MEDIOS Y MÉTODOS PARA EL CLIVAJE DE LA ZEARALENONA

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

[001] La presente invención se relaciona con un método para incrementar la estabilidad de una α/β-hidrolasa. Además, la presente invención se relaciona con una α/β-hidrolasa obtenible por el método de la presente invención. También se proporcionan α/β-hidrolasas que tienen un valor de hidropatía (gran promedio de hidropatía, por sus siglas en inglés GRAVY, *grand average of hydropathy*) disminuido y/o que comprenden mutaciones específicas. Además, la presente invención se relaciona con el uso de una α/β-hidrolasa de la presente invención para degradar zearalenona (ZEN).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[002] Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos. Un importante exponente de las micotoxinas es la zearalenona (ZEN), que antes se conocía como toxina F-2, producida por una variedad de hongos *Fusarium* y que puede encontrarse en todo el mundo. Estos hongos infestan plantas cultivadas, entre otras, como pueden ser varios tipos de granos, en los que la infestación por hongos suele ocurrir antes de la cosecha, cuando el crecimiento de los hongos y/o la producción de micotoxinas puede tener lugar antes del almacenamiento o incluso después de la cosecha, ya sea antes del almacenamiento o en condiciones inadecuadas de almacenamiento. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha calculado que el 25 % de los productos agrícolas del mundo están contaminados con micotoxinas, lo que provoca importantes pérdidas económicas. En un estudio internacional que abarcó 8 años, se analizó un total de 19.657 muestras entre enero de 2004 y diciembre de 2011; el 72% de ellas dieron positivo en al menos una micotoxina, el 39 % fueron co-contaminadas y el 37% dieron positivo en las pruebas de ZEN (*Schatzmayr y Streit (2013) "Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: "Hechos y cifras". World Mycotoxin Journal 6(3):213-222*). La ZEN se ha encontrado en todas las regiones del mundo y en todos los tipos de cultivos de cereales y alimentación animal ensayados, como el maíz, la harina de soja, el trigo, el salvado de trigo, los DDGS (*dried distillers grains with solubles*), así como en mezclas acabadas de alimento animal con una incidencia de hasta el 100%.

[003] La ZEN se une al receptor de estrógeno y puede causar alteraciones hormonales, siendo absorbida inmediatamente después de la ingestión oral y convertida por los mamíferos en los dos metabolitos estereoisoméricos α-zearalenol (α-ZEL) y/o β-zearalenol (β-ZEL). Por ejemplo, α-ZEL pero también α-zearalanol (α-ZAL) y/o zearalanona (ZAN) tienen un efecto estrogénico mucho más fuerte que ZEN. Aunque los derivados de ZEN conjugados tienen una actividad estrogénica más baja que la de ZEN en sí misma, la ZEN puede ser liberada nuevamente de estos derivados de ZEN conjugados en el tracto digestivo y, por lo tanto, recuperar su plena actividad estrogénica.

[004] La ZEN tiene un LD50 oral de hasta 20.000 mg/kg de peso corporal, los efectos tóxicos subagudos y/o subcrónicos tales como teratogénicos, cancerígenos, estrogénicos e inmunosupresores pueden ocurrir en animales o humanos con exposición prolongada. La alimentación animal contaminados con ZEN provocan trastornos en el desarrollo de los mamíferos. Los cerdos, y en particular los lechones, son extremadamente sensibles a la ZEN. Las concentraciones de ZEN de más de 0,5 ppm en la alimentación animal provocan trastornos del desarrollo, y las concentraciones de más de 1,5 ppm pueden provocar hiperestrogenicidad en los cerdos. En el ganado vacuno, concentraciones de 12 ppm de ZEN pueden causar abortos espontáneos.

[005] Dado que la ZEN se absorbe rápidamente a través de las membranas mucosas, en particular a través de la mucosa gástrica así como la mucosa oral, la desactivación inmediata y cuantitativa es esencial. Ya a los 30 minutos después de la administración oral, la ZEN puede ser detectada en el torrente sanguíneo. Debido a los efectos nocivos de ZEN, la Unión Europea ha establecido límites máximos vinculantes para la ZEN en los productos alimenticios, así como recomendaciones sobre límites máximos para la ZEN en los productos de alimentación animal (EC No. 1881/2006).

[006] La estrategia principal para reducir la contaminación por ZEN de los alimentos y de los productos de alimentación animal consiste en restringir la proliferación de hongos, por ejemplo, manteniendo las "buenas prácticas agrícolas". Esto incluye, entre otras cosas, asegurar que las semillas estén libres de infestación de plagas y hongos o que los productos de desecho agrícola sean retirados del campo rápidamente. Además, el crecimiento de hongos en el campo puede reducirse mediante el uso de fungicidas. Después de la cosecha, el producto cosechado deberá almacenarse con un nivel de humedad residual inferior al 15 % y a baja temperatura para evitar la proliferación de hongos. Asimismo, el material contaminado por infestación fúngica deberá retirarse antes de ser procesado. A pesar de esta larga lista de medidas preventivas, incluso en regiones con los más altos estándares agrícolas

como Norteamérica y Europa Central, hasta un 37 % de las muestras de maíz analizadas se encontraron contaminadas con ZEN en los años 2004 a 2011 (*Schatzmayr y Streit* (2013)).

[007] A fin de contrarrestar los problemas y defectos descritos anteriormente, es necesario desarrollar α/β-hidrolasas adicionales capaces de detoxificar la ZEN y adecuadas para su uso como aditivo alimentario o como aditivo para alimentos o para alimentación animal o como producto alimenticio o para alimentación animal.

[008] La solución de la presente invención está descrita en la presente, ejemplificada en los ejemplos, ilustrada en las Figuras y reflejada en las reivindicaciones.

[009] La presente invención se relaciona con un método para incrementar la estabilidad de una α/β-hidrolasa, comprendiendo la α/β-hidrolasa una secuencia que corresponde a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene 58 % o más de identidad de secuencia con una secuencia que corresponde a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 (dominio CAP; 58 % de identidad presente al dominio CAP de SEQ ID NO: 1), que comprende
sustituir al menos un aminoácido
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,
en donde el aminoácido(s) está sustituido por un aminoácido, el cual tiene un índice de hidropatía más negativo que el aminoácido sustituido, donde el índice de hidropatía está determinado por el índice de hidropatía de Kyte y Doolittle,
obteniendo así una α/β-hidrolasa con estabilidad incrementada.

[0010] Además, la presente invención se relaciona con una α/β-hidrolasa obtenible por el método de la presente invención.

[0011] También se proporciona una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia superior al 58 % con una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1,
en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,

donde la α/β-hidrolasa tiene un valor gran promedio de hidropatía (GRAVY) más negativo de al menos 0,6% comparado con el valor GRAVY de una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1.

[0012] La presente invención también se relaciona con una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia que corresponde a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene más de 58 % de identidad de secuencia con una secuencia que corresponde a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1,
en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 o
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a una posición de 201 a 208 de SEQ ID NO: 6,
en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona de V→A, G→R, G→S, A→P, A→R, A→R, A→D, A→H, A→N, A→G, , S→D, P→H, M→D, M→D, G→E, I→A, I→V, H→N y Q→K y/o en donde el o los aminoácidos están sustituidos por un aminoácido seleccionado de P, R, D, H, G o N, más preferentemente el aminoácido es seleccionado de R, D, H, G o N, más preferentemente el aminoácido es seleccionado de R o N.

[0013] La presente invención también se relaciona con una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia que corresponde a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene más de 58 % de identidad de secuencia con una secuencia que corresponde a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6,
en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,
donde la α/β-hidrolasa tiene un valor GRAVY más negativo de al menos 0,6 % en comparación con el valor GRAVY de una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 6.

[0014] Además, la presente invención se relaciona con un uso de una α/β-hidrolasa de la presente invención para degradar ZEN.

[0015] Además, la presente invención se relaciona con una composición que comprende una α/β-hidrolasa de la presente invención, preferentemente la composición es un aditivo para alimentos o alimentación animal o un producto alimenticio o de alimentación animal.

[0016] También la presente se relaciona con una α/β-hidrolasa o una composición de la presente invención para uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad.

[0017] Además, la presente invención se relaciona con un kit que comprende la α/β-hidrolasa o la composición de la presente invención.

[0018] Las figuras muestran:

[0019] Fig. 1 Posiciones de los dominios CAP, dominios VI y bucles CAP. Posiciones de aminoácidos de los dominios CAP, dominios VI y bucles CAP de SEQ ID NO: 1-6.

[0020] Fig. 2A-2G Diferentes mutaciones en el dominio VI y/o en el bucle CAP y su influencia en los valores de GRAVY. **2A**: Influencia de la(s) modificación(es) en el dominio VI de SEQ ID NO: 1 en el valor GRAVY de variantes de SEQ ID NO: 1. **2B**: Influencia de la(s) modificación(es) en el dominio VI de SEQ ID NO: 1 en el valor GRAVY de los dominios CAP de variantes de SEQ ID NO: 1. **2C**: Influencia de la(s) modificación(es) en el dominio VI de SEQ ID NO: 1 en el valor GRAVY de los dominios VI de variantes de SEQ ID NO: 1. **2D**: Influencia de la(s) modificación(es) en el bucle CAP de SEQ ID NO: 1 en el valor GRAVY del bucle CAP de variantes de SEQ ID NO: 1. **2E**: Influencia de las modificaciones en el dominio VI de SEQ ID NO: 6 en el valor GRAVY de variantes de SEQ ID NO: 6. **2F**: Influencia de la(s) modificación(es) en el dominio VI de SEQ ID NO: 6 en el valor GRAVY de los dominios VI de variantes de SEQ ID NO: 6. **2G**: Influencia de la(s) modificación(es) en el dominio VI de SEQ ID NO: 6 en el valor GRAVY de los dominios VI de variantes de SEQ ID NO: 6.

[0021] Fig. **3A-3B** Incremento de la estabilidad térmica de los polipéptidos degradantes de ZEN en relación con el polipéptido SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 6 en porcentaje. **3A**: Incremento de la estabilidad térmica (T(50%)) de los polipéptidos degradantes de ZEN en relación con el polipéptido SEQ ID NO: 1 en porcentaje. **3B**: Incremento de la estabilidad térmica (T(50%)) de los polipéptidos degradantes de ZEN en relación con el polipéptido SEQ ID NO: 6 en porcentaje.

[0022] Fig. 4 Actividades de las variantes de polipéptidos degradantes de ZEN después de la incubación a pH 4,0 en comparación con las actividades después de la incubación a pH 7,5 (= estabilidad frente a pH). Actividad residual de las variantes de polipéptidos degradantes de ZEN después de la incubación a pH 4,0 en comparación con las mismas variantes de polipéptidos después de la incubación a pH 7,5 en porcentaje. La actividad residual (estabilidad frente a pH) del polipéptido parental SEQ ID NO: 1 es del 2,5 %.

[0023] Fig. 5 Parámetros seleccionados de monitoreo de la reacción en 6500 QTrap para análisis de muestras del ensayo de alimentación de cerdos. Los análisis de las muestras del ensayo de alimentación de cerdos se realizaron en un sistema UHPLC Agilent serie 1290

acoplado a un espectrómetro de masa 6500 QTrap. Se muestran los parámetros de monitoreo de reacción seleccionados. Los iones producto se dan como cuantificador/calificador.

[0024] Fig. 6 Resultados del análisis de las muestras de orina del ensayo de alimentación de cerdos comparados con SEQ ID NO: 1. Las cantidades combinadas de ZEN más α-ZEL en la muestra de orina de cada grupo se determinaron en un sistema UHPLC Agilent serie 1290 acoplado a un espectrómetro de masa de 6500 QTrap (media por grupo; n = 3). El grupo de control fue alimentado con una dieta que contenía ZEN, pero no con polipéptidos degradantes de ZEN. Los grupos SEQ ID NO: 1, Variante A y Variante B fueron alimentados con la misma dieta que el grupo de control, conteniendo adicionalmente el polipéptido degradante de ZEN indicado a una dieta de 2,5 U/kg, 5 U/kg, 10 U/kg o 20 U/kg. Los cambios en las cantidades de ZEN más α-ZEL en la orina en comparación con SEQ ID NO: 1 se muestran en porcentaje

[0025] Fig. 7 Resultados del análisis de las muestras de heces del ensayo de alimentación de cerdos comparadas con SEQ ID NO: 1. Las concentraciones combinadas de ZEN más α-ZEL por g de heces liofilizadas se determinaron en un sistema UHPLC Agilent serie 1290 acoplado a un espectrómetro de masa 6500 QTrap (media por grupo; n = 3). El grupo de control fue alimentado con una dieta que contenía ZEN, pero no con polipéptidos degradantes de ZEN. Los grupos SEQ ID NO: 1, Variante A y Variante B fueron alimentados con la misma dieta que el grupo de control, conteniendo adicionalmente el polipéptido degradante de ZEN indicado a una dieta de 2,5 U/kg, 5 U/kg, 10 U/kg o 20 U/kg. Los cambios en las concentraciones de ZEN más α-ZEL en las heces en comparación con SEQ ID NO: 1 se muestran en porcentaje.

[0026] Fig. 8 Parámetros de monitoreo de reacción seleccionados en 6500 QTrap para análisis de muestras de la prueba de alimentación de pollos de engorde. Los análisis de las muestras de la prueba de alimentación de pollos de engorde se realizaron en un sistema UHPLC Agilent serie 1290 acoplado a un espectrómetro de masas 6500 QTrap. Se muestran los parámetros de monitoreo de reacción seleccionados. Los iones producto se dan como cuantificador/calificador.

[0027] Fig. 9 Resultados del análisis de las muestras de cultivos del ensayo de alimentación de pollos de engorde comparados con SEQ ID NO: 1. Las concentraciones de ZEN por kg de muestra de cultivo liofilizada se determinaron en un sistema UHPLC Agilent serie 1290 acoplado a un espectrómetro de masas de 6500 QTrap (media por grupo; n = 8). El grupo de control fue alimentado con una dieta que contenía ZEN, pero no con polipéptidos degradantes de ZEN. Los otros grupos fueron alimentados con la misma dieta que el grupo de control, conteniendo además las cantidades indicadas de actividad enzimática del polipéptido

degradante de ZEN variante B. Los cambios en las concentraciones de ZEN en el cultivo en comparación con el grupo de control se muestran en porcentaje.

[0028] Se encontró sorprendentemente que una α/β-hidrolasa que comprende una mutación como la descrita aquí en una región específica, a saber, en el dominio VI y el bucle CAP, exhibe una estabilidad incrementada térmica y/o estabilidad frente a pH. Sin ánimo de ligarse a una teoría, se cree que el dominio VI y el bucle CAP juegan un papel importante para la actividad enzimática, por ejemplo, para la entrada del sustrato en el sitio activo de la enzima. La alta flexibilidad de esta parte de la enzima puede tener un impacto positivo en la actividad, sin embargo, esta flexibilidad también puede tener un impacto negativo en la estabilidad.

[0029] Los inventores actuales identificaron el dominio CAP de SEQ ID NO: 1 como aminoácidos desde la posición 145 a 218, de SEQ ID NO: 2 desde las posiciones 144-217, de SEQ ID NO: 3, 4 y 5 desde las posiciones 145-218 y de SEQ ID NO: 6 desde las posiciones 161-235. Además, los inventores identificaron el dominio VI de SEQ ID NO: 1 desde la posición de aminoácidos 160 a 205, de SEQ ID NO: 2 desde la posición de aminoácidos 159-204, de SEQ ID NO: 3, 4 y 5 desde la posición de aminoácidos 160-205 y de SEQ ID NO: 6 desde la posición de aminoácidos 176-222. En particular, la combinación de simulaciones dinámicas con datos de difracción de rayos X de, por ejemplo, una variante de SEQ ID NO: 1 o 6 por refinamiento de ensamblaje Phenix (https://www.phenix-online.org/; *Burnley y Gros (2012) 'phenix.ensemble_refinement: a test study of apo and holo BACE1' Computational crystallography newsletter, volume 4, pp. 51 - 58*) reflejó un bucle flexible al generar 65 estructuras. La región de SEQ ID NO: 1 definida por las posiciones de aminoácidos desde 185 a 191, aquí definida como bucle CAP, es parte de este bucle flexible (y por posiciones equivalentes en SEQ ID NO: 2-6 como se describe también en la presente).

[0030] Las mutaciones descritas en la presente introducidas en el dominio CAP, en particular en el dominio VI, tal como se define en la presente, o más concretamente en el bucle CAP tal como se define en la presente, proporcionan una estabilidad térmica suficiente sin perder las propiedades de actividad y/o la estabilidad frente a pH, de modo que dichas enzimas pueden utilizarse en procesos tecnológicos a temperaturas elevadas.

[0031] Esto es particularmente importante ya que los tratamientos térmicos como la peletización para la producción de productos higienizados con una carga microbiana disminuida se aplican comúnmente en las industrias de alimentos y alimentación animal.

[0032] La peletización de alimentación animal es un proceso particularmente extendido y estandarizado para mejorar la fluidez, reducir la formación de polvo y reducir la carga microbiana, en particular de las salmonelas. Durante el proceso de granulación, el producto

básico suele humedecerse con vapor caliente, calentarse y posteriormente prensarse a través de una matriz bajo presión. Este tratamiento térmico de las enzimas o polipéptidos a menudo tiene como resultado la reducción de sus actividades enzimáticas y/o su desnaturalización irreversible.

[0033] Además, cuando se aplican en alimentos o alimentación animal, las enzimas suelen estar sujetas a inactivación por las condiciones del tracto gastrointestinal de los animales. Particularmente los ambientes de pH bajo pueden causar una reducción temporal o permanente o incluso la eliminación de las actividades enzimáticas de las enzimas o polipéptidos.

[0034] Sin embargo, las enzimas de degradación de ZEN suelen tener una baja estabilidad térmica y/o frente a pH y, por lo tanto, no pueden mezclarse con alimentos o alimentación animal como tales. Por lo tanto, el uso de polipéptidos o enzimas como aditivos para el peletización de alimentos o alimentación animal constituye un desafío tecnológico considerable.

[0035] Las α/β-hidrolasas aquí descritas tienen una estabilidad incrementada, especialmente con respecto a la estabilidad térmica y/o el pH, y por lo tanto son muy adecuadas para su uso en procesos de producción de alimentos y alimentación animal.

[0036] Así, la presente invención se relaciona con un método para incrementar la estabilidad de una α/β-hidrolasa, comprendiendo la α/β-hidrolasa una secuencia que corresponde a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene 58 % o más de identidad de secuencia con una secuencia que corresponde a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 (dominio CAP; 58 % de identidad presente al dominio CAP de SEQ ID NO: 1), comprendiendo

sustituir al menos un aminoácido

- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,

en donde el o los aminoácidos son sustituidos por un aminoácido que tiene un índice de hidropatía más negativo que el aminoácido sustituido,

donde el índice de hidropatía es determinado por el índice de hidropatía de Kyte y Doolittle, obteniendo así una α/β-hidrolasa con estabilidad incrementada, preferiblemente la α/β-hidrolasa tiene una estabilidad incrementada en comparación con la α/β-hidrolasa antes de

sustituir dicho(s) aminoácido(s) y/o tiene una estabilidad incrementada en comparación con la α/β-hidrolasa que no comprende dicha(s) sustitución(es) de aminoácidos.

[0037] La presente invención también se relaciona con un método para incrementar la estabilidad de una α/β-hidrolasa, comprendiendo la α/β-hidrolasa una secuencia que corresponde a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene 58 % o más de identidad de secuencia con una secuencia que corresponde a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 (dominio CAP; 58 % de identidad presente al dominio CAP de SEQ ID NO: 6), comprendiendo

sustituir al menos un aminoácido

- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,

en donde el o los aminoácidos son sustituidos por un aminoácido que tiene un índice de hidropatía más negativo que el aminoácido sustituido,

donde el índice de hidropatía es determinado por el índice de hidropatía de Kyte y Doolittle,

obteniendo así una α/β-hidrolasa con estabilidad incrementada, preferiblemente la α/β-hidrolasa tiene una estabilidad incrementada en comparación con la α/β-hidrolasa antes de sustituir dichos aminoácidos y/o tiene una estabilidad incrementada en comparación con la α/β-hidrolasa que no comprende dicha(s) sustitución(es) de aminoácidos.

[0038] Una estabilidad incrementada como se utiliza en la presente puede significar que una α/β-hidrolasa de la presente invención tiene una estabilidad más alta que una α/β-hidrolasa que comprende una secuencia que corresponde a posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 (así como a 3, 4, 5). Alternativamente o adicionalmente, una estabilidad incrementada como se utiliza en la presente significa que una α/β-hidrolasa de la presente invención tiene una estabilidad más alta que una α/β-hidrolasa que comprende una secuencia que corresponde a posiciones y/o comprende una secuencia que corresponde a posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2. Alternativamente o adicionalmente, una α/β-hidrolasa comprende una secuencia que corresponde a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6.

[0039] Una estabilidad incrementada como se utiliza en la presente también puede significar que una α/β-hidrolasa de la presente invención tiene una estabilidad más alta que una α/β-hidrolasa de SEQ ID NO: 1. Alternativamente o adicionalmente, una estabilidad incrementada como se utiliza en la presente también puede significar que una α/β-hidrolasa de la presente invención tiene una estabilidad más alta que una α/β-hidrolasa de SEQ ID NO: 2.

Alternativamente o adicionalmente, una estabilidad incrementada como se utiliza en la presente también puede significar que una α/β-hidrolasa de la presente invención tiene una estabilidad más alta que una α/β-hidrolasa de SEQ ID NO: 6.

[0040] Esto incluye que la α/β-hidrolasa con estabilidad incrementada, por ejemplo, obtenida por los métodos de la presente invención o una α/β-hidrolasa de la invención tiene una estabilidad incrementada en comparación con una α/β-hidrolasa que no comprende la(s) sustitución(es) como se describe en la presente. De manera similar, la α/β-hidrolasa con estabilidad incrementada, por ejemplo, obtenida por los métodos de la presente invención o una α/β-hidrolasa de la invención tiene una estabilidad incrementada en comparación con la α/β-hidrolasa antes de la sustitución del o de los aminoácido(s) como se describe en la presente.

[0041] La persona con conocimientos en la materia conoce diversas α/β-hidrolasas, que se describen, entre otros, en *Lenfant et al. (2013) 'ESTHER, the database of the α/β-hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions' Nucleic Acids Research, Volume 41, Issue D1, D423-D429 y Mindrebo et al. (2016) 'Unveiling the functional diversity of the Alpha-Beta hydrolase fold in plants' Curric Opin Struct Biol. 233-246*. En resumen, todas las α/β-hidrolasas comparten la característica de un pliegue específico llamado *α/β-fold* (pliegue alfa/beta). El pliegue de la α/β-hidrolasa es común a un número de enzimas hidrolíticas de orígenes filogenéticos y funciones catalíticas muy diferentes. El núcleo de cada enzima es una α/β-estructura (en lugar de un barril), que contiene 8 β-hebras (b1-b8) conectadas por α-helices *(aA-aF) (Ollis et al. (1992) `The alpha/beta α/β-hydrolase fold' Protein Eng. 5(3):197-211)*. Por lo tanto, una α/β-hidrolasa como se describe en la presente puede comprender un *α/β-fold*. Una α/β-hidrolasa como se describe en la presente preferentemente comprende el dominio de núcleo de α/β-hidrolasa que consiste en 8 β-hebras (b1-b8) arregladas respecto de una β-lámina y además comprende 6 α-hélices entrecruzadas o *crossover* (aA - aF).

[0042] En la mayoría de los miembros de la familia, las β-hebras están en orientación paralela, pero algunas tienen una inversión de las primeras hebras, lo que resulta en una orientación antiparalela. El prototipo de enzimas en el pliegue tiene una tríada catalítica compuesta por un residuo nucleófilo situado en la parte superior de un γ-giro entre la quinta β-hebra y la siguiente α-hélice (el codo nucleófilo), un residuo de aminoácido ácido (ácido glutámico o ácido aspártico) y un residuo de histidina. Algunos otros miembros carecen de uno o de todos los residuos catalíticos. Por lo tanto, algunos miembros están inactivos; otros

están involucrados en el reconocimiento de superficies. Una α/β-hidrolasa como se describe en la presente preferentemente comprende la triada catalítica.

[0043] Los miembros de diferentes clases de α/β-hidrolasas, así como sus características estructurales, se describen, entre otros, en *Kourist et al. (2010) 'The alpha/betaα/β-hidrolasafold 3DM database (ABHDB) as a tool for protein engineering. Chembiochem. 11(12):1635-43)*.

[0044] Como enzimas, las α/β-hidrolasas se describen a menudo como responsables de la hidrólisis de los enlaces ésteres y peptídicos. Sin embargo, las α/β-hidrolasas también participan en la ruptura de los enlaces carbono-carbono, en las reacciones de descarboxilación y en la dioxigenación independiente de los cofactores de los anillos heteroaromáticos. Por lo tanto, las α/β-hidrolasas pueden comprender miembros catalíticos (enzimas) en esta superfamilia. Ejemplos no limitantes son las hidrolasas (acetilcolinesterasa, carboxilesterasa, dienelactona hidrolasa, lipasa, cutinasa, tioesterasa, serina carboxipeptidasa, prolina iminopeptidasa, prolina oligopeptidasa, epoxihidrolasa) junto con enzimas que requieren la activación de HCN, H_2O_2 u O_2 en lugar de H_2O para el mecanismo de reacción (haloalcalcano deshalogenasa, haloperoxidasa, hidroxinitrilo liasa). Los miembros no catalíticos pueden comprender las neuroliginas, glutactina, neurotactina, el dominio C-terminal de la tiroglobulina, las proteínas de la yema de huevo, el factor B de interacción CCG1 y la dipeptidilaminopeptidasa VI.

[0045] La base de datos ESTHER recoge y anota la información publicada relacionada con las secuencias de genes y proteínas de esta superfamilia. Así, la persona con conocimientos en la materia también puede obtener α/β-hidrolasas de ESTHER (=index), una base de datos de los pliegues de la superfamilia de proteínas α/β-hidrolasa.

[0046] La persona con conocimientos en la materia puede también determinar si una α/β-hidrolasa comprende un dominio CAP. Una forma de hacerlo se describe en los ejemplos o como se describe a continuación:

1. Búsqueda una α/β-hidrolasa dentro de una base de datos de enzimas en línea o comparando una secuencia dada con SEQ ID NO: 1-6.

2. Determinación de si la α/β-hidrolasa contiene un dominio CAP, un dominio VI o un bucle CAP, preferiblemente utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

3. Determinación de si la α/β-hidrolasa que contiene un dominio CAP, un dominio VI o un bucle CAP es capaz de hidrolizar ZEN, preferiblemente utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 4.

[0047] Una α/β-hidrolasa, tal como se utiliza en la presente, comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene un 58 % o más de identidad de secuencia, y una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 (dominio CAP). Así, cualquier α/β-hidrolasa que comprende esta secuencia es abarcada por el término α/β-hidrolasa. Esta secuencia corresponde al dominio CAP de la α/β-hidrolasa de SEQ ID NO: 1.

[0048] Además o alternativamente, una α/β-hidrolasa como la utilizada en la presente también puede comprender una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 217 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2 (dominio CAP). Así, cualquier α/β-hidrolasa que comprende esta secuencia es abarcada por el término α/β-hidrolasa. Esta secuencia corresponde al dominio CAP de la α/β-hidrolasa de SEQ ID NO: 2.

[0049] Además, o alternativamente, una α/β-hidrolasa como la utilizada en la presente también puede comprender una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más, a una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5 (dominio CAP). Así, cualquier α/β-hidrolasa que comprende esta secuencia es abarcada por el término α/β-hidrolasa. Esta secuencia corresponde al dominio CAP de la α/β-hidrolasa de SEQ ID NO: 3, 4 o 5.

[0050] Además o alternativamente, una α/β-hidrolasa como la utilizada en la presente también puede comprender una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 (dominio CAP). Así, cualquier α/β-hidrolasa que comprende esta secuencia es abarcada por el término α/β-hidrolasa. Esta secuencia corresponde al dominio CAP de la α/β-hidrolasa de SEQ ID NO: 6.

[0051] Por ejemplo, la α/β-hidrolasa puede comprender una secuencia que tiene al menos un 58 %, un 59 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 1. Además o alternativamente, la α/β-hidrolasa puede comprender una secuencia que tiene al menos un 58 %, 59 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % y 99 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 2. Además o alternativamente, la α/β-hidrolasa puede comprender una secuencia que tiene al menos un 58 %, 59 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % y 99 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 3, 4 y/o 5. Además o alternativamente, la α/β-hidrolasa puede comprender una secuencia

que tiene al menos un 58 %, 59 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % y 99 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 6.

[0052] El término "polipéptido" cuando se utiliza en la presente significa un péptido, una proteína o un polipéptido, que se utiliza intercambiablemente y que abarca cadenas de aminoácidos de una longitud determinada, en las que los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes. También se encuentran abarcados por la invención aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos proteinogénicos del código genético estándar conocidos para una persona con conocimientos en la materia, como selenocisteína. Tales polipéptidos incluyen cualquiera de SEQ ID. NOs 1-6.

[0053] El término polipéptido también se refiere a, y no excluye, modificaciones del polipéptido. Las modificaciones incluyen glicosilación, acetilación, acilación, fosforilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un grupo hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces de disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formulación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN transferido de aminoácidos a proteínas como la arginilación, y ubiquitinación; véase, por ejemplo, *PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York (1983), pgs. 1-12; Seifter, Meth. Enzymol. 182 (1990); 626-646, Rattan, Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992); 48-62*.

[0054] De acuerdo con la presente invención, el término "idéntico" o "identidad porcentual" en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos tales como SEQ ID NO: 1-6 se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales, o que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad), cuando se comparan y alinean para la correspondencia máxima en una ventana de comparación, o en una región designada, medida mediante un algoritmo de comparación de secuencias, tal como se conoce en la técnica, o mediante alineación manual e inspección visual. Las secuencias que tengan, por ejemplo, una identidad de secuencia del 80 % al 95 % o superior se consideran sustancialmente idénticas. Esta definición se aplica también al complemento de una secuencia de ensayo. Aquellos que

tengan habilidad en el arte sabrán cómo determinar el porcentaje de identidad entre secuencias utilizando, por ejemplo, algoritmos como los basados en el programa informático CLUSTALW (*Thompson Nucl. Acis Res. 2 (1994), 4673-4680*) o FASTDB (*Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245*), tal como se conoce en la técnica.

[0055] También están disponibles para aquellos que tienen conocimientos en la materia los algoritmos BLAST y BLAST 2.6 (*Altschul Nucl. Acids Res. 25 (1977), 3389-3402*). El programa BLASTP para secuencias de aminoácidos utiliza por defecto un tamaño de palabra (W) de 6, un umbral esperado de 10 y una comparación de ambas cadenas. Además, puede utilizarse la matriz de puntuación BLOSUM62 (*Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 89, (1989), 10915; Henikoff y Henikoff (1992) 'Amino acid substitution matrices from protein blocks'. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1992 Nov 15;89(22):10915-9*).

[0056] Por ejemplo, BLAST2.6, que significa *Basic Local Alignment Search Tool (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410*), puede utilizarse para buscar alineaciones de secuencias locales.

[0057] Un "dominio CAP", tal como se utiliza en la presente, se refiere al dominio CAP de α/β-hidrolasas, que se describe, por ejemplo, en la Fig. 1 de *Kourist et al. (2010)* '*The alpha/beta-hydrolase fold 3DM database (ABHDB) as a tool for protein engineering*'. Chembiochem. 11(12):1635-43, o en *Carr y Ollis (2009) "α/β-hydrolase Fold: An Update", Protein & Peptide Letters, 2009, 16(10):1137-1148*. También se prevé que un dominio CAP puede estar situado dentro de la excursión entre una β-lámina y una α-hélice, por ejemplo, entre b6 y aD de la α/β-hidrolasa, por ejemplo, como se describe en *Ollis et al. (1992) 'The alpha/beta hydrolase fold' Protein Eng. 5(3):197-211*. Por ejemplo, un dominio CAP puede comenzar poco después del extremo C-terminal de la β-lámina b6 del dominio de núcleo de la α/β-hidrolasa, y puede extenderse hasta el comienzo N-terminal de la α-hélice aD del dominio núcleo de la α/β-hidrolasa. Se prevé que un dominio CAP puede comprender por α-hélices. Sin embargo, el dominio CAP también puede comprender β-láminas u otras estructuras de proteínas.

[0058] El método de la presente invención requiere sustituir al menos un aminoácido

- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6 de la α/β-hidrolasa. Estas posiciones se encuentran dentro de un dominio VI.

[0059] Tal y como se utiliza en la presente, el `Dominio VI' forma parte del dominio CAP. Por lo tanto, el dominio CAP comprende el dominio VI. Este dominio VI puede comenzar con el primer aminoácido después del motivo QXAGP (SEQ ID NO: 7) presente en el dominio CAP y puede abarcar hasta el último aminoácido antes del motivo EYDPE (SEQ ID NO: 8), mientras que el motivo EYDPE no forma parte del dominio VI. Estos motivos están subrayados en las secuencias representadas en la Tabla 2.

[0060] Por ejemplo, el dominio VI puede comprender una secuencia que corresponde a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 58 %, 59 %, 60 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una secuencia que corresponde a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1. Además o alternativamente, el dominio VI puede comprender una secuencia que corresponde a las posiciones 159 a 204 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 58 %, 59 %, 60 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una secuencia que corresponde a las posiciones 159 a 204 de SEQ ID NO: 2. Además o alternativamente, el dominio VI puede comprender una secuencia que corresponde a las posiciones 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 y/o 5 o una secuencia que tiene al menos un 58 %, 59 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una secuencia que corresponde a las posiciones 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 y/o 5. Además o alternativamente, el dominio VI puede comprender una secuencia que corresponde a las posiciones 176 a 222 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene al menos un 58 %, 59 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una secuencia que corresponde a las posiciones 176 a 222 de SEQ ID NO: 6.

[0061] El término "posición" cuando se usa de acuerdo con la presente invención significa la posición de un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en la presente. El término "correspondiente", tal como se utiliza en la presente, también incluye que una posición no sólo se determina por el número de aminoácidos precedentes. La posición de un aminoácido dado de acuerdo con la presente invención, el cual puede ser sustituido, puede variar debido a deleciones o aminoácidos adicionales o puede ser sustituido, puede variar debido a deleción o adición de aminoácidos en otra parte en una α/β-hidrolasa (mutante o de tipo salvaje).

[0062] Así, por "posición correspondiente" de acuerdo con la presente invención debe preferiblemente entenderse que los aminoácidos pueden diferir en el número indicado pero de todos modos pueden tener aminoácidos vecinos similares. Dichos aminoácidos que pueden intercambiarse, delecionarse o añadirse también están comprendidos en el término

"posición correspondiente". Específicamente, la persona con conocimientos en la materia puede, al alinear la secuencia de referencia (“secuencia sujeto” o *subject sequence*), por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID No: 1-6, preferiblemente SEQ ID NO: 1, con una secuencia de aminoácidos de interés (“secuencia de consulta” o *query sequence*), por ejemplo, inspeccionar una secuencia de interés para la secuencia de SEQ ID NO: 1 (o la secuencia de aminoácidos correspondiente que codifica esta proteína) al buscar la posición de aminoácidos tal como se especifica en la presente (es decir, una posición que corresponde a la posición 185 y/o a la posición 188 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID No: 1).

[0063] En el método de la presente invención los aminoácidos son sustituidos por un aminoácido que tiene un índice de hidropatía más negativo que el aminoácido sustituido, donde el índice de hidropatía es determinado por el índice de hidropatía de Kyte y Doolittle.

[0064] Como se describe en la presente, por "sustitución de aminoácidos" se entiende la sustitución de un aminoácido en relación con la posición correspondiente de un SEQ ID NO identificado, por ejemplo, cualquiera de las posiciones de SEQ ID NO indicadas en la presente: 1-6. Por ejemplo, en una forma de realización el reemplazo es una sustitución de aminoácidos de un aminoácido en relación a una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1.

[0065] El 'índice de hidropatía', también conocido como 'valor de hidropatía', es un número que representa las propiedades hidrófobas o hidrofílicas de la cadena lateral de un aminoácido. En particular, con el índice de hidropatía se ha asignado a cada aminoácido un valor que refleja su hidropatía relativa. Así, la hidropatía de un aminoácido puede ser determinada por el índice de hidropatía. Este índice de hidropatía de un aminoácido fue propuesto por *Jack Kyte y Russell F. Doolittle (Kyte y Doolittle (1983) "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein" J. Mol. Biol. 157 (1): 105-32)*. Los aminoácidos con menor índice de hidropatía son la isoleucina (4,5) y la valina (4,2). Según Kyte y Doolittle, los aminoácidos con el índice de hidropatía más negativo son la arginina (-4,5) y la lisina (-3,9). El índice de hidropatía se considera importante en la estructura de la proteína. Los aminoácidos con un índice de hidropatía menos negativo tienden a ser internos (con respecto a la forma tridimensional de la proteína) mientras que los aminoácidos con un índice de hidropatía más negativo se encuentran más comúnmente en la superficie de la proteína. El índice de hidropatía de Kyte y Doolittle se ha resumido en la presente Tabla 1:

Tabla 1:

aa	aa	Índice de hidropatía (Kyte-Doolittle)
R	Arginina	-4,50
K	Lisina	-3,90
N	Asparagina	-3,50
Q	Glutamina	-3,50
D	Ácido aspártico	-3,50
E	Ácido glutámico	-3,50
H	Histidina	-3,20
P	Prolina	-1,60
Y	Tirosina	-1,30
W	Triptofano	-0,90
S	Serina	-0,80
T	Treonina	-0,60
G	Glicina	-0,40
A	Alanina	1,80
M	Metionina	1,90
C	Cisteína	2,50
F	Fenilalanina	2,80
L	Leucina	3,80
V	Valina	4,20
I	Isoleucina	4,50

Tabla 1: Índice de hidropatía de Kyte y Doolittle

[0066] Además, se prevé que al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más aminoácidos sean sustituidos.

[0067] El método también prevé sustituir al menos un aminoácido

- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1, y/o
- en una posición correspondiente a la posición 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 y/o
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5 y/o
- en una posición correspondiente a la posición 201 a 208 de SEQ ID NO: 6.

Todas estas posiciones se encuentran dentro del bucle CAP.

[0068] En este contexto, cabe señalar que el dominio CAP y el dominio VI pueden comprender además un bucle (secuencia/dominio). Este "bucle", también denominado en la presente "bucle CAP", puede comenzar después del primer aminoácido después del motivo G(F/Y)XXAA (SEQ ID NO: 9) presente en el dominio VI y puede extenderse hasta el último aminoácido antes del motivo ARXF (SEQ ID NO: 10) (o el motivo QLFP (SEQ ID NO: 11) para SEQ ID NO: 6), mientras que el motivo ARXF (o el motivo QLFP para SEQ ID NO: 6) no forma parte del bucle CAP. Todos estos motivos han sido subrayados en la Tabla 2 a continuación.

[0069] Por ejemplo, el bucle CAP puede comprender una secuencia que corresponde a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 58 %, un 59 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad con una secuencia que corresponde a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1. Además o alternativamente, el bucle CAP puede comprender una secuencia que corresponde a las posiciones 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos un 58 %, 59 %, 60 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una secuencia que corresponde a las posiciones 184 a 190 de SEQ ID NO: 2. Además o alternativamente, el bucle CAP puede comprender una secuencia que corresponde a las posiciones 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 y/o 5 o una secuencia que tiene al menos un 58 %, 59 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % y 99 % de identidad con una secuencia que corresponde a las posiciones 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 y/o 5. Además o alternativamente, el bucle CAP puede comprender una secuencia que corresponde a las posiciones 201 a 208 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene al menos un 58 %, 59 %, 60 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una secuencia que corresponde a las posiciones 201 a 208 de SEQ ID NO: 6.

[0070] Así las α/β-hidrolasas como se describen en la presente pueden comprender un Dominio VI y/o un bucle CAP como se describe en la presente.

[0071] También se contempla que los aminoácidos sean sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, K, N, Q, D, E, H, P, Y, W, S, T, G, A, M, C, F, L o V.

[0072] Además, se prevé que los aminoácidos sean sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, K, N, Q, D, E, H, P, Y, W, S, T o G.

[0073] También se contempla que los aminoácidos sean sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, K, N, Q, D, E, H o P.

[0074] Además, se prevé que los aminoácidos sean sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, K, D, Q, D, D, N, E, P, G, T, S o H.

[0075] También se contempla que los aminoácidos sean sustituidos por un aminoácido seleccionado de S, P, R, D, H, G o N. Los aminoácidos también pueden ser sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, D, H, G o N.

[0076] También se contempla que los aminoácidos sean sustituidos por un aminoácido seleccionado de P, S, R o H. Los aminoácidos también pueden ser sustituidos por un aminoácido seleccionado de R o N.

[0077] Además, se prevé que la sustitución de aminoácidos se seleccione de una o más de V→A, G→R, G→S, A→P, I→V, A→R, A→D, A→H, A→N, G→E, A→G, S→D, P→H, M→D, M→D, G→E, I→A, F→Y, H→N, Q→K, V→C y/o V→C.

[0078] La sustitución de aminoácidos también puede seleccionarse de uno o más de los siguientes productos: V160A, G185R, G185S, A186P, A186R, A188D, A188H, A188N, A188G, A188R, S189D, P190H, M191D, G199E, I200A, I200V, H203N, Q205K, F183Y y/o V197C.

[0079] También se prevé que la sustitución de aminoácidos se seleccione de una o más de V→A, G→R, G→S, A→P, A→R, A→R, A→D, A→H, A→N, G→E, A→G, S→D, P→H, M→D, M→D, I→A, I→V, I→V, H→N y/o Q→K. La sustitución de aminoácidos también puede seleccionarse de uno o más de los siguientes productos: V160A, G185R, G185S, A186P, A186R, A188D, A188H, A188N, A188G, A188R, S189D, P190H, M191D, G199E, I200A, I200V, H203N y/o Q205K.

[0080] La sustitución de aminoácidos también se puede seleccionar de G185R, A186R, A188R, A188D, A188H, A188N y/o M191D.

[0081] Además, se prevé que los aminoácidos sean sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, D, H, G, N o P.

[0082] También está contemplado que el método de la invención comprende sustituir al menos un aminoácido

- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1, y/o
- en una posición correspondiente a la posición 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 y/o
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5 y/o
- en una posición correspondiente a la posición 201 a 208 de SEQ ID NO: 6.

y en la que el aminoácido o aminoácidos se sustituyen por un aminoácido seleccionado de R, D, H, G, N o P.

[0083] La presente invención se relaciona con un método para incrementar la estabilidad de una α/β-hidrolasa. El incremento de la estabilidad puede ser una disminución del valor

GRAVY, un incremento de la estabilidad frente a pH y/o un incremento de la estabilidad térmica.

[0084] Tal como se utiliza aquí, el "valor GRAVY" de una proteína es una medida de su hidrofobia o hidrofilia relativa. Las dos medidas se combinan en una escala de hidropatía o índice de hidropatía. De acuerdo con Kyte y Doolittle (*Kyte J, Doolittle RF (May 1983). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein". J. Mol. Biol. 157 (1): 105–32)*, el valor GRAVY se calcula sumando el valor de hidropatía (índice de hidropatía, véase la tabla 1 anterior) para cada residuo y dividiéndolo por el número de residuos de la secuencia. Así, el valor de GRAVY puede calcularse sumando los valores de hidropatía (índices) de todos los aminoácidos divididos por el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (de acuerdo con el cálculo de Kyte y Doolittle). Tal como se utiliza en la presente, el término "estabilidad térmica" se refiere a la propiedad de las enzimas de mantener sus actividades catalíticas después de una exposición temporal a temperaturas elevadas. La estabilidad térmica se determina midiendo y comparando la actividad enzimática de una solución de enzimas o polipéptidos antes y después de un tratamiento térmico de 10 minutos o sin tratamiento térmico en condiciones idénticas y definidas.

[0085] En particular, la estabilidad térmica puede medirse de la siguiente manera. Los polipéptidos se diluyen con buffer de muestra (buffer de Teorell Stenhagen a pH 7,5 (*Stenhagen & Teorell. (1938) Nature 141, 415*), que contiene 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino) a una concentración de 0,001526923 U/ml y se mantiene en hielo hasta su uso posterior. Cuarenta alícuotas de 50 µl de solución de polipéptido diluido se transfieren a los tubos de cuatro tiras de 12 tubos (por ejemplo, de starlab), omitiendo el primero y el último tubo de cada tira. Las tiras se sellan con tapas de 12 tiras (por ejemplo de Starlab). Como controles positivos, se transfieren cuatro alícuotas de 50 µl de solución enzimática diluida a cuatro tubos de PCR. Todos los tubos y tiras de PCR se mantienen en hielo hasta que se inicia el paso de incubación de la temperatura. Como controles negativos, se transfieren cuatro alícuotas de 50 µl de buffer de muestra a cuatro tubos de PCR. Estos tubos se almacenan a 25 °C.

[0086] Las cuatro tiras de 12 tubos se incuban en un ciclador PCR precalentado con función de gradiente (por ejemplo, el gradiente del Mastercycler de Eppendorf) a una temperatura seleccionada de +/- 10 °C. El gradiente de temperatura (+/- 10 °C de la temperatura seleccionada) a lo largo del bloque térmico del ciclador PCR es calculado automáticamente por el ciclador PCR. Los tubos de PCR que contienen los controles positivos son incubados en hielo y los que contienen los controles negativos se incuban a 25 °C. Después de 0, 5, 10

y 20 minutos, se transfieren una tira de PCR y un tubo de control negativo para ser mantenidos en hielo hasta el final de la incubación, es decir, 20 minutos después del inicio de la incubación. Después de que todos los pasos de incubación hayan terminado y todas las tiras y tubos estén en hielo, se inician los ensayos de degradación de ZEN.

[0087] Se prepara el buffer del ensayo de degradación de ZEN (buffer Teorell Stenhagen, pH 7,5 que contiene 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino y 5,3 ppm de ZEN) y se transfieren 660 µl de alícuotas del buffer del ensayo a 48 tubos de reacción. Los tubos se sellan y se mantienen a 25 °C hasta el inicio de los ensayos de degradación de ZEN. Para los ensayos de degradación, 40 µl de cada una de las 40 muestras tratadas con temperatura de las tiras de PCR, 40 µl de cada uno de los cuatro controles negativos y 40 µl de cada uno de los cuatro controles positivos se añaden a los tubos que contienen el buffer del ensayo de 660 µl, alcanzando así una concentración final de ZEN de 5 ppm en la reacción del ensayo. Además, se consigue una concentración final de los polipéptidos para degradar la ZEN eficientemente (es decir, una degradación del 90 % - 100 % de ZEN) dentro de las tres horas.

[0088] Añadiendo muestras tratadas con temperatura o controles positivos o negativos al buffer del ensayo, se inicia el ensayo de degradación. La reacción de degradación de ZEN se incuba en un baño de agua precalentado a 37 °C. Inmediatamente después de iniciar una reacción de degradación, se mezcla en vórtex durante unos 2 segundos y se transfiere una muestra de 0 h de 100 µl a un nuevo tubo de reacción. Se extraen muestras adicionales de la reacción del ensayo de degradación de ZEN después de 0,5, 1,0, 2,0 y 3,0 horas. Tan pronto como se toma una muestra de la reacción de degradación, la enzima de esta muestra se inactiva por calor mediante incubación durante 10 minutos a 99 °C. A continuación, se centrifuga el tubo (2 minutos, 25 °C, 14674 xg) y se transfieren 90 µl del sobrenadante a un vial de HPLC con inserto. Estas ampollas HPLC se almacenan a 4 °C hasta la medición HPLC-DAD, tal como se describe en el ejemplo 4.

[0089] Utilizando la disminución lineal de la concentración de ZEN determinada por el análisis HPLC-DAD de las muestras de degradación de ZEN, las actividades enzimáticas se calculan en unidades por litro (U/l). Una unidad se define como la cantidad de actividad enzimática que degrada un µmol de ZEN en un minuto en las condiciones descritas. Las actividades residuales después de la incubación a diferentes temperaturas durante 0, 5, 10 y 20 minutos se calculan de la siguiente manera: Actividad enzimática en una muestra tratada con temperatura dividida por el promedio de las actividades enzimáticas de los controles positivos, multiplicada por 100.

[0090] La estabilidad térmica (T(50%)) se define como la temperatura a la que los polipéptidos tienen una actividad residual del 50% después de 10 minutos de incubación en comparación con el control positivo. El siguiente ejemplo sirve para ilustrar: La enzima parental tiene una actividad enzimática de 50 U/ml después de una incubación de 10 minutos en hielo y una actividad de 25 U/ml después de una incubación de 10 minutos a 59,3 °C, por lo que el valor T(50%) es de 59,3 °C. Si una variante de enzima tiene un valor T(50%) de 61,0 °C, el incremento relativo de la estabilidad térmica (T(50%)) en comparación con la enzima parental es del 2,9%. Esto resulta de la diferencia entre los dos valores de T(50%) de 1,7 °C, dividido por el valor de T(50%) de la enzima parental de 59,3 °C, multiplicado por 100.

[0091] La estabilidad térmica utilizada en la presente es, por lo tanto, una medida de la resistencia de una actividad enzimática a la inactivación en caso de exposición temporal a temperaturas seleccionadas de un rango de entre 20 °C y 85 °C. La temperatura a la que la actividad residual de la enzima tratada térmicamente después de 10 minutos de incubación es del 50 % puede compararse con el control positivo. El Incremento en T(50%) de una variante de polipéptido en relación con su polipéptido parental se define aquí como una estabilidad térmica incrementada y puede indicarse relativamente como un valor porcentual o absolutamente en grados Celsius.

[0092] El término "estabilidad frente a pH", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la propiedad de los polipéptidos de mantener sus actividades catalíticas después de la incubación temporal a un determinado pH y, por tanto, se refleja en la actividad residual del polipéptido después de la incubación temporal a un determinado pH. La actividad residual después de la incubación a un determinado pH se determina comparando la actividad enzimática de degradación de ZEN de una solución de polipéptido después de una incubación de 60 minutos en buffers de diferente pH con la actividad enzimática en una solución del mismo polipéptido después de una incubación de 60 minutos en un buffer de pH 7,5. La estabilidad frente a pH es una medida de la resistencia de las enzimas a la exposición temporal a ambientes de un determinado pH. Un incremento en la estabilidad frente a pH se define como el incremento de la actividad residual después de la incubación a un pH de 4,0 (= tratamiento de pH) de una variante de polipéptido en comparación con la actividad residual después de la incubación a un pH de 4,0 de una variante de enzima parental.

[0093] La estabilidad frente a pH puede medirse de la siguiente manera. Los polipéptidos degradantes ZEN se incuban durante una hora en soluciones buffer de diferentes valores de pH. Las alícuotas que contienen una variante del polipéptido se transfieren a ocho tubos de muestra que contienen buffers de incubación de ocho valores de pH diferentes. El buffer de

incubación es el buffer medio del *Fed State Simulated Gastric Fluid* sin leche y semi-concentrado *(Jantratid et al. (2008) 'Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update.') Pharm Res. 2008 Jul;25(7):1663-76))*. Los valores de pH del buffer de incubación en los ocho tubos de muestra se ajustan a 3,5, 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0 y 6,0. Una alícuota de la variante del polipéptido también se transfiere a un tubo que contiene buffer de muestra (buffer de Teorell Stenhagen, pH 7,5, que contiene 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino) como control positivo. Como control negativo, se incuban 100 µl de buffer de muestra a 37 °C en un baño de agua precalentado durante una hora. Después de la incubación, se comprueba la capacidad de las muestras para degradar ZEN en la solución buffer del ensayo de forma análoga a la descrita en la presente o a la descrita en los ejemplos (por ejemplo, en el Ejemplo 4). La adición del buffer de ensayo de degradación de ZEN garantiza un valor pH constante de 7,5 en todas las muestras. Se toman muestras a lo largo de la reacción del ensayo de degradación de ZEN y se analizan las concentraciones de ZEN, zearalenona hidrolizada (HZEN) y zearalenona hidrolizada descarboxilada (DHZEN) utilizando la medición HPLC-DAD tal como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 4. Las actividades se calculan, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 4.

[0094] Un incremento en la estabilidad frente a pH se define como un incremento de la actividad residual de una solución de polipéptido después de la incubación a un pH de 4,0 en comparación con la actividad residual de una solución de enzima parental no mutada después del mismo tratamiento. La actividad residual se define mediante la comparación de la actividad de la solución de polipéptido tratada con pH con la actividad de la misma solución de variante de polipéptido después de la incubación a pH 7,5. La actividad residual se calcula como se indica a continuación: Actividad enzimática de la muestra tratada con pH dividida por la actividad enzimática de un control incubado a pH 7,5, multiplicada por 100. El siguiente ejemplo sirve para ilustrar: Si la actividad enzimática de la muestra de polipéptido después de la incubación a pH 4,0 es de 0,5 U/l y la actividad enzimática del polipéptido después de la incubación a pH 7,5 es de 2,7 U/l, la actividad residual es de 18,5 %. Si la actividad residual del polipéptido parental de SEQ ID NO: 1 después de la incubación a pH 4,0 se mide en un 2,5 %, el incremento de la estabilidad frente a pH de la variante del polipéptido en comparación con el polipéptido parental es de 7,4 veces.

[0095] La presente invención también se relaciona con una α/β-hidrolasa obtenible por el método descrito en la presente.

[0096] La presente invención también se relaciona con una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia que corresponde a las posiciones 145

a 218 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene más de 58 % de identidad de secuencia con una secuencia que corresponde a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1,
en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,
en la donde la α/β-hidrolasa tiene un valor GRAVY más negativo de al menos 0,6 % en comparación con el valor GRAVY de una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1.

[0097] La presente invención también se relaciona con una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia que corresponde las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene más de 58 % de identidad de secuencia con una secuencia que corresponde a posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6,
en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,
donde la α/β-hidrolasa tiene un valor GRAVY más negativo de al menos 0,6 % en comparación con el valor GRAVY de una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 6.

[0098] También se contempla que la α/β-hidrolasa tiene un valor GRAVY más bajo de al menos 3,0 %, 4,2 %, 4,8 %, 6,0 %, 6,6 %, 7,8 %, 10,2 %, 12,0 % o más comparado con el valor GRAVY de una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1.

[0099] También se contempla que la α/β-hidrolasa tiene un valor GRAVY más bajo de al menos 1,0 %, 2,0 %, 2,5 %, 2,6 %, 3,0 %, 4,0 %, 5,0 %, 6,0 %, 6,8 % o más comparado con el valor GRAVY de una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 6.

[00100] La presente invención también se relaciona con una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia que corresponde a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene más de 58 % de identidad de secuencia con una secuencia que corresponde a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1,
en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos

- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 o
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a una posición de 201 a 208 de SEQ ID NO: 6,

donde la sustitución de aminoácidos se selecciona de V→A, G→R, G→S, A→P, A→R, A→D, A→H, A→N, A→G, S→D, P→H, M→D, M→D, G→E, I→A, I→V, H→N y Q→K y/o en donde el aminoácido(s) está sustituido por un aminoácido seleccionado de P, R, D, H, G o N, preferentemente el aminoácido está seleccionado de R, D, H, G o N, más preferentemente el aminoácido está seleccionado de R o N. Dichas α/β-hidrolasas pueden tener una estabilidad más alta que la misma α/β-hidrolasa no que tiene esta sustitución(s) o antes de introducir estas sustituciones(s). Por ejemplo, una α/β-hidrolasa de este tipo puede tener una estabilidad incrementada en comparación con una α/β-hidrolasa de SEQ ID NO: 1.

[00101] La presente invención también se relaciona con una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia que corresponde a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene más de 58 % de identidad de secuencia con una secuencia que corresponde a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6, en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos

- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 o
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a una posición de 201 a 208 de SEQ ID NO: 6,

en donde la sustitución del aminoácido está seleccionada de F→Y o V→C. Dicha α/β-hidrolasa puede tener una estabilidad superior a la de la misma α/β-hidrolasa que no tiene esta sustitución o antes de introducir estas sustituciones. Por ejemplo, tal α/β-hidrolasa puede tener una estabilidad más alta comparada con una α/β-hidrolasa de SEQ ID NO: 6.

[00102] Se prevé que la α/β-hidrolasa, tal como se describe en la presente, comprende las sustituciones de aminoácidos

- G→R y A→N, preferiblemente G185R y A188N;
- G→S y A→R, preferiblemente G185S y A188R;
- G→R, A→R, A→H, S→D, P→H y M→D, preferiblemente G185R, A186R, A188H, S189D, P190H y M191D;
- V→A, G→R, A→N, G→E, G→E, I→A, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G185R, A188N, G199E, I200A, H203N y Q205K;

- V→A, G→S, A→R, G→E, I→A, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G185S, A188R, G199E, I200A, H203N y Q205K;
- V→A, G→E, I→A, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G199E, I200A, H203N y Q205K,
- V→A, G→R, A→R, A→H, G→E, I→V, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G185R, A186R, A188H, G199E, I200V, H203N y Q205K, y/o

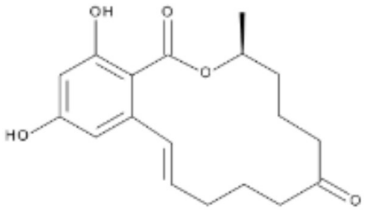
F→Y y V→C, preferiblemente F183Y y V197C.

[00103] La presente invención también se relaciona con moléculas de ácido nucleico que codifican para una α/β-hidrolasa como se describe en la presente. El ácido nucleico puede ser introducido o insertado en un vector de expresión. El término "vector de expresión" se refiere a un constructo de moléculas de ácido nucleico que es capaz de expresar un gen *in vivo* o *in vitro*. En particular, puede abarcar constructos de ADN adecuadas para transferir la secuencia de nucleótidos que codifican para polipéptidos a la célula hospedadora, de modo que se integre en el genoma o se sitúe libremente en el espacio extracromosómico, y para expresar intracelularmente la secuencia de nucleótidos que codifica para polipéptidos y, opcionalmente, transportar el polipéptido fuera de la célula.

[00104] El vector de expresión tal como se describe en la presente puede expresarse en una célula hospedadora. El término "célula hospedadora" se refiere a todas las células que contienen una secuencia de nucleótidos para ser expresada, o un vector de expresión, y que es capaz de producir una enzima o un polipéptido según la invención. En particular, se refiere a las células procariotas y/o eucariotas, preferiblemente Pichia pastoris, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Streptomyces, Hansenula, Trichoderma, Lactobacillus, Aspergillus, células de plantas y/o esporas de Bacillus, Trichoderma o Aspergillus. El nombre P. pastoris usado aquí es sinónimo del nombre Komagataella pastoris, siendo P. pastoris el más antiguo y K. pastoris el sistemáticamente más nuevo (*Yamada et al. (1995) 'The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of Komagataella Gen. Nov. (Saccharomycetaceae)' Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, Vol. 59, issue 3, pp. 439-444*). En particular, las especies de Komagataella pastoris han sido reasignadas recientemente a Komagataella phaffii (*Kurtzman (2009) "Biotechnological strains of Komagataella (Pichia) pastoris are Komagataella phaffii as determined from multigene sequence analysis." J Ind Microbiol Biotechnol. 36(11):1435-8*). Komagataella phaffii tal y como se utiliza aquí puede, por ejemplo, referirse a las cepas Komagataella phaffii CBS 7435, Komagataella phaffii GS115 o Komagataella phaffii JC308.

[00105] La presente invención también se relaciona con un uso de una α/β-hidrolasa descrita en la presente para degradar zearalenona (ZEN).

[00106] ZEN es una lactona estrogénica macrocíclica no esteroide con la siguiente fórmula estructural, sintetizada a través de la vía metabólica de los policétidos:

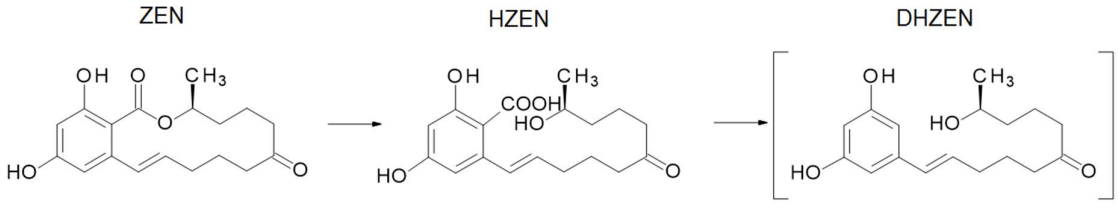


y su nombre según la nomenclatura IUPAC es (2E,11S)-15,17-dihidroxi-11-metil-12-oxabiciclo[12.4.0]octadeca-1(18),2,14,16-tetraeno-7,13-diona.

[00107] Sin embargo, una variedad de derivados de ZEN también ocurre en la naturaleza y puede estar formada por modificaciones enzimáticas o químicas de ZEN. Ejemplos de ello son los conjugados glicosídicos ZEN o los que contienen sulfato, formados por el metabolismo de hongos, plantas o mamíferos, así como los metabolitos ZEN formados en el organismo humano o animal, entre otros. Se entiende que los derivados de ZEN son conjugados o metabolitos de ZEN que se producen naturalmente o son sintetizados por síntesis química o bioquímica, pero en particular α-zearalenol (α-ZEL; (2E,7R,11S)-7,15,17-trihidroxi-11-metil-12-oxabiciclo[12.4.0]-octadeca-1(18),2,14,16-tetraen-13-ona), β-zearalenol (β-ZEL; (2E,7S,11S)-7,15,17-trihidroxi-11-metil-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(18),2,14,14,16-tetraen-13-ona), α-zearalanol (α-ZAL; (7R,11S)-7,15,17-trihidroxi-11-metil-12-oxabiciclo[12.4.0]octadeca-1(18),14,16,16-trien-13-ona), β-zearalanol (β-ZAL; (-7S,11S)-7,15,17-trihidroxi-11-metil-12-oxabiciclo[12.4.0]-octadeca-1(14),15,17-trien-13-ona), zearalenona 14-sulfato (Z14S; [(2E,11S)-15-hidroxi-11-metil-7,13-dioxo-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(18),2,14,16-tetraen-17-il] hidrógeno sulfato), zearalenona-14-glicósido (Z14G; (2E,11S)-15-hidroxi-11-metil-17-[(3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-tetrahidropiran-2-il]oxi-12-oxabiciclo[12.4.0]octadeca 1(18)2,14,16-tetraeno-7,13-diona) así como zearalanona (ZAN; (11S)-15,17-dihidroxi-11-metil-12-oxabicyclo-[12.4.0]octadeca-1(18),14,16-trieno-7,13-diona).

[00108] Tanto la ZEN como los derivados de ZEN, en particular α-ZEL, β-ZEL, Z14S, α-ZAL, β-ZAL, Z14G y ZAN, también pueden detectarse en alimentos procesados y productos de alimentación animal, como el pan o la cerveza, debido a su alta estabilidad química y física.

[00109] La hidrólisis de ZEN y derivados de ZEN tiene éxito con cualquiera de los polipéptidos de secuencia con números de identificación de 1 a 6. Se cree que la hidrólisis de ZEN o sus derivados ocurre en el grupo de ésteres de acuerdo con el siguiente mecanismo de reacción:



La hidrólisis de ZEN para formar zearalenona hidrolizada no-tóxica (HZEN) y/o derivados hidrolizados de ZEN puede tener lugar mediante las α/β-hidrolasas de la presente invención. Se cree que la descarboxilación adicional de HZEN a ZEN hidrolizada descarboxilada (DHZEN) y/o derivados de ZEN hidrolizada descarboxilada ocurre espontáneamente.

[00110] La α/β-hidrolasa aquí descrita puede ser capaz de y adecuada para degradar ZEN. Por ejemplo, la α/β-hidrolasa puede ser adecuada para la división hidrolítica independiente del oxígeno y libre de cofactores del grupo de ésteres de ZEN y/o sus derivados.

[00111] La degradación de ZEN puede medirse añadiendo las α/β-hidrolasas de la presente invención al buffer de Teorell Stenhagen (pH 7,5) con 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino a una temperatura de 37 °C. La concentración inicial del sustrato en la reacción es de ZEN 15,71 μM. La ZEN, HZEN, DHZEN y/u otros derivados pueden detectarse a partir de muestras tomadas de la reacción mediante HPLC u otros métodos bien conocidos por la persona con conocimientos en la materia.

[00112] En particular, la degradación de ZEN puede medirse en buffer de muestra (buffer de Teorell Stenhagen (*Stenhagen & Teorell. (1938) Nature 141, 415*), pH 7,5, que contiene 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino a una temperatura de 37 °C durante las 3 horas como sigue. El polipéptido/enzima se diluye con buffer de muestra y se almacena en hielo hasta su uso. Como control negativo, se incuba el buffer de muestra que contiene 5 μg/ml de ZEN. Para la estrategia de degradación, el buffer de la muestra que contiene 5 μg/ml de ZEN se mezcla con una solución de polipéptido/enzima para conseguir una concentración final de enzima que degrada la ZEN disponible hasta un grado del 90 % al 100 % dentro de las 3 horas. Con la adición del polipéptido/enzima a la estrategia de degradación, se inicia la

reacción. No se añade ninguna enzima al control negativo. Inmediatamente después de que se inicia cada reacción, se agita por vórtex durante aproximadamente unos 2 segundos y se transfiere una muestra de 0 h (100 µl) a un nuevo tubo de reacción. La reacción se incuba en un baño de agua precalentado a 37 °C, la muestra se inactiva por calor mediante incubación durante 10 minutos a 99 °C, se centrifuga (2 minutos, 25 °C, 14674 xg) y se transfiere el sobrenadante de 90 µl a un vial de HPLC con inserto. La muestra se almacena a 4 °C hasta la medición con HPLC-DAD. El muestreo se repite después de 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0 horas.

[00113] Las concentraciones de ZEN, HZEN y DHZEN pueden ser analizadas por HPLC-DAD como se describe en Vekiru et al. (*Vekiru et al. (2016) 'Isolation and characterisation of enzymatic zearalenone hydrolysis reaction products' World Mycotoxin Journal 9:353-363*). El análisis se realiza en una HPLC Agilent Serie 1100 equipada con un detector de matriz de diodos (DAD) que funciona a 274 nm. El tiempo de retención de los analitos es de 7,03 minutos para ZEN, 5,17 minutos para HZEN y 5,95 minutos para DHZEN cuando la separación se realiza en una columna Zorbax SB-Aq, 4,6×150 mm, 5 µm (Agilent Technologies) a 35 °C utilizando el solvente A: de metanol en agua 20 %7+ de acetato de amonio 5 mM y el solvente B: de metanol en agua 90 % + de acetato de amonio 5 mM y con el siguiente gradiente: 0-0,1 min 0 % fase B, 0,1-3 min incremento lineal hasta el 90 % fase B, 3-5 min incremento lineal hasta el 100 % de B, que se mantiene durante 1,9 min, luego se reduce al 0 % fase B en 0,1 min. La columna se reacondiciona durante 2,0 minutos antes de comenzar la siguiente corrida. El caudal se fija en 0,8 ml/min y el volumen de inyección en 15 µl.

[00114] La cuantificación se basa en la calibración con estándares externos de ZEN, HZEN y DHZEN. La actividad enzimática en unidades por litro (U/l) se calcula a partir de la pendiente del rango lineal de degradación de ZEN determinada a partir de una gráfico de la concentración de ZEN en una muestra frente al punto de muestreo en el tiempo. Para determinar la cantidad de actividad enzimática en una muestra en U/l, la pendiente del rango lineal en un gráfico como se describe anteriormente puede calcularse en ZEN µM por hora y dividirse por 60 para determinar µM/min. Considerando las posibles diluciones e incluyendo estos factores de dilución apropiados en el cálculo, se puede determinar la actividad enzimática en una muestra en U/l. El siguiente ejemplo sirve para ilustrar: Si la pendiente del rango lineal es de 10 µM/h, la actividad enzimática de una muestra no diluida es de 0,17 U/l; calculada en 10 / 60 = 0,17.

[00115] En este contexto, se denota que el término "unidad" o "U" se refiere a la medida de la actividad catalítica de una enzima y se define como el número de micromoles (µmol) del

sustrato, es decir, zearalenona en este caso, que reaccionan o se clivan por minuto en condiciones definidas. Por "actividad" de una solución enzimática o polipeptídica se define la concentración enzimática de la solución enzimática o polipeptídica, indicada en unidades por mililitro (U/ml) o en unidades por litro (U/l) de solución.

[00116] La presente invención también se relaciona con una composición que comprende una α/β-hidrolasa como se describe en la presente. La composición puede ser un aditivo para alimentos o alimentación animal, o un producto alimenticio o de alimentación animal.

[00117] Los métodos para preparar dichas composiciones de alimentos y/o alimentación animal son conocidos por la persona con conocimientos en la materia y se describen, entre otros, en el documento WO 99/35240.

[00118] La presente invención también se relaciona con una α/β-hidrolasa o una composición como se describe en la presente para uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad. La enfermedad puede ser una enfermedad que afecta el equilibrio hormonal, como el equilibrio de estrógenos, especialmente la micotoxicosis causada por ZEN.

[00119] La presente invención también se relaciona con un kit que comprende la α/β-hidrolasa o la composición descrita en la presente.

[00120] La presente invención se caracteriza además por los items siguientes:

[00121] 1. Método para incrementar la estabilidad de una α/β-hidrolasa, comprendiendo la α/β-hidrolasa una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2, y/o comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6, y/o una secuencia con un 58% o más de identidad de secuencia con una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 (dominio CAP; identidad del 58 % presente en el dominio CAP de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6), comprendiendo el método sustituir al menos un aminoácido

- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,

en donde los aminoácidos son sustituidos por un aminoácido, que tiene un índice de hidropatía más negativo que el aminoácido sustituido,
en donde el índice de hidropatía es determinado por el índice de hidropatía de Kyte y Doolittle, obteniendo así una α/β-hidrolasa con estabilidad incrementada.

[00122] 2. El método del ítem 1, en donde el índice de hidropatía de un determinado aminoácido es

aa	**aa**	**Índice de hidropatía (Kyte-Doolittle)**
R	Arginina	-4,50
K	Lisina	-3,90
N	Asparagina	-3,50
Q	Glutamina	-3,50
D	Ácido aspártico	-3,50
E	Ácido glutámico	-3,50
H	Histidina	-3,20
P	Prolina	-1,60
Y	Tirosina	-1,30
W	Troptofano	-0,90
S	Serina	-0,80
T	Treonina	-0,60
G	Glicina	-0,40
A	Alanina	1,80
M	Metionina	1,90
C	Cisteína	2,50
F	Fenilalanina	2,80
L	Leucina	3,80
V	Valina	4,20
I	Isoleucina	4,50

[00123] 3. El método de los ítems 1 o 2, en donde el método comprende sustituir al menos un aminoácido
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1, y/o

- en una posición correspondiente a la posición 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 y/o
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5 y/o
- en una posición correspondiente a la posición 201 a 208 de SEQ ID NO: 6.

[00124] 4. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, K, D, Q, D, N, E, P, G, T, S o H.

[00125] 5. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, K, N, Q, D, E, H, P, Y, W, S, T, G, A, M, C, F, L o V.

[00126] 6. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, K, N, Q, D, E, H, P, Y, W, S, T o G.

[00127] 7. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, K, N, Q, D, E, H o P.

[00128] 8. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado de S, P, R, D, H, G o N.

[00129] 9. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, D, H, G, N o P.

[00130] 10. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, D, H, G o N.

[00131] 11. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado de P, S, R o H.

[00132] 12. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado a partir de R o N.

[00133] 13. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona de una o más de V→A, G→R, G→S, A→P, A→R, A→R, A→D, A→H, A→N, A→G, S→D, P→H, M→D, G→E, I→A, I→V, H→N y/o Q→K.

[00134] 14. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona de uno o más de los siguientes: V160A, G185R,

G185S, A186P, A186R, A188D, A188H, A188N, A188G, A188R, S189D, P190H, M191D, G199E, I200A, I200V, H203N y/o Q205K.

[00135] 15. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona de uno o más de V→A, G→R, G→S, A→P, A→R, A→R, A→D, A→H, A→N, A→G, S→D, P→H, M→D, G→E, I→A, I→V, H→N y/o Q→K.

[00136] 16. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona de G185R, A186R, A188R, A188D, A188H, A188N y/o M191D.

[00137] 17. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde la estabilidad incrementada es una disminución del valor GRAVY, un incremento de la estabilidad frente a pH y/o un incremento de la estabilidad térmica.

[00138] 18. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el valor GRAVY se calcula por la suma de los valores de hidropatía (índice) de todos los aminoácidos dividida por el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (de acuerdo con el cálculo de Kyte y Doolittle).

[00139] 19. El método de uno cualquiera de los ítems anteriores, en donde el valor GRAVY se calcula dividiendo la suma de los valores de hidropatía (índice) de todos los aminoácidos en una secuencia por el número total de aminoácidos de la secuencia.

[00140] 20. El método de uno cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aminoácido o aminoácidos son sustituidos por un aminoácido seleccionado de R, D, H, G, N o P.

[00141] 21. El método de uno cualquiera de los items anteriores, en donde el método comprende sustituir al menos un aminoácido

- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1, y/o
- en una posición correspondiente a la posición 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 y/o
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5 y/o
- en una posición correspondiente a la posición 201 a 208 de SEQ ID NO: 6.

y en donde el aminoácido o aminoácidos se sustituyen por un aminoácido seleccionado de R, D, H, G, N o P.

[00142] 22. Una α/β-hidrolasa obtenible por el método de uno cualquiera de los ítems anteriores.

[00143] 23. Una α/β-hidrolasa, comprendiendo la α/β-hidrolasa una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o comprendiendo una secuencia correspondiente a las posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2, y/o comprendiendo

una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6, y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más a una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 (dominio CAP; identidad del 58 % presente en el dominio CAP de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6),

en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos

- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,

donde la α/β-hidrolasa tiene un valor GRAVY más negativo de al menos 0,6 % en comparación con el valor GRAVY de una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1.

[00144] 24. 6. Una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de la SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia superior al 58 % de una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de la SEQ ID NO: 6,

en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos

- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,

en donde la α/β-hidrolasa tiene un valor GRAVY más negativo de al menos 0,6 % en comparación con el valor GRAVY de una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 6.

[00145] 25. Una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o que comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2, y/o que comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6, y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia igual o superior al 58 % de una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o

una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 (dominio CAP; identidad del 58 % presente en el dominio CAP de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6), que comprende

en donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos

- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 o
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a una posición de 201 a 208 de SEQ ID NO: 6,

en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona de V→A, G→R, G→S, A→P, A→R, A→D, A→H, A→N, A→G, S→D, P→H, M→D, M→D, G→E, I→A, I→V, H→N, Q→K, F→Y y/o V→C y/o

en donde el aminoácido(s) está sustituido por un aminoácido seleccionado de P, R, D, H, G o N, preferentemente el aminoácido está seleccionado de R, D, H, G o N, más preferentemente el aminoácido está seleccionado de R o N.

[00146] 26. La α/β-hidrolasa de uno cualquiera de los ítems anteriores, en la donde la α/β-hidrolasa comprende las sustituciones de aminoácidos

- G→R y A→N, preferiblemente G185R y A188N;
- G→S y A→R, preferiblemente G185S y A188R;
- G→R, A→R, A→H, S→D, P→H y M→D, preferiblemente G185R, A186R, A188H, S189D, P190H y M191D;
- V→A, G→R, A→N, G→E, G→E, I→A, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G185R, A188N, G199E, I200A, H203N y Q205K;
- V→A, G→S, A→R, G→E, I→A, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G185S, A188R, G199E, I200A, H203N y Q205K;
- V→A, G→E, I→A, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G199E, I200A, H203N y Q205K;
- V→A, G→R, A→R, A→H, G→E, I→A, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G185R, A186R, A188H, G199E, I200A, H203N y Q205K y/o
- V→A, G→R, A→R, A→H, G→E, I→V, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G185R, A186R, A188H, G199E, I200V, H203N y Q205K;
- V→A, G→R, A→R, A→H, S→D, P→H, M→D, M→D, G→E, I→V, H→N y Q→K, preferiblemente V160A, G185R, A186R, A188H, S189D, P190H, M191D, G199E, I200V, H203N y Q205K; y/o

- F→Y y V→C, preferiblemente F183Y y V197C.

27. Un uso de una α/β-hidrolasa de uno cualquiera de los ítems anteriores para degradar la zearalenona (ZEN).

[00147] 28. Una composición que comprende una α/β-hidrolasa de uno cualquiera de los ítems anteriores, preferiblemente la composición es un aditivo para alimentos o alimentación animal, o un producto alimenticio o de alimentación animal.

[00148] 29. La α/β-hidrolasa o la composición de uno cualquiera de los ítems anteriores para uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad.

[00149] 30. Kit que comprende la α/β-hidrolasa o la composición de uno cualquiera de los ítems anteriores.

[00150] 31. Método para incrementar la estabilidad de una α/β-hidrolasa, comprendiendo la α/β-hidrolasa una secuencia correspondiente a las posiciones 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o comprendiendo una secuencia correspondiente a las posiciones 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, y/o comprendiendo una secuencia correspondiente a las posiciones 176 a 222 de SEQ ID NO: 6, y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia igual del 58% o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 159 a 204 de SEQ ID NO: 2 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 176 a 222 de SEQ ID NO: 6 (dominio VI; identidad del 58 % presente en el dominio VI de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6), que comprende

sustituir al menos un aminoácido

- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,

en donde el o los aminoácidos son sustituidos por un aminoácido, que tiene un índice de hidropatía más negativo que el aminoácido sustituido,

en donde el índice de hidropatía es determinado por el índice de hidropatía de Kyte y Doolittle, obteniendo así una α/β-hidrolasa con estabilidad incrementada.

[00151] 32. Un método para incrementar la estabilidad de una α/β-hidrolasa, comprendiendo la α/β-hidrolasa una secuencia de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 o 6, comprendiendo el método

sustituir al menos un aminoácido

- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,

en donde el o los aminoácidos son sustituidos por un aminoácido que tiene un índice de hidropatía más negativo que el aminoácido sustituido,
en donde el índice de hidropatía es determinado por el índice de hidropatía de Kyte y Doolittle, obteniendo así una α/β-hidrolasa con estabilidad incrementada.

[00152] 33. Una α/β-hidrolasa, comprendiendo la α/β-hidrolasa una secuencia correspondiente a las posiciones 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o comprendiendo una secuencia correspondiente a las posiciones 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, y/o comprendiendo una secuencia correspondiente a las posiciones 176 a 222 de SEQ ID NO: 6, y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 159 a 204 de SEQ ID NO: 2 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 176 a 222 de SEQ ID NO: 6 (dominio VI; identidad del 58 % presente en el dominio VI de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6), en la donde la secuencia polipeptídica comprende, como mínimo, al menos una sustitución de aminoácidos

- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 159 a 204 de SEQ ID NO: 2, o
- en una posición correspondiente a la posición 160 a 205 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a la posición 176 a 222 de SEQ ID NO: 6,

en donde la α/β-hidrolasa tiene un valor GRAVY más negativo de al menos 0,6 % en comparación con el valor GRAVY de una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1.

[00153] 34. Una α/β-hidrolasa que tiene una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o que comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2, y/o que comprende una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6, y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 145 a 218 de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia

correspondiente a las posiciones 144 a 217 de SEQ ID NO: 2 y/o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 58 % o más con una secuencia correspondiente a las posiciones 161 a 235 de SEQ ID NO: 6 (dominio CAP; identidad del 58 % presente en el dominio CAP de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6), que comprende
en la donde la secuencia polipeptídica comprende al menos una sustitución de aminoácidos
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 1, o
- en una posición correspondiente a la posición 184 a 190 de SEQ ID NO: 2 o
- en una posición correspondiente a la posición 185 a 191 de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, o
- en una posición correspondiente a una posición de 201 a 208 de SEQ ID NO: 6,
en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona de V→A, G→R, G→S, A→P, A→R, A→D, A→H, A→N, A→G, S→D, P→H, M→D, M→D, G→E, I→A, I→V, H→N y Q→K y/o
en donde el aminoácido(s) está sustituido por un aminoácido seleccionado de P, R, D, H, G o N, preferentemente el aminoácido está seleccionado de R, D, H, G o N, más preferentemente el aminoácido está seleccionado de R o N.

****

[00154] Cabe señalar que, tal como se utiliza en la presente, las formas singulares "un", "una", “el” y "la" incluyen referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de dichos reactivos diferentes y la referencia a "el método" incluye la referencia a pasos y métodos equivalentes conocidos a los de la habilidad ordinaria en la materia que podrían modificarse o sustituirse por los métodos aquí descritos.

[00155] Salvo indicación en contrario, debe entenderse que el término "al menos", que precede a una serie de elementos, se refiere a cada elemento de la serie. Aquellos con conocimientos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descrita en la presente. Tales equivalentes están destinados a ser abarcados por la presente invención.

[00156] El término "y/o", donde sea que se utilice en la presente, incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados con dicho término".

[00157] El término "menos que" o a su vez "más que" no incluyen el número concreto.

[00158] Por ejemplo, menos de 20 significa menos que el número indicado. Del mismo modo, más que o mayor que significa más que o mayor que el número indicado, por ejemplo, más del 80 % significa más que o mayor que el número indicado del 80 %.

[00159] A lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "comprendiendo", implican la inclusión de un número entero, un paso, un grupo de números enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero, o paso, o grupo de números enteros o paso. Cuando se utiliza en la presente, el término "que comprende" puede sustituirse por el término "que contiene" o "que incluye" o, a veces, cuando se utiliza en la presente con el término "que tiene". Cuando se utiliza aquí, "que consiste en" excluye cualquier elemento, paso o ingrediente no especificado.

[00160] El término "incluyendo" significa "incluyendo pero no limitándose a". Los términos "incluyendo" y "incluyendo pero no limitado a" se utilizan intercambiablemente.

[00161] Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, material, reactivos y sustancias, etc. particulares, descritos en la presente y como tales pueden variar. La terminología usada aquí es para el propósito de describir formas de realización particulares solamente, y no se limita el alcance de la presente invención, el cual es definido únicamente por las reivindicaciones.

[00162] Todas las publicaciones citadas en el texto de esta descripción (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, instrucciones, etc.), ya sean supra o infra, se incorporan por referencia en su totalidad. Nada de lo aquí expuesto debe interpretarse como una admisión de que la invención no precede dichas divulgaciones en virtud de una invención anterior. En la medida en que el material incorporado por referencia contradiga o sea inconsistente con esta descripción, la presente descripción reemplaza a cualquiera de dichos materiales.

[00163] El contenido de todos los documentos y documentos de patente citados en la presente se incorpora por referencia en su totalidad.

[00164] En la presente aplicación se utilizan las siguientes secuencias.

Tabla 2

SEQ ID NO	Secuencia

1	MVTSPALRDVHVPHAYPEQQVDLGEITMNYAEAGDPDRPA VLLIPEQTGSWWSYEEAMGLLSEHFHVYAVDLRGQGRSSW TPKRYSLDNFGNDLVRFIALVVKRPVVVAGNSSGGVLAAW LSAYSMPGQLRGVLCEDPPFFASELVPAHGHSVRQGAGPV FELFRTYLGDQWSVGDWEGFCRAAGASASPMARSFVADGI PQHLQEYDPEWARVFYEGTVGLSCPHERMLGQVKTPVLLT HHMRGIDPETGNLLGALSDEQALRARRLMDSAGVTVDYES VPDASHMMHQSAPARYVEIFTRWAAALAP
2	MADPAQRDVYVPHAYPEKQADLGEITMNYAEAGEPDMPAV LLIPEQTGSWWGYEEAMGLLAENFHVYAVDLRGQGRSSWA PKRYSLDNFGNDLVRFIALVVKRPVIVAGNSSGGVLAAWL SAYSMPGQVRGALCEDAPFFASELVTTCGHSIRQAAGPMF ELFRTYLGDQWSVGDWTGYCRAADASSSPMARYFVADEIP QHMREYDPEWARAFWEGTVALHCPHEQLLTQVKTPVLLTH HMRDIDPDTGHLVGALSDEQAARARLLMESAGVKVDYASV PDALHMMHQFDPPRYVEIFTQWAATLAA
3	MVTSPALRDVHVPHAYPEQQVDLGEITMNYAEAGDPGRPA VLLIPEQTGSWWSYEEAMGLLAEHFHVYAVDLRGQGRSSW TPKRYSLDNFGNDLVRFIALVVRRPVVVAGNSSGGVLAAW LSAYSMPGQIRGVLCEDPPFFASELVPAHGHSVRQGAGPV FELFRTYLGDQWSVGDWEGFRSAADASASPMARSFVADTI PQHLKEYDPEWARAFYEGTVGLNCPHERMLNRVNTPVLLT HHMRGTDPETGNLLGALSDEQAAQVRRLMESAGVKVDYES VPDASHMMHQSDPARYAEILTPWTAALAP
4	MVTSPALRDVHVPHAYPEQQVDLGEITMNYAEAGDPDRPA VLLIPEQTGSWWSYEEAMGLLAEHFHVYAVDLRGQGRSSW TPKRYSLDNFGNDLVRFIALVVKRPVVVAGNSSGGVLAAW LSAYSMPGQLRGVLCEDPPFFASELVPAHGHSVRQGAGPV FELFRTYLGDQWSVSDWEGFCRAAGASASPMARSFVADGI PQHLKEYDPEWARAFHEGTVGLNCPHERMLGRVNTPVLLT

	HHMRGTDPETGNLLGALSDEQAAQARLLMESAGVRVDYES VPDASHMMHQSDPARYAEIFTRWAAALAP
5	MVTSPALRDVHVPHAYPEQQVDLGEITMNYAEAGDPGRPA VLLIPEQTGSWWSYEEAMGLLAEHFHVYAVDLRGQGRSSW TPKRYSLDNFGNDLVRFMALVVRRPVVVAGNSSGGVLAAW LSAYSMPGQIRGVLCEDPPFFASELVPAHGHSVRQGAGPV FELFRTYLGDQWSVGDWEGFRSAAGASASPMARSFVADTI PQHLKEYDPEWARAFYEGTVGLNCPHERMLNRVNTPVLLT HHMRGTDPETGNLLGALSDEQAAQARRLMESAGVKVDYES VPDASHMMHQSDPARYAEILTPWAAALAP
6	MAEEGTRSEAADAATQARQLPDSRNIFVSHRFPERQVDLG EVVMNFAEAGSPDNPALLLLPEQTGSWWSYEPVMGLLAEN FHVFAVDIRGQGRSTWTPRRYSLDNFGNDLVRFIALVIKR PVVVAGNSSGGLLAAWLSAYAMPGQIRAALCEDAPFFASE LVPAYGHSVLQAAGPAFELYRDFLGDQWSIGDWKGFVEAA KASPAKAMQLFPTPDEAPQNLKEYDPEWGRAFFEGTVALH CPHDRMLSQVKTPILITHHARTIDPETGELLGALSDLQAE HAQDIIRSAGVRVDYQSHPDALHMMHLFDPARYAEILTSW SATLPAND
7	QXAGP
8	EYDPE
9	G(F/Y)XXAA
10	ARXF
11	QLFP

Tabla 2: Secuencias utilizadas en la presente solicitud. Los motivos que pueden flanquear un dominio VI tal y como se describe aquí se muestran como SEQ ID NO: 7 y 8. Los motivos que pueden flanquear un bucle CAP como se describe aquí se muestran como SEQ ID NO: 9, 10, 11. Una "X" en un motivo puede ser cualquier aminoácido. El segundo aminoácido del motivo de SEQ ID NO: 9 puede ser F o Y, como se indica por "(F/Y)". Ambos, un dominio VI y un

bucle CAP, están comprendidos en un dominio CAP que puede estar situado dentro de la excursión entre una β-lámina y una α-hélice, por ejemplo, entre b6 y aD de la α/β-hidrolasa, tal y como se describe en *Ollis et al. (1992) `The alpha/beta α/β-hydrolase fold' Protein Eng. 5(3):197-211*. Los VI-dominios y bucle CAPs se muestran subrayados para SEQ ID NO: 1-6.

[00165] Una mejor comprensión de la presente invención y de sus ventajas surgirá de los siguientes ejemplos, ofrecidos sólo para propósitos ilustrativos. Los ejemplos no limitan el alcance de la presente invención de ninguna manera.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

[00166] Ejemplo 1: Modificación, clonación y expresión de polinucleótidos que codifican polipéptidos que clivan zearalenona

[00167] Las sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos se realizaron mediante mutaciones de las secuencias de nucleótidos por medio de PCR utilizando el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Alternativamente, también se sintetizaron secuencias completas de nucleótidos (por ejemplo, GeneArt Gene Synthesis de Thermo Fisher Scientific). Las secuencias de nucleótidos generadas por mutagénesis PCR y las obtenidas de GeneArt fueron integradas por métodos estándar en vectores de expresión para la expresión en E. coli. E. coli BL21(DE3) se transformó con los vectores de expresión y las secuencias de nucleótidos se expresaron en esa cepa (*J.M. Cregg, Pichia Protocols, se¬cond Edition, ISBN-10: 1588294293, 2007; J. Sambrook et al. 2012, Molecular Cloning, A La¬bo¬ratory Manual 4th Edition, Cold Spring Harbor*). Cualquier otra célula hospedadora adecuada también puede ser utilizada para esta tarea. El lisado celular soluble de E. coli se utilizó para determinar las propiedades catalíticas de las variantes del polipéptido.

[00168] Ejemplo 2: Determinación de las α/β-hidrolasas degradantes de ZEN, su dominio CAP, su dominio VI y el bucle CAP.

[00169] Para determinar si una secuencia de aminoácidos es una α/β-hidrolasa degradante de ZEN, la secuencia de interés fue alineada con la secuencia de SEQ ID NO: 1 para determinar la identidad de secuencia. Además, se realizó una predicción topológica y un modelado de homología para la secuencia de interés. La alineación de la secuencia se realizó con el visor de secuencia de CLC 7,8,1 con los siguientes parámetros: La penalidad de brecha abierta (o *open gap penalty*) fue de 10,0, la penalidad de extensión de brecha (o *gap extension*

penalty) fue 1,0, y la penalidad de brecha final: Como cualquier otra, la alineación: Muy precisa.

[00170] La predicción topológica y el modelado de homología se realizó con *YASARA Structure 16,6,22 (1993-2016 por Elmar Krieger, Bioinformatics 30,2981-2982)* mediante el modelado de homología con los siguientes parámetros: Iteraciones PSI-BLAST: 3, PSI-BLAST Valor E: 0,5, Estado de oligomerización: 4, Templates: 5, con la misma secuencia: 1, alineación por template: 5, velocidad de modelado: Rápido, extensión de terminal: 10, muestras de bucle: 50, uso de PSSP: Sí. En el Informe de Modelado de Homología de YASARA se documentó la predicción topológica mediante el algoritmo de predicción de estructura secundaria *PSI-Pred (Jones (1999) 'Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices' J.Mol.Biol. 292:195-202)*. Se documentaron puntajes z para todos los modelos de homología generados. El modelo generado con el mejor puntaje z fue tomado para el análisis estructural y la determinación de las características estructurales de las α/β-hidrolasas y las excursiones, por ejemplo, como se describe en *Ollis et al. (1992) `The alpha/beta-hydrolase fold' Protein Eng. 5(3):197-211*.

[00171] Para la identificación de un dominio CAP, un dominio VI y un bucle CAP en la nueva secuencia de interés, las estructuras secundarias del dominio central de la α/β-hidrolasa debieron etiquetarse de acuerdo con la Fig. 2a en *Ollis et al. (1992) `The alpha/beta α/β-hydrolase fold' Protein Eng. 5(3):197-211*. El dominio CAP, el dominio VI y el bucle CAP se encuentran dentro de la excursión entre b6 y aD de una α/β-hidrolasa degradante de ZEN. Un dominio CAP puede comenzar poco después del extremo C-terminal de la β-hebra b6 del dominio núcleo de la α/β-hidrolasa, y puede extenderse hasta el extremo N-terminal de la α-hélice aD del dominio núcleo de la α/β-hidrolasa. El dominio VI forma parte del dominio CAP y comienza desde el primer aminoácido después del motivo QXAGP presente en el dominio CAP y se extiende hasta el último aminoácido antes del motivo EYDPE, mientras que el motivo EYDPE no forma parte del dominio VI. El bucle CAP es una parte del dominio VI y comienza desde el primer aminoácido después del motivo G(F/Y)XXAA presente en el dominio VI y se extiende hasta el último aminoácido antes del motivo ARXF (o el motivo QLFP para la SEQ ID NO: 6), mientras que el motivo ARXF (o el motivo QLFP para la SEQ ID NO: 6) no forma parte del bucle CAP. Por ejemplo, las posiciones de los dominios CAP, de los dominios VI y de los bucles CAP se determinaron tal y como se describe aquí para los polipéptidos de SEQ ID NO: 1-6 y se muestran en la Fig. 1.

[00172] Ejemplo 3: Determinación del valor del gran promedio de hidropatía (GRAVY)

[00173] El valor del gran promedio de hidropatía (GRAVY) de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido se define por la suma de los valores de hidropatía (Kyte y Doolittle, 1982, citados aquí) de todos los aminoácidos divididos por la longitud del polipéptido, que corresponde al número total de aminoácidos del polipéptido. Los valores GRAVY se calcularon para los polipéptidos y las partes definidas de los mismos utilizando el programa ProtParam en *https://web.expasy.org/protparam* (*Gasteiger E. et al.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, en John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 2005, pp. 571-607)*. El dominio CAP de SEQ ID NO: 1 está definido por la parte de las posiciones de aminoácidos 145 a 218 (incluidas ambas posiciones), el dominio VI de SEQ ID NO: 1 está definido como la secuencia de aminoácidos de las posiciones de aminoácidos 160 a 205 (incluidas ambas posiciones) y el bucle CAP de SEQ ID NO: 1 está definido por la parte de la secuencia de aminoácidos de las posiciones de aminoácidos 185 a 191 (incluidas ambas). Para el polipéptido completo de SEQ ID NO: 1, el valor GRAVY calculado es -0,167, para el dominio CAP de SEQ ID NO: 1 el valor GRAVY es -0,284, para el dominio VI de SEQ ID NO: 1 el valor GRAVY es -0,043, y para el bucle CAP dentro del dominio CAP de SEQ ID NO: 1 el valor GRAVY es +0,271. El dominio CAP, el dominio VI y el bucle CAP de SEQ ID NO: 6 están definidos por las partes de las posiciones de los aminoácidos de 161-235, 176-222, 201-208, respectivamente (se incluyen ambas posiciones de los rangos indicados). Para el polipéptido completo de SEQ ID NO: 6, el valor GRAVY calculado es -0,192, para el dominio CAP de SEQ ID NO: 6 el valor GRAVY es -0,388, para el dominio VI de SEQ ID NO: 6 el valor GRAVY es -0,468, y para el bucle CAP de SEQ ID NO: 6 el valor GRAVY es -0,362.

[00174] La disminución del valor GRAVY en porcentaje de toda la secuencia de aminoácidos de un polipéptido causada por al menos una mutación relativa a toda la secuencia de aminoácidos del polipéptido no mutado/no sustituido de SEQ ID NO: 1 ó 6 se calculó por la diferencia entre los dos valores GRAVY divididos por el valor GRAVY del polipéptido no mutado, multiplicado por 100. Para ilustración, aquí se muestra el cálculo para la SEQ ID NO: 1 variante V160A: ((-0,174)-(-0,167)) / (-0,167) x 100 = 4,2 %. Los resultados de ejemplos adicionales se muestran en las Figuras 2A y 2E.

[00175] La disminución del valor GRAVY en porcentaje del dominio CAP causada por las mutaciones dentro del dominio CAP en relación con la secuencia del dominio CAP no mutado de SEQ ID NO: 1 ó 6 se calculó por la diferencia entre los dos valores GRAVY dividida

por el valor GRAVY del dominio CAP no mutado, multiplicado por 100. Para ilustración, se muestra aquí el cálculo para la SEQ ID NO: 1 variante V160A: ((-0,316)-(-0,284)) / (-0,284) x 100 = 11,3 %. Los resultados de otros ejemplos se enumeran en las figuras 2B y 2F.

[00176] La disminución del valor GRAVY en porcentaje del dominio VI causada por mutaciones dentro del dominio VI en relación con la secuencia del dominio VI no mutado de SEQ ID NO: 1 ó 6 se calculó por la diferencia entre los dos valores GRAVY dividida por el valor GRAVY del dominio VI no mutado, multiplicado por 100. Para ilustración, aquí se muestra el cálculo para la SEQ ID NO: 1 variante G185R: ((-0,133) - (0,043)) / (-0,043) x 100 = 209,3 %. Los resultados de ejemplos adicionales se enumeran en las figuras 2C y 2G.

[00177] La disminución del valor GRAVY en porcentaje del bucle CAP causada por las mutaciones dentro del bucle CAP en relación con la secuencia del bucle CAP no mutado de SEQ ID NO: 1 ó 6 se calculó por la diferencia entre los dos valores GRAVY dividida por el valor GRAVY del bucle CAP no mutado, multiplicado por 100. Para ilustración, aquí se muestra el cálculo de SEQ ID NO: 1 variante G185R: ((-0,314) - (+0,271)) / (+0,271) x 100 = -215,9 %. El valor es negativo, porque el valor GRAVY del bucle parental CAP es positivo. Para simplificar la representación de datos para ejemplos adicionales de mutaciones, los valores porcentuales se muestran como valores positivos en la Figura 2D.

[00178] Ejemplo 4: Determinación de la actividad de los polipéptidos degradantes de ZEN

[00179] Los genes correspondientes que codifican para los polipéptidos degradantes de ZEN fueron clonados utilizando métodos estándar, expresados intracelularmente en Escherichia coli, y los polipéptidos producidos fueron aislados de E. coli por métodos conocidos por una persona con conocimientos en la materia, por ejemplo, mediante lisis utilizando una celda *French Press* o de prensa francesa. La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante métodos estándar, por ejemplo, el método BCA (*Pierce BCA Protein Assay KitProd #23225*).

[00180] Las determinaciones de actividad enzimática se realizaron en buffer de muestra (buffer de Teorell Stenhagen (Stenhagen & Teorell. (1938) Nature 141, 415), pH 7,5, que contiene 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino a una temperatura de 37 °C durante 3 horas. Los polipéptidos se diluyeron con buffer de muestra y se almacenaron en hielo hasta su uso. Se diluyó una solución madre de ZEN de 1500 ppm (p/v) en acetonitrilo 1:10 con buffer de muestra y se almacenó a 25 °C hasta una nueva dilución para su uso en una reacción de degradación. La estrategia de degradación y un control negativo se prepararon

en tubos de reacción. Como control negativo, se incubó un buffer de muestra que contenía 5 µg/ml de ZEN. Para la reacción de degradación, el buffer de la muestra se mezcló con una solución de polipéptido para conseguir una concentración final de ZEN de 5 µg/ml y una concentración final de enzima que consiguió una degradación de ZEN del 90 % al 100 % dentro de las 3 horas. Con la adición del polipéptido al buffer de muestra que contiene ZEN, se inició la reacción. No se añadió ninguna enzima al control negativo. Inmediatamente después de que se iniciara cada reacción, se agitó en vórtex durante aproximadamente 2 segundos y se tomó una muestra de 0 h (100 µl) y se transfirió a un nuevo tubo de reacción. La reacción se incubó en un baño de agua precalentada a 37 °C, la muestra se desactivó por calor mediante incubación durante 10 minutos a 99 °C, se centrifugó (2 minutos, 25 °C, 14674 xg) y se transfirió el sobrenadante de 90 µl a un vial de HPLC con inserto. La muestra se almacenó a 4 °C hasta la medición con HPLC-DAD. El muestreo se repitió después de 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0 horas.

Las concentraciones de ZEN, HZEN y DHZEN fueron analizadas por HPLC-DAD como se describe en *Vekiru et al. (Vekiru et al. (2016) `Isolation and characterisation of enzymatic zearalenone hydrolysis reaction products' World Mycotoxin Journal 9:353-363)*. El análisis se realizó en una HPLC Agilent Serie 1100 equipada con un detector DAD que funciona a 274 nm. Los tiempos de retención de los analitos fueron de 7,03 minutos para ZEN, 5,17 minutos para HZEN y 5,95 minutos para DHZEN cuando la separación se realizó en una columna Zorbax SB-Aq, 4,6×150 mm, 5 µm (Agilent Technologies) a 35 °C utilizando el solvente A: de metanol en agua 20% + acetato de amonio 5 mM y el solvente B: de metanol en agua 90 % + de acetato de amonio 5 mM y con el siguiente gradiente: 0-0,1 min 0 % fase B, 0,1-3 min incremento lineal a 90 % fase B, 3-5 min incremento lineal a 100 % de B que se mantuvo durante 1,9 min, volviendo a 0 % fase B en 0,1 min. La columna fue reacondicionada durante 2,0 minutos antes de comenzar la siguiente corrida. El caudal se fijó en 0,8 ml/min y el volumen de inyección en 15 µl. La cuantificación se basó en la calibración con patrones externos de ZEN, HZEN y DHZEN. La actividad enzimática en unidades por litro (U/l) se calculó a partir de la pendiente del rango lineal de degradación de ZEN determinada a partir de un gráfico de la concentración de ZEN en una muestra en función del punto de muestreo en el tiempo. Para determinar la cantidad de actividad enzimática en una muestra en U/l, la pendiente del rango lineal en un gráfico como se describió anteriormente podría calcularse en ZEN µM por hora y dividirse por 60 para determinar µM/min. Considerando las posibles diluciones e incluyendo estos factores de dilución apropiados en el cálculo, se puede determinar la actividad enzimática en una muestra en U/l. El siguiente ejemplo sirve para

ilustrar: Si la pendiente del rango lineal fue de 10 µM/h, la actividad enzimática de una muestra no diluida fue de 0,17 U/l; calculada según 10 / 60 = 0,17.

[00181] Ejemplo 5: Estabilidad en función de la temperatura de los polipéptidos degradantes de ZEN

[00182] La producción y cuantificación de los polipéptidos degradantes de ZEN se realizó como se describe en los ejemplos anteriores. Para evaluar la estabilidad térmica, las enzimas de degradación de ZEN se incubaron en una solución buffer a diferentes temperaturas antes de ser ensayadas para determinar su capacidad de degradar ZEN en condiciones óptimas. Se tomaron muestras durante la incubación térmica y se calcularon las actividades residuales en relación con un control no tratado térmicamente.

[00183] Para las pruebas de estabilidad térmica, los polipéptidos se diluyeron con buffer de muestra (buffer Teorell Stenhagen, pH 7,5, que contiene 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino) a una concentración de 0,001526923 U/mL y se mantuvieron en hielo hasta su uso posterior. Se transfirieron 40 alícuotas de 50 µl de solución de polipéptido diluido a los tubos de cuatro tiras de 12 tubos (por ejemplo, de starlab), en los que no se utilizaron el primer tubo de cada tira y el último tubo de cada tira, sino que se dejaron vacíos. Las tiras se sellaron con tapas de 12 tiras (por ejemplo, de Starlab). Como controles positivos, se transfirieron cuatro alícuotas de 50 µl de solución enzimática diluida a cuatro tubos de PCR. Todos los tubos y tiras de PCR se mantuvieron en hielo hasta que se inició el paso de incubación a temperatura. Como controles negativos, se transfirieron cuatro alícuotas de 50 µl de buffer de muestra a cuatro tubos de PCR. Estos tubos se almacenaron a 25 °C.

[00184] Las cuatro tiras de 12 tubos se incubaron en un ciclador PCR precalentado con función de gradiente (por ejemplo, el gradiente del Mastercycler de Eppendorf) a una temperatura seleccionada de +/- 10 °C. El gradiente de temperatura (+/- 10 °C de la temperatura seleccionada) a lo largo del *thermoblock* del ciclador PCR fue calculado automáticamente por el ciclador PCR. Los tubos de PCR que contienen los controles positivos se incubaron en hielo, mientras que los que contienen los controles negativos se incubaron a 25 °C. Después de 0, 5, 10 y 20 minutos, se transfirió una tira de PCR y un tubo de control negativo para mantenerlos en hielo hasta el final de la incubación, es decir, 20 minutos después del inicio de la incubación.

[00185] Después de terminar todos los pasos de incubación y de que todas las tiras y tubos estuvieran en hielo, se iniciaron los ensayos de degradación de ZEN.

[00186] Se preparó el buffer del ensayo de degradación de ZEN (buffer Teorell Stenhagen, pH 7,5 que contiene 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino y 5,3 ppm de ZEN) y se transfirieron 660 µl de alícuotas del buffer del ensayo a 48 tubos de reacción. Los tubos se sellaron y se mantuvieron a 25 °C hasta el inicio de los ensayos de degradación de ZEN. Para los ensayos de degradación, se añadieron 40 µl de cada una de las 40 muestras tratadas con temperatura de las tiras de PCR, 40 µl de cada uno de los cuatro controles negativos y 40 µl de cada uno de los cuatro controles positivos a los tubos que contienen el buffer de ensayo de 660 µl, alcanzando así una concentración final de ZEN de 5 ppm en la reacción del ensayo. Además, se logró una concentración final de los polipéptidos para degradar la ZEN eficientemente (es decir, 90 % - 100 % de degradación de ZEN) dentro de las tres horas.

[00187] Al añadir muestras tratadas mediante temperatura, o controles positivos o negativos al buffer del ensayo, se inició el ensayo de degradación. La reacción de degradación de ZEN se incubó en un baño de agua precalentado a 37 °C. Inmediatamente después de iniciar una reacción de degradación, se mezcló por vórtex durante aproximadamente unos 2 segundos y se transfirió una muestra de 0 h de 100 µl a un nuevo tubo de reacción. Se extrajeron muestras adicionales de la reacción del ensayo de degradación de ZEN después de 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0 horas. Tan pronto como fue tomada una muestra de la reacción de degradación, la enzima de esta muestra se desactivó por calor mediante incubación durante 10 minutos a 99 °C. Posteriormente, se centrifugó el tubo (2 minutos, 25 °C, 14674 xg) y se transfirieron 90 µl del sobrenadante a un vial de HPLC con inserto. Estas ampollas de HPLC se almacenaron a 4 °C hasta la medición de HPLC-DAD, como se describe en el Ejemplo 4.

[00188] Utilizando la disminución lineal de la concentración de ZEN determinada por el análisis HPLC-DAD de las muestras de degradación de ZEN, se calcularon las actividades enzimáticas, por ejemplo, en unidades por litro (U/l) o en unidades por mililitro (U/ml). Una unidad se definió como la cantidad de actividad enzimática que degrada un µmol de ZEN en un minuto según las condiciones descritas. Las actividades residuales después de la incubación a diferentes temperaturas durante 0, 5, 10 y 20 minutos se calcularon de la siguiente manera: Actividad enzimática en una muestra tratada a temperatura dividida por el promedio de las actividades enzimáticas de las muestras de 0 minutos, multiplicado por 100.

[00189] La estabilidad térmica (T(50%)) se definió como la temperatura a la que los polipéptidos tienen una actividad residual del 50% después de 10 minutos de incubación en comparación con el control positivo.

[00190] El siguiente ejemplo sirve para ilustrar: La enzima parental tiene una actividad enzimática de 50 U/ml después de una incubación de 10 minutos en hielo y una actividad de 25 U/ml después de una incubación de 10 minutos a 59,3 °C, el valor T(50%) es de 59,3 °C. Si una variante de enzima tiene un valor T(50%) de 61,0 °C, el incremento relativo de la estabilidad térmica (T(50%)) en comparación con la enzima parental es del 2,9%. Esto resulta de la diferencia entre los dos valores de T(50%) de 1,7 °C, dividido por el valor de T(50%) de la enzima parental de 59,3 °C, multiplicado por 100.

[00191] Las mutaciones individuales, así como la combinación de mutaciones, muestran un incremento en la estabilidad térmica, como se muestra en las Figuras 3A y 3B.

[00192] Ejemplo 6: Estabilidad según pH de los polipéptidos degradantes de toxinas ZEN

[00193] Los polipéptidos degradantes ZEN se incubaron en solución buffer con diferentes valores de pH durante una hora antes de ser ensayados para determinar su capacidad de degradar ZEN en condiciones óptimas. Se tomaron muestras regularmente y se analizaron las concentraciones de ZEN, HZEN y DHZEN utilizando mediciones HPLC-DAD.

[00194] Los valores de pH utilizados para el experimento fueron 3,5; 4,0; 4,2; 4,4; 4; 4,8; 5,0 y 6,0. El polipéptido ensayado se transfirió a ocho tubos de muestra con buffer de incubación de ocho pH diferentes. El buffer de incubación fue el buffer medio de *Fed State Simulated Gastric Fluid* sin leche; medio concentrado *(Jantratid et al. (2008) 'Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update.') Pharm Res. 2008 Jul;25(7):1663-76)*, ajustado a pH 3,5; 4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0 y 6,0. Una alícuota de la variante del polipéptido también se transfirió a un tubo que contenía buffer de muestra (buffer de Teorell Stenhagen, pH 7,5, que contiene 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino) como control positivo. La concentración del polipéptido ensayado en la solución de incubación fue de 0,00152626923 U/ml en un volumen de 100 µl. Los tubos se agitaron en vórtex durante aproximadamente unos 2 segundos y se incubaron a 37 °C en un baño de agua precalentado durante una hora. Como control negativo, se incubaron 100 µl de buffer de muestra a 37 °C en un baño de agua precalentado durante una hora. Después de una hora de incubación, se realizaron los ensayos de degradación de ZEN con una concentración final del polipéptido ensayado de 8,62527E-05 U/ml. Para iniciar la reacción de degradación de ZEN, se transfirieron 40 µl de las muestras incubadas a un buffer de ensayo de 660 µl (buffer de Teorell Stenhagen, pH 7,5 que contiene 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino y 5,3 ppm de ZEN).

La adición del buffer de ensayo aseguró un valor de pH constante de 7,5 en todas las muestras. Inmediatamente después de que se iniciara cada reacción, se agitó en vórtex durante unos 2 segundos y se tomó una muestra de 0 h (100 µl) y se transfirió a un nuevo tubo de reacción. La reacción se incubó en un baño de agua precalentado a 37 °C, las muestras extraídas de la reacción se inactivaron por calor mediante incubación durante 10 minutos a 99 °C, se centrifugaron (2 minutos, 25 °C, 14674 xg) y se transfirió el sobrenadante de 90 µl a un vial de HPLC con inserto. La muestra se almacenó a 4 °C hasta la medición con HPLC-DAD. Se tomaron muestras de cada reacción del ensayo de degradación después de 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0 horas. ZEN, HZEN y DHZEN fueron analizados por HPLC-DAD como se describe en el Ejemplo 4 y las actividades fueron calculadas como se describe en el Ejemplo 4.

[00195] Un incremento en la estabilidad frente a pH se definió como un incremento de la actividad residual de una solución de polipéptido después de la incubación a pH 4,0 en comparación con la actividad residual de una solución de enzima parental no mutada después del mismo tratamiento. La actividad residual se definió mediante la comparación de la actividad de la solución de polipéptido tratada con pH con la actividad de la misma solución variante de polipéptido después de la incubación a pH 7,5. La actividad residual se calculó de la siguiente manera: Actividad enzimática de la muestra tratada con pH dividida por la actividad enzimática del control incubado a pH 7,5, multiplicada por 100. El siguiente ejemplo sirve para ilustrar: Si la actividad enzimática de una muestra de polipéptidos después de la incubación a pH 4,0 fue de 0,5 U/l y la actividad enzimática de la misma muestra de polipéptidos después de la incubación a pH 7,5 fue de 2,7 U/l, la actividad residual de esta muestra de polipéptidos sería del 18,5 %. Además, si la actividad residual de una variante del polipéptido después de la incubación a un pH de 4,0 se midió en un 18,5 %, y la actividad residual del polipéptido parental con SEQ ID NO: 1 después de la incubación a un pH de 4,0 se midió en un 2,5 %, el incremento de la estabilidad frente a pH de la variante del polipéptido en comparación con el del polipéptido parental fue de 7,4 veces. En la Fig. 4 se muestran los datos sobre el incremento de la estabilidad frente a pH tras la introducción de las mutaciones aquí descritas.

[00196] Ejemplo 7: Ensayo de variantes de polipéptidos para la desintoxicación de ZEN en cerdos

[00197] Se eligió un total de 12 lechones destetados (hembras; edad 38 días - 40 días) y se asignaron al azar de acuerdo con el ensayo establecido utilizando 12 jaulas individuales

de 1 lechón cada una (4 grupos con 3 jaulas/replicas cada una). Tres grupos de prueba recibieron enzimas de degradación de ZEN y un grupo de control no recibió ninguna enzima de degradación de ZEN. Todos los lechones fueron del genotipo austriaco Ö-HYB-F1 [(Landrace x Large White) x Pietrain]. Todas las jaulas estaban equipadas con suelos de listones, bebederos individuales y comederos individuales. Las condiciones climáticas fueron operadas por computadora, reguladas automáticamente de acuerdo con las recomendaciones estándar para lechones destetados y registradas diariamente.

[00198] Después del alojamiento, todos los lechones fueron alimentados con una dieta que contenía en porcentaje (p/p): 29,70 % de cebada, 10,00 % de trigo, 9,98 % de maíz, 0,27 % de aceite de colza, 15,30 % de soja grasa, 10,94 % de maíz cocido a presión, 5,00 % de proteína de papa, 5,13 % de dextrosa, 3,75 % de semilla de palma, grasa de coco, 3,75 % de lactosa, 1,35 % de lignocelulosa, 1,23 % de fosfato monocálcico, 0,93 % de carbonato de calcio, 0,48 % de cloruro de sodio, 0,25 % de fosfato de magnesio, 0,42 % de premezcla de vitaminas y oligoelementos, 0,70 % de L-Lisina, 0,30 % de L-Treonina, 0,27 % de DL-metionina, 0,15 % de L-Valina, 0,07 % de L-triptofano y 0,02 % de edulcorante.

[00199] Durante el período experimental, la dieta de todos los grupos se complementó con ZEN hasta una concentración final de 500 µg de ZEN/kg de dieta. Para los grupos de prueba se utilizó el polipéptido parental de SEQ ID NO: 1 y dos variantes del polipéptido. Los polipéptidos fueron ensayados en las siguientes concentraciones: 2,5 U/kg dieta, 5 U/kg dieta, 10 U/kg dieta y 20 U/kg dieta. Después de una fase de adaptación de 3 días, la aplicación de los polipéptidos se inició a una concentración de 2,5 U/kg de dieta durante un día seguido de un día de lavado sin polipéptidos y sin ZEN en la dieta. Después del día de lavado, los lechones sin control recibieron la dieta que contenía ZEN con el mismo polipéptido a una concentración de 5 U/kg de dieta seguida de un día de lavado y así sucesivamente. Durante el ensayo, se recolectó la orina durante un período de 12 horas y se tomaron muestras de heces una vez al día. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta la medición LC-MS/MS.

[00200] Para normalizar el volumen de orina excretado, se midió la concentración de creatinina en las muestras de orina. Para determinar el contenido de creatinina, las muestras de orina se diluyeron 1:5000 en agua. Las muestras de orina se diluyeron con agua hasta una concentración final de creatinina 2,5 mM. Se mezclaron 100 µl de muestra de orina diluida con 20 µl de buffer PBS 100 mM que contenía 528 U de beta-glucuronidasa y se incubaron a 37 °C durante la noche. Tras la incubación nocturna, se añadieron 380 µl de metanol frío, centrifugado a 14674 xg, los sobrenadantes se transfirieron a viales de HPLC y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis. Para el análisis de las muestras de heces, se

extrajeron 500 mg de heces liofilizadas tres veces (90, 30 y 30 minutos) con 5 ml de acetonitrilo/agua (50/50, v/v) cada una. Después de cada paso de extracción, las muestras fueron clarificadas por centrifugación (10 min, 14674 xg). Se centrifugaron alícuotas de los sobrenadantes agrupados y se midieron mediante HPLC-MS/MS. Los análisis se realizaron en un sistema UHPLC Agilent serie 1290 acoplado a un espectrómetro de masa 6500 QTrap. La temperatura de la columna se fijó en 30 °C y el caudal en 0,25 ml/min. Las fases móviles A y B consistieron en agua/ácido acético y acetonitrilo/ácido acético (ambos 99,9/0,1, v/v), respectivamente. El gradiente comenzó con un 5 % de B durante 0,5 minutos y continuó con un incremento lineal hasta el 36 % de B hasta 17,0 minutos, y un incremento lineal hasta el 100 % de B entre 17,0 y 22,0 minutos, seguido de 100 % de B hasta 24,0 minutos y un marcado descenso hasta el 5 % de B entre 24,0 y 24,1 minutos. Finalmente, la columna se reequilibró al 5% de B hasta los 27,0 min. El volumen de inyección fue de 2 µl para las muestras de orina y de 3 µl para las muestras de heces. La separación se realizó en una columna Phenomenex Kinetex C18 (150x2,1 mm, 2,6 µm). La cuantificación se basó en la calibración con patrones externos de ZEN, α-ZEL, HZEN y DHZEN. α-ZEL es un metabolito de ZEN con mayor estrogenicidad y se produce en cerdos por biotransformación hepática (*Malekinejad et al. (2006) 'Hydroxysteroid dehydrogenases in bovine and porcine granulosa cells convert zearalenone into its hydroxylated metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol. Vet Res Commun:445-53*). En la Figura 5 se muestran los parámetros seleccionados para el monitoreo de la reacción (SRM).

[00201] Se ensayaron dos variantes, variante A y variante B, del polipéptido con SEQ ID NO: 1, además del polipéptido con SEQ ID NO: 1.

[00202] La variante A comprende las siguientes mutaciones en comparación con SEQ ID NO: 1: V160A/G185R/A186R/A188H/G199E/I200V/H203N/Q205K.

[00203] La variante B comprende las siguientes mutaciones en comparación con SEQ ID NO: 1: V160A/G185R/A186R/A188H/S189D/P190H/M191D/G199E/I200V/H203N/Q205K.

[00204] Los resultados de los análisis de muestras de orina y heces se muestran en las figuras 6 y 7. El cambio en las concentraciones combinadas de ZEN más α-ZEL en comparación con SEQ ID NO: 1 en porcentaje resulta de la diferencia entre las concentraciones de los dos grupos, dividida por la concentración del grupo con SEQ ID NO: 1, multiplicada por 100. El incremento de la concentración de ZEN sumada a α-ZEL durante el ensayo de alimentación en el grupo control que no recibió un polipéptido degradante de ZEN en su dieta puede deberse a la circulación enterohepática de ZEN y derivados de ZEN

en los cerdos y, por consiguiente, a una acumulación de los mismos (*Biehl et al. (1993)* ` *Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs'. Toxicol Appl Pharmacol. 1993 Jul;121(1):152-9*).

[00205]

[00206] Ejemplo 8: Ensayo de varias concentraciones de un polipéptido para la desintoxicación de ZEN en pollos de engorde

[00207] Para el ensayo de alimentación, se utilizaron pollos de engorde de 90 días de edad y de sexo mixto (Ross 308). Las aves fueron alimentadas con dos dietas diferentes en dos fases. Durante el periodo de adaptación, las aves recibieron la dieta de la fase 1 (periodo vivo día 1-14), durante el periodo experimental las aves recibieron la dieta de la fase 2 (periodo vivo día 15 - 28). Composición de la dieta de la fase 1 en porcentaje (p/p): 55,00 % maíz, 29,00 % soja HP, 1,00 % aceite de girasol, 6,92 % soja grasa, 0,72 % concentrado de proteína de soja, 1,88 % semilla de palma, grasa de coco, 1,96 % carbonato de calcio, 1,89 % fosfato monocálcico, 0,35 % de bicarbonato sódico, 0,23 % cloruro sódico, 0,13 % fosfato magnésico, 0,24 % premezcla de vitaminas y elementos traza, 0,34 % L-lisina, 0,12 % L-treonina y 0,24 % DL-metionina.

[00208] Composición de la dieta de la fase 2 en porcentaje (p/p): 62,00 % maíz, 23,80 % soja HP, 2,00 % aceite de girasol, 5,53 % soja grasa, 0,58 % concentrado de proteína de soja, 1,50 % semilla de palma, grasa de coco, 1,56 % carbonato cálcico, 61 % de fosfato monocálcico, 0,28 % de bicarbonato sódico, 0,19 % de cloruro sódico, 0,10 % de fosfato magnésico, 0,19 % de premezcla de vitaminas y elementos traza, 0,27 % de L-lisina, 0,10 % de L-treonina y 0,20 % de DL-metionina.

[00209] Para el período de adaptación (14 días), las aves se distribuyeron aleatoriamente en 3 jaulas. Después del período de adaptación, las aves fueron distribuidas uniformemente por peso promedio en 7 jaulas (grupos) con 8 aves cada una. La duración del ensayo fue de 14 días. Las condiciones climáticas fueron reguladas de acuerdo con las recomendaciones estándar de la empresa de cría. La alimentación se hizo manualmente una vez al día. El alimento y el agua estuvieron disponibles ad libitum. La concentración de ZEN en la dieta fue de 400 µg ZEN/kg de dieta. El grupo control fue alimentado con una dieta que contenía 400 µg de ZEN por kg de dieta, sin la adición de ninguna enzima que degradara la ZEN. La variante A del polipéptido (SEQ ID NO: 1 que comprende las siguientes mutaciones V160A/G185R/A186R/A188H/G199E/I200V/H203N/Q205K) se probó en las siguientes concentraciones: 5 U/kg dieta, 10 U/kg dieta, 20 U/kg dieta, 40 U/kg dieta, 80 U/kg dieta y 160

U/kg dieta. Después de la eutanasia, se tomaron muestras de cultivos de las aves al principio y al final del ensayo. Las muestras fueron congeladas y liofilizadas. Para el análisis de ZEN, HZEN y DHZEN, se pesó 1 g de cada muestra en un tubo de 50 ml y se extrajo dos veces con 15 ml de acetonitrilo 80 % en un agitador rotatorio a 25 °C durante 30 minutos. A continuación, el tubo se centrifugó durante 10 minutos a 2300 xg, 25 °C, y los sobrenadantes se combinaron en un nuevo tubo de 50 ml. Se centrifugó de nuevo 1 ml durante 5 minutos a 2300 xg, 25 °C, y el sobrenadante se transfirió a un vial para la medición de LC-MS/MS. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta la medición y se analizaron mediante LC-MS/MS. Los análisis se realizaron en un sistema UHPLC Agilent serie 1290 acoplado a un espectrómetro de masa 6500+ QTrap. La temperatura de la columna se fijó en 30 °C y el caudal en 0,25 ml/min. Las fases móviles A y B consistieron en agua/ácido acético y acetonitrilo/ácido acético (ambos 99,9/0,1 v/v), respectivamente. El gradiente comenzó con un 15 % de B durante 0,5 minutos y continuó con un incremento lineal hasta el 60 % de B hasta 13,5 minutos, y un incremento pronunciado hasta el 100 % de B entre 13,5 y 14,0 minutos, seguido de un 100 % de B hasta 16,9 minutos y un descenso pronunciado hasta el 15 % de B entre 16,9 y 17,0 minutos. Finalmente, la columna se reequilibró al 15 % de B hasta 20,0 min. El volumen de inyección fue de 2 µl. La separación se realizó en una columna Phenomenex Kinetex C18 (150x2,1 mm, 2,6 µm). La cuantificación se basó en la calibración con patrones externos de ZEN, HZEN y DHZEN. Los parámetros seleccionados para el monitoreo de la reacción (SRM) se muestran en la Figura 8.

[00210] Los resultados del análisis de las muestras de cultivos al final del ensayo se muestran en la Figura 9. La reducción de la concentración de ZEN en porcentaje se calculó de la siguiente manera: (concentración ZEN del grupo de control menos la concentración ZEN de un grupo de muestra) dividida por la concentración ZEN del grupo de control multiplicada por 100.

Listado de referencias

Altschul Nucl. Acids Res. 25 (1977), 3389-3402

Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300

Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410

Biehl et al. (1993) ‘Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenona in immature pigs.’ Toxicol Appl Pharmacol. 1993 Jul;121(1):152-9

Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245

Burnley and Gros (2012) ‘phenix.ensemble_refinement: a test study of apo and holo BACE1‘Computational crystallography newsletter, volume 4, pp. 51 – 58

Cregg, Pichia Protocols, second Edition, ISBN-10: 1588294293, 2007

PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993)

Elmar Krieger, Bioinformatics 30,2981-2982

Gasteiger E. et al.; *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, in John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 2005, pp. 571-607

Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, (1989), 10915

Henikoff and Henikoff (1992) ‘Amino acid substitution matrices from protein blocks.‘ Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 15;89(22):10915-9

Jantratid et al. (2008) ’Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update.’ Pharm Res. 2008 Jul;25(7):1663-76

Jones (1999) ‘Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices’ J.Mol.Biol. 292:195-202

POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983), pgs. 1-12; Seifter, Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646

Kourist et al. (2010) ‘The alpha/betaα/β-hidrolasafold 3DM database (ABHDB) as a tool for protein engineering.’ Chembiochem. 11(12):1635-43

Kurtzman (2009) “Biotechnological strains of Komagataella (Pichia) pastoris are Komagataella phaffii as determined from multigene sequence analysis.” J Ind Microbiol Biotechnol. 36(11):1435-8

Kyte and Doolittle (1983) "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein". J. Mol. Biol. 157 (1): 105–32

Lenfant et al. (2013) 'ESTHER, the database of the α/βα/β-hidrolasafold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions' Nucleic Acids Research, Volume 41, Issue D1, D423–D429

Malekinejad et al. (2006) 'Hidroxisteroid dehydrogenases in bovine and porcine granulosa cells convert zearalenona into its hidroxilated metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol. Vet Res Commun:445-53

Mindrebo et al. (2016) 'Unveiling the functional diversity of the Alpha-Beta α/β-hidrolasa fold in plants' Curr Opin Struct Biol. 233–246

Ollis et al. (1992) 'The alpha/beta α/β-hidrolasa fold' Protein Eng. 5(3):197-211

Rattan, Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992); 48-62

Schatzmayr and Streit (2013) 'Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: Facts and figures.' World Mycotoxin Journal 6(3):213-222

Sambrook et al. 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4th Edition, Cold Spring Harbor

Stenhagen & Teorell. (1938) Nature 141, 415

Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680

Vekiru et al. (2016) 'Isolation and characterisation of enzymatic zearalenona hydrolysis reaction products' World Mycotoxin Journal 9:353-363)

Yamada et al. (1995) 'The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae)' Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, Vol. 59, issue 3, pp. 439-444).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ERBER AG
<120> MEDIOS Y MÉTODOS PARA EL CLIVAJE DE ZEARALENONA
<130> P4757AR00
<160> 11
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 309
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio alfa/beta hidrolasa

<400> 1
Met Val Thr Ser Pro Ala Leu Arg Asp Val His Val Pro His Ala Tyr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

210 215 220

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Ala Pro
305

<210> 2
<211> 308
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio alfa/beta hidrolasa

<400> 2
Met Ala Asp Pro Ala Gln Arg Asp Val Tyr Val Pro His Ala Tyr Pro
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Ala Ala
305

<210> 3
<211> 309
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio alfa/beta hidrolasa

<400> 3
Met Val Thr Ser Pro Ala Leu Arg Asp Val His Val Pro His Ala Tyr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Ala Pro
305

<210> 4
<211> 309
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio alfa/beta hidrolasa

<400> 4
Met Val Thr Ser Pro Ala Leu Arg Asp Val His Val Pro His Ala Tyr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Ala Pro
305

<210> 5
<211> 309
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio alfa/beta hidrolasa

<400> 5
Met Val Thr Ser Pro Ala Leu Arg Asp Val His Val Pro His Ala Tyr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

210 215 220

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Ala Pro
305

<210> 6
<211> 328
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio alfa/beta hidrolasa

<400> 6
Met Ala Glu Glu Gly Thr Arg Ser Glu Ala Ala Asp Ala Ala Thr Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Thr Leu Pro Ala Asn Asp
325

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

<220>
<223> Motivo

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> X es cualquier aminoácido
<400> 7
Gln Xaa Ala Gly Pro
1 5

<210> 8

<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Motivo

<400> 8
Glu Tyr Asp Pro Glu
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Motivo

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> X es F o Y
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
<222> (3)..(4)
<223> X es cualquier aminoácido
<400> 9
Gly Xaa Xaa Xaa Ala Ala
1 5

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Motivo

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
<222> (3)..(3)
<223> X es cualquier aminoácido
<400> 10
Ala Arg Xaa Phe
1

<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Motivo

<400> 11
Gln Leu Phe Pro
1

Descripción
PCT/EP2019/070434
Diciembre 30, 2020