

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/025657 A1

(43) Fecha de publicación internacional
1 de marzo de 2012 (01.03.2012)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12P 17/06 (2006.01) C12R 1/13 (2006.01)
C07D 311/76 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070557

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de julio de 2011 (28.07.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201031188 29 de julio de 2010 (29.07.2010) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES];
C/ Serrano 117, E-28006 Madrid (ES). **CENTRO DI RICERCA PER L'ENOLOGIA (CRA-ENO)** [IT/IT];
Via Pietro Micca, 35, I-14100 Asti (IT).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **MUÑOZ MORENO, Maria Rosario** [ES/ES]. **RODRÍGUEZ LÓPEZ, Héctor** [ES/ES]. **DE LAS RIVAS GONZÁLEZ DEL REY, Blanca** [ES/ES]. **REVERÓN POJÁN, Inés** [IT/IT]. **GARCÍA MORUNO, Emilia** [IT/IT]. **DORIA, Francesca** [IT/IT]. **COSTANTINI, Antonella** [IT/IT].

(74) Mandatario: **RUO, Alessandro**; C/ Padre Recaredo De Los Rios, 30 Entlo, E-03005 Alicante (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: BIOLOGICAL DEGRADATION OF OCHRATOXIN A INTO OCHRATOXIN α

(54) Título : DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE OCRATOXINA A EN OCRATOXINA α

(57) Abstract: The invention relates to the use of a microorganism of the genus *Brevibacterium* for the biological degradation of ochratoxin A, in which the microorganism is preferably *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium iodinum* or *Brevibacterium epidermidis*. In addition, the invention relates to a method for the production of ochratoxin α using said microorganism.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de un microorganismo del género *Brevibacterium* para la degradación biológica de ocratoxina A, preferiblemente el microorganismo es *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium iodinum* o *Brevibacterium epidermidis*. Además, la presente invención se refiere a un método para la producción de ocratoxina α , mediante el uso de dicho microorganismo.



WO 2012/025657 A1

Degradación biológica de ocratoxina A en ocratoxina α

La presente invención se refiere al uso de un microorganismo del género *Brevibacterium* para la degradación biológica de ocratoxina A, preferiblemente el microorganismo es *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium iodinum* o *Brevibacterium epidermidis*. Además, la presente invención se refiere a un método para la producción de ocratoxina α , mediante el uso de dicho microorganismo.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por numerosas especies de mohos, principalmente pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Actualmente se conocen más de 300 micotoxinas, entre las que se incluyen las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenona, citrinina y patulina entre otras. Aunque la toxicidad aguda y subaguda de algunas micotoxinas es bien conocida, preocupan más los efectos de su ingestión a largo plazo, puesto que las pequeñas cantidades ingeridas con los alimentos de forma continuada se acumulan en el organismo pudiendo producir, en algunos casos, efectos mutagénicos y cancerígenos (Martín et al., 1990. Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, 30: 315-332).

Las ocratoxinas son un grupo de micotoxinas producidas sobre diferentes sustratos por algunas especies de hongos, entre las cuales destacan los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Aunque existen varios tipos de ocratoxinas, la ocratoxina A (OTA) es la más tóxica. Debido a que estos mohos son capaces de crecer en una amplia variedad de alimentos, la OTA puede encontrarse en productos cárnicos y lácteos, cacao, frutas, cereales, café, aceite de oliva, frutos secos, especias, alimentos infantiles y productos fermentados como el vino y la cerveza entre otros, en condiciones de humedad, pH y temperatura muy variables (Engelhardt G. et al., 1999. Adv. Food Sci. 21, pag. 88-92;

Romani S., et al., 2000. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, pag. 3616–3619).

La OTA es un derivado de la isocumarina que por el grupo carboxilo presenta
5 unida una L- β - fenilalanina. Químicamente es N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-
3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil]-L-fenilalanina, una
dihidrocumarina clorada unida a través de un grupo carboxilo por una unión
amida a una molécula de L- β -fenilalanina. Otros tipos de ocratoxinas son la
ocratoxina B (OTB), derivado no clorado de la OTA y menos tóxica, ocratoxina
10 C (OTC), éster de la OTA, con un escaso potencial tóxico, ocratoxina α (OT α) y
ocratoxina β (OT β), productos de la hidrólisis de la OTA y OTB,
respectivamente, que no poseen la molécula de fenilalanina y no se consideran
tóxicos (Pavón et al., 2007. RCCV Vol. 1 (2)).

15 En los últimos años, las ocratoxinas y en particular la ocratoxina A, han recibido
una especial atención, debido a su elevado poder toxicológico. La ocratoxina A,
que tiene un marcado carácter nefrotóxico, se ha relacionado con
enfermedades graves, como la “nefropatía endémica de los Balcanes” o
tumores en el tracto urinario en personas y la “nefropatía espontánea porcina” o
20 la “nefropatía aviar” en los animales. Además, los estudios realizados con
animales y en líneas celulares humanas han puesto de manifiesto sus
propiedades carcinogénicas, genotóxicas, inmunotóxicas, hepatotóxicas,
neurotóxicas y teratogénicas (Kuiper-Goodman, T. 1996. *Food Addit. Contam.*
13, pag. 53–57) y se ha detectado en sangre humana después del consumo de
25 alimentos contaminados con ella (Petkova-Bocharova, T. et al., 1988. *Food*
Addit. Contam. 5, pag. 299–301).

Por ello, y para garantizar la salud de los consumidores expuestos a esta
micotoxina, en la Unión Europea se han fijado límites en la concentración de
30 OTA permitida en cereales, pasas, café tostado en grano o molido, café
instantáneo, vinos y mostos de uva y especias. Los límites varían de acuerdo
con la materia prima, pero se encuentran en un rango de 2-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En el

caso de frutos secos derivados de la vid el valor permitido es de 10 µg/kg y el límite para cereales no procesados es de 5 µg/kg, mientras que para productos de cereales procesados destinados al consumo humano directo es de 3 µg/kg. Sin embargo, se ha establecido un límite menor de 0,5 µg/kg para los alimentos procesados a base de cereales cuando éstos están destinados a lactantes y a niños (European Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 del 19 de diciembre de 2006). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto 5 µg/kg como límite máximo de OTA en cereales.

10 A través del Reglamento UE 105/2010, se fija por primera vez y con carácter temporal para las especias y regaliz un contenido máximo de ocratoxina A, que entra en vigor este mes de julio y que será más estricto a partir de 2012. En el caso de las especias se establecen la concentración máxima de 30 µg/kg desde el 1.7.2010 hasta el 30.6.2012, y de 15 µg/kg a partir del 1.7.2012. Las
15 especias consideradas son: *Capsicum* spp. (frutos de dicho género secos, enteros o pulverizados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón), *Piper* spp. (frutos, con inclusión de la pimienta blanca y negra), *Myristica fragrans* (nuez moscada), *Zingiber officinale* (jengibre), *Curcuma longa* (cúrcuma), y mezclas de especias que contengan una o más de las
20 especias antes mencionadas.

Debido por tanto a que OTA representa un problema real en el sector alimentario por su toxicidad y alta presencia en una gran cantidad de alimentos y bebidas, resulta necesario reducir los niveles de esta micotoxina presente en
25 los alimentos. En este contexto, se buscan métodos fiables capaces de degradar esta micotoxina.

En la industria del café, por ejemplo, se ha descrito que la descafeinización con solventes reduce significativamente los niveles de OTA (Heilmann W. et al.,
30 1999. Eur. Food Res. Technol. 209, pag. 297–300), además, la aplicación de tratamientos con ozono se propone también como método de destoxificación de los granos contaminados con OTA (McKenzie K.S. et al., 1997. Food Chem.

Toxicol. 35, pag. 807–820). Por otra parte, en bodegas se han realizado diversos estudios para reducir la presencia de OTA en mostos de vinos y en vinos entre los que se incluyen diferentes procedimientos de descontaminación basados en la eliminación físico- química de la toxina (Castellari M. et al., 2001. J. Agric. Food Chem. 49, pag. 3917–3921; Dumeau F., y Trionè D., 2000. Rev. Fr. Oenol. 95, pag. 37–38; Garcia-Moruno E. et al., 2005. Am. J. Enol. Vitic. 56, pag. 73–76).

La utilización de métodos físicos o químicos para la descontaminación de micotoxinas puede eliminar, además de la micotoxina, muchas sustancias importantes desde el punto de vista organoléptico o nutricional. Por ello, los métodos de degradación biológica de toxinas constituyen una estrategia muy prometedora actualmente.

Respecto a la descontaminación biológica de OTA, en la literatura científica se han descrito enzimas con actividad carboxipeptidasa A (CPA), como la CPA de páncreas bovino (Sigma), capaces de degradar OTA. Estas enzimas hidrolizan el enlace amídico en la molécula de OTA con la producción de L-fenilalanina y ocratoxina α (OT α) (Pitout M.J. 1969. Biochem Pharmacol 18, pag. 485–491).

Posteriormente se ha descrito que algunos microorganismos poseen un mecanismo de acción en la degradación de OTA similar al que llevan a cabo las enzimas CPA, como por ejemplo *Phenylobacterium immobile* (Wegst W. y Lingens F. 1993. FEMS Letters 17, pag. 341–344), *Acinetobacter calcoaceticus*, (Hwang C.A., y Draughon F.A. 1994. J. Food Prot. 57, pag. 410–414) ó *Aspergillus niger* (Abrunhosa L. y Venancio A. 2007. Biotechnol. Lett. 29, pag.1909–1914). Además es conocido que algunas cepas de *Rhodococcus* son capaces de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos, como por ejemplo *Rhodococcus erythropolis* que recientemente se ha visto que puede degradar aflatoxina B1, una micotoxina estructuralmente diferente a OTA. (Teniola O.D. et al., 2005. Int. J. Food Microbiol. 105, pag. 111–117).

Sin embargo, aunque los resultados obtenidos tienen importantes implicaciones en seguridad alimentaria, ninguno de los microorganismos mencionados en el párrafo anterior y con capacidad para degradar OTA se utilizan en la industria alimentaria.

5

Por tanto, a pesar de que se han descrito distintos tratamientos basados en métodos físicos, químicos y biológicos para reducir los niveles de ocratoxina A, por ahora ninguno de los tratamientos descritos se pueden utilizar para la destoxificación de OTA en alimentos.

10

Entre los procedimientos físico-químicos habitualmente utilizados se incluyen lavados físicos-químicos, tratamientos con materiales absorbentes, extracción con solventes, etc. Estos métodos son costosos y pueden eliminar también diversos nutrientes o compuestos importantes desde un punto de vista organoléptico. Por otra parte, actualmente no existe ningún tratamiento biológico empleado para reducir el contenido de OTA en alimentos, bebidas y piensos para animales debido a que ninguno de los microorganismos que se han descrito y con capacidad para degradar OTA están relacionados con alimentos.

20

Por tanto, existe una dificultad manifiesta a la hora de encontrar un método adecuado para la degradación de ocratoxina A en productos alimentarios de forma que no se alteren las características del alimento tanto desde el punto de vista organoléptico como nutricional.

25

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de un microorganismo perteneciente al género *Brevibacterium* para la degradación biológica de ocratoxina A. Además, la presente invención se refiere al uso de dicho microorganismo para la producción de ocratoxina α que procede de la degradación biológica de ocratoxina A. Este microorganismo se puede utilizar para la degradación

30

biológica de ocratoxina A en productos alimentarios.

La presente invención provee un método para la degradación biológica de ocratoxina A mediante *Brevibacterium* generando OT α , un producto no tóxico para rumiantes (Kießling et al., 1984. Applied and environmental microbiology, 47(5): 1070-1073) o en otros mamíferos (*Application for the Approval of the use REGENASURE® Non-Shellfish Glucosamine Hydrochloride from Aspergillus niger (RGHAN), for use in Certain Foods Products under Regulation (EC) No 258/97 for the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. FINAL NON-CONFIDENTIAL 4 August, 2006*).

Es de destacar que en la presente invención se ha estudiado el potencial de diferentes cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Brevibacterium* y *Rhodococcus*. Sin embargo, y a pesar de que todas las cepas ensayadas tienen una demostrada actividad en la degradación de compuestos orgánicos, como por ejemplo *Rhodococcus erythropolis* que, como se ha comentado anteriormente, es capaz de degradar aflatoxina B1, una micotoxina estructuralmente diferente a OTA, a lo largo de la presente invención (Ejemplo 1, Tabla 1) se demuestra que de las cepas ensayadas sólo las pertenecientes al género *Brevibacterium* son capaces de degradar OTA, siendo dicha actividad una característica común de todas las cepas pertenecientes a dicho género.

El género *Brevibacterium* se incluye entre las *Actinobacterias*, bacterias Gram positivas que aunque incluye especies aisladas del suelo, la mayoría de las especies de este género se han aislado de leche y quesos, como por ejemplo, pero sin limitarse, *B. linens*, *B. casei* y *B. iodinum* las cuales se utilizan en la industria alimentaria para aplicaciones tales como la formación de aroma, la coloración de la superficie y la maduración de varios tipos de queso.

Por tanto, la presente invención describe un método adecuado para la degradación de ocratoxina A en productos alimentarios de forma que no se

alteren las características del alimento tanto desde el punto de vista organoléptico como nutricional. Además se ha comprobado que la degradación de esta micotoxina mediante la utilización de *Brevibacterium* da lugar a la síntesis de ocratoxina α . Por todo ello, la presente invención proporciona un método para la destoxificación biológica de OTA y la síntesis de OT α en alimentos mediante la utilización de microorganismos del género *Brevibacterium*.

Por tanto, mediante la presente invención se aporta al estado de la técnica una solución al problema de la degradación de ocratoxina A en productos alimentarios mediante un método biológico, respetuoso con las características organolépticas y nutricionales del alimento, basado en el uso de un microorganismo perteneciente al género *Brevibacterium*, ampliamente utilizado en la industria alimentaria del queso, microorganismo que no se ha relacionado con la degradación de Ocratoxina hasta el momento.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un microorganismo perteneciente al género *Brevibacterium* para la degradación biológica de ocratoxina A. El microorganismo se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende preferentemente microorganismos de las especies *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium iodinum* o *Brevibacterium epidermidis*.

En adelante, para hacer referencia a cualquier microorganismo perteneciente al género *Brevibacterium* se emplea el término "microorganismo de la presente invención" o "microorganismo de la invención".

El término "degradación biológica" hace referencia a la transformación de una sustancia compleja en otra de estructura más sencilla por medio de microorganismos. Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término degradación biológica hace referencia a la transformación de ocratoxina A por medio de un microorganismo de la invención. La transformación de ocratoxina

A da lugar a la aparición de otras sustancias, como por ejemplo, pero sin limitarse ocratoxina α . La ocratoxina A puede estar presente en muchos tipos de sustrato como por ejemplo pero sin limitarse, un producto alimentario, donde dicho producto alimentario es, preferentemente, un cereal o una especia.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención, donde la degradación biológica tiene lugar en, al menos, un producto alimentario.

- 10 El término "producto alimentario" tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a todas aquellas sustancias o productos de cualquier naturaleza, sólidos o líquidos, naturales o transformados que, por sus características, aplicaciones, componentes, preparación y estado de conservación son susceptibles de ser habitual e idóneamente utilizados para la
- 15 normal nutrición humana o animal, como fruitivos o como productos dietéticos, en casos especiales de alimentación. Así como a todas las materias no nocivas, en sentido absoluto o relativo, que, sin valor nutritivo, puedan ser utilizadas en la alimentación, tanto humana como animal. Preferentemente, el producto alimentario está destinado al consumo humano o al consumo animal,
- 20 y debido a que los contenidos más altos de ocratoxina se encuentran en los cereales, preferentemente, el producto alimentario es un cereal o una especia obtenida a partir de la planta que se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Capsicum* spp., *Piper* spp., *Myristica fragrans*, *Zingiber officinale* (jengibre), *Curcuma longa* (cúrcuma), o cualquiera de sus mezclas. Además, el
- 25 producto alimentario puede ser regaliz.

- Diferentes estudios (como por ejemplo Abrunhosa L. et al., 2002. J. Sgric. Food Chem. 50, pag. 7493-7496) demuestran que la hidrólisis enzimática de OTA con la enzima CPA da como resultado dos compuestos, uno de los cuales
- 30 posee un tiempo de retención cercano al del estándar de OT α (obtenido mediante la hidrólisis ácida de OTA).

Por otro lado, en los ejemplos de la invención se puede ver que las cepas de *Brevibacterium* no sólo son capaces de degradar OTA completamente (ver ejemplo 2) sino que estudios más específicos con *B. casei* RM101 y *B. linens* DSM 20425^T (ver ejemplo 3) indican también que ambas cepas pudieron crecer en ausencia de glicerol en un medio de cultivo que contenía OTA como única fuente de carbono. Además, las cantidades detectadas de OT α en los sobrenadantes de los cultivos en ambas cepas, se correspondían con la concentración teórica producida a partir de la hidrólisis completa de OTA añadida al medio (Ejemplo 3, Tabla 3).

10

Con todos estos datos se puede concluir que la hidrólisis de OTA puede dar lugar a L-fenilalanina y OT α , pero la L-fenilalanina liberada durante el proceso puede ser utilizada como fuente de carbono durante el crecimiento bacteriano corroborando que los diferentes extractos de *B. linens* ensayados contienen una enzima con actividad carboxipeptidasa y que, una vez ha hidrolizado el enlace amídico de la molécula de OTA produciendo OT α y L-fenilalanina, actúan otras enzimas en las L-fenilalaninas obtenidas metabolizándolas, explicando así, que en los ejemplos de la presente invención sólo se obtenga OT α .

20

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de, al menos una molécula con actividad biológica producida por el microorganismo de la invención, para la degradación biológica de OTA donde preferentemente la molécula con actividad biológica según el aspecto anterior es una proteína capaz de degradar OTA en, al menos, OT α . Esta proteína preferentemente es una enzima con actividad carboxipeptidasa.

25

En adelante, para hacer referencia a cualquier molécula con actividad biológica producida por el microorganismo de la invención, capaz de degradar ocratoxina A en, al menos, ocratoxina α según el párrafo anterior, se puede emplear el término “molécula de la presente invención”, “molécula de la invención”, “proteína de la presente invención” o “proteína de la invención”.

30

Aunque el genoma del microorganismo *Brevibacterium linens* no está completamente secuenciado, ya hay más de 50 proteínas anotadas con función de "peptidasas" de las cuales 6 son carboxipeptidasas cuyas secuencias aminoacídicas vienen definidas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Por ello, la enzima con actividad carboxipeptidasa según se describe en el párrafo anterior puede poseer una secuencia aminoacídica que se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

10

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende el microorganismo de la invención y/o la molécula de la invención para la degradación biológica de ocratoxina A.

Además, debido a que como ya se ha comentado, la degradación de OTA por bacterias de *Brevibacterium* spp. observada en este estudio da como resultado OT α (ver ejemplo 3), otro aspecto se refiere al uso del microorganismo de la invención, la molécula de la invención, o la composición que comprende el microorganismo de la invención o que comprende la molécula de la invención, o al uso de cualquiera de las combinaciones de los productos anteriores, para la producción de OT α que procede de la degradación biológica de ocratoxina A.

20

Otro aspecto de la presente invención se refiere al método para la degradación biológica de ocratoxina A, en adelante "primer método de la invención" que comprende:

25

- a. utilizar al menos una bacteria perteneciente al género *Brevibacterium*,
- b. poner en contacto la bacteria del paso (a) con una solución acuosa y,
- c. poner en contacto el producto obtenido en el paso (b) con ocratoxina A.

30

En una realización preferida del primer método de la invención, la solución acuosa del paso (b) permite la supervivencia de la bacteria utilizada en el paso (a) perteneciente al género *Brevibacterium*.

- 5 En una realización aún más preferida del primer método de la invención, la degradación biológica de OTA produce OT α . Y, en otra realización aún más preferida, el producto en el paso (c) se pone en contacto con un producto alimentario que contiene ocratoxina A, es decir, en el paso (c) se pone en contacto el producto obtenido en el paso (b) con OTA a través de un producto
- 10 alimentario que contiene esta micotoxina. Preferentemente el producto del paso (c) se pone en contacto con el producto alimentario por nebulización.

En una realización más preferida del primer método de la invención, el producto obtenido en el paso (c) se incuba a una temperatura de entre 10 y 50 °C

15 durante un tiempo de entre 1 hora y 20 días.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al método para la degradación biológica de OTA, en adelante “segundo método de la invención” que comprende:

20

- a. utilizar al menos una molécula con actividad biológica o molécula de la invención, aislada de una bacteria perteneciente al género *Brevibacterium*,
- b. poner en contacto la molécula con actividad biológica obtenida en el

25 paso (a) con ocratoxina A, y

- c. incubar el producto obtenido en el paso (b) a una temperatura de entre 10 y 50 °C durante un tiempo de entre 30 minutos y 30 días.

donde la degradación biológica de OTA según el segundo método de la

30 invención produce ocratoxina α .

En una realización preferida del segundo método de la invención, la molécula en el paso (b) se pone en contacto con un producto alimentario que contiene OTA, es decir, en el paso (b) se pone en contacto la molécula obtenida en el paso (a) con OTA a través de un producto alimentario que contiene esta micotoxina.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Cromatograma del análisis del sobrenadante de *B. casei* RM101 cultivado en medio salino basal sin fuente de carbono pero con OTA (40 mg/L). Detector fluorimétrico, λ_{Ex} (longitud de onda de excitación) = 330nm; λ_{Em} (longitud de onda de emisión) =460nm.

1A. Muestra el sobrenadante a tiempo 0 (T_0). En el eje de ordenadas se representa la absorbancia medida en LU (unidades de luminiscencia) y en el eje de abscisas se representa el tiempo medido en minutos (min.).

1B. Muestra el sobrenadante después de 10 días de crecimiento. Puede observarse la desaparición del pico de OTA y la aparición del pico de OT α . En el eje de ordenadas se representa la absorbancia medida en LU (unidades de luminiscencia) y en el eje de abscisas se representa el tiempo medido en minutos (min.).

30

FIG. 2. Espectros UV/VIS (ultravioleta/visible) de OT α , en el sobrenadante de *B. casei* RM101 cultivado en medio salino basal sin fuente de carbono

pero con OTA (40 mg/L).

2A. Muestra el espectro de ocratoxina α obtenido con el detector de diodo Array (DAD). En el eje de ordenadas se representa la absorbancia medida en mAU (mili-unidad de absorción) y en el eje de abscisas se representa la longitud de onda medida en nanómetros (nm.).

2B. Muestra el espectro de ocratoxina α obtenido con el detector fluorimétrico (FLD). En el eje de ordenadas se representa la absorbancia medida en LU (unidades de luminiscencia) y en el eje de abscisas se representa la longitud de onda medida en nanómetros (nm.). Longitud de onda de excitación (λ_{ex}) =330 nm.

FIG. 3. Espectro de masas de OT α en el sobrenadante de *B. casei* RM101 cultivado en medio salino basal sin fuente de carbono pero con OTA (40 mg/L).

En el eje de ordenadas se representa la abundancia de iones y en el eje de abscisas se representa la relación masa/número de carga (m/z).

20

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante una serie de ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la alta eficacia que poseen los microorganismos pertenecientes al género *Brevibacterium* para transformar la micotoxina OTA en OT α . Se muestra como la OTA es degradada completamente por *Brevibacterium* y como esta degradación da lugar a la síntesis de OT α .

30 Además, debido al creciente uso de estos microorganismos en la industria alimentaria, resultan altamente recomendables para ser utilizados en la

degradación de OTA sobre alimentos potencialmente contaminados con esta micotoxina.

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma. Así, aunque en los ejemplos de la presente invención se han usado algunas cepas determinadas pertenecientes a *Brevibacterium*, estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones de la invención que aquí se reivindica, siendo los resultados extrapolables a cualquier bacteria del género *Brevibacterium spp.*, y preferentemente a las especies *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium iodinum* o *Brevibacterium epidermidis*.

EJEMPLO 1. Detección de la capacidad de degradar OTA que tienen diferentes cepas de *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Brevibacterium*.

Debido a que las bacterias del suelo son capaces de transformar una gran variedad de compuestos aromáticos, varias especies de *Actinobacterias* y *Pseudomonas* se cultivaron inicialmente en medios líquidos de cultivo sintéticos como BSM (Medio Basal Salino) en presencia de OTA (10 µg/L).

1.1. Cepas bacterianas empleadas y cultivo de las bacterias.

Para detectar la capacidad de degradar OTA, se han utilizado cultivos de las cepas *Rhodococcus erythropolis* CECT 3008, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, *Pseudomonas putida* DSMZ 291, *Pseudomonas putida* KT2442 y siete cepas de distintas especies del género *Brevibacterium*.

Rhodococcus erythropolis CECT 3008 (DSMZ 43060) fue obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). *Pseudomonas putida* DSM 291^T y seis cepas de *Brevibacterium* pertenecían a la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) (*Brevibacterium epidermidis* DSM 20660^T, *Brevibacterium iodinum* DSM 20626^T, *Brevibacterium linens* DSM 20425^T, *Brevibacterium casei* DSM 20657^T, *Brevibacterium casei* DSM 9657, *Brevibacterium casei* DSM 20658). La cepa *Brevibacterium casei*, RM101, se aisló en el Instituto de Fermentaciones Industriales IFI-CSIC, y se ha identificado mediante la secuenciación del 16S rDNA. *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y *Pseudomonas putida* KT2442 fueron proporcionadas por el Dr. Eduardo Díaz, del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

Todas las bacterias se cultivaron en medio líquido "Luria-Bertani" (LB) suplementado con 0,5% de glucosa e incubado a 30 °C en condiciones aeróbicas. En la prueba de degradación de OTA, las bacterias se cultivaron en medio basal salino (BSM) que contenía un 0,2% de glicerol, 4 g de NaH₂PO₄-H₂O, 4 g de K₂HPO₄-3H₂O, 2 g de NH₄Cl, 0.2 g de MgCl₂-6H₂O, 0.001 g de CaCl₂-2H₂O, y 0.001 g de FeCl₃-6H₂O (Denome et al., 1994). El glicerol no se incluyó en los experimentos llevados a cabo para conocer el uso potencial de OTA como única fuente de carbono por parte de las bacterias analizadas.

1.2. Estándar de OTA y OT α .

La OTA en forma sólida se adquirió a Sigma (Sigma-Aldrich) y se diluyó en metanol al 99% en condiciones estériles para obtener una solución stock de 500 μ g/mL. También se adquirió una solución estándar de OT α (11,9 μ g/mL) a LGC Standards (Alemania) que se diluyó 1:2 en acetonitrilo para obtener una solución patrón de 5,9 μ g/mL.

1.3. Prueba de degradación de OTA.

Inicialmente, algunas cepas de *Actinobacterias* (*Rhodococcus erythropolis* 5 CECT 3008, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y *Brevibacterium casei* RM101) y *Pseudomonas* (*P. putida* DSMZ 291^T y *P. putida* KT2442) se cultivaron en 25 mL de medio BSM al que se le había añadido OTA (10 µg/L, aprox.) a 30 °C bajo condiciones aeróbicas hasta la fase exponencial de crecimiento. Los sobrenadantes de los cultivos se analizaron mediante HPLC para determinar la 10 concentración de OTA presente.

En todas las pruebas de degradación, las células se separaron de los sobrenadantes mediante centrifugación a 3000 x g durante 10 min a 4 °C y se analizaron éstos últimos por HPLC. En el caso de *Brevibacterium* las células 15 sedimentadas se conservaron a -80 °C para sucesivos análisis. Se prepararon también controles del medio BSM con OTA y sin bacterias.

1.4. Cuantificación por HPLC y espectrometría de masas de OTA y OTα

20 Se cuantificó la concentración de OTA presente en los sobrenadantes, en las células sedimentadas y en las soluciones de lavado de las células sedimentadas según el método que se divulga en Del Prete V. et al., 2007. Journal of food protection, 70(9), pag. 2155-2160.

25 Para la determinación y cuantificación de OTA se utilizó un cromatógrafo HPLC Hewlett–Packard modelo I, serie 1100 (Hewlett–Packard, Palo Alto, Calif.), equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, un inyector automático, un detector DAD y un detector de fluorescencia (FLD). Se utilizó una columna Alltima C18 (5 µm), 200 mm – 4,6 mm. La fase móvil fue: eluente 30 (A), acetonitrilo; eluente (B), agua (grado HPLC)/acetonitrilo/ácido acético glacial (89:10:1 v/v); eluente A:B = 37:63 (v/v), en isocrática; flujo, 1,3 mL/min; temperatura, 30°C; tiempo del análisis, 20 min; detector FLD (λ_{ex} =330 nm, λ_{em} =460 nm) y detector DAD (330 nm) ; volumen de inyección, 100 µL. El

límite de detección para OTA en estas condiciones fue de 0,02 µg/L. El estándar de OTA se inyectó a dos concentraciones: 20 y 50 µg/L y el estándar de OTα se inyectó a una concentración de 5,9 mg/L. Las muestras, diluidas en el eluyente A:B, se inyectaron directamente para su análisis mediante HPLC.

5

Las células sedimentadas de *Brevibacterium* se resuspendieron dos veces en 2 mL de metanol absoluto durante 1h. para extraer la OTA. Después de centrifugar a 3,000 x g durante 15 min a 20 °C, se separaron los sobrenadantes, se recogieron en viales de 5 mL y se evaporaron a sequedad mediante nitrógeno. Para determinar la concentración de OTA los residuos secos se disolvieron en la fase móvil de HPLC en el momento del análisis cromatográfico.

10

Para la realización del ensayo mediante espectrometría de masas se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard serie 1100 MSD (Palo Alto, CA) acoplado a un detector de masas cuadrupolo con una interfase de ionización por electrospray (ESI). La separación se llevó a cabo mediante inyección directa. Los parámetros de ESI utilizados fueron: flujo de N₂ a 10 L/min, temperatura de N₂ 330 °C; presión del nebulizador, 40 psi; voltaje capilar, 4000 V. El ESI se operó en modo negativo, empleando un rango de masas entre m/z 100 y 800, utilizando un gradiente variable en el voltaje de fragmentación.

20

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de las especies de *Actinobacterias* y *Pseudomonas* analizadas, capaces de transformar una gran variedad de compuestos aromáticos.

25

Cepas	OTA [µg/L]	OTA media [µg/L]	Disminución de OTA (%)
BSM + OTA (Control)	11,06	11,01	0
BSM + OTA (Control)	10,96		
<i>Rhodococcus erythropolis</i> CECT 3008 (A)	8,37	7,88	28,47
<i>Rhodococcus erythropolis</i> CECT 3008 (B)	7,38		
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8 (A)	9,50	8,81	19,98
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8 (B)	8,12		
<i>Brevibacterium casei</i> RM101 (A)	n.d.	0	100
<i>Brevibacterium casei</i> RM101 (B)	n.d.		
<i>Pseudomonas putida</i> DSM 291 ^T (A)	10,14	10,07	8,54
<i>Pseudomonas putida</i> DSM 291 ^T (B)	10,00		
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442 (A)	7,72	8,18	25,70
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442 (B)	8,64		

Los ensayos se realizaron por duplicado (A) y (B); n.d.: no detectado; ^T: cepa tipo.

En la tabla 1 se puede observar la disminución de ocratoxina A (OTA) en medio BSM por algunas especies de *Actinobacterias* y *Pseudomonas*. La disminución en la concentración de OTA observada es del 8 al 25% al analizar los sobrenadantes de los cultivos en las cepas de *Rhodococcus erythropolis* y *Pseudomonas putida*. La poca disminución observada parece indicar que estas bacterias no poseen un mecanismo de degradación de OTA y que probablemente la OTA se adsorbe en la superficie de las células, de manera similar a lo descrito para bacterias lácticas (Del Prete V. et al., 2007. Journal of food protection, 70(9), pag. 2155-2160) y levaduras (Cecchini F. et al., 2006. Food Microbiol. 23, pag. 411–417.). Por otra parte, en estas cepas los análisis cromatográficos mediante HPLC no muestran la presencia de productos de degradación de OTA.

En el caso de la cepa de *Brevibacterium casei* RM101, la OTA desapareció totalmente de los sobrenadantes de los cultivos.

EJEMPLO 2. Degradación de OTA por *Brevibacterium*.

5

Se realizaron pruebas adicionales utilizando un número mayor de cepas de *Brevibacterium* para confirmar lo observado con *B. casei* RM101 y para verificar si esta habilidad es una característica específica de la cepa, de la especie o del género en estudio.

10

Así, para confirmar la degradación de OTA por *Brevibacterium spp.*, las cepas se cultivaron en medio BSM con una concentración de OTA cuatro veces mayor (40 µg/L). Las cepas de *Brevibacterium* se cultivaron en condiciones aeróbicas en agitación a 150 rpm durante 10 días. Estos ensayos se realizaron en medios de cultivo conteniendo OTA a una concentración 40 µg/L. Niveles de OTA equivalentes a 40 µg/L se encuentran raramente en alimentos o bebidas. Las pruebas de degradación se realizaron como se describe en el ejemplo 1.

15

Tabla 2. Disminución de ocratoxina A (OTA) en medio BSM por *Brevibacterium*.

20

Cepa	OTA (µg/L) ^a	Disminución de OTA (%)
BSM + OTA (Control)	39,81	0
<i>Brevibacterium casei</i> DSM 20657 ^T	n.d.	100
<i>Brevibacterium casei</i> DSM 9657	n.d.	100
<i>Brevibacterium casei</i> DSM 20658	n.d.	100
<i>Brevibacterium casei</i> RM101	n.d.	100
<i>Brevibacterium linens</i> DSM 20425 ^T	n.d.	100
<i>Brevibacterium iodinum</i> DSM20626 ^T	n.d.	100
<i>Brevibacterium epidermidis</i> DSM 20660 ^T	n.d.	100

OTA (µg/L)^a determinado en los sobrenadantes de tres cultivos independientes; n.d.: no detectado ; ^T: cepa tipo.

Los ensayos de degradación de OTA indican una desaparición total de la toxina en todas las cepas de las diferentes especies de *Brevibacterium* analizadas. La OTA añadida al medio en una concentración 40 µg/L no se detectó mediante HPLC en ninguno de los sobrenadantes de los cultivos (Tabla 2). Por otra parte, después de la extracción con metanol tampoco se detectó la presencia de OTA ni en las células sedimentadas, ni en las soluciones de lavado.

Estos resultados corroboran los resultados anteriores e indican que todas las cepas de *Brevibacterium* son capaces de degradar OTA. El género *Brevibacterium* agrupa a un grupo heterogéneo de nueve especies corineformes los cuales son capaces de degradar insecticidas (DTT, DDE, etc.), así como de producir proteasas extracelulares. Estas bacterias se pueden encontrar en diferentes hábitats entre los que se incluyen el suelo, aves de corral, peces, piel humana y en alimentos.

15

EJEMPLO 3. Mecanismo de degradación de OTA por *Brevibacterium*.

Se utilizaron las cepas *B. casei* RM101 y *B. linens* DSM 20425^T, para comprobar la capacidad de estas cepas para degradar OTA a una concentración mayor (40 mg/L), 1000 veces superior a la concentración utilizada en la prueba anterior, y para comprobar la capacidad de estas cepas para utilizar OTA como única fuente de carbono. Para ello las cepas se cultivaron en medio BSM en el cual el glicerol (0.2%) y la OTA (40 mg/L) estaban o no presentes y así estudiar la posible utilización de OTA como única fuente de carbono. Las pruebas de degradación se realizaron como se describe en el ejemplo 1.

Se ha podido elucidar el mecanismo de degradación de OTA llevado a cabo por *Brevibacterium spp.* al analizar los datos de HPLC y espectrometría de masas de estas cepas, *B. casei* RM101 y *B. linens* DSM 20425^T.

30

Tabla 3. Disminución de ocratoxina A (OTA) y producción de ocratoxina α (OT α) por *Brevibacterium casei* RM101 y *Brevibacterium linens* DSM 20425^T en medio BSM con diferente composición.

Cepas	Medio BSM con:		OTA (mg/L)	Disminución de OTA (%)	OT α (mg/L)
	Glycerol (0,2%)	OTA (40 mg/L)			
<i>B. casei</i> RM101	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-
	-	+	n.d.	100	25,07
	+	+	n.d.	100	26,22
<i>B. linens</i> DSM 20425	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-
	-	+	n.d.	100	26,19
	+	+	n.d.	100	26,79

5 n.d. no detectado; ^T: cepa tipo.

Los resultados obtenidos (Tabla 3) nuevamente indican que ambas cepas de *Brevibacterium* degradan completamente la OTA presente en el medio de cultivo. El ensayo que se ha realizado utilizando medio BSM sin la fuente de carbono tradicional (glicerol) demostró que las cepas de *B. casei* RM101 y *B. linens* DSM 20425^T son capaces de utilizar OTA como única fuente de carbono.

Paralelamente, el análisis de los cromatogramas correspondientes a los sobrenadantes de los cultivos, indica la ausencia del pico correspondiente a OTA y la aparición en el perfil de elución de un pico nuevo con un tiempo de retención y espectro diferente (Figura 1). El enlace amídico presente en la OTA se puede hidrolizar enzimáticamente mediante una CPA con la consiguiente producción de L-fenilalanina y OT α . El espectro UV/VIS del compuesto generado (Figura 2) es idéntico al que presenta el estándar correspondiente a OT α . Por otra parte, los resultados del análisis HPLC-MS han permitido confirmar la identificación del producto de la degradación como OT α puesto

que se observó un pico de ion molecular $[M-H]^-$ a m/z 255 en espectrometría de masas (PM $OT\alpha = 256$) (Figura 3).

Las dos cepas de *Brevibacterium* estudiadas, *B. casei* RM101 y *B. linens* DSM 20425^T, fueron capaces de crecer en ausencia de glicerol tal y como se observó mediante el aumento de la turbidez en el medio de cultivo. En un medio de cultivo conteniendo OTA como única fuente de carbono, la población bacteriana creció más lentamente si se compara con los cultivos crecidos en medio con glicerol y OTA; sin embargo, hay que señalar que en todos los casos la OTA se degradó completamente. Estos resultados indican la existencia en las cepas de *Brevibacterium spp.* de una enzima tipo carboxipeptidasa, que hidroliza el enlace amídico presente en la molécula de OTA. La L-fenilalanina liberada puede ser utilizada como fuente de carbono durante el crecimiento bacteriano. La Tabla 3 muestra la concentración de $OT\alpha$ recuperada de los sobrenadantes de los cultivos. Las dos cepas estudiadas, *B. casei* RM101 y *B. linens* DSM 20425^T, producen cantidades equivalentes de $OT\alpha$ independientemente de si el medio BMS contiene glicerol o no. Las cantidades detectadas de $OT\alpha$ corresponden a la concentración teórica producida a partir de la hidrólisis completa de la OTA añadida al medio.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
 <120> Degradación biológica de ocratoxina A en ocratoxina alfa
 <130> 1641.696
 <160> 6
 <170> Patent In version 3.5
 <210> 1
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Brevi bacterium lincens
 <400> 1

Met Thr Thr Ser Gln Thr Ser Asp Leu Gln Ser Ala Asp Leu Val Ala
 1 5 10 15

Lys Ala Asn Asp Arg Leu Pro Leu Ile Leu Glu Asp Ile Glu Arg Val
 20 25 30

Ile Thr Lys Glu Thr Pro Ser His Asp Lys Glu Ala Val Ala Ala Gly
 35 40 45

Ala Ala Asp Phe Val Glu Leu Leu Arg Glu Arg Leu Gly Ala Thr Ala
 50 55 60

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

Ser Gly Pro Ala Arg Val Val Leu Leu Asn His Gln Asp Thr Val Trp
 85 90 95

Pro His Gly Thr Leu Asp Arg Ile Pro Phe Ser Thr Asp Asp Gly Ile
 100 105 110

Leu Arg Gly Pro Gly Ser Phe Asp Met Leu Thr Gly Ala Ile Met Ser
 115 120 125

Ile His Ala Ser Ala Ile Leu Arg Glu His Leu Gly Glu Gly Gly Leu
 130 135 140

Asp Gly Leu Ser Ile Leu Val Ser Gly Asp Glu Glu Ile Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Ser Ser Ser Asp Leu Ile Arg Ala Glu Ala Ala Glu Ala Lys Ala Val
 165 170 175

Tyr Val Met Glu Ala Ser Ala Gly Gly Ala Leu Lys Leu Glu Arg Lys
 180 185 190

Gly Thr Ser Asn Tyr Val Leu Val Phe Thr Gly Lys Ala Ser His Ala
 195 200 205

Gly Leu Gu Pro Gu Lys Gly Ile Asn Ala Gly Met Ala Leu Ala Leu
210 215 220

His Leu Pro Leu Val Ala Asp Leu Ala Asp Thr Gu Ala Gly Thr Ser
225 230 235 240

Val Val Pro Thr Val Ile Ser Ala Gly Thr Thr Ser Asn Thr Val Pro
245 250 255

Ala Gu Ala Arg Val Asp Ile Asp Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gu
260 265 270

Leu Asp Arg Val Asp Ala Ala Ile Arg Gu Leu Ala Thr Arg Pro Gn
275 280 285

Leu Gu Gly Ser Ser Ile Gu Val Leu Gly Gly Ile Asn Arg Pro Pro
290 295 300

Phe Gu Arg Gu Gn Ser Ala Val Leu Phe Gu Arg Ala Thr Ala Leu
305 310 315 320

Ala Ala Gu Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gu Gly Val Ser Val Gly Gly
325 330 335

Ala Ser Asp Gly Asn Phe Thr Ala Gly Asp Gly Ile Ala Thr Leu Asp
340 345 350

Gly Leu Gly Ala Val Gly Asp Gly Ala His Ala Gu His Gu His Ala
355 360 365

Val Ile Asp Gu Ile Ala Pro Arg Thr Ala Leu Leu Ala Ala Leu Ile
370 375 380

Ala Asp Gn Leu Gn Gly
385 390

<210> 2
<211> 372
<212> PRT
<213> Brevibacterium lichen

<400> 2

Met Val Gu Phe Asp Ser Lys Asp Phe Met Ser Asp Phe Lys Ala Leu
1 5 10 15

Ile Gu Cys Gu Ser Phe Ser Gn Asp Pro Gu Ser Leu Ala Arg Ser
20 25 30

Ala Gn Leu Val Ser Arg Ile Gly Thr Gly Leu Leu Gly Ala Ala Pro
35 40 45

His Ile Ile Gu Thr Asp Ser His Pro His Val Leu Trp Arg Phe Gly
 50 55 60

Thr Gly Pro Arg Lys Val Val Leu Ile Gly His His Asp Thr Val Trp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Thr Leu Ser Gu Phe Pro Tyr Ser Val Ala Asp Gly Val
 85 90 95

Val Arg Gly Pro Gly Ala Asp Asp Met Lys Gly Gly Leu Leu Ile Ala
 100 105 110

Leu Tyr Ala Met Ala Arg Leu Arg Gu Gn Arg Gly Asp Leu Ala Gly
 115 120 125

Val Ser Ile Leu Met Thr Gly Asp Gu Gu Leu Gly Ser Pro Gly Ser
 130 135 140

Arg Gn Ile Ile Gu Asp Gu Ala Arg Gly Ala Lys Ala Ala Leu Val
 145 150 155 160

Phe Gu Ser Gly Ala Pro Asp Gly Ala Val Lys Ile Ala Arg Lys Gly
 165 170 175

Val Ala Ile Tyr Ser Leu Gu Val Thr Gly Leu Ala Ala His Ala Gly
 180 185 190

Val Gu Pro Gu Lys Gly Ile Asn Ala Thr Ile Gu Val Ala Asn Gn
 195 200 205

Val Val Lys Ile Ala Ala Leu His Asp Pro Ser Val Gly Thr Ser Val
 210 215 220

Val Pro Thr Val Met His Ser Gly Ser Thr Thr Asn Thr Val Pro Ala
 225 230 235 240

Lys Ala Val Val Gly Val Asp Ser Arg Ala Ala Ser Val Ala Gu Gn
 245 250 255

Gu Arg Ile Asp Ala Ile Leu Ser Asp Leu Ser Pro Thr Val Ala Gly
 260 265 270

Ala Lys Val Asp Val Arg Gly Gly Ile Asn Arg Ala Pro Leu Gu Gu
 275 280 285

Lys Met Ala Met Gly Leu Tyr Ala Arg Ala Gn Arg Leu Ser Ala His
 290 295 300

Leu Gly His Pro Pro Leu Arg Ser Val Ala Val Gly Gly Gly Ser Asp
 305 310 315 320

Gly Asn Phe Thr Ala Gly Val Gly Thr Pro Thr Ile Asp Gly Leu Gly

325 330 335
 Thr Val Gly Gly Gly Ser His Ala Arg Thr Gu His Ala Leu Gn Val
 340 345 350
 Trp Ile Pro Arg Arg Val Gu Leu Thr Thr Ala Leu Val Gly Gu Leu
 355 360 365
 Leu Ala Gu Asp
 370
 <210> 3
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Brevi bacterium l i n e n s
 <400> 3
 Met Asn Pro Thr Pro Gu Arg Lys Lys Ser Lys Arg Ser Lys Lys Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Ile Thr Ala Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Ala Gly Val
 20 25 30
 Ala Ala Leu Asp Ala Tyr Asp Val Phe Pro Gu Leu Pro Gly Ile Leu
 35 40 45
 Thr Thr Gu Pro Ala Ile Gu Val Gn Asp Val Leu Ser Pro His Ala
 50 55 60
 Gn Gly Lys Asp Val Pro Ala Pro Ala Ser Ala Leu Asp Asp Ser Ala
 65 70 75 80
 Pro Val Pro Thr Ala Ile Pro Asp Gu Val Asp Lys Val Leu Ser Asp
 85 90 95
 Ala Lys Val Lys Gly Phe Gly Ile Gu Ile Arg Asp Gly Leu Ser Asp
 100 105 110
 Asp Ile Leu Tyr Ala Lys Asn Gu Asn Lys Pro Arg Thr Pro Ala Ser
 115 120 125
 Val Thr Lys Val Leu Thr Gly Ser Ala Ala Leu Leu Thr Ile Gly Gly
 130 135 140
 Gu Lys Arg Leu Ser Thr Thr Thr Gn Phe Asp Pro Ala Thr Ser Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Leu Gn Gly Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Ala Gly Gu Ser
 165 170 175
 Gn Pro Gly Ala Val Asn Gly His Ala Gly Leu Ala Thr Leu Ala Gn
 180 185 190

G n Thr Ala 195 G u Ser Leu Lys Ser 200 G n Asn Val Ala 205 G u Val Ala Leu
 Asp Leu 210 Asp Thr Ser Arg Tyr 215 Ser G y Lys Asp Phe 220 Ser Pro G y Trp
 G u Arg Val Asp Ile Ala 230 Lys G y Val Ile Thr 235 Pro Ile G n Pro Leu 240
 Met Ile Asp Thr G y Tyr Val G y Ser Lys 250 Asp Lys G u Trp Arg G y 255
 Arg Ser G u His 260 Pro Ala Lys Asp Ala 265 Phe Ala Val Phe Thr Lys G u 270
 Leu Lys Ala 275 Ala G y Ile Thr Val Ser Lys Asp Pro G n Pro Ala Asp 285
 Ala Thr Asp Ala Thr G y Asp 295 G u Ala Lys Pro Thr 300 G u Leu Ala G u
 Val 305 G u Ser Ala Thr Ile Ser G u Ile Val G u Tyr Ala Leu Val His 320
 Ser Asp Asn Val Val 325 Ala G u Val Leu G y Asn G u Val Ala Ile Ala 335
 G n G y G u Pro G y Ser Leu G u Ala G y Pro G n Ala Val 350 Leu Asp
 Ala Leu Ser 355 Asp Thr Val Asp Leu G y G n Thr His Leu G u Asp Thr
 Ser G y 370 Leu Ser Tyr Asp Asn 375 G n Ile Ser Pro His 380 Asp Leu Thr Thr
 Ile Leu G n Ala Ser Val 390 Val Ala Asp Asp Ser 395 Leu Ser Asp Leu Ile 400
 Ala Ala Met Pro Val 405 G y G y Leu Thr G y Thr Leu Thr Asp Arg Phe 415
 Thr Lys Asp Arg 420 Asn Ala Ala G y Ala Val His Ala Lys Thr G y Thr 430
 Leu Ser Thr 435 Val Thr Ser Leu Ala 440 G y G y Val Leu Asp 445 Ala Asp G y
 Arg Tyr 450 Leu Val Phe Thr Leu 455 G n Ile Asp Asp Val 460 Asp Lys Asp Lys

I l e L e u G u A l a A r g L y s T h r V a l A s p A s p I l e V a l A l a A l a L e u A l a
465 470 475 480

A s n O y s G l y O y s A r g
485

<210> 4
<211> 359
<212> PRT
<213> Brevibacterium linnens

<400> 4

M e t A s p L e u P h e T h r A s p S e r S e r H i s T h r A l a L e u P r o S e r T r p L e u
1 5 10 15

A r g P r o V a l P r o A l a T h r A r g A r g L e u A r g L e u L e u L e u A l a G l y S e r
20 25 30

L e u L e u A l a L e u T h r P h e T h r V a l A l a G l u V a l G l y L e u P r o L e u G l u
35 40 45

S e r P r o T h r H i s I l e S e r S e r A l a A l a A l a A l a T h r S e r T h r V a l A l a
50 55 60

A l a T h r S e r V a l S e r G l u A l a G l u P r o T h r T r p V a l S e r P r o V a l P r o
65 70 75 80

A l a M e t G l u I l e I l e G l u A l a P h e A s p P r o P r o T h r G l u A l a T r p L e u
85 90 95

L y s G l y H i s A r g G l y I l e A s p V a l L e u T h r V a l S e r G l y G l u P r o V a l
100 105 110

A r g A l a P r o A l a A l a G l y T h r I l e A r g P h e A r g G l y T h r V a l A l a G l y
115 120 125

T h r A l a T h r V a l S e r I l e V a l T h r A s p S e r G l y H i s V a l V a l S e r P h e
130 135 140

G n P r o A l a L y s S e r G l u L e u A s n L y s G l y G l u A r g P h e A l a A l a G l y
145 150 155 160

G l u G l u I l e G l y T h r V a l G l y L y s G l y S e r H i s C y s A s p G l u S e r C y s
165 170 175

L e u H i s I l e G l y V a l T r p A l a A l a G n G l y A s p L y s V a l T y r I l e A s p
180 185 190

P r o A l a G l y P h e P h e G l y G n G l u G l u S e r I l e L e u L e u P r o L e u S e r
195 200 205

A r g L y s P r o A l a L y s G l u P r o T h r G l y A s p S e r T h r T h r S e r G l y A l a
210 215 220

Gly Ala Trp Gly Gly His Arg Asn Gly Arg Ile Pro Ala Ala Ala Met
225 230 235 240

Cys Thr Leu Asp Ser Ala Pro Gly Gln Met Leu Arg Cys Asp Ala Gln
245 250 255

Lys Ala Phe Asp Arg Met Ser His Ala Tyr Gu Ala Arg Phe Ser Thr
260 265 270

Pro Ile Ser Val Thr Asp Ala Tyr Arg Asp Tyr Asp Thr Gln Val Ile
275 280 285

Leu Lys Lys Arg Lys Gly Arg Met Ala Ala Thr Pro Gly Thr Ser Asn
290 295 300

His Gly Trp Ala Leu Ala Val Asp Leu Gly Gly Gly Ile Asn Ser Phe
305 310 315 320

Gly Ser Ala Gln His Gln Trp Met Arg Ala Asn Ala Pro Lys Phe Gly
325 330 335

Trp Ile His Pro Gly Trp Ala Arg Gln Ser Gly Ser Leu Pro Gu Pro
340 345 350

Trp His Trp Gu Phe Arg Gln
355

<210> 5
<211> 408
<212> PRT
<213> Brevibacterium linens

<400> 5

Met Arg Phe Thr Arg Ser Thr Ala Ser Ser Pro Arg Ala Ala Leu Leu
1 5 10 15

Arg Val Leu Gly Phe Ala Ala Ala Leu Leu Val Leu Pro Ala Gln Leu
20 25 30

Val His Ser Pro Ala Pro Ala Gln Ala Val Pro Gln Pro Ala Gu Ser
35 40 45

Thr Ala Pro Ala Tyr Val Ser Pro Asp Asp Leu Gly Asp Gly Ala Lys
50 55 60

Pro Pro Lys Pro Thr Gly Thr Ser Trp Leu Val Gly Asp Leu Asp Ser
65 70 75 80

Gly Gu Leu His Val Ala Lys Asn Val Gu Lys Arg His Ala Pro Ala
85 90 95

Ser Thr Ile Lys Leu Leu Thr Ala Leu Ala Leu Val Asp Gu Phe Asp
 100 105 110

Asp Lys Lys Lys Lys Val Thr Ala Gu Phe Gu Asp Met Gu Val Asp
 115 120 125

Gy Thr Lys Val Gy Leu Met Gn Thr Asn Lys Tyr Ser Ile Asp Leu
 130 135 140

Leu Phe His Ala Met Leu Met Ser Ser Ala Asn Asp Ala Ala Asn Ala
 145 150 155 160

Leu Gy Arg Ala Ala Gy Gy Gn Asp Lys Ala Val Asp Leu Met Asn
 165 170 175

Gu Lys Ala Ala Gu Leu Gy Met Ser Asn Thr Gn Ala Lys Asn Thr
 180 185 190

Ser Gy Leu Asp Ala Lys Gy Gn Tyr Thr Thr Ala Gu Asp Leu Met
 195 200 205

Lys Leu Ala Trp Ala Val Cys Gu Asp Asp Tyr Leu Met Lys Val Ile
 210 215 220

Gy Thr Gu Thr Tyr Gn Phe Pro Gy Gy Thr Asn Pro Gu Thr Lys
 225 230 235 240

Gu Lys Phe Lys Gy Tyr Gu Ile Gn Asn His Thr Lys Ile Ala Gy
 245 250 255

Gn Val Asp Gy Gy Leu Gy Leu Lys Asn Gy Phe Thr Arg Ala Ala
 260 265 270

Lys Gy Ser Tyr Val Ala Val Ala Gu Arg Asp Gy His Arg Val Val
 275 280 285

Ala Thr Met Leu Gy Ile Asp Asn Asn Ser Arg Gn Ala Ala Val Asp
 290 295 300

Leu Leu Gu Trp Asp Phe Ala Gn Thr Asp Pro Lys Ser Leu Gn Thr
 305 310 315 320

Val Pro Val Gy Val Gn Ala Thr Ala Gu Ala Val Pro Thr Ala Thr
 325 330 335

Gy Ser Ser Ser Asp Ala Gy Gy Ala Asp Ser Asp Ala Ser Gy Ala
 340 345 350

Ala Gu Ser Lys Val Thr Asp Gu Ser Gu Pro Ser Met Ala Ala Gn
 355 360 365

Thr Leu Gy Ala Ala Leu Asp Asn Pro Leu Ala Leu Gy Leu Leu Ala

Ala Leu Gly Lys Leu Ala Thr Asp Leu Pro Ser Thr Leu Gly Arg Leu
210 215 220

Ile Asp Pro Arg His Ala Ile Ser Leu Val Trp Gly Gu Ile Ser Ala
225 230 235 240

Gly His Ala Ala Asn Val Val Pro Ser Gu Gly Ile Leu Arg Gly Thr
245 250 255

Leu Arg Cys Leu Asp Val Asp Gly Trp Asn Gn Val Ala Gu Val Leu
260 265 270

Pro Gu Leu Val Gu Arg Ile Ala Gly Pro Tyr Gly Val Thr Val Asp
275 280 285

Leu Asp His Arg Arg Gly Val Pro Pro Val Val Asn Thr Gu Asp Gn
290 295 300

Val Ala Leu Ile Gu Ser Ala Val Arg Gly Gu Leu Gly Gu Asn Ser
305 310 315 320

Val Gn Leu Thr Pro Gn Ser Met Gly Gly Gu Asp Phe Ala Trp Tyr
325 330 335

Leu Thr His Cys Pro Gly Ala Leu Val Arg Met Gly Thr Arg Thr Pro
340 345 350

Gly Gly Lys Thr Tyr Asp Ile His Gn Gly Asp Leu Leu Ile Asp Gu
355 360 365

Asp Ser Val Gu Ile Ala Ala Arg Ile Phe Thr Ala Thr Ala Leu Lys
370 375 380

Val Leu Gn Arg Asp
385

REIVINDICACIONES

1. Uso de un microorganismo perteneciente al género *Brevibacterium* para la degradación biológica de ocratoxina A.
5
2. Uso del microorganismo según la reivindicación 1, donde el microorganismo es *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium iodinum* o *Brevibacterium epidermidis*.
- 10 3. Uso de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la degradación biológica de ocratoxina A tiene lugar en, al menos, un producto alimentario.
- 15 4. Uso según la reivindicación 3, donde el producto alimentario está destinado al consumo humano.
5. Uso según la reivindicación 3, donde el producto alimentario está destinado al consumo animal.
- 20 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde el producto alimentario es un cereal.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde el producto alimentario es una especia.
25
8. Uso de al menos una molécula con actividad biológica producida por el microorganismo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la degradación biológica de ocratoxina A.
- 30 9. Uso según la reivindicación 7 donde la molécula con actividad biológica es una proteína.

10. Uso según la reivindicación 8, donde la proteína degrada ocratoxina A en, al menos, ocratoxina α .
11. Uso de una composición, que comprende el microorganismo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la degradación biológica de ocratoxina A.
12. Uso de una composición que comprende la molécula con actividad biológica, según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para la degradación biológica de ocratoxina A.
13. Uso de una composición que comprende el microorganismo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y la molécula con actividad biológica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para la degradación biológica de ocratoxina A.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la producción de ocratoxina α que procede de la degradación biológica de ocratoxina A.
15. Método para la degradación biológica de ocratoxina A, que comprende:
- Utilizar al menos una bacteria perteneciente al género *Brevibacterium*,
 - poner en contacto la bacteria del paso (a) con una solución acuosa y,
 - poner en contacto el producto obtenido en el paso (b) con ocratoxina A.
16. Método según la reivindicación 15, donde la solución acuosa del paso (b) permite la supervivencia de la bacteria.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, donde la degradación biológica de ocratoxina A produce ocratoxina α .
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, donde el producto
5 del paso (c) se pone en contacto con un producto alimentario que contiene ocratoxina A.
19. Método según la reivindicación 18, donde el producto del paso (c) se pone en contacto con el producto alimentario por nebulización.
- 10 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, donde el producto obtenido en el paso (c) se incuba a una temperatura de entre 10 y 50 °C durante un tiempo de entre 1 hora y 20 días.
- 15 21. Método para la degradación biológica de ocratoxina A, que comprende:
- a. Utilizar al menos una molécula con actividad biológica, según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, aislada de una bacteria perteneciente al género *Brevibacterium*,
 - 20 b. poner en contacto la molécula con actividad biológica obtenida en el paso (a) con ocratoxina A, e
 - c. incubar el producto obtenido en el paso (b) a una temperatura de entre 10 y 50 °C durante un tiempo de entre 30 minutos y 30 días.
- 25 22. Método según la reivindicación 21, donde la degradación biológica de ocratoxina A produce ocratoxina α .
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, donde la molécula del paso (b) se pone en contacto con un producto alimentario que contiene
30 ocratoxina A.

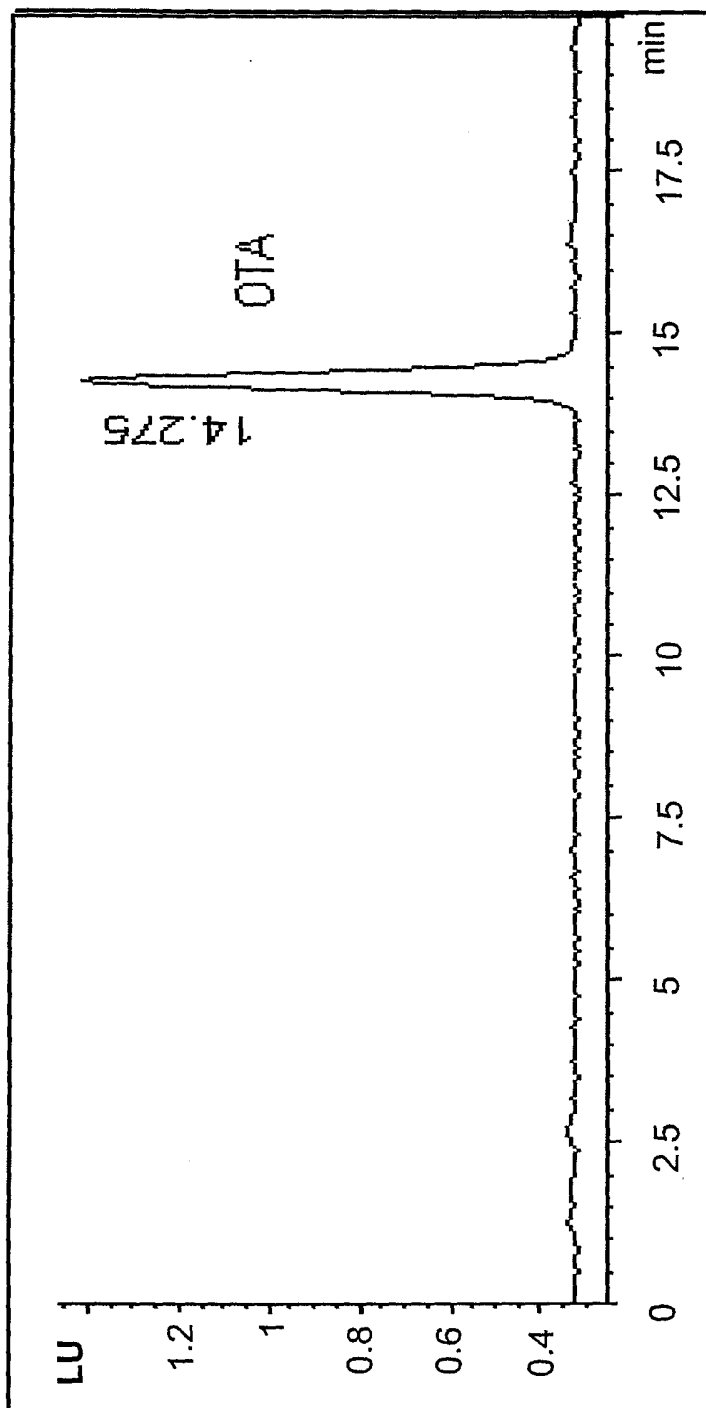


Fig.1A

2/5

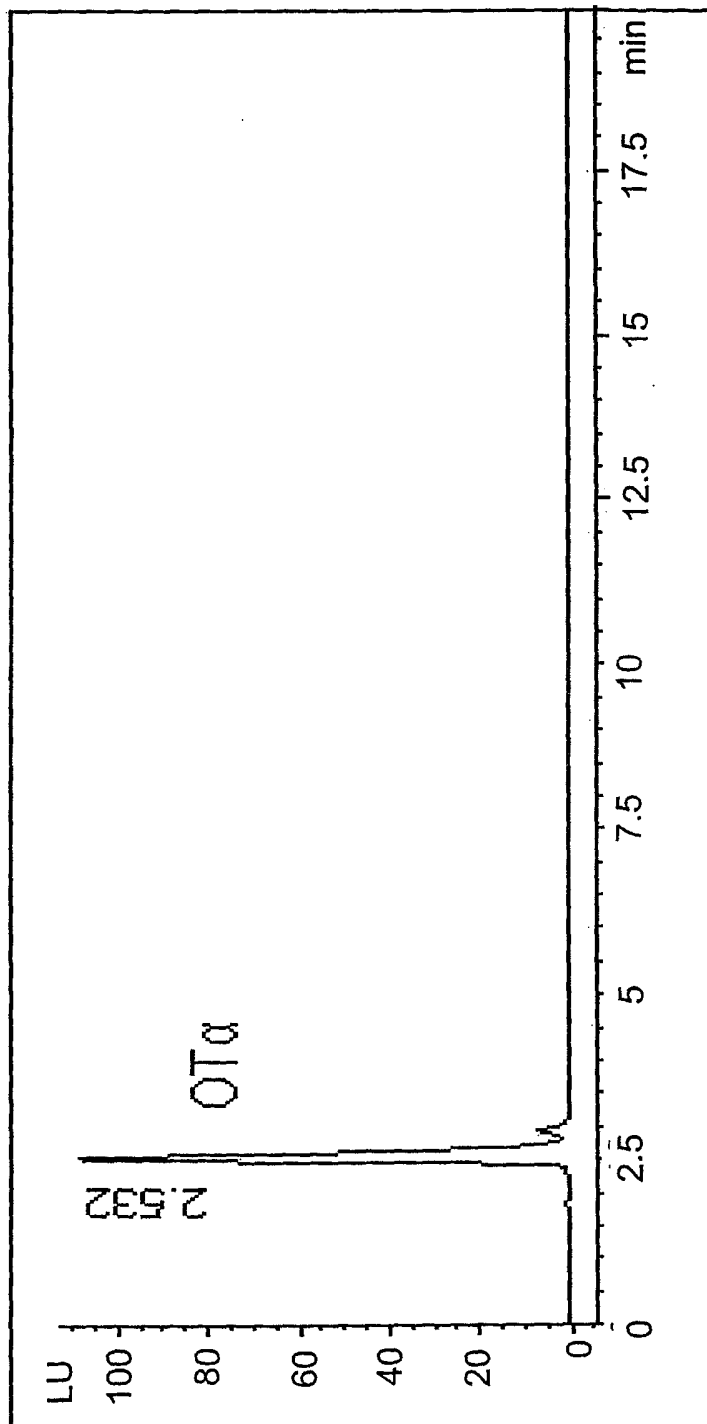


Fig.1B

3/5

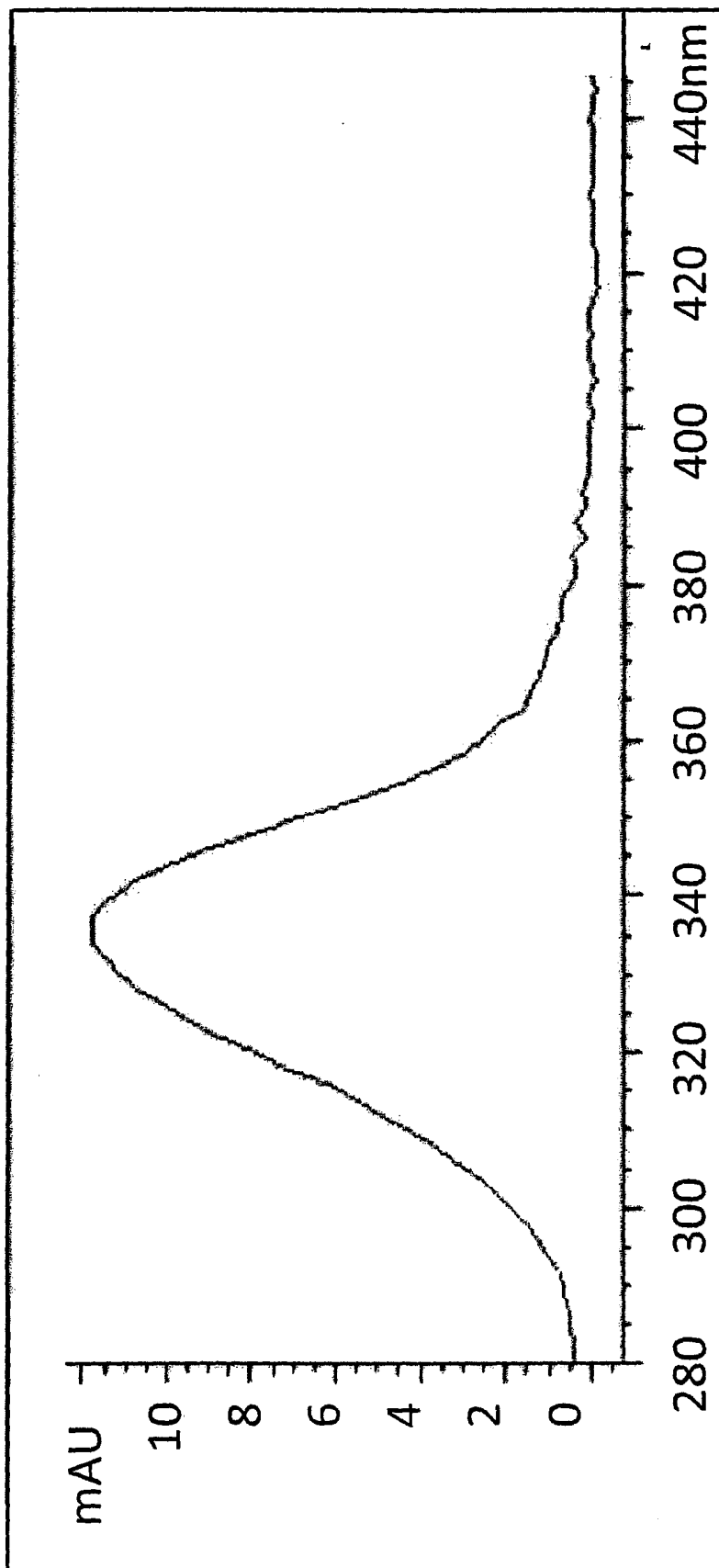


Fig. 2A

4/5

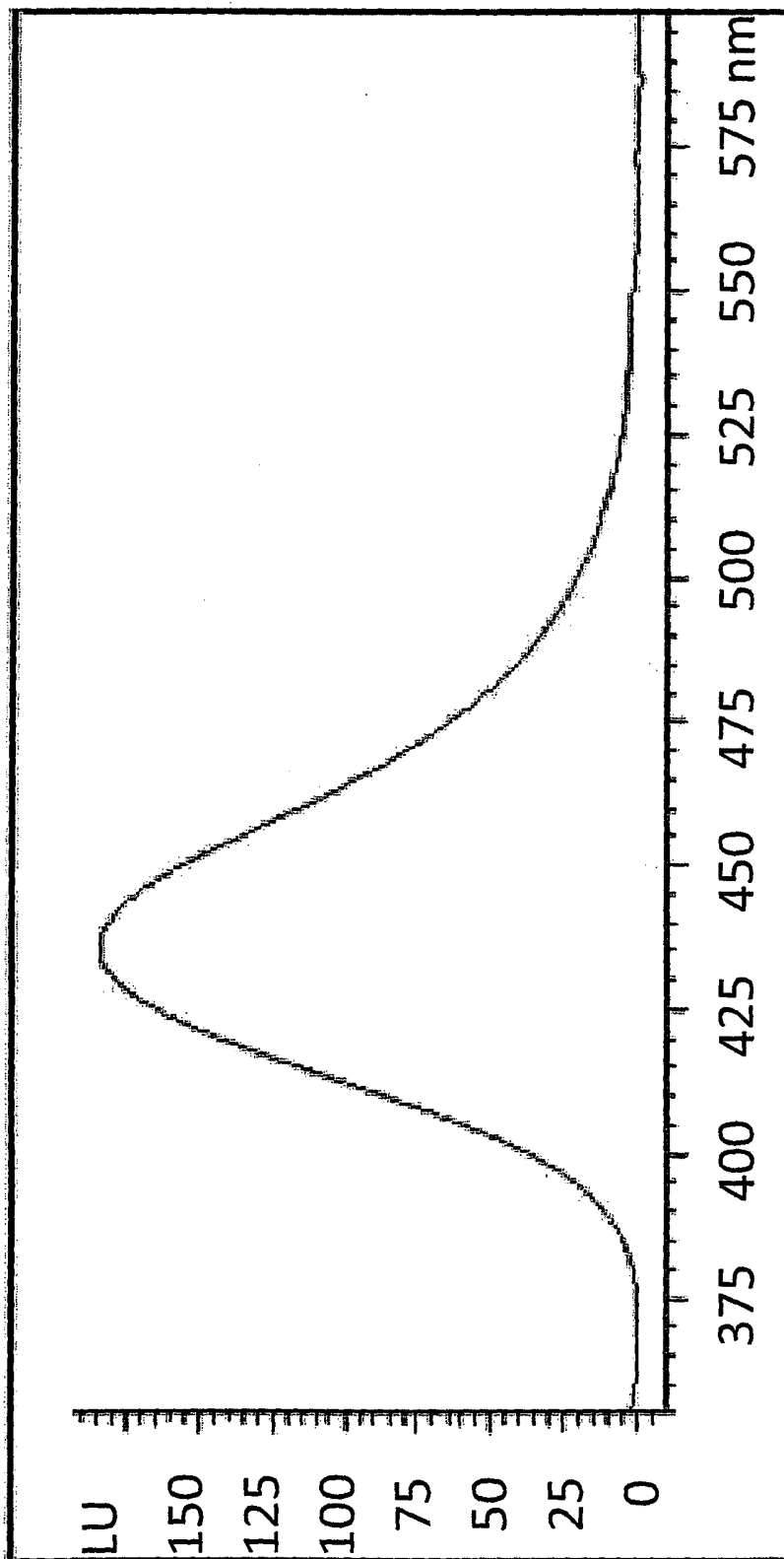


Fig. 2B

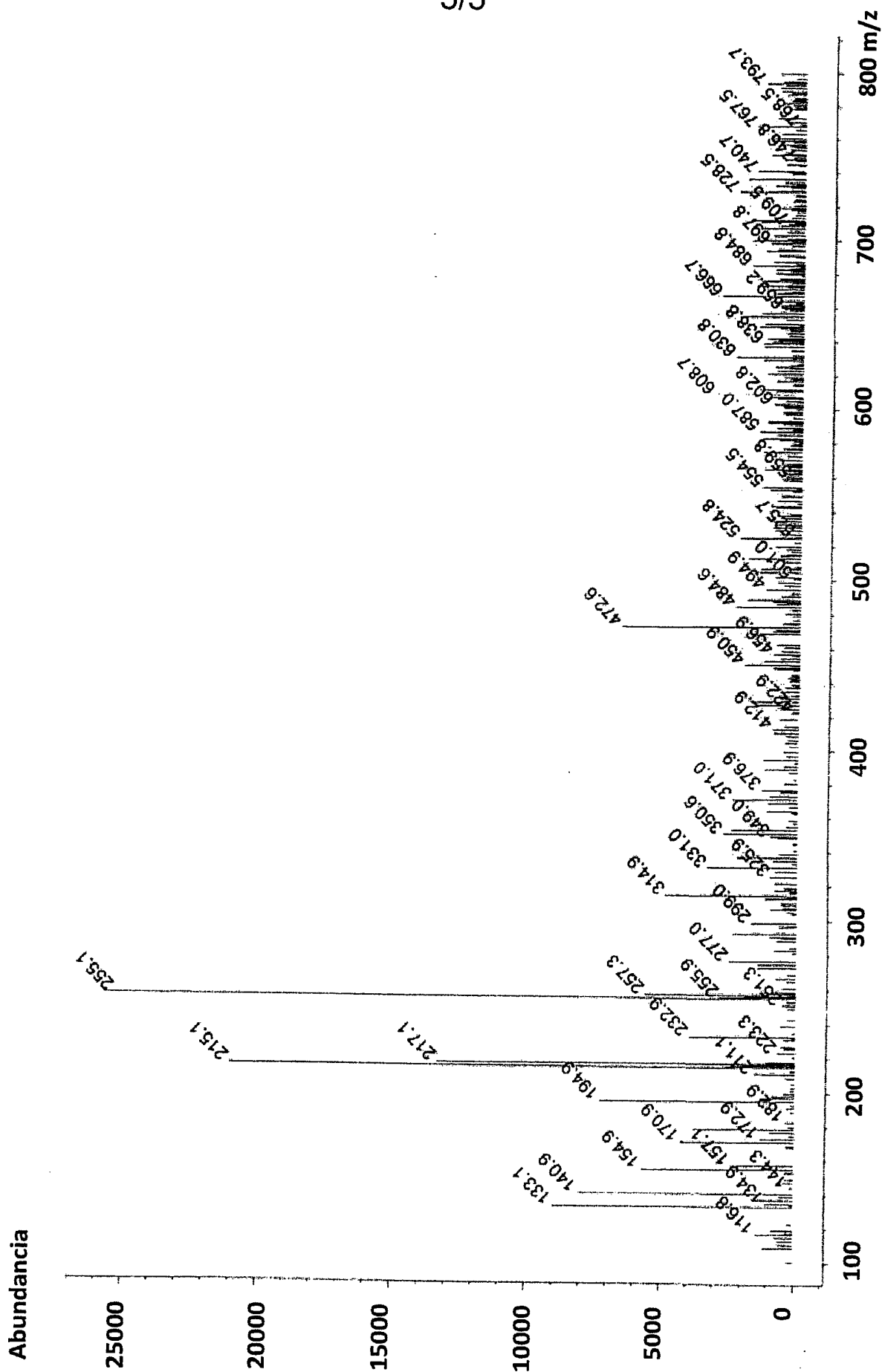


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P, C07D, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (EMBL All).

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ABRUNHOSA, L., <i>et al.</i> Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. Toxins. May 2010. Vol 2, n° 5, pages 1078-1099. ISSN 2072-6651 (Electronic). See the whole document.	1-23
A	RODRIGUES, I., <i>et al.</i> Microorganisms and their enzymes for detoxifying mycotoxins posing a risk to livestock animals. In: ACS Symposium Series (ISSN 0097-6156 (Print)); Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture. Edited by M. Appell et al. Washington DC. ACS 2009, pages 107-117. ISBN 978-0-8412-6990-3(H). See the whole document, especially pages 110-111.	1-23

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
19/12/2011

Date of mailing of the international search report
(27/12/2011)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
B. Pérez Esteban

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498484

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070557

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SINGH, V.P. Enzymatic transformations of xenobiotics of health and environmental concern. In: BiotransformationsBioremediation Technology for Health and Environmental Protection. Edited by Singh Ved Pal and Stapleton Raymond D. 2002, Vol. 36, pages 129-148. ISBN: 978-0-444-50997-0. See pages 139-141 and figure 3.	1-23
A	US 2004/0208956 A1 (SCHATZMAYR, G.; HEIDLER, D.; FUCHS. E.; BINDER, E.M.) 21-10-2004, see the whole document.	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070557

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2004208956 A	21.10.2004	CA2467392 AC	03.07.2003
		WO03053161 A	03.07.2003
		AU2002363819 A	09.07.2003
		NO20033664 A	13.10.2003
		NO330925 B	22.08.2011
		BR0207398 A	10.02.2004
		MA26256 A	01.08.2004
		EP1455595 AB	15.09.2004
		HU0402278 A	29.03.2005
		MXPA04005985 A	31.03.2005
		PL207048 B	29.10.2010
		PL368742 A	04.04.2005
		AT413540 B	15.03.2006
		ATA20002001 A	15.08.2005
		ZA200403653 A	25.04.2007
		EA008598 B	29.06.2007
		AT394034 T	15.05.2008
		PT1455595 E	01.08.2008
		DK1455595 T	11.08.2008
		ES2303563 T	16.08.2008
		SI1455595 T	31.08.2008
		US2009098244 A	16.04.2009
		IL161847 A	30.11.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070557

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P17/06 (2006.01)

C07D311/76 (2006.01)

C12R1/13 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070557

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C07D, C12R

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (EMBL All).

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ABRUNHOSA, L., <i>et al.</i> Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. Toxins. Mayo 2010. Vol 2, nº 5, páginas 1078-1099. ISSN 2072-6651 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-23
A	RODRIGUES, I., <i>et al.</i> Microorganisms and their enzymes for detoxifying mycotoxins posing a risk to livestock animals. In: ACS Symposium Series (ISSN 0097-6156 (impreso)); Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture. Edited by M. Appell et al. Washington DC. ACS 2009, páginas 107-117. ISBN 978-0-8412-6990-3(H). Ver todo el documento, especialmente páginas 110-111.	1-23

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
19/12/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
27 de diciembre de 2011 (27/12/2011)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
B. Pérez Esteban

Nº de teléfono 91 3498484

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070557

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	<p>SINGH, V.P. Enzymatic transformations of xenobiotics of health and environmental concern. In: Biotransformations Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection. Edited by Singh Ved Pal and Stapleton Raymond D. 2002, Vol. 36, páginas 129-148. ISBN: 978-0-444-50997-0. Ver páginas 139-141 y figura 3.</p>	1-23
A	<p>US 2004/0208956 A1 (SCHATZMAYR, G.; HEIDLER, D.; FUCHS. E.; BINDER, E.M.) 21-10-2004, Ver todo el documento.</p>	1-23

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070557

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2004208956 A	21.10.2004	CA2467392 AC	03.07.2003
		WO03053161 A	03.07.2003
		AU2002363819 A	09.07.2003
		NO20033664 A	13.10.2003
		NO330925 B	22.08.2011
		BR0207398 A	10.02.2004
		MA26256 A	01.08.2004
		EP1455595 AB	15.09.2004
		HU0402278 A	29.03.2005
		MXPA04005985 A	31.03.2005
		PL207048 B	29.10.2010
		PL368742 A	04.04.2005
		AT413540 B	15.03.2006
		ATA20002001 A	15.08.2005
		ZA200403653 A	25.04.2007
		EA008598 B	29.06.2007
		AT394034 T	15.05.2008
		PT1455595 E	01.08.2008
		DK1455595 T	11.08.2008
		ES2303563 T	16.08.2008
SI1455595 T	31.08.2008		
US2009098244 A	16.04.2009		
IL161847 A	30.11.2010		

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12P17/06 (2006.01)

C07D311/76 (2006.01)

C12R1/13 (2006.01)