

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 8025/2009**

(22) Anmeldetag: **18.09.2008**

(43) Veröffentlicht am: **15.04.2010**

(51) Int. Cl.⁸: **C12N 15/52 (2006.01),
A23L 1/015 (2006.01)**

(66) Umwandlung von GM 502/2008

(73) Patentinhaber:

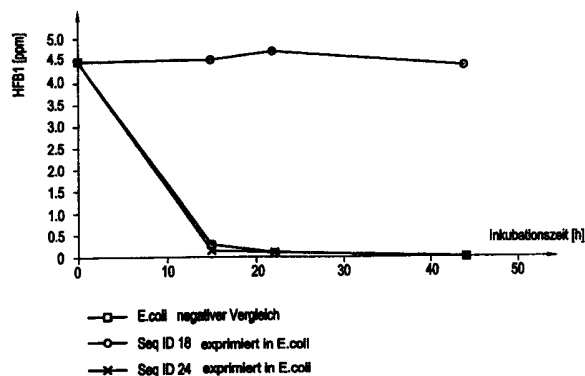
ERBER AKTIENGESELLSCHAFT
A-3130 HERZOGENBURG (AT)

(72) Erfinder:

MOLL WULF-DIETER DR.
STOCKERAU (AT)
HARTINGER DORIS MAG.
WIEN (AT)
HEINL STEFAN DR.
WIEN (AT)
GRIESSLER KARIN DIPL.ING.
POTTENBRUNN (AT)
BINDER EVA MARIA DR.
TULLN (AT)
SCHATZMAYR GERD DR.
TULLN (AT)
GRABHERR REINGARD DR.
PRESSBAUM (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES FUTTERMITTELZUSATZES ZUM SAUERSTOFFUNABHÄNGIGEN, ENZYMATISCHEN ABBAU VON MYKOTOXINEN SOWIE FUTTERMITTELZUSATZ UND VERWENDUNG DESSELBEN**

(57) Bei einem Verfahren zur Herstellung eines Futtermittelzusatzes zum sauerstoffunabhängigen, enzymatischen Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin, wird wenigstens eine Nukleinsäuresequenz von Genen entsprechend Sequenz ID-Nr. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 vorgelegt, die wenigstens eine Nukleinsäuresequenz in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen exprimiert und wenigstens ein dadurch hergestelltes Enzym entsprechend Sequenz ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 oder auch ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus sowie gegebenenfalls gemeinsam mit einem Cosubstrat in einem Futtermittel eingesetzt.



Z u s a m m e n f a s s u n g :

Bei einem Verfahren zur Herstellung eines Futtermittelzusatzes zum sauerstoffunabhängigen, enzymatischen Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin, wird wenigstens eine Nukleinsäuresequenz von Genen entsprechend Sequenz ID-Nr. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 vorgelegt, die wenigstens eine Nukleinsäuresequenz in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen exprimiert und wenigstens ein dadurch hergestelltes Enzym entsprechend Sequenz ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 oder auch ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus sowie gegebenenfalls gemeinsam mit einem Cosubstrat in einem Futtermittel eingesetzt.

(Fig. 3)

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines Futtermittelzusatzes zum sauerstoffunabhängigen, enzymatischen Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin und einen Futtermittelzusatz zum sauerstoffunabhängigen, enzymatischen Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin, in Futtermitteln bzw. im Verdauungstrakt von Tieren sowie die Verwendung derselben.

Verschiedenste Mykotoxine treten auf landwirtschaftlichen Produkten sehr häufig auf und verursachen je nach Art der Mykotoxine schwere wirtschaftliche Schäden, insbesondere in den aus den landwirtschaftlichen Produkten hergestellten Nahrungsmitteln und auch bei Tieren und Menschen, welche derartige Nahrungsmittel verzehren, wobei derartige Schäden äußerst vielfältig sind. Es wurden bereits zahlreiche Methoden entwickelt, um zu versuchen, derartige Mykotoxine zu entgiften bzw. abzubauen oder unschädlich zu machen, um die durch die Mykotoxine verursachten Schäden in den Bereichen von tierischer und menschlicher Ernährung, der Tierzucht, Viehwirtschaft, Verarbeitung von Futter und Lebensmittel und dgl. hintanzuhalten.

Unter den bekannten Mykotoxinen existiert eine Vielzahl von untereinander strukturell verwandten Mykotoxinen, wie beispielsweise die Fumonisine, von welchen Fumonisin B₁ das am häufigsten vorkommende Toxin der Gruppe ist. Jedoch sind zahlreiche Derivate und verwandte Moleküle bekannt, welche ebenfalls giftige Wirkungen bei Tieren aufweisen, wie beispielsweise im Zusammenhang mit der Fütterung von kontaminiertem Mais. Fumonisine sind in diesem Zusammenhang eine nahezu allgegenwärtige Kontamination auf Mais, welche aber auch auf anderen Getreiden, Nüssen und Gemüse einen stark negativen Effekt in bezug auf die Tiergesundheit und Leistung darstellen.

Der mikrobielle Abbau von Fumonisin wurde bereits in der EP 1 860 954 beschrieben, gemäß welcher Mikroorganismen zur Entgiftung von Fumonisin und Fumonisinderivaten eingesetzt werden, bei welchen die detoxifizierenden Bakterien oder Hefen, gewählt

aus genau definierten Stämmen zur Entgiftung von Fumonisin Futtermitteln zugesetzt werden.

Auch wurden bereits katabolische Stoffwechselwege für den biologischen Abbau von Fumonisin und die hierfür verantwortlichen Gene und Enzyme beschrieben. So beschreibt beispielsweise die EP 0 988 383 Fumonisin entgiftende Zusammensetzungen und Verfahren, wobei die eingesetzten, Fumonisin abbauenden Enzyme in erster Linie in transgenen Pflanzen produziert werden, bei welchen die Entgiftung von Fumonisin mit Hilfe einer Aminooxidase, welche für ihre enzymatische Aktivität molekularen Sauerstoff benötigt, erfolgt.

Des weiteren beschreibt die WO 2004/085624 Transaminasen, Deaminasen und Aminomutasen und Zusammensetzungen und Verfahren zur enzymatischen Detoxifizierung, wobei insbesondere aminierte Toxine, beispielsweise Fumonisine, entgiftet werden. In diesem Zusammenhang werden Polypeptide, welche eine Deaminaseaktivität besitzen, zur Entgiftung eingesetzt.

Bisher bekannten Verfahren ist jedoch gemeinsam, daß sie für eine Detoxifizierung der Mykotoxine molekularen Sauerstoff für die beschriebenen, katabolischen Stoffwechselwege benötigen, wobei die insbesondere erforderlichen Aminooxidasen unter sauerstoffunabhängigen Bedingungen nicht arbeiten können. Ein Einsatz von derartigen Genen und Enzymen zur Detoxifizierung von Futtermitteln, beispielsweise im Verdauungstrakt von Tieren, ist aufgrund des im wesentlichen sauerstofffreien Milieus in dem Verdauungstrakt von Tieren nicht möglich bzw. zeigen die bekannten Gene oder Enzyme keinerlei Wirkung.

Die Erfindung zielt nun darauf ab, ein Verfahren zur Herstellung eines Futtermittelzusatzes zur Verfügung zu stellen, mit welchem es gelingt, Mykotoxine und insbesondere Fumonisine unabhängig von Sauerstoff sicher und zuverlässig zu entgiften.

Zur Lösung dieser Aufgaben ist das erfindungsgemäße Verfahren im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Nukleinsäuresequenz von Genen entsprechend Sequenz ID-Nr. 1, 2,

4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 vorgelegt wird, die wenigstens eine Nukleinsäuresequenz in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen exprimiert wird und wenigstens ein dadurch hergestelltes Enzym entsprechend Sequenz ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 oder auch ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus gewonnen werden kann, wobei das wenigstens eine Enzym gegebenenfalls gemeinsam mit einem Cosubstrat in einem Futtermittel eingesetzt wird. Dadurch, daß wenigstens eine Nukleinsäuresequenz von Genen entsprechend den nachfolgenden Sequenz ID-Nr. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 vorgelegt wird, gelingt es, spezifische, Fumonisine bzw. Mykotoxine abbauende Gene zu klonieren und zu produzieren, wobei beispielsweise die Expression in E.coli und Pichia pastoris unter Verwendung von Standardverfahren durchgeführt wird, bei welcher Expression Enzyme entsprechend den Sequenz ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 oder auch ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus gewonnen werden können, welcher gegebenenfalls gemeinsam mit einem Cosubstrat in einem Futtermittel eingesetzt wird. Mit einem nach einem derartigen Verfahren hergestellten Futtermittelzusatz gelingt es, Mykotoxine im Verdauungstrakt von Tieren auch in einem anaeroben oder einem sauerstoffunabhängigen Milieu vollständig und zuverlässig abzubauen, wobei die spezifischen bei diesem Verfahren exprimierten bzw. produzierten Enzyme den Abbau von Fumonisin und von Zwischenprodukten des Abbaueweges katalysieren. Mit einem derartigen Verfahren gelingt es weiterhin, den Sphingolipidstoffwechsel, der durch eine Wechselwirkung der Fumonisine mit dem Enzym Ceramidsynthase behindert wird, aufrecht zu erhalten und gleichzeitig die Fumonisine biologisch zu nicht toxischen Substanzen abzubauen, welche von dem Tier ohne Schädigung ausgeschieden werden können. Schließlich können technologische Anwendungen der Detoxifizierung erzielt werden, da dieses Verfahren auch im größeren technischen Maßstab, entgegen den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren, anwendbar ist, so daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sicher

und zuverlässig ein Futtermittelzusatz hergestellt werden kann, der Mykotoxine und insbesondere Fumonisine im sauerstoffunabhängigen Milieu enzymatisch abbauen kann.

Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Nukleinsäuresequenzen bzw. die mittels dieser Nukleinsäuresequenzen in bakteriellen und eukaryotischen Wirtszellen exprimierten, in sauerstoffunabhängigem Milieu sauerstoffunabhängig katalytisch wirkenden Enzyme sind nachfolgend aufgelistet.

Nukleinsäuren

Sequenzen:

```
>Seq ID 1 (fum (Fumonisin katabolismus) Gencluster, 15.420 bp)
TGTCGGCGATCRGTAAACTTCTACCGTGGTCCTCGTTCGCCCCACAKCATACATCACAGACRTCGGGATTTCCAACGAAC
GGGTCCCGGCCTGCCGGCCACATTTCCCGGAACGCCATATGGGTGATTTGACAAATCCGGTTCAGGCGAAGATGGGTG
CGCCCCATTAAACCGCGGGTCGAAAGAGGTGATCTGGTCTTGTCCTGAAAGGTTTTTGGCGTGCAGGGATAAACGACA
CCAAGTTGATGCTGGGACGTTATTGCGACGAAGGGAACCCCTTCGTGGCGTGCCGTACAGACTCCAGGCAGAAGGTTTGC
CGTACCGGGACCCGGATTGCTGACAAATCGCGGCGACCTGTCCGGTGGTCTTGTAATGCCCTCGGCCATATAGGCTGCGG
CGGCCTCGTGCCGACCCGGGACGAACAATATCCATTGTCTTCGAGCGCAGCCAGGAGCGGATCCACCTCCGGCGACATG
AGGCCGAAGACATACCGGACGCTTCGACGGCCAAACATCGTGCCAATAATTCTCCGCCCGTGAGGCGCATGACGATCTC
CAGTACGAAAGGTGAGTGCAGGTTCCGGCACATTGCTGTGGTTAGTTGATGCGCTGATCGGCCAACCGACTGAGTGG
AGTTGGATGGCCGACCTTACCCTGTGCGGCATAACTCTCAGATCCGGAACCGACCCCGACATTAAAATAGCGGCCGAC
CGGATCATAGGCAGAGCTGGTCCGGCTGGAAGAACTGCTGGGGTGGTTCGTGCTGCTATTGGCGGATCTCGGTGCAACAAAT
TATTGACCGATAGAAACAGCTGCTGCTTCTGGCCAAAAGCCGCGATGTGCAAGGTCAATGTCCGCTCGGTGTACCAAACC
GCCGGAGCGTGGTTCAAATTCGTATCGACGCCCTCCACATTGTCCGCATTGAACACCGATGCTGCGATGAAGCGCTGCTG
CAGGAGAAGCGCCCAATCGTCGGTCGAATATCGCGCCTGGAAGTTGGCCGACCATTTTGGCGTGTCCGGTTGTCGAGCG
AACGGATGGCGCGCGAGCCGGTCCGCGATGCGATAGGCAGAGGTATGGTGGCTGCCAGCGCACGAAGACTGAACGTGCCG
CCGCCGACGGGGCGTGAGTAATAGGCCCTCGAAGTCAATTCCCGCCGCTTTCTGGACAGCCAGGTTGAGATTGGGACCCGT
CACTGTGATGGTGCCGTCCGGATTCTCCGTTATGAGGTGCGCAGAAGAAGGTGTTTCTGTCATCGCACGCGTCGATTTCCT
GCTGGGGAAGGAGGAAATCGATCGCGCCCTTACCTTACCACATAGCGATCGACCGAAAACGAAACCCCGGCACGAAG
GCGGGGCGTAGCACCGCGCCGAATGTAAGGACGTCCGCCTTTTCAGGGCGCAAATCCGCGTTGCCGGCGGTAAAGAACC
CGTCTGCACAGCCTGTCCGCCATAAATTGAATTGAGCTCGCCTCAGCTGAGCGACGCCATCAGCGGTGACATAGTCGA
CGCGGATATCTCGCGAACCGGTGCGCGCGAACCTGAGCGCGCTCGATCGGCTCATATTCTCCGCCAGCTTCCAGGTTGTT
ACTCCACCGGACTGGCTGTAATCGGCATATCGGACGGCGCGCTTTAAGTTGAGCGAACGTCCAGCGCGCTGTCTTCAG
AATCGGGACGCCGATTTGACAAAACCTTCTTTGATGTCATAGCTTCCCGAGAAGGGAAGTGGGTGTGAGAGATTGAAGC
CTCCAGGCCGACCTGCCTGCGCGCCGAGCCCCCTGATTCCCGTGATCGAGGTCGTGCGCTGCGATATCGCGTCCGTT
TCCTGCCGGGCTTCTCCTTGCGATATTCGATACAGCGCGACCGAGACCGGGCCCGCGCCGAACGACAGGCTATCGCC
GAGGTGCGCCGAAATCGTGAGTCCCGCCACATATTGTCAGGCTCAGCTGAGCGACGCCATCAGCGGTGACATAGTCGA
TGGCCGATACGCTCGCGCGCGTAGGAACGCGTTGTAGCGAAGCTGATCCGGGGCGAAGCCGATATTCACGCGCGGTCCA
TCGCGCGCGCTCTGGAACGACGAGCTCGTAAAATTCCCGTAGTCGAAGGTCCCTAGGACTCCTCCGGGCAAAAACGCGAT
GCCTTTTCAGAGGGCCGACGTGACAAGTCCGCGTAGGATCCGCGAGAAGTGCGAATATCGGGCAGACCGGTGACGCGCTG
TCGTAGCGCCGGGACGGGATATTGGCCGCGCGCGATGTCGAACAGCGCGGACCGGTTGCTTTCATCGGCCCGGATTCCG
TCCTGTGCAAAATATTGAAAGCTGCCGAGCAAGTGCAACCGGTGTCGCGCAAACGAAGTGCCGAAGGCGATCGAACCGCC
GTAGGACGGGAGGTGCGCGCGGGTTGAAACACCCGATGAGCTGAGCTCGGCCCTGATGCCTTCCAGATCTTCGTGAGCAGCA
AGTTGATGACGCCCGGAAACCGCATCGGAACCGTAGGCGCGGAGGCGCGCCCGTACGACATCGACGCGCTTGACCAAC
GCCTGCGGCAGCAGTTGATATCGACCGAGCCTGTGAAATTGGTTCGCGACGAAACGGTTGCCGTTTCAGCAGGACGAGGTT
CCGTTTTGACCCGAGGCCGCGCATGTTGAGCAGGTTCTGACCGCTGTTCCCGGTTCCGGGTGTCGTGCCAGGGTTGAGG
TCTTCAAGCTGTCGTTGAACACGGGCGAGTGGTTGAGTGGTTCGGCAAGGTTGGTTCGAGATGCCTCCTTCAACTGCTCG
CTGGATACGGCTGTAACCGGCGTCCGGCAATTGAAGCCGTTCTGGAGGCGGCTGCCGGTCACGACGATTTCGCTCGTTCC
CCGGTCCGTGTCGCTTCGTCGGCTGACCTATCGATGCGGGATCGTATCCTGAGCACTGGCAGAGACGGAATGCGA
GGGTCCGAGCGCTACTGCGCCGAGCAAATATTGCCTTGCCGGGCTTTTCGATTCTGAACTCCGATACATCTGCAGT
```

CCCTCCCGAATTGATAGGGACTCCGTTTGTAGTCCCTTGTCTTGTACGCCCGCGTCGCTCACCACGGTCCGGTCGGAGG
CTAAGCGTCGGGCCCTAAGGACCCGCAATTTGAACATCAAATGCAATGATCGGAGGCTTCATTGCACTTCGCGCATAGACC
GGCGCGGTAGCTGAAAGTGCCAATAATCAGGGATTTTGTGTAACAGTTGCGGCATGACGTCGGGCATCGGCCACGCGGTT
GGCGGCATCGACGTGGCTTTTCGCGTCGCGGCCCTCAAGCACCGGCGAGTTGCATTAAAAATGGGATGAGGCTGGAGAGAC
GCAAAATCTCTGAGGACCGCGCTGAACGCGCGATCCGTCGCTCGAGGGTCTCCGTTACATCGTCAACTGTATGGGCCGC
AGAGAGAAACATATTGTGATAGGGATGAACATAGACGCCGCCCTTCAGGCACGCCCGGCCACGCATAGCCGATCCGAA
AATCGGGATCGTCCGCAAGAATAATTGCGGCATCTGCGCGGCCCTGACGCCGGGCCCGTCTGCTTCAACTCAAGACCATGGCGCTGAGAC
TGTGCCCTCCAGGCCCTGCCCGAGGGCGGCGCGCTGGCGATCAGCGTTTCGAGATAAGGCGTCTCTCGAATGATCCTGAG
GGTTTCGATCGCGGCCGCCATCGGTACCGCAGAGAACCAGAAGGAGCCGGTCACAAATATATCCCGCGCCGCATCGCGCG
CCTTGTTCGAGCCCAGCAGGGCGGAGATCGGATAGCCATTTCGCAAGCATTTCCTCCAGCAACTGAGATCGGGTTCGATA
CCCAATGCGTCCAGCTGCAATCGCGGCCACCCGGAACCTGCGCGCACATCGTCAACGACCAGAAGCGCACCGGTCTC
GTCACAACATTTTCGAGCGGTGCGCGCAACTCAAGCTGGGCGAGGGCCTGGTCTTCAATACTTCGTGTCGGAAGGTG
TGGCAAGACAGCCGCAATATCGCCATCGTGCCTTGAACCGCGTCCGATAAGCTTTGGGCGTCTGTTATAGGTATGAT
GCGACATGACAGCGATCGGAAGCGAGAATCCCGGCAGTATGCGGAGTGTTCACGGGGAAGCGCCATGATAGGCGCCTTT
GGCGCATAATATGGTTTTCGCGCCCCGTATGGGCACGCGGAGAACCATCGCGTTCGAGGTGGCATCGCTGCCATTTTTCG
AGAATCGCCCCAATCCGCATGACGACCATGCCACAAAGGCTTCGGCGAGGTTGACCATGATCTCCGAGGACCGGT
ATGGTGTGCGCGAGAAGTCGCTGCGCATCAGCCGCGGCTTCGATTTCGATTGCGCGTAACCGAGCAAAATTTGGCCATA
CGCGCACATATAGTCGATATAGGGCTGCTCGTCGCGCTCCCAATTCGTGCCCCAGCGCGCCTGAAGAAGTGGGGA
ATTCTGGCGGCAGCAACCGTGTGACTCGTGGCCGTACATCCCGCGGAATGACCCGTTTCGCGCGCTTCTCTGAGATCT
TTCTGCTTGTTCGCTTCGCCATAATGCACCTCTCGCGATAAATAATGGGTAAAAATCCACGAAATTCACGATTTCGTGA
TCTGAAAGAGATATATCTTGAATATACTGTATAATTATACACAATGCGCAATCGGACGACGGGATAGCGGGGAGGAG
GACGGGGAATCTATGCGGAACGTACGCGACAAGGCGCGCCCGCACGAGACGCTCACCGTAGTCGTGCGCGCAATGATCG
TTGGCACGCGCCCTTGATGGTGTTCGAATACAGCCCATCTTCTCGCGCCCTTGTAGAGGAGGGGCGTATTCCCGCC
GAGGGGTTGGGATCGGCGGCAACGGTGGAAATACTGGCGATCGGCGGGAACATGCATCGGACCCGTTCTTATGAAGAC
GGGATATCTGCGGGCGAATGCGCGCACTCTGCTTAAATGCTCGCGCAATCAACTTCGGATTGACGTTGCGGGTTTCG
ATTTGCCCATCGTGGCTTGCCGAGCGCGAGCGGGAGCCCTGGAAGGTCTTTCGCTCAGCGCGCGATCCTGATCATGACT
CATAATCGGCGCGCGGACCGGCTGAGCGGAATATTTCTGGGCGCGCAGACGATACCGCAGGTAATATCTGCTATTTGCT
CCCAGCGAGATTATTCGCGCTGGGGAGCGCAGGCGGCTTCACGATCCTGGGCATTCTCGCGCGATCGCGCGATCG
CGGCTCTGTGCTCGTCGATCGCGTTGAGCTCGATCCGACGACCGTTAACGACGACTTGCAGTGGTCACCCGCGCGCAT
GTCATTTTCGATGGCGGCATTTCGTTCAATTCGCGGGTTCGTCGCGCATGGAGCTATCTGGAGCGACTGGCTGCGCAGCA
CGGATTTTCGGGAGAAACGATCGGTATCGCCATTTCCGGAGTTTTCGCTTTCGCGAGGTAGGCGGGCTTGGCTGGCCGCTT
GGATCGGTGGCGGGTCGATATCGCTTCGCTTAAATCGTGGGAGCCTGCTTCAGGCGGGCAACGTGATCGCATTGGCG
GTGGCCGATCAGCCAAGCTGGTTTATTTCCGCTTCTGTGCTTTTCGGCCTGTTCTGGTTGGCGATGCAGCCCTTCAAAT
CCGCTTCGCGATCGCGATAGATAACAGCCGGCAGCTTGTCTGTACTGCTGACGCGCATCGCCCTCGTTCGGGTTGAGCGCG
GGCCCTTGTGTCTCTCGCTTTGCCGGGGCGACCGACTTGCCTGGATCTTTGTGGGAGTTTCGACCTTGTGTGCTGGC
AGCGCGCTTCTGTATCTTTGCGCTTCTCTGTTTCAACCGCGGAAAGGTGATCGCTGAAACGGTGGACGTATGAAAAAG
ACCGATCGGGGTTTCGCGATGACATCGCAGTCAAGCTTCGATGCGCGCAAGCGGCCGCGAGTCTCTAAAAGCGGCGA
GGTCTTGCTCGTTACGAGTCTTGTCTGATGCGACCGACAGGCTGTTGGTTCGATCTAGACCCCGATCAGGTCGGTCTCTA
TCGATTGACAGGAAGCGGGTGCTCACCGTCGTCGCTATCATTTCTTTCGACCAAGGAAGTGGCTCATCTCGCTC
TGATGCGCGCTATCTGGAGGGGCTCCGGAATCTCGACGCGATGGAAGTCGACATCGGCCAGCTCGAAAGCTGGCAGGAC
CTGATGAAGTTGGATCAGATCAGGGCGCGAGACTATTATAATAGCCACCCGCCCGCCCTCAAGCTTCTGTTTCGGCGGATA
TGGCGGGTTCGAGGCCAGAAAGCTTGACGAGCGATCTCCGAGGAAATCGTGAGCTCCATGTATGGCAGATACAACGGCA
TTTTTCATATGCCGCAATGGAGAATGAGGCTCTACTTTCAGCATCTGCTTCGCAATTCGACGCGGTATGGCTCGCGCATCT
TCTTTTCGCGGTTCCGTTGAAATTACGTTCGATTTTCTTCGGGAGGGGCAAGCGGCTTGCAATTGCTTATGGCGACACTA
TCTGCCGAGCGAACGCCATCAGCGTGAATCCGTTCAACGATATGCAGGAATGTCGCTTGCGTTGAGTTTCGGTTCTGAGT
TCGGTTCGGTTAGGAGGCCCGCGATAAACCACGCTTCTGTGCGAAGGGATGTCGCTGCTTCGACAGGCCCTTCGGA
GTCAGCCGCAATCAACGAGGCGAGATGTCAACGTGGCCAGCAAGTTCAACTGTGAGTTACTCGATCTGCGATCATTGTTG
CGGTGTATGAAACGCGAAGTTTAGCCACGCGCGCGCTTCTGAATCAATCGCAGCCCGCGCTCAGCCGAGAAATCCAG
CGCTTCGAGAGTCTCGTGGGCGGTCGTTGTTTCGAGCGGACGATCGCTGCTTTCGGAACCGGCCCTCGGCAAGGAT
GCTCCCGCTCGCCACCGAGCGTTGGAATGTCGATACGTCGCTGTTTTCGCTCGCCCAATGTCGGGAGTTCCGCTGGA
CAGACATCAGGATTGCTGTGACAGACCGCGCCTTCCATGTTCTCCCGGAGCTGCGCGCTTGTACATGGATCAAAAT
CCGAGGGTCCGACTCCGCATCCTTGACGTGCGCGCGGTGAGGCTGCGGACCTGGTTGCGAGCGCGGAGGCGGAGTTTCG
CATCAGCATTGAGAGCCTGTTGCCATCAAGCCTGCGGTTTCGATGCGCTCCACGAGGACCCGTTTCGGCTGGCATGCCACC
GAAGCCATCCGCTGGCGTCGCTCGAGATCCTTGAATGGACGCAATGAAAGGTGAAAGCCTGATCGCGGTTACCCGTGCG
AGCCGGAACCGCACGTTGCTCGATGCCGAATCGCGCGCAACATATCGCGCTGGAATGGCGGTATGAGGTCCGCGCATCT
GACGACGGCGCTGGGATTGATCGATGCGCAATTTGGGTGTCGCTGTTATGCCCCGATGGTTATGCCCGCTCGGGTCGGT
CGGAGGTCTGTCGGCGCCCCGTCGTCGCGCGGTCGTTCAACGACGATCGGCATCGTTTCAGCGCCGACCCGGCTCGATG
CACCCTGCCGCACAGCAATTGCTTGC CGGCTCCGCGCGCCTGGTCTCCGCAATCTGGGCGACATCGCGTCTCGCGA
AGATGGGGCATCGTGACAGCGTCTTATGCGCTGCAGCATCGATGCTCACGATCATTGCATTGCTGAGAGACGAACGC
GAAGATACCGCTGGGTACAGGATATCAGTCCATCGAGGCGGAGAGAAATGTGTGAAAGAGACCAATGCCGTGGCGGC
CGGGCGTCCCCGCTGCGCCCGCACGTCGGCTTTCGCGGATCAGCGTTTCCCGGGGGGCTCCGCGCATCGCTGGACCTT
CATGCTTGGCGCAACTGCCATTCCCGTGGCTGCGCAACTGACGATCCGAAGCTCGTTTCGTATACCCAGTCGGGCGCG
TCGAGGGCGTCGAGGGCGACGTCGAGACTTTTGGGAATACCCTTCGCGGCTCCGCGGTTCGGCGACCTGCGATGGCGG
CCGCGGCTCCGCGAGGGCGTGGGCGGGCACGAGGACGCGCGGCTTTCGCGCCGATTGCATCGGGAACGAGCGGCT
TAGAGAGGGGAGCGGGCTGCCGGAGAGCGAAGACTGCTCTATCTGAATATCTGGTCTCCCAAACAGGTTCGTAAGG
GGGGGCTCCCCGTCATGATCTGGGTTTACGGCGGTGGGTTAGCGCGGTTTCGGCGGGTGCCATATTATGACGGCTCT
GCGCTCGCGCAGAAGGGCGTGGTGGTGTACGTTCAACTATCGCGCGGATTCTGGGCTTTCTTGCCCATCCGGCGCT
TTCAAAGGAAAGTCCGAATGGCGTGTGCGGCAACTATGGTCTTCTCGACATGCTCGCGCGTTCAAATGGGTTTCAGAAC

GCGAATATATGGTCCTCACGGAAGCGCTCTTGCTGCCTGTTCCGAACGGCCTTCCGGCGACCTGCGCGGCGTTGACGGAG

CCGATGGCGGTGGGATGGCATGCCGTCGAGATCGCGCAGGTTCAACCACATCACATCCCTGTGGTGATCGGGTGGGACC
GGTCGGGTTGGCAGTCCTCGCTGCCCTGAAACATAAGCAAGTTGCTCCGATTATTGCGTCGGATCCATCGCCCGATCGGC
GTGCTCTTGCTCTGCGGATGGGCGCCGACGCCGTTGTGATCCGCGCGAAGAATCACCCCTTCGCCAGGCCGAGAAGATC
GCACGCCCGGTTCGACAAAGGTGGGGCCCTGTCCAGCTCATTGCTGTCAAAGTCTCAAATGATATTGAAATGCGTAGGGGT
GCCGGGCATGCTTCGGCATGCGATGGACGGCGCGTCCGACGGGTCCGAGATCATGGTCGTTGGCGCATGCATGCAGCCGG
ACGCGATCGAGCCCATGATCGGGATGTTAAAGCGCTCACGATCAAATTCTCGCGAACTTACACGGGTGAGGAATTCGCC
GCGGTGCTTCACATGATAGGTGAGGCGCACTCGACGTATCTCGCTCGTTACCGATGTGATTGGCCTGTCCGATGTCCC
GTCCGCGTTTGAGGCTCTACGAGTCCAGGCGCCCAAGCAAAAGTGATTGTGGACCCTTGGCGCTGAGCCTGAGGATGCC
AAGGGTGGCAGCTTGGGCATCGTCAAAGAAGGCGACGTTGACCCGGTATGTGAACATCCCCATATTCTTCCGAGCTGAA
GCAGTTGGTAAACATGCCAAAATATGAACTGTAGTATTGCGTCGGGGTTCTCATTGTGGGGTTTGCCATTGTCATCGCTC
GCACCCGGCGACAAAGATTAGATGTACTTCCGATAATCCGTGCTCTCGACCTGGCCTTCCTTCATATATTTAGGACCTC
TCCGACCATGCGTGCGGCGCGGATCGGGATCGGCAGGCGTTGGTTCATCTGGGTGAGTTCAGTTGATCTTCGTAAGAG
AGAACACCTCCTCGGCTAACTGCGCCGCGGTACTATCGCAGGATCGTCTCGAGCGTYCGC

>Seq ID 2 (*fumA*)

ATGCGGAACGTCAGCGACAAGGCGCGCCCCACGAGACGCTCACCGTAGTCGTCGCGCAATGATCGTTGGCACGGCCGC
CTTGATGGTGCTTGGAAATACAGCCCATCCTTCTCGCGCCCTTTAGAGGAGGGGCGTATTCGCCCGAGGGGTTGGGAT
CGGCGGCAACGGTGGAAATACTGGCGATCGCGCGGGAACATGCATCGGACCCGTTCTTATGAAGACGGGATATCTGCGG
GCGAAATGCGCGGCACTCTGCTTAATGCTCGCCGCAATCAACTTCGGATTGACGTTGCCGGGTTTCGATTTGCCCATCGT
GGCTTGCCGAGCGGCGAGCGGGAGCCCTGGAAGGTTCTTCGCTCAGCGCGGCGATCCTGATCATGACTCATAATCGGCGGC
CGGACCGGCTGAGCGGAATATTTCTGGGCGCGCAGACGATACCGCAGGTAATATCTGCTTATTTGCTCCCGACGGAGATT
ATTCGCGCTGGGGGAGCGCAGGCGGCTTCACGATCCTGGGCATTCTCGCGCGATCGCCGCGATCGCGGCTCTGTGCCT
CGTCGATCGCGTTGAGCTCGATCCGACGACCGTTAACGACGACTTGCAGTGGTCACCCGCGCGATCGTCATTTTCGATGG
CGGCATTCGTTCAATTCTCGGGGTCGTTGCCGATGGAGCTATCTGGAGCGACTGGCTGCGCAGCACGGATTTTCGGGA
GAAACGATCGGTATCGCCATTTCCGGGAGTTTGCTTTGCCAGGTAGGCGGGGCTTGGCTGGCCGCTTGGATCGGTGGGCG
GGTCGGATATCGCTTCGCTTAATCGCTGGGAGCTGCTTCAGGCGGGCAACGTGATCGCATTGGCGGTGGCCGATCAGC
CAAGCTGGTTTATTTCCGCTTCTGTGCTTTCCGCTGTTCTGGTTGGCGATGCAGCCCTTCCAAATCCGCTTCGCGATC
GCGATAGATAACAGCCGGCAGCTTGCTGTACTGCTGACCGCCTCGCCCTCGTCGGGTTGAGCGCGGGGCCCTTGTGTCT
CTCTCGCTTTGCCGGGGCGACCGACTTGCCTGGATCTTTGTGGGAGTTCGACCTTGTGTGCTGGCCAGCGCGCTTCTGT
ATCTTTGCGCTTCTCTGTTTCAACCGCGCGGAAAGGTGATCGCTGAAACGGTGGACGTA

>Seq ID 4 (*fumB*)

ATGACATCGCAGGTCAAGCTTCGTAGCGCGGCAAAGCGGCGCGCAGTCCTAAAAGCGAGCGAGGTCTTGCTCGTTACGA
GTCCTTGCTTGATGCGACCGACAGGCTGTTGGTCGATCTAGACCCGATCAGGTCGGTCTCTATCAGATTGCAGAGGAAG
CGGGTGCCCTACCGTCGTCGCTCTATCATTTCTTTCCGACCAAGGAAGTGGCTCATCTCGCTCTGATGCGCCGCTATCTG
GAGGGGCTCCGGAATCTCGACCGGATGGAAGTCGACATCGGCCAGCTCGAAAGCTGGCAGGACCTGATGAAGTTGGATCA
GATCAGGGCGGAGACTATTATAATAGCCACCCGCCGCCCTCAAGCTTCTGTTCCGCGGATATGGCGGGGTCGAGGCCA
GAAAGCTTGACGAGCGATACCTCCGAGGAAATCGTGAGCTCCATGATGGCAGATACAACGGCATTTTCCATATGCCGCAA
ATGGAGAATGAGGCTCTCATGTTACGATCTGCTTCGCAATTCTCGACGCGGTATGGGCGCTCTCCTTTCCGCGGTTCCG
TGAAATTACGTCGATTTTCTTCGGGAGGGGAAGCGGCTTGCTATGCTTATGCCGACACTATCTGCCGAGCGAACGC
CATCAGCGTGA

>Seq ID 6 (*fumC*)

GTGGCCAGCAAGTTCAACTGTGAGTTACTCGATCTGCGATCATTGTTGCGGTGTATGAAACGCGAAGTTTTAGCCACGC
CGCGCGGCTTCTGAATCAATCGCAGCCCGCGCTCAGCCGAGAAATCCAGCGCCTCGAGAGTCTCGTGGGCGGTCCGTTGT
TCGAGCGGACAGTCGGTCGCTTGCCGAAACGGCGCTCGGCAAAGAGTTGCTCCCGGTGCGCCACCGAGCGTTGGAACCT
GTCGATACGTCGCTGTTTGCCTCGCCCAATGTCCGGGAGTTCCGCTGGACAGACATCACGATTGCTGTGTACAGACCGC
CGCTTCCATGTTCTCCCGCGAGCTGCGCGCTTGTACATGGATCAAATCCGAGGTCGACTCCGATCCTTGACGTGTC
CGGCGGTGAGGCTGCGGACCTGGTTGCGAGCGGCGAGGCGGAGTTCCGCATCAGCATTGAGAGCCTGTTGCCATCAAGC
CTGCGGTTGATGCGCTCCACGAGGACCCGTTCCGGCTGGCATGCCACCGAAGCCATCCGCTGGCGTCGCTCGAGATCCT
TGAATGGACGCAATTGAAAGGTGAAAGCCTGATCGCCGTTACCCGTGCGAGCCGGAACCGCACGTTGCTCGATGCCGAAC
TCGCGCGCAACAATATCGCGCTGGAATGGCGGTATGAGTTCGCGCATCTGACGACGGCGCTGGGATTGATCGATGCGCAA
TTGGGTGTCGCTGTTATGCCCCGATGTTATGCCCGCTCGGGTCGGTCGGAGGTCGTCGCGCGCCCGTCGTCGCGCC
GGTCGTCGAACGCACGATCGGCATCGTTACGCGCCGACCGGCTCGATGCACCCTGCCGCACAGCAATTGCTTGCAGCGG
TCCGCGCGGCTTGGTCGTCGCCAATCTGGGCGACATCGCGTCTCGCGAAGATGGGGCATCGTGA

>Seq ID 8 (*fumD*)

GTGAAAGAGCACCATGCGGTGGCGGCCGGGCGTCCCCCGCTGCGCCCGCCACGTGGCTTGCGCGGATCAGCGTTTCCCG
GGGGGCTCCGCCATCGCCTGGACCTTCATGCTTGGCGCAACTGCCATTCCCGTGGCTGCGCAAACCTGACGATCCGAAGC
TCGTTTCGTCATACCCAGTCGGGCGCCGTCGAGGGCGTCGAGGGCGACGTCGAGACTTTTGGGAATACCCCTTCGCGGCT
CCGCGGTCGCGCAGCTGCGATGGCGGCGCGCGGCTCCGCGAGGGCGTGGGCGGGCACCAGGGACGGCCCGCTTTGCG
GCCCGATTGCTCGGGAACGAGCGGCTTAGAGAGGGGAGCGGGCTGCCGGGACGAGCGAAGACTGCCTCTATCTGAATA
TCTGGTCTCCCAAACAGGTTCGTTAAGGGGGGCTCCCCGTCATGATCTGGGTTACGGCGGTTGGGTTAGCGCGGTTCT
GGCGCGGTGCCATATTATGACGGCTCTGCGCTCGCGCAGAAGGGCGTGGTGGTCTCACGTTCAACTATCGCGCCGGGAT
TCTGGGCTTTCTTGCCCATCCGGCGCTTTCAAAGGAAAGTCCGAATGGCGTGTGCGGCAACTATGGTCTTCTCGACATGC

TCGCGGCGTTCAAATGGGTTCAGAACAACATAAGGGAGTTTCGGCGGAGACCCGAACCGTGTACGGTCTTTGGCGAGTCC
GCCGCGCGAGCGCGCTCGGACTGCTCTGACCTCGCCGCTCAGTGAGAGCGCCTTCAATCAGGCGATACTGCAAAGTCC
GGGTCTGGCCAGGCGCTCGCCACGCTTTCTGAAAGCGAAGCGAATGGGCTGGAGCTGGGAGCCGATATTTCTGCTCTAC
GGCGTGCCGATGCGGGCGAATTGACGAAGATCGCGCAATCGCGAATACCCATGTGCGGCCAGTTTACCAAGCCGCGGCCG
ATGGGTCCGATTCTGGACGGCTATGTTTTCGCGACCTTGACGTCGATGCCTTCGCCAAGGGGGCCTTCGCCAAGATAACC
CGTTCTGGTTCGGCGGAAACGCCGACGAAGGGCGCGCTTTACGGATCGCCTGCCGGTCAAACCGGTCTTGAATATCGAG
CCTATCTCACAGAACAATTTGGTGACGAGGCGGACGATGGGAGCGTTGTTATCCCGGAACTCCGACGCGACGTCCCC
GCCGCCGTTGCCCGTCTTTTGGGGATAGTCAGTTCAACAACGGGATCGAGTGCTCTCGGCAGCCTTCGCGAAATGGCG
AACGCCGCTTTGGAGATATCGCTTTACGGGCATTCCAGGAGCCGGCGCTCGCCCCGCCACGCATGGAGACGAAATCCCT
ATGTCTTCGCAAATCTGGGGCCGTGCTCCGTATCTATGTTTGGGTGCTGCTCGAAGGCGGCGCCGGGGCGTCGGACATCAAA
CTTGCGACCGAAATGTCCGCGGCCTGGGTGAGCTTCGCGGTGACGGGGTCCCGATCAGGGCACGAAATCGCACTGGCC
GCGCTTCGAGCGGCGAGGGGAGATCATGACTTTTGGTTTCGACAGTTGGCTCTGGGGAAGGTCTTGAGTTTCGCCGAGCA
AAGCCTGCCAACCTCAAATAG

>Seq ID 10 (*fumE*)

TTGGAGTTTCGCCGAGCAAAGCCTGCCAACCTCAAATAGCGCCCGCCTGTGCGTGCTTCAGCACGCCGTCGCCGTTT
GCGGGCGACGGGCTGTGCCCTCTGCCCTAGAAGGAAGTAAGTTGCGCTACGACGTGCGGATAATTGGAGGTGGCAACGCTG
CATTGACGGCAGCGTGACGGCGCGTGAAGCGGGGCGCTCGGTTCTTGTGATCGAGCATGCGCCGCGGCCATGCGCGGC
GGCAACAGTCGTACACACGCAATATGCGTACGATGCACGAACGTCCCCTGTGCGCGTTGACCGGTGAATATTCGGCGGA
CGAATATTGGAATGATCTTGTCCGCGTCACGGGGGGCGCACCGACGAAGAACTCGCGCGGCTCGTTATCCGCAACACCA
CCGACGCTATTCCCTTCATGACGCGCTGCGGTGTGCGTTTCCAGCCCTCGCTGTGCGGCACGCTGAGTTTATCGGAACC
AACGCATTCTTCTTGGCGGCGGGAAGGCGCTTGTAAACGCATATTACGCCACGGCCGAACGGCTAGGCGTCGATATTCT
CTATGATTCTGAGGTGACCGAGATCAACCTTCAGCAAGGCGTCTGACGCGTCTGCAATTGCGCAGCCGGGATTCCCTG
TCGAAGTGAAGCCAAGGTGCCATCGCTCGTCCGAGGATTCCAGGCAATCTTGACTGGCTCTCAAGCGCATGGGGG
CCTGCTGCGCGCAACTTCATCGTACGGGGCACGCCATATGCGACTGGCACGGTGCTCAAGAACCTGTTGGAGCAAGGCGT
CGCCTCGGTGGGAGATCCAACCAATGCCATGCTGTGCGCATCGATGGGCGAGCGCCAAATACGACGGCGGCATCGTCA
CACGACTGGACTGCGTTCCCTTCTCGATCGTGTCAACAAGGACGCTTTCGCGTTCTACGATGAAGGCGAAGATGTGTGG
CCGAAGCGTTACGCCATATGGGGTCGTTGGTGCCACAGCAGCTGATCAGATCGCTTTCAGCATAATCGATCGGCAGGC
CGAAGACCTCTTCATGCCGTGAGTGTCCCCCGGTGCAAGCGGACACGATCGCGGGTCTGGCCGAGAACTCGGTCTGA
ATCCCGTAACCTTGAACGCGACGGTGGCCGAATTCAACGCCGATGCGTGCCCGGCGAATTCCGGCGCCAAAGATCTCGAC
GACCTCCACACCGAGGGAATCGAACCAGAAATCCAACCTGGGCCCCGACCGATTATTGTGCCCCGTTTCAGCGCTATCC
TCTCCGGCCCGGGATCACCTTCACCTATCTCGGCGTCAAGGTAGACAGCCGTGCGCGGGTCACTATGGAGACAGGTGAGC
CGACAAAAAACCCTGTTTGTCTCGGGGAAATAATGGCGGCGAGCATCTCGGCCAAGGTTATCTCGTGGATTGGAATG
CGGATTGGTACCGTATTCGGCCGCATCGCGGTTGGGAGGCCGACGTATGCAGGATTTTGA

>Seq ID 12 (*fumF*)

ATGCAGGATTTTGATCTCGTAAAAATGCTGTCTGACTTGCCGTGCGCGCCGAGCTGGAAGCCAGGCGCGTTATGGAGGT
GTGCAACGCGTGCCGCTATTGCGAAGGTTCTGCGCGGTATTTCTGCAATGACCTTGACGCGTCATTTGCCAGCGGGC
ATCTCAGCCACCTCGCCAACTCTTGCCACTCGTGCCAAGGTTGCTATTACGCTGCCAATACGCCCCCTCCGCATGAGTTC
GGAATAAACGTTCCAAAGGCGCTGTGCGAGTTGCGGCTCGAGAGCTACGAGCAGCATGCTTGGCCCCGGCCGCTCGCCGC
TCTCTATCGCAAGAATGCGCTCATCATTTCCATCTTGTGCGCGGCATGCATAACCGCGCTCCTTCTGCTTGCCGCCATCT
TCAACGGGATGCACTTTTCGCGAAACACGCATCGGTGCCCGGCGCGGGTTTTACAACGTTATTCCTTATCAGGCGATG
ATTGCCGTGCGGCGACCAATTTCTTTATTCGCGCTGGCGCTGGCGATCAGTCTCGTTTCGCTTTTCGCGGACGATCGG
TCTGGGAATTAAGGTTCTTTATCAGCACGTGCCGTTCTTCGGGCGCTACGCGATGCGGCGACTCTGCGATATCTCGGCG
GCAGCGACGCGGAGGGGTTTAACGACGCGGACGAGACATTTTCAGCAGCCGCGGCAAAATTTATCAGCCCTTGCCAT
GGCTTCGGACTTTGTTTCGCGGCCACAGCCAGGGCACGATCTACGATCATATGTTTCGGCTGGCCGGCGCCCTATGCGCT
TTTCAGCTTGCCGGTGTCTTAGGGACCGTTGGGGGGATCGGAATGGTGTGCGGCGGATCGGCCCTACTCTGGCTCAAGC
TGGCCGGCGAAGACGCTCCTCGATCACCGGCACTGCTTGGGCGCGATGTTGCCCTGTGTTGCTTCTGCTTGCCATAGCG
GCAACGGGCTCCTCCTTTTAGCGGTCCGACGACCGAAGTCATGGGCGTGCCTCGCCGTCCATCTCGGCGTGTCTT
GGCCTTCTTTTGGTGATGCCATACAGCAAATTTGTCCACGGTATCTTCAGGCTCACGGCTCTCGTGCGCCATCATGCTG
ACCGCGAGGCAAGTAATGGCTTCGCCTCCAGCCCTCCACGAAAAAGGGTTAA

>Seq ID 14 (*fumG*)

ATGGAACATAGAAGTCCGTTTCGCGATCGCAGTAGCGTCATGCAGATCGTGAGAGTGGCGAGTGGCAACTGTCTCGAGCA
ATATGATTTCTTCGTTTACGCTTCTATGCGGCATATATTGCGAGAAGCTTTTTTCCGACCGGCGATAACGCGACATCGC
TCATGCTTTTCATTGGCCACTTTTGGCGCTGGTTTCTCATGAGGCCCTTGGGGGCGATTTTTCTCGGGTCTACATCGAT
CGCGTCGGGCGTCGGAAGGCGTGATCGTGACACTCGCGATCATGGCCGTGGAACCTCACCATTGCGATGACTCCAAG
CTATGAGGCAATTGGATTACTCGCACCGGTTATCGTGCTCGTGGGCGACTTTTCAGGGTTTTTCCGCTGGAGCAGAGT
CGGGTGGCGTCTCAGTGACTTGGCGGAAATGCGTCGCGCAATCGAGAGGCTTCTCACCTCGTGGCAGTCTGCCAGC
CAGCAGGTGGCGCTGATGATCGCCGCGGATCGGTCTTGCCGTGCAATCAACGCTTTCACCGGAGCAAATGAACGACTG
GGGATGGCGGGTGCCCTTGTGTGATCGGATGCTTGATTATCCCCGTGATACTCTGGCTGCGCCGGTCTCTCCCGAAACGA
AAGCCTATCTCCACATGGAGCACAAGGCGCATTGATCGGCGAATCCCTCCGCGAATTGCAACAGAGCTGGGGGCTGATC
TTGACGGGCATGGCGATGTGATCCTCACGACGACACCTTTTACATGATTACCGCTATACGCCGACATTTGGCGAGAA
AGCACTCGGACTGAGCCCGCAAGATGTCTGCTGGTTACCATCATGGTCGGCGTGTGCAACTTCTGTGGCTTCCGATCG
GGGGTGTCTCTCGGATCGTATCGGTAGAACCCCGATCTACTGGTGTGCGGGTACCGGTTCTCGCCATCGCCTTTCC
CTGATGAGCTGGCTCGTGGCGCACCGACATTCGAGCGCTTGACGCTGTTCTGCTGACTTTCTCCGATGCTTTTGACT

CTATAATGGGGCGCTCATCGCGAGACTCACCGAGATTATGCCTCCCGCCATTAGAACCCTTGGCTTCTCGTGGCGTTCA
GTCTCGCGACCTCGCTGTTTCGGCGGCTTACCCCATTTGGTAAGTACGGCGCTAATCCACGCGACGGGCAGCAATTCCGCG
CCTGCAATCTGGCTCTGTTTTGCGGCTTTCATCAGCTTCGTGGTGTGGCCGCATCGACCCGGCTGAGCCGGCCAATCGC
CGAAGGCGCCAGATAG

>Seq ID 16 (*fumH*)

ATGAGAGCAGTAGTTTACCGAAATGGCGAACTTGTCTGGGGGCTATGCTGATCCGATACCCGCCGCCGGGCAGGTGCT
CGTCAAGACCAGAGCATGCGGCATCTGCGGATCTGACCTTCAATTTTGGCATCATGCGCAGGCGTTTACGAACCTTGCA
CGCGGGCGGGTATCGCCTCTATGGAAGTTGATTGTGTGCGAGACATCGTTCTGGGGCATGAATTCTGTGGCGAGATTATG
GAGTTCCGGGCCCTCTGCGGATCGTCTGCTTCAAACCCGGACAGCTTGTGTGCTCGCTGCCGCTGGCGATCGGTCCGACCGG
AGCGCGGACGATTGGCTACTCGGATGAGTATCCCGCGGGCTCGGCGAATATATGGTCTCACGGAAGCGCTCTTGCTGC
CTGTTCCGAACGGCCTTCCGGCGACCTGCGCGGCGTTGACGAGCCGATGGCGGTGGGATGGCATGCCGTCGAGATCGCG
CAGGTTCAACCACATCACATCCCTGTGGTATCGGGTGGGACCGGTGGGTTGGCAGTGTGCTGCCCTGAAACATAA
GCAAGTTGCTCCGATTATTGCGTCCGATCCATCGCCCGATCGGCGTGTCTTGCTCTGCGGATGGGCGCCGACGCCGTTG
TCGATCCGCGCGAAGAATCACCTTTCGCCAGGCCGAGAAGATCGCACGCCCGGTCCGACAAGGTGGGGCCCTGTCCAGC
TCATTGCTGTCAAAGTCTCAAATGATATTGAAATGCGTAGGGGTGCCGGCATGCTTCGGCATGCGATGGACGGCGCGTC
CGACGGGTCCGAGATCATGGTCGTTGGCGCATGTCAGCCGGACGCGATCGAGCCCATGATCGGGATGTTTAAAGCGC
TCACGATCAAATTCTCGCGAACTTACACGGGTGAGGAATTGCCGCGGTGCTTACATGATAGGTGAGGGCGCACTCGAC
GTATCTCCGCTCGTTACCGATGTGATTGGCCTGTCCGATGTCCCGTCCGCTTTGAGGCTCTACGGAGTCCAGGCGCCCA
AGCAAAAGTGATTGTGGACCCTTGGCGCTGA

>Seq ID 18 (*fumI*)

ATGGCGAACGGAACAAGGCAGAAAGATCTCAGAGAACCGCGCGAACGGGTCAATCCGGGCGGGATGTACGGCCACGAGTCGACACGG
TTGTGCGCCGAGAAATCCCCAGTTCCTTCAGGCGCGCGTGGGGGACGAATTTGGGACGCCGACGAGCAGCCCTATATCGACTAT
ATGTGCGCGTATGGGCCAAATTTGCTCGGTTACCGGCAATCCGAAATCGAAGCCGCGGCTGATGCGCAGCGACTTCTCGGCGACACC
ATGACCGGTCTCTCGGAGATCATGGTCAACCTCGCCGAAGCTTTGTGGGCATGGTCCGTATGCGGATTGGGCGATGTTCTGCAAA
AATGGCAGCGATGCCACCTCAACGGCGATGGTTCTCGCGCTGCCCATACGGGGCGCAAAACCATATTATGCGCCAAAGGCGCCTAT
CATGGCGCTTCCCCGTGGAACACTCCGCATACTGCCGGGATTCTCGCTCCGATCGCGTGCATGTGCGATATTATACCTATAACGAC
GCCCAAAGCTTATCGGACGCGTTCAAGGCGCACGATGGCGATATTGCGGCTGTCTTTGCCACACCTTTCGACACGAAGTATTTGAG
GACCAGGCCCTCGCCAGCTTGAGTTTCGCGCGCACCGCTCGAAAATGTTGTGACGAGACCGGTGCGCTTCTGGTCTTGACGATGTG
CGCGCAGGTTTCCGGGTGGCGCGCGATTGACGCTGGACGCATTGCGGTATCGAACCAGATCTCAGTTGCTGGGGAAAATGCTTTGCG
AATGGCTATCCGATCTCCGCCCTGCTGGGCTCGAACAAGGCGCGCGATGCGGCGCGGGATATATTTGTGACCGGCTCCTTCTGGTTC
TCTGCGGTACCGATGGCGCGCGCGATCGAAACCTCAGGATCATTCGAGAGACGCTTATCTCGAAACGCTGATCGCCAGCGCGCC
GCCCTGCGGGCAGGCCCTGGAGGCACAGTCTCAGCGCCATGGTCTTGAGTTGAAGCAGACGGGCCCGGCGCAGATGCCGCAATATTC
TTTGGCGACGATCCCGATTTTCGGATCGGCTATGCGTGGGCCGCGCGTGCCTGAAGGGCGCGCTCTATGTTTCATCCCTATCACAAT
ATGTTTCTCTGCGGCCCATACAGTTGACGATGTAACGGAGACCTCGAGGCGACGGATCGCGCGTTCAGCGCGGTCTCTCAGAGAT
TTTGGCTCTCTCAGCCTCATCCATTTAATGCAACTCGCCGGTGCTTGA

>Seq ID 20 (*fumJ*)

ATGTATCGGAAGTTCAGAATCGAAAAGCCCGCAAGGCAAAATAGTTTGCTCGGCGCAGTAGCGCTCGGCACCCTCGCATTTCTGTCT
TCTGCCAGTGCTCAGGATAGCGATCCCGCATCGATAGGTCAGCCGGACGAAGCGGACACGGACCGGGGAACGAGCGAAATCGTCGTG
ACCGCGAGCGCCTCCAGAACGGCTTCAATTGCGCGACGCGGTTACAGCCGTATCCAGCGAGCAGTTGAAGGAGGCATCTCCGACC
AACCTTGCCGACGCACTCAACCAGCTGCCCGTGTTCACGACAGCTTGAAGACCTCCAACCTTGGCAGCACACCCGGAACGGGGAAC
AGCGGTGAGAACCTGCTCAACATGCGCGGCTCGGGTCAAACCGGAACCTCGTCTGCTGAACGGCAACCGTTTCGTGCGGACCAAT
TTCACAGGCTCGGTGATATCAACGTCTGCCGACGCGTGGTCAAGCGCGTCGATGTGTCGACGGGCGGCGCTCGGCCCGCTAC
GGTTCCGATGCCGTTTCGGGCGTCATCAACTTCGTGCTCGACGAAGATCTGGAAGGCATCAGGGCCGAGCTCCAGTCCGGTGTTC
AACCGCGGCACTCCCGTCTACGGCGGTTTCGATCGCTTCGGCACTTCGTTTGCCGACGACCGGTTGCACTTGTCTCGGTCGCTTC
GAATATTCTCGACAGGACGGAATCCGGCCGATGAAGCAACGGGTGCTCCGCTGTTTCGACATCGCCGCCGGAATATCCCGTGCC
GGCGCTACGACAGGCGTCACGGTCGTGCCCGATATTTCGAGTTCTCGCGGATCCTACGGCGGACTTGTACGTCGGGCCCTCTGAAA
GGCATCGGTTTTTTGCCCGGAGGAGTCTAGGGACCTTCGACTACGGGAATTTTACGAGCTCGTCTGTTCCAGAGCGGCGCGATGGA
CCGCGCGTGAATATCGGCTTCGCCCCGATCAGCTTCGCTACAACGCGTTCCTACGCGCCGATATGATGTGTCGACACTGTGCAG
GTGTATGCGGAGGGCACCTATGCTTATCCACACCAACCTGGGTGCATTCTGAATATCGCATGTGCGTGGCTCGAATAATTTCCGG
ATCTTCCGTGATAACGCCTTCTTCCGGCTCCACTCGCGACGCTCATGGACAGAAATGCCAGGCTTCGATCGTGTGTCGGTCTGCTT
TCAAGCGCACTTTCCCTTGGTCGAAATCGAGAATTTTCGAAAGGTTACCGCGCGCTGCCGGCTTCCGGGCGAGCATTGGCAATGGC
TGGAAACTCGATGGCTCGGCTCCTTTGGCCTTACGGACCTCGAGCTTCGTGAAAACAATCTCACCATCAACCGCAATCTCTACGCC
GCCGTGATGCGGTCCGCGATCCCGCGGCAATATCGTCTGCCGTTCAACACTGGCCGGCTCGACCAAGATTGCGTGGCGCTCAAT
CTCTTCGCGACAGGCTCGCCGAGCGCTCGGCCATCGACTATGTACCCGCTGATGGCGTCTGCTCAGCTGAGGCTTGAGCAATATGTG
GCGGACTCACGATTTCCGGCGACCTCGGCGATAGCTGTGCTCGGCGCGGGCCCGGTCTCGGTGCGCGCTGGTATCGAATATCGC
AAGGAAGGCCCCGCGAGGAAACCGACGCGATTCGACGCGACGCTCATGACGGAATCAGGGGGCTCCGGCGGCGAGGCA
GGTCGGCTTGGAGGCTTCAATCTCTACAACCCATTTCCCTTCTCGGGAAGCTATGACATCAAGGAAGGTTTTGTGCAAAATCGGCGTC
CCGATTCTGAAGGACAGCGCTGGGACGTTTCGTGAACTTAAACGGCGCGTCCGATATGCCGATTACAGCCAGTCCGGTGGAGTA
ACAACCTGGAAGCTGGGCGGAGAATATGAGCCGATCGACGGCTCAGGTTCCGCGCGACCCGTTGCGGAGATATCCGCGGGCCAAGC
CTTGTGAGCTATTTCGACCCCGGCGCTCAGGCGACGCTCAATTCAATTTATGGCGGACAGGCTGTGCGAGACGCGGTTCTTTACCGCC
GGCAACGCGGATTTGCGCCCTGAAAAGGCGGACGTCCTTACATTGCGCGCGGTGTACGCCCCGCTTCGTGCGGGGTTTTAGTTT
TCGGTCGATCGCTATGTGTTGAAGGTGAAGGCGCGATGCAATTTCTCTCCAGCAGGAAATCGACGCGTGCATGAGGAAC
ACCTTCTTCGCGACCTCATACGGAGAATCCGGACGACCATCACAGTACGGGTCCCAATCTCAACCTGGCTGTCCAGAAAGCG

CGCGGAATTGACTTCGAGGCTTACTCAGCCCCGTCGGCGGCGGCACGTTTTCGTGCGCTGGCAACGCACCATACTCT
GCCTATCGCATCGCGACCGGCTCGCGCGCCATCCGTTTCGTCTCGGACAACCGGACACGCCAAAATGGTCGGCCAACCTCCAGGCGCGA
TATTCGACCGACGATTGGGCGCTTCTCGTGCAGCAGCGCTTCATCGCAGCATCGGTGTTCAATGCCGACAATGTGGAGGGCGTCGAT
ACGAATTTGAACCACGCTCCGGCGGTTTGGTACACCGACGCGACATTGACCTTCGACATCGCGGCTTTTGGCCAGAAGCAGCAGCTG
TTTCTATCGGTCAATAATTTGTTTCGACCGAGATCCGCCAATAGCGACGAACGCCAGCCAGCAGTTTTTCCAGCCCGACCGCTCTGCC
TATGATCCGGTCGGCCGCTATTTTAATGTGGGGTCCGTTTCCGGATCTGA

>Seq ID 22 (*fumK*) nicht vollständig

ATGCGCTCACGGGCGGAGAATTATTGGCACGATGTTTGGCCGTCGAAGGCGTCCGGTATGTCTTCGGCCTCATGTGCCCGGAGGTG
GATCCGCTCCTGGCTGCGCTCGAAGACAATGGGATATTGTTTCGTCCCGTTCGGCACGAGGCCCGCGCAGCCTATATGGCCGAGGGC
ATTTACAAGACCACCGACAGGTCCCGCGATTGTTCACGAATCCCGGTCCCGGTACGGCAAACCTTCTGCTGGAGTCGTGACGGCA
CGCCACGAAGGGGTTCCCTTTCGTGCAATAACGTCACGATCAACTTGGTGTGTTTTATCCCTGCACGCCAAAACCTTTCAGGGA
CAAGACCAGATCGACCTCTTTCGACCCGCGTTAAATGGGGCGCACCCATCTTCGCTGGAACCGGATTGTGAAATCACCCATATG
GCGTTCCGGGAAATGTGGGCCGGCAGGCCGGGACCCGTTTCAATTGGAATCCCGARGTCTGTGATGTATGKTGTGGGCGAACGAGGA
CCACGGTAGAAGTTTACRGATCGCCGACA...

>Seq ID 24

ATGGAATTGAGCCGCCAACGAGACCAGGCCTTGAGGGAGCGCGCCAAAGCGGTGATCCCGGGCGGGATGTACGGTCACGAGTCGACC
TATCTGATGCCCGAGGGCAGCCACAGTTCTTCAGTCGCGGCAAAGGCGCCGACTTTGGGACGCCGACGGCAACGAGTATGTGAT
TACATGTGCGCTATGGCCCCAACCTGCTGGGTTACGGCTTCGAACCCGTCGAAGCGGCCCGCGCAGCCAGCAAGCCCGGGGCGAT
ACCCTGACCGGGCCGTCGGAGGTGATGGTGCAGTTGGCGGAAGACTTCGTGCGCAAATCAGCCACGCGGACTGGGCCATGTTCTGC
AAGAACGGCACAGACGCCACCTCAATGGCGATGGTCATCGCGCGCGCACACACCGGCCGGAAGACGATCCTCTGCGCGAAAGCGCC
TATCATGGGGCCGCGCTTGGTGACGCCGATCCTGGCCGGAACGCTACCGGAGGATCGCGCCTTTGTAGTCTACTACGACTACAAT
GACGCCCAAAGCCTCGTCGACGCCCTTCGAGGCCCATCAGGACGACGTGCGGCGGATCTTCGCCACCCCTCACCGTCACGAGGTGTTT
AGCGACCAGATCGATCCTGATCCGGAATATGCGGCCAGCGTGGCGGCGCTCTGCGACAAGAGCGGCGCCCTGCTCGTCGTCGACGAA
GTTTCGAGCCGGGTTTCAGGATCGCGCGGACTGCAGCTGGGCCAAGATCGGCGTCTGCTCCGGATCTGAGCACCTGGGGCAAGTGCTTC
GCCAACGCTATCCGATCTCGGCGGTCTAGGGGGCGAAAAGGTGCGCAGCGCGGCAAAGGCCGTCTACGTCACCGGCTCGTTCTGG
TTCTCGGCCACGCCCATGGCCGACCGCTCGAAACCTGAAGCAAATCCGCGAGACCGACTATCTCGAGCGGATCAACGCGGCCGGG
ACCCGCTCGCGGAGGGCCTGCAGCAGCAGGCTGCTCACAACGGCTTTACGTTGCGCCAAACGGGGCCCGTCTCCATGCCCCAAGTC
CTCTTCGAGGAAGATCCCGATTTTCGGTTCGGCTACGGCTGGGTTTCGCAATGCCTGAAGCGAGGGGTGTACTTCAGCCCTACCAT
AACATGTTCTGTGCGGCGGCCATAGCGAGGCGGACCTGGCCAAGACCTTTCGGCTACCGGCGACGCTTCGTGAGCTACGCGCC
AAGCTTCGAGCCTAGAAATCCACCAACCCCTCTCGCCCTGAGAGCGGCCTAA

Enzyme

Sequenzen:

>Seq ID 3 (*FumA*)

MRNVSDKAPPHETLTVVVAAMIVGTAALMVLGIQPIILLGALVEEGRI PAEGLGSAATVEI
LAIAAGTCIGPVLMTGTYLRAKCAALCLMLAAINFGLTLPGFDPPIVACRAAAGALEGLS
LSAAILIMTHNRRPDRLSGIFLGAQTIPQVISAYLLPTEIIPRWGSAGGFITILGILAAIA
AIAALCLVDRVELDPTTVNDDLQWSPAAIVISMAAFVQFSVGVAAWSYLERLAAQHGFSG
ETIGIAISGSLLCQVGGAWLAAWIGGRVGYRFALIAGSLLQAGNVIALAVADQPSWFISA
SCAFGLFWLAMQPFQIRFAIAIDNSRQLAVLLTPIALVGLSAGPLLLSRFAGATDLRWIF
VGSSTLLLASALLYLCASLFQPRGKVIAETVDV

>Seq ID 5 (*FumB*)

MTSQVKLRSAAKRPRSPKSERGLARYESLLDATDRLLVDLDPDQVGLYQIAEEAGASPSS
VYHFFPTKEVAHLALMRRYLEGLRNLDAEVDIGQLESWQDLMKLDQIRARDYYN SHPPA
LKLLFGGYGGVEARKLDERYSEEIVSSMYGRYNGIFHMPQMENEALMFTICFAILDAVWA
VSFRRFGEITSDFLREGQAACIAYCRHYLPERTPSA

>Seq ID 7 (*FumC*)

VASKFNCELLDLRSFVAVYETRFS SHAARLLNQSQPALSRRIRLES LVGGPLFERTSRS
LAETALGKELLPVAHRALELVDTSLFASPNVREFRWTDTIACVQTAAFHVLPRAARLYM
DQNPRVRLRILDVPAVEAADLVASGEAEFGISIESLLPSSLRFDALHEDPFGLACHRSHP
LASLEILEWTQLKGESLIAVHRASRNRTLLDAELARNNIALEWRYEVAHLTTALGLIDAQ
LGVAVMPRMVMPRSGRSEVVWRPVVAPVVQRTIGIVQRTGSMHPAAQQLLARLRAAWSS

ANLGDIASREDGAS

>Seq ID 9 (FumD)

VKEHQCRGGRASPAAPATWLARISVSRGASAIAWTFMLGATAIPVAAQTDDPKLVRHTQS
GAVEGVEGDVETFLGIPFAAPPVGDLRWRPPAPPRAWAGTRDGRRFAPDCIGNERLREGS
RAAGTSEDCLYLNIWSPKQVGKGLPVMIVVYGGGFSGGSGAVPYDGSALAQKGVVVVT
FNYRAGILGFLAHPALSKESPNGVSGNYGLLDMLAFAFKWVQNNIREFGGDPNRVTVFGES
AGASALGLLLLTSPLSESAFNQAILQSPGLARPLATLSESEANGLELGADISALRRADAGE
LTKIAQSRIPMSRQFTKPRPMGPILDGYVLRTLDVDAFAKGAFRKIPVLVGGNADEGRAF
TDRLPVKTVLEYRAYLTEQFGDEADAWERCYPANSADVPAAVARLFGDSQFNNGIELLS
AAFAKWRTPLWRYRFTGIPGAGRRPATHGDEIPYVFANLGPSSVSMFGSLEGGAGASDIK
LATEMSAAWVSFAVHGVPDQGTKSHWPRFERRGEIMTFGSQVGSGEGLGVSPSKACQPSK

>Seq ID 11 (FumE)

LEFRRAKPANPQNSARPVRASARRPALRATGCALCLEGSKLRYDVAIIIGGNAALTAAVT
AREAGASVLVIEHAPRAMRGGNSRHRTRNMRTMHERPLSPLTGEYSADEYWN DLVRVTGGR
TDEELARLVIRNTTDAIPFMTRCGVRFQPSLSGTLSSLRTNAFFLGGGKALVNAYYATAE
RLGVDILYDSEVTEINLQQGVVQRLQLRSRGFPVEVEAKAAIASSGGFQANLDWLSSAWG
PAAANFIVRGTPYATGTVLKNLLEQGVASVGDPTQCHAVAIDGRAPKYDGGIVTRLDCVP
FSIVVNKDALRFYDEGEDVWPKYAIWGRLLVAQQPDQIAFSIIDRQAEDLFMPSPVFPVQ
ADTIAGLAEKLG LNPVT LERTVAEFNAACVPGEFGGQDLDDLHTEGIEPKKSNWARPIIV
PPFSAYPLRPGITFTYLGVKVDSRARVIMETGEPTKNLFASGEIMAGSILGQGYLAGFGM
AIGTVFGRIAGWEAARHAGF

>Seq ID 13 (FumF)

MQDFDLVKMLSDLPSAPELEARRVMEVCNACRYCEGFCAVFPAMTLQRHFASGDLSHLAN
LCHSCQGCYYACQYAPPHEFGINVPKALSELRLSEYEQHAWPRPVAALYRKNALIISILS
AACITGVLLLAIFNGDALFAKHASVPGGGFYNVIPYQAMIAVAATTFLYSALALAI SLV
RFSRTIGLGIKVLYQHVPVLRALRDAATLRYLGGSDGEGCNDADETFSTTRKFHHALAY
GFGLCFAATATGTIYDHMFGWPAFYALFSLPVVLGTVGGIGMVVGAIGLLWLKLAGEDAP
RSPALLGPDVALLVLLLAIAATGLLLLAVRSTEVMGVALAVHLGVVLAFFLVMPYSKFVH
GIFRLTALVRHHADREASNGFASSPPTKKG

>Seq ID 15 (FumG)

MEHMKSVDRSSVMQIVRVASGNCLEQYDFFVYGFYAAYIARSFFPTGDNATSLMLSLAT
FGAGFLMRPLGAI FLGSYIDRVGRRKGLIVTLAIMAVGTLTIAMTPSYEAI GLLAPVIVL
VGRL LQGFSAGAESGGVSVYLAEIASPKSRGFFTSWQSASQQVAVMIAAIGLALQSTLS
PEQMNDWGWVRVPLLIGCLIIIPVILWLRRSLPETKAYLHMEHKAHSIGESLRELQQSWG LI
LTGMAMSILTTTTFYMITAYTPTFGEKALGLSPQDVLLVTIMVGVSNFLWLPIGGALSDR
IGRTPILLVVPVTVLAIAFPLMSWLVAAPTFGALAAVLLTFSACFGLYNGALIARLTEIM
PPAIRTLGFSLAFSLATSLFGGFTPLVSTALIHATGSNSAPAIWLCFAAFISFVGVAAST
RLSRPIAEGAR

>Seq ID 17 (FumH)

MRAVVYRNGELVLGAYADPIPAAGQVLVKTRACGICGSDLHFCDHAQAFTNLASRAGIAS
MEVDLCRDIVLGHEFCGEIMEFGPSADRRFKPGQLVCSLPLAIGPTGARTIGYSDEYPPG
LGEYMLVTEALLLPVPNGLPATCAALTEPMAVGWHAVEIAQVQPHHIPVVIGCGPVGLAV
VAALKHKQVAPIIASDPSPDRRALALRMGADAVVDPREESPFRAEKIARPVGQGGALSS
SLLSKSQMIFECVGVPGLMRHAMDGASDGSEIMVVGACMQPDAIEPMIGMFKALTIKFSR
TYTGEEFAAVLHMI GEGALDVSPLVTDVIGLSDVPSAFEALRSPGAQAKVIVDPWR

>Seq ID 19 (FumI)

MANGTRQKDLRERAERVIPGGMYGHESTRLLPPEFPQFFRRALGARIWDADEQPYIDYMC
AYGPNLLGYRQSEIEAAADAQRLLGDTMTGPSEIMVNLAEAFVGMVRHADWAMFCKNGSD
ATSTAMVLARAHTGRKTILCAKGAYHGASPWNTPHTAGILASDRVHVAYYTYNDAQSLSD
AFKAHDGDIAAVFATPFRHEVFEDQALAQLEFARTARKCCDETGALLVVDDVRAGFRVAR
DCSWTHLGI EPDLSCWGKCFANGYPISALLGSNKARDAARDIFVTGSFWFSAPVMAAAIE
TLRIIRETPYLETLIASGAALRAGLEAQSQRHGLELKQTGPAQMPQIFFADDPDFRIGYA
WAAACLKGGVYVHPYHNMFLSAAHTVDDVTETLEATDRAFSAVLRDFASLQPHPILMQLA
GA

>Seq ID 21 (FumJ)

MYRKFRIEKPGKANSLLGAVALGTLAAPPVSASAQSDPASIGQPDEADTDRGTSEIVVTG
SRLQNGFNSPTPTAVSSEQLKEASPTNLADALNQLPVFNDSLKTSNPGTTPGTGNSGQN
LLNMRGLGSRNRLVLLNGNRVFATNFTGSVDINVLQPALVKRVDVVTGGASAAYGSDAVS
GVINFLDEDELEGIRAEQSGVSTRGDLPSYGGSI AFGTSFADDRHLHLLGSFEYFRQDGI
RADEATGRRWFDIAAGQYPVPGATTGVTVPDIRSSRGSYGGLVTSGPLKGIAFLPGGVL
GTFDYGNFTSSSFQSGGDGPRVNI GFAPDQLRYNAFLRAAYDVSDTVQVYAEGTYAYSHT
NLGAFVISHVGGSNFRIFRDNAFLPAPLATLMDRNAQASIVVGRFSSDFPLVEIENFAK
VYRGAAGFRADIGNGWKLDGSASFGLTDLELRENNLTINRNLYAAVDAVRDPAGNIVCRS
TLAGLDQDCVPLNLFGTGSPSASAI DYVTADGVAQLRLEQYVAGLTISGDLGDSLSFGAG
PVSVAAGIEYRKEKARQETDAISQATTSITGIRGAPAAQAGRPGGFNLYNPLPFGSGSYDI
KEGFVEIGVPILKDSALGRSLNLNGAVRYADYSQSGGVTTWKLGGEYEPIDGLRFRATRS
RDIRGPSLVELFDPGRQATLNSIYGGQAVQTRFFTAGNADLRPEKADVLTFGAVLRPAFV
PGFQFSVDRYVVKVKGAI DFLLPQQEIDACDAGNTFFCDLITENPDGTITVTGPNLNLAV
QKAAGIDFEAYYSRPVGGGTFSRLALATHHTSAYRIATGSAPIRSLGQPDTPKWSANFQA
RYSTDDWALLVQQRFIAASVFNADNVEGVDTNLNHAPAVWYTDATLTFTDIAAFGQKQQLF
LSVNNLFDRDPPIATNDPSSFSSTSSAYDPVGRYFNVGVRFRI

>Seq ID 23 (FumK) nicht vollständig

MRLTGELLARCLAVEGVRYVFGGLMSPEVDPLLALEDNGILFVPVRHEAAAAAYMAEGYI
KTTGQVAAIVTNPGPGTANLLPGVV TARHEGVPFVAITSQHQLGVVYPCTPKTFQGQDQI
DLFRPAVKWGAPIFAWNRIVEITHMAFREM WAGRPGPVQLEIPXSVMYVVGGERGPR-KFX
DRR....

>Seq ID 25

MELSRQRDQALRERAQAVIPGGMYGHESTYLMPEGTPQFFSRGKGARLWDADGNEYVDYM
CAYGPNLLGYGFEPVEAAAAAQARGDTLTGPSEVMVQLAEDFVAQISHADWAMFCKNGT
DATSMAMVIARAHTGRKTILCAKGAYHGAAPWCTPILAGTLPEDRAFFVYYDYNDASLV
DAFEAHQDDVAAIFATPHRHEVFSDQIDPDPEYAASVRALCDKSGALLVVDEVRAGFRIA
RDCSWAKIGVAPDLSTWGKCFANGYPISAVLGGEKVRSAKAVYVTGSFWFSATPMAAAV
ETLKQIRETDYLERINAAGTRLREGLQQQAAHNGFTLRQTGPVSMQPQLFEEDPDFRVGY
GWVRECLKRGVYFSPYHNMFLSAAHSEADLAKTLAATGDAFVELRAKLPSLEIHQPLLAL
RAA-

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Verfahren so geführt, daß vor Einsatz der Enzyme im Futtermittel diese mittels molekulargenetischer Methoden, Mutagenese oder molekularer Evolution verändert werden. Indem das

Verfahren so geführt wird, daß die Enzyme vor ihrem Einsatz im Futtermittel mittels molekulargenetischer Methoden, Mutagenese oder molekularer Evolution verändert werden, gelingt es, die Enzyme in noch stabilerer und an den späteren Einsatzzweck angepaßter Form herzustellen, wodurch der sauerstoffunabhängige Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin, im Futter noch weiter verbessert bzw. vervollständigt werden kann.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung des Verfahrens wird das Verfahren so geführt, daß die Enzyme vor ihrem Einsatz in dem Futtermittelzusatz isoliert werden. Durch Isolation der Enzyme kann ein gezielter Einsatz einzelner Enzyme in dem Futtermittel und somit dem Verdauungstrakt von Tieren durchgeführt werden, wodurch ein noch gezielterer Abbau von Mykotoxinen möglich wird.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Weiterbildung des Verfahrens wird das Verfahren so geführt, daß die Enzyme in einer Schutzhülle verkapselt werden. Durch Verkapseln der Enzyme in einer Schutzhülle gelingt es, die Enzyme ohne Veränderung, insbesondere ohne Abbau und Schädigung an ihren Einsatzort, insbesondere in den Verdauungstrakt von Tieren, zu transportieren, so daß erst nach Auflösung der Schutzhülle, beispielsweise im Magen-Darm-Trakt von Tieren, die Enzyme zu wirken beginnen, wodurch ein noch gezielterer, rascherer und vollständiger Abbau der Mykotoxine im sauerstoffunabhängigen bzw. anaeroben Milieu des Magen-Darm-Trakts von Tieren erzielt werden kann.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung wird das erfindungsgemäße Verfahren so geführt, daß die Enzyme aus Permease ID-Nr. 3, Carboxylesterase ID-Nr. 9, Tricarballoyl-Dehydrogenase ID-Nr. 11, Citratverwertungsprotein ID Nr. 13, Alkohol-Dehydrogenase ID-Nr. 17, Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25 und/oder Acetolactat-Synthase ID-Nr. 23 gewählt werden. Durch eine derartige Verfahrensführung können insbesondere Fumonisine vollständig und sauerstoffunabhängig abgebaut werden. In diesem Fall werden aus dem Gencluster der Nukleinsäuresequenz mit der ID-Nr. 1 ausgewählte offene Leserahmen in prokaryotischen oder

eukaryotischen Wirtszellen zur Expression gebracht. Im bakteriellen Stamm mit der Hinterlegungsnummer DSM16254 erfolgt die Transkription der im Gencluster mit der ID-Nr 1 enthaltenen offenen Leserahmen gesteuert bzw. geregelt durch einen bidirektionalen Promotor, der zwischen *fumA* und *fumI*, wie dies Abb. 1 entnehmbar ist, angeordnet ist. Die Gene codieren für Proteine, welche in der Regulierung der Genexpression, wie beispielsweise *FumB* und *FumC*, bei der Substraterkennung und dem Transport, wie beispielsweise *FumA*, *FumJ*, *FumG* und im Substratkatabolismus, wie beispielsweise *FumD*, *FumE*, *FumF*, *FumH*, *FumI* und *FumK* involviert sind. Aus den entsprechenden Nukleinsäuresequenzen, welche für spezielle Proteine codieren, wurden gemäß einer bevorzugten Weiterbildung des Verfahrens gemäß der Erfindung die Gene ausgewählt, welche für den Substratkatabolismus verantwortlich sind, wodurch die entsprechenden gebildeten Enzyme das Substrat, nämlich Fumonisine vollständig katabolisieren können.

In der nachfolgenden Tabelle 1 ist die Bezeichnung der Gene des fumonisinkatabolischen Genclusters aufgeführt, wobei 0 die Orientierung, nämlich f forward und r reverse bedeuten.

Tabelle 1

Gen	Sequenz ID	O	Start	Ende	Länge	Bezeichnung
<i>fumA</i>	2	f	5214	6395	1182	Permease
<i>fumB</i>	4	f	6418	7068	651	tetR-artiger Transkriptionsregulator
<i>fumC</i>	6	f	7232	8176	945	lysR-artiger Transkriptionsregulator
<i>fumD</i>	8	f	8294	9916	1623	Carboxylesterase
<i>fumE</i>	10	f	9876	11378	1503	Tricarballylatdehydrogenase
<i>fumF</i>	12	f	11494	12537	1044	Citratverwertungsprotein B
<i>fumG</i>	14	f	12541	13836	1296	Tricarballylatprotonensymport
<i>fumH</i>	16	f	13957	15027	1071	Alkoholdehydrogenase
<i>fumI</i>	18	r	5063	3795	1269	Aminotransferase
<i>fumJ</i>	20	r	3513	679	2835	TonB-abhängiger Rezeptor
<i>fumK</i>	22	r	551	?	?	Acetolactatsynthase (teilweise)

Indem das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt so geführt wird, daß ein Enzym eingesetzt wird, welches wenigstens 90 % Sequenzidentität mit wenigstens einem der Enzyme ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 aufweist, kann ein noch vollständigerer Abbau der Fumonisine im Magen-Darm-Trakt von Tieren sichergestellt werden, wobei gleichzeitig nicht nur Fumonisine, sondern auch verwandte bzw. strukturell ähnliche Mykotoxine im anaeroben Milieu entgiftet werden können, wie zum Beispiel das AAL Toxin.

Indem das Verfahren bevorzugt so geführt wird, daß bei Einsatz von Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25 als Cosubstrat ein Keton, insbesondere eine α -Ketosäure, eingesetzt wird, kann insbesondere beim Abbau der Aminogruppe von Fumonisin und gleichzeitigem Einsatz von einer α -Ketosäure, wie beispielsweise Brenztraubensäure, die Aminogruppe an dem Fumonisinmolekül durch eine Ketogruppe ersetzt werden, wobei als Nebenprodukt dieser Reaktion Alanin entsteht, welches vollständig unschädlich ist, so daß ein vollständiger Abbau von Fumosinen zu unschädlichen Substanzen sichergestellt ist.

Die Erfindung zielt weiterhin auf einen Futtermittelzusatz ab, mit welchem es sicher und zuverlässig gelingt, Mykotoxine, insbesondere Fumonisine im Futtermittel und/oder dem Verdauungstrakt von Tieren sauerstoffunabhängig abzubauen bzw. zu detoxifizieren.

Zur Lösung dieser Aufgaben ist ein derartiger Futtermittelzusatz im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein Enzym der Sequenz ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 oder wenigstens ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus zur Produktion dieser Enzyme sowie gegebenenfalls zusätzlich wenigstens ein Cosubstrat für wenigstens eines bzw. einige der eingesetzten Enzyme und ein inerter Träger enthalten sind. Ein derartiger Futtermittelzusatz, in dem wenigstens ein Enzym oder ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus zur Produktion dieses Enzyms sowie gegebenenfalls zusätzlich wenigstens ein Co-

substrat für wenigstens eines bzw. einige der eingesetzten Enzyme und ein inerter Träger enthalten sind, zeichnet sich dadurch aus, daß er zielgerichtet Mykotoxine, insbesondere Fumonisine im Verdauungstrakt von Tieren abbaut und somit detoxifiziert. Durch den Einsatz eines erfindungsgemäßen Futtermittelzusatzes, welcher im wesentlichen aus isolierten Enzymen sowie gegebenenfalls deren Cosubstraten und Trägern bestehen, ergibt sich der Vorteil, daß diese ihre katalytische Aktivität in einer Umgebung und unter Bedingungen beibehalten, in welchem beispielsweise komplette Mikroorganismen nicht oder nur wenig aktiv wären, wobei gleichzeitig eine bedeutend höhere, spezifische Aktivität erzielt werden kann, sowie definierte Reaktionen unter Vermeidung von unerwünschten Nebenreaktionen katalysiert werden können. Darüber hinaus können Probleme, welche gemäß dem Stand der Technik durch den Einsatz vermehrungsfähiger Keime in den Futtermitteln entstanden sind, mit Sicherheit hintangehalten werden und überdies weisen Futtermittelzusätze, welche nur isolierte Enzyme enthalten, sowohl eine bessere Eignung zur Formulierung für gezielte und kontrollierte Aktivierung, d.h. beispielsweise an einer bestimmten Stelle des Verdauungstrakts, als auch die Vermeidung von unerwünschtem, erhöhtem Substratverbrauch auf. Um die Spezifität noch weiter zu erhöhen, ist der Futtermittelzusatz gemäß der vorliegenden Erfindung dahingehend bevorzugt weitergebildet, daß durch molekulargenetische Methoden, Mutagenese oder molekulare Evolution veränderte Enzyme eingesetzt sind.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung ist der Futtermittelzusatz so ausgebildet, daß ein Enzym eingesetzt ist, welches wenigstens 90 % Sequenzidentität mit einem Enzym der ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 aufweist. Wenn ein Enzym eingesetzt ist bzw. wird, welches wenigstens 90 % Sequenzidentität mit einem Enzym mit der ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 aufweist, gelingt es, neben den bevorzugt abzubauenen Fumonisininen auch weitere Mykotoxine sicher und zuverlässig im Magen-Darm-Trakt von Tieren sauerstoffunabhängig abzu-

bauen, wodurch eine weitgehende Entgiftung der aufgenommenen Futtermittel erzielt werden kann.

Indem der Futtermittelzusatz so ausgebildet ist, wie dies einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung entspricht, daß die Enzyme, veränderten Enzyme und/oder zu wenigstens 90 % identen Enzyme mit einer Schutzhülle ummantelt eingesetzt sind, kann sichergestellt werden, daß die Enzyme, die zu wenigstens 90 % identen Enzyme oder veränderten Enzyme vor einem vorzeitigen Aktivitätsverlust gesichert sind und sicher und zuverlässig an der vorgesehenen Stelle des Magen-Darm-Trakts ihre Wirkung entfalten.

Indem der Futtermittelzusatz bevorzugt so weitergebildet ist, daß die Enzyme aus einer Carboxylesterase ID-Nr. 9, Tricarballoylat-Dehydrogenase ID-Nr. 11, einem Citratverwertungsprotein ID Nr. 13, Alkohol-Dehydrogenase ID-Nr. 17, Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25 und/oder Acetolactat-Synthase ID-Nr. 23 gewählt sind, werden im wesentlichen die zum Substratkatabolismus befähigten Enzyme zum Einsatz gebracht, so daß neben einer geringeren Menge an einzusetzenden Enzymen auch sichergestellt werden kann, daß keine unerwünschten Nebenreaktionen im Magen-Darm-Trakt von Tieren auftreten.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung ist der Futtermittelzusatz so ausgebildet, daß eine Carboxylesterase ID-Nr. 9, eine Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25, eine α -Ketosaure als Cosubstrat und ein inerter Träger enthalten sind. Indem der Futtermittelzusatz eine Carboxylesterase, eine Aminotransferase und eine α -Ketosaure als Cosubstrat neben einem inerten Träger aufweist, gelingt es insbesondere, Fumonisine, welche in den Futtermitteln enthalten sind, zuerst zu hydrolysieren, indem von den Fumonisin Tricarballoylsäurereste mit Hilfe einer Carboxylesterase abgespalten werden, und das so gebildete hydrolysierte Fumonisin in weiterer Folge unter Einwirkung der Aminotransferase und der α -Ketosaure als Cosubstrat, im vorliegenden Fall bevorzugt Brenztraubensäure, weiter umzusetzen, indem eine Aminogruppe von dem hydrolysierten Fumonisinmolekül durch eine

Ketogruppe ersetzt wird, so daß ein für Tiere völlig ungefährliches 2-Keto-hydrolysiertes Fumonisin entsteht, welches unverändert ausgeschieden werden kann, und als Nebenprodukt Alanin gebildet wird, welches ebenfalls keinerlei negative Eigenschaften auf den Organismus ausübt.

Schließlich zielt die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von Genen, wie sie in den Sequenzen ID-Nr. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 dargestellt sind, oder kompletten, rekombinanten Wirtsorganismen zur Expression dieser Gensequenzen sowie gegebenenfalls von Cosubstraten zur Herstellung eines Futtermittelzusatzes für Tiere ab. Mit derartig hergestellten Futtermittelzusätzen gelingt ein vollständiger und zuverlässiger Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin im Verdauungstrakt von Tieren, wobei für einen derartigen Abbau im Gegensatz zu aus dem Stand der Technik bekannten Genen keinerlei molekularer Sauerstoff erforderlich ist.

In bevorzugter Weise werden gemäß der vorliegenden Erfindung eine Carboxylesterase ID-Nr. 9, eine Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25, eine α -Ketosäure als Cosubstrat sowie ein inerter Träger eingesetzt, mit welcher Verwendung insbesondere Fumonisine sicher und zuverlässig im Verdauungstrakt von Tieren zur Gänze zu unschädlichen Bestandteilen abgebaut werden können.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen sowie Figuren näher dargestellt. In diesen zeigt:

Fig. 1 den Fumonisin-katabolischen Gencluster,

Fig. 2 die Michaelis-Menten-Kurve für Fumonisin-Carboxylesterase FumD, und

Fig. 3 eine Abbaukurve von hydrolysiertem Fumonisin B₁.

In Fig. 1 ist ein Fumonisin katabolischer Gencluster als Teilsequenz von 15420 Basenpaaren eines mikrobiellen Stammes mit der Hinterlegungsnummer DSM 16254 dargestellt. In dem *fum*-Gencluster des bakteriellen Stammes DSM 16254 wird die Transkription der offenen Leserahmen durch einen bidirektionalen Promotor gesteuert bzw. geregelt, welcher zwischen *fumA* und *fumI* angeordnet

ist. Der Cluster codiert Proteine, welche in der Regulierung der Genexpression, wie beispielsweise FumB und FumC, in der Substraterkennung und dem Transport, wie beispielsweise FumJ, FumA und FumG und in einem Substratkatabolismus, wie beispielsweise FumD, FumE, FumF, FumH, FumI und FumK involviert sind.

Beispiele

Beispiel 1: Die Enzymkinetik von Fumonisin-Carboxylesterase

Das *fumD* Gen (Sequenz ID-Nr. 8), welches eine Fumonisin-Carboxylesterase codiert, wurde kloniert und in *Pichia pastoris* unter Verwendung von Standardverfahren exprimiert. Das his-getaggte Enzym wurde rückgewonnen und aus der überstehenden Lösung der Kultur durch Affinitätschromatographie gereinigt. Die Enzymkonzentration wurde bestimmt und die enzymkinetischen Parameter wurden mit sieben unterschiedlichen Substratkonzentrationen im Bereich zwischen 50 µg bis 25 mg FB₁ pro Liter und einer Enzymkonzentration von 0,33 ng/ml bestimmt. Die Reaktionen wurden in 20 mM Tris-Cl (pH 8,0) Puffer mit 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin gepuffert und bei 30 °C inkubiert. Proben wurden nach 0, 30, 60 120 und 240 Minuten Inkubation genommen und durch HPLC-MS/MS analysiert. Fumonisin B₁ (FB₁) und hydrolysiertes Fumonisin B₁ wurden quantifiziert basierend auf einer Kalibrierung mit den gereinigten Referenzsubstanzen und einem vollständig ¹³C markierten, internen FB₁ Standard.

Fig. 2 zeigt die Michaelis-Menten-Kurve für die Transformation von Fumonisin B₁ (FB₁) durch Fumonisin-Carboxylesterase FumD, welche bei einer Enzymkonzentration von 0,33 ng/ml in Tris-Cl-Puffer (pH 8,0) bestimmt wurde, wobei anfängliche Enzymgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration aufgetragen wurden. Die Michaelis-Menten-Kurve zeigt einen Abfall bei höheren Substratkonzentrationen, da die Enzymgeschwindigkeit basierend auf dem Produkt, d.h. hydrolysiertes FB₁-Bildung berechnet wurde. Da hydrolysiertes FB₁ aus FB₁ in einer zweistufigen Reaktion über

partiell hydrolysiertes FB₁ mit lediglich einer Tricarballylsäure-Seitenkette, die zurückbehalten wurde, und einer Seitenkette ausgebildet wird, die abgespalten wurde, war die Endproduktbildung bei hohen Substratkonzentrationen verzögert. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M wurde als 0,90 µmol/l berechnet, was 650 ppb äquivalent ist, und die Umwandlungszahl war 900 pro Sekunde.

Aus Fig. 2 ergibt sich, daß Fumonisine mit der Carboxylesterase in den relevanten Konzentrationsbereichen rasch und vollständig hydrolysiert werden können.

Beispiel 2: Die katalytische Aktivität von hydrolysierter Fumonisinaminotransferase

Sequenz ID-Nr. 18 wurde unter Verwendung von Standardverfahren kloniert und in E. coli exprimiert unter Steuerung bzw. Regelung eines Bakteriophagen T7 Promotors. Die Bakterienzellen wurden gesammelt in 50 mM Natriumphosphatpuffer, neuerlich suspendiert und durch Ultraschall lysiert. Hydrolysiertes Fumonisin wurde hinzugefügt und die Proben wurden bei 25 °C inkubiert. Proben wurden in Zeitintervallen genommen und durch HPLC-MS/MS analysiert. Es wurde keine Reduktion der hydrolysierten FB₁ Konzentration beobachtet. Wenn ein Cosubstrat, wie beispielsweise eine α-Ketosäure, wie Brenztraubensäure oder Oxalacetat zu der Reaktion hinzugefügt wurde, konnte ein vollständiger Abbau des hydrolysierten Fumonisins zu 2-Keto-HFB₁ beobachtet werden, wie dies in Fig. 3 dargestellt ist. Diese Substanz ist für Tiere vollständig unschädlich.

Beispiel 3: Enzymaktivität in Darmmilieu

Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität von FUM-Carboxylesterase im Verdauungstrakt wurden schlachtfrische Schweinedärme verwendet und unter Ausschluß von Sauerstoff ins Labor transportiert und in einer anaeroben Sterilwerkbank untersucht.

Etwa 10cm lange Stücke von Duodenum und Jejunum wurden abgebunden und herausgeschnitten. Mit Kanülen wurde Fumonisin B1 in konzentrierter wäßriger Lösung auf eine Endkonzentration von etwa 10 ppm eingespritzt und mit Darminhalt vermischt. Anschließend wurden 5 µg Fumonisin-Carboxylesterase in wäßriger Lösung, bzw. dasselbe Volumen Wasser in den Negativkontrollen, eingespritzt und eingemischt. Die Darmabschnitte wurden bei 39 °C inkubiert. Mit Hilfe von Kanülen wurden Proben gezogen und durch HPLC-MS/MS analysiert. Dabei zeigte sich, daß Fumonisin B1 im Duodenum und Jejunum zum Zeitpunkt der ersten Probenahme nach zwei Stunden bereits vollständig hydrolysiert war.

Beispiel 4: Ermittlung des Temperaturbereichs der Aktivität von Fumonisin-Carboxylesterase

Zur Ermittlung des Temperaturbereichs, in dem Fumonisin-Carboxylesterase aktiv ist, wurden 1,6 ng/ml FUM-Carboxylesterase in 20 mM Tris-Cl Puffer, pH 7,0, mit 0,1 mg/ml BSA und 10 ppm Fumonisin B1 bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Dabei zeigte sich, daß das Temperaturoptimum für das Enzym bei 30 °C lag. Auch bei 40 °C und sogar 50 °C wurde enzymatische Aktivität noch eindeutig festgestellt. Somit ist diese FUM-Carboxylesterase zur Anwendung unter den Temperaturbedingungen wie im Verdauungstrakt, oder im Zuge von Prozeßschritten der Lebens- oder Futtermittelherstellung, die bei erhöhter Temperatur stattfinden, geeignet.

Beispiel 5: Bestimmung des pH-Bereichs der Aktivität von Fumonisin-Carboxylesterase

Zur Bestimmung des pH-Bereichs, in dem Fumonisin-Carboxylesterase aktiv ist, wurde Teorell-Stenhagen-Puffer verwendet. Dieser Puffer läßt sich durch die Kombination von Citrat, Phosphat und Borat über einen Bereich von 10 pH Einheiten mit

gleicher Pufferkapazität einstellen. FUM-Carboxylesterase wurde in einer Konzentration von 3,3 ng/ml mit 10 ppm Fumonisin B1 bei verschiedenen pH-Werten in diesem Puffer bei 25 °C inkubiert. Die höchste Aktivität zeigte sich bei pH 8,0, aber es konnte im gesamten Bereich von pH 5 bis pH 10 Aktivität festgestellt werden. Durch die Aktivität in diesem breiten pH-Bereich wird die technologische Anwendung des Enzyms als Futtermittelzusatz bzw. in Zuge der Verarbeitung von Lebens- und Futtermitteln ermöglicht.

Beispiel 6: Fütterungsversuch mit Ferkeln

Der Versuch wurde in einem Versuchsstall mit 12 Buchten für jeweils 10 Tiere durchgeführt. Der Stall war ausgestattet mit Spaltenboden, Schalentränkern und einem computergesteuerten Fütterungssystem. Die Automaten waren entlang der Buchtenwände angeordnet. Das Stallklima wurde täglich automatisch aufgezeichnet und die Temperatur nach den Standardempfehlungen zur Ferkelaufzucht eingestellt.

120 gemischt-geschlechtliche Absetzferkel (Alter: ca. 4 Wochen, durchschnittliches Einstellgewicht 8,21 kg) wurden für diesen Versuch eingesetzt. Jedes Ferkel wurde mit einer Ohrmarke versehen und einzeln gewogen. Die 120 Ferkel wurden auf 12 Buchten zufällig verteilt. Alle Ferkel entstammten dem österreichischen Zuchtprogramm ÖHYB (= (Edelschwein x Landrasse) x Pietrain).

Direkt nach dem Absetzen wurden die Ferkel für 2 Tage mit einem Starterfutter gefüttert, nach dieser Eingewöhnungsphase erfolgte die Umstellung auf das Versuchsfutter. Die Fütterung erfolgte 2-phasig: Absetzphase Tag 1 - 14, Aufzuchtphase Tag 15 - 42. Das Versuchsfutter wurde buchtenindividuell über die Spotmix-Fütterungsanlage gemischt und je nach Anzahl der Ferkel, Gewichtsentwicklung und Futterverzehr zweimal täglich trocken zugeteilt. Wasser stand zur Aufnahme ad libitum zur Verfügung. Die 12 Buchten wurden in vier verschiedene Applikationsgruppen zu je

drei Wiederholungen geteilt und erhielten die folgenden Einmischungen ins oben beschriebene Futter:

Gruppe	
Negativ-Kontrolle	Keine Toxine, kein Enzymzusatz
Positiv-Kontrolle	4 - 5,5 ppm Fumonisin B1
Versuchsgruppe 1	4 - 5,5 ppm Fumonisin B1 + Enzymmix 1 (Carboxylesterase, Aminotransferase, Pyruvat) 0,5 kg/t Futter
Versuchsgruppe 2	4 - 5,5 ppm Fumonisin B1 + Enzymmix 1 (Carboxylesterase, Aminotransferase, Pyruvat, inerte Carrier) 1 kg/t Futter

In der Positiv-Kontrolle wurden bei fast der Hälfte der Tiere respiratorische Probleme beobachtet, wobei es auch zu einem Ausfall kam. Alle anderen Gruppen erschienen gesund.

Leistungsdaten

Gruppe	Anzahl der Tiere	Anfangsgewicht (Durchschnitt, kg)	Endgewicht (Durchschnitt, kg)	Ausfälle
Negativ-Kontrolle	30	8,34	26,82	
Positiv-Kontrolle	30	8,17	24,77	1
Versuchsgruppe 1	30	8,08	26,69	
Versuchsgruppe 2	30	8,25	27,03	

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung eines Futtermittelzusatzes zum sauerstoffunabhängigen, enzymatischen Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Nukleinsäuresequenz von Genen entsprechend Sequenz ID-Nr. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 vorgelegt wird, die wenigstens eine Nukleinsäuresequenz in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen exprimiert wird und wenigstens ein dadurch hergestelltes Enzym entsprechend Sequenz ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 oder auch ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus gewonnen werden kann, wobei das wenigstens eine Enzym gegebenenfalls gemeinsam mit einem Cosubstrat in einem Futtermittel eingesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vor Einsatz der Enzyme im Futtermittel diese mittels molekulargenetischer Methoden, Mutagenese oder molekularer Evolution verändert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme isoliert werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme in einer Schutzhülle verkapselt werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme aus Permease ID-Nr. 3, Carboxylesterase ID-Nr. 9, Tricarballylat-Dehydrogenase ID-Nr. 11, Citratverwertungsprotein ID Nr. 13, Alkohol-Dehydrogenase ID-Nr. 17, Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25 und/oder Acetolactat-Synthase ID-Nr. 23 gewählt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Enzym eingesetzt wird, welches wenigstens 90 % Sequenzidentität mit wenigstens einem der Enzyme ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 aufweist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß bei Einsatz von Aminotransferase ID-Nr. 19 oder

ID-Nr. 25 als Cosubstrat ein Keton, insbesondere eine α -Ketosäure, eingesetzt wird.

8. Futtermittelzusatz zum sauerstoffunabhängigen, enzymatischen Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin, in Futtermitteln bzw. im Verdauungstrakt von Tieren, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein Enzym der Sequenz ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 oder wenigstens ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus zur Produktion dieser Enzyme sowie gegebenenfalls zusätzlich wenigstens ein Cosubstrat für wenigstens eines bzw. einige der eingesetzten Enzyme und ein inerter Träger enthalten sind.

9. Futtermittelzusatz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß durch molekulargenetische Methoden, Mutagenese oder molekulare Evolution veränderte Enzyme eingesetzt sind.

10. Futtermittelzusatz nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Enzym eingesetzt ist, welches wenigstens 90 % Sequenzidentität mit einem Enzym der ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 aufweist.

11. Futtermittelzusatz nach Anspruch 8, 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme, veränderten Enzyme und/oder zu wenigstens 90 % identen Enzyme mit einer Schutzhülle ummantelt eingesetzt sind.

12. Futtermittelzusatz nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme aus einer Carboxylesterase ID-Nr. 9, Tricarballoylat-Dehydrogenase ID-Nr. 11, einem Citratverwertungsprotein ID Nr. 13, Alkohol-Dehydrogenase ID-Nr. 17, Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25 und/oder Acetolactat-Synthase ID-Nr. 23 gewählt sind.

13. Futtermittelzusatz nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß eine Carboxylesterase ID-Nr. 9, eine Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25, eine α -Ketosäure als Cosubstrat und ein inerter Träger enthalten sind.

14. Verwendung von Genen, wie sie in den Sequenzen ID-Nr. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 dargestellt sind,

oder kompletten, rekombinanten Wirtsorganismen zur Expression dieser Gensequenzen sowie gegebenenfalls von Cosubstraten zur Herstellung eines Futtermittelzusatzes für Tiere.

15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Carboxylesterase ID-Nr. 9, eine Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25, eine α -Ketosäure als Cosubstrat sowie ein inerter Träger eingesetzt werden.

Wien, 18. SEP. 2008

Erber Aktiengesellschaft
durch:
Patentanwälte
Mikšovsky & Pollhammer 08

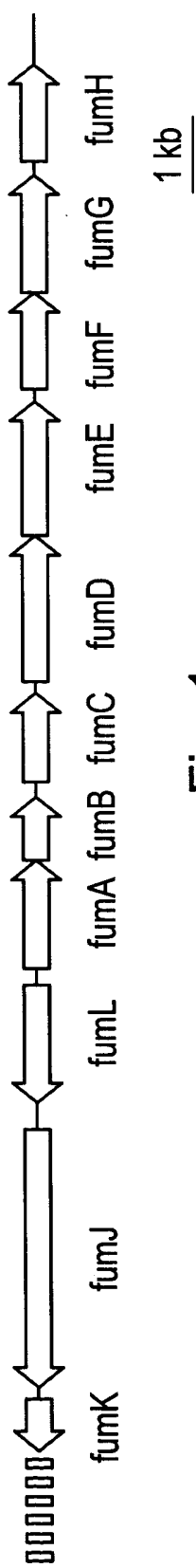


Fig. 1

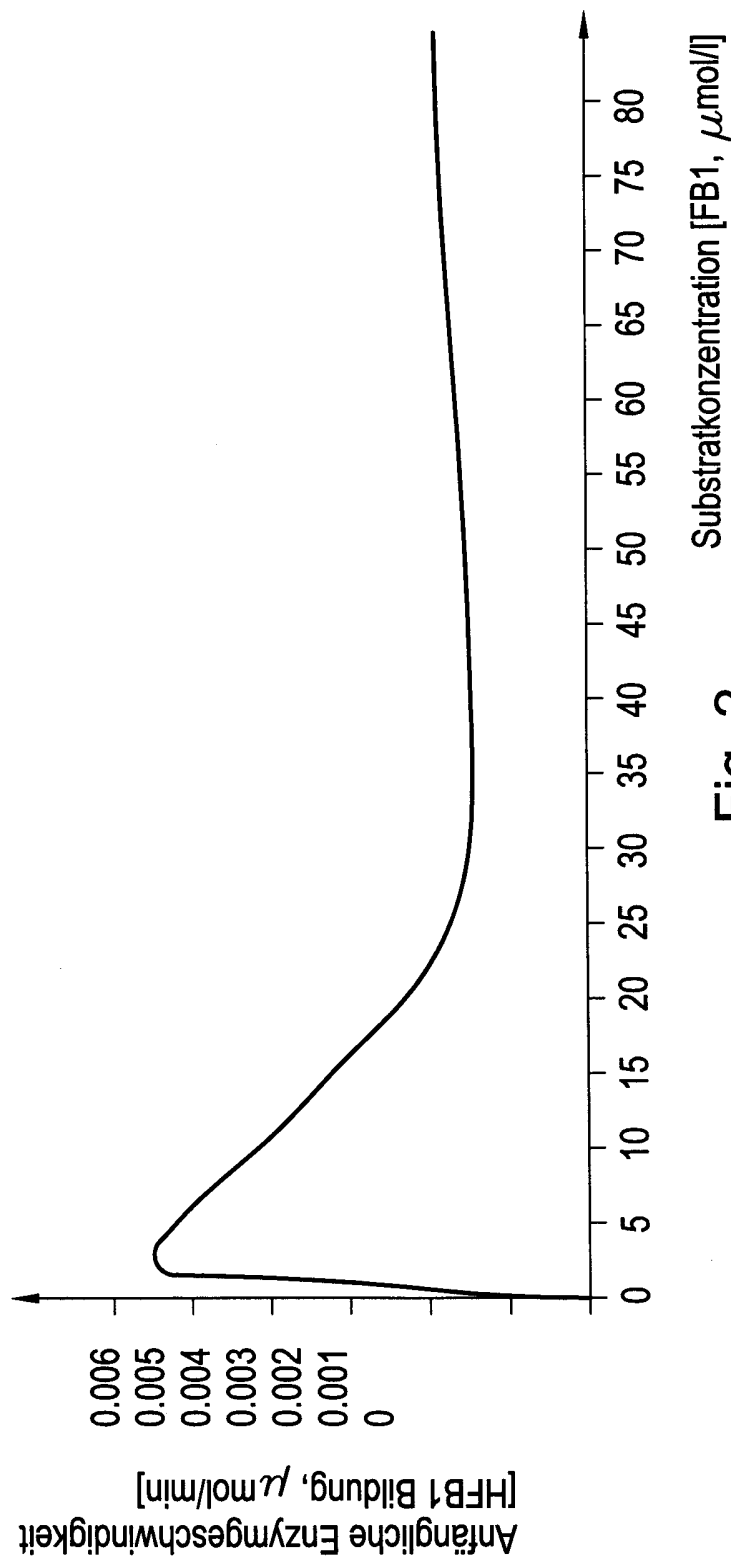


Fig. 2

010148

2/2

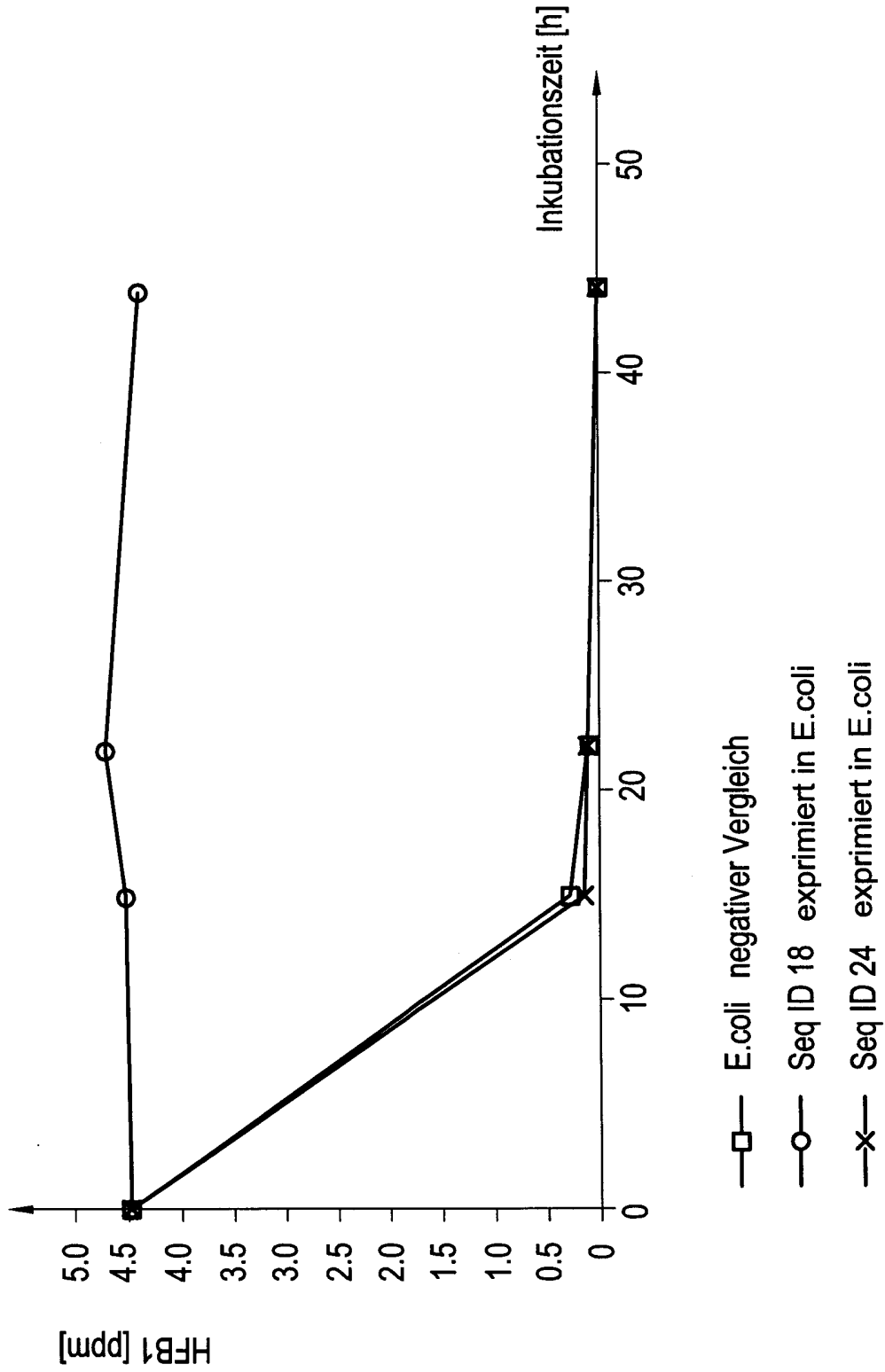


Fig. 3

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung eines Futtermittelzusatzes zum sauerstoffunabhängigen, enzymatischen Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Nukleinsäuresequenz von Genen entsprechend Sequenz ID-Nr. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 vorgelegt wird, die wenigstens eine Nukleinsäuresequenz in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen exprimiert wird und wenigstens ein dadurch hergestelltes Enzym entsprechend Sequenz ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 oder auch ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus gewonnen werden kann, wobei das wenigstens eine Enzym gegebenenfalls gemeinsam mit einem Cosubstrat in einem Futtermittel eingesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vor Einsatz der Enzyme im Futtermittel diese mittels molekulargenetischer Methoden, Mutagenese oder molekularer Evolution verändert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme isoliert werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme in einer Schutzhülle verkapselt werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme aus Permease ID-Nr. 3, Carboxylesterase ID-Nr. 9, Tricarballylat-Dehydrogenase ID-Nr. 11, Citratverwertungsprotein ID Nr. 13, Alkohol-Dehydrogenase ID-Nr. 17, Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25 und/oder Acetolactat-Synthase ID-Nr. 23 gewählt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Enzym eingesetzt wird, welches wenigstens 90 % Sequenzidentität mit wenigstens einem der Enzyme ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 aufweist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß bei Einsatz von Aminotransferase ID-Nr. 19 oder

NACHGEREICHT

ID-Nr. 25 als Cosubstrat ein Keton, insbesondere eine α -Ketosäure, eingesetzt wird.

8. Futtermittelzusatz zum sauerstoffunabhängigen, enzymatischen Abbau von Mykotoxinen, insbesondere Fumonisin, in Futtermitteln bzw. im Verdauungstrakt von Tieren, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein Enzym der Sequenz ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 oder wenigstens ein kompletter, rekombinanter Wirtsorganismus zur Produktion dieser Enzyme sowie gegebenenfalls zusätzlich wenigstens ein Cosubstrat für wenigstens eines bzw. einige der eingesetzten Enzyme und ein inerter Träger enthalten sind.

9. Futtermittelzusatz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß durch molekulargenetische Methoden, Mutagenese oder molekulare Evolution veränderte Enzyme eingesetzt sind.

10. Futtermittelzusatz nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Enzym eingesetzt ist, welches wenigstens 90 % Sequenzidentität mit einem Enzym der ID-Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 aufweist.

11. Futtermittelzusatz nach Anspruch 8, 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme, veränderten Enzyme und/oder zu wenigstens 90 % identen Enzyme mit einer Schutzhülle ummantelt eingesetzt sind.

12. Futtermittelzusatz nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme aus einer Carboxylesterase ID-Nr. 9, Tricarballylat-Dehydrogenase ID-Nr. 11, einem Citratverwertungsprotein ID Nr. 13, Alkohol-Dehydrogenase ID-Nr. 17, Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25 und/oder Acetolactat-Synthase ID-Nr. 23 gewählt sind.

13. Futtermittelzusatz nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß eine Carboxylesterase ID-Nr. 9, eine Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25, eine α -Ketosäure als Cosubstrat und ein inerter Träger enthalten sind.

14. Verwendung von Genen, wie sie in den Sequenzen ID-Nr. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 dargestellt sind,

oder kompletten, rekombinanten Wirtsorganismen zur Expression von Enzymsequenzen ID Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 sowie gegebenenfalls von Cosubstraten zur Herstellung eines Futtermittelzusatzes für Tiere.

15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß ein Cosubstrat gewählt aus der Gruppe einer Carboxylesterase ID-Nr. 9, einer Aminotransferase ID-Nr. 19 oder ID-Nr. 25 oder einer α -Ketosäure und ein inerter Träger eingesetzt werden.

Wien, 3. September 2009

Erber Aktiengesellschaft
durch:
Patentanwälte
Mikšovsky & Pollhammer OG

NACHGEREICHT



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : C12N 15/52; A23L 1/015
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: C12N 15/52, A23L1/015D
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): C12N, A23L
Konsultierte Online-Datenbank: STN-registry, Blast, Fulltext
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 3. September 2009 eingereichten Ansprüchen 1-15 erstellt.

Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	WO 2006/053327 A2 (ERBER AKTIENGESELLSCHAFT) 26. Mai 2006 (26.05.2006) <i>Anspruch 1</i> --	1-15
A	WO 2004/085624 A2 (DIVERSA CORPORATION) 7. Oktober 2004 (07.10.2004) <i>Zusammenfassung; Anspruch 1</i> --	1-15
A	WO 2003/053161 A1 (ERBER AKTIENGESELLSCHAFT) 3. Juli 2003 (03.07.2003) <i>Anspruch 1</i> ----	1-15

Datum der Beendigung der Recherche:
20. November 2009

☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt

Prüfer(in):
Mag. MOSSER

¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente:

- X** Veröffentlichung **von besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y** Veröffentlichung **von Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese **Verbindung für einen Fachmann naheliegend** ist.

- A** Veröffentlichung, die den **allgemeinen Stand der Technik** definiert.
- P** Dokument, das **von Bedeutung** ist (Kategorien X oder Y), jedoch **nach dem Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E** Dokument, das **von besonderer Bedeutung** ist (Kategorie X), aus dem ein **älteres Recht** hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- &** Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.