

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 541**

51 Int. Cl.:

C12N 9/18 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2009 E 15000331 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2896691**

54 Título: **Aditivo para la degradación enzimática de micotoxinas, así como uso del mismo**

30 Prioridad:

18.09.2008 AT 50108 U

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

23.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MOLL, WULF-DIETER;
HARTINGER, DORIS;
GRIESSLER, KARIN;
BINDER, EVA MARÍA y
SCHATZMAYR, GERD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 541 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

Aditivo para la degradación enzimática de micotoxinas, así como uso del mismo

La presente invención se refiere a un aditivo para la degradación enzimática de fumonisinas en una materia prima vegetal y mezclas que contienen las materias primas vegetales, así como a un uso del mismo.

5 Las micotoxinas aparecen con mucha frecuencia en productos vegetales agrícolas y provocan, en función del tipo de las micotoxinas, serios daños industriales, en particular en los alimentos preparados a partir de los productos agrícolas, y también en animales y seres humanos alimentados con este tipo de alimentos, siendo este tipo de daños extremadamente variado. Se han desarrollado ya numerosos métodos con los que se intenta desintoxicar o bien degradar o hacer inocuas a micotoxinas de este tipo con el fin de evitar los daños provocados por las
10 micotoxinas en los sectores de la alimentación animal y humana, la cría de animales, el procesamiento de piensos y alimentos, y similares.

Entre las micotoxinas conocidas existe una pluralidad de micotoxinas estructuralmente relacionadas entre sí tales como, por ejemplo, las fumonisinas, de las cuales la fumonisina B1 es la toxina del grupo que aparece con mayor frecuencia. Sin embargo, se conocen numerosos derivados y moléculas relacionados que asimismo presentan efectos tóxicos en los seres humanos y animales. Así, es conocido que las fumonisinas impiden el metabolismo de esfingolípidos a través de una interacción con la enzima ceramida sintasa. Los esfingolípidos no sólo son componentes de las membranas celulares, sino que también juegan un papel importante como moléculas de señales y mensajeras en muchos procesos celulares elementales tal como el desarrollo celular, la migración celular y la unión celular, en el caso de procesos inflamatorios y procesos de transporte intracelulares. En virtud de este impedimento del metabolismo de esfingolípidos se responsabiliza a las fumonisinas del efecto tóxico en las más diversas especies animales y también para el hombre. Así, pudo determinarse que las fumonisinas actúan de forma cancerígena en roedores y fueron relacionadas mediante datos epidemiológicos con cáncer esofágico y con el defecto del tubo neural en el hombre. En diferentes especies animales tales como, por ejemplo, cerdos se las hace responsables de la toxicosis típica por edema pulmonar. Las fumonisinas son a este respecto una contaminación casi omnipresente en las más diversas especies de cereales y, en particular, en maíz así como nueces y verduras este efecto fuertemente negativo no es nada despreciable en relación con la salud de los seres humanos y animales.

La degradación microbiana de fumonisinas se describió ya en el documento EP-A 1 860 954, conforme al cual se emplean microorganismos para la desintoxicación de fumonisinas y derivados de fumonisinas, en los que las bacterias o levaduras desintoxicantes, elegidas de cepas definidas con precisión para la desintoxicación de
30 fumonisinas, se añaden a forrajes.

También se describieron ya vías de metabolismo catabólicas para la degradación biológica de fumonisinas y los genes y enzimas responsables de ellas. Así, por ejemplo, el documento EP 0 988 383 describe composiciones y procedimientos desintoxicantes de fumonisina, produciéndose las enzimas degradantes de fumonisina empleadas, en primer término, en plantas transgénicas, en las que la desintoxicación de fumonisinas tiene lugar con ayuda de una amino-oxidasa que requiere oxígeno molecular para su actividad enzimática.

Además de ello, el documento WO 2004/085624 describe transaminasas, desaminasas y aminomutasas y composiciones y procedimientos para la desintoxicación enzimática, en los que se desintoxican, en particular, toxinas aminadas, por ejemplo fumonisinas. A este respecto, para la desintoxicación se emplean polipéptidos que poseen una actividad de desaminasa.

40 A partir del documento WO 00/04158 se ha dado a conocer el uso de amino-oxidasas degradantes de fumonisina en la producción de alimentos o forrajes o bien en el procesamiento de materias primas vegetales.

Procedimientos hasta ahora conocidos tienen, sin embargo, en común que para una desintoxicación de las micotoxinas requieren oxígeno molecular para las vías de metabolismo catabólicas descritas, en donde, en particular, las amino-oxidasas necesarias no pueden trabajar bajo condiciones independientes del oxígeno. El empleo de genes y enzimas de este tipo para la desintoxicación de forrajes, por ejemplo en el tracto digestivo de animales, no es posible en virtud del medio esencialmente exento de oxígeno en el tracto digestivo de los animales, o bien los genes y enzimas conocidos no muestran efecto alguno.

La invención se dirige entonces a proporcionar un aditivo para la degradación enzimática de micotoxinas, con el que se consiga de forma segura y fiable degradar o bien desintoxicar fumonisinas para formar sustancias toxicológicamente inocuas.

Por materias primas vegetales se entienden en este caso cereales o bien productos de cereales, hierbas, frutas o verduras, así como productos intermedios que contienen estas sustancias para la producción de alimentos y forrajes tales como, por ejemplo, ensilado, mosto de fruta o similar.

Por aditivos se entienden, ante todo, aditivos de forrajes, aditivos de alimentos así como aditivos para la preparación de bioetanol.

Con un procedimiento de este tipo se consigue, además, mantener el metabolismo de los esfingolípidos, el cual es impedido por una interacción de las fumonisinas con la enzima ceramida sintasa y, al mismo tiempo, degradar biológicamente las fumonisinas para formar sustancias no tóxicas. Finalmente, se pueden conseguir aplicaciones tecnológicas de la destoxicación, dado que este procedimiento puede ser aplicado también a una mayor escala industrial, de modo que con el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden preparar de forma segura y fiable productos exentos de micotoxinas.

5

Seguidamente se listan las secuencias de ácidos nucleicos empleadas en el aditivo o bien las enzimas expresadas mediante estas secuencias de ácidos nucleicos en células huésped procarióticas y eucarióticas, que actúan de forma catalítica en el medio independiente del oxígeno.

10 Ácidos nucleicos

Secuencias:

SEQ ID N° 1

> Seq ID 1 (racimo de genes fum (metabolismo de fumonisina), 15.420 pb)

```

TGTCGGCGGATCRGTAAACTTCTACCGTGGTCTCGTTCGCCACAKCATAACATCACAGACRTCGGGATTTCCAACCTGAAC
GGGTCCCGCCCTGCCGGCCACATTTCCCGGAACGCCATATGGGTGATTTTCGACAATCCGGTTCAGGCGAAGATGGGTG
CGCCCCATTTAACCGGGTTCGAAAGAGGTTCGATCTGGTCTTGTCCCTGAAAGGTTTTTGGCGTGCAGGGATAAACGACA
CCAAGTTGATGCTGGGACGTTATTGCGACGAAGGGAACCCCTTCGTGGCGTGCCTGCAGACTCCAGGCAGAAGGTTTGC
CGTACCGGGACCCCGATTTCGTGACAATCGCGGCGACCTGTCCGGTGGTCTTGTAAATGCCCTCGGCCATATAGGCTGCCG
CGCCCTCGTGCAGCACCGGGACGAACAATATCCCATTTGTCTTCGAGCGCAGCCAGGAGCGGATCCACCTCCGGCGCATG
AGGCCGAAGACATACCGGACGCCCTTCGACGGCCAAACATCGTGCCAATAATTCTCCGCCGTGAGGCGCATGACGATCTC
CAGTACGAAAGGTGAGTGCCAGGTTCCGGCACATTCGTGTGGTTAGTTGATGCGCTGATCGGCCAACCAGACTGAGTGG
AGTTGGATGGCCGCACCTTACCCTGTCCGCGATAACTCTCAGATCCGGAAACGGACCCCGACATTAATAATAGCGCCGAC
CGGATCATAGGCAGAGCTGGTCCGGCTGGAAAACTGCTGGGGTCTGTCGCTATTGGCGGATCTCGGTGCAACAAAT
TATTGACCGATAGAAAACAGCTGCTGCTTCTGGCCAAAAGCCGCGATGTCGAAGGTCAATGTCGCGTCCGTGTACCAAACC
GCCGAGCGTGGTTCAAATTCGTATCGACGCCCTCCACATTGTCCGCATTGAACACCGATGCTCGCATGAAGCGCTGCTG
CACGAGAAGCGCCCAATCGTCCGTCGAATATCGCGCCTGGAAGTTGGCCGACCATTTTGGCGTGTCCGGTTGTCCGAGCG
AACGGATGGGCGCCGAGCCGGTCCGCGATGCGATAGGCAGAGGTATGGTCCGTTGCCAGCGCACGAAGACTGAACGTGCCG
CCGCCGACGGGGCGTGAGTAATAGGCCTCGAAGTCAATTCGCCCGCTTTCTGGACAGCCAGGTTGAGATTGGGACCCGT
CACTGTGATGGTCCGTCGGATTCTCCGTTATGAGTTCGACAGAAGAAGGTGTTTCCCTGCATCGCACGCGTGCATTTCT
GCTGGGGAAGGAGGAAATCGATCGCGCCCTCACCTTACCACATAGCGATCGACCGAAAACCTGAAACCCCGGCACGAAG
GCGGGCGTAGCACCGCGCCGAATGTAAGGACGTCCGCTTTTCAGGGCGCAAATCCGCTTGCAGGCGGTAAAGAACC
CGTCTGCACAGCTGTCCGCCATAAATTGAATTGAGCGTCCGCTGACGCGCGGGGTGCAATAGCTCGACAAGGCTTGGCC
CGCGGATATCTCGCGAACGGGTCCGCGGGAACCTGAGGCCGTGATCGGCTCATATTTCCGCCAGCTTCCAGGTTGTT
ACTCCACCGGACTGGCTGTAATCGGCATATCGGACGGCGCCGTTTAAAGTTCAGCGAACGTCAGCGCGCTGCCTTCCAG
AATCGGGACGCCGATTTTCGACAAAACCTTCTTGTATGTCATAGCTTCCCGAGAAGGGAAGTGGGTTGTAGAGATTGAAGC
CTCCAGGCCGACTGCTGCGCCGCGGAGCCCCCTGATTCCCGTATCGAGGTGTCGCTCGCCTGCGATATCGCGTCCGTT
TCCGCGGGGCTTCTCCTTGCATATTCGATACCAGCGGCGACCGAGACCGGGCCGCGCGGAACGACAGGCTATCGCC
GAGGTCCGCGGAAATCGTGAGTCCCGCCACATATTGCTCAAGCCTCAGCTGAGCGACGCCATCAGCGGTGACATAGTCGA
TGGCCGACGCGCTCCGGGAGCCTGTGCCGAAGAGATTGAGCGGCACGCAATCTTGGTTCGAGGCCGCGCCAGTGTGAACGG
CAGACGATATTGCCCGGGATCGCGGACCGCATCGACGGCGGCGTAGAGATTGCGGTTGATGGTGGATGTTTTCACG
AAGTTCGAGGTCCGTAAGGCCAAAGGAGGCCGAGCCATCGAGTTTCCAGCATTGCCAATGTCGCCCCGGAAGCCGGCAG
CGCCGCGTAGACTTTGCGAAATTCGATTTTCGACCAAGGGAAGTTCGCTTGAGAAGCGACCCGACAACGATCGAAGCC
TGGGCATTTCTGTCCATGAGCGTCCGAGTGGAGCCGGAAGGAAGGCTTATCACGGAAGATCCGGAATTTATTCGAGCC
ACCGACATGCGATATTACGAATGCACCCAGGTTGGTGTGGGAATAAGCATAGGTGCCCTCCGATACACCTGCACAGTGT
CGGACACATCATATGCGGCGCGTAGGAACGCGTTGTAGCGAAGCTGATCCGGGGCGAAGCCGATATTACGCGCGGTTCCA
TCCCGCCGCTCTGGAACGACGAGCTCGTAAATTTCCCGTAGTCGAAGGTCCCTAGGACTCCTCCGGGCAAAAACGCGAT
GCCTTTCAGAGGGCCGACGTGACAAGTCCGCCGTAGGATCCGCGAGAAGTGCGAATATCGGGCACGACCGTGCAGCCTG
TCGTAGCGCCGGCACGGGATATTGGCCGGCGCGATGTCGAACCAGCGGCGACCCGTTGCTTTCATCGGCCCGGATTCCG
TCCTGTGCAAAATATTTCGAAGTCCGAGCAAGTGAACCGGTCGTCCGCAACGAAGTCCGAAGGCGATCGAACCGCC
GTAGGACGGGAGTCCGCGGGTTGAAACACCCGACTGGAGCTCGGCCCTGATGCCTTCCAGATCTTCTGTCGAGCACGA
    
```

AGTTGATGACGCCCGAAACGGCATCGGAACCGTAGGCGGCCGAGGCGCCCGCTCACGACATCGACGCGCTTGACCAAC
GCCTGCGGCAGCACGTTGATATCGACCGAGCCTGTGAATTTGTCGCGACGAAACGGTTGCGGTTTACGAGGACGAGGTT
CCGGTTTGACCCGAGGCGCGCATGTTGAGCAGGTTCTGACCGCTGTTCCCGGTTCCGGGTGTCGTCGACGGGTTGGAGG
TCTTCAAGCTGTCGTTGAACACGGGCAGCTGGTTGAGTGCCTCGGCAAGGTTGGTTCGAGATGCTTCCCTTCAACTGCTCG
CTGGATACGGCTGTAACCGGCGTTCGCGAATTGAAGCCGTTCTGGAGGCGGCTGCCGCTCACGACGATTTCCGCTCGTCC
CCGTTCCGTTCCGCTTCCGCTGACCTATCGATCGGGATCGCTATCTGAGCACTGGCAGAGACAGGAAATGCGA
GGGTGCGAGCTACTGCGCCGAGCAAACTATTGCTTCCCGGCTTTTCGATTTCGATACATCTGACGT
CCCTCCGAATTGATAGGACTCCGTTTGTAGTCCCTTGTTCCTGACGCGCCGCTGCTCACACGGTCCGTCGGAGG
CTAAGCGTGGGCCTAAGGACCCGCAATTTGAACATCAAATGCAATGATCGGAGGCTTCATTGCACTTCGCGCATAGACC
GGCGCGGTAGTGAAAGTGCAATAATCAGGGATTTTGTGTAACAGTTGCGGCGATGACGTCGCGCATCGGCCACGCGGTT
GGCGCATCGACGTGGCTTTCGCGTTCGCGCCCTCAAGCACCGGCGAGTTGCATTAATAATGGGATGAGGCTGGAGAGAC
GCAAAATCTCTGAGGACCGCGCTGAACGCGCGATCCGTCGCTCGAGGTTCTCCGTTACATCGTCAACTGTATGGGCCG
AGAGAGAAACATATTTGTATAGGATGAACATAGACGCGCCCTTCAGGCACGCGCGGCCACGCATAGCCGATCCGAA
AATCGGATCGTCCGCAAGAATTTGCGGCATCTGCGCCGGCCCGTCTGCTTCAACTCAAGACCATGGCGCTGAGAC
TGTGCTCAGGCTGCGCGCAGGCGCGCTGGCGTTCGAGATAAGGCGCTTCGAGATAAGGCGCTTCGAAATGATCCTGAG
GGTTTCGATCGCGCCGCTCGGTACCGCAGAGAACCAGAAGGAGCCGGTCACAAATATATCCCGCGCCGATCGCGCG
CCTGTTTCGAGCCAGCAGGCGGAGATCGGATAGCCATTCGCAAGCATTTTCCCGAGCAACTGAGATCGGGTTCGATA
CCCAAATGCTGACTGCAATCGCGCCACCCGGAACCTGCGCGCACATCGTCAACGACACGAGCGCAAGCGCCGCTTC
GTCACAACATTTTCGAGCGGTGCGCGCGAACTCAAGCTGGGCGAGGCGCTGCTCCTCAAATACTTCGTGTCGAAAGGTG
TGGCAAAGACAGCGCAATATCGCCATCGTGGCGCTTGAACGCGTCCGATAAGCTTTGGGCGTGGTTATAGGTATAAAT
GCGCATGACCGCATCGGAAGCGAGAATCCCGCAGTATGCGGAGTGTCCACGGGAAGCGCCATGATAGGCGCCCTTT
GGCGCATAATATGTTTTCGCGCCGATAGGGACGCGCGAAGCAACCATCGCGGTTGAGGTGGCATCGCTCCATTTTTC
AGAACATCGCCCAATCCGATGACGGACATGCCACAAAGGCTTCGGCGAGGTTGACCATGATCTCGAAGGACCGGTC
ATGTTGTCGCGGAGAGTTCGTCGCGATCAGCGCGGCTTCGATTTTCGATTGCGCGTAAACCGAGCAAAATTTGGCCGTA
GGGATATCTGCGGCGCAATGCGCGGCACTCTGCTTAATGCTCGCGCAATCAACTTCGATTGACGTTGCGCGGTTTCG
ATTCGCGCGCAGCAACCGTGTGACTCGTGGCGTACATCCCGCCGGAATGACCGGTTTCGCGCGGTTCTCTGAGATCT
TCTGCGCTTGTTCGCTTCGCCATAATGCACTCTCGCGATAAATAATGGGTAATAATCCACGAAATCAACGATTCGTA
TCTGAAAGAGATATCTTGTAAATATACTGTATAATTATACAAATGCGCAATCGGACGACGGGATAGCGGGCAGGGAG
GACGGGAAATCTATGCGGAACGTCAGCGACAAGGCGCGCCACGAGACGCTCACCGTAGTCTGCGCGCAATGATCG
TTGGCAGCGCCGCTTGTAGGTTGTTGGAATACAGCCATCTTCTCGCGCCCTTGTAGAGGAGGGCGTATTCGCGCC
GAGGGTTGGGATCGCGGCAACGGTGGAAACTGCGGATCGCGCGGGAACATGCATCGGACCCGTTCTTATGAAGAC
GGGATATCTGCGGCGCAATGCGCGGCACTCTGCTTAATGCTCGCGCAATCAACTTCGATTGACGTTGCGCGGTTTCG
ATTTGCCATCGTGGCTTTCGCGAGCGGACGCGGAGCCCTGGAAGGTTCTTCGCTCAGCGCGCGATCTGATCATGACT
CATAATCGCGCGCCGACCGGCTGAGCGGAATATTTCTGGGCGCGCAGACGATACCGCAGGTAATATCTGCTTATTTGCT
CCCAACGGAGTATTTCCGCGTGGGGAGCGCAGCGGCTCACGATCTGGGCAITTCGCGCGCATCGCCATTCGCGG
CGGCTCTGTGCTTCGTCGATCGCGTTGAGCTCGATCCGACGACCGTTAACGACGACTTGCAGTGGTACCCGCGCGATC
GTCATTTGATGCGCGCATTCGTTCAATTCGCGGGTTCGTCGCGCATGGAGCTATCTGGAGGAGTGGCTGCGCGACA
CGGATTTTCGGGAGAAACGATCGGTATCGCCATTTCCGGGAGTTTGTCTTTCGAGGTTAGGCGGGGCTGGCTGGCCGCT
GGATCGGTCGGCGGTCGATATCGCTTTCGCGCTTAATCGCTGGGAGCCTGCTTCAGCGCGGCAACGTTGATCGCATTCG
GTGGCGGATCAGCAAGCTGGTTTATTTCCGCTTCTGTGCTTTCGCGCTGTTCTGGTTGGCGATGACGCTTCCAAT
CCGCTTCGCGATCGGATAGATAACAGCGCGGAGCTTGTCTGACTGTGACGCGGATCGCCCTGCTCGGGTTGAGCGCGG
GGCCTTGTGCTCTCGCTTTGCGGGGCGACCGACTTGTGCTGGATCTTGTGGGAGTTGACATTTGTTGCTGGCC
AGCGCGCTTCTGTATCTTTCGCGTCTCTGTTTCAACCGCGCGGAAAGGTGATCGCTGAAACGGTGGACGATGAAAAAG
ACGATCGGGGTTTCGCGATGACATCGCAGGTCAGCTTCGATGCGCGGCAAGCGCGCGCAGTCTAAAAGCGAGCGA
GGTCTTGTCTGTTACGAGTCTTGTGATGCGACCGACAGGCTGTTGGTCGATCTAGACCCGATCAGGTCGGTCTCTA
TCAGATTGACAGGAAGCGGGTGCCTCACCGTCTCGCTTATCATTTCTTTCCGACCAAGGAAGTGGCTCATCTCGCTC
TGATGCGCGCTATCTGGAGGGTCCGGAATCTCGACGCGATGGAAGTCGACATCGGCCAGCTCGAAAGCTGGCAGGAC
CTGATGAAGTTGGATCAGATCAGGCGCGGAGACTATTATAATAGCCACCCCGCCCTCAAGCTTCTGTTCCGCGGATA
TGGGGGTCGAGGGCGAAAGCTTTCGAGCGGATCTCCAGGAAATCGTGAGCTCATGATGAGGAGGAGTGGCGGCA
TTTTCCATATGCGCAAAATGGAGAATGAGGCTCTCATGTTACGATCTGCTTCGCAATTCGACGCGGATGGCCGCTC
TCCTTTCGCGGTTTCGGTGAATACGTCGATTTTCTTCGGGAGGGCAAGCGGCTTGCATTCGCTATTGCGGACACTA
TCTGCCCGAGGCAACCGCATCAGCGTGAATCCGTTCAACGATATGCAAGGATGTCGTTGCGTTGAGTTGCTGTTCTGAT
TCGTTTCGGTTAGGAGGCCCCGCGATAAACCAACGCTCTTCTGTCGAAAGGATGTCGCTGGTTGTCAGCAGGCGGAA
GTCAGCGCAATCAACGAGGCGATGTCACGTTGCCAGCAAGTTCAACTGTGAGTTACTCGATCTCGGATCATTGTTG
CGGTGATGAAACCGCAAGTTTTCGACGCGCGCGGCTTCTGAATCAATCGCAGCCCGGCTCAGCCGAGAAATCCAG
CGCTTCGAGAGTCTCGTGGCGGTCGCTTGTTCGAGCGGACAGTCCGTCGCTTTCGAAACGCGCGCTCGGCAAGAGTT
GCTCCCGTTCGCGCCACCGAGCGTGGAACTTGTGATACGTCGCTGTTTTCGCTGCGCCAAATGTCGCGGAGTTCCGCTGGA
CAGACATCAGATTGCTGTGTACAGACCGCGCTTCCATGTTCTCCCGGAGCTGCGCGCTGTACATGATGAAAT
CCGAGGTTCCGACTCCGATCCTTGCAGTTCGCGCGGTCGAGGCTGCGGACTGGTTGCGAGCGGCGAGGCGGAGTTCCG
CATCAGCATGAGAGCCTGTTGCCATCAAGCCTGCGGTTTCGATGCGCTCCACGAGGACCCGTTCCGCTGGCATGCCACC
GAAGCCATCGCTGGCGTTCGATCCTTGAATGACGCAATGAAAGGTGAAAGCCTGATCGCGTTCACCGTGG
AGCCGAAACCGCACGTTGCTGATGCGCAACTCGCGCAACAAATATCGCGTGAATGGCGGATGAGGTCGCGCATCT
GACGACGCGCTGGGATGATCGATGCGCAATGGGTGTCGCTGTTATGCCCGCATGGTTATGCCCGCTCGGGTCCGTT
CGGAGGTCGTCGCGCCCGTTCGTCGCGCGGTCGTTCAACGACGATCGGCATCGTTACGCGCGCACCGGCTCGATG
CACCTGCGCACAGCAATGCTTGCGCGGCTCCGCGCGGCTGGTTCGTCGCGCAATCTGGGCGACATCGCGTCTCGGGA
AGATGGGCGCATCTGACACGCGTTCTATGCGCTGACGATGCTCAGGATCATTGCAATTTGCTGAGAGACGAACGC
GAAGATACCGTGGTTCAGGATCAGTCCATGAGGCGGAGAGAAATGTTGAAAGAGACCAATGCGTGGCGGCG
CGGCGTCCCGCTGCGCCCGCACGTTGGCTTTCGCGGATCAGCGTTTCCGGGGGCGCTTCGCGCATGCGCTGGACCTT
CATGCTTGGCGCAACTGCCATTCGCTGCTGCGCAACTGACGATCCGAAGCTCGTTTCGTCATACCCAGTCCGGCGCG
CTGAGGGCGTTCGAGGCGAGCTCGAGACTTTTTGGGAATACCTTCCGCGCTCCGCGGTCGCGCGGTCGCGGAGG
CCGCGGCTCCGCGAGGCGTGGGCGGACACGAGGACGCGCGGCTTTCGCGCCGATTGATCGGGAACGAGCGGCT
TAGAGAGGCGGCGGCTGCGCGGACGAGCAGACTGCGCTTATCGAAATCTGGTCTCCAAACAGGTCGGTAAAG
GGGGCTCCCGCTCATGATCTGGTTCACGGCGGTTTACGGCGGTTTACGGCGGTTTCGCGCGGTTCCATGATGACCGCTCT
CGCTTCGCGCAAGAGGCGTGGTGGTTCGTCAGTTCAACTTCGCGCGGATTCGCGGCTTCTTGGCCATCCGCGCT
TTCAAAGGAAAGTCCGAATGGCGTTCGGCAACTATGTTCTCTGACATGCTCGCGGCTTCAAATGGGTTCAAGAA

ACATAAGGGAGTTCGGCGGAGACCCGAACCGTGTACAGGCTTTTGGCGAGTCCGCCGGCGGAGCGCGCTCGGACTGCTC
 CTGACCTCGCGCTCAGTGAGAGCGCCTTCAATCAGGCGATACTGCAAAAGTCCGGGTCTGGCCAGGCCGCTCGCCACGCT
 TTCTGAAAGCGAAGCGAATGGGCTGGAGCTGGGAGCCGATATTTCTGCTCTACGGCGTGCCGATGCGGGCGAATTGACGA
 AGATCGCGCAATCGCGAATACCCATGTCCGCGCAGTTCAACAAAGCCGCGGATGGGTCCGATTCTGGACGGCTATGTT
 TTGCGCACCTTACGCTCGATGCCCTTCGCAAGGGGGCTTCGCAAGATACCCGTTCTGGTCCGGCGAAACGCCGACGA
 AGGGCGCGCTTTACGGATCGCCTGCCGTTCAAACCGTCTTGAATATCGAGCCTATCTCACAGAACAATTTGGTGAGC
 AGGCGGACGATGGGAGCGTGTATCCCGCGAACTCCGACGCGACGTCCTCCGCGCGCTTGGCCGCTTTTGGGGAT
 AGTCAGTTCAACAACGGGATCGAGCTGCTCTCGGCAGCCTTCGCGAAATGGCGAACCGCGCTTTGGAGATATCGCTTTAC
 GGGCATTCAGGAGCGGGCGTCCGCCCGCACGATGGAGACGAAATCCCTATGTCTTCGCAATCTGGGGCCGTCGT
 CCGTATCTATGTTGGGTCGTCGAAGCGCGCGCGGGCGTCCGACATCAAATTCGACCGAAATGTCGCGCGCTGG
 GTGAGCTTCGCGGTGACCGGGTCCCGATCAGGGCAAGAAATCGCACTGGCCGCTTCGAGCGCGAGGGGAGATCAT
 GACTTTTGGTTCCGAGGTTGGCTTCGGGAAGGTTTGGAGTTTCGCGAGCAAAGCTGCAACCTCAAATAGCGCC
 CGGCTGTGGCTGCTTACGACCGCTCCCGCTTTGGGGCGAGCGGCTGTGCCCTCTGCTAGAAAGGAAGTAAGTTGGC
 CTACGACGCTCGGATAATGGAGGTGGCAACGCTGCACTTCGCGCGGATCGCGCGTGAAGCGGGGCGCTCGGTT
 TTGTGATCGAGCATGCGCGCGCCATGCGCGGCGCAACAGTCTGACACACGCAATATGCGTACGATGACGAAACGT
 CCCCTGTCCGCTTACCGGTGAATATTCCGCGGACGAATATTGGAATGATCTGTCCGCTCACGGGGGGCGCAACGA
 CGAAGAATCCGCGCGCTGTTATCCGCAACACCACGACGCTATCCCTTCATGACGCGCTGCGGTTCCGTTCCAGC
 CCTCGCTGTCCGGCAGCTGAGTTTATCCGCAACCAACGCACTTCTCCTTGGCGCGGGAAGGCGCTGTGAAACGATAT
 TAGCCACGGCGAAGCGGTAGGCGTCAATTTCTATGATTCTGAGGTGACCGAGATCAACCTTCAGCAAGGCGTCTG
 CGAGCTGTGCAATGGCGAGCGGGGATCCCTGTGCAAGTGAAGCAAGGCTGCCATCGCTCGTCCGGAGGATTCC
 AGGCAAACTTGTACTGGCTCTCAAGCGCATGGGGGCTGCTGCGCGAACTTCATCGTACGGGGCACGCCAATATGCGACT
 GGCAGGTTCTCAAGAACCTGTTGGAGCAAGGCGTCCCTCGTGGGAGATCAACCAATGCCATGCTGTCCGATCGA
 TGGGCGAGCCCAATACGACGGCGGATCGTCAACGACTGGACTGCGTTCCTTCGATCGTCTCAACAAGGAGC
 CTTTGGCTTACGATGAAGCGAAGATGTGTGGCGAAGCTTACGCCATATGGGGTGGTGGCGCAGCAGCT
 GATCAGATCGCTTTCAGCATAATCGATCGGCAGGCCAAGACCTTCTCATGCGTCAAGTGTCCCCCGGTGCAAGCGGA
 CACGATCGCGGCTGCGCCGAGAACTCGGTCTGAATCCCGTAAACCTGGAACGACGCGTGGCCGAATTCACGCGCAT
 CGGTGCCCGCGAATTCGCGCGCAAGATCTCGACGACCTCCACACCGAGGGAATCGAACCAAGAAATCAACCTGGGCG
 CGAGGATTATTTGTCGCCCTTCAGCGCTATCTCTCCGCGCGGATCACCTTACCTATCTCGCGCTCAAGTAGA
 CAGCCGTGCGGGTTCATGAGAGCAGGTGAGCCGACAAAACCTGTTTGTCTCGGGGAAATTAATGGCGGGCAGCA
 TTCTCGCCAAAGTTATCTCGTGGATTGGAATGGCGATTGGTACCGTATTCCGGCCGATCGCGGGTGGGAGGCCGA
 CGTCAATGCGAGATTGATCTCGTAAAAATGCTGTCTGACTTCCGCTGCGCGGAGCTGGAAGCCAGGCGGCTATGG
 AGGTGTCAACCGGTCGCCCTATTGCGAAGGTTCTGCGCGGTTTCTGCAATGACCTTGCAGCGTCAATTCGCCAGC
 GGCGATCTCAGCCACTCGCAATCTCTGCCACTCGTGC AAGTTGCTATTACGCTGCCAATACGCCCTCCGATGA
 GTTCGGAATAAACGTTCAAAGGCGCTGTGGAGTTGGCGTTCGAGAGTACGAGCAGCATGCTTGGCGCGGCTCG
 CCGCTCTCTATCGAAGAATGCGCTCATCATTCCATCTTGTCCGGCGCATGCATAACCGCGCTCCTTCTGCTTCCGCC
 ATCTTCAACGGGGATGCACTTTTCGCGAAACAGCATCGGTGCCCGCGCGGGTTTACAACGTTATTCCTTATCAGGC
 GATGATTGGCGTCCGCGGACCACTTTTATTCGCGCTGGCGCTGGCGATCAGTCTCGTTCGCTTTCCGCGGACGA
 TCGGTTGGGAATTAAGTTCTTATCAGCAGCTGCGGTTCTTCCGGCGCTACGCGATGCGCGGCTCGGATATCTC
 GCGCGAGCGAGCGGAGGGGTGAACGACGCGGACGAGACATTTTCGACGACCCGCGGAAATTTTCATCAGCCCTTGC
 CTATGCTTCCGACTTTGTTTTCGCGGCCACAGCCAGGGCAGCATCTACGATCATATGTTCCGGTGGCCGGCCCTATG
 CGCTTTTCAGCTTTCGCGGTCTCCTAGGGACCTTGGGGATCGGAATGGTTCGTTGGCGCGATCGGCTCCTGCGCT
 AAGCTGGCCGCGAAGACGCTCCTCGATCACCGCACTGCTTGGCCGGATGTTGCCCTGTTGGTGTCTTCTGCTTGCAT
 AGCGGCAACGGGCTCCTCCTTTAGCGGTCCGCGACCGAAGTATGGGCGTCCGCTCGCCGCTCATCTCGGCGTCCG
 TCTTGGCCTTCTTTTGGTATGCCATACAGCAAAATTTGCTCCAGGTTATCTCAGGCTCACGGCTCTGTCGCGCATAT
 GCTGACCGGAGGCAAGTAATGGCTTCGCTCCAGCCCTCCACGAAAAGGGTTAAACAATGGAACATATGAAGTCCGT
 TCGCGATCGCAGTAGCGTATGAGATCGTGAGAGTGGCGAGTGGCAACTGTCTCGAGCAATATGATTTCTTCTGTTACG
 GCTTCTATGCGGCATATATGCGAGAAGCTTTTTCGACCGGCAATACCGGACATCGTCTCATGCTTTCATTGGCCACT
 TTTGGCGTGGTTTCTCATGAGGCTTTCGCGGCGAATTTCTCGGCTCCTACATCGATCGCTCGCGGCTCGGAAGG
 CCGTATCGTACACTCGCATCATGGCGTCCGGAACCTCACCATTTGCGATGACTCCAAGCTATGAGGCAATGGATTAC
 TCGCACCGGTTATCGTCTCGTCCGGCGACTTTTGCAGGGTTTTTCCGCTGGAGCAGAGTCCGGTGGCGTCTCAGTGTAC
 TTGGCGAAATTCGCTCGCCAAATCGAGAGGCTTCTTCACTCGTGGCAGTCTGCCAGCCAGCAGTGGCGCATGAT
 CGCCGCGCGATCGGTCTTGGCTGCAATCAACGCTTTCACCGGAGCAATGAACGACTGGGGATGGCGGTGCCCTTGT
 TGATCGGATGCTGATTATCCCGTGATACTCTGGCTGCGCGGCTCTCTCCGGAACGAAAGCCTATCTCCACATGGAG
 CACAAGGCGATTTCGATCGGGAATCCCTCCGCAATTGCAACAGAGTGGGGCTGATCTTGAACGGCATGGCGATGTC
 GATCTCACGACGACCACTTTTACATGATTACCGCTATACGCGGACATTTGGCGAGAAAGCACTCGGACTGAGCCCGC
 AAGATGCTGCTGTTTACCATCATGGTCCGCGTGTGCAACTTCTGTGGCTTCCGATCGGGGGTGTCTCTCGGATCGT
 ATCGGTAGAACCCCGATCTACTGGTCTGTCGCGTACCCTTCTCGCATCGCTTTCCCTGATGAGCTGGCTCGTCCG
 GGCACCGACATTCGGAGCGCTGACAGCTGTTCTGCTGACTTCTCCGATGCTTTGGACTTATAATGGGGCGCTCATCG
 CGAGACTCACCGAGATTATGCTCCGCCATTAGAACCTTGGCTTCTGCTGGCGTTCAGTCTCGCGACCTCGCTGTT
 GGCGGCTTACCCCATTTGTAAGTACGGCGCTAATCCACCGGACGGGCGCAATCCGCGCTGCAATCTGGCTCTGTTT
 TGGCGCTTTCATCAGCTTCTGCTGGTGGCCGATCGACCCGCTGAGCCGCAATCGCGAAGGCGCCAGATAGGACA
 ATCAGAGAATGCCGTCGGCAATGAAGCGAGATTGGGCGGTAGGTGCGCTGGCGGCACTTCGCGAAGAGCCGTTGCGG
 ACGGCTGAAACGATGATGGTATGAATGGGCTAAGACATGAGAGCAGTATTTACCGAAATGGCGAATGTCCTGGGGG
 CTATGCTGATCCGATACCCCGCGCGGCGAGGTGCTCGTCAAGACCAGAGCATGCGGCATCTCGGATCTGCGGATCATT
 TTTGCGATCATGCGCAGGCGTTTACGAACCTTGCATCGCGGGCGGGTATCGCTCTATGGAAGTTGATTGTGTCGAGAC
 ATCGTCTGGGGCATGAATCTGTGGCGAGATTATGGAGTTCGGGCGCTCTGCGGATCGTCCGCTCAAACCCGGACAGT
 TGTGTCTCGCTGCGCTGGCGATCGGTCGACCGGAGCGCGGACGATGGCTACTCGGATGATCTCCGGCGGCTCG
 GGAATATATGTTACCGGAAGCGCTTGTGCTGCTGTTCCGAAACGGCTTCCGCGACCTCGCGCGACTGCGCGGTTGACGG
 CCGATGGCGGTGGGATGGCATGCCGTCGAGATCGCGCAGGTTCAACACATCATCCTGTGGTATCGGGTGGCGACC
 GGTGGGTTGGCAGTCTGCTGCCCTGAAACATAAGCAAGTTGCTCCGATTATTGGCTCGGATCCATCGCCCGATCGGC
 GTGCTTGTCTGCGGATGGGCGCGGACGCGCTTGTGCTGCTGTTCCGAAACGGCTTCCGCGCAAGAAATCACCCCTTTCG
 GCACCGCCGGTCGGACAAGGTGGGGCCCTGTCCAGCTCATTGTGTCGCAAGTCTCAAATGATATTCGAATGCGTAGGGGT
 GCCGGGATGCTTCCGATGCGATGGACGCGCGCTCCGACGGTCCGAGATCATGGTCTTGGCGATGATGACGCGG
 ACGGCTCAGCCATGATCGGGATGTTAAAGCGCTCACGATCAAATTCGCGGAACTTACAGCGGTTGAGGATTCGCC
 GCGGTCTCACATGATAGGTGAGGGCGCACTCGACGATCTCCGCTGTTACCGATGATGTTGGCTGTCCGATGTC

GTCCGCGTTTGAGGCTCTACGGAGTCCAGGCGCCCAAGCAAAGTGATTGTGGACCCTTGGCGCTGAGCCTGAGGATGCC
AAGGGTGCAGCTTGGGCATCGTCAAAGAAGGCGACGTTGACCCGGTATGTGAACATCCCATATCTTCCGCGACTGAA
GCAGTTGGTAAACATGCCAAAATATGAACTGTAGTATTCGCGTCCGGGTTCTCATTGTGGGGTTTCCATTGTCATCGCTC
GCACCCGGCGACAAAGATTAGATGTACTTCCGATAAATCCGTGCTCTCGACCTGGCCTTCTTCCATATATTTCCAGGACCTC
TCCGACCATGCGTGGCGCGGATCGGGATCGGCAGGGCTTGGTTCATCTGGGTCGAGTTCAGTTGATCTTCGTAAGAG
AGAACACCTCCTCGGCTAACTGCGCCGCGTACTATCGCAGGATCGTCTCGAGCGTYCGC

> Seq ID 8 (*fumD*)

GTGAAAGAGCACCAATGCCGTGGCGGCCGGGCGTCCCGCTGCGCCCGCCACGTGGCTTGGCGGGATCAGCGTTTCCCG
GGGGGCTCCGCCATCGCCTGGACCTTCATGCTTGGCGCAACTGCCATTCCCGTGGCTGCGCAAACAGCAGATCCGAAGC
TCGTTTCGTACATCCAGTCCGGCGCGCTCGAGGGCGTGCAGGGGACGTCGAGACTTTTTTGGGAATACCCCTTCGCGGCT
CCGCCGGTCCGCGACCTGCGATGGCGGCCCGCGCTCCGCCAGGGCGTGGGCGGGCACCAGGGACGGCCGCGCTTTGC
GCCGATTGCATCGGGAACGAGCGGCTTAGAGAGGGGAGCCGGGCTGCCGGGACGAGCGAAGACTGCCTCTATCTGAATA
TCTGGTCTCCCAAACAGGTTCGGTAAGGGGGGGCTCCCGTTCATGATCTGGGTTTACGGCGGTGGGTTTAGCGGCGGTCT
GGCGCGGTCCATATTTATGACGGCTCTGCGCTCGCGCAGAAGGGCGTGGTGGTTCGTCACGTTCAACTATCGCGCCGGAT
TCTGGGCTTTCTTGGCCATCCGGCGCTTTCAAAGGAAAGTCCGAATGGCGTGTGGGCAACTATGGTCTTCTCGACATGC
TCGCGGCGTTCAAATGGGTTCCAGAACAACATAAGGGAGTTCGGCGGAGACCCGAACCGTGTACGGTCTTTGGCGAGTCC
GCCGCGCGAGCGCGCTCGGACTGCTCCTGACCTCGCCGCTCAGTGAGAGCGCCTTCAATCAGGCGATACTGCAAAGTCC
GGTCTGGCCAGGCCGCTCGCCACGCTTTCTGAAAGCGAAGCGAATGGGCTGGAGCTGGGAGCCGATATTTCTGCTCTAC
GGCGTCCGATGCGGGCGAATGACGAAGATCGCGCAATCGCAATACCCATGTGCGGCCAGTTCACCAAGCCGCGGCCG
ATGGGTCCGATTCTGGACGGCTATGTTTTGCGCACCTTGACGTCGATGCCTTCGCCAAGGGGGCCTTCGCCAAGATACC
CGTTCCTGCTGGCGGAAACGCCGACGAAGGGCGCGCTTTTACGGATCGCCTGCGGTCAAAACGGTCTTGAATATCGAG
CCTATCTCACAGAACAATTTGGTGACGAGGGCGGACGATGGGAGCGTGTGTTATCCCGGAACTCCGACGCCGACGTCCTC
CTTCTCACAGAACAATTTGGTGACGAGGGCGGACGCAATGGGAGCGTGTGTTATCCCGGAACTCCGACGCCGACGTCCTC
GCCCGCTTGGCCGCTTTTTTGGGATAGTCAAGTCAACAACGGGATCGAGCTGCTCTGGCAGCCTTCGGAAATGGCG
AACGCCGCTTTGGAGATATCGCTTTACGGGCATTCAGGAGCCGGCGCTCGCCCGCCACGATGGAGACGAAATTCCTC
ATGCTTCGCAAATCTGGGGCCGTCGTCGATCTATGTTTGGGTCGCTCGAAGGCGGCGCCGGGCGTTCGGACATCAA
CTTGGCAGCGAAATGTCGCGGCTGGGTGAGCTTCGCGGTGCACGGGTCACGGGTCCTCCGATCAGGGCACGAAATCGCACTGGCC
GCGCTTCGAGCGGCGAGGGGAGATCATGACTTTTGGTTCGAGGTTGGCTCTGGGAAGGTCTTGGAGTTTCGCCGAGCA
AAGCCTGCCAACCTCAAATAG

SEQ ID N° 2

5 > Seq ID 8 (*fumD*)

GTGAAAGAGCACCAATGCCGTGGCGGCCGGGCGTCCCGCTGCGCCCGCCACGTGGCTTGGCGGGATCAGCGTTTCCCG
GGGGGCTCCGCCATCGCCTGGACCTTCAATGCTTGGCGCAACTGCCATTCCCGTGGCTGCGCAAACAGCAGATCCGAAGC
TCGTTTCGTACATCCAGTCCGGCGCGCTCGAGGGCGTGCAGGGGACGTCGAGACTTTTTTGGGAATACCCCTTCGCGGCT
CCGCCGGTCCGCGACCTGCGATGGCGGCCGCGCGCTCCGCCAGGGCGTGGGCGGGCACCAGGGACGGCCGCGCTTTGC
GCCGATTGCATCGGGAACGAGCGGCTTAGAGAGGGGAGCCGGGCTGCCGGGACGAGCGAAGACTGCCTCTATCTGAATA
TCTGGTCTCCCAAACAGGTTCGGTAAGGGGGGGCTCCCGTTCATGATCTGGGTTTACGGCGGTGGGTTTAGCGGCGGTCT
GGCGCGGTGCCATATTTATGACGGCTCTGCGCTCGCGCAGAAGGGCGTGGTGGTTCGTCACGTTCAACTATCGCGCCGGAT
TCTGGGCTTTCTTGCCCATCCGGCGCTTTCAAAGGAAAGTCCGAATGGCGTGTGGGCAACTATGGTCTTCTCGACATGC
TCGCGGCGTTCAAATGGGTTCCAGAACAACATAAGGGAGTTCGGCGGAGACCCGAACCGTGTACGGTCTTTGGCGAGTCC
GCCGCGCGAGCGCGCTCGGACTGCTCCTGACCTCGCCGCTCAGTGAGAGCGCCTTCAATCAGGCGATACTGCAAAGTCC
GGGTCTGGCCAGGCCGCTCGCCACGCTTTCTGAAAGCGAAGCGAATGGGCTGGAGCTGGGAGCCGATATTTCTGCTCTAC
GGCGTCCGATGCGGGCGAATGACGAAGATCGCGCAATCGCAATACCCATGTGCGCGCAGTTCACCAAGCCGCGGCCG
ATGGGTCCGATTCTGGACGGCTATGTTTTGCGCACCTTGACGTCGATGCCTTCGCCAAGGGGGCCTTCGCCAAGATACC
CGTTCCTGCTGGCGGAAACGCCGACGAAGGGCGCGCTTTTACGGATCGCCTGCGGTCAAAACGGTCTTGAATATCGAG
CCTATCTCACAGAACAATTTGGTGACGAGGGCGGACGATGGGAGCGTGTGTTATCCCGGAACTCCGACGCCGACGTCCTC
GCCGCGTTCGCGCTTTTTTGGGATAGTCAAGTCAACAACGGGATCGAGCTGCTCTGGCAGCCTTCGGAAATGGCG
AACGCCGCTTTGGAGATATCGCTTTACGGGCATTCAGGAGCCGGCGCTCGCCCGCCACGATGGAGACGAAATTCCTC
ATGCTTCGCAAATCTGGGGCCGTCGTCGATCTATGTTTGGGTCGCTCGAAGGCGGCGCCGGGCGTTCGGACATCAA
CTTGGCAGCGAAATGTCGCGGCTGGGTGAGCTTCGCGGTGCACGGGTCACGGGTCCTCCGATCAGGGCACGAAATCGCACTGGCC
GCGCTTCGAGCGGCGAGGGGAGATCATGACTTTTGGTTCGAGGTTGGCTCTGGGAAGGTCTTGGAGTTTCGCCGAGCA
AAGCCTGCCAACCTCAAATAG

SEQ ID N° 4

> Seq ID 18 (*fuml*)

ATGGCGAACGGAAACAAGGCAGAAAGATCTCAGAGAACGCGCCGAAACGGGTCAATCCGGGCGGGATGTACGGCCACGAG
 TCGACACGGTTGCTGCCGCCAGAATTCCTCCAGTCTTCAGGCGCGCGCTGGGGCACGAATTTGGGACGCCGACGAG
 CAGCCCTATATCGACTATATGTGCGCGTATGGGCAAATTTGGTCTGGTTACCGGCAATCCGAAATCGAAGCCGCGGCT
 GATGCGCAGCGACTTCTCGGCGACACCATGACCGGTCTTCCGAGATCATGGTCAACCTCGCCGAGCCTTTGTGGGC
 ATGGTCCGTATGCGGATTGGGCGATGTTCTGCAAAAATGGCAGCGATGCCACCTCAACGGCGATGGTTCTCGCGGT
 GCCCATACGGGGCGAAAACCATATATGCGCCAAAGGCGCTATCATGGCGCTTCCCGTGGAACTCCGCATACT
 GCCGGGATTCTCGCTCCGATCGCGTGCATGTGCGATATTATACTATAACGACGCCCAAAGCTTATCGGACGCGTTC
 AAGGCGCAGATGGCGATATGCGGCTGTCTTGGCACACCTTCCGACACGAAGTATTTGAGGACCAGGCCCTCGCC
 CAGCTTGAGTTCGCGCGCACCGCTCGAAAATGTTGTGACGAGACCGGTGCGCTTCTGGTCTTGACGATGTGCGCGCA
 GGTTCGGGTGGCGCGGATTCAGCTGGACGCATTTGGGTATCGAACCAGATCTCAGTTGCTGGGAAAATGCTTT
 GCGAATGGCTATCCGATCTCCGCCCTGCTGGGCTCGAACAAGGCGCGCATGCGGCGCGGGATATATTTGTGACCGGC
 TCCTTCTGGTCTCTGCGGTACCGATGGCGGCGCGATCGAACCCTCAGGATCATTCGAGAGACGCCCTTATCTCGAA
 ACGCTGATCGCCAGCGGCGCGCCCTGCGGGCAGGCTGGAGGCACAGTCTCAGCGCCATGGTCTTGAGTTGAAGCAG
 ACGGGCCGCGCAGATGCCGAAATATTCTTGGGACGATCCCGATTTTCGGATCGGCTATGCGTGGGCGCGGCG
 TGCTGAAGGGCGCGTCTATGTTTCATCCCTATCAATATGTTCTCTGCGGCCATACAGTTGACGATGTAACG
 GAGACCTCGAGGCGACGGATCGCGGCTTCAGCGCGTCTCAGAGATTTGCGTCTCTCAGCCCTCATCCCATTTTA
 ATGCAACTCGCCGGTCTTGA

Secuencias:

SEQ ID N° 3

>Seq ID 9 (FumD)

VKEHQCRGGRASPAAPATWLARI SVSRGASAI AWTFMLGATAI PVAAQTDDPKLVRHTQS
 GAVEGVEGDVETFLGI PFAAPPVGLRWRPPAPPRAWAGTRDGRRFAPDCIGNERLREGS
 RAAGTSEDCLYLNIWS PKQVGKGLPVMIVVYGGFSGGSGAVPYDGSALAQKGVVVVT
 FNYRAGILGFLAHPALSKESPNGVSGNYGLLDMLAAFQVQNNIREFGGDPNRVTVFGES
 AGASALGLLTSPLESAFNQAILQS PGLARPLATLSESEANGLELGADISALRRADAGE
 LTKIAQSRI PMSRQFTKPRPMGPI LDGYVLRITLDVDAFAKGAFRKI PVLVGGNADEGRAF
 TDRLPVKTVLEYPYRFTGIPGAGRRPATHGDEI PYVFANLGPSSVSMFGSLEGGAGASDIK
 5 LATEMSAAVVSFAVHGVPDQGTKSHWPRFERRGEIMTFGSQVGSSEGLGVSPSKACQPSK

SEQ ID N° 5

>Seq ID 19 (Fuml)

MANGTRQKDLRERAERVI PGGMYGHESTRLLPPEFPQFFRRALGARIWDADEQPYIDYMC
 AYGPNLLGYRQSEIEAAADAQRLLGDTMTGPSEIMVNLAEAFVGMVRHADWAMFCKNGSD
 ATSTAMVLARAHTGRKTI LCAKAYHGASPWNTPHTAGILASDRVHVAYTYNDAQSLSD
 AFKAHDGDI AAVFATPFRHEVFEDQALAQLEFARTARKCCDETGALLVVDDVRAGFRVAR
 DCSWTHLGI EPDLSCWGKCFANGYPI SALLGSNKARDAARDIFVTGSFWFSAVPMAAAIE
 TLRIRIETPYLETLIASGAALRAGLEAQSQRHGLELQKTPAQMPQIFFADDPDFRIGYA
 WAAACLKGGVYVHPYHNMFLSAHTVDDVTETLEATDRAFSVLRDFASLQPHPI LMQLA
 GA

10 Para la solución de estos problemas, un aditivo de este tipo se caracteriza porque está contenida una enzima que presenta al menos un 90% de identidad de la secuencia con una enzima de la SEQ ID N° 3 (Seq ID 9 (FumD)), así como, eventualmente, de manera adicional un co-sustrato para la enzima empleada, una enzima de la SEQ ID N° 5 (Seq ID 19 (Fuml)) y un soporte inerte.

15 Con un aditivo de este tipo se consigue, por una parte, por ejemplo degradar de forma completa y fiable micotoxinas directamente sobre el material bruto, catalizando las enzimas producidas específicas en este procedimiento la degradación y de productos intermedios de la vía de degradación y, por otra parte, degradar micotoxinas, por ejemplo, también directamente durante la producción de bioetanol en el mosto para la preparación de alcohol, o también en la preparación de alimentos degradarlas directamente o bien neutralizarlas en el procedimiento de preparación.

20 Un aditivo de este tipo en el que se emplea una enzima que presenta al menos un 90% de identidad de la secuencia con la enzima de la SEQ ID N° 3 (Seq ID 9 (FumD)), o un organismo huésped recombinante completo para la expresión de esta enzima, así como, eventualmente, de manera adicional, al menos un co-sustrato para la enzima empleada, así como una enzima de la SEQ ID N° 5 (Seq ID 19 (Fuml)) y un soporte inerte, se distingue porque degrada de forma deliberada fumonisinas y, por consiguiente, las desintoxica. Mediante el empleo de un aditivo de acuerdo con la invención, que esencialmente se compone de una enzima aislada, así como, eventualmente, de su
 25 co-sustrato y soportes, resulta la ventaja de que éste conserva su actividad catalítica en un entorno y bajo condiciones en las que, por ejemplo, microorganismos completos no serían activos o sólo serían poco activos,

pudiendo alcanzarse al mismo tiempo una actividad específica significativamente superior, así como pudiendo catalizarse reacciones definidas evitando reacciones secundarias indeseadas.

- Además de ello, pueden evitarse con seguridad problemas que, conforme al estado de la técnica, han resultado mediante el empleo de gérmenes susceptibles de multiplicación en productos brutos agrícolas y, además de ello, aditivos que sólo contienen enzimas aisladas presentan tanto una mejor idoneidad para la formulación para una activación preestablecida y controlada, es decir, por ejemplo, en un lugar determinado del tracto digestivo, como también la prevención de un consumo de sustrato indeseado, elevado. Con el fin de continuar aumentando la especificidad, el aditivo está perfeccionado en la medida en que se emplea una enzima modificada por métodos genéticos moleculares, mutagénesis o evolución molecular.
- 5 Cuando se ha empleado o se emplea una enzima que presenta al menos un 90% de identidad de la secuencia con una enzima de la SEQ ID N° 3 (Seq ID 9 (FumD)), se consigue degradar de forma segura y fiable de modo independiente del oxígeno, junto a las fumonisinas a degradar preferiblemente, también otras micotoxinas, con lo cual se puede alcanzar una amplia desintoxicación de las fumonisinas presentes, por ejemplo, en productos brutos vegetales.
- 10 Al estar configurado el aditivo, tal como corresponde a un perfeccionamiento preferido de la invención, de modo que la enzima y/o las enzimas al menos un 90% idénticas son empleadas envueltas con una envoltura protectora, se puede garantizar que la enzima o las enzimas al menos un 90% idénticas estén aseguradas frente a una pérdida prematura de la actividad y desplieguen de forma segura y fiable su efecto en el lugar previsto, por ejemplo en el tracto gastrointestinal.
- 15 Al estar el aditivo configurado preferiblemente de modo que la enzima se elige de una carboxilesterasa SEQ ID N° 3 (Seq ID 9 (FumD)), pasa a emplearse esencialmente la enzima capacitada para el catabolismo del sustrato, de modo que junto a una pequeña cantidad de enzima a emplear también puede asegurarse que no se manifiesten reacciones secundarias indeseadas con el empleo de la enzima.
- 20 De acuerdo con un perfeccionamiento de la invención, se lleva a cabo un uso del aditivo en un medio independiente de oxígeno en la producción de bioetanol, junto con un mosto o bien un material de partida vegetal, estando elegido el aditivo de manera que la enzima contenida en el mismo procede por completo de bacterias que catalizan, a través de una vía de degradación muy específica, el catabolismo de fumonisinas, con lo que se consigue emplearlas con una elevada especificidad, actividad y eficacia, con lo que el aditivo también puede ser utilizado tecnológicamente en un medio independiente de oxígeno.
- 25 De acuerdo con un uso preferido, el aditivo de acuerdo con la invención se emplea para el tratamiento independiente de oxígeno o bien anaerobio de un material de partida vegetal o bien de un mosto en la producción del bioetanol. En este caso, se consigue neutralizar de forma segura y fiable las micotoxinas contenidas en el material de partida o materia prima vegetal durante la producción de bioetanol en el medio independiente de oxígeno, de modo que el residuo de la producción de etanol, a saber, el orujo o el bagazo seco puede ser empleado seguidamente ya sea directamente o después del secado y granulación sin un procesamiento ulterior, en particular desintoxicación, como forraje que está exento de fumonisinas.
- 30
- 35

La invención se explica a continuación con mayor detalle con ayuda de ejemplos de realización así como figuras. En éstas muestran:

- la Fig. 1, el racimo de genes catabólico de fumonisina,
- 40 la Fig. 2, la curva de Michaelis-Menten para la carboxilesterasa de fumonisina FumD,
- la Fig. 3, una curva de degradación de fumonisina B₁ hidrolizada,
- la Fig. 4 muestra la transformación de fumonisina FB1 en fumonisina hidrolizada HFB1 después de la adición de carboxilesterasa SEQ ID N° 3 (Seq ID 9 (FumD)) y
- 45 la Fig. 5, la degradación de fumonisina hidrolizada HFB1 mediante la adición de aminotransferasa de SEQ ID N° 5 (Seq ID 19 (FumI)).

En la Fig. 1 se representa un racimo de genes catabólico de fumonisina como secuencia parcial de 15420 pares de bases de una cepa microbiana con el número de depósito DSM 16254. En el racimo de genes fum de la cepa procarionótica DSM 16254 se controla o bien regula la transcripción de los marcos de lectura abiertos mediante un promotor bidireccional que está dispuesto entre *fumA* y *fumI*. El racimo codifica proteínas que están implicadas en la regulación de la expresión génica tales como, por ejemplo, FumB y FumC, en el reconocimiento del sustrato y el transporte tales como, por ejemplo, FumJ, FumA y FumG y en un catabolismo del sustrato tales como, por ejemplo, FumD, FumE, FumF, FumH, FumI y FumK.

50

Ejemplos

Ejemplo 1: La cinética enzimática de carboxilesterasa de fumonisina

Se clonó el gen *fumD* (SEQ ID N° 2) que codifica una carboxilesterasa de fumonisina y se expresó en *Pichia pastoris* utilizando procesos convencionales. Se recuperó la enzima marcada con his y se purificó mediante cromatografía de afinidad a partir de la disolución sobrenadante del cultivo. Se determinó la concentración enzimática y los parámetros cinéticos de la enzima se determinaron con siete concentraciones de sustrato diferentes en el intervalo entre 50 µg y 25 mg de FB₁ por litro y una concentración enzimática de 0,33 ng/ml. Las reacciones se tamponaron en tampón Tris-Cl 20 mM (pH 8,0) con 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino y se incubaron a 30 °C. Se tomaron muestras después de 0, 30, 60, 120 y 240 minutos de incubación y se analizaron mediante HPLC-MS/MS. Se cuantificaron fumonisina B₁ (FB₁) y fumonisina hidrolizada B₁ en base a un calibrado con las sustancias de referencia purificadas y un patrón interno FB₁ totalmente marcado con ¹³C.

La Fig. 2 muestra la curva de Michaelis-Menten para la hidrólisis de fumonisina B₁ (FB₁) por parte de carboxilesterasa de fumonisina FumD, que se determinó en el caso de una concentración enzimática de 0,33 ng/ml en tampón Tris-Cl (pH 8,0), registrándose las velocidades iniciales de la enzima frente a la concentración del sustrato. La curva de Michaelis-Menten muestra un descenso en el caso de concentraciones elevadas del sustrato, dado que se calculó la velocidad de las enzimas en base al producto, es decir, la formación de FB₁ hidrolizada. Dado que FB₁ hidrolizada de FB₁ se configura en una reacción en dos etapas a través de FB₁ parcialmente hidrolizada con únicamente una cadena lateral de ácido tricarbálico, que fue conservada, y una cadena lateral que fue disociada, la formación de producto final se demoró en el caso de concentraciones elevadas del sustrato. La constante de Michaelis-Menten K_M se calculó como 0,80 µmol/l, lo cual equivale a 650 ppb, y el índice de transformación era 900 por segundo.

A partir de la Fig. 2 resulta que fumonisinas pueden ser hidrolizadas de forma rápida y completa con la carboxilesterasa en los intervalos de concentración relevantes.

Ejemplo 2: La actividad catalítica de aminotransferasa HFB₁ (fumonisina hidrolizada B₁) aminotransferasa SEQ ID N° 4 se clonó utilizando procesos convencionales, y se expresó en *E. coli* bajo el control o bien la regulación de un promotor del bacteriófago T7. Las células bacterianas se recogieron en tampón fosfato sódico 50 mM, se suspendieron de nuevo y se lisaron mediante ultrasonidos. Se agregó fumonisina hidrolizada y las muestras se incubaron a 25°C. Las muestras se tomaron a intervalos de tiempo y se analizaron mediante HPLC-MS/MS. No se observó reducción alguna de la concentración de FB₁ hidrolizada. Cuando a la reacción se agregó un co-sustrato tal como, por ejemplo, un α-cetoácido tal como ácido pirúvico u oxalacetato, se pudo observar una degradación completa de la fumonisina hidrolizada en 2-ceto-HFB₁ tal como se representa en la Fig. 3. Esta sustancia es totalmente inocua para mamíferos.

Ejemplo 3: Actividad enzimática en el medio intestinal

Para verificar la actividad enzimática de carboxilesterasa de FUM en el tracto digestivo se utilizaron intestinos de cerdo recién sacrificados y se transportaron al laboratorio bajo la exclusión de oxígeno y se examinaron en un banco de trabajo estéril anaerobio. Se ligaron y recortaron trozos de duodeno y yeyuno de aproximadamente 10 cm de longitud. Con cánulas se inyectó de manera diluida fumonisina B₁ en disolución acuosa concentrada hasta una concentración final de aproximadamente 10 ppm y se mezcló con el contenido del intestino. A continuación, se inyectaron e incorporaron por mezcladura 5 µg de carboxilesterasa de fumonisina en disolución acuosa o bien el mismo volumen de agua en los controles negativos. Los segmentos de intestino se incubaron a 39 °C. Con ayuda de cánulas se tomaron muestras y se analizaron mediante HPLC-MS/MS. En este caso se demostró que fumonisina B₁ ya se había hidrolizado por completo después de dos horas en el duodeno y yeyuno en el instante de la primera toma de muestras.

Ejemplo 4: Determinación del intervalo de temperaturas de la actividad de carboxilesterasa de fumonisina

Para determinar el intervalo de temperaturas al que es activa la carboxilesterasa de fumonisina se incubaron 1,6 ng/ml de carboxilesterasa de FUM en tampón Tris-Cl 20 mM, pH 7,0, con 0,1 mg/ml de BSA y 10 ppm de fumonisina B₁ a diferentes temperaturas. En este caso, se demostró que el óptimo de temperaturas para la enzima se encontraba en 30°C. También a 40°C e incluso a 50°C se comprobó todavía de manera inequívoca una actividad enzimática. Por consiguiente, esta carboxilesterasa de FUM es adecuada para su aplicación bajo las condiciones de temperatura tal como tienen lugar en el tracto digestivo o en el transcurso de etapas del proceso de la producción de alimentos o forraje que tienen lugar a temperatura elevada.

Ejemplo 5: Determinación del intervalo de pH de la actividad de carboxilesterasa de fumonisina

Para la determinación del intervalo de pH al que es activa la carboxilesterasa de fumonisina se utilizó tampón de Teorell-Stenhagen. Este tampón se puede ajustar mediante la combinación de citrato, fosfato y borato a lo largo de un intervalo de 10 unidades de pH con la misma capacidad tamponadora. Carboxilesterasa de FUM se incubó en una concentración de 3,3 ng/ml con 10 ppm de fumonisina B₁ a diferentes valores del pH en este tampón a 25°C. La actividad más alta se mostró a pH 8,0, pero en todo el intervalo de pH 5 a pH 10 se pudo comprobar una actividad.

Mediante la actividad a este amplio intervalo de pH se posibilita la aplicación tecnológica de la enzima como aditivo de forraje o bien en el transcurso del procesamiento de alimentos y forrajes.

Ejemplo 6: Ensayo de cebado con lechones

5 El ensayo se llevó en un establo de ensayo con 12 corrales para en cada caso 10 animales. El establo estaba dotado de emparrillados, abrevaderos y un sistema de cebado controlado por ordenador. Los dispositivos automáticos estaban dispuestos a lo largo de las paredes de los corrales. El clima del establo se registró diariamente de forma automática y la temperatura se ajustó según los consejos estándares para la cría de lechones.

10 Para este ensayo se emplearon 120 lechones destetados de sexos mixtos (edad: aprox. 4 semanas, peso de ajuste medio 8,21 kg). A cada uno de los lechones se les proveyó de una marca en la oreja y se pesaron individualmente. Los 120 lechones se distribuyeron al azar en 12 corrales. Todos los lechones procedían del programa de cría austriaco ÖHYB (= (Edelschwein x Landrasse) - Pietrain).

15 Directamente después del destete, los lechones fueron cebados durante 2 días con un pienso de iniciación y después de esta fase de adaptación tuvo lugar el cambio al pienso de ensayo. El cebado tuvo lugar en 2 fases: fase de destete, días 1-14, fase de cría, días 15-42. El pienso de ensayo se mezcló individualmente en los corrales a través de la instalación de cebado Spotmix y se repartió en seco diariamente dos veces en función del número de los lechones, del desarrollo del peso y del consumo de pienso. El agua estaba disponible para su toma ad libitum. Los 12 corrales se dividieron en cuatro grupos de aplicación diferentes, en cada caso de tres repeticiones, y recibieron las siguientes mezclas en el pienso arriba descrito:

Grupo	
Control negativo	Ninguna toxina, ninguna adición de enzimas
Control positivo	4 -5,5 ppm de fumonisina B1
Grupo de ensayo 1	4 - 5,5 ppm de fumonisina B1 + mezcla de enzimas 1 (carboxilesterasa, aminotransferasa, piruvato) 0,5 kg/t de pienso
Grupo de ensayo 2	4 - 5,5 ppm de fumonisina B1 + mezcla de enzimas 1 (carboxilesterasa, aminotransferasa, piruvato, soporte inerte) 1 kg/t de pienso

20 En el control positivo se observó en casi la mitad de los animales problemas respiratorios, produciéndose también un fallo. Todos los otros grupos parecían estar sanos.

Datos de rendimiento

Grupo	Número de animales	Peso inicial (media, kg)	Peso final (media, kg)	Fallos
Control negativo	30	8,34	26,82	
Control positivo	30	8,17	24,77	1
Grupo de ensayo 1	30	8,08	26,69	
Grupo de ensayo 2	30	8,25	27,03	

Ejemplo 7: Degradación enzimática de fumonisinas en el mosto de bioetanol

25 Se tomaron muestras de mosto de maíz para la producción de bioetanol y se incubaron a 30 hasta 65°C con agitación, examinándose la degradación de fumonisina B1 después de la adición de 770 unidades de carboxilesterasa SEQ ID N° 3 (Seq ID 9 (FumD)) por metro cúbico de mosto con agitación (tiempo de agitación en minutos). Las muestras se inactivaron mediante cocción después de la toma de muestras y luego se separaron por centrifugación para la analítica y se separó por evaporación una parte alícuota del sobrenadante. El residuo se
30 recogió en 200 µl de tampón de muestra que contenía patrón de fumonisina interno marcado con C13, se agitó durante 1,5 min, se separó por centrifugación y luego se sometió a un análisis por LC-MS. De ello resulta que, como se representa en la Fig. 4, la fumonisina FB1 se ha transformado por completo en fumonisina hidrolizada HFB1. Después de la adición de aminotransferasa SEQ ID N° 5, la fumonisina hidrolizada HFB1 se degrada por completo en componentes inocuos tal como se representa en la Fig. 5.

35

Ejemplo 8: Degradación de fumonisinas y sus derivados en puré de tortilla de maíz y puré de cereales

La actividad de las enzimas degradantes de fumonisina se examinó en muestras de maíz ("polentas") para la preparación de tortilla de maíz y cereales. Maíz contaminado con fumonisina (aprox. 1 ppm) se molió para formar una harina de maíz, se mezcló con agua y se hirvió. Para la preparación de la tortilla, el puré de maíz enfriado hasta 5 5 a 60°C se mezcló con una mezcla de proteinasas en disolución alcalina. Al cabo de 30 a 180 min, cuando el pH había caído por debajo de 9, preferiblemente por debajo de pH 8, se agregó una mezcla a base de carboxilesterasa y aminotransferasa (en cada caso 500 – 1000 unidades/m³) y se incubó durante otros 30 a 60 min. En el caso de la preparación de cereales, un puré de maíz a base de maíz molido y malta de cebada se hirvió durante aprox. una hora en un recipiente a presión; después del enfriamiento a menos de 60 °C (preferiblemente 50 10 °C) se agregó una mezcla de enzimas consistente en carboxilesterasa y aminotransferasa (en cada caso 500 – 1000 unidades/m³) y se incubó durante otros 30 a 60 min. A partir de esta mezcla se tomaron entonces muestras y se examinaron en cuanto a residuos de FB1 o bien HFB1 tal como en el Ejemplo 7. Los niveles de HFB1 se encontraban en todas las muestras por debajo de 80 ppb, evidentemente la HFB1 que resulta a partir de FB1 se continuó haciendo reaccionar de manera continua. Los valores medidos para FB1 están recogidos en la Tabla 15 indicada a continuación.

Tabla: Degradación enzimática de FB1 y HFB1 en el puré de maíz; concentración de fumonisina en ppb (µg/kg)

Tiempo de tratamiento con mezcla de enzimas (min)	Puré de tortilla (50 °C, 500 unidades)	Puré de tortilla (50 °C, 1000 unidades)	Puré de cereales (35 °C, 500 unidades)	Puré de cereales (35 °C, 1000 unidades)
0	852	866	912	1053
10	116	134	51	97
30	32	71	17	37

Listado de secuencias

- 20 <110> Erber Aktiengesellschaft
- <120> Procedimiento para la preparación de un aditivo para la degradación enzimática de micotoxinas, así como aditivo y uso del mismo
- <130> P05371EP
- <140> A8024/2009
- 25 <141> 18-09-2009
- <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 15420
- 30 <212> ADN
- <213> Sphingopyxis sp.
- <220>
- <221> Seq ID 1 (fum)
- 35 <222> (1).....(15420)
- <300>
- <308> FJ426269
- <309> 11-06-2009
- <313> (1)..(15420)
- 40 <400> 1

ES 2 643 541 T3

tgtcggcgat	crgtaaactt	ctaccgtggt	cctcgttcgc	ccacakcata	catcacagac	60
rtcgggattt	ccaactgaac	gggtcccggc	ctgccggccc	acatttcccg	gaacgccata	120
tgggtgattt	cgacaatccg	gttccaggcg	aagatgggtg	cgccccattt	aaccgcgggt	180
cgaaagaggt	cgatctggtc	ttgtccctga	aaggtttttg	gcgtgcaggg	ataaacgaca	240
ccaagttgat	gctgggacgt	tattgcgacg	aaggaaccc	cttcgtggcg	tgccgtcacg	300
actccaggca	gaaggtttgc	cgtaccggga	cccggattcg	tgacaatcgc	ggcgacctgt	360
ccggtggtct	tgtaaatagcc	ctcggccata	taggctgcgg	cggcctcgtg	ccgcaccggg	420
acgaacaata	tcccattgtc	ttcgagcgca	gccaggagcg	gatccacctc	cggcgacatg	480
aggccgaaga	cataccggac	gccttcgacg	gccaaacatc	gtgccaataa	ttctccgccc	540
gtgaggcgca	tgacgatctc	cagtacgaaa	ggtgagtgcc	caggttccgg	cacattcgct	600
gtggttagtt	gatgcgctga	tcggccaacc	gactgagtgg	agttggatgg	ccgcacctta	660
ccctgtcgcg	cataactctc	agatccggaa	acggaccccc	acattaaaat	agcggcccgc	720
cggatcatag	gcagagctgg	tcgggctgga	aaaactgctg	gggtcgttcg	tcgctattgg	780
cggatctcgg	tcgaacaaat	tattgaccga	tagaaacagc	tgctgcttct	ggccaaaagc	840
cgcgatgtcg	aaggtcaatg	tcgcgtcggt	gtaccaaacc	gccggagcgt	ggttcaaatt	900

ES 2 643 541 T3

cgtatcgacg ccctccacat tgtcggcatt gaacaccgat gctgcgatga agcgctgctg 960
 cacgagaagc gcccaatcgt cggtcgaata tcgcgcctgg aagttggccg accattttgg 1020
 cgtgtccgggt tgtccgagcg aacggatggg cgccgagccg gtcgcgatgc gataggcaga 1080
 ggtatggtgc gttgccagcg cacgaagact gaacgtgccg ccgccgacgg ggcgtgagta 1140
 ataggcctcg aagtcaattc ccgccgcttt ctggacagcc aggttgagat tgggaccctg 1200
 cactgtgatg gtgccgtccg gattctccgt tatgaggctc cagaagaagg tgtttcctgc 1260
 atcgcacgcg tcgatttctt gctggggaag gaggaaatcg atcgcgccct tcaccttcac 1320
 cacatagcga tcgaccgaaa actgaaacct cgccacgaag gcggggcgta gcaccgcgcc 1380
 gaatgtaagg acgtccgcct tttcagggcg caaatccgcg ttgccggcgg taaagaaccg 1440
 cgtctgcaca gcctgtccgc cataaattga attgagcgtc gcctgacggc cggggtcgaa 1500
 tagctcgaca aggcttggcc cgccgatata tcgcgaacgg gtcgcgcgga acctgaggcc 1560
 gtcgatcggc tcatattctc cgcccagctt ccaggttggt actccaccgg actggctgta 1620
 atcggcatat cggacggcgc cgtttaagtt cagcgaacgt ccagcgcgcg tgtccttcag 1680
 aatcgggacg ccgatttcga caaaaccttc cttgatgtca tagcttcccg agaaggggag 1740
 tgggttgtag agattgaagc ctccaggccg acctgcctgc gccgcgggag cccccctgat 1800
 tcccgtgatc gaggtcgtcg cctgcgatat cgcgctcgggt tcctgcgggg ccttctcctt 1860
 gcgatattcg ataccagcgg cgaccgagac cgggcccgcg ccgaacgaca ggctatcgcc 1920
 gaggtcgcgg gaaatcgtga gtcccgccac atattgctca agcctcagct gagcgacgcc 1980
 atcagcggtg acatagtcga tggccgacgc gctcggcgag cctgtgccga agagattgag 2040
 cggcacgcaa tcttggtcga ggccggccag tgttgaacgg cagacgatat tgcccgcggg 2100
 atcgcggacc gcatcgacgg cggcgtagag attgcggttg atggtgagat tgttttcacg 2160
 aagctcgagg tccgtaaggc caaaggaggc cgagccatcg agtttccagc cattgccaat 2220
 gtctgcccgg aagccggcag cgccgcggta gacctttgcg aaattctoga tttcgaccaa 2280
 gggaaagtcg cttgagaagc gaccgacaac gatcgaagcc tgggcatttc tgtccatgag 2340
 cgtcgcgagt ggagccggaa ggaaggcgtt atcacggaag atccggaaat tattcgagcc 2400
 accgacatgc gatattacga atgcaccag gttggtgtgg gaataagcat aggtgccttc 2460
 cgcatacacc tgcacagtgt cggacacatc atatgcggcg cgtaggaacg cgttgtagcg 2520
 aagctgatcc ggggcgaagc cgatattcac gcgcgggtcca tcgccgccgc tctggaacga 2580
 cgagctcgta aaattcccgt agtcgaaggt ccctaggact cctccgggca aaaacgcgat 2640
 gcctttcaga gggccggacg tgacaagtcc gccgtaggat ccgcgagaac tgccaatata 2700
 gggcacgacc gtgacgcctg tcgtagcggc gggcacggga tattggccgg cggcgatgtc 2760
 gaaccagcgg cgacccttg cttcatcggc ccggattccg tcctgtcgaa aatattcgaa 2820

ES 2 643 541 T3

gctgccgagc aagtgaacc ggtcgtcggc aaacgaagtg ccgaaggcga tcgaaccgcc 2880
gtaggacggg aggtcgccgc gggttgaaac acccgactgg agctcggccc tgatgccttc 2940
cagatcttcg tcgagcacga agttgatgac gcccgaacg gcatcggaac cgtaggcggc 3000
cgaggcggcg cccgtcacga catcgacgcg cttgaccaac gcctgctggca gcacgttgat 3060
atcgaccgag cctgtgaaat tggtcgcgac gaaacggttg ccgttcagca ggacgaggtt 3120
ccggtttgac ccgaggccgc gcatgttgag caggttctga ccgctgttcc ccgttccggg 3180
tgtcgtgcca gggttggagg tcttcaagct gtcgttgaac acgggcagct ggttgagtgc 3240
gtcggcaaggt ttggtcggag atgcctcctt caactgctcg ctggatacgg ctgtaaccgg 3300
cgtcggcgaa ttgaagccgt tctggaggcg gctgccggtc acgacgattt cgctcgttcc 3360
ccggtccgtg tccgcttcgt ccggctgacc tatcgatgcg ggatcgctat cctgagcact 3420
ggcagagaca ggaaatgca gggtgccgag cgctactgcg ccgagcaaac tatttgcctt 3480
gccgggcttt tcgattctga acttccgata catctgcagt ccctcccga ttgataggga 3540
ctccgtttga gtccccttgt ttcttgacgc cgccgtcgct caccacggtc cggtcggagg 3600
ctaagcgtcg ggcctaagga cccgcaattt gaacatcaaa tgcaatgatc ggaggcttca 3660
ttgcacttcg cgcatagacc ggcgcggtag ctgaaagtgc caataatcag ggattttgct 3720
gaacagttgc ggcatgacgt ccggcatcgg ccacgcggtt ggcggcatcg acgtggcttt 3780
cgcgtcgccg cccctcaagc accggcgagt tgcattaaaa tgggatgagg ctggagagac 3840
gcaaaatctc tgaggaccgc gctgaacgcg cgatccgtcg cctcgagggt ctccgttaca 3900
tcgtcaactg tatgggccgc agagagaaac atattgtgat agggatgaac atagacgccg 3960
cccttcaggc acgccgcggc ccacgcatag ccgatccgaa aatcgggatc gtccgcaaag 4020
aatatttgcg gcatctgcbc cgggccgctc tgcttcaact caagaccatg gcgctgagac 4080
tgtgcctcca ggcctgcccg cagggcggcg ccgctggcga tcagcgtttc gagataaggc 4140
gtctctcgaa tgatcctgag ggtttcgatc gcggccgcca tcggtaccgc agagaaccag 4200
aaggagccgg tcacaaatat atcccgcgcc gcatcgcgcg ccttgttcga gccagcagg 4260
gcgagatcg gatagccatt cgcaaagcat tttcccagc aactgagatc gggttcgata 4320
cccaaagcg tccagctgca atcgcgcgcc acccgaaac ctgcgcgcac atcgtcaacg 4380
accagaagcg caccggtctc gtcacaacat tttcgagcgg tgcgcgcgaa ctcaagctgg 4440
gcgagggcct ggtcctcaa tacttctgtg cggaaaggtg tggcaaagac agccgcaata 4500
tcgccatcgt gcgccttgaa cgcgtccgat aagctttggg cgtcgttata ggtataatat 4560
gcgacatgca cgcgatcggg agcgagaatc ccggcagtat gcggagtgtt ccacggggaa 4620
gcgccatgat aggcgccttt ggcgcataat atggttttgc gcccgtatg ggcacgcgcg 4680

ES 2 643 541 T3

agaaccatcg ccgttgaggt ggcatcgctg ccatttttgc agaaccatcgc ccaatccgca 4740
 tgacggacca tgcccacaaa ggcttcggcg aggttgacca tgatctccga aggaccggtc 4800
 atggtgtcgc cgagaagtgc ctgcgcatca gccgcggctt cgatttcgga ttgccggtaa 4860
 ccgagcaaat ttggcccata cgcgcacata tagtcgatat agggctgctc gtcggcgtcc 4920
 caaattcgtg ccccagcgc gcgcctgaag aactggggga attctggcgg cagcaaccgt 4980
 gtcgactcgt ggccgtacat cccgcccgga atgaccggtt cggcgcggtt tctgagatct 5040
 ttctgccttg ttccgttcgc cataatgcac ctctcgcgat aaataatggg taaaaatcca 5100
 cgaaattcaa cgattcgtga tctgaaagag atatatcttg taatatactg tataattata 5160
 cacaatgcgc aatcggacga cgggatagcg gggcagggag gacggggaaa tctatgcgga 5220
 acgtcagcga caaggcgcgc ccccacgaga cgctcaccgt agtcgtcgcg gcaatgatcg 5280
 ttggcacggc cgccttgatg gtgcttgga tacagcccat ccttctcggc gccctttag 5340
 aggagggggc tattcccgc gaggggttg gatcggcggc aacggtgga atactggcga 5400
 tcgcgccggg aacatgcac ggaccggtt ttatgaagac gggatatctg cgggcgaaat 5460
 gcgcggcact ctgcttaatg ctgcgccgaa tcaacttcgg attgacggtt ccgggtttcg 5520
 atttgcccat cgtggcttgc cgagcggcag cgggagccct ggaaggctt tcgctcagcg 5580
 cggcgatcct gatcatgact cataatcggc ggccggaccg gctgagcggga atatttctgg 5640
 gcgcgcagac gataccgcag gtaatatctg cttatttgc cccgacggag attattccgc 5700
 gctgggggag cgcaggcggc ttcaagatcc tgggcattct cgcggcgatc gccgcgatcg 5760
 cggctctgtg cctcgtcgat cgcgcttgagc tcgatccgac gaccgttaac gacgacttgc 5820
 agtggtcacc cgcggcgatc gtcatttoga tggcggcatt cgttcaattc tcgggggtcg 5880
 gtccgcgatg gagctatctg gagcgactgg ctgcgcagca cggatttctg ggagaaacga 5940
 tcggtatcgc catttccggg agtttgcttt gccaggtagg cggggcttgg ctggccgctt 6000
 ggatcgggtg gcgggtcggga tatcgcttgc cottaatcgc tgggagcctg cttcaggcgg 6060
 gcaacgtgat cgcattggcg gtggccgatc agccaagctg gtttatttcc gcttctctgtg 6120
 ctttcggcct gttctgggtg gcgatgcagc ccttccaaat ccgcttcgcg atcgcgatag 6180
 ataacagccg gcagcttgct gtactgctga cgcgatcgc cctcgtcggg ttgagcgcgg 6240
 ggcccttggt gctctctcgc tttgccgggg cgaccgactt gcgctggatc tttgtgggga 6300
 gttcagacct gttgctggcc agcgcgcttc tgtatctttg cgcttctctg tttcaaccgc 6360
 gcggaaaggt gatcgcctgaa acggtggacg tatgaaaaag acggatcggg gttcgcgatg 6420
 acatcgcagg tcaagcttgc tagcgcggca aagcggccgc gcagtcctaa aagcgcgca 6480
 ggtcttgctc gttacagatc cttgcttgat gcgaccgaca ggctgttggc cgatctagac 6540
 cccgatcagg tcggtctcta tcagattgca gaggaagcgg gtgcctcacc gtcgtccgctc 6600

ES 2 643 541 T3

tatcatttct	ttccgaccaa	ggaagtggct	catctcgctc	tgatgcgccg	ctatctggag	6660
gggctccgga	atctcgacgc	gatggaagtc	gacatcggcc	agctcgaaag	ctggcaggac	6720
ctgatgaagt	tggatcagat	cagggcgcgga	gactattata	atagccaccc	gcccgcctc	6780
aagcttctgt	tcggcggata	tggcggggtc	gaggccagaa	agcttgacga	gcgatactcc	6840
gaggaaatcg	tgagctccat	gtatggcaga	tacaacggca	ttttccatat	gccgcaaatg	6900
gagaatgagg	ctctcatggt	cacgatctgc	ttcgcaattc	tcgacgcggt	atgggcccgc	6960
tcctttcgcc	ggttcggtga	aattacgtcg	gattttcttc	gggaggggca	agcggccttc	7020
attgcctatt	gccgacacta	tctgcccag	cgaacgccat	cagcgtgaat	ccgttcaacg	7080
atatgcagga	atgtccgttg	cgttgagttc	ggttctgagt	tcggtcggtt	aggaggcccc	7140
gcgataaacc	aacgctcttc	tgtcgaaggg	atgtcgcctg	gttcgaccag	gccctgcgaa	7200
gtcagccgca	atcaacgagg	cagatgtcaa	cgtggccagc	aagttcaact	gtgagttact	7260
cgatctgcga	tcatttggtg	cggtgtatga	aacgcgaagt	tttagccacg	ccgcgcggct	7320
tctgaatcaa	tcgcagcccg	cgctcagccg	gagaatccag	cgctcgcgga	gtctcgtggg	7380
cggtccggtg	ttcgagcggga	ccagtcggtc	gcttgccgaa	acggcgcctc	gcaaagagtt	7440
gctcccggtc	gccaccgag	cgttggaact	tgtcgatacg	tcgctgtttg	cgtcgcccaa	7500
tgtccgggag	ttccgctgga	cagacatcac	gattgcctgt	gtacagaccg	ccgccttcca	7560
tgttctcccg	cgagctgcgc	gcttgtacat	ggatcaaaat	ccgaggggtcc	gactccgcat	7620
ccttgacgtg	ccggcggctc	aggctgcgga	cctggttgcg	agcggcgagg	cggagttcgg	7680
catcagcatt	gagagcctgt	tgccatcaag	cctgcggttc	gatgcgctcc	acgaggaccc	7740
gttcggcctg	gcatgccacc	gaagccatcc	gctggcgtcg	ctcgagatcc	ttgaatggac	7800
gcaattgaaa	ggtgaaagcc	tgatcgccgt	tcaccgtgcg	agccggaacc	gcacgttgct	7860
cgatgccgaa	ctcgcgcgca	acaatatcgc	gctggaatgg	cggtatgagg	tcgcgcatct	7920
gacgacggcg	ctgggattga	tcgatgcgca	attgggtgtc	gctgttatgc	cccgcattgt	7980
tatgccccgc	tcgggtcggg	cggaggtcgt	ctggcgcccc	gtcgtcgcgc	cggtcgtcca	8040
acgcacgatc	ggcatcgttc	agcgccgcac	cggctcgatg	caccctgccg	cacagcaatt	8100
gcttgcgcgg	ctccgcgcgg	cctggtcgtc	cgccaatctg	ggcgacatcg	cgtctcgcga	8160
agatggggca	tcgtgacacg	cgttctatgc	gcctgcagca	tcgatgctca	cgatcattgc	8220
atgtgctgag	agacgaacgc	gaagataccg	ctgggtcaca	ggatatcagt	ccatcgaggc	8280
gggagagaaa	tgtgtgaaag	agcaccaatg	ccgtggcggc	cgggcgtccc	ccgctgcgcc	8340
cgccacgtgg	cttgcgcgga	tcagcgtttc	ccggggggcc	tccgcatcgc	cctggacctt	8400
catgcttggc	gcaactgcca	ttcccgtggc	tgcgcaaact	gacgatccga	agctcgttcg	8460

ES 2 643 541 T3

tcataccag tcgggcgccc tcgagggcgt cgagggcgac gtcgagactt ttttgggaat 8520
 acccttcgcg gctccgcccg tcggcgacct gcgatggcgg ccgccggctc cgccgagggc 8580
 gtgggcgggc accagggacg gccgcccgtt tgcgcccgat tgcacggga acgagcggct 8640
 tagagagggg agccgggctg ccgggacgag cgaagactgc ctctatctga atatctggtc 8700
 tcccaaacag gtcggtaagg gggggctccc cgtcatgac tgggtttacg gcggtgggtt 8760
 tagcggcggg tctggcgcgg tgccatatta tgacggctct gcgctcgcgc agaagggcgt 8820
 ggtggtcgtc acgttcaact atcgcgcccg gattctgggc tttcttgccc atccggcgt 8880
 ttcaaaggaa agtccgaatg gcgtgtcggg caactatggt cttctcgaca tgctcgcggc 8940
 gttcaaatgg gttcagaaca acataaggga gttcggcggg gacccgaacc gtgtcacggg 9000
 ctttggcgag tccgccggcg cgagcgcgct cggactgctc ctgacctcgc cgctcagtga 9060
 gagcgccttc aatcaggcga tactgcaaag tccgggtctg gccaggccgc tcgccacgct 9120
 ttctgaaagc gaagcgaatg ggctggagct gggagccgat atttctgctc tacggcgtgc 9180
 cgatgcgggc gaattgacga agatcgcgca atcgcgaata cccatgtcgc gccagttcac 9240
 caagccgcgg ccgatgggtc cgattctgga cggctatggt ttgcgcaccc ttgacgtcga 9300
 tgccttcgcc aagggggcct tccgcaagat acccgttctg gtcggcggaa acgcccacga 9360
 agggcgcgct tttacggatc gcctgccggg caaaacggtc cttgaatata gagcctatct 9420
 cacagaacaa tttggtgacg agggcgacgc atgggagcgt tgttatcccg cgaactccga 9480
 cgccgacgtc cccgccgccg ttgcccgctt ttttggggat agtcagttca acaacgggat 9540
 cgagctgctc tcggcagcct tcgcgaaatg gcgaacgccg ctttggagat atcgctttac 9600
 gggcattcca ggagccggcc gtcgccccgc cacgcatgga gacgaaattc cctatgtctt 9660
 cgcaaactcg gggccgctgt ccgtatctat gtttgggtcg ctcgaaggcg gcgcccgggc 9720
 gtcggacatc aaacttgcca ccgaaatgtc cgcggcctgg gtgagcttcg cgggtgcacgg 9780
 ggtccccgat cagggcaccg aatcgcaactg gccgcgcttc gagcggcgag gggagatcat 9840
 gacttttggg tcgcaggttg gctctgggga aggtcttggg gtttcgccga gcaaagcctg 9900
 ccaaccctca aaatagcgcc cggcctgtgc gtgcttcagc acgccgtccc gctttgcggg 9960
 cgacgggctg tgccctctgc ctagaaggaa gtaagttgcg ctacgacgtc gcgataattg 10020
 gaggtggcaa cgctgcattg acggcagccg tgacggcgcg tgaagcgggg gcctcggttc 10080
 ttgtgatcga gcatgcgccg cgcgccatgc gcggcggcaa cagtcgtcac acacgcaata 10140
 tgcgtacgat gcacgaacgt cccctgtcgc cgttgaccgg tgaatattcg gcggacgaat 10200
 attggaatga tcttgtccgc gtcacggggg ggcgcaccga cgaagaactc gcgcggtcgt 10260
 ttatccgcaa caccaccgac gctattccct tcatgacgcg ctgcggtgtg cgtttccagc 10320
 cctcgtgctc gggcacgctg agtttatcgc gaaccaacgc attcttcctt ggcggcggga 10380

ES 2 643 541 T3

aggcgcttgt aaacgcatat tacgccacgg ccgaacggct aggcgtcgat attctctatg 10440
 attctgaggt gaccgagatc aaccttcagc aaggcgtcgt gcagcgtctg caattgcgca 10500
 gccggggatt ccctgtcgaa gtggaagcca aggcgtccat cgcctcgtcc ggaggattcc 10560
 aggcaaatct tgactggctc tcaagcgc at gggggcctgc tgcggcgaac ttcacgtac 10620
 ggggcacgcc atatgcgact ggcacgggtgc tcaagaacct gttggagcaa ggcgtcgcct 10680
 cgggtgggaga tccaacccaa tgccatgctg tcgcatcga tgggcgagcg cccaaatacg 10740
 acggcggcat cgtcacacga ctggactgcg ttcccttctc gatcgtcgtc aacaaggacg 10800
 ccttgcgctt ctacgatgaa ggcgaagatg tgtggccgaa gcgttacgcc atatggggtc 10860
 gcttggtggc acagcagcct gatcagatcg ctttcagcat aatcgatcgg caggccgaag 10920
 acctcttcat gccgtcagtg ttcccccccg tgcaagcgga cacgatcgcg ggtctggccg 10980
 agaaactcgg tctgaatccc gtaaccctgg aacgcacggg gccgaattc aacgccgcat 11040
 gcgtgcccgg cgaattcggc ggccaagatc tcgacgacct ccacaccgag ggaatcgaac 11100
 caaagaaatc caactgggcc cgaccgatta ttgtgcccc gttcagcgcc tatectctcc 11160
 ggcccgggat caccttcacc tatctcggcg tcaaggtaga cagccgtgcg cgggtcatca 11220
 tgagacagtg tgagccgaca aaaaacctgt ttgcttcggg gaaataatg gcgggcagca 11280
 ttctcggcca aggttatctc gctggatttg gaatggcgat tggtagcgta ttcggccgca 11340
 tcgcggttg ggaggccgca cgtcatgcag gattttgatc tcgtaaaaat gctgtctgac 11400
 ttgccgtcgg cgccggagct ggaagccagg cgcgttatgg aggtgtgcaa cgcgtgccgc 11460
 tattgcgaag ggttctgcbc ggtatttctt gcaatgacct tgcagcgtca tttcgccagc 11520
 ggcgatctca gccacctcgc caatctctgc cactcgtgcc aagggtgcta ttacgcctgc 11580
 caatacggcc ctccgcatga gttcgggaata aacgttccaa aggcgctgtc ggagttgagg 11640
 ctcgagagct acgagcagca tgcttggccc cggccggctc ccgctctcta tcgcaagaat 11700
 gcgctcatca tttccatctt gtcggcggca tgcataaccg gcgtccttct gcttgccgcc 11760
 atcttcaacg gggatgcaact tttcgcgaaa cacgcacatcgc tgcccggcgg cgggttttac 11820
 aacgttattc cttatcaggc gatgattgcc gtcgcgccga ccacatttct ttattccggc 11880
 ctggcgctgg cgatcagtct cgttcgcttt tcgcgagcga tcggtctggg aattaaggtt 11940
 ctttatcagc acgtgccggg tcttcggggc ctacgcgatg cggcgactct gcgatatctc 12000
 ggcggcagcg acggcgaggg gtgtaacgac gcggacgaga cattttcgac gaccggcgca 12060
 aaatttcatc acgcccttgc ctatggcttc ggactttggt tcgcgccac agccacgggc 12120
 acgatctacg atcatatggt cggctggccg gcgccctatg cgcttttcag cttgccggtc 12180
 gtccatagga ccgttggggg gatcggaatg gtcgtggggc cgatcggcct actctggctc 12240

ES 2 643 541 T3

aagctggccg gcgaagacgc tcctcgatca ccggcactgc ttgggcccga tgttgccctg 12300
ttggtgcttc tgcttgccat agcggcaacg ggccctcctc ttttagcggg ccgcagcacc 12360
gaagtcatgg gcgtcgcgct cgccgtccat ctccggcgtcg tcttggcctt ctttttggtg 12420
atgccataca gcaaatttgt ccacgggtatc ttcagggtca cggctctcgt gcgccatcat 12480
gctgaccgcg aggcaagtaa tggcttcgcc tccagccctc ccacgaaaaa gggttaaaca 12540
atggaacata tgaagtccgt tcgcgatcgc agtagcgtca tgcagatcgt gagagtggcg 12600
agtggcaact gtctcagaca atatgatttc ttcgtttacg gcttctatgc ggcataatatt 12660
gcgagaagct tttttccgac cggcgataac gcgacatcgc tcatgctttc attggccact 12720
tttggcgctg gtttccctcat gaggcccttg ggggcgattt ttctcgggtc ctacatcgat 12780
cgcgtcgggc gtccgaaagg cctgatcgtg aactcgcga tcatggccgt ccggaaccctc 12840
accattgcga tgactccaag ctatgaggca attggattac tcgcaccggt taccgtgctc 12900
gtcgggcgac ttttgcaggg tttttccgct ggagcagagt cgggtggcgt ctcagtgtac 12960
ttggcggaaa ttgcgtcgc caaatcgaga ggcttcttca cctcgtggca gtctgccagc 13020
cagcaggtgg ccgtcatgat ccgccccgcg atcggctctg cgtcgaatc aacgctttca 13080
ccggagcaaa tgaacgactg gggatggcgg gtgcccttgt tgatcggatg cttgattatc 13140
cccgtgatac tctggctgcg ccggtctctc ccggaaacga aagcctatct ccacatggag 13200
cacaaggcgc attcgatcgg cgaatccctc cgcgaattgc aacagagctg ggggctgatc 13260
ttgacgggca tggcgatgtc gatcctcacg acgaccacct tttacatgat taccgcctat 13320
acgccgacat ttggcgagaa agcactcggg ctgagcccgc aagatgtcct gctggttacc 13380
atcatggtcg gcgtgtcgaa cttcctgtgg cttccgatcg ggggtgctct ctccgatcgt 13440
atcggtagaa ccccgatcct actggtcgtg ccggtcaccg ttctcggcat cgcctttccc 13500
ctgatgagct ggctcgtcgc ggcaccgaca ttcggagcgc ttgcagctgt tctgctgact 13560
ttctccgcat gctttggact ctataatggg gcgctcatcg cgagactcac cgagattatg 13620
cctcccgcca ttagaacctt tggcttctcg ctggcgttca gtctcgcgac ctccgtgttc 13680
ggcggcttca cccattggt aagtacggcg ctaatccacg cgacgggcag caattccgcg 13740
cctgcaatct ggctctgttt tgcggctttc atcagcttcg tcgggtgtggc cgcacgcacc 13800
cggctgagcc ggccaatcgc cgaaggcgc agataggaca atcagagaat gcccgtcggy 13860
caatgaagcg agattcgggc ggtagggtcg ctggcggcac ttcgcgaaga gccgttgcgy 13920
acggctgaaa cgatgatggt atgaatggc taagacatga gagcagtagt ttaccgaaat 13980
ggcgaacttg tcctgggggc ctatgctgat ccgatacccg ccgccgggca ggtgctcgtc 14040
aagaccagag catgcggcat ctgcggatct gaccttcatt tttgcgatca tgcgcaggcg 14100
tttacgaacc ttgcatcgcg ggcgggtatc gcctctatgg aagttgattt gtgtcagagc 14160

ES 2 643 541 T3

atcgttctgg ggcataaatt ctgtggcgag attatggagt tcgggccctc tgcggatcgt 14220
 cgcttcaaac ccggacagct tgtgtgctcg ctgccgctgg cgatcgggcc gaccggagcg 14280
 cggacgattg gctactcgga tgagtatccc ggcgggctcg gcgaatataat ggtcctcacg 14340
 gaagcgctct tgctgcctgt tccgaacggc cttccggcga cctgcgcggc gttgacggag 14400
 ccgatggcgg tgggatggca tgccgtcgag atcgcgcagg ttcaaccaca tcacatccct 14460
 gtggtgatcg ggtgcggacc ggtcggggtg gcagtcgtcg ctgccctgaa acataagcaa 14520
 gttgctccga ttattgcgtc ggatccatcg cccgatcggc gtgctcttgc tctgcggatg 14580
 ggcgccgacg ccgttgtcga tccgcgcgaa gaatcacctt ttcgccaggc cgagaagatc 14640
 gcacgcccgg tcggacaagg tggggccctg tccagctcat tgctgtcaaa gtctcaaatg 14700
 atattcgaat gcgtaggggt gccgggcatg cttcggcatg cgatggacgg cgcgtccgac 14760
 ggggccgaga tcatggtcgt tggcgcgatgc atgcagccgg acgcgatcga gcccatgatc 14820
 gggatgttta aagcgtcac gatcaaattc tcgcgaactt acacgggtga ggaattcgcc 14880
 gcggtgcttc acatgatagg tgagggcgca ctgcagctat ctccgctcgt taccgatgtg 14940
 attggcctgt ccgatgtccc gtccgcgctt gaggctctac ggagtccagg cgcccaagca 15000
 aaagtgattg tggacccttg gcgctgagcc tgaggatgcc aagggtgcga cgttgggcat 15060
 cgtcaaagaa ggcgacgctg acccggatg tgaacatccc catattcttc cgcagctgaa 15120
 gcagttggta aacatgccaa aatatgaact gtagtattgc gtcgggggtc tcattgtggg 15180
 gtttgccatt gtcacgctc gcacccggcg acaaagatta gatgtacttc cgataatccg 15240
 tgctctcgac ctggccttcc ttcatatatt tcaggacctc tccgacctg cgtgcggcgc 15300
 ggatcgggat cggcaggcgt tggttcatct gggctcagtt ccagttgatc ttcgtaagag 15360
 agaacacctc ctcggctaac tgcgccggc tactatcgca ggatcgtctc gagcgytgcg 15420

<210> 2
 <211> 1623
 <212> ADN
 5 <213> Sphingopyxis sp.

<220>
 <221> Seq ID 8 (fumD)
 <222> (1).....(1623)

10 <300>
 <308> FJ426269
 <309> 11-06-2009
 <313> (1)..(1623)

<400> 2
 gtgaaagagc accaatgccg tggcggccgg gcgtccccg ctgcgcccgc cacgtggctt 60

15 gcgcggatca gcgtttcccg gggggcctcc gccatgcct ggacctcat gcttggcgca 120

ES 2 643 541 T3

actgccattc ccgtggctgc gcaaactgac gatccgaagc tcgttcgtca taccagtcg	180
ggcgccgctcg agggcgctcga gggcgacgtc gagacttttt tgggaataacc cttcgcggct	240
ccgccggtcg gcgacctgcg atggcggccg ccggtccgc cgagggcgctg ggcgggcacc	300
agggacggcc gccgctttgc gcccgattgc atcgggaacg agcggcttag agaggggagc	360
cgggctgccg ggacgagcga agactgcctc tatctgaata tctggtctcc caaacaggtc	420
ggtaaggggg ggctccccgt catgatctgg gtttacggcg gtgggttag cggcggttct	480
ggcgcggtgc catattatga cggctctgcg ctcgcgcaga agggcggtgt ggtcgtcacg	540
ttcaactatc gcgccgggat tctgggcttt cttgcccatc cggcgctttc aaaggaaagt	600
ccgaatggcg tgtcgggcaa ctatggtctt ctcgacatgc tcgcggcgtt caaatgggtt	660
cagaacaaca taaggagtt cggcggagac ccgaaccgtg tcacggtctt tggcgagtcc	720
gccggcgcga gcgcgctcgg actgctcctg acctcgccgc tcagtgagag cgccttcaat	780
caggcgatac tgcaaagtcc gggctctggc aggcgctcg ccacgctttc tgaaagcgaa	840
gcgaatgggc tggagctggg agccgatatt tctgctctac ggcgtgccga tgcgggcgaa	900
ttgacgaaga tcgcgcaatc gcgaataccc atgtcgcgcc agttcaccaa gccgcggccg	960
atgggtccga ttctggacgg ctatgttttg cgcacccttg acgtcgatgc cttcgccaag	1020
ggggccttcc gcaagatacc cgttctggtc ggcggaaacg ccgacgaagg gcgcgctttt	1080
acggatcgcc tgccggtcaa aacggtcctt gaatatcgag cctatctcac agaacaattt	1140
ggtgacgagg cggacgcatg ggagcgttgt tatccccgca actccgacgc cgacgtcccc	1200
gccgccgctg cccgtctttt tggggatagt cagttcaaca acgggatcga gctgctctcg	1260
gcagccttcg cgaaatggcg aacgccgctt tggagatata gctttacggg cattccagga	1320
gccggccgtc gccccgccac gcatggagac gaaattccct atgtcttcgc aaatctgggg	1380
ccgtcgtccg tatctatggt tgggtcgcctc gaaggcggcg ccggggcgtc ggacatcaaa	1440
cttgcgaccg aaatgtccgc ggcctgggtg agcttcgcggt tgcacggggt ccccgatcag	1500
ggcacgaaat cgcaactggc gcgcttcgag cggcgagggg agatcatgac ttttggttcg	1560
caggttggct ctggggaagg tcttgaggtt tcgccgagca aagcctgccca accctcaaaa	1620
tag	1623

<210> 3
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Sphingopyxis sp.

<220>
 <221> Seq ID 9 (FumD)

5

ES 2 643 541 T3

<222> (1)..(540)

<300>

<308> FJ426269

5 <309> 11-06-2009

<313> (1)..(540)

<400> 3

Val Lys Glu His Gln Cys Arg Gly Gly Arg Ala Ser Pro Ala Ala Pro
1 5 10 15

Ala Thr Trp Leu Ala Arg Ile Ser Val Ser Arg Gly Ala Ser Ala Ile
20 25 30

Ala Trp Thr Phe Met Leu Gly Ala Thr Ala Ile Pro Val Ala Ala Gln
35 40 45

Thr Asp Asp Pro Lys Leu Val Arg His Thr Gln Ser Gly Ala Val Glu
50 55 60

Gly Val Glu Gly Asp Val Glu Thr Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Ala
65 70 75 80

Pro Pro Val Gly Asp Leu Arg Trp Arg Pro Pro Ala Pro Pro Arg Ala
85 90 95

Trp Ala Gly Thr Arg Asp Gly Arg Arg Phe Ala Pro Asp Cys Ile Gly
100 105 110

Asn Glu Arg Leu Arg Glu Gly Ser Arg Ala Ala Gly Thr Ser Glu Asp
115 120 125

Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Ser Pro Lys Gln Val Gly Lys Gly Gly
130 135 140

Leu Pro Val Met Ile Trp Val Tyr Gly Gly Gly Phe Ser Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Ala Val Pro Tyr Tyr Asp Gly Ser Ala Leu Ala Gln Lys Gly Val
165 170 175

Val Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Ala Gly Ile Leu Gly Phe Leu Ala
180 185 190

His Pro Ala Leu Ser Lys Glu Ser Pro Asn Gly Val Ser Gly Asn Tyr
195 200 205

Gly Leu Leu Asp Met Leu Ala Ala Phe Lys Trp Val Gln Asn Asn Ile
210 215 220

ES 2 643 541 T3

Arg Glu Phe Gly Gly Asp Pro Asn Arg Val Thr Val Phe Gly Glu Ser
 225 230 235 240
 Ala Gly Ala Ser Ala Leu Gly Leu Leu Leu Thr Ser Pro Leu Ser Glu
 245 250 255
 Ser Ala Phe Asn Gln Ala Ile Leu Gln Ser Pro Gly Leu Ala Arg Pro
 260 265 270
 Leu Ala Thr Leu Ser Glu Ser Glu Ala Asn Gly Leu Glu Leu Gly Ala
 275 280 285
 Asp Ile Ser Ala Leu Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Leu Thr Lys Ile
 290 295 300
 Ala Gln Ser Arg Ile Pro Met Ser Arg Gln Phe Thr Lys Pro Arg Pro
 305 310 315 320
 Met Gly Pro Ile Leu Asp Gly Tyr Val Leu Arg Thr Leu Asp Val Asp
 325 330 335
 Ala Phe Ala Lys Gly Ala Phe Arg Lys Ile Pro Val Leu Val Gly Gly
 340 345 350
 Asn Ala Asp Glu Gly Arg Ala Phe Thr Asp Arg Leu Pro Val Lys Thr
 355 360 365
 Val Leu Glu Tyr Arg Ala Tyr Leu Thr Glu Gln Phe Gly Asp Glu Ala
 370 375 380
 Asp Ala Trp Glu Arg Cys Tyr Pro Ala Asn Ser Asp Ala Asp Val Pro
 385 390 395 400
 Ala Ala Val Ala Arg Leu Phe Gly Asp Ser Gln Phe Asn Asn Gly Ile
 405 410 415
 Glu Leu Leu Ser Ala Ala Phe Ala Lys Trp Arg Thr Pro Leu Trp Arg
 420 425 430
 Tyr Arg Phe Thr Gly Ile Pro Gly Ala Gly Arg Arg Pro Ala Thr His
 435 440 445
 Gly Asp Glu Ile Pro Tyr Val Phe Ala Asn Leu Gly Pro Ser Ser Val
 450 455 460
 Ser Met Phe Gly Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Ala Ser Asp Ile Lys
 465 470 475 480

ES 2 643 541 T3

Leu Ala Thr Glu Met Ser Ala Ala Trp Val Ser Phe Ala Val His Gly
 485 490 495

Val Pro Asp Gln Gly Thr Lys Ser His Trp Pro Arg Phe Glu Arg Arg
 500 505 510

Gly Glu Ile Met Thr Phe Gly Ser Gln Val Gly Ser Gly Glu Gly Leu
 515 520 525

Gly Val Ser Pro Ser Lys Ala Cys Gln Pro Ser Lys
 530 535 540

- <210> 4
- 5 <211> 1269
- <212> ADN
- <213> Sphingopyxis sp.
- <220>
- 10 <221> Seq ID 18 (fumI)
- <222> (1)..(1269)
- <300>
- <308> FJ426269
- 15 <309> 11-06-2009
- <313> (1)..(1269)
- <400> 4

```

atggcgaacg gaacaaggca gaaagatctc agagaacgcg ccgaacgggt cattccgggc      60
gggatgtacg gccacgagtc gacacgggtg ctgccgccag aattcccca gttcttcagg      120
cgcgcgctgg gggcacgaat ttgggacgcc gacgagcagc cctatatoga ctatatgtgc      180
gcgatatggc caaatttgcg cggttaccgg caatccgaaa tcgaagccgc ggctgatgcg      240
cagcgacttc tcggcgacac catgaccggt ccttcggaga tcatggtcaa cctcgccgaa      300
gcctttgtgg gcatggtccg tcatgcggat tgggcgatgt tctgcaaaaa tggcagcgat      360
gccacctcaa cggcgatggt tctcgcgcggt gccatacgg ggcgcaaac catattatgc      420
gccaaaggcg cctatcatgg cgcttccccg tggaacactc cgcatactgc cgggattctc      480
gcttccgatc gcgtgcatgt cgcataattat acctataacg acgcccaaag cttatcggac      540
gcgttcaagg cgcacgatgg cgatattgcg gctgtctttg ccacaccttt ccgacacgaa      600
gtatttgagg accaggccct cgcccagctt gagttcgcgc gcaccgctcg aaaatgttgt      660
gacgagaccg gtgcgcttct ggtcgttgac gatgtgcgcg caggtttccg ggtggcgcg      720
gattgcagct ggacgcattt gggtatcgaa cccgatctca gttgctgggg aaaatgcttt      780
gcgaatggct atccgatctc cgccctgctg ggctogaaca aggcgcgcga tgcggcgcg      840
gatataattg tgaccggctc cttctggttc tctgcggtac cgatggcggc cgcatcgaa      900
    
```


ES 2 643 541 T3

```

accctcagga tcattcgaga gacgccttat ctcgaaacgc tgatcgccag cggcgccgcc      960
ctgcgggcag gcctggaggc acagtctcag cgccatggtc ttgagttgaa gcagacgggc      1020
ccggcgcaga tgccgcaaat attctttgcg gacgatcccg attttcggat cggctatgcg      1080
tgggccgcgg cgtgcctgaa gggcggcgtc tatgttcatc cctatcaciaa tatgtttctc      1140
tctgcggccc atacagttga cgatgtaacg gagaccctcg aggcgacgga tcgcgcgttc      1200
agcgcggtcc tcagagattt tgcgtctctc cagcctcatc ccattttaat gcaactcgcc      1260
ggtgcttga                                     1269

```

```

5 <210> 5
  <211> 422
  <212> PRT
  <213> Sphingopyxis sp.

10 <220>
    <221> Seq ID 19 (Fuml)
    <222> (1)..(422)

15 <300>
    <308> FJ426269
    <309> 11-06-2009

    <313> (1)..(422)

    <400> 5

```

```

Met Ala Asn Gly Thr Arg Gln Lys Asp Leu Arg Glu Arg Ala Glu Arg
 1           5           10           15

Val Ile Pro Gly Gly Met Tyr Gly His Glu Ser Thr Arg Leu Leu Pro
          20           25           30

Pro Glu Phe Pro Gln Phe Phe Arg Arg Ala Leu Gly Ala Arg Ile Trp
          35           40           45

Asp Ala Asp Glu Gln Pro Tyr Ile Asp Tyr Met Cys Ala Tyr Gly Pro
 50           55           60

Asn Leu Leu Gly Tyr Arg Gln Ser Glu Ile Glu Ala Ala Ala Asp Ala
65           70           75           80

Gln Arg Leu Leu Gly Asp Thr Met Thr Gly Pro Ser Glu Ile Met Val
          85           90           95

Asn Leu Ala Glu Ala Phe Val Gly Met Val Arg His Ala Asp Trp Ala
          100          105          110

Met Phe Cys Lys Asn Gly Ser Asp Ala Thr Ser Thr Ala Met Val Leu
115          120          125

```

ES 2 643 541 T3

Ala Arg Ala His Thr Gly Arg Lys Thr Ile Leu Cys Ala Lys Gly Ala
130 135 140

Tyr His Gly Ala Ser Pro Trp Asn Thr Pro His Thr Ala Gly Ile Leu
145 150 155 160

Ala Ser Asp Arg Val His Val Ala Tyr Tyr Thr Tyr Asn Asp Ala Gln
165 170 175

Ser Leu Ser Asp Ala Phe Lys Ala His Asp Gly Asp Ile Ala Ala Val
180 185 190

Phe Ala Thr Pro Phe Arg His Glu Val Phe Glu Asp Gln Ala Leu Ala
195 200 205

Gln Leu Glu Phe Ala Arg Thr Ala Arg Lys Cys Cys Asp Glu Thr Gly
210 215 220

Ala Leu Leu Val Val Asp Asp Val Arg Ala Gly Phe Arg Val Ala Arg
225 230 235 240

Asp Cys Ser Trp Thr His Leu Gly Ile Glu Pro Asp Leu Ser Cys Trp
245 250 255

Gly Lys Cys Phe Ala Asn Gly Tyr Pro Ile Ser Ala Leu Leu Gly Ser
260 265 270

Asn Lys Ala Arg Asp Ala Ala Arg Asp Ile Phe Val Thr Gly Ser Phe
275 280 285

Trp Phe Ser Ala Val Pro Met Ala Ala Ala Ile Glu Thr Leu Arg Ile
290 295 300

Ile Arg Glu Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Leu Ile Ala Ser Gly Ala Ala
305 310 315 320

Leu Arg Ala Gly Leu Glu Ala Gln Ser Gln Arg His Gly Leu Glu Leu
325 330 335

Lys Gln Thr Gly Pro Ala Gln Met Pro Gln Ile Phe Phe Ala Asp Asp
340 345 350

Pro Asp Phe Arg Ile Gly Tyr Ala Trp Ala Ala Ala Cys Leu Lys Gly
355 360 365

Gly Val Tyr Val His Pro Tyr His Asn Met Phe Leu Ser Ala Ala His

ES 2 643 541 T3

370

375

380

Thr Val Asp Asp Val Thr Glu Thr Leu Glu Ala Thr Asp Arg Ala Phe
385 390 395 400

Ser Ala Val Leu Arg Asp Phe Ala Ser Leu Gln Pro His Pro Ile Leu
405 410 415

Met Gln Leu Ala Gly Ala
420

REIVINDICACIONES

- 5 1. Aditivo adecuado para la degradación enzimática de fumonisinas en una materia prima vegetal y mezclas que contienen materias primas vegetales, caracterizado por que presenta al menos un 90% de identidad de la secuencia con una enzima de la SEQ ID N° 3 (Seq ID 9 (FumD)), así como, eventualmente, de manera adicional un co-sustrato para la enzima empleada, una enzima de la SEQ ID N° 5 (Seq ID 19 (FumI)) y un soporte inerte.
2. Aditivo según la reivindicación 1, caracterizado por que la enzima y/o las enzimas idénticas en al menos un 90% se emplean envueltas en una envoltura protectora.
3. Aditivo según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que la enzima se elige de una carboxilesterasa SEQ ID N° 3 (Seq ID 9 (FumD)).
- 10 4. Uso de un aditivo según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el aditivo se emplea en un medio independiente de oxígeno en la producción de bioetanol, junto con un mosto o bien un material de partida vegetal.
5. Uso de un aditivo según la reivindicación 4, para el tratamiento independiente de oxígeno de un material de partida vegetal o bien de un mosto para la producción de bioetanol.

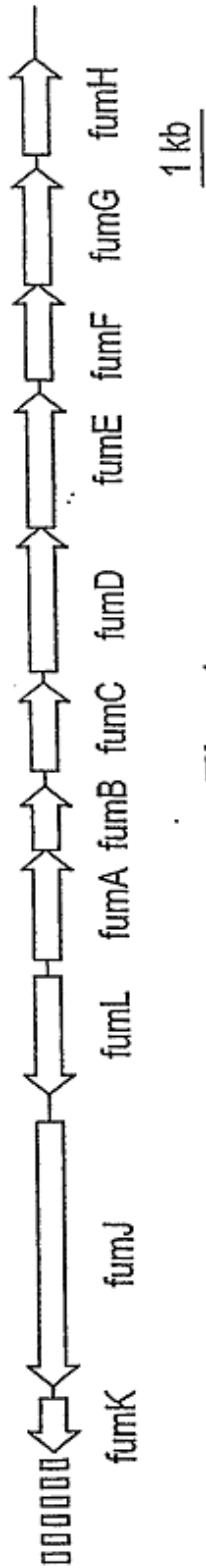


Fig. 1

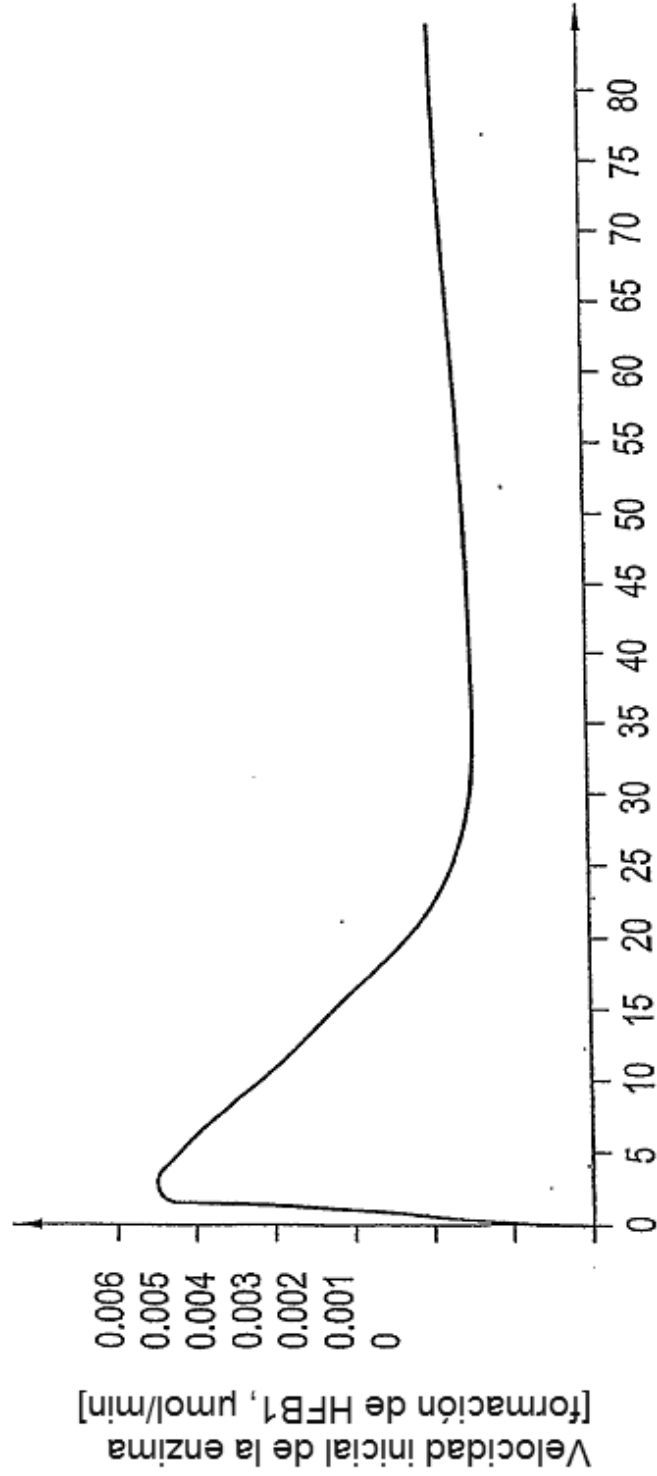


Fig. 2 Concentración de sustrato [FB1, $\mu\text{mol}/\text{l}$]

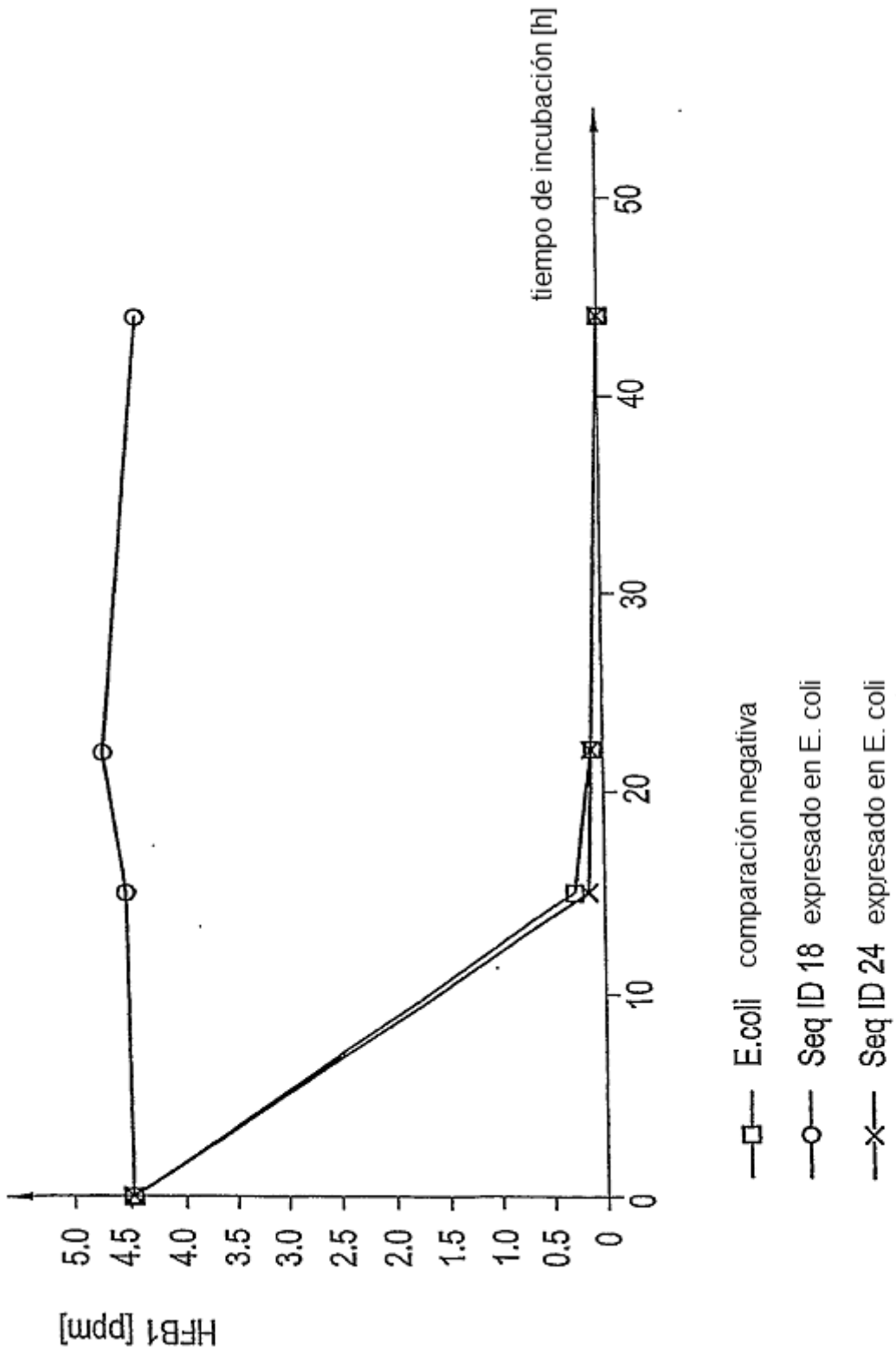


Fig. 3

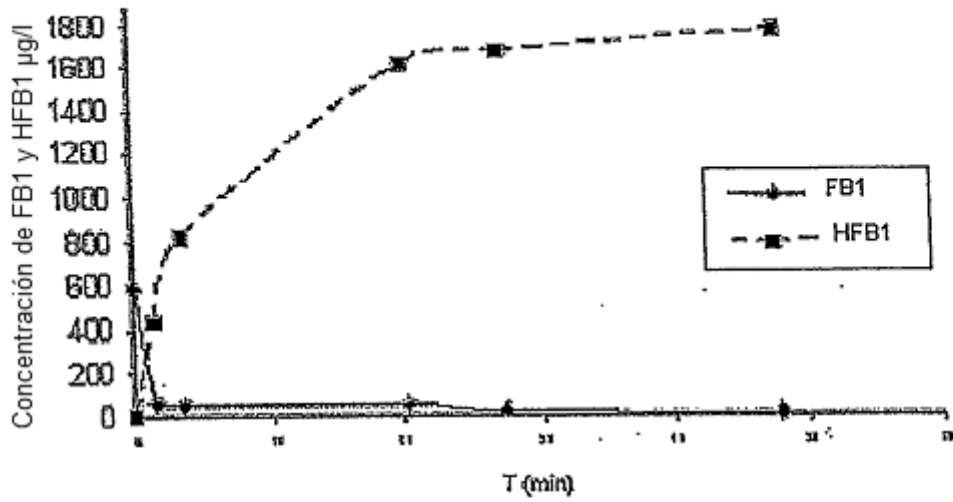


Fig. 4

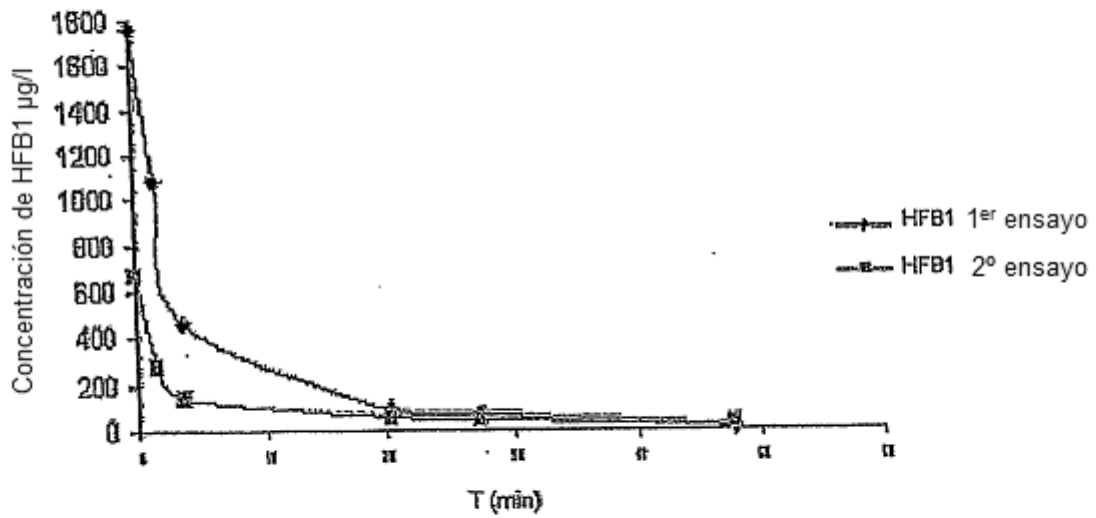


Fig. 5