, en particular para cerdos, aves y acuicultura, en alimentos o en granos secos de destilería con solubles.

Fig. 1

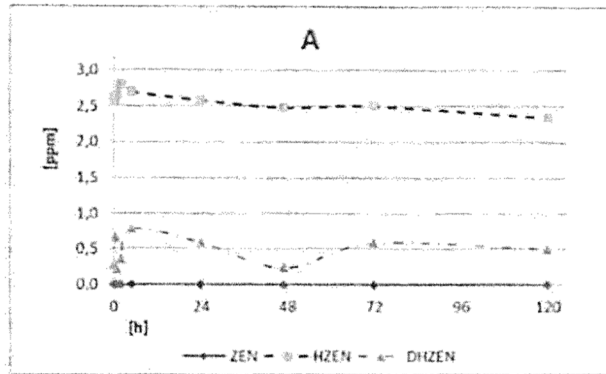


Fig. 1A

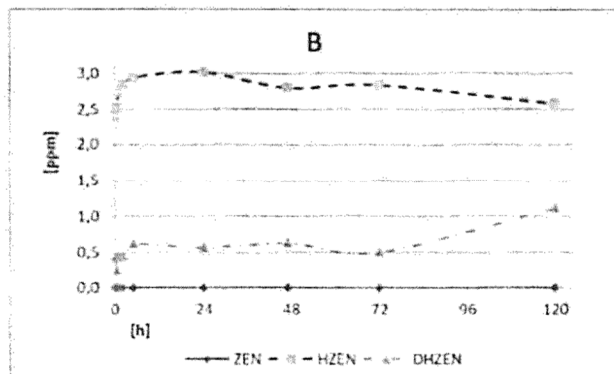


Fig. 1B

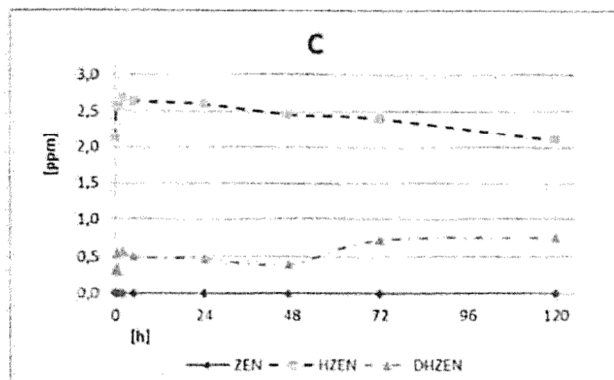


Fig. 1C

Fig. 2

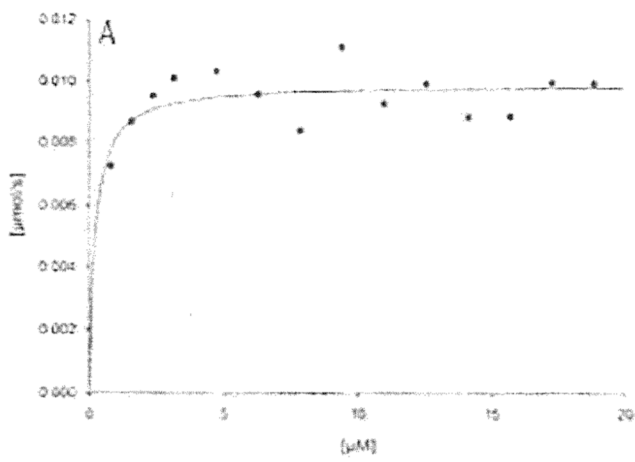


Fig. 2A

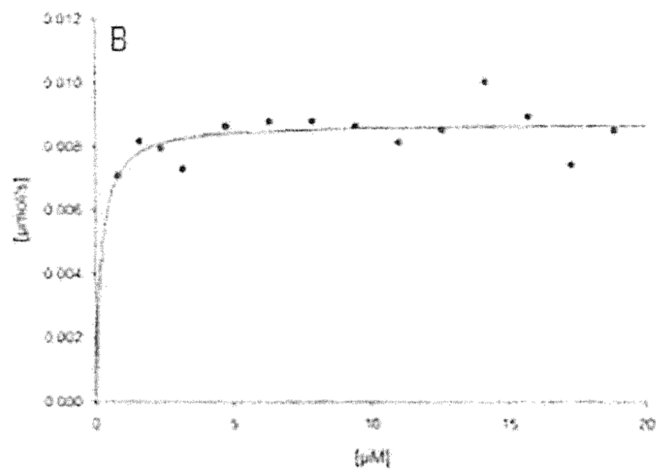


Fig. 2B