

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11)

014985

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: **2011.04.29**

(21) Номер заявки: **200700040**

(22) Дата подачи: **2005.07.18**

(51) Int. Cl. *C11B 3/00* (2006.01)
C11C 3/00 (2006.01)
C07F 9/10 (2006.01)

(54) СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО РАФИНИРОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ МАСЕЛ ГИДРАТАЦИЕЙ И ПРИМЕНЕНИЕ ЛИПИДАЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ СПОСОБА

(31) 0416035.4; 60/591,185; 0513859.9

(32) 2004.07.16; 2004.07.26; 2005.07.07

(33) GB; US; GB

(43) 2007.10.26

(86) PCT/GB2005/002823

(87) WO 2006/008508 2006.01.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДАНИСКО А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Сое Йорн Борк, Тёрнер Марк (DK)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Пивницкая Н.Н., Кузенкова Н.В., Веселицкий М.Б., Каксис Р.А., Комарова О.М., Белоусов Ю.В. (RU)

(56) US-A1-2004005399
WO-A-03100044
KIM CLAUSEN: "New enzyme for degumming". OILS AND FATS INTERNATIONAL, vol. 17, no. 4, June 2001 (2001-06), pages 24-25, XP008054279, GB INTERNATIONAL TRADE PUBLICATIONS, REDHILL, the whole document
KIM CLAUSEN: "Enzymatic oil-

degumming by a novel microbial phospholipase". EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 103, 2001, pages 333-340, XP002350666, DEWILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, the whole document

DATABASE EMBL 'Online! EBI; 1 March, 2001 (2001-03-01), LACHMANN, I., GUDMUNSDOTTIR, B., ATREYA, C.: "Glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase", XP002350670, retrieved from EBI. Database accession no. Q9F7Y6, abstract

WO-A-0116308

MONJUR HOSSEN AND ERNESTO HERNANDEZ: "Phospholipase D-catalyzed synthesis of novel phospholipid-phytosterol conjugates". LIPIDS, vol. 39, August 2004 (2004-08), pages 777-782, XP008054148, USCHAMPAIGN, IL, abstract

J. GRAILLE: "Possible applications of acyl-transferases in oleotechnology". LIPID TECHNOLOGY, vol. 5, no. 1, 1993, pages 11-16, XP008054101, GBBARKING ESSEX, the whole document

(57) Изобретение относится к способу ферментативного рафинирования гидратацией пищевых масел, заключающемуся в обработке пищевого масла липидацилтрансферазой для того, чтобы перенести ацильную группу с основной части фосфолипида на один или более акцепторов ацила, в котором акцептор ацила представляет собой один или более стероидов и/или станоидов и в котором липидацилтрансфераза отличается следующим: (а) липидацилтрансфераза обладает активностью ацилтрансферазы, которую определяют как активность переноса сложного эфира, причем ацильная часть исходной сложно-эфирной связи липидного донора ацила переносится на акцептор ацила с образованием нового сложного эфира; и (б) фермент включает мотив последовательности аминокислот GDSX, в котором X представляет собой один или более из следующих остатков аминокислот: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, причем липидацилтрансфераза при сравнительном анализе первичной структуры либо с консенсусной последовательностью SEQ ID NO:2, либо с SEQ ID NO:37, либо с обеими указанными последовательностями включает блок GANDY. Кроме того, в изобретении раскрыто применение указанной липидацилтрансферазы для осуществления способа.

014985**B1****B1****014985**

Ссылка на родственные заявки

Делают ссылку на следующие родственные заявки: заявка США № 09/750990, поданная 20 июля 1999 г., заявка США № 10/409391, WO 2004/064537, WO 2004/064987, PCT/IB 2004/004378 и PCT/IB 2004/004374. Каждая из данных заявок и каждый из документов, приведенных в каждой из данных заявок ("документы, приведенные в заявке"), и каждый документ, на который ссылаются или приводят в документах, приведенных в заявке, как в тексте, так и во время ведения дела по данным заявкам, а также все аргументы в поддержку патентоспособности, выдвигаемые во время данного ведения дела, включены таким образом в данном контексте в виде ссылки. В данном тексте также приведены различные документы ("документы, приведенные в данном контексте"). Каждый из приведенных в данном контексте документов и каждый документ, приведенный или на который ссылаются в данном контексте, включены таким образом в данном контексте в виде ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способу ферментативного рафинирования пищевых масел гидратацией с использованием липидацилтрансферазы.

Кроме того, настоящее изобретение далее относится к применению липидацилтрансферазы для рафинирования пищевых масел гидратацией.

Предшествующий уровень техники

Традиционно для рафинирования масла гидратацией использовали два способа, которые представляют собой способы физического рафинирования гидратацией и химического рафинирования гидратацией. Ранее в 1990-е годы был разработан ферментативный способ рафинирования гидратацией на основе использования фосфолипазы поджелудочной железы. Поскольку данный фермент некошерный, фосфолипазу со временем заменили микробной фосфолипазой A1 (Lecitase Ultra™ - Novozymes, Дания). Ферментативный способ имеет некоторые преимущества относительно химического или физического способов рафинирования гидратацией, включая снижение себестоимости, повышенный выход и процесс, более благоприятный для окружающей среды.

Краткое изложение аспектов настоящего изобретения

Термин "липидацилтрансфераза", как используют в данном контексте, означает фермент, который обладает активностью ацилтрансферазы (как правило, классифицируемой как E.C. 2.3.1.x), причем фермент, который способен переносить ацильную группу с липида на один или более акцепторных субстратов, таких как один или более из следующих: стерин, станол, углеводов, белок, белковая субъединица, глицерин, предпочтительно стерин и/или станол.

Фермент липидацилтрансфераза, представленный в настоящем изобретении или предназначенный для использования в способах и/или вариантах применения настоящего изобретения, может быть охарактеризован с помощью следующих критериев:

(i) фермент обладает активностью ацилтрансферазы, которую можно определить как активность переноса сложного эфира, причем ацильная часть исходной эфирной связи липидного донора ацила переносится на акцептор ацила с образованием нового сложного эфира; и

(ii) фермент включает мотив последовательности аминокислот GDSX, в котором X означает один или более следующих остатков аминокислот: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, причем липидацилтрансфераза при сравнительном анализе первичной структуры с консенсусной последовательностью либо SEQ ID NO: 2, либо SEQ ID NO: 37, либо с обеими указанными последовательностями включает блок GANDY.

Предпочтительно, когда X мотива GDSX представляет собой L или Y. Более предпочтительно, когда X мотива GDSX представляет собой L. Таким образом, предпочтительно, когда фермент, представленный в настоящем изобретении, включает мотив последовательности аминокислот GDSL.

Мотив GDSX состоит из четырех консервативных аминокислот. Предпочтительно, когда серин в мотиве представляет собой каталитический серин фермента липидацилтрансферазы. Соответственно серин мотива GDSX может находиться в положении, соответствующем Ser16 в липолитическом ферменте *Aeromonas hydrophila*, описанном в статье Brumlik & Buckley (Journal of Bacteriology Apr. 1996, v. 178, No. 7, p. 2060-2064).

Для того чтобы определить, включает ли белок мотив GDSX, представленный в настоящем изобретении, последовательность сравнивают с профилями скрытой модели Маркова (профилями HMM) базы данных rfam согласно методам, описанным в заявке WO 2004/064537 или WO 2004/064987.

Rfam является базой данных семейств белковых доменов и включает скорректированные элайнменты множества последовательностей для каждого семейства, а также профили скрытых моделей Маркова (профиль HMMs) для идентификации данных доменов в новых последовательностях. Введение в rfam можно найти в статье Bateman A. et al. (2002), Nucleic Acids Res. 30; 276-280. Скрытые модели Маркова используют в ряде баз данных, целью которых является классификация белков, в качестве обзора см. статью Bateman A. and Haft D.H. (2002), Brief Bioinform, 3; 236-245.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12230032&dopt = Реферат.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11752314&dopt =

Реферат.

В плане подробного объяснения скрытых моделей Маркова и того, как их применяют в базе данных pfam, см. монографию Durbin R., Eddy S. and Krogh A. (1998), *Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, ISBN 0-521-62041-4. Пакет программ Hammer можно получить в Washington University, St. Louis, USA.

Альтернативно, мотив GDSX можно идентифицировать с использованием пакета программ Hammer software package, инструкции представлены в монографии Durbin R., Eddy S. and Krogh A. (1998), *Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, ISBN 0-521-62041-4 и в ссылках в данной работе, и профиль HMMER2 приведен в данном описании.

К базе данных pfam можно получить доступ, например, через ряд серверов, которые в настоящее время находятся на следующих веб-сайтах:

<http://www.sanger.ac.uk/Software/pfam/index.shtml>;

<http://pfam.wustl.edu/>;

<http://pfam.jouy.inra.fr/>;

<http://pfam.cgb.ki.se/>.

База данных обеспечивает возможность поиска, при котором можно войти в последовательность белка. Используя заданные по умолчанию параметры базы данных, затем анализируют последовательность белка на присутствие доменов pfam. Домен GDSX является широко известным доменом в базе данных, и вследствие этого его присутствие будет распознано в любой запрашиваемой последовательности. База данных даст ответ относительно сравнительного анализа консенсусной последовательности pfam00657 с запрашиваемой последовательностью.

Фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения изобретения, может быть подвергнут сравнительному анализу с использованием консенсусной последовательности pfam00657 (в плане полного объяснения см. заявку WO 2004/064537 или WO 2004/064987).

Предпочтительно, когда положительное соответствие с профилем скрытой модели Маркова (профиль HMM) семейства домена pfam00657 указывает на присутствие домена GDSL или GDSX, соответствующего настоящему изобретению.

Предпочтительно, когда остатки мотива GANDY выбраны из GANDY, GGND, GGNDL, наиболее предпочтительно GANDY.

Предпочтительно, когда подвергнутый сравнительному анализу с консенсусной последовательностью pfam00657 фермент, предназначенный для использования в способах и вариантах применения изобретения, имеет по меньшей мере 1, предпочтительно более чем 1, предпочтительно более чем 2, предпочтительно более чем 3, предпочтительно более чем 4, предпочтительно более чем 5, предпочтительно более чем 6, предпочтительно более чем 7, предпочтительно более чем 8, предпочтительно более чем 9, предпочтительно более чем 10, предпочтительно более чем 11, предпочтительно более чем 12, предпочтительно более чем 13, предпочтительно более чем 14 следующих остатков аминокислот по сравнению с эталонной полипептидной последовательностью A.hydrophilia, а именно: SEQ ID NO: 1: Hid28, Hid29, Hid30, Hid31, Gly32, Asp33, Ser34, Hid35, Hid130, Gly131, Hid132, Asn133, Asp134, Hid135, His309.

Домен pfam00657 GDSX является уникальным идентификатором, который отличает белки, имеющие данный домен, от других ферментов.

Консенсусная последовательность pfam00657 представлена на фиг. 12 как SEQ ID NO: 2. Она получена при идентификации семейства pfam 00657, база данных version 6, которая также может быть обозначена в данном контексте как pfam00657.6.

Консенсусную последовательность можно обновить, используя следующие выпуски базы данных pfam (см., например, заявки WO 2004/064537 или WO 2004/064987).

Присутствие блока GANDY обнаруживают в семействе 00657 pfam из обоих выпусков базы данных. Дальнейшие выпуски базы данных pfam можно использовать для идентификации семейства 00657 pfam.

В одном варианте осуществления фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения изобретения, может быть охарактеризован с использованием следующих критериев:

(i) фермент обладает активностью ацилтрансферазы, которую можно определить как активность переноса сложного эфира, причем ацильная часть исходной эфирной связи липидного донора ацила переносится на акцептор ацила с образованием нового эфира;

(ii) фермент включает мотив последовательности аминокислот GDSX, в котором X означает один или более следующих остатков аминокислот: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S;

(iii) фермент включает His309 или включает остаток гистидина в положении, соответствующем His309 в ферменте липидацилтрансферазе *Aeromonas hydrophila*, показанном на фиг. 11 и 13 (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3).

Предпочтительно, когда остатком аминокислоты мотива GDSX является L.

В SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1 первые 18 остатков аминокислот образуют сигнальную последовательность. His309 последовательности полной длины, которая представляет собой белок, включающий сигнальную последовательность, приравнивают к His291 зрелой части белка, т.е. последовательности без сигнальной последовательности.

В одном варианте осуществления фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, включает следующую каталитическую триаду: Ser34, Asp134 и His309 или содержит остаток серина, остаток аспарагиновой кислоты и остаток гистидина соответственно в положениях, соответствующих Ser34, Asp134 и His309 в ферменте липидацилтрансферазе *Aeromonas hydrophila*, представленном на фиг. 13 (SEQ ID NO: 3) или фиг. 11 (SEQ ID NO: 1). Как определено выше, в последовательности, показанной в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1, первые 18 остатков аминокислот образуют сигнальную последовательность. Ser34, Asp134 и His309 последовательности полной длины, которая представляет собой белок, включающий сигнальную последовательность, приравнивают к Ser16, Asp116 и His291 зрелой части белка, т.е. последовательности без сигнальной последовательности. В консенсусной последовательности pfam00657, как приводят на фиг. 12 (SEQ ID NO: 2), остатки активного центра соответствуют Ser7, Asp157 и His348.

В одном варианте осуществления фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, можно охарактеризовать, используя следующие критерии:

(i) фермент обладает активностью ацилтрансферазы, которую можно определить как активность переноса сложного эфира, причем ацильная часть исходной эфирной связи первого липидного донора ацила переносится на акцептор ацила с образованием нового эфира;

(ii) фермент включает, по меньшей мере, Gly32, Asp33, Ser34, Asp134 и His309 или содержит остатки глицина, аспарагиновой кислоты, серина, аспарагиновой кислоты и гистидина в положениях, соответствующих Gly32, Asp33, Ser34, Asp134 и His309 соответственно, в ферменте липидацилтрансферазе *Aeromonas hydrophila*, приведенном на фиг. 13 (SEQ ID NO: 3) или фиг. 11 (SEQ ID NO: 1).

Соответственно фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, включает одну или более следующих последовательностей аминокислот:

(i) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 3 (см. фиг. 13);
 (ii) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 4 (см. фиг. 14);
 (iii) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 5 (см. фиг. 15);
 (iv) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 6 (см. фиг. 16);
 (v) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 7 (см. фиг. 17);
 (vi) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 8 (см. фиг. 18);
 (vii) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 9 (см. фиг. 19);
 (viii) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 10 (см. фиг. 20);
 (ix) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 11 (см. фиг. 21);
 (x) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 12 (см. фиг. 22);
 (xi) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 13 (см. фиг. 23);
 (xii) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 14 (см. фиг. 24);
 (xiii) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 1 (см. фиг. 11);
 (xiv) последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 15 (см. фиг. 25) или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность 75% или более с любой из последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15.

Соответственно фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, включает либо последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 15, либо включает последовательность аминокислот, которая имеет идентичность 75% или более, предпочтительно 80% или более, предпочтительно 85% или более, предпочтительно 90% или более, предпочтительно 95% или более с последовательностью аминокислот, показанной как SEQ ID NO: 3, или последовательностью аминокислот, показанной как SEQ ID NO: 4, или последовательностью аминокислот, показанной как SEQ ID NO: 1, или последовательностью аминокислот, показанной как SEQ ID NO: 15.

Соответственно фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, включает последовательность аминокислот, которая имеет идентичность 80% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более и еще более предпочтительно 95% или более с любой из последовательностей, показанной как SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1 или

SEQ ID NO: 15.

Соответственно фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, включает одну или более следующих последовательностей аминокислот:

(а) последовательность аминокислот, показанную как остатки аминокислот 1-100 SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1;

(б) последовательность аминокислот, показанную как остатки аминокислот 101-200 SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1;

(в) последовательность аминокислот, показанную как остатки аминокислот 201-300 SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1; либо

(г) последовательность аминокислот, которая имеет идентичность 75% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, еще более предпочтительно 95% или более с любой из последовательностей аминокислот, определенных в (а)-(с) выше.

Соответственно фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, включает одну или более следующих последовательностей аминокислот:

(а) последовательность аминокислот, показанную как остатки аминокислот 28-39 SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1;

(б) последовательность аминокислот, показанную как остатки аминокислот 77-88 SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1;

(в) последовательность аминокислот, показанную как остатки аминокислот 126-136 SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1;

(г) последовательность аминокислот, показанную как остатки аминокислот 163-175 SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1;

(д) последовательность аминокислот, показанную как остатки аминокислот 304-311 SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1; или

(е) последовательность аминокислот, которая имеет идентичность 75% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, еще более предпочтительно 95% или более с любой из последовательностей аминокислот, определенных в (а)-(е) выше.

В одном аспекте липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, может представлять собой липидацилтрансферазу из *Candida parapsilosis*, как описано в заявке EP 1275711. Таким образом, в одном аспекте липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способе и вариантах применения настоящего изобретения, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую одну из последовательностей аминокислот, описанных в SEQ ID NO: 17 (см. фиг. 28) или SEQ ID NO: 18 (см. фиг. 29).

Более предпочтительно, когда липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способе и вариантах применения настоящего изобретения, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 16 (см. фиг. 10), или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность 75% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, еще более предпочтительно 95% или более, еще более предпочтительно 98% или более либо еще более предпочтительно 99% или более с SEQ ID NO: 16. Данный фермент можно рассматривать как вариант фермента.

В одном аспекте липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способе и вариантах применения настоящего изобретения, может представлять собой лецитин: холестеринацилтрансферазу (LCAT) или ее вариант (например, вариант, полученный путем молекулярной эволюции).

Подходящие LCAT известны в области техники, и их можно получить из одного или более следующих организмов, например млекопитающих, крыс, мышей, кур, *Drosophila melanogaster*, растений, в том числе *Arabidopsis* и *Oryza saliva*, нематод, грибов и дрожжей.

В одном варианте осуществления фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, может представлять собой липидацилтрансферазу, получаемую и предпочтительно полученную из штаммов *E.coli* TOP 10, несущих pPet12aAhydro и pPet12aASalmo, депонированных фирмой Danisco A/S of Langebrogade 1, DK-1001, Копенгаген К, Дания, согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в Национальной коллекции промышленных, морских и пищевых бактерий (NCIMB), 23 St. Machar Street, Абердин, Шотландия, GB, 22 декабря 2003 г. под регистрационными номерами NCIMB 41204 и NCIMB 41205 соответственно.

Весьма предпочтительные липидацилтрансферазы, предназначенные для использования в способах, предложенных в настоящем изобретении, включают выделенные из *Aeromonas* spp., предпочтительно *Aeromonas hydrophila* или *A.salmonicida*, наиболее предпочтительно *A.salmonicida*. Наиболее предпочтительные липидацилтрансферазы, предназначенные для применения в настоящем изобретении, кодируются SEQ ID NO: 1, 3, 4, 15, 16. Компетентный специалист признает, что предпочтительно, чтобы сигнальные пептиды ацилтрансферазы отщеплялись в процессе экспрессии трансферазы. Сигнальный пептид

SEQ ID NO: 1, 3, 4, 15 и 16 представляет собой аминокислоты 1-18. Вследствие этого наиболее предпочтительными участками являются аминокислоты 19-335 для SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3 (*A. hydrophilia*) и аминокислоты 19-336 для SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. (*A. salmonicida*). При использовании для определения гомологии или идентичности последовательностей аминокислот предпочтительно, чтобы при сравнительном анализе, как описано в данном контексте, использовали зрелую последовательность.

Вследствие этого наиболее предпочтительными участками для определения гомологии (идентичности) являются аминокислоты 19-335 для SEQ ID NO: 1 и 3 (*A. hydrophilia*) и аминокислоты 19-336 для SEQ ID NO: 4, 15 и 16. (*A. salmonicida*). SEQ ID NO: 34 и 35 являются последовательностями зрелого белка весьма предпочтительных липидацилтрансфераз из *A. hydrophilia* и *A. Salmonicida* соответственно.

Липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в изобретении, может быть также выделена из *Thermobifida*, предпочтительно *T. fusca*, наиболее предпочтительной является кодируемая SEQ ID NO: 28.

Липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в изобретении, может быть также выделена из *Streptomyces*, предпочтительно *S. avermitis*, наиболее предпочтительной является кодируемая SEQ ID NO: 32. Другие возможные ферменты из *Streptomyces*, предназначенные для использования в настоящем изобретении, включают кодируемые SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 31, 33. Примеры показывают, что фермент, кодируемый SEQ ID NO: 33, высокоэффективен при ферментативном рафинировании гидратацией.

Фермент, предназначенный для использования в изобретении, может быть также выделен из *Corynebacterium*, предпочтительно *C. efficiens*, наиболее предпочтительным является кодируемый SEQ ID NO: 29.

Соответственно липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую любую из последовательностей аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 37, 38, 40, 41, 43, 45 или 47, либо последовательность аминокислот, которая идентична указанным по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% или кодируется любой из нуклеотидных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 36, 39, 42, 44, 46 или 48, либо нуклеотидными последовательностями, которые идентичны указанным по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98%.

Предпочтительно, когда липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, представляет собой липидацилтрансферазу, способную гидролизовать, по меньшей мере, галактолипиды и/или способную переносить ацильную группу, по меньшей мере, из галактолипида на один или более субстратов акцептора ацила, причем получаемый фермент предпочтительно получен из *Streptomyces species*.

В одном варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой липидацилтрансферазу, способную гидролизовать, по меньшей мере, галактолипиды и/или способную переносить ацильную группу, по меньшей мере, из галактолипида на один или более субстратов акцептора ацила, причем фермент кодируется нуклеиновой кислотой, выбранной из группы, состоящей из:

(а) нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 36;

(б) нуклеиновой кислоты, которая является родственной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 36 вследствие вырождения генетического кода, и

(в) нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 70% с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 36.

В одном варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой липидацилтрансферазу, включающую последовательность аминокислот, как показано в SEQ ID NO: 37, или последовательность аминокислот, которая идентична ей по меньшей мере на 60%.

В другом варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой липидацилтрансферазу, способную гидролизовать, по меньшей мере, галактолипид и/или способную переносить ацильную группу, по меньшей мере, с галактолипида на один или более субстратов акцептора ацила, причем фермент включает последовательность аминокислот, как показано в SEQ ID NO: 37, или последовательность аминокислот, которая идентична ей по меньшей мере на 60%.

Предпочтительно, когда липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, представляет собой липидацилтрансферазу, способную гидролизовать, по меньшей мере, галактолипиды, и/или способную переносить ацильную группу, по меньшей мере, с галактолипида на один или более субстратов акцептора ацила, причем получаемый фермент предпочтительно получен из *Thermobifida species*, предпочтительно

Thermobifida fusca.

Предпочтительно, когда липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, представляет собой липолитический фермент, способный гидролизовать, по меньшей мере, галактолипиды и/или способный переносить ацильную группу, по меньшей мере, с галактолипида на один или более субстратов акцептора ацила, причем получаемый фермент предпочтительно получен из *Corynebacterium species*, предпочтительно *Corynebacterium efficiens*.

В следующем варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую любую из последовательностей аминокислот, показанных как SEQ ID NO: 37, 38, 40, 41, 43, 45 или 47, или последовательность аминокислот, которая идентична указанным по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98%, либо кодируемую любой из нуклеотидных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 39, 42, 44, 46 или 48, либо нуклеотидной последовательностью, которая идентична указанным по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98%.

В следующем варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую любую из последовательностей аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 38, 40, 41, 45 или 47, либо последовательность аминокислот, которая идентична указанным по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98%, предназначенную для вариантов применения, описанных в данном контексте.

В следующем варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую любую из последовательностей аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 38, 40 или 47, либо последовательность аминокислот, которая идентична указанным по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98%, предназначенную для вариантов применения, описанных в данном контексте.

Более предпочтительно, когда в одном варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 47, или последовательность аминокислот, которая идентична указанной по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98%.

В другом варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 43 или 44, либо последовательность аминокислот, которая идентична указанным по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98%.

В другом варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 41, или последовательность аминокислот, которая идентична указанной по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98%.

В одном варианте осуществления липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, может представлять собой липидацилтрансферазу, способную гидролизовать, по меньшей мере, галактолипиды и/или способную переносить ацильную группу, по меньшей мере, с галактолипида на один или более субстратов акцептора ацила, причем фермент кодируется нуклеиновой кислотой, выбранной из группы, состоящей из:

а) нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 36;

б) нуклеиновой кислоты, которая является родственной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 36 вследствие вырождения генетического кода; и

в) нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 70% с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 36.

В одном варианте осуществления липидацилтрансфераза, соответствующая настоящему изобретению, может представлять собой получаемую липидацилтрансферазу, предпочтительно полученную из штаммов *Streptomyces* L130 или L131, депонированных фирмой Danisco A/S of Langebrogade 1, DK-1001 Копенгаген К, Дания согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в Национальной коллекции промышленных, морских и пищевых бактерий (NCIMB), 23 St. Machar Street, Абердин, Шотландия, GB, 25 июня 2004 г. под регистрационными номерами NCIMB 41226 и NCIMB 41227 соответственно.

Подходящие липидацилтрансферазы, предназначенные для использования в соответствии с настоящим изобретением и/или в способах, представленных в настоящем изобретении, могут включать любую из следующих последовательностей аминокислот и/или кодироваться следующими нуклеотидными последовательностями:

полинуклеотидом, кодирующим липидацилтрансферазу, соответствующую настоящему изобретению (SEQ ID NO: 16);

последовательностью аминокислот липидацилтрансферазы, соответствующей настоящему изобретению (SEQ ID NO: 17).

Подходящий фермент липидацилтрансфераза, предназначенный для использования в способах, соответствующих изобретению, можно также идентифицировать посредством элайнмента с последовательностью L131 (SEQ ID NO: 37) с помощью Align X, алгоритма попарного элайнмента Clustal W VectorNTI при использовании установок, заданных по умолчанию.

Сравнительный анализ L131 и гомологов из *S. avermitilis* и *T. fusca* иллюстрирует консервацию мотива GDSX (GDSY в L131, а также *S. avermitilis* и *T. fusca*), бокса GANDY, который представляет собой либо GGNDА, либо GGNDL (является, как считают, консервативным каталитическим гистидином). Данные три консервативных блока выделены на фиг. 61.

Соответственно, когда липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способах или вариантах применения настоящего изобретения, может представлять собой вариант липидацилтрансферазы, в таком случае фермент можно охарактеризовать тем, что он включает мотив последовательности аминокислот GDSX, в котором X означает один или более следующих остатков аминокислот: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, причем при сравнительном анализе первичной структуры этого фермента с консенсусной последовательностью либо SEQ ID NO: 2, либо SEQ ID NO: 37, либо с обеими указанными последовательностями включает блок GANDY. Этот вариант фермента может включать одну или более модификаций аминокислот по сравнению с исходной последовательностью в любом из одного или более остатков аминокислот, определенных в группе 2, или группе 4, или группе 6, или группе 7 (определено ниже).

Например, вариант фермента липидацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, можно охарактеризовать тем, что фермент включает мотив последовательности аминокислот GDSX, в которой X означает один или более следующих остатков аминокислот: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, причем вариант фермента включает одну или более модификаций аминокислот по сравнению с исходной последовательностью в любом из одного или более остатков аминокислот, подробно описанных в группе 2, или группе 4, или группе 6, или группе 7 (определено ниже), идентифицированных с помощью указанной исходной последовательности, подвергнутой сравнительному анализу структуры со структурной моделью P10480, определенной в данном контексте, которая предпочтительно получена путем структурного элайнмента координат кристаллической структуры P10480 с 1IVN.PDB и/или 1DEO.PDB, как представлено в данном контексте. В следующем варианте осуществления вариант фермента липидацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, можно охарактеризовать тем, что фермент включает мотив последовательности аминокислот GDSX, в которой X означает один или более следующих остатков аминокислот: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, причем вариант фермента включает одну или более модификаций аминокислот по сравнению с исходной последовательностью в любом из одного или более остатков аминокислот, описанного в группе 2, идентифицированных при структурном анализе исходной последовательности с консенсусной последовательностью rfam (SEQ ID NO: 2 - фиг. 12) и модифицированных согласно структурной модели P10480, чтобы обеспечить наилучшим образом соответствующее перекрытие (см. фиг. 30), как описано в данном контексте.

Соответственно вариант фермента липидацилтрансферазы может включать последовательность аминокислот, которая показана как SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33, за исключением одной или более модификаций аминокислот в любом одном или более остатков аминокислот, определенных в группе 2, или группе 4, или группе 6, или группе 7 (определенных ниже), идентифицированных с помощью элайнмента последовательности с SEQ ID NO: 34.

Альтернативно, вариант фермента липидацилтрансферазы может представлять собой вариант фермента, включающий последовательность аминокислот, которая показана как SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33, за исключением одной или более модификаций аминокислот в любом одном или более остатков аминокислот, определенных в группе 2, или группе 4, или группе 6, или группе 7 (определенных ниже), идентифицированных с помощью указанной исходной последовательности, подвергнутой сравнительному анализу структуры со структурной моделью P10480,

определенной в данном контексте, которая предпочтительно получена путем структурного элайнмента координат кристаллической структуры P10480 с 1IVN.PDB и/или 1DEO.PDB, как представлено в данном контексте.

Альтернативно, вариант фермента липидацилтрансферазы может представлять собой вариант фермента, включающий последовательность аминокислот, которая показана как SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33, за исключением одной или более модификаций аминокислот в любом одном или более остатков аминокислот, определенных в группе 2, идентифицированных при структурном анализе исходной последовательности с консенсусной последовательностью rfam (SEQ ID NO: 2) и модифицированных согласно структурной модели P10480, чтобы обеспечить наилучшим образом соответствующее перекрытие (см. фиг. 30), как описано в данном контексте.

Термин "модификация", как используют в данном контексте, означает добавление, замену и/или удаление. Предпочтительно, когда термин "модификация" означает "замена".

Чтобы избежать неопределенности при замене аминокислоты в исходном ферменте, ее предпочтительно заменяют аминокислотой, которая отличается от исходно обнаруженной в данном положении в исходном ферменте, чтобы, таким образом, получить вариант фермента. Другими словами, термин "замена" не предусматривает покрытие замены аминокислоты такой же аминокислотой.

Предпочтительно, когда исходный фермент представляет собой фермент, который включает последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 34, и/или SEQ ID NO: 15, и/или SEQ ID NO: 35.

Предпочтительно, когда вариант фермента представляет собой фермент, который включает последовательность аминокислот, которая показана как SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35, за исключением одной или более модификаций аминокислот в любом из одного или более остатков аминокислот, определенных в группе 2, или группе 4, или группе 6, или группе 7.

В одном варианте осуществления предпочтительно, когда вариант фермента включает одну или более модификаций аминокислот по сравнению с исходной последовательностью по меньшей мере в одном из остатков аминокислот, определенных в группе 4.

Соответственно вариант фермента включает один или более следующих модификаций аминокислот по сравнению с исходным ферментом: S3E, A, G, K, M, Y, R, P, N, T или G; E309Q, R или A, предпочтительно Q или R; -318Y, H, S или Y, предпочтительно Y.

Предпочтительно, когда X мотива GDSX представляет собой L. Таким образом, предпочтительно, когда исходный фермент включает аминокислотный мотив GDSL.

Предпочтительно, когда способ получения варианта фермента липидацилтрансферазы далее включает одну или более следующих стадий:

- 1) картирование структурной гомологии или
- 2) сравнительный анализ гомологии последовательностей.

Соответственно картирование структурной гомологии может включать одну или более следующих стадий:

- i) проведение элайнмента исходной последовательности со структурной моделью (1IVN.PDB), представленной на фиг. 46;
- ii) выбор одного или более остатков аминокислот в сферической области 10 Å, центром которой является центральный атом углерода молекулы глицерина в активном центре (см. фиг. 47) (такой как один или более остатков аминокислот, определенных в группе 1 или группе 2); и
- iii) модификация одной или более аминокислот, выбранных в соответствии со стадией (ii), в указанной исходной последовательности.

В одном варианте осуществления выбранный остаток аминокислоты может находиться в сферической области 9, предпочтительно в сферической области 8, 7, 6, 5, 4 или 3 Å, центром которой является центральный атом углерода молекулы глицерина в активном центре (см. фиг. 47).

Соответственно картирование структурной гомологии может включать одну или более следующих стадий:

- i) проведение элайнмента исходной последовательности со структурной моделью (1IVN.PDB), представленной на фиг. 46;
- ii) выбор одной или более аминокислот в сферической области 10 Å, центром которой является центральный атом углерода молекулы глицерина в активном центре (см. фиг. 47) (такой как один или более остатков аминокислот, определенных в группе 1 или группе 2);
- iii) определение, является ли один или более остатков аминокислот, выбранных в соответствии со стадией (ii), высококонсервативным (особенно остатки активного центра и/или часть мотива GDSX motif, и/или часть мотива GANDY); и
- iv) модификация одной или более аминокислот, выбранных в соответствии со стадией (ii), за исключением консервативных участков, идентифицированных в соответствии со стадией (iii), в указанной исходной последовательности.

В одном варианте осуществления выбранный остаток аминокислоты может находиться в сферической области 9, предпочтительно 8, 7, 6, 5, 4, или 3 Å, центром которой является центральный атом углерода молекулы глицерина в активном центре (см. фиг. 47).

Альтернативно или в сочетании с вышеописанным картированием структурной гомологии может быть проведено картирование структурной гомологии путем выбора специфических участков петли (LRs) или промежуточных участков (IVRs), выделенных при сравнении первичной структуры rfam (сравнение первичной структуры 2, см. фиг. 48), перекрывающихся с моделью P10480 и IIVN. Участки петли (LRs) или промежуточные участки (IVRs) определены в нижеприведенной таблице.

	Положения аминокислоты P10480 (SEQ ID NO:34)
IVR1	1-19
Петля 1 (LR1)	20-41
IVR2	42-76
Петля 2 (LR2)	77-89
IVR3	90-117
Петля 3 (LR3)	118-127
IVR4	128-145
Петля 4 (LR4)	146-176
IVR5	177-207
Петля 5 (LR5)	208-287
IVR6	288-317

В ряде вариантов осуществления настоящего изобретения вариант фермента ацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, не только включает модификации аминокислоты в одной или более аминокислот, определенных в любой из групп 1-4 и 6-7, но также включает по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в одном или более из определенных выше промежуточных участков (IVR1-6) (предпочтительно в одном или более из IVRs3, 5 и 6, более предпочтительно в IVR5 или IVR6) и/или в одном или более определенных выше участков петли (LR1-5) (предпочтительно в одном или более из LR1, LR2 или LR5, более предпочтительно в LR5).

В одном варианте осуществления вариант ацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, может включать одну или более модификаций аминокислоты, которая не только определена одной или более групп 2, 4, 6 и 7, но также находится в одном или более из IVRs1-6 (предпочтительно в IVR3, 5 или 6, более предпочтительно в IVR5 или IVR6) или в одном или более из LRs1-5 (предпочтительно в LR1, LR2 или LR5, более предпочтительно в LR5).

Соответственно, вариант ацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, может включать одну или более модификаций аминокислоты, которая находится не только в группе 1 или 2, но также в IVR3.

Соответственно, вариант ацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, может включать одну или более модификаций аминокислоты, которая находится не только в группе 1 или 2, но также в IVR5.

Соответственно, вариант ацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, может включать одну или более модификаций аминокислоты, которая находится не только в группе 1 или 2, но также в IVR6.

Соответственно, вариант ацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, может включать одну или более модификаций аминокислоты, которая находится не только в группе 1 или 2, но также в LR1.

Соответственно, вариант ацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, может включать одну или более модификаций аминокислоты, которая находится не только в группе 1 или 2, но также в LR2.

Аналогично в ряде вариантов осуществления настоящего изобретения вариант фермента ацилтрансферазы, предназначенный для использования в способах и вариантах применения настоящего изобретения, не только включает модификацию аминокислоты в одном или более остатков аминокислот, которые находятся в сферической области 10, предпочтительно в 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 Å, центр которой находится на центральном атоме углерода молекулы глицерина в активном центре (см. фиг. 47), но также включает модификацию по меньшей мере одной аминокислоты в одном или более определенных выше промежуточных участков (IVR1-6) (предпочтительно в одном или более IVRs3, 5 и 6, более предпочтительно в IVR5 или IVR6) и/или в одном или более из вышеопределенных участков петли (LR1-5) (предпочтительно в одном или более из LR1, LR2 или LR5, более предпочтительно в LR5).

В одном варианте осуществления предпочтительно, когда модификация аминокислоты представляет собой модификацию в одном или более остатков аминокислот, который находится в сферической области 10 Å, а также в LR5.

Таким образом, картирование структурной гомологии может включать одну или более следующих стадий:

- i) проведение элайнмента исходной последовательности со структурной моделью (1IVN.PDB), показанной на фиг. 46;
- ii) выбор одного или более остатков аминокислот в сферической области 10 Å, центр которой находится на центральном атоме углерода молекулы глицерина в активном центре (см. фиг. 47) (таком как один или более остатков аминокислот, определенных в группе 1 или группе 2); и/или выбор одного или более остатков аминокислот в IVR1-6) (предпочтительно в IVR3, 5 или 6, более предпочтительно в IVR5 или IVR6); и/или выбор одного или более остатков аминокислот в LR1-5 (предпочтительно в LR1, LR2 или LR5, более предпочтительно в LR5) и
- iii) модификация одной или более аминокислот, выбранных в соответствии со стадией (ii) в указанной исходной последовательности.

В одном варианте осуществления выбранный остаток аминокислоты может находиться в сферической области 9 Å, предпочтительно в сферической области 8, 7, 6, 5, 4 или 3 Å, центр которой находится на центральном атоме углерода молекулы глицерина в активном центре (см. фиг. 47).

Соответственно, картирование структурной гомологии может включать одну или более следующих стадий:

- i) проведение элайнмента исходной последовательности со структурной моделью (1IVN.PDB), показанной на фиг. 46;
- ii) выбор одного или более остатков аминокислот в сферической области 10 Å, центр которой находится на центральном атоме углерода молекулы глицерина в активном центре (см. фиг. 47) (таком как один или более остатков аминокислот, определенных в группе 1 или группе 2); и/или выбор одного или более остатков аминокислот в IVR1-6) (предпочтительно в IVR3, 5 или 6, более предпочтительно в IVR5 или IVR6); и/или выбор одного или более остатков аминокислот в LR1-5 (предпочтительно в LR1, LR2 или LR5, более предпочтительно в LR5);
- iii) определение, являются ли один или более остатков аминокислот, выбранных в соответствии со стадией (ii), высококонсервативными (особенно остатки активных центров, и/или часть мотива, и/или часть мотива GANDY); и
- модификацию одной или более аминокислот, выбранных в соответствии со стадией (ii), за исключением консервативных участков, идентифицированных в соответствии со стадией (iii) в указанной исходной последовательности.

Соответственно, одна или более аминокислот, выбранных в способах, подробно описанных выше, находятся не только в сферической области 10 Å, центр которой расположен на центральном атоме углерода молекулы глицерина в активном центре (см. фиг. 47) (например, один или более остатков аминокислот, определенных в группе 1 или группе 2), но также в одном или более IVRs1-6 (предпочтительно в IVR3, 5 или 6, более предпочтительно в IVR5 или IVR6) или в одном или более LRs1-5 (предпочтительно в LR1, LR2 или LR5, более предпочтительно в LR5).

В одном варианте осуществления предпочтительно, когда одна или более модификаций аминокислот находится/находятся в LR5. В случае когда модификация(и) находится в LR5, модификация не является той, которая определена в группе 5. Соответственно, одна или более модификаций аминокислот не только расположены в области, определенной LR5, но также включают аминокислоту в одной или более из группы 2, группы 4, группы 6 или группы 7.

Соответственно, сравнительный анализ гомологии последовательностей может включать одну или более следующих стадий:

- i) выбор первой исходной липидацилтрансферазы;
- ii) идентификация второй родственной липидацилтрансферазы, обладающей требуемой активностью;
- iii) проведение элайнмента указанной первой исходной липидацилтрансферазы и второй родственной липидацилтрансферазы;
- iv) идентификация остатков аминокислот, которые отличаются в двух последовательностях; и
- v) модификация одного или более остатков аминокислот, идентифицированных в соответствии со стадией (iv) в указанной исходной липидацилтрансферазе.

Соответственно, структурный анализ гомологии последовательностей может включать одну или более следующих стадий:

- i) выбор первой исходной липидацилтрансферазы;
- ii) идентификация второй родственной липидацилтрансферазы, обладающей требуемой активностью;
- iii) проведение элайнмента указанной первой исходной липидацилтрансферазы и второй родственной липидацилтрансферазы;
- iv) идентификация остатков аминокислот, которые отличаются в двух последовательностях;
- v) определение, является ли один или более остатков аминокислот, выбранных в соответствии со стадией (iv), высококонсервативными (особенно остатки активного центра, и/или часть мотива GDSX,

и/или часть мотива GANDY); и

vi) модификация одного или более остатков аминокислот, идентифицированных в соответствии со стадией (iv), за исключением консервативных участков, идентифицированных в соответствии со стадией (v) в указанной исходной последовательности.

Соответственно, указанная первая исходная липидацилтрансфераза может включать любую из следующих последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33.

Соответственно, указанная вторая родственная липидацилтрансфераза может включать любую из следующих последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33.

Вариант фермента может включать по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с исходным ферментом. В ряде вариантов осуществления вариант фермента может включать по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3, предпочтительно по меньшей мере 4, предпочтительно по меньшей мере 5, предпочтительно по меньшей мере 6, предпочтительно по меньшей мере 7, предпочтительно по меньшей мере 8, предпочтительно по меньшей мере 9, предпочтительно по меньшей мере 10 модификаций аминокислот по сравнению с исходным ферментом.

Что касается специфических остатков аминокислот, то в данном контексте нумерация такая, как получена при структурном анализе варианта последовательности с эталонной последовательностью, показанной как SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35.

В одном аспекте предпочтительно, когда вариант фермента включает одну или более следующих замен аминокислот:

S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, или Y; и/или
 L17A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 S18A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, или Y; и/или
 K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 Y30A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, или W; и/или
 G40A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 K82A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 N87A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 W111A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, или Y; и/или
 A114C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 Y117A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, или W; и/или
 L118A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 P156A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 G159A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 Q160A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 N161A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 P162A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 S163A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, или Y; и/или
 A164C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 R165A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, или Y; и/или
 S166A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, или Y; и/или
 Q167A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 K168A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 V169A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, или Y; и/или
 V170A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, или Y; и/или
 E171A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 A172C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, или W; и/или
 H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 N181A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или

Q182A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, или Y, предпочтительно K; и/или
 M209A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 L210 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 R211 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 N215 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 Y226A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, или W; и/или
 Y230A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W; и/или
 K284A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 M285A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 V290A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, или Y; и/или
 E309A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, или Y; и/или
 S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, или Y.

В дополнение или альтернативно этому может иметься одно или более С-концевых удлинений. Предпочтительно, когда дополнительное С-концевое удлинение состоит из одной или более алифатических аминокислот, предпочтительно неполярной аминокислоты, более предпочтительно из I, L, V или G. Таким образом, настоящее изобретение далее представляет вариант фермента, включающий одно или более следующих С-концевых удлинений: 318I, 318L, 318V, 318G.

В случае когда остатки в исходном скелете отличаются от находящихся в P10480 (SEQ ID NO: 2), как определяют посредством гомологичного элайнмента и/или структурного элайнмента с P10480 и/или HIVN, может потребоваться заменить остатки, которые выравниваются с любым одним или более следующим остатков аминокислот в P10480 (SEQ ID NO: 2): Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309 или Ser310, остатком, обнаруженным в P10480, соответственно.

Варианты фермента, которые имеют пониженную гидролитическую активность в отношении фосфолипида, такого как фосфатидилхолин (ФХ), могут также иметь повышенную активность трансферазы, переносящей группу из фосфолипида.

Варианты фермента, которые обладают повышенной активностью трансферазы, переносящей группы из фосфолипида, такого как фосфатидилхолин (ФХ), могут также иметь повышенную активность в отношении фосфолипида.

Соответственно, один или более следующих центров могут быть включены в связывание субстрата:

Leu17; Ala114; Tyr 179; His180; Asn181; Met209; Leu210; Arg211; Asn215; Lys284; Met285; Gln289; Val290.

Модификация одного или более следующих остатков может привести в результате к получению варианта фермента, обладающего повышенной абсолютной активностью трансферазы в отношении фосфолипида:

S3, D157, S310, E309, Y179, N215, K22, Q289, M23, H180, M209, L210, R211, P81, V112, N80, L82, N88; N87.

Специфические модификации, которые могут дать вариант фермента, обладающий улучшенной активностью трансферазы в отношении фосфолипида, могут быть выбраны из одной или более следующих модификаций:

S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y; предпочтительно N, E, K, R, A, P или M, наиболее предпочтительно S3A
D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно D157S, R, E, N, G, T, V, Q, K или C
S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y; предпочтительно S310T
-318 E
E309A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y; предпочтительно E309 R, E, L, R или A
Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W; предпочтительно Y179 D, T, E, R, N, V, K, Q или S, более предпочтительно E, R, N, V, K или Q
N215A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно N215 S, L, R или Y
K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно K22 E, R, C или A
Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно Q289 R, E, G, P или N
M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно M23 K, Q, L, G, T или S
H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно H180 Q, R или K
M209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно M209 Q, S, R, A, N, Y, E, V или L
L210A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно L210 R, A, V, S, T, I, W или M
R211A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W или Y; предпочтительно R211T
P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно P81G
V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W или Y; предпочтительно V112C
N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно N80 R, G, N, D, P, T, E, V, A или G
L82A, C, D, E, F, G, H, I, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно L82N, S или E
N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно N88C
N87A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно N87M или G

Модификация одного или более следующих остатков приводит в результате к получению варианта фермента, обладающего повышенной абсолютной активностью трансферазы в отношении фосфолипида:

S3 N, R, A, G

M23 K, Q, L, G, T, S

H180 R

L82 G

Y179 E, R, N, V, K или Q

E309 R, S, L или A

Одной из предпочтительных модификаций является N80D. Это, в частности, тот случай, когда используют эталонную последовательность SEQ ID NO: 35. Вследствие этого в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения липидацилтрансфераза, соответствующая настоящему изобретению, включает SEQ ID NO: 35.

Как отмечено выше относительно специфических остатков аминокислот в данном контексте, нумерация такая, как получена при сравнительном анализе варианта последовательности с эталонной последовательностью, показанной как SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35.

Во многом предпочтительно, когда липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в способе и вариантах применения настоящего изобретения, может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 16 (см. фиг. 10), или последовательность аминокислот, которая идентична на 75% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, еще более предпочтительно 95% или более, еще более предпочтительно 98% или более либо еще более предпочтительно 99% или более SEQ ID NO: 16. Данный фермент можно считать вариантом фермента.

Чтобы избежать неопределенности, когда конкретную аминокислоту описывают, например, в специфическом положении, например L118, это относится к специфической аминокислоте с номером остатка 118 в SEQ ID NO: 34, пока не указывают иначе. Однако остаток аминокислоты в положении 118 в другом исходном ферменте может быть отличным от лейцина.

Таким образом, когда указывают заменить аминокислоту остатка 118, хотя ссылка может быть сделана на L118, компетентный специалист легко поймет, что, если исходный фермент отличен от приведенного в SEQ ID NO: 34, замещаемая аминокислота может не быть лейцином. Вследствие этого возможно, что при замене последовательности аминокислот в исходном ферменте, который не является ферментом, имеющим последовательность аминокислот, показанную как SEQ ID NO: 34, новая (замещающая) аминокислота может быть такой же, как указано в SEQ ID NO: 34. Это может быть в случае, например, когда аминокислота указанного остатка 118 не является лейцином и вследствие этого отлична от аминокислоты остатка 118 в SEQ ID NO: 34.

Другими словами, в остатке 118, например, если исходный фермент имеет в данном положении аминокислоту, отличную от лейцина, данная аминокислота может быть заменена лейцином в соответствии с настоящим изобретением.

Для целей настоящего изобретения степень идентичности основана на числе элементов последовательности, которые являются одинаковыми. Степень идентичности в соответствии с настоящим изобретением может быть, соответственно, определена с помощью компьютерных программ, известных в области техники, таких как GAP, представленная в пакете программ GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, US53711) (см. статью Needleman & Wunsch (1970), J. of Molecular Biology, 48, 443-45) с использованием следующих установок для сравнения последовательностей полипептидов: формирования GAP образование потерь 3.0 и дополнительные потери GAP 0,1. Соответственно, степень идентичности касательно последовательности аминокислот определяют по меньшей мере для 20 следующих друг за другом аминокислот, предпочтительно по меньшей мере для 30 следующих друг за другом аминокислот, предпочтительно по меньшей мере для 40 следующих друг за другом аминокислот, предпочтительно по меньшей мере для 50 следующих друг за другом аминокислот, предпочтительно по меньшей мере для 60 следующих друг за другом аминокислот.

Соответственно, фермент липидацилтрансфераза, представленный в настоящем изобретении, можно получить и предпочтительно получают из организмов из одного или более следующих родов: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Candida*, *Thermobifida* и *Corynebacterium*.

Соответственно, фермент липидацилтрансферазу, представленный в настоящем изобретении, можно получить и предпочтительно получают из организмов из одного или более следующих организмов: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptomyces thermosacchari*, *Streptomyces avermitilis*, *Lactobacillus helveticus*,

Desulfitobacterium dehalogenans, *Bacillus* sp, *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Candida parapsilosis*, *Thermobifida fusca* и *Corynebacterium efficiens*.

В одном аспекте предпочтительно, когда получаемый фермент липидацилтрансфераза, представленный в настоящем изобретении, предпочтительно получен из одного или более *Aeromonas hydrophila* или *Aeromonas salmonicida*.

В одном варианте осуществления, соответственно, стерин и/или станол может включать один или более следующих структурных признаков:

- i) 3-β-гидроксильную группу или 3-α-гидроксильную группу и/или
- ii) циклы А:В в цис-положении или циклы А:В в транс-положении или C₅-C₆ является ненасыщенным.

Подходящие стеринные акцепторы ацила включают холестерин и фитостерины, например α-ситостерин, β-ситостерин, стигмастерин, эргостерин, кампестерин, 5,6-дигидростерин, брассикастерин, α-спинастерин, β-спинастерин, γ-спинастерин, δ-спинастерин, фукостерин, димостерин, аскостерин, себеристерин, эпистерин, анастерин, гипостерин, хондрилластерин, десмостерин, халиностерин, пориферастерин, клионастерин, стеринные гликозиды, токоферол, токотриенол и другие природные или синтетические изомерные формы и производные.

Преимуществом в одном варианте осуществления стеринный акцептор ацила представляет собой токоферол. Соответственно, токоферол может являться одним или более из γ-, δ-, β- или d-α-токоферолов, включая, например, кислый сукцинат d-α-токоферола. В одном варианте осуществления предпочтительно, когда стеринный акцептор ацила представляет собой α-токоферол.

В одном варианте осуществления предпочтительно, когда способ, представленный в настоящем изобретении, включает стадию добавления к маслу токоферола, предпочтительно α-токоферола.

В одном аспекте предпочтительно, когда стеринный акцептор ацила представляет собой холестерин.

В одном аспекте предпочтительно, когда стеринный и/или станоловый акцептор ацила представляет собой стерин и/или станол, отличный от холестерина.

В одном аспекте настоящего изобретения, соответственно, в качестве акцептора ацила может действовать больше одного стерина и/или станола, соответственно, в качестве акцептора ацила может действовать больше двух стеринных и/или станолов. Другими словами, в одном аспекте настоящего изобретения, соответственно, может быть получено больше одного сложного стеринного эфира и/или сложного станолового эфира. Соответственно, когда холестерин является акцептором ацила, один или более других стеринных или один или более станолов также могут действовать как акцептор ацила. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение представляет способ получения *in situ* как сложного эфира токоферола, так и по меньшей мере одного из сложных эфиров другого стерина или станола в комбинации. Другими словами, липидацилтрансфераза для некоторых аспектов настоящего изобретения может переносить ацильную группу с липида на оба, токоферол и по меньшей мере один из других стеринных и/или по меньшей мере один станол.

Масло, полученное согласно настоящему изобретению, можно использовать для снижения риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, в частности для снижения уровня холестерина сыворотки крови и/или для снижения уровня липопротеина низкой плотности. Как холестерин сыворотки крови, так и липопротеины низкой плотности ассоциированы с рядом заболеваний человека, таких как атеросклероз и/или, например, сердечное заболевание. Таким образом, предполагают, что масла, полученные согласно настоящему изобретению, можно использовать для уменьшения риска развития данных заболеваний.

Стеринный акцептор ацила может представлять собой акцептор, обнаруженный в естественных условиях в пищевом или растительном масле.

Альтернативно или дополнительно стеринный акцептор ацила может представлять собой акцептор, добавленный к пищевому или растительному маслу.

В случае когда стерин и/или станол добавляют к пищевому маслу, стерин и/или станол могут быть добавлены перед, одновременно и/или после добавления липидацилтрансферазы, представленной в настоящем изобретении. Соответственно, настоящее изобретение может охватывать добавление экзогенных стеринных/станолов, особенно фитостеринных/фитостанолов, к пищевому или растительному маслу перед или одновременно с добавлением фермента, представленного в настоящем изобретении.

Для некоторых аспектов один или более стеринных, присутствующих в пищевом масле, можно превратить в один или более станолов перед тем или в то же самое время, когда добавляют липидацилтрансферазу в соответствии с настоящим изобретением. Можно использовать любой подходящий способ превращения стеринных в станолы. Например, превращение может быть осуществлено, в частности, путем химического гидрирования. Превращение можно провести перед добавлением липидацилтрансферазы в соответствии с настоящим изобретением или одновременно с добавлением липидацилтрансферазы в со-

ответствии с настоящим изобретением. Соответственно, ферменты для превращения стеринов в станолаы описаны в заявке WO 00/061771.

Соответственно, настоящее изобретение можно использовать для получения сложных фитостаноловых эфиров *in situ* в пищевом масле. Фитостаноловые эфиры обладают повышенной растворимостью в липидных мембранах, биодоступностью и повышенным благоприятным эффектом на состояние здоровья (см., например, заявку WO 92/99640).

Преимущество настоящего изобретения состоит в том, что сложные стериновые или станоловые эфиры получают в пищевом масле в процессе его рафинирования гидратацией. Следующее преимущество состоит в том, что фермент обеспечивает рафинирование гидратацией без повышения или существенного повышения содержания свободных жирных кислот в пищевом масле. Образование свободных жирных кислот в пищевом масле может быть вредным. Предпочтительно, когда способ, представленный в настоящем изобретении, в результате приводит к рафинированию пищевого масла гидратацией, при котором накопление свободных жирных кислот понижено и/или исключено. Не намереваясь связывать себя теорией, в соответствии с настоящим изобретением жирная кислота, которая удаляется из липида, переносится липидацилтрансферазой на акцептор ацила, например стерин и/или станол. Таким образом, общий уровень свободных жирных кислот в пищевом продукте не повышается или повышается только до незначительного уровня. Это прямо противоположно ситуации, когда при ферментативном рафинировании пищевых масел гидратацией используют фосфолипазы, такие как Lecitase Ultra™. В частности, применение данных фосфолипаз может привести к образованию повышенного количества свободных жирных кислот в пищевом масле, что может быть вредным. Согласно настоящему изобретению накопление свободных жирных кислот понижено и/или исключено по сравнению с количеством свободных жирных кислот, которое накапливалось бы при использовании фермента фосфолипазы, такой как Lecitase Ultra™, вместо липидацилтрансферазы, представленной в настоящем изобретении.

Липидацилтрансфераза, представленная в настоящем изобретении, может подходить для использования в ферментативном рафинировании растительных или пищевых масел гидратацией. При переработке растительного или пищевого масла данное пищевое или растительное масло обрабатывают липидацилтрансферазой, представленной в настоящем изобретении, чтобы гидролизовать большую часть фосфолипида. Предпочтительно, когда жирные ацильные группы переносятся из полярных липидов на акцептор ацила. Способ рафинирования, как правило, приводит в результате к уменьшению содержания полярных липидов, особенно фосфолипидов, в пищевом масле вследствие гидролиза основной части (т.е. больше 50%) фосфолипида. Как правило, водную фазу, включающую гидролизованный фосфолипид, отделяют от масла. Соответственно, пищевое или растительное масло может изначально (предварительная обработка ферментом, представленным в настоящем изобретении) иметь содержание фосфора 50-250 промилей.

Как известно компетентному специалисту, термин "рафинирование гидратацией", как используют в данном контексте, означает рафинирование масла путем превращения фосфатидов (таких как лецитин, фосфолипиды и сорбированное масло) в гидратируемые фосфатиды. Масло, которое рафинировано гидратацией, является более текучим и, таким образом, имеет улучшенные технологические свойства по сравнению с маслом, не подвергнутым рафинированию гидратацией.

Термин "трансферазы", как используют в данном контексте, является взаимозаменяемым с термином "липидацилтрансфераза".

Соответственно, липидацилтрансфераза, как определено в данном контексте, катализирует одну или более из следующих реакций: интерэстерификация, трансэстерификация, алкоголиз, гидролиз.

Термин "интерэстерификация" относится к ферментативно катализируемому переносу ацильных групп между липидным донором и липидным акцептором, причем липидный донор не является свободной ацильной группой.

Термин "трансэстерификация", как используют в данном контексте, означает ферментативно катализируемый перенос ацильной группы от липидного донора (отличного от свободной жирной кислоты) на акцептор ацила (отличный от воды).

Как используют в данном контексте, термин "алкоголиз" относится к ферментативному расщеплению ковалентной связи кислотного производного путем реакции со спиртом ROH, так что один из продуктов связывается с Н спирта, а другой продукт связывается с группой OR спирта.

Как используют в данном контексте, термин "спирт" относится к алкильному соединению, включающему гидроксильную группу.

Как используют в данном контексте, термин "гидролиз" относится к ферментативно катализируемому переносу ацильной группы с липида на группу ОН молекулы воды.

Термин "без повышения или без существенного повышения уровня свободных жирных кислот", как используют в данном контексте, означает, что предпочтительно, когда липидацилтрансфераза, представленная в настоящем изобретении, имеет 100% активность трансферазы (т.е. переносит 100% ацильных групп с донора ацила на акцептор ацила при отсутствии гидролитической активности); однако фермент может переносить менее чем 100% ацильных групп, присутствующих в липидном доноре ацила, на ак-

цептор ацила. В таком случае предпочтительно, когда ацилтрансферазная активность составляет по меньшей мере 5%, более предпочтительно по меньшей мере 10%, более предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно по меньшей мере 98% общей активности фермента. Процент трансферазной активности (т.е. трансферазная активность как доля общей ферментативной активности) можно определить с помощью следующего протокола.

Фермент, подходящий для использования в способах, представленных в изобретении, предпочтительно обладает активностью фосфолипазы в стандартном анализе активности фосфолипазы, описанном ниже.

Определение активности фосфолипазы (анализ активности фосфолипазы (PLU-7)).

Субстрат.

0,6% L- α фосфатидилхолина растительного 95% (фирмы Avanti #441601), 0,4% Тритон-X100 (фирмы Sigma X-100) и 5 мМ CaCl₂ диспергируют в 0,05 М буфере HEPES pH 7.

Методика анализа.

400 мкл субстрата вносят в эппендорфовскую пробирку объемом 1,5 мл и помещают в термосмеситель Eppendorf при 37°C на 5 мин. В точке времени t=0 мин добавляют 50 мкл раствора фермента. Кроме того, анализируют контроль с водой вместо фермента. Образец перемешивают при 10×100 об/мин в термосмесителе Eppendorf при 37°C в течение 10 мин. В точке времени t=10 мин эппендорфовскую пробирку помещают в другой термосмеситель при 99°C на 10 мин, чтобы остановить реакцию.

Свободную жирную кислоту в образцах анализируют с использованием набора NEFA C фирмы WAKO GmbH.

Активность фермента PLU-7 при pH 7 рассчитывают как количество микромолей жирной кислоты, образующееся в минуту в условиях анализа.

Более предпочтительно, когда липидацилтрансфераза будет также обладать активностью трансферазы, как определено нижеприведенной методикой.

Протокол определения активности ацилтрансферазы, %.

Пищевое масло, к которому добавлена липидацилтрансфераза, представленная в настоящем изобретении, можно экстрагировать после ферментативной реакции с CHCl₃:CH₃OH, 2:1 и органическую фазу, включающую липидный материал, выделяют и анализируют посредством ГЖХ (газожидкостной хроматографии) и ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) согласно методике, подробно описанной ниже. На основании анализов ГЖХ и ВЭЖХ определяют количество свободных жирных кислот и одного или более сложных стероидных/станоловых эфиров. Контрольное пищевое масло, к которому не добавляют фермент, представленный в настоящем изобретении, анализируют аналогичным методом.

Расчет.

На основании результатов анализов ГЖХ и ВЭЖХ можно рассчитать повышение уровня свободных жирных кислот и сложных стероидных/станоловых эфиров:

$\Delta\%$ жирной кислоты = % жирной кислоты(фермент) - % жирной кислоты(контроль);

Mв жирной кислоты = среднемассовая молекулярная масса жирных кислот;

$A = \Delta\%$ стероидного эфира/Mв стероидного эфира (где $\Delta\%$ стероидного эфира = % стероидного/станолового эфира(фермент) - % стероидного/станолового эфира(контроль) и Mв стероидного эфира = среднемассовая молекулярная масса стероидных/станоловых эфиров);

Трансферазную активность рассчитывают как процент общей ферментативной активности

$$\% \text{ трансферазной активности} = \frac{A \times 100}{A + \Delta\% \text{ жирной кислоты} / (Mв \text{ жирной кислоты})}$$

Если в пищевом масле повышено содержание свободных жирных кислот, предпочтительно, чтобы оно не было повышено в существенной степени, т.е. до значительного уровня. Под этим имеют в виду, что повышение содержания свободной жирной кислоты не влияет неблагоприятным образом на качество пищевого масла.

Пищевое масло, используемое для анализа активности ацилтрансферазы, предпочтительно является соевым маслом, в которое добавлены растительный стерин (1%) и фосфатидилхолин (2%), используемым в способе, представленном в примере 3. Для анализа доза используемого фермента предпочтительно составляет 0,2 PLU-7/г масла, более предпочтительно 0,08 PLU-7/г масла. Уровень фосфолипида, присутствующего в масле, и/или % превращения стерина предпочтительно определяют через 4 ч, более предпочтительно через 20 ч.

В ряде аспектов настоящего изобретения термин "без существенного повышения содержания свободных жирных кислот", как используют в данном контексте, означает, что количество свободной жирной кислоты в пищевом масле, обработанном липидацилтрансферазой, представленной в настоящем изобретении, меньше, чем количество свободной жирной кислоты, образованной в пищевом масле, когда используют фермент, отличный от липидацилтрансферазы, представленной в настоящем изобретении,

как, например, по сравнению с количеством свободной жирной кислоты, образованной, когда используют принятый фермент фосфолипазу, например Lecitase Ultra™ (фирмы Novozymes A/S, Дания).

Дополнительно или вместо оценки % трансферазной активности в масле (см. выше) для идентификации ферментов липидацилтрансфераз, наиболее предпочтительных для использования в способах, представленных в изобретении, можно использовать следующий анализ, названный "Протокол идентификации липидацилтрансфераз, предназначенных для использования в настоящем изобретении".

Протокол идентификации липидацилтрансфераз.

Липидацилтрансфераза, соответствующая настоящему изобретению, представляет собой приводящую к следующему результату:

i) удаление фосфолипида, присутствующего в соевом масле с добавлением растительного стерина (1%), фосфатидилхолина (2%), при использовании способа, описанного в примере 3; и/или

ii) превращение (% превращения) добавленного стерина в сложный стериновый эфир при использовании способа, описанного в примере 3.

Можно использовать способ ГЖХ для определения уровня стерина и сложных стериновых эфиров, как описано в примере 5.

Для анализа доза используемого фермента может составлять 0,2 PLU-7/г масла, предпочтительно 0,08 PLU-7/г масла. Уровень фосфолипида, присутствующего в масле, и/или превращения (% превращения) стерина предпочтительно определяют через 4 ч, более предпочтительно через 20 ч.

В протоколе идентификации липидацилтрансфераз после обработки ферментом предпочтительно добавляют 5% воды и тщательно перемешивают с маслом. Затем масло разделяют на масляную и водную фазу при использовании центрифугирования (см. монографию "Enzyme-catalyzed degumming of vegetable oils". Buchold H. и Laurgi A.-G., Fett Wissenschaft Technologie (1993), 95(8), 300-4, ISSN: 0931-5985) и затем масляную фазу можно проанализировать на содержание фосфора, используя следующий протокол ("Анализ на содержание фосфора").

Анализ на содержание фосфора.

Уровень фосфолипида, имеющийся в масле после рафинирования гидратацией, определяют, получая сначала образец масла в соответствии с получением образца, описанного в АОАС официальном методе 999.10 (>свинца, кадмия, цинка, меди и железа в атомно-абсорбционной спектрофотометрии пищевых продуктов после микроволнового разложения, метод NMKL-АОАС первое действие 1999). Затем количество фосфолипидов в масле измеряют посредством анализа содержания фосфора в образце масла после рафинирования гидратацией согласно АОАС официальному методу 985.01 (>металлов и других элементов в растениях и кормах для домашних животных, способ спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой первое действие 1985, окончательное действие 1988).

Количество фосфора, присутствующее в масле после рафинирования гидратацией, составляет предпочтительно менее чем 50 промилей, предпочтительно менее чем 40 промилей, предпочтительно менее чем 30 промилей, предпочтительно менее чем 20 промилей, предпочтительно менее чем 10 промилей, предпочтительно менее чем 5 промилей. Масло после рафинирования гидратацией, как проиллюстрировано в примерах, может быть в существенной степени свободным от фосфолипида, т.е. содержать менее чем 1 промилей фосфолипида.

Процент превращения стерина, присутствующего в масле, составляет по меньшей мере 1%, предпочтительно по меньшей мере 5%, предпочтительно по меньшей мере 10%, предпочтительно по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, предпочтительно по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%.

В одном варианте осуществления % превращения стерина, присутствующего в масле, составляет по меньшей мере 5%, предпочтительно по меньшей мере 20%.

Рафинирование при низком содержании воды.

Неожиданно обнаружено, что при использовании липидацилтрансферазы в способе ферментативного рафинирования гидратацией пищевого масла ферментативное рафинирование гидратацией можно осуществить в среде с очень низким содержанием воды. Может потребоваться еще немного воды, например при добавлении фермента к маслу фермент может быть добавлен в небольшом количестве воды, таком как менее чем 1%, предпочтительно 0,5%, более предпочтительно менее чем 0,2%, более предпочтительно менее чем 0,1%.

Предпочтительно, когда содержание воды в пищевом масле в способах и вариантах применения, представленных в настоящем изобретении, составляет менее чем 1%, предпочтительно менее чем 0,5%, более предпочтительно менее чем 0,2%, более предпочтительно менее чем 0,1%.

Таким образом, одно из преимуществ настоящего изобретения состоит в том, что, когда при ферментативном рафинировании гидратацией используют только небольшое количество воды (т.е. <5%, предпочтительно <1%, предпочтительно <0,5%, предпочтительно <0,2%), клейкие вещества (т.е. фосфорсодержащая часть) выделяются из масла, например, в форме твердого осадка. Твердый осадок легко

можно удалить из рафинированного гидратацией масла такими способами, как, например, простая декантация масла или удаление клейких веществ фильтрацией.

Это прямо противоположно принятым способам ферментативного рафинирования гидратацией, в которых к маслу добавляют значительное количество воды. Это обусловлено тем, что в принятых способах ферментативного рафинирования гидратацией после рафинирования получают водный слой, который включает фосфорсодержащую часть (например, ту часть, которая включает лизофосфолипиды). Данный водный слой можно удалить, например, центрифугированием. Однако удаление водного слоя значительно сложнее, чем удаление твердого осадка, полученного при использовании способа, представленного в настоящем изобретении.

Вследствие этого способ ферментативного рафинирования гидратацией, представленный в настоящем изобретении, мог рассматриваться как "способ рафинирования гидратацией при низком содержании воды".

В одном варианте осуществления настоящего изобретения клейкое вещество можно удалить доведением содержания воды в масле до 5% с последующим центрифугированием масла, (см. статью "Enzyme-catalyzed degumming of vegetable oils", Buchold H. и Laurgi A.-G., Fett Wissenschaft Technologie (1993), 95(8), 300-4).

Вследствие этого изобретение представляет способ рафинирования гидратацией пищевого масла, такого как неочищенное пищевое масло (например, неочищенное соевое масло), без необходимости включения либо стадии предварительного промывания перед рафинированием гидратацией и/либо стадии удаления воды, добавленной в процессе рафинирования гидратацией, которое требуется при использовании принятых фосфолипаз, таких как фосфолипаза поджелудочной железы и Lecitase Ultra™.

Предпочтительно, когда пищевое масло имеет содержание воды менее чем 4,5%, более предпочтительно менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2%, менее чем 1%, менее чем 0,5%.

Соответственно, пищевое масло может включать по меньшей мере 0,1% воды, например по меньшей мере 0,3, 0,4 или 0,5%.

Предпочтительные липидацилтрансферазы, предназначенные для использования в настоящем изобретении, идентифицированы как обладающие высокой активностью, такой как высокая гидролитическая активность в отношении фосфолипидов или высокая активность фосфолипидтрансферазы в отношении фосфолипидов в масляной среде, наиболее предпочтительно, когда липидацилтрансферазы, предназначенные для использования в ферментативном рафинировании гидратацией, обладают высокой активностью фосфолипид-стерин-трансферазы.

Как подробно описано выше, другие ацилтрансферазы, подходящие для использования в способах, представленных в изобретении, можно определить путем идентификации присутствия блоков GDSX, GANDY и HPT либо посредством элайнмента с консенсусной последовательностью pfam00657 (SEQ ID NO: 1) и/или элайнмента с ацилтрансферазой GDSX, например SEQ ID NO: 28. Для того чтобы оценить их пригодность для рафинирования гидратацией, т.е. идентифицировать те ферменты, которые обладают трансферазной активностью по меньшей мере 5%, более предпочтительно по меньшей мере 10%, более предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно по меньшей мере 98% от общей активности фермента, данные ацилтрансферазы тестируют с использованием анализа "Протокол определения процента ацилтрансферазной активности", подробно описанного выше.

Настоящее изобретение относится к применению липидацилтрансферазы, представленной в настоящем изобретении, в рафинировании гидратацией пищевых растительных масел и/или пищевых масел и к способам рафинирования пищевых или растительных масел.

В одном аспекте настоящее изобретение может представлять способ, включающий применение липидацилтрансферазы для удаления доли негидратируемого фосфора (NHP) в масле, включающем относительно высокое количество NHP.

Термин "пищевое масло", как используют в данном контексте, может охватывать растительные масла.

Предпочтительно, когда пищевое масло перед обработкой в соответствии с настоящим изобретением включает долю негидратируемого фосфора 50-250 промилей, предпочтительно по меньшей мере 60 промилей, более предпочтительно по меньшей мере 100 промилей и еще более предпочтительно по меньшей мере 200 промилей, еще более предпочтительно выше 250 промилей.

Более предпочтительно, когда пищевое масло перед обработкой в соответствии с настоящим изобретением включает долю негидратируемого фосфора в интервале 60-500 промилей, более предпочтительно в интервале 100-500 промилей и еще более предпочтительно в интервале 200-500 промилей.

Пищевое масло, как называют в данном контексте, может представлять собой любое масло, содержащее относительно высокое количество негидратируемого фосфора, оно может включать рафинированное водой масло или более предпочтительно оно представляет собой неочищенное масло или полуочищенное масло.

В одном аспекте неочищенное пищевое масло имеет перед осуществлением способа, представленного в изобретении, содержание фосфора выше 350 промилей, более предпочтительно выше 400 промилей, еще более предпочтительно выше 500 промилей и наиболее предпочтительно выше 600 промилей.

Масла, охватываемые способом, представленным в настоящем изобретении, включают, но без ограничения перечисленным, одно или более из соевого масла, масла канолы, кукурузного масла, хлопкового масла, пальмового масла, кокосового масла, арахисового масла, оливкового масла, масла сафлора, косточкового пальмового масла, рапсового масла и подсолнечного масла.

Предпочтительно, когда масло представляет собой одно или более из соевого масла, подсолнечного масла и рапсового масла (иногда называемого маслом канолы).

Более предпочтительно, когда масло представляет собой одно или более из соевого масла, подсолнечного масла и рапсового масла.

Наиболее предпочтительно, когда масло представляет собой соевое масло.

Данные масла могут находиться в форме неочищенного масла, полуочищенного масла или масла, рафинированного водой.

Как используют в данном контексте, "неочищенное масло" (называемое в данном контексте также масло, нерафинированное гидратацией) может представлять собой масло, полученное отжимом, или экстрагированное масло либо их смесь, например из рапса, сои или подсолнечника. Содержание фосфатидов в неочищенном масле может варьировать от 0,5 до 3% мас./мас., соответствуя содержанию фосфора в интервале 200-1200 промилей, более предпочтительно в интервале 250-1200 промилей. Кроме фосфатидов, неочищенное масло содержит также маленькие концентрации углеводов, соединений сахаров и комплексы металл/фосфатидная кислота Ca, Mg и Fe.

Как используют в данном контексте, термин "полуочищенное масло" относится к любому маслу, которое не является неочищенным маслом, но содержание фосфатидов в котором составляет выше 250 промилей, более предпочтительно выше 500 промилей. Такое масло можно было бы получить, например, обработкой неочищенного масла способом, аналогичным нижеописанному способу "рафинирования водой".

Как используют в данном контексте, "масло, рафинированное водой", как правило, можно получить "способом рафинирования водой", заключающимся в смешивании 1-3% мас./мас. горячей воды с теплым (60-90°C) неочищенным маслом. Обычно периоды обработки составляют 30-60 мин. На стадии рафинирования водой удаляют фосфатиды и вязкие клейкие вещества, которые становятся нерастворимыми в масле при гидратации. Гидратированные фосфатиды и клейкие вещества можно отделить от масла посредством отстаивания, фильтрации или центрифугирования - центрифугирование является более распространенным способом. Основной целью в данном способе рафинирования водой является отделение гидратированных фосфатидов от масла. Вышеописанное вмешивание горячей воды в масло следует в данном контексте понимать в широком смысле как вмешивание водного раствора в масло в соответствии со стандартными способами рафинирования водой в области техники.

Преимущественно способ и варианты применения настоящего изобретения обеспечивают возможность рафинирования пищевых масел гидратацией в среде с низким содержанием воды (<5%, предпочтительно менее чем 2%, более предпочтительно менее чем 1%). Вследствие этого рафинирование гидратацией можно осуществить при добавлении меньшего количества воды, чем при использовании принятых ферментов. Следующим преимуществом настоящего изобретения является образование сложных стероидных эфиров (в частности, сложных эфиров токоферола) в масле. Еще одно преимущество настоящего изобретения состоит в удалении (предпочтительно полном удалении) фосфолипидов. Следующим преимуществом настоящего изобретения является удаление (предпочтительно полное удаление) фосфолипидов без удаления фитостерина и, в частности, токоферола. Предпочтительно, чтобы вследствие эстерификации фитостерина не происходило существенного удаления фитостероидов, таких как токоферол, из масла и вместо этого они бы просто эстерифицировались. Однако в одном варианте осуществления количество фитостерина, такого как токоферол, может быть уменьшено. В данных вариантах осуществления абсолютные уровни фитостерина, такого как токоферол, могут понизиться предпочтительно не более чем на 10%, альтернативно не более чем на 25%, альтернативно не более чем на 50%, альтернативно не более чем на 75%. Еще одно преимущество настоящего изобретения состоит в удалении (предпочтительно полном удалении) фосфолипидов без гидролиза триглицеридов. Для простоты ссылки данные и последующие аспекты настоящего изобретения теперь обсуждают под соответствующими названиями разделов. Однако описания в каждом из разделов не являются обязательно ограниченными каждым конкретным разделом.

Определение групп.

Группа аминокислот 1.

Группа аминокислот 1 представляет собой Gly8, Asp9, Ser10, Leu11, Ser12, Tyr15, Gly44, Asp45, Thr46, Glu69, Leu70, Gly71, Gly72, Asn73, Asp74, Gly75, Leu76, Gln106, Ile107, Arg108, Leu109, Pro110, Tyr113, Phe121, Phe139, Phe140, Met141, Tyr145, Met151, Asp154, His157, Gly155, Ile156, Pro158.

Выбор высококонсервативных мотивов, таких как GDSX и каталитические остатки, из группы 1 отменен (остатки подчеркнуты). Чтобы избежать неопределенности, группа 1 определяет остатки аминокислот в радиусе 10 Å от центрального атома углерода глицерина в активном центре модели 1IVN.

Группа аминокислот 2.

Группа аминокислот 2 (заметим, что нумерация аминокислот относится к аминокислотам в зрелой последовательности P10480):

Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289 и Val290.

Таблица выбранных остатков в группе 1 по сравнению с группой 2

Модель IVN			P10480
IVN	Гомолог <i>A.hyd</i>		Номер остатка зрелой последовательности
	PFAM	Структура	
Gly8	Gly32		
Asp9	Asp33		
Ser10	Ser34		
Leu11	Leu35		Leu17
Ser12	Ser36		Ser18
			Lys22
			Met23
Tyr15	Gly58		Gly40
Gly44	Asn98		Asn80
Asp45	Pro99		Pro81
Thr46	Lys100		Lys82
			Asn87
			Asn88
Glu69	Trp129		Trp111
Leu70	Val130		Val112
Gly71	Gly131		
Gly72	Ala132		Ala114
Asn73	Asn133		
Asp74	Asp134		
Gly75	Tyr135		Tyr117
Leu76	Leu136		Leu118
Gln106		Pro174	Pro156
Ile107		Gly177	Gly159
Arg108		Gln178	Gln160
Leu109		Asn179	Asn161
Pro110		180 до 190	Pro162
Tyr113			Ser163
			Ala164
			Arg165
			Ser166
			Gln167
			Lys168
			Val169
			Val170
			Glu171
			Ala172
Phe121	His198	Tyr197	Tyr179
		His198	His180
		Asn199	Asn181
Phe139	Met227		Met209
Phe140	Leu228		Leu210
Met141	Arg229		Arg211
Tyr145	Asn233		Asn215
			Lys284
Met151	Met303		Met285
Asp154	Asp306		
Gly155	Gln307		Gln289
Ile156	Val308		Val290
His157	His309		
Pro158	Pro310		

Группа аминокислот 3.

Группа аминокислот 3 идентична группе 2, но относится к кодирующей последовательности *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID NO: 28), т.е. номера остатков аминокислот в группе 3 на 18 больше, поскольку это отражает разницу между нумерацией аминокислот в зрелом белке (SEQ ID NO: 2) по сравнению с белком, включающим сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 28).

Зрелые белки GDSX *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID NO: 28) и GDSX *Aeromonas hydrophila* (SEQ ID NO: 26) различаются по пяти аминокислотам. Они представляют собой Thr3Ser, Gln182Lys, Glu309Ala, Ser310Asn, Gly318-, когда остаток *salmonicida* приведен в перечислении первым и остаток *hydrophila* приведен последним (см. фиг. 59). Белок *hydrophila* имеет длину всего 317 аминокислот и у него отсутствует остаток в положении 318. GDSX *Aeromonas salmonicidae* обладает значительно более высокой активностью в отношении полярных липидов, таких как галактолипидные субстраты, чем белок *Aeromonas hydrophila*. Проводят сканирование центра по всем пяти положениям аминокислот.

Группа аминокислот 4.

Группа аминокислот 4 представляет собой S3, Q182, E309, S310 и -318.

Группа аминокислот 5.

Группа аминокислот 5 представляет собой F13S, D15N, S18G, S18V, Y30F, D116N, D116E, D157N, Y226F, D228N, Y230F.

Группа аминокислот 6.

Группа аминокислот 6 представляет собой Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318.

Нумерация аминокислот в группе 6 относится к остаткам аминокислот в P10480 (SEQ ID NO: 2) - соответствующие аминокислоты в других скелетах последовательностей можно определить с помощью элайнмента гомологии и/или структурного элайнмента с P10480 и/или 11VN.

Группа аминокислот 7.

Группа аминокислот 7 представляет собой Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318, Y30X (где X выбрано из A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W), Y226X (где X выбрано из A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W), Y230X (где X выбрано из A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W), S18X (где X выбрано из A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W или Y), D157X (где X выбрано из A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y).

Нумерация аминокислот в группе 7 относится к остаткам аминокислот в P10480 (SEQ ID NO: 2) - соответствующие аминокислоты в других скелетах последовательностей можно определить с помощью элайнмента гомологии и/или структурного элайнмента с P10480 и/или 11VN.

Выделенный.

В одном аспекте предпочтительно, когда полипептид или белок, предназначенный для использования в настоящем изобретении, находится в выделенной форме.

Термин "выделенный" означает, что последовательность, по меньшей мере, в существенной степени свободна по меньшей мере от одного из других компонентов, с которыми последовательность по природе связана в естественных условиях или как она обнаружена в естественных условиях.

Очищенный.

В одном аспекте предпочтительно, когда полипептид или белок, предназначенный для использования в настоящем изобретении, находится в очищенной форме.

Термин "очищенный" означает, что последовательность находится в относительно очищенном состоянии - например по меньшей мере приблизительно 51% чистоты, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 90% чистоты, или по меньшей мере приблизительно 95% чистоты, или по меньшей мере приблизительно 98% чистоты.

Клонирование нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, представленный в настоящем изобретении.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая либо полипептид, который имеет специфические свойства, как определено в данном контексте, либо полипептид, который пригоден для модификации, может быть выделена из любой клетки или организма, продуцирующего данный полипептид. В области техники хорошо известны различные методы выделения нуклеотидных последовательностей.

Например, геномную ДНК и/или библиотеку кДНК можно сконструировать, используя хромосомную ДНК или информационную РНК из организма, продуцирующего полипептид. Если последовательность аминокислот полипептида известна, можно синтезировать меченые олигонуклеотидные зонды и использовать для идентификации клонов, кодирующих полипептид из геномной библиотеки, полученной из организма. Альтернативно, для идентификации клонов, кодирующих полипептид, можно было бы

использовать меченый олигонуклеотидный зонд, включающий последовательности, гомологичные другому известному гену полипептида. В последнем случае используют условия гибридизации и промывания более низкой жесткости.

Альтернативно, клоны, кодирующие полипептид, можно было бы идентифицировать путем инсерции фрагментов геномной ДНК в экспрессирующий вектор, такой как плазида, трансформации фермент-отрицательной бактерии полученной библиотекой геномной ДНК и затем помещения трансформированной бактерии на агаризованную среду, содержащую фермент, ингибируемый полипептидом, чтобы получить возможность идентифицировать клоны, экспрессирующие полипептид.

В еще одном альтернативном варианте нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, можно получить синтетически с помощью разработанных стандартных методов, например фосфоамиditного метода, описанного в статье *Beucage S.L. et al. (1981), Tetrahedron Letters, 22, p. 1859-1869*, или метода, описанного в статье *Matthes et al. (1984), EMBO J. 3, p. 801-805*. В фосфоамиditном методе олигонуклеотиды синтезируют, например, в автоматическом синтезаторе ДНК, очищают, отжигают, лигируют и клонируют в подходящие векторы.

Нуклеотидная последовательность может быть смешанной геномной и синтетической природы или смешанной геномной и кДНК природы, полученной лигированием фрагментов синтетической, геномной или ДНК природы (как требуется) в соответствии со стандартными методиками. Каждый лигированный фрагмент соответствует различным частям полной нуклеотидной последовательности. Последовательность ДНК можно получить также с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) при использовании специфических праймеров, например, как описано в *US 4683202* или в статье *Saiki R.K. et al. (Science (1988), 239, p. 487-491)*.

Нуклеотидные последовательности.

Настоящее изобретение охватывает также нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, имеющие специфические свойства, как определено в данном контексте.

Термин "нуклеотидная последовательность", как используют в данном контексте, относится к олигонуклеотидной последовательности или полинуклеотидной последовательности и ее вариантам, гомологам, фрагментам и производным (таким как ее части). Нуклеотидная последовательность может быть геномной или синтетической либо рекомбинантной природы, которая может быть двунитовой или однонитевой, представляя либо смысловую, либо антисмысловую нить.

Термин "нуклеотидная последовательность" в контексте настоящего изобретения включает геномную ДНК, кДНК, синтетическую ДНК и РНК. Он предпочтительно означает ДНК, более предпочтительно кДНК кодирующей последовательности.

В предпочтительном варианте осуществления сама по себе нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий специфическими свойствами, не покрывает нативную нуклеотидную последовательность в ее естественной среде, когда она связана с естественно ассоциированной с ней последовательностью(ями), которая(ые) также находится в своей естественной среде. Для простоты ссылки данный предпочтительный вариант осуществления называют "ненативной нуклеотидной последовательностью". В связи с этим термин "нативная нуклеотидная последовательность" означает полную нуклеотидную последовательность, которая находится в своей естественной среде, и если она функционально связана с полным промотором, с которым она ассоциирована естественным образом, то данный промотор также находится в своей естественной среде. Таким образом, полипептид, представленный в настоящем изобретении, может экспрессироваться нуклеотидной последовательностью в своем нативном организме, но когда нуклеотидная последовательность не находится под контролем промотора, с которым она естественным образом ассоциирована в данном организме.

Предпочтительно, когда полипептид не является нативным полипептидом. В этом плане термин "нативный полипептид" означает полный полипептид, который находится в своей нативной среде и когда он экспрессирован своей нативной нуклеотидной последовательностью.

Как правило, нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, обладающие специфическими свойствами, как определено в данном контексте, получают, используя технологии рекомбинантной ДНК (т.е. рекомбинантную ДНК). Однако в альтернативном варианте осуществления изобретения нуклеотидную последовательность можно было бы синтезировать полностью или частично, используя химические методы, хорошо известные в области техники (см. статьи *Caruthers M.H. et al. (1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 215-23* и *Horn T. et al. (1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 225-232*).

Молекулярная эволюция.

После выделения кодирующей фермент нуклеотидной последовательности или идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей данный фермент, может потребоваться модифицировать выбранную нуклеотидную последовательность, например может потребоваться подвергнуть последовательность мутации с целью получения фермента, соответствующего настоящему изобретению.

Мутации можно индродуцировать, используя синтетические олигонуклеотиды. Данные олигонуклеотиды включают нуклеотидные последовательности, фланкирующие требующиеся мутационные сайты.

Подходящий метод описан в статье Morigana et al. (Biotechnology (1984), 2, p. 646-649). Другой метод интродукции мутаций в кодирующие фермент нуклеотидные последовательности описан в статье Nelson и Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p. 147-151).

Вместо сайт-направленного мутагенеза, как описано выше, можно интродуцировать мутации неспецифическим образом, например используя коммерческий набор, такой как набор для ПЦР-мутагенеза GeneMorph фирмы Stratagene или набор для множественного неспецифического ПЦР-мутагенеза фирмы Clontech. Заявка EP 0583265 относится к методам оптимизации мутагенеза на основе ПЦР, которые можно также сочетать с использованием мутагенных аналогов ДНК, таких как описаны в заявке EP 0866796. Способствующие ошибкам ПЦР-технологии подходят для получения вариантов липидацилтрансфераз с предпочтительными характеристиками. Заявка WO 0206457 относится к молекулярной эволюции липазы.

Третий способ получения новых последовательностей представляет собой фрагментацию неидентичных нуклеотидных последовательностей либо при использовании любого числа рестрикционных ферментов, либо такого фермента, как ДНКаза I, и повторную сборку полных нуклеотидных последовательностей, кодирующих функциональные белки. Альтернативно можно использовать одну или множество неидентичных нуклеотидных последовательностей и интродуцировать мутации во время повторной сборки полной нуклеотидной последовательности. Технологии тасования ДНК и тасования семейств подходят для получения вариантов липидацилтрансфераз с предпочтительными характеристиками. Подходящие способы осуществления "тасования" можно найти в заявках EP 0752008, EP 1138763, EP 1103606. Тасование можно также сочетать с другими формами ДНК-мутагенеза, как описано с заявками US 6180406 и WO 01/34835.

Таким образом, имеется возможность получить множество сайт-направленных или неспецифических мутаций в нуклеотидной последовательности как *in vivo*, так и *in vitro* и затем провести скрининг на повышенную функциональность кодируемого полипептида различными способами. Используя *in silico* и экзоопосредованные методы (см. заявки WO 00/58517, US 6344328, US 6361974), например, можно осуществить молекулярную эволюцию, при которой полученный вариант сохраняет очень низкую гомологию с известными ферментами или белками. Данные варианты, полученные таким путем, могут обладать существенной структурной аналогией с известными ферментами трансферазами, но иметь очень низкую гомологию последовательности аминокислот.

В качестве неограничивающего примера, кроме того, мутации или природные варианты полинуклеотидной последовательности могут быть подвергнуты рекомбинации либо с диким типом, либо с другими мутациями с целью получения новых вариантов. Данные новые варианты также можно подвергнуть скринингу на повышенную функциональность кодируемого полипептида.

Применение вышеупомянутых и аналогичных методов молекулярной эволюции дает возможность идентификации и селекции вариантов ферментов, представленных в настоящем изобретении, которые обладают предпочтительными характеристиками, без предварительного знания структуры или функции белка и обеспечивает продукцию непредсказанных, но полезных мутаций и вариантов. Имеется множество примеров применения молекулярной эволюции в области оптимизации или изменения активности фермента, данные примеры включают, но не ограничены одним или более из следующих: оптимизированная экспрессия и/или активность в клетке-хозяине или *in vitro*; повышенная ферментативная активность; измененная специфичность в отношении субстрата и/или продукта; повышенная или пониженная ферментативная или структурная стабильность; измененная ферментативная активность/специфичность в предпочтительных условиях окружающей среды, например температуры, pH и/или субстрата.

Как будет очевидно компетентному специалисту в данной области, при использовании инструментов молекулярной эволюции можно изменить фермент с целью повышения функциональности фермента.

Соответственно, липидацилтрансфераза, используемая в изобретении, может представлять собой вариант, т.е. может включать по меньшей мере одну замену, делецию или добавление аминокислоты по сравнению с исходным ферментом. Варианты фермента сохраняют по меньшей мере 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 99% гомологию с исходным ферментом. Подходящие исходные ферменты могут включать любой фермент с активностью эстеразы или липазы. Предпочтительно, когда исходный фермент выравнивают с консенсусной последовательностью pfam00657.

В предпочтительном варианте осуществления вариант фермента липидацилтрансферазы сохраняет или включает по меньшей мере один или более остатков аминокислот консенсусной последовательности pfam00657, обнаруженных в блоках GDSX, GANDY и HPT.

Ферменты, такие как липазы, с отсутствующей или с низкой активностью липидацилтрансферазы в водной среде можно подвергнуть мутированию, используя инструменты молекулярной эволюции для интродукции или усиления трансферазной активности, получая при этом фермент липидацилтрансферазу с существенной трансферазной активностью, подходящий для использования в композициях и способах, представленных в настоящем изобретении.

Соответственно липидацилтрансфераза, предназначенная для использования в изобретении, может представлять собой вариант с повышенной ферментативной активностью в отношении фосфолипидов по сравнению с исходным ферментом. Предпочтительно, когда данные варианты также имеют низкую или не имеют активности в отношении лизополярных липидов. Повышенная активность в отношении фос-

фолипидов может также являться результатом гидролиза и/или трансферазной активности или комбинации обоих факторов.

Вариант липидацилтрансферазы, предназначенный для использования в изобретении, может иметь пониженную активность в отношении триглицеридов, и/или моноглицеридов, и/или диглицеридов по сравнению с исходным ферментом.

Соответственно вариант фермента может не обладать активностью в отношении триглицеридов, и/или моноглицеридов, и/или диглицеридов.

Альтернативно, вариант фермента, предназначенный для использования в изобретении, может иметь повышенную активность в отношении триглицеридов и/или может также иметь повышенную активность в отношении одного или более из следующих соединений: полярных липидов, фосфолипидов, лецитина, фосфатидилхолина.

Известны варианты липидацилтрансферазы, и один или более данных вариантов могут подходить для использования в способах и вариантах применения, соответствующих настоящему изобретению, и/или в композициях ферментов, соответствующих настоящему изобретению. Только в качестве примера варианты липидацилтрансфераз, описанные в следующих ссылках, могут быть использованы согласно настоящему изобретению: см. статьи Hilton & Buckley J. Biol. Chem. 15 January, 1991; 266(2): 997-1000; Robertson et al. J. Biol. Chem. 21 January, 1994; 269(3): 2146-50; Brumlik et al. J. Bacteriol, April 1996; 178(7): 2060-4; Peelman et al. Protein Sci. March 1998; 7(3): 587-99.

Последовательности аминокислот.

Настоящее изобретение охватывает также последовательности аминокислот полипептидов, обладающих специфическими свойствами, как определено в данном контексте.

Как используют в данном контексте, термин "последовательность аминокислот" является синонимом термина "полипептид" и/или термина "белок". В ряде случаев термин "последовательность аминокислот" является синонимом термина "пептид".

Последовательность аминокислот можно получить/выделить из подходящего источника, или она может быть создана синтетическим путем, или может быть получена с использованием технологий рекомбинантной ДНК.

Соответственно последовательности аминокислот можно получить из выделенных полипептидов, описанных в данном контексте, с помощью стандартных методик.

Одним из подходящих методов определения последовательностей аминокислот из выделенных полипептидов является следующий.

Очищенный полипептид может быть лиофилизирован и 100 мкг лиофилизированного материала растворяют в 50 мкл смеси 8 М мочевины и 0,4 М гидрокарбоната аммония, pH 8,4. Растворенный белок можно денатурировать и восстановить в течение 15 мин при 50°C после покрытия слоем азота и добавления 5 мкл 45 мМ динитротрейтола. После охлаждения до комнатной температуры можно добавить 5 мкл 100 мМ йодацетамида для того, что дериватизировать цистеиновые остатки в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте под азотом.

К вышеуказанной реакционной смеси можно добавить 135 мкл воды и 5 мкг эндопротеиназы Lys-C в 5 мкл воды и можно осуществить разложение при 37°C под азотом в течение 24 ч.

Полученные в результате пептиды можно разделить обращено-фазовой ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографией) на колонке VYDAC C18 (0,46×15 см; 10 мкм; The Separation Group, California, USA) при использовании растворителя А: 0,1% ТФУК (трифторуксусная кислота) в воде и растворителя В: 0,1% ТФУК в ацетонитриле. Отобранные пептиды можно повторно хроматографировать на колонке Develosil C18, используя ту же систему растворителей, перед N-концевым секвенированием. Секвенирование можно осуществить с помощью секвенатора Applied Biosystems 476A при использовании быстрых циклов с импульсным введением жидкости согласно инструкциям изготовителя (фирма Applied Biosystems, California, USA).

Идентичность последовательности или гомология последовательности.

Настоящее изобретение охватывает также использование последовательностей, имеющих степень гомологии последовательности с последовательностью(ями) аминокислот полипептида, обладающего специфическими свойствами, определенными в данном контексте, или любой нуклеотидной последовательностью, кодирующей данный полипептид (далее обозначают как "гомологичная последовательность(и)"). В данном случае термин "гомолог" означает элемент, имеющий некоторую гомологию с данными последовательностями аминокислот и данными нуклеотидными последовательностями. В данном случае термин "гомология" может быть приравнен к термину "идентичность".

Гомологичная последовательность аминокислот и/или нуклеотидная последовательность должна давать и/или кодировать полипептид, который сохраняет функциональную активность и/или повышает активность фермента.

В настоящем контексте предусматривают, что гомологичная последовательность включает последовательность аминокислот, которая может быть по меньшей мере на 75, 85 или 90% идентичной, предпочтительно по меньшей мере на 95 или 98% идентичной заданной последовательности. Как правило, гомологи будут включать такие же активные центры и т.п., как заданная последовательность аминокис-

лот. Хотя гомологию можно также рассматривать в терминах близости (т.е. остатков аминокислот, имеющих близкие химические свойства/функции), в контексте настоящего изобретения предпочтительно, когда гомологию выражают в терминах идентичности последовательности.

В настоящем контексте предусматривают, что гомологичная последовательность включает нуклеотидную последовательность, которая может быть по меньшей мере на 75, 85 или 90% идентичной, предпочтительно по меньшей мере на 95 или 98% идентичной нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, представленный в изобретении (заданная последовательность). Как правило, гомологи будут включать одинаковые последовательности, которые кодируют такие же активные центры и т.п., как заданная последовательность. Хотя гомологию можно также рассматривать в терминах близости (т.е. остатков аминокислот, имеющих близкие химические свойства/функции), в контексте настоящего изобретения предпочтительно, когда гомологию выражают в терминах идентичности последовательности.

Сравнения гомологии можно проводить визуально или, более обыкновенно, с помощью легкодоступных программ сравнения последовательностей. Данные коммерчески доступные компьютерные программы могут рассчитать % гомологии между двумя или более последовательностями.

Процент гомологии можно рассчитать относительно соседних последовательностей, т.е. одну последовательность выравнивают с другой последовательностью и каждую аминокислоту в одной последовательности непосредственно сравнивают с соответствующей аминокислотой в другой последовательности, по одному остатку за один раз. Это называют сравнительный анализ "без гэпов". Как правило, данные сравнительные анализы без гэпов проводят только при относительно маленьком числе остатков.

Хотя это очень простой и совместимый метод, в нем не принимают во внимание, что, например, в идентичной в других отношениях паре последовательностей одна инсерция или делеция будет вызывать выпадение следующих остатков аминокислот из элайнмента, таким образом потенциально приводя в результате к большому снижению % гомологии при проведении общего элайнмента. Впоследствии разрабатывают большинство методов сравнения последовательностей, чтобы получить оптимальные элайнменты, в которых принимают во внимание возможные инсерции и делеции без неправильного определения штрафа для всего результата гомологии. Это достигается введением "гэпов" в сравниваемые последовательности для того, чтобы попытаться довести до максимума локальную гомологию.

Однако в данных более сложных методах устанавливают "штрафы за гэпы" за каждый гэп, который появляется при сравнительном анализе, так что за одинаковое число идентичных аминокислот при сравнительном анализе последовательности с насколько это возможно маленьким числом гэпов (отражающим более высокое родство между двумя сравниваемыми последовательностями) будут получать более высокое значение, чем результат элайнмента с множеством гэпов. Как правило, используют выражение "аффинные цены гэпов", которое отражает относительно высокую цену наличия гэпа и меньший штраф за каждый последующий остаток в гэпе. Это представляет собой наиболее широко используемую систему подсчета гэпов. Высокие штрафы за гэпы, конечно, будут давать оптимизированные элайнменты с меньшим числом гэпов. Большинство программ элайнмента допускают модификацию штрафов за гэпы. Однако предпочтительно, когда используют значения, заданные по умолчанию, при использовании данных программ для сравнений последовательностей. Например, при использовании пакета GCG Wisconsin Bestfit штраф за гэп по умолчанию для последовательностей аминокислот составляет -12 за гэп и -4 за каждое удлинение.

Вследствие этого для вычисления максимального % гомологии необходимо получение оптимального элайнмента, учитывающего штрафы за гэпы. Подходящей компьютерной программой для осуществления данного элайнмента является пакет программ GCG Wisconsin Bestfit (см. статью Devereux et al. 1984, Nuc. Acids Research, 12, p. 387). Примеры других программ, которые могут проводить сравнения последовательностей, включают, но без ограничения перечисленным, пакет программ BLAST (см. монографию Ausubel et al. 1999, Short Protocols in Molecular Biology, 4-е изд., глава 18), FASTA (см. статью Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol. 403-410) и набор инструментов для сравнения GENWORKS. Обе программы, BLAST и FASTA, доступны для поиска в автономном и неавтономном режимах (см. Ausubel et al. 1999, p. 7-58 - 7-60). Однако для некоторых вариантов применения предпочтительно использование программы GCG. Новый инструмент, названный BLAST 2 Sequences, также доступен для сравнения белковой и нуклеотидной последовательности (см. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 174(2): 247-50; FEMS Microbiol. Lett. 1999, 177(1): 187-8 и tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Хотя конечный % гомологии можно измерить в терминах идентичности, сам процесс элайнмента, как правило, не основан на сравнении пар по принципу "все или ничего". Вместо этого в основном используют масштабную матрицу для подсчета подобия, которая устанавливает результаты для каждого попарного сравнения на основе химической близости или эволюционного расстояния. Примером такой обычно используемой матрицы является матрица BLOSUM62 - матрица, заданная по умолчанию для пакета программ BLAST. В программах GCG Wisconsin, как правило, используют либо общедоступные значения, заданные по умолчанию, либо заказную таблицу сравнения символов, если она прилагается (дальнейшие подробности см. в руководстве для пользователя). Для ряда приложений предпочтительно использовать для пакета GCG общедоступные значения, заданные по умолчанию, или в случае другой программы - заданную по умолчанию матрицу, такую как BLOSUM62.

Альтернативно, процент гомологии можно рассчитать, используя функцию множественного элайнмента в программе DNASIS™ (Hitachi Software), основанной на алгоритме, аналогичном CLUSTAL (см. статью Higgins D.G. & Sharp P.M. (1988), *Gene* 73(1), 237-244).

После того как программа даст оптимальный сравнительный анализ, возможно рассчитать % гомологии, предпочтительно % идентичности последовательностей. Программа, как правило, делает это как часть сравнения последовательностей и генерирует числовой результат.

В предпочтительном аспекте настоящего изобретения используют следующую программу и установки для расчета процента гомологии/идентичности. Для последовательностей аминокислот процент идентичностей (гомологии) или "положительные результаты" вычисляют с помощью AlignX VectorNTI (Vector NTI Advance 9.1 фирмы Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA), причем для каждой возможной пары последовательностей аминокислот установки представляют собой параметры, заданные по умолчанию (штраф за открытие гэпа составляет 10, штраф за удлинение гэпа - 0,1).

Последовательности могут также иметь делеции, инсерции или замены остатков аминокислот, которые образуют молчащее изменение и в результате приводят к образованию функционально эквивалентной субстанции. Преднамеренные замены аминокислот можно сделать на основе близости полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы остатков, пока сохраняется вторичная связывающая активность субстанции. Например, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; положительно заряженные аминокислоты включают лизин и аргинин и аминокислоты с незаряженными полярными головными группами, имеющие близкие значения гидрофильности, включают лейцин, изолейцин, валин, глицин, аланин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, фенилаланин и тирозин.

Консервативные замены можно сделать, например, согласно нижеприведенной таблице. Аминокислоты из одного блока во второй колонке и предпочтительно из одной строки в третьей колонке можно заменять одна другой.

Алифатические	Неполярные	G A P
		I L V
	Полярные – незаряженные	C S T M
		N Q
	Полярные – заряженные	D E
		K R
Ароматические		H F W Y

Настоящее изобретение также охватывает гомологичную замену (оба термина, замена и замещение, используют в данном контексте для обозначения взаимообмена имеющихся остатков аминокислот с альтернативным остатком), которая может существовать, т.е. замена подобного на подобное, например основной на основную, кислой на кислую, полярной на полярную и т.п. Может также происходить негомологичная замена, т.е. остатка из одного класса на другой или, альтернативно, предусматривающая включение неприродных аминокислот, таких как орнитин (далее обозначают как Z), диаминомасляная кислота (далее обозначают как B), норлейцин (далее обозначают как O), пиридилаланин, тиенилаланин, нафтилаланин и фенилглицин.

Могут быть также проведены замещения неприродными аминокислотами.

Варианты последовательностей аминокислот могут включать подходящие спейсерные группы, которые могут быть введены между двумя остатками аминокислот последовательности, в том числе алкильные группы, такие как метильная, этильная или пропиловая группы, в дополнение к аминокислотным спейсерам, таким как остатки глицина или β-аланина. Следующая форма вариации, которая включает присутствие остатков аминокислот в пептоидной форме, будет хорошо понятна компетентным специалистам в данной области. Чтобы избежать неопределенности, термин "пептоидная форма" используют для ссылки на остатки вариантов аминокислот, в которых α-углеродная замещающая группа находится на атоме азота остатка, а не на α-углероде. Методы получения пептидов в пептоидной форме известны в области техники, например, см. статьи Simon R.J. et al., *PNAS* (1992), 89(20), 9367-9371 и Horwell D.C., *Trends Biotechnol.* (1995), 13(4), 132-134.

Нуклеотидные последовательности, предназначенные для применения в настоящем изобретении или кодирующие полипептид, обладающий специфическими свойствами, описанными в данном контексте, могут включать в своей структуре синтетические или модифицированные нуклеотиды. В области техники известен ряд различных типов модификации олигонуклеотидов. Они включают метилфосфонатные и фосфоротиоатные скелеты и/или введение акридиновых или полилизиновых цепей в 3'- и/или 5'-концы молекулы. Для целей настоящего изобретения следует иметь в виду, что нуклеотидные последовательности, описанные в данном контексте, можно модифицировать любым из методов, имеющихся в области техники. Данные модификации могут быть проведены с целью повышения активности *in vivo* или продолжительности существования нуклеотидных последовательностей.

Настоящее изобретение также охватывает использование нуклеотидных последовательностей, которые комплементарны последовательностям, представленным в данном контексте, или любое производное, фрагмент или его производное. Если последовательность комплементарна ее фрагменту, то данную последовательность можно использовать в качестве зонда для идентификации близких кодирующих последовательностей в других организмах и т.п.

Полинуклеотиды, которые не являются на 100% гомологичными последовательностям, присутствующим в настоящем изобретении, но входят в объем изобретения, можно получить рядом способов. Другие варианты последовательностей, описанные в данном контексте, можно получить, например, зондированием библиотек ДНК, полученных у ряда субъектов, например субъектов из различных популяций. Кроме того, можно получить другие вирусные/бактериальные или клеточные гомологи, особенно клеточные гомологи, обнаруженные в клетках млекопитающих (например, в клетках крысы, мыши, крупного рогатого скота и приматов), и данные гомологи и их фрагменты, как правило, будут способны к селективной гибридизации с последовательностями, показанными в перечне последовательностей, приведенном в данном материале. Данные последовательности можно получить зондированием библиотек кДНК, полученных из/или библиотек геномных ДНК других видов животных, и зондированием данных библиотек зондами, включающими полностью или часть любой из последовательностей в прилагаемых перечнях последовательностей в условиях сред высокой жесткости. Аналогичные рассуждения используются для получения видовых гомологов и аллельных вариантов полипептидных или нуклеотидных последовательностей, представленных в изобретении.

Варианты и штаммовые/видовые гомологи можно также получить, используя ПЦР с вырожденными праймерами, в которой будут использованы праймеры, созданные для получения направленности на последовательности в вариантах и гомологах, кодирующие консервативные последовательности аминокислот в последовательностях, представленных в настоящем изобретении. Консервативные последовательности можно предсказать, например, посредством элайнмента последовательностей аминокислот из нескольких вариантов/гомологов. Элайнменты последовательности можно провести, используя компьютерные программы, известные в области техники. Например, широко используют программу GCG Wisconsin PileUp.

Праймеры, используемые в вырожденной ПЦР, будут включать одно или более вырожденных положений и будут использованы в условиях жесткости ниже тех, которые используют для клонирования последовательностей с праймерами одной и той же последовательности относительно известных последовательностей.

Альтернативно, данные полинуклеотиды можно получить сайт-направленным мутагенезом охарактеризованных последовательностей. Это может быть использовано, когда, например, требуются изменения последовательности молчащего кодона с целью оптимизации предпочтительности кодонов для определенной клетки-хозяина, в которой экспрессируются полинуклеотидные последовательности. Другие изменения последовательности могут потребоваться для интродукции сайтов распознавания рестрикционного полипептида или для изменения свойства или функции полипептидов, кодируемых полинуклеотидами.

Полинуклеотиды (нуклеотидные последовательности), представленные в изобретении, можно использовать для получения праймера, например ПЦР-праймера, праймера для альтернативной реакции амплификации, зонда, например, меченого уходящей меткой, принятыми средствами с использованием радиоактивных или нерадиоактивных меток либо полинуклеотиды можно клонировать в векторы. Данные праймеры, зонды и другие фрагменты будут иметь длину по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 20, например по меньшей мере 25, 30 или 40 нуклеотидов, и они также охватываются термином полинуклеотиды, представленные в изобретении, как используют в данном контексте.

Полинуклеотиды, такие как ДНК-полинуклеотиды и зонды, представленные в изобретении, можно получить рекомбинантно, синтетическим или любыми средствами, доступными компетентным специалистам в данной области. Их можно также клонировать стандартными методами.

Как правило, праймеры будут получать синтетическими средствами, включая постадийное получение требующейся последовательности нуклеиновой кислоты по одному нуклеотиду за один раз. Методики осуществления этой цели с использованием автоматизированных технологий легко доступны в области техники.

Более длинные полинуклеотиды, как правило, будут получать с использованием рекомбинантных средств, например при использовании методик клонирования с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции). Данные методики будут включать получение пары праймеров (например, приблизительно из 15-30 нуклеотидов), фланкирующих направленную на липид последовательность, которую требуется клонировать, осуществление контакта праймеров с мРНК или кДНК, полученных из клетки животного или человека, проведение полимеразной цепной реакции в условиях, которые приводят к амплификации требующегося участка, выделение амплифицированного фрагмента (например, путем очистки реакционной смеси на агарозном геле) и выделение амплифицированной ДНК. Можно сконструировать праймеры, включающие подходящие сайты распознавания рестриктазами, чтобы амплифицированную ДНК можно было клонировать в подходящий клонирующий вектор.

Гибридизация.

Настоящее изобретение охватывает также последовательности, которые комплементарны последовательностям, представленным в настоящем изобретении, или последовательности, которые способны гибридизоваться либо с последовательностями, представленными в настоящем изобретении, либо с последовательностями, которые им комплементарны.

Термин "гибридизация", как используют в данном контексте, будет включать "способ, посредством которого нить нуклеиновой кислоты связывается с комплементарной нитью посредством спаривания оснований", а также способ амплификации, осуществляемый в технологиях полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Настоящее изобретение охватывает также применение нуклеотидных последовательностей, которые способны гибридизоваться с последовательностями, которые комплементарны заданным последовательностям, обсуждаемым в данном контексте, или любому производному, фрагменту или его производному.

Настоящее изобретение охватывает также последовательности, которые комплементарны последовательностям, которые способны гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном контексте.

Условия гибридизации основаны на температуре плавления (T_p) нуклеотид-связывающего комплекса, как описано в монографии Berger и Kimmel (1987), *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, vol. 152, Academic Press, San Diego CA), и обеспечивают определенную "жесткость", как объясняют ниже.

Максимальная жесткость, как правило, имеет место приблизительно при T_p 5°C (5°C ниже T_p зонда); высокая жесткость приблизительно при 5-10°C ниже T_p ; средняя жесткость приблизительно при 10-20°C ниже T_p и низкая жесткость приблизительно при 20-25°C ниже T_p . Как будут иметь в виду компетентные специалисты в области техники, гибридизацию максимальной жесткости можно использовать для идентификации или детекции нуклеотидных последовательностей, тогда как гибридизацию средней (или низкой) жесткости можно использовать для идентификации или детекции близких или родственных полинуклеотидных последовательностей.

Предпочтительно, когда настоящее изобретение охватывает последовательности, которые комплементарны последовательностям, которые способны гибридизоваться в условиях высокой жесткости или условиях средней жесткости с нуклеотидными последовательностями, кодирующими полипептиды, обладающие специфическими свойствами, как определено в данном контексте.

Более предпочтительно, когда настоящее изобретение охватывает последовательности, которые комплементарны последовательностям, которые способны гибридизоваться в условиях высокой жесткости (например, 65°C и $0,1 \times SSC$ { $1 \times SSC = 0,15$ M NaCl, 0,015 M цитрат Na, pH 7,0}) с нуклеотидными последовательностями, кодирующими полипептиды, обладающие специфическими свойствами, как определено в данном контексте.

Настоящее изобретение относится также к нуклеотидным последовательностям, которые могут гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном контексте (включая последовательности, комплементарные обсуждаемым в данном контексте).

Настоящее изобретение относится также к нуклеотидным последовательностям, которые комплементарны последовательностям, которые могут гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном контексте (включая последовательности, комплементарные обсуждаемым в данном контексте).

В объем настоящего изобретения включены также полинуклеотидные последовательности, которые способны гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном контексте, в условиях средней до максимальной жесткости.

В предпочтительном аспекте настоящее изобретение покрывает нуклеотидные последовательности, которые могут гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном контексте, или их комплементом в жестких условиях (например, 50°C и $0,2 \times SSC$).

В более предпочтительном аспекте настоящее изобретение покрывает нуклеотидные последовательности, которые могут гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном контексте, или их комплементом в условиях высокой жесткости (например, 65°C и $0,1 \times SSC$).

Экспрессия полипептидов.

Нуклеотидная последовательность, предназначенная для использования в настоящем изобретении или для кодирования полипептида, обладающего специфическими свойствами, как определено в данном контексте, может быть включена в рекомбинантный реплицирующийся вектор. Вектор можно использовать для репликации и экспрессии нуклеотидной последовательности в форме полипептида в и/или из совместимой клетки-хозяина. Экспрессию можно контролировать, используя контролирующие последовательности, которые включают промоторы/энхансеры и другие сигналы регуляции экспрессии. Могут быть использованы прокариотические промоторы и промоторы, функциональные в эукариотических клетках. Можно использовать тканеспецифические или специфические в отношении стимулов промото-

ры. Могут быть также использованы химерные промоторы, включающие элементы последовательностей из двух или более различных промоторов, описанных выше.

Полипептид, продуцируемый рекомбинантной клеткой-хозяином посредством экспрессии нуклеотидной последовательности, может секретироваться или содержаться внутри клетки в зависимости от используемых последовательности и/или вектора. Можно создать кодирующие последовательности с сигнальными последовательностями, которые направляют секрецию последовательностей, кодирующих субстанцию, через мембрану определенной прокариотической или эукариотической клетки.

Экспрессирующий вектор.

Термин "экспрессирующий вектор" означает конструкцию, способную в экспрессии *in vivo* или *in vitro*.

Предпочтительно, когда экспрессирующий вектор инкорпорирован в геном организма. Термин "инкорпорированный" предпочтительно покрывает стабильную инкорпорацию в геном.

Нуклеотидная последовательность, представленная в настоящем изобретении или кодирующая полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном контексте, находится в векторе, в котором нуклеотидная последовательность функционально связана с регуляторными последовательностями, так что регуляторные последовательности способны обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности подходящим организмом-хозяином, т.е. вектор представляет собой экспрессирующий вектор.

Векторами, представленными в настоящем изобретении, можно трансформировать подходящую клетку-хозяин, как описано ниже, чтобы получить экспрессию полипептида, обладающего специфическими свойствами, как определено в данном контексте.

Выбор вектора, например плазмиды, космиды, вирусного или фагового вектора, будет часто зависеть от клетки-хозяина, для интродукции в которую он предназначен.

Векторы могут содержать один или более генов селективных маркеров, таких как ген, который обуславливает антибиотикоустойчивость, например устойчивость к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу или тетрациклину. Альтернативно, селекцию можно осуществлять путем котрансформации (как описано в заявке WO 91/17243).

Векторы можно использовать *in vitro*, например для продукции РНК, или использовать для трансфекции или трансформации клетки-хозяина.

Так, в следующем варианте осуществления изобретение представляет собой способ получения нуклеотидных последовательностей, представленных в настоящем изобретении, или нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, обладающие специфическими свойствами, как описано в данном контексте, путем интродукции нуклеотидной последовательности в реплицирующийся вектор, интродукции вектора в совместимую клетку-хозяин и выращивание клетки-хозяина в условиях, которые обеспечивают репликацию вектора.

Вектор может, кроме того, включать нуклеотидную последовательность, дающую возможность вектору реплицироваться в данной клетке-хозяине. Примерами данных последовательностей являются точки начала репликации плазмид pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 и pIJ702.

Регуляторные последовательности.

В ряде вариантов использования нуклеотидная последовательность, предназначенная для использования в настоящем изобретении, или нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий специфическими признаками, как описано в данном контексте, может быть функционально связана с регуляторной последовательностью, которая способна обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности, например, выбранной клеткой-хозяином. В качестве примера настоящее изобретение покрывает вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в настоящем изобретении, функционально связанную с данной регуляторной последовательностью, т.е. вектор является экспрессирующим вектором.

Термин "функционально связанный" относится к расположению рядом, при котором описанные компоненты находятся в связи, позволяющей им функционировать предназначенным им образом. Регуляторная последовательность, "функционально связанная" с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Термин "регуляторные последовательности" включает промоторы и энхансеры и другие сигналы регуляции экспрессии.

Термин "промотор" используют в нормальном смысле, принятом в области техники, например сайт связывания РНК-полимеразы.

Повышенный уровень экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей фермент, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном контексте, может также достигаться путем отбора гетерологичных регуляторных участков, например промотора, лидера секреции и терминальных участков.

Предпочтительно, когда нуклеотидная последовательность, представленная в настоящем изобретении, может быть функционально связана, по меньшей мере, с промотором.

Примеры подходящих промоторов, чтобы направлять транскрипцию нуклеотидной последовательности в бактериальном, грибном или вирусном хозяине, хорошо известны в области техники.

Конструкции.

Термин "конструкция", который является синонимом таких терминов, как "конъюгат", "кассета" и "гибрид", включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как описано в данном контексте, предназначенный для использования согласно настоящему изобретению, непосредственно или опосредованно присоединенную к промотору. Примером опосредованного присоединения является наличие подходящей спейсерной группы, такой как последовательность интрона, такая как Sh1-интрон или интрон ADH, находящийся между промотором и нуклеотидной последовательностью, представленной в настоящем изобретении. Это относится также к термину "слитый" в связи с настоящим изобретением, который включает непосредственное или опосредованное присоединение. В ряде случаев термины не покрывают природную комбинацию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, обычно ассоциированной с промотором гена дикого типа, и когда они оба находятся в своей естественной среде.

Конструкция может даже содержать или экспрессировать маркер, который дает возможность селекции генетической конструкции.

Для ряда вариантов применения предпочтительно, когда конструкция включает, по меньшей мере, нуклеотидную последовательность, представленную в настоящем изобретении, или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как описано в данном контексте, функционально связанную с промотором.

Клетки-хозяева.

Термин "клетка-хозяин" в связи с настоящим изобретением включает любую клетку, которая содержит либо нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как описано в данном контексте, либо экспрессирующий вектор, как описано выше, и которую используют в рекомбинантной продукции полипептида, обладающего специфическими свойствами, как описано в данном контексте.

Таким образом, следующий вариант осуществления настоящего изобретения представляет клетки-хозяева, трансформированные или трансфицированные нуклеотидной последовательностью, представленной в настоящем изобретении, или нуклеотидной последовательностью, которая экспрессирует полипептид, обладающий специфическими свойствами, как описано в данном контексте. Клетки будут выбраны так, чтобы они были совместимы с указанным вектором, и могут, например, быть прокариотическими (например, бактериальными), грибными, дрожжевыми или растительными клетками. Предпочтительно, когда клетки-хозяева не являются клетками человека.

Примерами подходящих бактериальных организмов-хозяев являются грамотрицательная бактерия или грамположительные бактерии.

В зависимости от природы нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, обладающий специфическими свойствами, как описано в данном контексте, и/или необходимости дальнейшего процессинга экспрессированного белка могут быть предпочтительными эукариотические хозяева, такие как дрожжи или другие грибы. В общем дрожжевые клетки предпочтительны относительно грибных клеток, поскольку ими легче манипулировать. Однако некоторые белки либо слабо секретируются из дрожжевой клетки, либо в ряде случаев не процессируются должным образом (например, гипергликозилирование в дрожжах). В ряде случаев следует выбрать другой грибной организм-хозяин.

Использование подходящих клеток-хозяев, таких как дрожжевые, грибные и растительные клетки-хозяева, может привести к пост-трансляционным модификациям (например, миристоилированию, гликозилированию, укорочению, липидизации и фосфорилированию тирозина, серина или треонина), как может потребоваться для обеспечения оптимальной биологической активности продуктов экспрессии, представленных в настоящем изобретении.

Клетка-хозяин может представлять собой штамм с дефицитом протеазы или протеаза(-)-штамм.

Организм.

Термин "организм" в связи с настоящим изобретением включает любой организм, который мог бы включать нуклеотидную последовательность, представленную в настоящем изобретении, или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном контексте, и/или полученные из него продукты.

Подходящие организмы могут включать прокариоты, грибок, дрожжи или растение.

Термин "трансгенный организм" касательно настоящего изобретения включает любой организм, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном контексте, и/или полученные из него продукты, и/или в котором промотор может обеспечить возможность экспрессии в организме нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном контексте.

Предпочтительно, когда нуклеотидная последовательность инкорпорирована в геном организма.

Термин "трансгенный организм" не покрывает нативный нуклеотид, кодирующий последовательности в их естественной среде, когда они находятся под контролем своего естественного промотора, который также находится в своей естественной среде.

Вследствие этого трансгенный организм, представленный в настоящем изобретении, включает организм, содержащий любую из или комбинации нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном контексте, конструкции, как определено в данном контексте, векторы, как определено в данном контексте, плазмиды, как определено в данном контексте, клетки, как определено в данном контексте, или их продукты. Например, трансгенный организм может также включать нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном контексте, под контролем гетерологичного промотора.

Трансформация клеток-хозяев/организма.

Как указано ранее, организм-хозяин может быть прокариотическим или эукариотическим организмом. Примеры подходящих прокариотических хозяев включают *E.coli* и *Bacillus subtilis*.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой бактерии, предпочтительно грамположительные бактерии, предпочтительно клетка-хозяин выбрана из *Actinobacteria*, такой как *Biofidobacteria* и *Aeromonas*, особенно предпочтительно *Aeromonas salmonicida*. Еще более предпочтительными являются *Actinomycetales*, такие как *Corynebacteria*, в особенности *Corynebacterium glutamicum* и *Nocardia*. Особенно предпочтительны *Streptomycetaceae*, такие как *Streptomyces*, в особенности *S.lividans*.

Микробный хозяин может быть использован для экспрессии гена галактозидазы, например *Eubacteria*, *Archea* или *Fungi*, в том числе дрожжи. Предпочтительными являются *Eubacteria*, например *Firmicutes* (грамположительные бактерии с низким содержанием ГЦ), такие как *Bacillus subtilis* и другие виды *Bacillus*, молочно-кислые бактерии, такие как виды рода *Lactobacillus* и *Lactococcus*.

Предпочтительны также грамтрицательные *Proteobacteria*, в частности *Gamma*proteobacteria, такие как виды хозяев, принадлежащие к роду *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Citrobacter* и *Escherichia*, особенно *Escherichia coli*.

Предпочтительно, когда вид хозяина является грамположительным экспрессирующим хозяином, таким как *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces lividans* или *Corynebacterium glutamicum*, как подробно описано в заявке GB № 0513859.9.

В другом варианте осуществления клетка-хозяин относится к тому же роду, что нативный вид хозяина, т.е. рекомбинантный ген интродуцируют и экспрессируют в виде того же рода, что и вид, из которого выделен рекомбинантный ген.

В другом варианте осуществления клетка-хозяин относится к нативному виду хозяина, т.е. рекомбинантный ген реинтродуцируют и экспрессируют в том же виде, из которого выделен рекомбинантный ген.

Описание трансформации прокариотических хозяев хорошо обосновано в области техники, например см. Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). При использовании прокариотического хозяина может потребоваться, чтобы нуклеотидная последовательность была соответствующим образом модифицирована перед трансформацией, например, посредством удаления интронов.

В другом варианте осуществления трансгенный организм может быть представлен дрожжами.

Клетки филаментозных грибов можно трансформировать, используя различные методы, известные в области техники, например способом, включающим образование протопластов и трансформацию протопластов с последующей регенерацией клеточной стенки известным путем. Использование *Aspergillus* в качестве микроорганизма-хозяина описано в заявке EP 0238023.

Другим организмом-хозяином может быть растение. Обзор основных методик, используемых для трансформации растений, можно найти в статьях Potrykus (*Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* (1991), 42: 205-225) и Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech*, March/April 1994, 17-27). Дополнительные данные по трансформации растений можно найти в EP-A-0449375.

Основные данные по трансформации грибов, дрожжей и растений представлены в следующих разделах.

Трансформированный гриб.

Организм-хозяин может представлять собой гриб, такой как филаментозный гриб. Примеры данных подходящих хозяев включают любого представителя, принадлежащего родам *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* и т.п.

Обзор данных по трансформации филаментозных грибов приведен в US-A-5741665, где указывают, что стандартные методики трансформации филаментозных грибов и культивирования грибов хорошо известны в области техники. Расширенный обзор методик применительно к *N.crassa* находится, например, в статье Davis и de Serres, *Methods Enzymol* (1971), 17A: 79-143.

Дополнительные данные по трансформации филаментозных грибов приведены в виде обзора в US-A-5674707.

В одном аспекте организм-хозяин может быть из рода *Aspergillus*, например *Aspergillus niger*.

Трансгенный *Aspergillus*, представленный в настоящем изобретении, можно также получить следующим образом, например согласно данным Turner G. 1994 (Vectors for genetic manipulation, монография под ред. Martinelli S.D., Kinghorn J.R. *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology*, vol. 29. Elsevier Amsterdam, 1994, p. 641-666).

Обзор по экспрессии генов в филаментозных грибах приведен в статьях Punt et al. (2002). *Trends Biotechnol.* May 2002; 20(5): 200-6, Archer & Peberdy *Crit. Rev. Biotechnol.* (1997), 17(4): 273-306.

Трансформированные дрожжи.

В другом варианте осуществления трансгенный организм может представлять собой дрожжи.

Обзор принципов экспрессии гетерологичных генов в дрожжах представлен, например, в *Methods Mol. Biol.* (1995), 49: 341-54 и *Curr Opin. Biotechnol.* October, 1997; 8(5): 554-60.

В этом плане дрожжи, такие как виды *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris* (см. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000, 24(1): 45-66), можно использовать как носитель экспрессии гетерологичного гена.

Обзор принципов экспрессии гетерологичных генов в *Saccharomyces cerevisiae* и секреции продуктов генов приведен E. Hinchcliffe, E. Kenny (1993, монография "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", *Yeasts*, vol. 5, Ed. Anthony H. Rose и J. Stuart Harrison, 2-е изд., Academic Press Ltd.).

Для трансформации дрожжей разработан ряд протоколов. Например, трансгенный *Saccharomyces*, соответствующий настоящему изобретению, можно получить согласно данным, представленным в статьях Hinnen et al. (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75, 1929); Beggs J.D. (1978, *Nature*, London, 275, 104) и Ito H. et al. (1983, *J. Bacteriology*, 153, 163-168).

Трансформированные дрожжевые клетки можно отобрать с использованием различных селективных маркеров, таких как ауксотрофные маркеры, доминантные маркеры устойчивости к антибиотикам.

Подходящий дрожжевой организм-хозяин можно выбрать из биотехнологически соответствующих видов дрожжей, таких как, но без ограничения перечисленным, видов дрожжей, выбранных из *Pichia spp.*, *Hansenula spp.*, *Kluveromyces*, *Yarrowinia spp.*, *Saccharomyces spp.*, в том числе *S.cerevisiae*, или *Schizosaccharomyces spp.*, в том числе *Schizosaccharomyces pombe*.

Штамм метилотрофных дрожжей вида *Pichia pastoris* можно использовать в качестве организма-хозяина.

В одном варианте осуществления организм-хозяин может представлять *Hansenula species*, такой как *H.polymorpha* (как описано в WO 01/39544).

Трансформированные растения/клетки растений.

Организм-хозяин, соответствующий настоящему изобретению, может представлять собой растение. Обзор по основным методикам можно найти в статьях Potrykus (*Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* (1991), 42: 205-225) и Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech*, March/April, 1994, 17-27) или в WO 01/16308.

Секреция.

Часто требуется, чтобы полипептид секретировался из экспрессирующего хозяина в культуральную среду, из которой фермент легко можно выделить. Согласно настоящему изобретению лидерную последовательность секреции можно выбрать на основе желательного экспрессирующего хозяина. Гибридные сигнальные последовательности также можно использовать в контексте настоящего изобретения.

Типичными примерами гетерологичных лидерных последовательностей секреции являются последовательности, происходящие из грибного гена амилоглюкозидазы (АГ) (*glaA* - оба варианта из 18 и 24 аминокислот, например из *Aspergillus*), гена α -фактора (из дрожжей, например, *Saccharomyces*, *Kluveromyces* и *Hansenula*) или гена α -амилазы (*Bacillus*).

Детекция.

В области техники известен ряд протоколов детекции и измерения экспрессии последовательности аминокислот. Примеры включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортинг клеток по интенсивности флуоресценции (FACS).

Широкий ряд меток и методик конъюгирования известен компетентным специалистам в области техники и может быть использован в различных анализах нуклеиновых и аминокислот.

Ряд фирм, таких как Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) и US Biochemical Corp (Cleveland, OH), поставляют коммерческие наборы и протоколы для данных методов.

Подходящие сигнальные молекулы или метки включают данные радионуклиды, ферменты, флуоресцентные, хемолуминесцентные или хромогенные агенты, а также субстраты, кофакторы, ингибиторы, магнитные частицы и т.п. Патенты, представляющие применение данных меток, включают US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 и US-A-4366241.

Кроме того, могут быть получены рекомбинантные иммуноглобулины, как показано в US-A-4816567.

Слитые белки.

Полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном контексте, можно получить в виде слитого белка, например, чтобы способствовать его экстракции и очистке. Примеры партнеров слитого белка включают глутатион-S-трансферазу (GST), 6×His, GAL4 (ДНК-связывающие домены и/или домены транскрипционной активации) и β-галактозидазу. Может также быть удобным включить центр протеолитического расщепления между партнером слитого белка и белковой последовательностью, представляющей интерес, чтобы получить возможность удаления последовательности слитого белка. Предпочтительно, когда слитый белок не будет препятствовать активности белковой последовательности.

Системы экспрессии слияния генов в *E.coli* описаны в обзоре в *Curr. Opin. Biotechnol.* (1995), 6(5): 501-6.

В другом варианте осуществления изобретения последовательность аминокислот полипептида, обладающего специфическими свойствами, как определено в данном контексте, можно лигировать с гетерологичной последовательностью, чтобы кодировать слитый белок. Например, для скрининга пептидных библиотек в плане агентов, способных воздействовать на активность субстанции, может быть полезным кодировать химерную субстанцию, экспрессирующую гетерологичный эпитоп, который распознается коммерчески доступным антителом.

Теперь изобретение будет описано только в качестве примера со ссылкой на следующие фигуры и примеры.

На фиг. 1 показан профиль активности липидацилтрансферазы (анализ с PNP-каприлатом), полученный после анионообменной хроматографии (АОХ).

На фиг. 2 показаны результаты анализа SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия) очищенных фракций липидацилтрансферазы (4-12% Mes, +DTT, на гель наносят 40/10 мкл образца):

дорожка 1 - образец липидацилтрансферазы после обессоливания, на гель наносят 40 мкл;

дорожка 2 - образец липидацилтрансферазы после обессоливания, на гель наносят 10 мкл;

дорожка 3 - очищенная липидацилтрансфераза липаза после АОХ (объединенные фракции 27-39), на гель наносят 40 мкл;

дорожка 4 - очищенная липидацилтрансфераза липаза после АОХ (объединенные фракции 27-39, на гель наносят 10 мкл).

На фиг. 3 показаны результаты ТСХ (растворитель 4) продуктов реакции, полученных при обработке липидацилтрансферазой образцов соевого масла согласно табл. 2. В качестве контроля анализируют также фосфатидилхолин (ФХ).

На фиг. 4 показаны результаты ТСХ (растворитель 1) продуктов реакции, полученных при обработке липидацилтрансферазой образцов соевого масла согласно табл. 2. В качестве контроля анализируют также свободную жирную кислоту (СЖК) и моно-ди-триглицерид (TRI/DI/MONO).

На фиг. 5 показаны результаты ТСХ (растворитель 5) продуктов реакции, полученных при обработке липидацилтрансферазой образцов соевого масла согласно табл. 2. В качестве контроля анализируют также холестерин (CHL) и холестеринный эфир (CHL-эфир).

На фиг. 6 показаны результаты ТСХ (растворитель 4) продуктов реакции, полученных при обработке липидацилтрансферазой или Lecitase Ultra™ образцов соевого масла согласно табл. 3 в течение 20 ч.

На фиг. 7 показаны результаты ТСХ (растворитель 5) продуктов реакции, полученных при обработке липидацилтрансферазой или Lecitase Ultra™ образцов соевого масла согласно табл. 3 в течение 20 ч. В качестве контролей анализируют также холестеринный эфир (CHL-эфир); моно-ди-триглицерид (MONO/DI/TRI) и растительный стерин. Указана также идентификация свободной жирной кислоты (СЖК).

На фиг. 8 показаны результаты ТСХ (растворитель 4) продуктов реакции, полученных при обработке липидацилтрансферазой или Lecitase Ultra™ образцов соевого масла согласно табл. 3 в течение 4 ч.

На фиг. 9 показаны результаты ТСХ (растворитель 5) продуктов реакции, полученных при обработке липидацилтрансферазой или Lecitase Ultra™ образцов соевого масла согласно табл. 3 в течение 4 ч. В качестве контролей анализируют также холестеринный эфир (CHL-эфир); моно-ди-триглицерид (MONO/DI/TRI) и растительный стерин. Указана также идентификация свободной жирной кислоты (СЖК).

На фиг. 10 показана последовательность аминокислот зрелой липидацилтрансферазы (GCAT) мутантного *Aeromonas salmonicida* с мутацией Asn80Asp (а именно, аминокислоты 80 в зрелой последовательности).

На фиг. 11 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 1) липидацилтрансферазы и *Aeromonas hydrophila* (ATCC #7965).

На фиг. 12 показана консенсусная последовательность pfam00657 из базы данных version 6 (SEQ ID NO: 2).

На фиг. 13 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 3), полученная из организма *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051).

На фиг. 14 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 4), полученная из организма *Aeromonas salmonicida* (AAG098404; GI:9964017).

На фиг. 15 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 5), полученная из организма *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Genbank, регистрационный номер NP 631558).

На фиг. 16 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 6), полученная из организма *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Genbank, регистрационный номер CAC42140).

На фиг. 17 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 7), полученная из организма *Saccharomyces cerevisiae* (Genbank, регистрационный номер P41734).

На фиг. 18 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 8), полученная из организма *Ralstonia* (Genbank, регистрационный номер AL646052).

На фиг. 19 показана SEQ ID NO: 9. Белок Scoe1 NCBI, регистрационный код CAB39707.1, консервативный гипотетический белок GI:4539178 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

На фиг. 20 показана последовательность аминокислот, представленная как SEQ ID NO: 10. Белок Scoel NCBI, регистрационный код CAB39707.1, консервативный гипотетический белок GI:4539178 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

На фиг. 21 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 11). Белок Scoe3 NCBI, регистрационный код CAB88833.1. Предполагаемый секретируемый белок GI:7635996 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

На фиг. 22 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 12). Белок Scoe4 NCBI, регистрационный код CAB89450.1. Предполагаемый секретируемый белок GI:7672261 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

На фиг. 23 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 13). Белок Scoe5 NCBI, регистрационный код CAB62724.1, предполагаемый липопротеин GI:6562793 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

На фиг. 24 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 14). Белок Srim1 NCBI, регистрационный код AAK84028.1 GDSL-липаза GI:15082088 [*Streptomyces rimosus*].

На фиг. 25 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 15) липидацилтрансферазы из *Aeromonas salmonicida* sub sp. *salmonicida* (ATCC#14174).

На фиг. 26 показаны результаты ТСХ (растворитель 4) образцов 1-10 неочищенного соевого масла, обработанного в течение 20 ч ферментами согласно табл. 4. ФХ означает фосфатидилхолин, добавленный в 5 различных концентрациях (контрольный материал).

На фиг. 27 показаны результаты ТСХ (растворитель 5) продуктов реакции, полученных при обработке липидацилтрансферазой или Lecitase Ultra™ неочищенного соевого масла согласно табл. 4 (20 ч). В качестве контролей анализируют также холестеринэфир (СНЛ-эфир); моно-ди-триглицерид (MONO/DI/TRI) и растительный стерин. Указана также идентификация свободной жирной кислоты (СЖК).

На фиг. 28 показана SEQ ID NO: 17, которая представляет собой последовательность аминокислот липидацилтрансферазы из *Candida parapsilosis*.

На фиг. 29 показана SEQ ID NO: 18, которая представляет собой последовательность аминокислот липидацилтрансферазы из *Candida parapsilosis*.

На фиг. 30 показан сравнительный анализ 1.

На фиг. 31 показана SEQ ID NO: 19. Белок Scoe1 NCBI, регистрационный код CAB39707.1 Консервативный гипотетический белок GI:4539178 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

На фиг. 32 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 25) слитой конструкции, используемой для мутагенеза гена липидацилтрансферазы *Aeromonas hydrophila*. Подчеркнутые аминокислоты представляют собой сигнальный пептид ксиланазы.

На фиг. 33 показана последовательность полипептида фермента липидацилтрансферазы из *Streptomyces* (SEQ ID NO: 26).

На фиг. 34 показана последовательность полипептида фермента липидацилтрансферазы из *Thermobifida* (SEQ ID NO: 27).

На фиг. 35 показана последовательность полипептида фермента липидацилтрансферазы *Thermobifida* (SEQ ID NO: 28).

На фиг. 36 показан полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Corynebacterium efficiens*, GDSX, 300 аминокислот (SEQ ID NO: 29).

На фиг. 37 показан полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Novosphingobium aromaticivorans*, GDSX, 284 аминокислоты (SEQ ID NO: 30).

На фиг. 38 показан полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Streptomyces coelicolor*, GDSX, 269 аминокислот (SEQ ID NO: 31).

На фиг. 39 показан полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Streptomyces avermitilis*, GDSX, 269 аминокислот (SEQ ID NO: 32).

На фиг. 40 показан полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Streptomyces* (SEQ ID NO: 33).

На фиг. 41 показано изображение в виде ленты кристаллической структуры 1IVN.PDB, которая содержит глицерин в активном центре. Фиг. 41 получена с использованием программы отображения Deep View Swiss-PDB.

На фиг. 42 показана кристаллическая структура 1IVN.PDB, вид сбоку, получено при использовании программы отображения Deep View Swiss-PDB, с молекулой глицерина в активном центре - остатки глицерина активного центра в радиусе 10 Å представлены черным цветом.

На фиг. 43 показан сравнительный анализ 2.

На фиг. 44 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 34), полученная из организма *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051) (а именно, представляющая собой зрелую последовательность).

На фиг. 45 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 35) зрелой липидацилтрансферазы (GCAT) мутантного *Aeromonas salmonicida* (а именно, представляющая собой зрелую последовательность).

На фиг. 46 показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 36) из *Streptomyces thermosacchari*.

На фиг. 47 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 37) из *Streptomyces thermosacchari*.

На фиг. 48 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 38) из *Thermobifida fusca*/GDSX, 548 аминокислот.

На фиг. 49 показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 39) из *Thermobifida fusca*.

На фиг. 50 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 40) из *Thermobifida fusca*/GDSX.

На фиг. 51 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 41) из *Corynebacterium efficiens*/GDSX, 300 аминокислот.

На фиг. 52 показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 42) из *Corynebacterium efficiens*.

На фиг. 53 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 43) из *S.coelicolor*/GDSX, 268 аминокислот.

На фиг. 54 показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 44) из *S.coelicolor*.

На фиг. 55 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 45) из *S.avermitilis*.

На фиг. 56 показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 46) из *S.avermitilis*.

На фиг. 57 показана последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 47) из *Thermobifida fusca*/GDSX.

На фиг. 58 показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 48) из *Thermobifida fusca*/GDSX.

На фиг. 59 показаны результаты ТСХ (растворитель 4) продуктов реакции, полученных при обработке ферментом образцов неочищенного соевого масла согласно табл. 6. В качестве контролей анализируют также фосфатидилхолин (ФХ). Указаны также фосфатидилэтаноламин (ПЭ) и лизофосфатидилхолин (ЛФХ).

На фиг. 60 показаны результаты ТСХ (растворитель 5) продуктов реакции, полученных при обработке ферментом образцов неочищенного соевого масла согласно табл. 6. Контроли: холестериновый эфир, моно-ди-триглицерид и растительный стерин. Указана также свободная жирная кислота (СЖК).

На фиг. 61 показан сравнительный анализ L131 и гомологов из *S.avermitilis* и *T.fusca*, который иллюстрирует, что имеется консервативность мотива GDSX (GDSY в L131 и *S.avermitilis* и *T.fusca*), блока GANDY, который представляет собой либо GGND A, либо GGND L, и блока HPT (считают, что он является консервативным каталитическим гистидином). Данные три консервативных блока выделены.

Примеры

Целью данного исследования является изучить возможное применение липидацилтрансферазы (в некоторых случаях обозначаемой в данном контексте как глицерофосфолипидхолестеринацилтрансфераза (GCAT)) для рафинирования гидратацией растительного масла, например соевого масла, подсолнечного масла и рапсового масла.

Одной из целей данного исследования является изучить, является ли, в частности, мутант липидацилтрансферазы (N80D) более подходящим ферментом для рафинирования гидратацией. Из более ранних исследований известно, что липидацилтрансферазы (особенно GCATs) катализируют перенос ацила жирной кислоты с фосфолипид на стерин с образованием лизолецитина и сложных стериновых эфиров.

Настоящее исследование проводят на модели, основанной на рафинированном соевом масле, в которое добавляют фосфатидилхолин и растительные стеринны. Данную модель выбирают, поскольку легче анализировать продукт реакции в модельной системе вместо использования неочищенного соевого масла.

Ферментативные способы рафинирования гидратацией растительных масел, включая соевое масло и рапсовое масло, в последние годы расширяются, поскольку данный способ является более дешевым и более подходящим способом удаления лецитинов из масла. Фермент, используемый для рафинирования масла гидратацией, представляет собой фосфолипазу A1 (Lecitase Ultra™ или фосфолипазу поджелудочной железы A2 - Novozymes A/S, Дания).

Одним из преимуществ фермента, представленного в настоящем изобретении, при использовании в рафинировании гидратацией по сравнению с фосфолипазой А1, соответствующей предшествующему уровню техники, является то, что фермент, представленный в настоящем изобретении, способствует образованию сложных стериновых эфиров в процессе рафинирования гидратацией и участвует в накоплении сложных стериновых эфиров, которое не достигается с используемой в настоящее время фосфолипазой А1 (Lecitase Ultra™).

Материалы и способы.

Ферменты.

Липидацилтрансфераза, представленная в настоящем изобретении: фермент *Aeromonas salmonicida* с мутацией Asn80Asp (аминокислота 80 зрелого фермента) (SEQ ID NO: 16 (см. фиг. 10)); Lecitase Ultra (#3108) фирмы Novozymes, Дания.

Соевое масло: масло соевое IP (соответствующее Международной фармакопее) (номер продукта: 005018/партия № Т-618-4).

Лецитин: L- α -фосфатидилхолин 95% растительный (фирмы Avanti No 441601).

Растительный стерин: генерол 122 N фирмы Henkel, Германия.

Токоферол: α -токоферол (номер продукта: 050908/партия № 4010140554).

Активность фосфолипазы.

Субстрат.

0,6% L- α -фосфатидилхолин 95% растительный (фирмы Avanti No 441601), 0,4% Тритон-Х100 (фирмы Sigma X-100) и 5 мМ CaCl₂ растворяют в 0,05 М буфера HEPES, pH 7.

Способ анализа.

400 мкл субстрата вносят в эппендорфовскую пробирку объемом 1,5 мл и помещают в термосмеситель Eppendorf при 37°C в течение 5 мин. В точке времени t=0 мин добавляют 50 мкл раствора фермента. Анализируют также контроль с добавлением воды вместо фермента. Образец смешивают при 10×100 об/мин в термосмесителе Eppendorf при 37°C в течение 10 мин. В точке времени t=10 мин эппендорфовскую пробирку помещают в другой термосмеситель при 99°C на 10 мин, чтобы остановить реакцию.

Свободную жирную кислоту в образцах анализируют с использованием набора NEFA C фирмы WAKO GmbH.

Активность фермента PLU-NEFA pH 7 рассчитывают как микромоли жирной кислоты, образующейся в минуту в условиях анализа.

ВЭТСХ (высокоэффективная тонкослойная хроматография).

Устройство для нанесения: автоматический дозатор для ТСХ 4, SAMAG.

Пластинка для ВЭТСХ: 20×10 см, Merck No 1.05641. Перед использованием активируют в течение 30 мин при 160°C.

Нанесение: 1 мкл 8% раствора масла в буфере наносят на пластинку для ВЭТСХ, используя автоматическое устройство для нанесения.

Подвижный буфер 1: Р-эфир:метил-трет-бутиловый эфир:уксусная кислота 60:40:1.

Подвижный буфер 4: хлороформ:метанол:вода 75:25:4.

Подвижный буфер 5: Р-эфир:метил-трет-бутиловый эфир:уксусная кислота 70:30:1.

Время нанесения/элюции:

подвижный буфер 1 - 12 мин;

подвижный буфер 4 - 20 мин;

подвижный буфер 5 - 10 мин.

Проявление.

Пластинку сушат в сушильном шкафу при 160°C в течение 10 мин, охлаждают и погружают в 6% ацетат меди в 16% H₃PO₄. Дополнительно сушат в течение 10 мин при 160°C и непосредственно анализируют.

Пример 1. Очистка фермента.

Образец: образец липидацилтрансферазы (Asn80Asp) (SEQ ID NO: 16) фильтруют через фильтр 0,8/0,22 мкм. Собирают 510 мл фильтрата.

Стадия 1. Обессоливание, Sephadex 25 G, 3,2 л геля (10 см cm id).

Колонку Sephadex готовят, как описано изготовителем (Amersham biosciences). Колонку уравнивают 20 мМ Na-P-буфера, pH 8,0. Образец (510 мл) наносят на колонку при скорости потока 25 мл/мин. Собирают 815 мл обессоленного образца и хранят при 4°C.

Стадия 2. Анионообменная хроматография, Q-Sepharose FF 300 мл геля (ХК 50).

Колонку Q-Sepharose FF готовят, как описано изготовителем (Amersham biosciences). Колонку уравнивают 20 мМ Na-P-буфера, рН 8,0. Обессоленный образец наносят на колонку при скорости потока 15 мл/мин. Затем колонку промывают буфером А. Липазу элюируют линейным градиентом 0-0,4 М NaCl в 20 мМ Na-P-буфера (рН 8,0, буфер В). За время полного прохождения колонки собирают фракции по 15 мл. Липазу элюируют приблизительно при 0,2 М NaCl и при просмотре фракций активность липазы не определяют.

Анализ фермента на основе PNP-каприлата.

Анализ осуществляют при использовании PNP-каприлата в качестве субстрата следующим образом.

10 мг субстрата растворяют в 1 мл этанола и смешивают с 9 мл 50 мМ буфера Трис-НСl (рН 7,3), содержащего 0,4% TX100.

240 мкл субстрата предварительно инкубируют при 35°C. Реакцию инициируют добавлением 25 мкл образца/контроля. Смесь инкубируют при 35°C в течение 5 мин при встряхивании. С помощью спектрофотометра непрерывно измеряют образование PNP при длине волны 410. Контрольный образец включает все компоненты с буфером вместо образца.

Одну единицу активности липазы определяют как количество фермента, высвобождающего 1 мкл свободной каприловой кислоты в минуту при 35°C.

Определение молекулярной массы и чистоты.

SDS-PAGE (гель-электрофорез в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия) проводят на 4-12% геле Nu-PAGE (+DTT) и окрашивают кумасси согласно инструкциям изготовителя (Novex, USA). Стандартным маркером является See Blue Plus2, полученный от фирмы Novex, USA.

Результаты.

Хроматограмма, полученная при очистке ионообменной хроматографией (АОХ) мутанта N80D липидацилтрансферазы, представлена на фиг. 1. Собранные фракции анализируют на активность липазы (на основе анализа PNP-каприлата). Активность фракций иллюстрируют на фиг. 1а.

Фракции, содержащие активность липидацилтрансферазы (27-39, 195 мл), объединяют. Конечное выделение частично очищенной липидацилтрансферазы составляет приблизительно 80% (на основе анализа PNP-каприлата).

Фракции очищенной липидацилтрансферазы подвергают гель-электрофорезу SDS-PAGE.

Гель SDS-PAGE показывает белок липидацилтрансферазы молекулярной массы приблизительно 28 кД. Частично очищенная липидацилтрансфераза включает минорную примесь молекулярной массы приблизительно 10 кД (см. фиг. 2).

Объединенные фракции липидацилтрансферазы 27-39 после АОХ анализируют на активность фосфолипазы, получая результат 20,4 PLU-7/мл.

Полная схема очистки представлена в табл. 1, в которой липидацилтрансфераза частично очищена с выходом 80%.

Таблица 1

Образец	Очистка липидацилтрансферазы				
	Объем	V_{Max}	Разведение	Общ. кол-во единиц	Выход, %
Неочищенный (Q3+Q4)	510	1,150	100	58650	100
Обессоленный неочищенный	815	0,697	100	56806	97
Объед. фракции 27-39 Q-Sep.	195	1,203	200	46898	80

Пример 2. Эксперимент по рафинированию гидратацией.

Образец липидацилтрансферазы из примера 1 используют для исследований по рафинированию гидратацией в препаратах, представленных в табл. 2.

Растительный стерин, α -токоферол и фосфатидилхолин растворяют в соевом масле нагреванием масла до 90°C. Затем масло охлаждают приблизительно до 40°C и добавляют фермент. Образец помещают при 40°C в течение 17 ч при перемешивании и затем образец берут для анализа ВЭТСХ путем растворения образца в смеси хлороформ:метанол 2:1.

Таблица 2

Модели соевого масла с α -токоферолом и растительным стеринном, используемые для тестирования липидацилтрансферазы.										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Соевое масло	%98	97	97	97	96	97	96	97	96	92
α -токоферол	%					1	1	1	1	1
Растительный стерин	%		1	1			1	1	1	1
Фосфатидилхолин	%	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Объед. фракции липидацилтрансферазы 27-39%		1	1	1	1	1	1	1	1	4

Результаты анализа ВЭТСХ представлены на фиг. 3 и 4.

Результаты ТСХ, представленные на фиг. 3, ясно показывают, что фосфатидилхолин удаляется почти на 100% при добавлении к маслу липидацилтрансферазы. Только образец 10 включает небольшое количество фосфатидилхолина. Образец 10 имеет самое высокое количество воды, которое указывает на то, что в плане рафинирования гидратацией фермент может работать лучше в составах с низким содержанием воды или это можно объяснить тем фактом, что, поскольку образец 10 включает 5% воды, образуется двухфазная система, которая могла бы привести к меньшей степени контакта реагентов и фермента.

Из результатов, приведенных на фиг. 4, видно, что образуется небольшое количество жирных кислот, но, когда стерин или α -токоферол также имеются в масле, количество свободных жирных кислот ниже, поскольку жирные кислоты из фосфатидилхолина переносятся на стерин или токоферол с образованием сложных стериновых эфиров и сложных эфиров токоферола.

Образование сложных стериновых эфиров ясно видно из результатов ТСХ, представленных на фиг. 5. Следует отметить, что в используемом сырьевом материале сложный холестерин эфир имеет такое же время удержания, как сложные эфиры растительных стеринов.

Пример 3. Эксперимент по рафинированию гидратацией (2).

В другом эксперименте объединенные фракции липидацилтрансферазы 27-39, полученные при АОХ хроматографии, тестируют с различными дозами фермента и концентрациями воды в соевом масле с фосфатидилхолином и растительным стеринном. В данном эксперименте тестируют также коммерческую фосфолипазу Lecitase Ultra™ в концентрации, рекомендованной изготовителем для рафинирования гидратацией. Состав образцов для данного эксперимента приведен в табл. 3.

Таблица 3

Модель соевого масла с растительным стеринном, используемая для тестирования липидацилтрансферазы и Lecitase Ultra™											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Соевое масло	%	96,6	96,6	96	92	96	92	95	92	96	92
Растительный стерин	%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Фосфатидилхолин	%	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Объед. фракции липидацилтрансферазы 27-39	%		0,4	0,4	0,4	1	1	2	2		
Lecitase Ultra™, 1% раствор	%									0,3	0,3
Water		0,4		0,6	4,6	0	4	0	3	0,7	4,7
Единиц/г масла (PLU-7/г)		0	0,08	0,08	0,08	0,20	0,20	0,40	0,41	0,31	0,3

Растительный стерин и фосфатидилхолин растворяют в соевом масле нагреванием до 95°C при перемешивании. Затем масло охлаждают до 40°C и добавляют ферменты. Образец поддерживают при 40°C при перемешивании с помощью магнитной мешалки и отбирают образцы через 4 и 20 ч и анализируют с помощью ТСХ. Результаты анализа ВЭТСХ образцов, взятых через 4 и 20 ч, представлены на фиг. 6-9.

Результаты ВЭТСХ показывают, что самая низкая доза липидацилтрансферазы (0,4%, соответствующие 0,08 PLU-7/г масла) достаточна для удаления фосфатидилхолина в соевом масле через время реакции 20 ч. Показывают также, что самая высокая доза воды (5%), по-видимому, оказывает вредное воздействие на липидацилтрансферазу в плане гидролиза фосфатидилхолина в масле. Вследствие этого предполагают, что самая низкая степень гидролиза в образце с самым высоким уровнем липидацилтрансферазного превращения объясняется тем фактом, что в образец добавляют также больше воды. Напротив, показано, что Lecitase Ultra™ имеет более низкую степень гидролиза фосфатидилхолина при более низкой дозе воды (1%), тогда как Lecitase Ultra™ почти полностью удаляет фосфатидилхолин в образце с 5% воды.

Результаты, представленные на фиг. 7, также показывают, что основная часть растительного стерина превращается в сложный эфир растительного стерина в образцах, обработанных липидацилтрансферазой, тогда как в образцах, обработанных Lecitase Ultra™, не образуется никаких сложных стериновых эфиров. На фиг. 7 показано, что Lecitase Ultra™ дает больше свободных жирных кислот (СЖК), чем липидацилтрансфераза.

Заключение.

Эксперименты по рафинированию на модели соевого масла, включающего фосфатидилхолин, растительный стерин и токоферол, показывают, что частично очищенный фермент липидацилтрансфераза способен удалять все примеси фосфатидилхолина с образованием сложных эфиров растительного стерина с образованием только маленьких количеств свободных жирных кислот.

Одним из дополнительных преимуществ липидацилтрансферазы является образование сложных стериновых эфиров и, в частности, сложного эфира токоферола, поскольку сложные стериновые эфиры (в том числе сложный эфир токоферола) обладают благоприятным воздействием на состояние здоровья. При обычной переработке пищевого масла после рафинирования гидратацией водную фазу, включающую гидролизованый полярный липид (например, фосфолипид и/или гликолипид), отделяют от масла. Как принято, стерин удаляют из пищевого масла в процессе рафинирования масла (это иногда называют дезодорацией). Однако сложные стериновые эфиры (и сложный эфир токоферола) устойчивы к дезодорации и, таким образом, остаются в масле. Накопление сложных стериновых эфиров в масле является привлекательным моментом, поскольку показано, что повышенный уровень поглощения сложных эфиров растительных стеринов снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний у человека.

Эксперимент также показывает, что липидацилтрансфераза способна к образованию сложных эфиров токоферола, которые будут накапливаться в масле.

Данный факт вносит вклад в повышение стабильности масла к окислению и, таким образом, представляет собой дополнительное преимущество использования липидацилтрансферазы, представленной в настоящем изобретении, для рафинирования гидратацией.

Пример 4. Эксперимент по рафинированию гидратацией неочищенного масла.

В другом эксперименте объединенные фракции липидацилтрансферазы 27-39, полученные при АОХ хроматографии, тестируют при различных дозах фермента и концентрациях воды в неочищенном соевом масле (перед рафинированием гидратацией), полученном от фирмы The Solae Company, Aarhus, Дания. В данном эксперименте тестируют также коммерческую фосфолипазу Lecitase Ultra™ в концентрации, рекомендованной изготовителем для рафинирования гидратацией. Состав образцов для данного эксперимента представлен в табл. 4.

Образцы помещают в нагревательное устройство при 40°C при перемешивании с помощью магнитной мешалки. Образцы вынимают через 20 ч для проведения анализа.

Таблица 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Неочищенное соевое масло	%99,5	99,5	99,9	98,9	97,9	95,9	99,7	99,9	95	
Липидацилтрансфераза	%	0,5	1	1	1	2	5			
Lecitase Ultra™ #3108, 1% раствор	%							0,3	0,3	0,3
Вода	% 0,5	0	0	1	2	0	0	0	0,7	4,7

Образцы масла анализируют ВЭТСХ, получая результаты, представленные на фиг. 26 и 27.

Анализ ТСХ, приведенный на фиг. 26, показывает, что липидацилтрансфераза эффективно удаляет фосфолипиды в неочищенном соевом масле, не оставляя в образце лизолецитин (см. образец 3, 4, 6 и 7). Lecitase Ultra™ также удаляет фосфолипид (ФХ), но на хроматограмме остаются некоторые полосы, которые, как предполагают, представляют собой лизолецитин. Показано также, что липидацилтрансфераза работает в среде с очень низким содержанием воды, но для действия Lecitase Ultra™ требуется содержание воды 1-5%.

Результаты на фиг. 27 подтверждают, что липидацилтрансфераза превращает свободный стерин в сложные стериновые эфиры и Lecitase Ultra™ не оказывает воздействия на стерин. На фиг. 27 также показано, что некоторые свободные жирные кислоты образуются в обоих образцах, с липидацилтрансферазой и Lecitase Ultra™. Причину образования свободных жирных кислот с липидацилтрансферазой объясняют тем фактом, что не имеется достаточно доступного донора ацила (стерина) и, вследствие этого, происходит также гидролиз.

Образцы 1, 2, 3, 6, 8 и 10 из табл.4 анализируют с помощью ГЖХ и определяют количество стеринов и сложных стериновых эфиров. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Анализ ГЖХ стеринов и сложных стериновых эфиров в неочищенном соевом масле, обработанном ферментом (см. табл. 4)

Образец	Фермент	Стерин	Стериновый эфир
№		%	%
1	Контроль	0,25	0,07
2	0,5% объед. фракций липидацилтрансферазы 27-39	0,13	0,13
3	1% объед. фракций липидацилтрансферазы 27-39	0	0,26
6	2% объед. фракций липидацилтрансферазы 27-39	0	0,22
8	0,3% Lecitase Ultra™, 1% раствор	0,25	0,03
10	0,3% Lecitase Ultra™, 1% раствор + 5% воды	0,27	0,05

Результаты, приведенные в табл. 5, подтверждают способность липидацилтрансферазы, представленной в настоящем изобретении, превращать весь стерин в неочищенном соевом масле в сложный стериновый эфир, и коммерческая фосфолипаза Lecitase Ultra™ не показывает действия на стерин.

Заключение.

Действие липидацилтрансферазы, представленной в настоящем изобретении, на неочищенное соевое масло, подтверждает, что липидацилтрансфераза, представленная в настоящем изобретении, эффективно удаляет фосфолипиды в неочищенном соевом масле с одновременным образованием сложных стериновых эфиров.

Пример 5.

В другом эксперименте фосфолипазу из *Streptomyces thermosacchari* L131 тестируют в неочищенном соевом масле.

Результаты подтверждают, что фосфолипаза *Streptomyces thermosacchari* L131 эффективно гидролизует фосфолипиды в неочищенном соевом масле и представляет собой подходящий альтернативный фермент для рафинирования растительных масел гидратацией.

Способы ферментативного рафинирования гидратацией растительных масел, в том числе соевого масла и рапсового масла, в настоящее время расширяются, поскольку данный способ является менее дорогим и более подходящим способом удаления лецитинов из растительных масел. Фермент, коммерчески используемый для рафинирования масла гидратацией, представляет собой микробную фосфолипазу A1 или фосфолипазу A2 животного происхождения.

(Фосфо)липидацилтрансфераза *Streptomyces thermosacchari* L131 представляет собой другой фермент, который можно использовать для рафинирования гидратацией.

Введение.

Целью настоящего исследования является изучить возможное применение липидацилтрансферазы из *Streptomyces thermosacchari* L131 для рафинирования гидратацией растительного масла, например соевого масла, подсолнечного масла и рапсового масла.

Традиционно для рафинирования масел гидратацией используют два способа, физическое рафинирование гидратацией и химическое рафинирование гидратацией. Ранее в 1990-е гг. разработан ферментативный способ рафинирования гидратацией на основе использования фосфолипазы поджелудочной железы. Поскольку данный фермент некошерный, фосфолипазу заменяют микробной фосфолипазой A1. Ферментативный способ имеет некоторые преимущества относительно химического или физического способов рафинирования гидратацией, включая снижение себестоимости, повышенный выход и процесс, более благоприятный для окружающей среды.

Целью настоящего исследования является изучить, может ли липидацилтрансфераза из *Streptomyces thermosacchari* L131 быть подходящим ферментом для рафинирования гидратацией. Из вышеописанных исследований известно, что *Streptomyces thermosacchari* L131 обладает гидролитическими свойствами в отношении галактолипидов и фосфолипидов, не проявляя какой-либо активности в отношении триглицеридов, и предполагают, что данный фермент способствует также реакциям трансферазы в некоторых средах с низким содержанием воды. Данное исследование проводят в неочищенном соевом масле с естественным содержанием фосфолипидов.

Материалы и способы.

Фермент.

K371(jour 2390-30): *Streptomyces thermosacchari* L131/S.lividans, лиофилизированный на крахмале.

(Активность: 108 PLU-7/г).

Lecitase Ultra (#3108) фирмы Novozymes, Дания.

Сложный эфир холестеразы, фирма Fluka 26950.

Растительный стерин: Generol 122 N фирмы Henkel, Германия.

Неочищенное соевое масло фирмы The Solae Company, Орхус, Дания.

Лецитин: L- α фосфатидилхолин 95%, растительный (фирмы Avanti No 441601).

Активность фосфолипазы.

Субстрат.

0,6% L- α фосфатидилхолина растительного 95% (фирмы Avanti No 441601), 0,4% Тритон-X100 (фирмы Sigma X-100) и 5 мМ CaCl₂ растворяют в 0,05 М буфере HEPES, pH 7.

Методика анализа.

400 мкл субстрата вносят в эппендорфовскую пробирку объемом 1,5 мл и помещают в термосмеситель Eppendorf при 37°C на 5 мин. В точке времени t=0 мин добавляют 50 мкл раствора фермента. Кроме того, анализируют контроль с водой вместо фермента. Образец перемешивают при 10×100 об/мин в термосмесителе Eppendorf при 37°C в течение 10 мин. В точке времени t=10 мин реакцию останавливают, помещая эппендорфовскую пробирку в другой термосмеситель при 99°C на 10 мин.

Содержание свободной жирной кислоты в образцах анализируют с использованием набора NEFA C фирмы WAKO GmbH.

Активность фермента PLU-NEFA pH 7 рассчитывают как количество микромолей жирной кислоты, образующейся в минуту в условиях реакции.

ГЖХ (газовая хроматография).

Капиллярный газовый хроматограф Perkin Elmer 8420, снабженный слитой силикагелевой колонкой WCOT 12,5 м×0,25 мм ID×0,1 мкм 5% фенил-метил-силикон (CP Sil 8 CB фирмы Chrompack).

Носитель: гелий.

Инжекция: 1,5 мкл с разъемом.

Детектор: FID. 385°C.

Программа печи:	1	2	3	4
Температура печи [°C]	80	200	240	360
Изотермический режим, время [мин.]	2	0	0	10
Температурный режим [°C/мин.]	20	10	12	

Получение образца.

Липид, экстрагированный из 0,2 г образца, растворяют в 2 мл смеси гептан:пиридин 2:1, включающей внутренний стандарт гептадекан, 2 мг/мл. 500 мкл образца переносят в изогнутую пробирку. Добавляют 100 мкл MSTFA (N-метил-N-триметилсилил-трифторацетамид) и инкубируют реакцию в течение 15 мин при 90°C.

ВЭТСХ.

Устройство для нанесения: автоматический дозатор для ТСХ 4, SAMAG.

Пластика для ВЭТСХ: 20×10 см, Merck No 1.05641. Перед использованием активируют в течение 30 мин при 160°C.

Нанесение: 1 мкл 8% раствора масла в буфере наносят на пластинку для ВЭТСХ, используя автоматическое устройство для нанесения для ТСХ.

Подвижный буфер 4: хлороформ:метанол:вода 75:25:4.

Подвижный буфер 5: Р-эфир:метил-трет-бутиловый эфир:уксусная кислота 70:30:1.

Время нанесения/эволюции:

подвижный буфер 4 - 20 мин;

подвижный буфер 5 - 10 мин.

Проявление.

Пластику сушат в сушильном шкафу при 160°C в течение 10 мин, охлаждают и погружают в 6% ацетат меди в 16% H₃PO₄. Дополнительно сушат в течение 10 мин при 160°C и непосредственно анализируют.

Результаты.

Эксперимент по рафинированию гидратацией.

Для исследований по рафинированию гидратацией используют *Streptomyces thermosacchari* L131 в составах, приведенных в табл. 6.

Образцы помещают при 40°C в течение 18 ч при перемешивании, после чего отбирают образец для анализа ВЭТСХ посредством растворения образца в смеси хлороформ:метанол 2:1.

Таблица 6

Рафинирование гидратацией неочищенного соевого масла
с использованием *Streptomyces thermosacchari* L131 и
Lecitase Ultra

	1	2	3	4	5	6
Неочищенное соевое масло	%99	99	98	97	99	7,99
K371, 10% в воде	%	1	2	3		
Lecitase Ultra™ #3108, 1% в воде	%				0,3	0,3
Вода	%	1	0	0	0	0,7

Результаты анализа ВЭТСХ приведены на фиг. 59 и 60.

На фиг. 59 показана ТСХ (растворитель 4) продуктов реакции, полученных при обработке ферментом образцов неочищенного соевого масла согласно табл. 6. В качестве контроля анализируют также фосфатидилхолин (ФХ). Указаны также фосфатидилэтаноламин (ПЭ) и лизофосфатидилхолин (ЛФХ).

На фиг. 60 показана ТСХ (растворитель 5) продуктов реакции, полученных при обработке ферментом образцов неочищенного соевого масла согласно табл. 6. Контроли: сложный эфир холестерина, моноглицерид, диглицерид, триглицерид и растительный стерин. Указана также свободная жирная кислота (СЖК).

Результаты ТСХ на фиг. 59 ясно показывают, что фосфатидилхолин полностью удаляется при добавлении к маслу *Streptomyces thermosacchari* L131. Только самая низкая доза (образец 2) не полностью гидролизует фосфолипиды. Lecitase Ultra™ также гидролизует фосфолипиды в масле, когда имеется 5% воды (образец 6), но без добавления дополнительного количества воды (образец 5) гидролизует только часть фосфолипидов.

Результаты, приведенные на фиг. 60, показывают, что гидролиз фосфолипидов сопровождается образованием свободной жирной кислоты.

Заключение.

Липидацилтрансфераза из *Streptomyces thermosacchari* L131 эффективно гидролизует фосфолипиды в неочищенном соевом масле во время образования свободных жирных кислот.

Все публикации, упомянутые в вышеприведенном описании, включены в данном контексте в виде ссылки. Компетентным специалистам будут очевидны различные модификации и варианты описанных способов и системы, представленных в настоящем изобретении, не выходя из объема настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует иметь в виду, что изобретение, как оно заявлено, не следует ненадлежащим образом ограничивать данными конкретными вариантами осуществления. В действительности предусматривают, что различные модификации описанных путей реализации изобретения, которые очевидны для компетентных специалистов в области биохимии и биотехнологии или близких областях, входят в объем следующей формулы изобретения.

Перечень последовательностей

<110> ДАНИСКО А/С
 <120> ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СПОСОБ РАФИНИРОВАНИЯ МАСЛА ГИДРАТАЦИЕЙ
 <130> P023020W0
 <140> PCT/GV2005/002823
 <141> 2005-07-18
 <150> GB 0416035.4
 <151> 2004-07-16
 <150> US 60/591,185
 <151> 2004-07-26
 <150> GB 513859.9
 <151> 2005-07-07
 <160> 53
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Aeromonas hydrophila
 <400> 1
 Met Lys Lys Trp Phe Val Cys Leu Leu Gly Leu Val Ala Leu Thr Val
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Asp Ser Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly
 20 25 30
 Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr
 35 40 45
 Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro
 50 55 60
 Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala
 65 70 75 80
 Asn Glu Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser
 85 90 95
 Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr
 100 105 110
 Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu
 115 120 125
 Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln
 130 135 140
 Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met

014985

Arg Gly Ile Ser Gly Arg Thr Ser Asp Gly Arg Leu Ile Val Asp Ala
50 55 60

Leu Val Ala Leu Leu Phe Leu Ala Gln Ser Leu Gly Leu Pro Asn Leu
65 70 75 80

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

Ala Gly Ala Thr Ile Leu Pro Thr Ser Gly Pro Phe Leu Ile Gln Val
100 105 110

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

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

Ser Pro Asp Leu Val Thr Ile Met Ile Gly Thr Asn Asp Leu Ile Thr
145 150 155 160

Ser Ala Phe Phe Gly Pro Lys Ser Thr Glu Ser Asp Arg Asn Val Ser
165 170 175

Val Pro Glu Phe Lys Asp Asn Leu Arg Gln Leu Ile Lys Arg Leu Arg
180 185 190

Ser Asn Asn Gly Ala Arg Ile Ile Val Leu Ile Thr Leu Val Ile Leu
195 200 205

Asn Leu Gly Pro Leu Gly Cys Leu Pro Leu Lys Leu Ala Leu Ala Leu
210 215 220

Ala Ser Ser Lys Asn Val Asp Ala Ser Gly Cys Leu Glu Arg Leu Asn
225 230 235 240

Glu Ala Val Ala Asp Phe Asn Glu Ala Leu Arg Glu Leu Ala Ile Ser
245 250 255

Lys Leu Glu Asp Gln Leu Arg Lys Asp Gly Leu Pro Asp Val Lys Gly
260 265 270

Ala Asp Val Pro Tyr Val Asp Leu Tyr Ser Ile Phe Gln Asp Leu Asp
275 280 285

Gly Ile Gln Asn Pro Ser Ala Tyr Val Tyr Gly Phe Glu Thr Thr Lys
290 295 300

Ala Cys Cys Gly Tyr Gly Gly Arg Tyr Asn Tyr Asn Arg Val Cys Gly
305 310 315 320

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

014985

His Val Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln
 195 200 205

Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe
 210 215 220

Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Gln Arg
 225 230 235 240

Asn Ala Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Ser Arg
 245 250 255

Ser Ala Ser Thr Asp Ser Gln Leu Ser Ala Phe Asn Pro Gln Glu Arg
 260 265 270

Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro
 275 280 285

Met Ala Ala Arg Ser Ala Ser Thr Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe
 290 295 300

Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu
 305 310 315 320

Pro Ala Ala Thr Phe Ile Glu Ser Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His
 325 330 335

<210> 4
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Aeromonas salmonicida
 <400> 4

Met Lys Lys Trp Phe Val Cys Leu Leu Gly Leu Ile Ala Leu Thr Val
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly
 20 25 30

Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr
 35 40 45

Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro
 50 55 60

Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala
 65 70 75 80

Asn Glu Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser
 85 90 95

Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Tyr Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr

014985

100 105 110
 Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu
 115 120 125
 Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln
 130 135 140
 Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met
 145 150 155 160
 Val Leu Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu
 165 170 175
 Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser
 180 185 190
 His Val Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln
 195 200 205
 Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe
 210 215 220
 Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu
 225 230 235 240
 Asn Pro Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg
 245 250 255
 Ser Val Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg
 260 265 270
 Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro
 275 280 285
 Met Ala Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe
 290 295 300
 Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu
 305 310 315 320
 Arg Ala Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly
 325 330 335
 <210> 5
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicolor
 <400> 5
 Met Pro Lys Pro Ala Leu Arg Arg Val Met Thr Ala Thr Val Ala Ala
 1 5 10 15

014985

Val Gly Thr Leu Ala Leu Gly Leu Thr Asp Ala Thr Ala His Ala Ala
 20 25 30
 Pro Ala Gln Ala Thr Pro Thr Leu Asp Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Gly Ser Gly Val Leu Pro Val Asp Pro Ala Asn Leu Leu
 50 55 60
 Cys Leu Arg Ser Thr Ala Asn Tyr Pro His Val Ile Ala Asp Thr Thr
 65 70 75 80
 Gly Ala Arg Leu Thr Asp Val Thr Cys Gly Ala Ala Gln Thr Ala Asp
 85 90 95
 Phe Thr Arg Ala Gln Tyr Pro Gly Val Ala Pro Gln Leu Asp Ala Leu
 100 105 110
 Gly Thr Gly Thr Asp Leu Val Thr Leu Thr Ile Gly Gly Asn Asp Asn
 115 120 125
 Ser Thr Phe Ile Asn Ala Ile Thr Ala Cys Gly Thr Ala Gly Val Leu
 130 135 140
 Ser Gly Gly Lys Gly Ser Pro Cys Lys Asp Arg His Gly Thr Ser Phe
 145 150 155 160
 Asp Asp Glu Ile Glu Ala Asn Thr Tyr Pro Ala Leu Lys Glu Ala Leu
 165 170 175
 Leu Gly Val Arg Ala Arg Ala Pro His Ala Arg Val Ala Ala Leu Gly
 180 185 190
 Tyr Pro Trp Ile Thr Pro Ala Thr Ala Asp Pro Ser Cys Phe Leu Lys
 195 200 205
 Leu Pro Leu Ala Ala Gly Asp Val Pro Tyr Leu Arg Ala Ile Gln Ala
 210 215 220
 His Leu Asn Asp Ala Val Arg Arg Ala Ala Glu Glu Thr Gly Ala Thr
 225 230 235 240
 Tyr Val Asp Phe Ser Gly Val Ser Asp Gly His Asp Ala Cys Glu Ala
 245 250 255
 Pro Gly Thr Arg Trp Ile Glu Pro Leu Leu Phe Gly His Ser Leu Val
 260 265 270
 Pro Val His Pro Asn Ala Leu Gly Glu Arg Arg Met Ala Glu His Thr
 275 280 285

014985

Met Asp Val Leu Gly Leu Asp
290 295

<210> 6
<211> 295
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 6

Met Pro Lys Pro Ala Leu Arg Arg Val Met Thr Ala Thr Val Ala Ala
1 5 10 15

Val Gly Thr Leu Ala Leu Gly Leu Thr Asp Ala Thr Ala His Ala Ala
20 25 30

Pro Ala Gln Ala Thr Pro Thr Leu Asp Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser
35 40 45

Tyr Ser Ala Gly Ser Gly Val Leu Pro Val Asp Pro Ala Asn Leu Leu
50 55 60

Cys Leu Arg Ser Thr Ala Asn Tyr Pro His Val Ile Ala Asp Thr Thr
65 70 75 80

Gly Ala Arg Leu Thr Asp Val Thr Cys Gly Ala Ala Gln Thr Ala Asp
85 90 95

Phe Thr Arg Ala Gln Tyr Pro Gly Val Ala Pro Gln Leu Asp Ala Leu
100 105 110

Gly Thr Gly Thr Asp Leu Val Thr Leu Thr Ile Gly Gly Asn Asp Asn
115 120 125

Ser Thr Phe Ile Asn Ala Ile Thr Ala Cys Gly Thr Ala Gly Val Leu
130 135 140

Ser Gly Gly Lys Gly Ser Pro Cys Lys Asp Arg His Gly Thr Ser Phe
145 150 155 160

Asp Asp Glu Ile Glu Ala Asn Thr Tyr Pro Ala Leu Lys Glu Ala Leu
165 170 175

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

Tyr Pro Trp Ile Thr Pro Ala Thr Ala Asp Pro Ser Cys Phe Leu Lys
195 200 205

Leu Pro Leu Ala Ala Gly Asp Val Pro Tyr Leu Arg Ala Ile Gln Ala
210 215 220

014985

His Leu Asn Asp Ala Val Arg Arg Ala Ala Glu Glu Thr Gly Ala Thr
 225 230 235 240
 Tyr Val Asp Phe Ser Gly Val Ser Asp Gly His Asp Ala Cys Glu Ala
 245 250 255
 Pro Gly Thr Arg Trp Ile Glu Pro Leu Leu Phe Gly His Ser Leu Val
 260 265 270
 Pro Val His Pro Asn Ala Leu Gly Glu Arg Arg Met Ala Glu His Thr
 275 280 285
 Met Asp Val Leu Gly Leu Asp
 290 295
 <210> 7
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 7
 Met Asp Tyr Glu Lys Phe Leu Leu Phe Gly Asp Ser Ile Thr Glu Phe
 1 5 10 15
 Ala Phe Asn Thr Arg Pro Ile Glu Asp Gly Lys Asp Gln Tyr Ala Leu
 20 25 30
 Gly Ala Ala Leu Val Asn Glu Tyr Thr Arg Lys Met Asp Ile Leu Gln
 35 40 45
 Arg Gly Phe Lys Gly Tyr Thr Ser Arg Trp Ala Leu Lys Ile Leu Pro
 50 55 60
 Glu Ile Leu Lys His Glu Ser Asn Ile Val Met Ala Thr Ile Phe Leu
 65 70 75 80
 Gly Ala Asn Asp Ala Cys Ser Ala Gly Pro Gln Ser Val Pro Leu Pro
 85 90 95
 Glu Phe Ile Asp Asn Ile Arg Gln Met Val Ser Leu Met Lys Ser Tyr
 100 105 110
 His Ile Arg Pro Ile Ile Ile Gly Pro Gly Leu Val Asp Arg Glu Lys
 115 120 125
 Trp Glu Lys Glu Lys Ser Glu Glu Ile Ala Leu Gly Tyr Phe Arg Thr
 130 135 140
 Asn Glu Asn Phe Ala Ile Tyr Ser Asp Ala Leu Ala Lys Leu Ala Asn
 145 150 155 160

014985

Glu Glu Lys Val Pro Phe Val Ala Leu Asn Lys Ala Phe Gln Gln Glu
 165 170 175
 Gly Gly Asp Ala Trp Gln Gln Leu Leu Thr Asp Gly Leu His Phe Ser
 180 185 190
 Gly Lys Gly Tyr Lys Ile Phe His Asp Glu Leu Leu Lys Val Ile Glu
 195 200 205
 Thr Phe Tyr Pro Gln Tyr His Pro Lys Asn Met Gln Tyr Lys Leu Lys
 210 215 220
 Asp Trp Arg Asp Val Leu Asp Asp Gly Ser Asn Ile Met Ser
 225 230 235
 <210> 8
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> *Ralstonia* sp.
 <400> 8
 Met Asn Leu Arg Gln Trp Met Gly Ala Ala Thr Ala Ala Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Gly Leu Ala Ala Cys Gly Gly Gly Thr Asp Gln Ser Gly Asn Pro
 20 25 30
 Asn Val Ala Lys Val Gln Arg Met Val Val Phe Gly Asp Ser Leu Ser
 35 40 45
 Asp Ile Gly Thr Tyr Thr Pro Val Ala Gln Ala Val Gly Gly Gly Lys
 50 55 60
 Phe Thr Thr Asn Pro Gly Pro Ile Trp Ala Glu Thr Val Ala Ala Gln
 65 70 75 80
 Leu Gly Val Thr Leu Thr Pro Ala Val Met Gly Tyr Ala Thr Ser Val
 85 90 95
 Gln Asn Cys Pro Lys Ala Gly Cys Phe Asp Tyr Ala Gln Gly Gly Ser
 100 105 110
 Arg Val Thr Asp Pro Asn Gly Ile Gly His Asn Gly Gly Ala Gly Ala
 115 120 125
 Leu Thr Tyr Pro Val Gln Gln Gln Leu Ala Asn Phe Tyr Ala Ala Ser
 130 135 140
 Asn Asn Thr Phe Asn Gly Asn Asn Asp Val Val Phe Val Leu Ala Gly
 145 150 155 160
 Ser Asn Asp Ile Phe Phe Trp Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser Gly Ser

014985

165 170 175
 Gly Val Thr Pro Ala Ile Ala Thr Ala Gln Val Gln Gln Ala Ala Thr
 180 185 190
 Asp Leu Val Gly Tyr Val Lys Asp Met Ile Ala Lys Gly Ala Thr Gln
 195 200 205
 Val Tyr Val Phe Asn Leu Pro Asp Ser Ser Leu Thr Pro Asp Gly Val
 210 215 220
 Ala Ser Gly Thr Thr Gly Gln Ala Leu Leu His Ala Leu Val Gly Thr
 225 230 235 240
 Phe Asn Thr Thr Leu Gln Ser Gly Leu Ala Gly Thr Ser Ala Arg Ile
 245 250 255
 Ile Asp Phe Asn Ala Gln Leu Thr Ala Ala Ile Gln Asn Gly Ala Ser
 260 265 270
 Phe Gly Phe Ala Asn Thr Ser Ala Arg Ala Cys Asp Ala Thr Lys Ile
 275 280 285
 Asn Ala Leu Val Pro Ser Ala Gly Gly Ser Ser Leu Phe Cys Ser Ala
 290 295 300
 Asn Thr Leu Val Ala Ser Gly Ala Asp Gln Ser Tyr Leu Phe Ala Asp
 305 310 315 320
 Gly Val His Pro Thr Thr Ala Gly His Arg Leu Ile Ala Ser Asn Val
 325 330 335
 Leu Ala Arg Leu Leu Ala Asp Asn Val Ala His
 340 345
 <210> 9
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicolor
 <400> 9
 Met Ile Gly Ser Tyr Val Ala Val Gly Asp Ser Phe Thr Glu Gly Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Pro Gly Pro Asp Gly Ala Phe Val Gly Trp Ala Asp Arg Leu
 20 25 30
 Ala Val Leu Leu Ala Asp Arg Arg Pro Glu Gly Asp Phe Thr Tyr Thr
 35 40 45
 Asn Leu Ala Val Arg Gly Arg Leu Leu Asp Gln Ile Val Ala Glu Gln
 50 55 60

014985

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

Gly Gly Asn Asp Ile Ile Arg Pro Gly Thr Asp Pro Asp Glu Val Ala
85 90 95

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

Val Leu Val Thr Thr Gly Phe Asp Thr Arg Gly Val Pro Val Leu Lys
115 120 125

His Leu Arg Gly Lys Ile Ala Thr Tyr Asn Gly His Val Arg Ala Ile
130 135 140

Ala Asp Arg Tyr Gly Cys Pro Val Leu Asp Leu Trp Ser Leu Arg Ser
145 150 155 160

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

Glu Gly His Thr Arg Val Ala Leu Arg Ala Gly Gln Ala Leu Gly Leu
180 185 190

Arg Val Pro Ala Asp Pro Asp Gln Pro Trp Pro Pro Leu Pro Pro Arg
195 200 205

Gly Thr Leu Asp Val Arg Arg Asp Asp Val His Trp Ala Arg Glu Tyr
210 215 220

Leu Val Pro Trp Ile Gly Arg Arg Leu Arg Gly Glu Ser Ser Gly Asp
225 230 235 240

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

Ile Ala Ala Val Ala
260

<210> 10
<211> 260
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 10

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

Phe Thr Glu Gly Met Ser Asp Leu Leu Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Gly
20 25 30

014985

Trp Ala Asp Leu Leu Ala Thr Arg Met Ala Ala Arg Ser Pro Gly Phe
 35 40 45
 Arg Tyr Ala Asn Leu Ala Val Arg Gly Lys Leu Ile Gly Gln Ile Val
 50 55 60
 Asp Glu Gln Val Asp Val Ala Ala Ala Met Gly Ala Asp Val Ile Thr
 65 70 75 80
 Leu Val Gly Gly Leu Asn Asp Thr Leu Arg Pro Lys Cys Asp Met Ala
 85 90 95
 Arg Val Arg Asp Leu Leu Thr Gln Ala Val Glu Arg Leu Ala Pro His
 100 105 110
 Cys Glu Gln Leu Val Leu Met Arg Ser Pro Gly Arg Gln Gly Pro Val
 115 120 125
 Leu Glu Arg Phe Arg Pro Arg Met Glu Ala Leu Phe Ala Val Ile Asp
 130 135 140
 Asp Leu Ala Gly Arg His Gly Ala Val Val Val Asp Leu Tyr Gly Ala
 145 150 155 160
 Gln Ser Leu Ala Asp Pro Arg Met Trp Asp Val Asp Arg Leu His Leu
 165 170 175
 Thr Ala Glu Gly His Arg Arg Val Ala Glu Ala Val Trp Gln Ser Leu
 180 185 190
 Gly His Glu Pro Glu Asp Pro Glu Trp His Ala Pro Ile Pro Ala Thr
 195 200 205
 Pro Pro Pro Gly Trp Val Thr Arg Arg Thr Ala Asp Val Arg Phe Ala
 210 215 220
 Arg Gln His Leu Leu Pro Trp Ile Gly Arg Arg Leu Thr Gly Arg Ser
 225 230 235 240
 Ser Gly Asp Gly Leu Pro Ala Lys Arg Pro Asp Leu Leu Pro Tyr Glu
 245 250 255
 Asp Pro Ala Arg
 260

<210> 11
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicolor
 <400> 11

014985

Met Thr Arg Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Ala Pro Pro Thr Lys His
 1 5 10 15

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

Ala Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Ala Asp Asp Gly Ser Arg Asp His Ala
 35 40 45

Leu Gln Ala Gly Gly Arg Leu Pro Arg Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ser
 50 55 60

Thr Gly Ala Trp Val Gly Ala Trp Ala Thr Ala Pro Ala Ala Ala Glu
 65 70 75 80

Pro Gly Thr Glu Thr Thr Gly Leu Ala Gly Arg Ser Val Arg Asn Val
 85 90 95

Val His Thr Ser Val Gly Gly Thr Gly Ala Arg Ile Thr Leu Ser Asn
 100 105 110

Leu Tyr Gly Gln Ser Pro Leu Thr Val Thr His Ala Ser Ile Ala Leu
 115 120 125

Ala Ala Gly Pro Asp Thr Ala Ala Ala Ile Ala Asp Thr Met Arg Arg
 130 135 140

Leu Thr Phe Gly Gly Ser Ala Arg Val Ile Ile Pro Ala Gly Gly Gln
 145 150 155 160

Val Met Ser Asp Thr Ala Arg Leu Ala Ile Pro Tyr Gly Ala Asn Val
 165 170 175

Leu Val Thr Thr Tyr Ser Pro Ile Pro Ser Gly Pro Val Thr Tyr His
 180 185 190

Pro Gln Ala Arg Gln Thr Ser Tyr Leu Ala Asp Gly Asp Arg Thr Ala
 195 200 205

Asp Val Thr Ala Val Ala Tyr Thr Thr Pro Thr Pro Tyr Trp Arg Tyr
 210 215 220

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

Ala Phe Gly Asp Ser Ile Thr Asp Gly Ala Arg Ser Gln Ser Asp Ala
 245 250 255

Asn His Arg Trp Thr Asp Val Leu Ala Ala Arg Leu His Glu Ala Ala
 260 265 270

014985

Gly Asp Gly Arg Asp Thr Pro Arg Tyr Ser Val Val Asn Glu Gly Ile
 275 280 285

Ser Gly Asn Arg Leu Leu Thr Ser Arg Pro Gly Arg Pro Ala Asp Asn
 290 295 300

Pro Ser Gly Leu Ser Arg Phe Gln Arg Asp Val Leu Glu Arg Thr Asn
 305 310 315 320

Val Lys Ala Val Val Val Val Leu Gly Val Asn Asp Val Leu Asn Ser
 325 330 335

Pro Glu Leu Ala Asp Arg Asp Ala Ile Leu Thr Gly Leu Arg Thr Leu
 340 345 350

Val Asp Arg Ala His Ala Arg Gly Leu Arg Val Val Gly Ala Thr Ile
 355 360 365

Thr Pro Phe Gly Gly Tyr Gly Gly Tyr Thr Glu Ala Arg Glu Thr Met
 370 375 380

Arg Gln Glu Val Asn Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Val Phe Asp Thr
 385 390 395 400

Val Val Asp Phe Asp Lys Ala Leu Arg Asp Pro Tyr Asp Pro Arg Arg
 405 410 415

Met Arg Ser Asp Tyr Asp Ser Gly Asp His Leu His Pro Gly Asp Lys
 420 425 430

Gly Tyr Ala Arg Met Gly Ala Val Ile Asp Leu Ala Ala Leu Lys Gly
 435 440 445

Ala Ala Pro Val Lys Ala
 450

<210> 12
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 12

Met Thr Ser Met Ser Arg Ala Arg Val Ala Arg Arg Ile Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Tyr Gly Gly Gly Gly Ile Gly Leu Ala Gly Ala Ala Ala Val
 20 25 30

Gly Leu Val Val Ala Glu Val Gln Leu Ala Arg Arg Arg Val Gly Val
 35 40 45

Gly Thr Pro Thr Arg Val Pro Asn Ala Gln Gly Leu Tyr Gly Gly Thr

014985

Asp Ser Leu Asp Ser Ala Ala Thr Leu Arg Arg Asn Thr Val Arg Asp
225 230 235 240

Arg Val Ala Asp Tyr Asn Glu Val Leu Arg Glu Val Cys Ala Lys Asp
245 250 255

Arg Arg Cys Arg Ser Asp Asp Gly Ala Val His Glu Phe Arg Phe Gly
260 265 270

Thr Asp Gln Leu Ser His Trp Asp Trp Phe His Pro Ser Val Asp Gly
275 280 285

Gln Ala Arg Leu Ala Glu Ile Ala Tyr Arg Ala Val Thr Ala Lys Asn
290 295 300

Pro
305

<210> 14
<211> 268
<212> PRT
<213> Streptomyces rimosus

<400> 14

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

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

Ile Gln Ala Thr Asp Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
35 40 45

Val Gly Ala Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ser Gly Ser Cys Lys Arg Ser
50 55 60

Thr Lys Ser Tyr Pro Ala Leu Trp Ala Ala Ser His Thr Gly Thr Arg
65 70 75 80

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

Lys Gln Leu Thr Pro Val Asn Ser Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Thr
100 105 110

Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ala Asp Thr Met Thr Thr Cys Asn
115 120 125

Leu Gln Gly Glu Ser Ala Cys Leu Ala Arg Ile Ala Lys Ala Arg Ala
130 135 140

014985

Tyr Ile Gln Gln Thr Leu Pro Ala Gln Leu Asp Gln Val Tyr Asp Ala
145 150 155 160

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

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

Ser Arg Ala Ala Ile Asn Ala Ala Ala Asp Asp Ile Asn Ala Val Thr
195 200 205

Ala Lys Arg Ala Ala Asp His Gly Phe Ala Phe Gly Asp Val Asn Thr
210 215 220

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

Val Thr Leu Pro Val Glu Asn Ser Tyr His Pro Thr Ala Asn Gly Gln
245 250 255

Ser Lys Gly Tyr Leu Pro Val Leu Asn Ser Ala Thr
260 265

<210> 15

<211> 336

<212> PRT

<213> *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

<400> 15

Met Lys Lys Trp Phe Val Cys Leu Leu Gly Leu Ile Ala Leu Thr Val
1 5 10 15

Gln Ala Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly
20 25 30

Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr
35 40 45

Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro
50 55 60

Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala
65 70 75 80

Asn Glu Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser
85 90 95

Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr
100 105 110

014985

Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu
115 120 125

Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln
130 135 140

Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met
145 150 155 160

Val Leu Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu
165 170 175

Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser
180 185 190

His Val Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln
195 200 205

Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe
210 215 220

Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu
225 230 235 240

Asn Pro Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg
245 250 255

Ser Val Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg
260 265 270

Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro
275 280 285

Met Ala Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe
290 295 300

Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu
305 310 315 320

Arg Ala Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly
325 330 335

<210> 16
<211> 318
<212> PRT
<213> Aeromonas salmonicida

<400> 16

Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser
1 5 10 15

Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro

014985

20 25 30
 Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp
 35 40 45
 Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu
 50 55 60
 Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asp
 65 70 75 80
 Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe
 85 90 95
 Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val
 100 105 110
 Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala
 115 120 125
 Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu
 130 135 140
 Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln
 145 150 155 160
 Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val
 165 170 175
 Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala
 180 185 190
 Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu
 195 200 205
 Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro
 210 215 220
 Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala
 245 250 255
 Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala
 260 265 270
 Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp
 275 280 285
 Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala

014985

290 295 300

Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly
 305 310 315

<210> 17
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Candida parapsilosis

<400> 17

Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala
 1 5 10 15

Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro
 20 25 30

Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg
 35 40 45

Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln
 50 55 60

Asn Ala Trp Gln Leu Leu Val Arg Ser Glu Asp Thr Phe Gly Asn Pro
 65 70 75 80

Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp
 85 90 95

Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys
 100 105 110

Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr
 115 120 125

Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr
 130 135 140

Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val
 145 150 155 160

Gly Leu Gln Ser Gly Arg Ala Thr Leu Asn Ser Leu Arg Ala Thr Leu
 165 170 175

Lys Ser Gly Asn Leu Thr Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Thr Leu Leu
 180 185 190

Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ala Ile
 195 200 205

Gln Lys Glu Tyr Ala Pro Glu Leu Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ala Ala
 210 215 220

014985

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

<210> 18
 <211> 471

014985

<212> PRT

<213> Candida parapsilosis

<400> 18

Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala
 1 5 10 15
 Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro
 20 25 30
 Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg
 35 40 45
 Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln
 50 55 60
 Asn Ala Trp Gln Leu Leu Val Arg Ser Glu Asp Thr Phe Gly Asn Pro
 65 70 75 80
 Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp
 85 90 95
 Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys
 100 105 110
 Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr
 115 120 125
 Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr
 130 135 140
 Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Leu Gln Ser Gly Arg Ala Thr Leu Asn Ser Leu Arg Ala Thr Leu
 165 170 175
 Lys Ser Gly Asn Leu Thr Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Thr Leu Leu
 180 185 190
 Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ala Ile
 195 200 205
 Gln Lys Glu Tyr Ala Pro Glu Leu Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ala Ala
 210 215 220
 Leu Gly Gly Phe Val Thr Asn Ile Thr Ala Thr Ala Glu Ala Val Asp
 225 230 235 240
 Ser Gly Pro Phe Ala Gly Ile Ile Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly
 245 250 255

014985

Asn Glu Tyr Pro Asp Phe Lys Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Val Ser Pro
 260 265 270

Leu Leu Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Asn Thr His Cys Leu Leu Asp
 275 280 285

Gly Gly Ile Ala Tyr Phe Gly Lys Ser Phe Phe Ser Arg Ile Ile Arg
 290 295 300

Tyr Phe Pro Asp Gly Trp Asp Leu Val Asn Gln Glu Pro Ile Lys Thr
 305 310 315 320

Ile Leu Gln Asp Asn Gly Leu Val Tyr Gln Pro Lys Asp Leu Thr Pro
 325 330 335

Gln Ile Pro Leu Phe Ile Tyr His Gly Thr Leu Asp Ala Ile Val Pro
 340 345 350

Ile Val Asn Ser Arg Lys Thr Phe Gln Gln Trp Cys Asp Trp Gly Leu
 355 360 365

Lys Ser Gly Glu Tyr Asn Glu Asp Leu Thr Asn Gly His Ile Thr Glu
 370 375 380

Ser Ile Val Gly Ala Pro Ala Ala Leu Thr Trp Ile Ile Asn Arg Phe
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Pro Val Asp Gly Cys Gln His Asn Val Arg Ala Ser
 405 410 415

Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu
 420 425 430

Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys
 435 440 445

Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala
 450 455 460

Phe His His His His His His
 465 470

<210> 19
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 19

Met Ile Gly Ser Tyr Val Ala Val Gly Asp Ser Phe Thr Glu Gly Val
 1 5 10 15

014985

Gly Asp Pro Gly Pro Asp Gly Ala Phe Val Gly Trp Ala Asp Arg Leu
 20 25 30

Ala Val Leu Leu Ala Asp Arg Arg Pro Glu Gly Asp Phe Thr Tyr Thr
 35 40 45

Asn Leu Ala Val Arg Gly Arg Leu Leu Asp Gln Ile Val Ala Glu Gln
 50 55 60

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

Gly Gly Asn Asp Ile Ile Arg Pro Gly Thr Asp Pro Asp Glu Val Ala
 85 90 95

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

Val Leu Val Thr Thr Gly Phe Asp Thr Arg Gly Val Pro Val Leu Lys
 115 120 125

His Leu Arg Gly Lys Ile Ala Thr Tyr Asn Gly His Val Arg Ala Ile
 130 135 140

Ala Asp Arg Tyr Gly Cys Pro Val Leu Asp Leu Trp Ser Leu Arg Ser
 145 150 155 160

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

Glu Gly His Thr Arg Val Ala Leu Arg Ala Gly Gln Ala Leu Gly Leu
 180 185 190

Arg Val Pro Ala Asp Pro Asp Gln Pro Trp Pro Pro Leu Pro Pro Arg
 195 200 205

Gly Thr Leu Asp Val Arg Arg Asp Asp Val His Trp Ala Arg Glu Tyr
 210 215 220

Leu Val Pro Trp Ile Gly Arg Arg Leu Arg Gly Glu Ser Ser Gly Asp
 225 230 235 240

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

Ile Ala Ala Val Ala
 260

<210> 20

<400> 20
 000

<210> 21
 <400> 21
 000
 <210> 22
 <400> 22
 000
 <210> 23
 <400> 23
 000
 <210> 24
 <400> 24
 000
 <210> 25
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Aeromonas hydrophila
 <400> 25
 Met Phe Lys Phe Lys Lys Asn Phe Leu Val Gly Leu Ser Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Ile Ser Leu Phe Ser Ala Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ala Asp
 20 25 30
 Ser Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser
 35 40 45
 Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser
 50 55 60
 Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu
 65 70 75 80
 Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu
 85 90 95
 Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn Pro Lys
 100 105 110
 Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln
 115 120 125
 Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala
 130 135 140
 Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg
 145 150 155 160

014985

Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu Asn Gly
165 170 175

Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro
180 185 190

Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val Ser Ala
195 200 205

Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr
210 215 220

Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu
225 230 240

Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro Cys Tyr
245 250 255

Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val Ser Thr
260 265 270

Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala
275 280 285

Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala Arg Arg
290 295 300

Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val
305 310 315 320

His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala Ala Thr
325 330 335

Phe Ile Ala Asn Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His
340 345

<210> 26
<211> 267
<212> PRT
<213> Streptomyces sp.

<400> 26

Met Arg Leu Thr Arg Ser Leu Ser Ala Ala Ser Val Ile Val Phe Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Gln Ala Ala Gly Pro
20 25 30

Ala Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asn Gly Ala Gly
35 40 45

Ser Tyr Ile Asp Ser Ser Gly Asp Cys His Arg Ser Asn Asn Ala Tyr

014985

His Glu Thr Arg Pro Leu Arg Gly Arg Cys Gly Cys Gly Glu Arg Arg
 35 40 45
 Val Pro Pro Leu Thr Leu Pro Gly Asp Gly Val Leu Cys Thr Thr Ser
 50 55 60
 Ser Thr Arg Asp Ala Glu Thr Val Trp Arg Lys His Leu Gln Pro Arg
 65 70 75 80
 Pro Asp Gly Gly Phe Arg Pro His Leu Gly Val Gly Cys Leu Leu Ala
 85 90 95
 Gly Gln Gly Ser Pro Gly Val Leu Trp Cys Gly Arg Glu Gly Cys Arg
 100 105 110
 Phe Glu Val Cys Arg Arg Asp Thr Pro Gly Leu Ser Arg Thr Arg Asn
 115 120 125
 Gly Asp Ser Ser Pro Pro Phe Arg Ala Gly Trp Ser Leu Pro Pro Lys
 130 135 140
 Cys Gly Glu Ile Ser Gln Ser Ala Arg Lys Thr Pro Ala Val Pro Arg
 145 150 155 160
 Tyr Ser Leu Leu Arg Thr Asp Arg Pro Asp Gly Pro Arg Gly Arg Phe
 165 170 175
 Val Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly
 180 185 190
 Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val
 195 200 205
 Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln
 210 215 220
 Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu
 225 230 235 240
 Asp Gly Glu Phe Leu Leu Leu Ser Pro Val Gln Ala Ala Thr Trp Gly
 245 250 255
 Asn Tyr Tyr Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Ala Arg
 260 265 270
 Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala
 275 280 285
 Asn Ala Tyr Pro Glu Leu Val Ala Glu Ala Tyr Asp Phe Ala Gly His
 290 295 300

014985

Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr
 325 330 335
 Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr
 340 345 350
 Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala
 355 360 365
 Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu
 370 375 380
 Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp
 385 390 395 400
 Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro
 405 410 415
 Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn
 420 425 430 435
 Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val
 435 440 445
 His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe
 450 455 460
 Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu
 465 470 475 480
 Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr
 485 490 495
 Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val
 500 505 510
 Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu
 515 520 525
 Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala
 530 535 540
 Gly Glu Val Gly
 545

<210> 28
 <211> 372

<212> PRT

<213> Thermobifida sp.

<400> 28

Met Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly
 1 5 10 15
 Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val
 20 25 30
 Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln
 35 40 45
 Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu
 50 55 60
 Asp Gly Glu Phe Leu Leu Leu Ser Pro Val Gln Ala Ala Thr Trp Gly
 65 70 75 80
 Asn Tyr Tyr Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Ala Arg
 85 90 95
 Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala
 100 105 110
 Asn Ala Tyr Pro Glu Leu Val Ala Glu Ala Tyr Asp Phe Ala Gly His
 115 120 125
 Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp
 130 135 140
 Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr
 145 150 155 160
 Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr
 165 170 175
 Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala
 180 185 190
 Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu
 195 200 205
 Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp
 210 215 220
 Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro
 225 230 235 240
 Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn
 245 250 255

014985

Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val
 260 265 270

His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe
 275 280 285

Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu
 290 295 300

Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr
 305 310 315 320

Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val
 325 330 335

Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu
 340 345 350

Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala
 355 360 365

Gly Glu Val Gly
 370

<210> 29
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium efficiens
 <400> 29

Met Arg Thr Thr Val Ile Ala Ala Ser Ala Leu Leu Leu Leu Ala Gly
 1 5 10 15

Cys Ala Asp Gly Ala Arg Glu Glu Thr Ala Gly Ala Pro Pro Gly Glu
 20 25 30

Ser Ser Gly Gly Ile Arg Glu Glu Gly Ala Glu Ala Ser Thr Ser Ile
 35 40 45

Thr Asp Val Tyr Ile Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ala Ala Met Gly Gly
 50 55 60

Arg Asp Gln Pro Leu Arg Gly Glu Pro Phe Cys Leu Arg Ser Ser Gly
 65 70 75 80

Asn Tyr Pro Glu Leu Leu His Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Cys Gln
 85 90 95

Gly Ala Val Thr Gly Asp Leu Leu Glu Pro Arg Thr Leu Gly Glu Arg
 100 105 110

014985

Thr Leu Pro Ala Gln Val Asp Ala Leu Thr Glu Asp Thr Thr Leu Val
 115 120 125

Thr Leu Ser Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Gly Glu Val Ala Gly
 130 135 140

Cys Ile Arg Glu Arg Ile Ala Gly Glu Asn Ala Asp Asp Cys Val Asp
 145 150 155 160

Leu Leu Gly Glu Thr Ile Gly Glu Gln Leu Asp Gln Leu Pro Pro Gln
 165 170 175

Leu Asp Arg Val His Glu Ala Ile Arg Asp Arg Ala Gly Asp Ala Gln
 180 185 190

Val Val Val Thr Gly Tyr Leu Pro Leu Val Ser Ala Gly Asp Cys Pro
 195 200 205

Glu Leu Gly Asp Val Ser Glu Ala Asp Arg Arg Trp Ala Val Glu Leu
 210 215 220

Thr Gly Gln Ile Asn Glu Thr Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg His Asp
 225 230 235 240

Ala Leu Phe Val Leu Pro Asp Asp Ala Asp Glu His Thr Ser Cys Ala
 245 250 255

Pro Pro Gln Gln Arg Trp Ala Asp Ile Gln Gly Gln Gln Thr Asp Ala
 260 265 270

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

Val Arg Asp Ala Leu Gly Leu Glu Pro Val Gln Pro
 290 295 300

<210> 30
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Novosphingobium aromaticivorans

<400> 30

Met Gly Gln Val Lys Leu Phe Ala Arg Arg Cys Ala Pro Val Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Gly Leu Ala Pro Ala Ala Thr Val Ala Arg Glu Ala Pro
 20 25 30

Leu Ala Glu Gly Ala Arg Tyr Val Ala Leu Gly Ser Ser Phe Ala Ala
 35 40 45

Gly Pro Gly Val Gly Pro Asn Ala Pro Gly Ser Pro Glu Arg Cys Gly

014985

Ala Gly Ala Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ala Gln Pro
20 25 30
Ala Ala Ala Asp Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
35 40 45
Val Gly Ala Gly Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser
50 55 60
Thr Lys Ala His Pro Tyr Leu Trp Ala Ala Ala His Ser Pro Ser Thr
65 70 75 80
Phe Asp Phe Thr Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ser
85 90 95
Gly Gln Leu Gly Pro Leu Ser Ser Gly Thr Gly Leu Val Ser Ile Ser
100 105 110
Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ala Asp Thr Met Thr Thr Cys Val
115 120 125
Leu Gln Ser Glu Ser Ser Cys Leu Ser Arg Ile Ala Thr Ala Glu Ala
130 135 140
Tyr Val Asp Ser Thr Leu Pro Gly Lys Leu Asp Gly Val Tyr Ser Ala
145 150 155 160
Ile Ser Asp Lys Ala Pro Asn Ala His Val Val Val Ile Gly Tyr Pro
165 170 175
Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Thr Thr Cys Ile Gly Leu Ser Glu Thr Lys
180 185 190
Arg Thr Ala Ile Asn Lys Ala Ser Asp His Leu Asn Thr Val Leu Ala
195 200 205
Gln Arg Ala Ala Ala His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Arg Thr Thr
210 215 220
Phe Thr Gly His Glu Leu Cys Ser Gly Ser Pro Trp Leu His Ser Val
225 230 235 240
Asn Trp Leu Asn Ile Gly Glu Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly Gln
245 250 255
Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Leu Asn Gly Ala Ala
260 265

<210> 32
<211> 269

014985

<212> PRT

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 32

Met Arg Arg Ser Arg Ile Thr Ala Tyr Val Thr Ser Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ser Pro Ala
 20 25 30
 Ala Ala Ala Thr Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
 35 40 45
 Val Gly Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser
 50 55 60
 Ser Lys Ala Tyr Pro Tyr Leu Trp Gln Ala Ala His Ser Pro Ser Ser
 65 70 75 80
 Phe Ser Phe Met Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ala
 85 90 95
 Asn Gln Leu Gly Thr Leu Asn Ser Ser Thr Gly Leu Val Ser Leu Thr
 100 105 110
 Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ser Asp Val Met Thr Thr Cys Val
 115 120 125
 Leu Gln Ser Asp Ser Ala Cys Leu Ser Arg Ile Asn Thr Ala Lys Ala
 130 135 140
 Tyr Val Asp Ser Thr Leu Pro Gly Gln Leu Asp Ser Val Tyr Thr Ala
 145 150 155 160
 Ile Ser Thr Lys Ala Pro Ser Ala His Val Ala Val Leu Gly Tyr Pro
 165 170 175
 Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Gly Ser Cys Leu Ala Gly Leu Ser Glu Thr
 180 185 190
 Lys Arg Ser Ala Ile Asn Asp Ala Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Ala Ile
 195 200 205
 Ala Lys Arg Ala Ala Asp His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Lys Ser
 210 215 220
 Thr Phe Thr Gly His Glu Ile Cys Ser Ser Ser Thr Trp Leu His Ser
 225 230 235 240
 Leu Asp Leu Leu Asn Ile Gly Gln Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly
 245 250 255

014985

Gln Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Met Asn Ser Val Ala
 260 265

<210> 33
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp.

<400> 33

Met Arg Leu Thr Arg Ser Leu Ser Ala Ala Ser Val Ile Val Phe Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Gln Ala Ala Gly Pro
 20 25 30
 Ala Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asn Gly Ala Gly
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Asp Ser Ser Gly Asp Cys His Arg Ser Asn Asn Ala Tyr
 50 55 60
 Pro Ala Arg Trp Ala Ala Ala Asn Ala Pro Ser Ser Phe Thr Phe Ala
 65 70 75 80
 Ala Cys Ser Gly Ala Val Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Gln Leu Gly
 85 90 95
 Ala Leu Asn Ala Ser Thr Gly Leu Val Ser Ile Thr Ile Gly Gly Asn
 100 105 110
 Asp Ala Gly Phe Ala Asp Ala Met Thr Thr Cys Val Thr Ser Ser Asp
 115 120 125
 Ser Thr Cys Leu Asn Arg Leu Ala Thr Ala Thr Asn Tyr Ile Asn Thr
 130 135 140
 Thr Leu Leu Ala Arg Leu Asp Ala Val Tyr Ser Gln Ile Lys Ala Arg
 145 150 155 160
 Ala Pro Asn Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Met Tyr Leu
 165 170 175
 Ala Ser Asn Pro Trp Tyr Cys Leu Gly Leu Ser Asn Thr Lys Arg Ala
 180 185 190
 Ala Ile Asn Thr Thr Ala Asp Thr Leu Asn Ser Val Ile Ser Ser Arg
 195 200 205
 Ala Thr Ala His Gly Phe Arg Phe Gly Asp Val Arg Pro Thr Phe Asn
 210 215 220

014985

Asn His Glu Leu Phe Phe Gly Asn Asp Trp Leu His Ser Leu Thr Leu
 225 230 235 240

Pro Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Thr Ser Thr Gly His Gln Ser Gly
 245 250 255

Tyr Leu Pro Val Leu Asn Ala Asn Ser Ser Thr
 260 265

<210> 34
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Aeromonas hydrophila
 <400> 34

Ala Asp Ser Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser
 1 5 10 15

Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro
 20 25 30

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp
 35 40 45

Leu Glu Gln Leu Thr Asn Glu Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu
 50 55 60

Ala Glu Gly Gly Pro Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn
 65 70 75 80

Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe
 85 90 95

Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val
 100 105 110

Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala
 115 120 125

Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu
 130 135 140

Asn Gly Ala Lys Glu Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln
 145 150 155 160

Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Ala Ser His Val
 165 170 175

Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala
 180 185 190

Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu

014985

Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu
 130 135 140
 Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln
 145 150 155 160
 Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val
 165 170 175
 Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala
 180 185 190
 Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu
 195 200 205
 Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro
 210 215 220
 Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala
 245 250 255
 Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala
 260 265 270
 Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp
 275 280 285
 Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala
 290 295 300
 Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly
 305 310 315

<210> 36
 <211> 1371
 <212> DNA
 <213> Streptomyces thermosacchari
 <400> 36
 acaggccgat gcacggaacc gtacctttcc gcagtgaagc gctctccccc catcgttcgc 60
 cgggacttca tccgcgattt tggcatgaac acttccttca acgcgcgtag cttgctacaa 120
 gtgcggcagc agaccgcctc gttggaggct cagtgagatt gaccgatcc ctgtcggccg 180
 catccgtcat cgtcttcgcc ctgctgctcg cgctgctggg catcagcccg gcccaggcag 240
 ccggcccggc ctatgtggcc ctgggggatt cctattcctc gggcaacggc gccggaagtt 300
 acatcgattc gagcggtgac tgtcaccgca gcaacaacgc gtaccccgcc cgctggggcg 360

cggccaacgc accgtcctcc ttcaccttcg cggcctgctc gggagcgggtg accacggatg 420
 tgatcaacaa tcagctgggc gccctcaacg cgtccaccgg cctggtgagc atcaccatcg 480
 gcggcaatga cgcgggcttc gcggacgca tgaccacctg cgtcaccagc tcggacagca 540
 cctgcctcaa ccggttgcc accgccacca actacatcaa caccacctg ctcgccggc 600
 tcgacgcggt ctacagccag atcaaggccc gtgccccaa cggccgctg gtcgtcctcg 660
 gctaccgcg catgtacctg gcctcgaacc cctggtactg cctgggctg agcaacacca 720
 agcgcgggc catcaacacc accgccgaca cctcaactc ggtgatctcc tcccgggcca 780
 ccgccacgg attccgattc ggcgatgtcc gcccgacctt caacaaccac gaactgttct 840
 tcggcaacga ctggctgcac tcaactcacc tgccggtggt ggagtcgtac caccaccca 900
 gcacgggcca tcagagcggc tatctgccgg tcctcaacgc caacagctcg acctgatcaa 960
 cgcacggccg tgcccgcgcc gcgctcacg ctcggcgcg gcgccgcagc gcggtgatca 1020
 gccacagtg ccggtgacgg tcccaccgtc acggtcgagg gtgtacgtca cggtgccg 1080
 gctccagaag tggaacgtca gcaggacctg ggagccgtcc ctgacctcg cgaagaactc 1140
 cggggtcagc gtgatcacc ctccccgta gccggggcg aaggcggcg cgaactcctt 1200
 gtaggacgtc cagtcgtgcg gccggcggt gccaccgtcc gcgtagaccg cttccatggt 1260
 cgccagccgg tccccggga actcgggtgg gatgtccgtg cccaaggtgg tcccgggtgt 1320
 gtccgagagc accgggggct cgtaccggat gatgtgcaga tccaagaat t 1371

<210> 37

<211> 267

<212> PRT

<213> Streptomyces thermosacchari

<400> 37

Met Arg Leu Thr Arg Ser Leu Ser Ala Ala Ser Val Ile Val Phe Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Gln Ala Ala Gly Pro
20 25 30

Ala Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asn Gly Ala Gly
35 40 45

Ser Tyr Ile Asp Ser Ser Gly Asp Cys His Arg Ser Asn Asn Ala Tyr
50 55 60

Pro Ala Arg Trp Ala Ala Ala Asn Ala Pro Ser Ser Phe Thr Phe Ala
65 70 75 80

Ala Cys Ser Gly Ala Val Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Gln Leu Gly
85 90 95

Ala Leu Asn Ala Ser Thr Gly Leu Val Ser Ile Thr Ile Gly Gly Asn
100 105 110

014985

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

Ser Thr Cys Leu Asn Arg Leu Ala Thr Ala Thr Asn Tyr Ile Asn Thr
 130 135 140

Thr Leu Leu Ala Arg Leu Asp Ala Val Tyr Ser Gln Ile Lys Ala Arg
 145 150 155 160

Ala Pro Asn Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Met Tyr Leu
 165 170 175

Ala Ser Asn Pro Trp Tyr Cys Leu Gly Leu Ser Asn Thr Lys Arg Ala
 180 185 190

Ala Ile Asn Thr Thr Ala Asp Thr Leu Asn Ser Val Ile Ser Ser Arg
 195 200 205

Ala Thr Ala His Gly Phe Arg Phe Gly Asp Val Arg Pro Thr Phe Asn
 210 215 220

Asn His Glu Leu Phe Phe Gly Asn Asp Trp Leu His Ser Leu Thr Leu
 225 230 235 240

Pro Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Thr Ser Thr Gly His Gln Ser Gly
 245 250 255

Tyr Leu Pro Val Leu Asn Ala Asn Ser Ser Thr
 260 265

<210> 38
 <211> 548
 <212> PRT
 <213> Thermobifida fusca

<400> 38

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

Ala Leu Leu Val Gly Thr Pro Gln Asp Arg Arg Leu Arg Leu Glu Cys
 20 25 30

His Glu Thr Arg Pro Leu Arg Gly Arg Cys Gly Cys Gly Glu Arg Arg
 35 40 45

Val Pro Pro Leu Thr Leu Pro Gly Asp Gly Val Leu Cys Thr Thr Ser
 50 55 60

Ser Thr Arg Asp Ala Glu Thr Val Trp Arg Lys His Leu Gln Pro Arg
 65 70 75 80

014985

Pro Asp Gly Gly Phe Arg Pro His Leu Gly Val Gly Cys Leu Leu Ala
 85 90 95
 Gly Gln Gly Ser Pro Gly Val Leu Trp Cys Gly Arg Glu Gly Cys Arg
 100 105 110
 Phe Glu Val Cys Arg Arg Asp Thr Pro Gly Leu Ser Arg Thr Arg Asn
 115 120 125
 Gly Asp Ser Ser Pro Pro Phe Arg Ala Gly Trp Ser Leu Pro Pro Lys
 130 135 140
 Cys Gly Glu Ile Ser Gln Ser Ala Arg Lys Thr Pro Ala Val Pro Arg
 145 150 155 160
 Tyr Ser Leu Leu Arg Thr Asp Arg Pro Asp Gly Pro Arg Gly Arg Phe
 165 170 175
 Val Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly
 180 185 190
 Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val
 195 200 205
 Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln
 210 215 220
 Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu
 225 230 235 240
 Asp Gly Glu Phe Leu Leu Leu Ser Pro Val Gln Ala Ala Thr Trp Gly
 245 250 255
 Asn Tyr Tyr Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Ala Arg
 260 265 270
 Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala
 275 280 285
 Asn Ala Tyr Pro Glu Leu Val Ala Glu Ala Tyr Asp Phe Ala Gly His
 290 295 300
 Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr
 325 330 335
 Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr
 340 345 350

014985

Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala
 355 360 365

Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu
 370 375 380

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

Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro
 405 410 415

Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn
 420 425 430

Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val
 435 440 445

His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe
 450 455 460

Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu
 465 470 475 480

Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr
 485 490 495

Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val
 500 505 510

Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu
 515 520 525

Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala
 530 535 540

Gly Glu Val Gly
 545

<210> 39
 <211> 3000
 <212> DNA
 <213> Thermobifida fusca

<400> 39
 ggtggtgaac cagaacaccc ggtcgtcggc gtgggcgtcc aggtgcaggt gcaggttctt 60
 caactgctcc agcaggatgc cgccgtggcc gtgcacgatg gccttgggca ggctgtggt 120
 ccccgacgag tacagcacc atagcggatg gtcgaacggc agcggggtga actccagttc 180
 cgcgcttcg cccgcggtt cgaactccgc ccaggacagg gtgtcggcga cagggccgca 240
 gcccaggtag gccaggacga cgggtgtgctg caggctgggc atgccgtcgc gcagggcttt 300

gagcacgtca cggcggtcga agtccttacc gccgtagcgg tagccgtcca cggccagcag 360
cactttcggg tcgatctgcg cgaaccggtc gaggacgctg cgcaccccga agtcggggga 420
acaggacgac caggtcgcac cgatcgcggc gcaggcgagg aatgcggccg tcgctcggc 480
gatgttcggc aggtaggcca cgaccggtc gccggggccc accccgaggc tgcggagggc 540
cgcagcgatc gcggcggcgc gggcccgcag ttctcccag gtccactcgg tcaacggccg 600
gagttcggac gcgtgccgga tcgccacggc tgatgggtca cggtcgcgga agatgtgctc 660
ggcgtagtgt aggggtggcgc cggggaacca gacggcgcgc ggcattggcgt cggaggcgag 720
cactgtgggtg tacgggggtg cggcgcgcac ccggtagtac tcccagatcg cggaccagaa 780
tccttcgagg tcggttaccg accagcgcca cagtgcctcg tagtccgggtg cgtccacacc 840
gcggtgctcc cgcaccacgc ggggtgaacgc ggtgaggtg gcgcgttctt tgcgtcctc 900
gtcgggactc cacaggatcg gcggctgcgg cttgagtgtc atgaaacgcg accccttcgt 960
ggacgggtcg gatgcgggta gcgtcgggtg cctcccctaa cgctcccggg tgacggagtg 1020
ttgtgcacca catctagcac gcgggacgcg gaaaccgtat ggagaaaaca cctacaacc 1080
cggccggacg gtgggtttcg gccacactta ggggtcgggt gcctgcttgc cgggcagggc 1140
agtcccgggg tgctgtgggt cgggcgggag ggctgctcgt tcgagggtgt ccggcgggac 1200
actccgggcc tcagccgtac ccgcaacggg gacagttctc ctcccctccg ggctggatgg 1260
tcccttcccc cgaaatgcgg cgagatctcc cagtccagccc ggaaaacacc cgctgtgccc 1320
aggtactctt tgcttcgaac agacaggccg gacggtccac gggggagggt tgtgggcagc 1380
ggaccacgtg cggcgaccag acgacggttgc ttctcggta tccccgctct tgtacttggtg 1440
acagcgtca cgctggtctt ggctgtcccg acggggcgcg agacgctgtg gcgcatgtg 1500
tgtgaggcca cccaggactg gtgcctgggg gtgccggctc actcccggg acagcctgcg 1560
gaggacggcg agtttctgct gctttctccg gtccaggcag cgacctgggg gaactattac 1620
gcgctcgggg attcgtactc ttcgggggac ggggcccgcg actactatcc cggcaccgcg 1680
gtgaagggcg gttgctggcg gtccgctaac gcctatccgg agctggctgc cgaagcctac 1740
gacttcgccc gacactgtgc gttcctggcc tgcagcggcc agcgcggcta cgccatgctt 1800
gacgctatcg acgaggtcgg ctgcagctg gactggaact cccctcacac gtcgctgggtg 1860
acgatcggga tcggcggcaa cgatctgggg ttctccacgg ttttgaagac ctgcatggtg 1920
cgggtgccgc tgctggacag caaggcgtgc acggaccagg aggacgctat ccgcaagcgg 1980
atggcgaaat tcgagacgac gtttgaagag ctcacagcg aagtgcgcac ccgcgcgccg 2040
gacgcccgga tccttctcgt gggctacccc cggatttttc cggaggaacc gaccggcgc 2100
tactacacgc tgaccgcgag caaccagcgg tggctcaacg aaaccattca ggagttcaac 2160
cagcagctcg ccgaggctgt cgcggtccac gacgaggaga ttgccgcgtc gggcgggggtg 2220
ggcagcgtgg agttcgtgga cgtctaccac gcggtggacg gccacgagat cggctcggac 2280
gagccgtggg tgaacggggg gcagttgcgg gacctcgcca ccgggggtgac tgtggaccgc 2340

014985

agtaccttcc accccaacgc cgctgggcac cgggcggtcg gtgagcgggt catcgagcag 2400
 atcgaaacgc gcccgggccg tccgctctat gccactttcg cggtggtggc gggggcgacc 2460
 gtggacactc tcgcgggcga ggtggggtga cccggcttac cgtccggccc gcaggtctgc 2520
 gagcactgcg gcgatctggt ccaactgccca gtgcagttcg tcttcggtga tgaccagcgg 2580
 cggggagagc cggatcgttg agccgtgctg gtccttgacg agcacacccc gctgcaggag 2640
 ccgttcgcac agttctcttc cggtgggccag agtcgggtcg acgtcgatcc cagcccacag 2700
 gccgatgctg cgggccgcga ccacgccgtt gccgaccagt tggtcgaggc gggcgcgcag 2760
 cacgggggagc agggcgcgga catggtccag gtaagggccg tcgcgggacga ggctcaccac 2820
 ggcagtgccg accgcgcagg cgagggcggt gccgccgaag gtgctgccgt gctggccggg 2880
 gcggatcacg tcgaagactt ccgcgtcgcc taccgccgcc gccacgggca ggatgccgcc 2940
 gccacagcgt ttgccgaaca ggtagatata ggcgtcgact ccgctgtggt cgcaggcccc 3000

<210> 40
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Thermobifida fusca

<400> 40

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

014985

Cys Ala Asp Gly Ala Arg Glu Glu Thr Ala Gly Ala Pro Pro Gly Glu
 20 25 30
 Ser Ser Gly Gly Ile Arg Glu Glu Gly Ala Glu Ala Ser Thr Ser Ile
 35 40 45
 Thr Asp Val Tyr Ile Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ala Ala Met Gly Gly
 50 55 60
 Arg Asp Gln Pro Leu Arg Gly Glu Pro Phe Cys Leu Arg Ser Ser Gly
 65 70 75 80
 Asn Tyr Pro Glu Leu Leu His Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Cys Gln
 85 90 95
 Gly Ala Val Thr Gly Asp Leu Leu Glu Pro Arg Thr Leu Gly Glu Arg
 100 105 110
 Thr Leu Pro Ala Gln Val Asp Ala Leu Thr Glu Asp Thr Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Leu Ser Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Gly Glu Val Ala Gly
 130 135 140
 Cys Ile Arg Glu Arg Ile Ala Gly Glu Asn Ala Asp Asp Cys Val Asp
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Glu Thr Ile Gly Glu Gln Leu Asp Gln Leu Pro Pro Gln
 165 170 175
 Leu Asp Arg Val His Glu Ala Ile Arg Asp Arg Ala Gly Asp Ala Gln
 180 185 190
 Val Val Val Thr Gly Tyr Leu Pro Leu Val Ser Ala Gly Asp Cys Pro
 195 200 205
 Glu Leu Gly Asp Val Ser Glu Ala Asp Arg Arg Trp Ala Val Glu Leu
 210 215 220
 Thr Gly Gln Ile Asn Glu Thr Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg His Asp
 225 230 235 240
 Ala Leu Phe Val Leu Pro Asp Asp Ala Asp Glu His Thr Ser Cys Ala
 245 250 255
 Pro Pro Gln Gln Arg Trp Ala Asp Ile Gln Gly Gln Gln Thr Asp Ala
 260 265 270
 Tyr Pro Leu His Pro Thr Ser Ala Gly His Glu Ala Met Ala Ala Ala
 275 280 285

014985

Val Arg Asp Ala Leu Gly Leu Glu Pro Val Gln Pro
 290 295 300

<210> 42
 <211> 3000
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium efficiens*

<400> 42
 ttctggggtg ttatggggtt gttatcggct cgtcctgggt ggatcccgcc aggtgggta 60
 ttcacggggg acttttgtgt ccaacagccg agaatgagtg ccctgagcgg tgggaatgag 120
 gtgggcgggg ctgtgtcgc atgagggggc ggcgggctct gtggtgcccc gcgacccccg 180
 gccccggtga gcggtgaatg aaatccggct gtaatcagca tcccgtagcc accccgtagc 240
 ggaggtcagc gcccgagtg tctacgagc cggatcctct cggactcggc catgtgtcgc 300
 gcagcatcgc gctcccgggt cttggcgctc ctcggctgtt ctgctgctg tccctggaag 360
 gcgaaatgat caccggggag tgatacaccg gtggtctcat cccggatgcc cacttcggcg 420
 ccatccggca attcgggcag ctccgggtg aagtaggtg catccgatgc gtcggtgacg 480
 ccatagtggg cgaagatctc atcctgctc aggggtctca ggccactctc cggatcgata 540
 tcgggggct ccttgatggc gtccttgctg aaaccgaggt gcagcttggt ggcttccaat 600
 ttcgcaccac ggagcgggac gaggctggaa tgacggccga agagcccgtg gtggacctca 660
 acgaagggtg gtagtcccgt gtcattcatt aggaacacgc cctccaccgc acccagcttg 720
 tggccggagt tgtcgtaggc gctggcatcc agaagggaaa cgatctcata tttgtcggtg 780
 tgctcagaca tgatcttctt ttgctgtcgg tgtctggtac taccacgta gggctgaatg 840
 caactgttat ttttctgta ttttaggaat tgggtccatat cccacaggct ggctgtggtc 900
 aaatcgtcat caagtaatcc ctgtcacaca aaatgggtg tgggagccct ggtcgcggtt 960
 ccgtggggag cgccgtgccc cgcaggatcg tcggcatcgg cggatctggc cggtagcccc 1020
 cggtgaaata aatcattctg taaccttcat cacggttgg tttaggtatc ccccccttc 1080
 gtcttgacct cgtccccggc gcgcgggagc ccgcggttg cggtagacag gggagacgtg 1140
 gacacatga ggacaacggt catcgcagca agcgcattac tccttctcgc cggatgcgcg 1200
 gatggggccc gggaggagac cgcgggtgca ccgcccgggt agtccctcgg gggcatccg 1260
 gaggaggggg cggaggcgtc gacaagcatc accgacgtct acatcgcctt cggggattcc 1320
 tatgcggcga tgggcgggag ggatcagccg ttacgggggt agccgttctg cctgcgctcg 1380
 tccggtatt acccgaact cctccacgca gaggtcaccg atctcacctg ccagggggcg 1440
 gtgaccgggg atctgctcga acccaggacg ctgggggagc gcacgctgcc ggcgaggtg 1500
 gatgcgctga cggaggacac caccctggtc accctctca tcgggggcaa tgacctcga 1560
 ttcggggag tggcgggatg catccgggaa cggatcgcgg gggagaacgc tgatgattgc 1620
 ttggacctgc tgggggaaac catcggggag cagctcgatc agcttcccc gcagctggac 1680

014985

cgctgacag aggctatccg ggaccgcgcc ggggacgcgc aggttgtggt caccggttac 1740
 ctgccgctcg tgtctgccgg ggactgcccc gaactggggg atgtctccga ggcggatcgt 1800
 cgttgggagg ttgagctgac cgggcagatc aacgagaccg tgcgcgaggc ggccgaacga 1860
 cagcatgccc tctttgtcct gcccgcagat gccgatgagc acaccagtgtg tgcaccccca 1920
 cagcagcgct gggcggatat ccagggccaa cagaccgatg cctatccgct gcacccgacc 1980
 tccgccggcc atgaggcgat ggccgcgcc gtccgggacg cgctgggcct ggaaccggtc 2040
 cagccgtagc gccgggagcg cgcttgtcga cgaccaacc atgccaggct gcagtcacat 2100
 ccgcacatag cgcgcgcggg cgatggagta cgcaccatag aggatgagcc cgatgccgac 2160
 gatgatgagc agcacactgc cgaagggttg ttccccgagg gtgcgcagag ccgagtccag 2220
 acctgcccgc tgctccgat catgggcccc accggcgatg acgatcaaca cccccaggat 2280
 cccgaaggcg ataccacggg cgacataacc ggctgttccg gtgatgatga tcgcggtccc 2340
 gacctgccct gaccccgcac ccgcctccag atcctcccgg aaatcccggg tggccccctt 2400
 ccagagggtg tagacaccg cccccagtac caccagcccg gcgaccacaa ccagcaccac 2460
 accccagggt tgggatagga cgggtgagggt gacatcgggtg gcggtctccc catcggagggt 2520
 gctgccgcc cgggcgaagg tggagggtgt caccgccagg gagaagtaga ccatggccat 2580
 gaccgcccc ttggcccttt ccttgaggtc ctcgccgcc agcagctggc tcaattgcca 2640
 gagtcccagg gccgccagg cgatgacggc aaccacaggg aggaactgcc caccgggagc 2700
 ctccgcgatg gtggccaggg cacctgaatt cgaggcctca tcaccgaac cgccggatcc 2760
 agtggcgatg cgcaccgcga tccaccgat gaggatgtgc agtatgcca ggacaatgaa 2820
 accacctctg gccagggtgg tcagcgcggg gtggtcctcg gcctggtcgg cagcccgttc 2880
 gatcgctcgt ttcgaggatc tgggtgcgcc cttatccata gctcccattg aaccgccttg 2940
 aggggtgggc ggccactgtc agggcggatt gtgatctgaa ctgtgatgtt ccatcaacc 3000

<210> 43
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 43

Met Arg Arg Phe Arg Leu Val Gly Phe Leu Ser Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Ala Ala Asp Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
 35 40 45

Val Gly Ala Gly Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser
 50 55 60

014985

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

<210> 44
<211> 2000
<212> DNA
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 44
cccggcggcc cgtgcaggag cagcagccgg cccgcgatgt cctcgggctg cgtcttcac 60
aggccgtcca tcgcgtcggc gaccggcgcc gtgtagttgg cccggacctc gtcccaggtg 120
cccgcggcga tctggcgggt ggtgcggtgc gggccgcgcc gaggggagac gtaccagaag 180
cccacgtca cgttctccgg ctgcggttcg ggctcgtccg ccgctccgtc cgtcgcctcg 240
ccgagcacct tctcggcgag gtcggcgctg gtcgccgtca ccgtgacgtc ggcgccccgg 300

ctccagcgcg agatcagcag cgtccagccg tcgccctccg ccagcgtcgc gctgcggtcg 360
tcgtcgcggg cgatccgag cacgcgcgcg ccggggcgca gcagcgtggc gccggaccgt 420
acgcggtcga tgttcgccgc gtgcgagtac ggctgctcac ccgtggcgaa acggccgagg 480
aacagcgcgt cgacgacgtc ggacggggag tcgctgtcgt ccacgttgag ccggatcggc 540
agggcttcgt gcgggttcac ggacatgtcg ccatgatcgg gcacccggcc gccgcgtgca 600
cccgctttcc cgggcacgca cgacaggggc tttctcgccg tcttccgtcc gaacttgaac 660
gagtgtcagc catttcttg catggacact tccagtcaac gcgcgtagct gctaccacgg 720
ttgtggcagc aatcctgcta agggaggttc catgagacgt ttccgacttg tcggcttcct 780
gagttcgtc gtcctcgccg ccggcgccgc cctcaccggg gcagcgaccg cccaggcggc 840
ccaacccgcc gccgccgacg gctatgtggc cctcggcgac tcctactcct ccggggtcgg 900
agcgggcagc tacatcagct cgagcggcga ctgcaagcgc agcacgaagg cccatcccta 960
cctgtggggc gccgccact cgccctccac gttcgacttc accgcctgtt ccggcgcccg 1020
tacgggtgat gttctctccg gacagctcgg cccgctcagc tccggcaccg gcctcgtctc 1080
gatcagcadc gggggcaacg acgccggttt gcgccgacac atgacgacct gtgtgctcca 1140
gtccgagagc tcctgcctgt cgcggatcgc caccgccgag gcgtacgtcg actcgacgct 1200
gccccgcaag ctcgacggcg tctactcggc aatcagcgac aaggcgccga acgcccacgt 1260
cgtcgtcadc gggtaccgc gcttctacaa gctcggcacc acctgcatcg gcctgtccga 1320
gaccaagcgg acggcgatca acaaggcctc cgaccacctc aacaccgtcc tcgcccagcg 1380
cgcccgccg caccgcttca ccttcggcga cgtacgcacc accttcaccg gccacgagct 1440
gtgctccggc agccccctggc tgcacagcgt caactggctg aacatcggcg agtcgtacca 1500
ccccaccgcg gccggccagt ccgggtggcta cctgcccgtc ctcaaccggcg ccgcctgacc 1560
tcaggcggaagg gagaagaag aaggagcggg gggagacgag gagtgggagg ccccgcccga 1620
cggggctccc gtccccgtct ccgtctccgt cccggctccg caagtaccg agaacgccac 1680
cgcgtcggac gtggcccgca ccggactccg cacctccacg cgcacggcac tctcgaacgc 1740
gccgggtgctg tcgtgcgtcg tcaccaccac gccgtcctgg cgcgagcgt cgccgcccga 1800
cgggaaggac agcgtccgcc accccggatc ggagaccgac ccgtccgagg tcaccaccg 1860
gtagccgacc tccgcgggca gccgcccgac cgtgaacgtc gccgtgaacg cgggtgcccg 1920
gtcgtcggc ggccgacagg cccccgagta gtgggtgctc gagcccacca cggtcacctc 1980
caccgactgc gctgcggggc 2000

<210> 45
<211> 269
<212> PRT
<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 45

Met Arg Arg Ser Arg Ile Thr Ala Tyr Val Thr Ser Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

014985

Val Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ser Pro Ala
 20 25 30
 Ala Ala Ala Thr Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
 35 40 45
 Val Gly Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser
 50 55 60
 Ser Lys Ala Tyr Pro Tyr Leu Trp Gln Ala Ala His Ser Pro Ser Ser
 65 70 75 80
 Phe Ser Phe Met Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ala
 85 90 95
 Asn Gln Leu Gly Thr Leu Asn Ser Ser Thr Gly Leu Val Ser Leu Thr
 100 105 110
 Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ser Asp Val Met Thr Thr Cys Val
 115 120 125
 Leu Gln Ser Asp Ser Ala Cys Leu Ser Arg Ile Asn Thr Ala Lys Ala
 130 135 140
 Tyr Val Asp Ser Thr Leu Pro Gly Gln Leu Asp Ser Val Tyr Thr Ala
 145 150 155 160
 Ile Ser Thr Lys Ala Pro Ser Ala His Val Ala Val Leu Gly Tyr Pro
 165 170 175
 Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Gly Ser Cys Leu Ala Gly Leu Ser Glu Thr
 180 185 190
 Lys Arg Ser Ala Ile Asn Asp Ala Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Ala Ile
 195 200 205
 Ala Lys Arg Ala Ala Asp His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Lys Ser
 210 215 220
 Thr Phe Thr Gly His Glu Ile Cys Ser Ser Ser Thr Trp Leu His Ser
 225 230 235 240
 Leu Asp Leu Leu Asn Ile Gly Gln Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly
 245 250 255
 Gln Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Met Asn Ser Val Ala
 260 265

<210> 46
 <211> 1980

<212> DNA

<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 46

```

ccaccgccgg gtcggcggcg agtctcctgg cctcggtcgc ggagaggttg gccgtgtagc      60
cgttcagcgc ggcgccgaac gtcttcttca ccgtgccgcc gtactcgttg atcaggccct      120
tgcccttgct cgacgcggcc ttgaagccgg tgcccttctt gagcgtgacg atgtagctgc      180
ccttgatcgc ggtgggggag ccggcggcga gcaccgtgcc ctcggccggg gtggcctggg      240
cgggcagtgc ggtgaatccg cccacgaggg cgccggtcgc cacggcggtt atcgcggcga      300
tccggatctt cttgctacgc agctgtgcca tacgagggag tcctcctctg ggcagcggcg      360
cgcctgggtg gggcgcacgg ctgtgggggg tgcgcgcgtc atcacgcaca cggccctgga      420
gcgtcgtggt ccgccctggg ttgagtaaag cctcggccat ctacgggggt ggctcaaggg      480
agttgagacc ctgtcatgag tctgacatga gcacgcaatc aacggggccg tgagcacccc      540
ggggcgaccc cggaaagtgc cgagaagtct tggcatggac acttctctgc aacacgcgta      600
gctggtacga cggttacggc agagatcctg ctaaagggag gttccatgag acgttcccga      660
attacggcat acgtgacctc actcctcctc gccgtcggct gcgccctcac cggggcagcg      720
acggcgcagg cgtccccagc cgccgcggcc acgggctatg tggccctcgg cgactcgtac      780
tcgtccggtg tcggcgccgg cagctacctc agctccagcg gcgactgcaa gcgcagttcg      840
aaggcctatc cgtacctctg gcaggcccg cattcacctc cgtcgttcag tttcatggct      900
tgctcgggcg ctcgtacggg tgatgtcctg gccaatcagc tcggcacctc gaactcgtcc      960
accggcctgg tctccctcac catcggaggc aacgacgcgg gcttctccga cgtcatgacg     1020
acctgtgtgc tccagtccga cagcgcctgc ctctcccgca tcaacacggc gaaggcgtac     1080
gtcgactcca ccctgcccgg ccaactcgac agcgtgtaca cggcgatcag cacgaaggcc     1140
ccgtcggccc atgtggccgt gctgggctac ccccgcttct acaaactggg cggctcctgc     1200
ctcgcgggcc tctcgagac caagcggfcc gccatcaacg acgcggccga ctatctgaac     1260
agcgcctatc ccaagcgcgc cgccgaccac ggcttcacct tcggcgacgt caagagcacc     1320
ttcaccggcc atgagatctg ctccagcagc acctggctgc acagtctcga cctgctgaac     1380
atcggccagt cctaccaccc gaccgcggcc ggccagtccg gcggctatct gccggtcatg     1440
aacagcgtgg cctgagctcc cacggcctga atttttaagg cctgaathtt taaggcgaag     1500
gtgaaccgga agcggaggcc ccgtccgtcg gggctctccgt cgcacaggtc accgagaacg     1560
gcacggagtt ggacgtcgtg cgaccgggtg gcgcacctc gacggcgatc tcgttcgaga     1620
tcgttccgct cgtgtcgtac gtggtgacga acacctgctt ctgctgggtc tttccgccc     1680
tcgccgggaa ggacagcgtc ttccagcccg gatccgggac ctcgcccttc ttggtcacc     1740
agcggtactc cacctcgacc ggcacccggc ccaccgtgaa ggtcggcgtg aacgtgggcg     1800
cctgggcggt gggcggcggg caggcaccgg agtagtcggt gtgcacgccg gtgaccgtca     1860
ccttcacgga ctgggcccgg ggggtcgtcg taccgccgcc gccaccgccg cctcccggag     1920

```

tggagcccga gctgtggtcg cccccccgt cggcgttgtc gtccctcgggg gttttcgaac 1980

<210> 47
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Thermobifida fusca

<400> 47

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

Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val
 20 25 30

Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln
 35 40 45

Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu
 50 55 60

Asp Gly Glu Phe Leu Leu Leu Ser Pro Val Gln Ala Ala Thr Trp Gly
 65 70 75 80

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

Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala
 100 105 110

Asn Ala Tyr Pro Glu Leu Val Ala Glu Ala Tyr Asp Phe Ala Gly His
 115 120 125

Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp
 130 135 140

Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr
 145 150 155 160

Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr
 165 170 175

Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala
 180 185 190

Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu
 195 200 205

Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp
 210 215 220

Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro
 225 230 235 240

014985

Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn
 245 250 255
 Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val
 260 265 270
 His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe
 275 280 285
 Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu
 290 295 300
 Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr
 305 310 315 320
 Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val
 325 330 335
 Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu
 340 345 350
 Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala
 355 360 365
 Gly Glu Val Gly
 370

<210> 48
 <211> 968
 <212> DNA
 <213> Thermobifida fusca

<400> 48
 ctgcagacac ccgccccgcc ttctcccgga tcgtcatggt cggcgactcc ctacagcgaca 60
 ccggcaagat gtactccaag atgcgcggct acctgccgtc ctccccgccg tactacgagg 120
 gccgcttctc gaacggcccc gtctggctgg agcagctgac gaagcagttc cccggcctga 180
 cgatcgccaa cgaggccgag gggggcgcga ccgcagtcgc ctacaacaag atctcctgga 240
 acccgaagta ccaggtcatt aacaacctcg actacgaggt caccagttc ttgcagaagg 300
 actcgttcaa gcccgacgac ctggatcatc tgtgggtggg cgccaacgac tacctggcct 360
 acggttgaa cacggagcag gacgccaagc gggtgcgcga cgccatctcg gacgcgga 420
 accgcatggt cctgaacggc gcgaagcaga tctgtgctgt caacctgccc gacctgggcc 480
 agaaccgctc cgcccgtcc cagaaggctg tcgaggccgt ctgcacgtg tccgcctacc 540
 acaacaagct gctcctcaac ctgcccggc agctcgcccc gacgggcatg gtcaagctgt 600
 tcgagatcga caagcagttc gcggagatgc tgcgcgacct ccagaacttc ggctgagcg 660
 acgtggagaa cccgtgctac gacggcggct acgtgtggaa gccgttcgcc acccgggtccg 720

tctcgaccga ccggcagctg tcggccttct cgccccagga gcgcttgccg atcgctggca 780
 acccgctcct ggcacaggcg gtagcttcgc cgatggcccg ccgctcggcc tcgcccccta 840
 actgcgaggg caagatgttc tgggaccagg tccacccac caccgtggtc cacgcccgcc 900
 tctcggagcg cgccgccacc ttcacgaga cccagtagca gttcctcgcc cactagtcta 960
 gaggatcc 968

<210> 49

<211> 232

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> структурная модель полследовательности для гомологичного картирования

<400> 49

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

Gly Ser Gly Thr Asn Gly Trp Gly Glu Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ser
 20 25 30

Ala Thr Val Val Asn Asp Ala Val Ala Gly Arg Ser Ala Arg Ser Tyr
 35 40 45

Thr Arg Glu Gly Arg Phe Glu Asn Ile Ala Asp Val Val Thr Ala Gly
 50 55 60

Asp Tyr Val Ile Val Glu Phe Gly His Asn Asp Gly Gly Ser Leu Ser
 65 70 75 80

Thr Asp Asn Gly Arg Thr Asp Cys Ser Gly Thr Gly Ala Glu Val Cys
 85 90 95

Tyr Ser Val Tyr Asp Gly Val Asn Glu Thr Ile Leu Thr Phe Pro Ala
 100 105 110

Tyr Leu Glu Asn Ala Ala Lys Leu Phe Thr Ala Lys Gly Ala Lys Val
 115 120 125

Ile Leu Ser Ser Gln Thr Pro Asn Asn Pro Trp Glu Thr Gly Thr Phe
 130 135 140

Val Asn Ser Pro Thr Arg Phe Val Glu Tyr Ala Glu Leu Ala Ala Glu
 145 150 155 160

Val Ala Gly Val Glu Tyr Val Asp His Trp Ser Tyr Val Asp Ser Ile
 165 170 175

Tyr Glu Thr Leu Gly Asn Ala Thr Val Asn Ser Tyr Phe Pro Ile Asp
 180 185 190

His Thr His Thr Ser Pro Ala Gly Ala Glu Val Val Ala Glu Ala Phe
 195 200 205

Leu Lys Ala Val Val Cys Thr Gly Thr Ser Leu Lys Ser Val Leu Thr
 210 215 220

Thr Thr Ser Phe Glu Gly Thr Cys
 225 230

<210> 50

<211> 184

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> структурная модель для гомологичного картирования

<400> 50

Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg
 1 5 10 15

Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln
 20 25 30

Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Asp Thr Ser Gln
 35 40 45

Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg
 50 55 60

Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln
 65 70 75 80

Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys
 85 90 95

Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn
 100 105 110

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

Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val
 130 135 140

Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg
 145 150 155 160

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

Leu Val Asn His Asp Ser Leu Glu

180

<210> 51
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> консенсуя последовательность

<400> 51

Met Arg Arg Ser Arg Phe Leu Ala Ala Leu Ile Leu Leu Thr Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Ala Ala Ala Arg Ala Ala Pro Ala Ala Tyr Val Ala Leu
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Gly Ala Gly Ser Tyr Ser Ser Gly Asp
 35 40 45
 Cys Arg Ser Thr Lys Ala Tyr Pro Ala Leu Trp Ala Ala Ala His Ala
 50 55 60
 Ser Ser Phe Ser Phe Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Tyr Asp Val Leu
 65 70 75 80
 Ala Gln Leu Leu Asn Ser Thr Leu Val Ser Ile Thr Ile Gly Gly Asn
 85 90 95
 Asp Ala Gly Phe Ala Asp Met Thr Thr Cys Val Leu Ser Asp Ser Ala
 100 105 110
 Cys Leu Arg Ile Ala Ala Lys Tyr Ile Thr Leu Pro Ala Arg Leu Asp
 115 120 125
 Ser Val Tyr Ser Ala Ile Thr Arg Ala Pro Ala Arg Val Val Val Leu
 130 135 140
 Gly Tyr Pro Arg Ile Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Ser Thr Lys Arg Ala
 145 150 155 160
 Ala Ile Asn Asp Ala Ala Asp Leu Asn Ser Val Ile Ala Lys Arg Ala
 165 170 175
 Ala Asp His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Thr Phe Gly His Glu Leu
 180 185 190
 Cys Ser Ala Pro Trp Leu His Ser Leu Thr Leu Pro Val Ser Tyr His
 195 200 205
 Pro Thr Ala Gly His Ala Ala Gly Tyr Leu Pro Val Leu Asn Ser Ile
 210 215 220

Thr
225

<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> последовательность мотив

<220>
<221> сайт
<222> (4)..(4)
<223> Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, His, Gln, Thr, Asn, Met or Ser

<400> 52

Gly Asp Ser Хаа
1

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> последовательность мотив

<220>
<221> сайт
<222> (2)..(2)
<223> Ala or Gly.

<220>
<221> сайт
<222> (5)..(5)
<223> Tyr, Ala or Leu.

<400> 53

Gly Ala Asn Asp Tyr
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ферментативного рафинирования пищевых масел гидратацией, заключающийся в обработке пищевого масла липидацилтрансферазой для того, чтобы перенести ацильную группу с основной части фосфолипида на один или более акцепторов ацила, в котором акцептор ацила представляет собой один или более стеринов и/или станолов и в котором липидацилтрансфераза отличается следующим:

(а) липидацилтрансфераза обладает активностью ацилтрансферазы, которую определяют как активность переноса сложного эфира, причем ацильная часть исходной сложно-эфирной связи липидного донора ацила переносится на акцептор ацила с образованием нового сложного эфира; и

(б) фермент включает мотив последовательности аминокислот GDSX, в котором X представляет собой один или более из следующих остатков аминокислот: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, причем липидацилтрансфераза при сравнительном анализе первичной структуры либо с консенсусной последовательностью SEQ ID NO: 2, либо с SEQ ID NO: 37, либо с обеими указанными последовательностями включает блок GANDY.

2. Способ по п.1, в котором в масле повышается уровень сложного стеринового эфира или сложного станолового эфира.

3. Способ по п.2, в котором акцептор ацила представляет собой стерин.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором фосфолипид представляет собой лецитин.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором липидацилтрансфераза дополнительно переносит ацильную группу с липида по меньшей мере на один углевод, белок, субъединицу белка и глицерин.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором липидацилтрансфераза представляет собой природную липидацилтрансферазу.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором липидацилтрансфераза представляет модифицированный вариант природной липидацилтрансферазы.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная липидацилтрансфераза получена из организма, принадлежащего одному из следующих родов: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Candida*, *Thermobifida* и *Corynebacterium*.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная липидацилтрансфераза получена из одного или более организмов, выбранных из группы, включающей *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces thermosacchari*, *Streptomyces avermitilis*, *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Bacillus* sp, *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Candida parapsilosis*, *Thermobifida fusca* и *Corynebacterium efficiens*.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором X мотива GDSX представляет собой L.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором липидацилтрансфераза включает по меньшей мере одну из следующих последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50 или последовательность аминокислот, которая имеет с ними идентичность 75% или более.

12. Способ по п.11, в котором липидацилтрансфераза включает по меньшей мере одну последовательность из следующих последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15 либо последовательность аминокислот, которая имеет с ними идентичность 75% или более.

13. Способ по п.11, в котором липидацилтрансфераза включает по меньшей мере одну последовательность из следующих последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50 или последовательность аминокислот, которая имеет с ними идентичность 70% или более.

14. Способ по п.11, в котором липидацилтрансфераза включает по меньшей мере одну последовательность из SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18 либо последовательность аминокислот, гомологичную указанным на 70% или более.

15. Способ по п.11, в котором липидацилтрансфераза включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16 или последовательность аминокислот, гомологичную указанной на 75% или более.

16. Способ по п.11, в котором липидацилтрансфераза включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16.

17. Способ по п.7, в котором вариант фермента включает одну или более модификаций аминокислот сравнительно с исходной последовательностью по крайней мере в одном из остатков аминокислот Ser3; Phe13Ser; Asp15Asn, Leu17; Ser18x (где x выбирают из Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Try или Tyr), Lys22, Met23, Tyr30x (где x выбирают из Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Try); Gly40; Asn80; Pro81; Lys82, Asn87; Asn88; Trp111; Val112; Ala114; Asp116Asn или Glu; Tyr117; Leu118; Pro156; Asp157Asn; Gly159; Gln160; Asn161; Pro162; Ser163; Ala164; Arg165; Ser166; Gln167; Lys168; Val169; Val170; Gln171; Ala172; Tyr179; His180; Asn181; Gln182; Met209; Leu210; Arg211; Asn215; Tyr226x (где x выбирают из Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Try); Asp228Asn; Try230x (где x выбирают из Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Try); Lys284; Met285; Gln289; Val290; Glu309; Ser310 и 318.

18. Способ по п.7 или 17, в котором липидацилтрансфераза включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16 или последовательность аминокислот, гомологичную указанной на 75% или более.

19. Способ по п.7 или 17, в котором липидацилтрансфераза включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16.

20. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пищевое масло во время обработки включает менее чем 1% воды.

21. Способ по п.20, в котором масло включает менее чем 0,5% воды.

22. Способ по п.21, в котором масло включает менее чем 0,1% воды.

23. Способ по любому из предшествующих пунктов, который включает удаление лизофосфолипидов, образующихся под действием липидацилтрансферазы, посредством фильтрования.

24. Применение липидацилтрансферазы, отличающейся тем, что:

(а) липидацилтрансфераза обладает активностью ацилтрансферазы, которую определяют как активность переноса сложного эфира, причем ацильная часть исходной сложно-эфирной связи липидного донора ацила переносится на акцептор ацила с образованием нового сложного эфира; и

(б) фермент включает мотив последовательности аминокислот GDSX, в котором X представляет собой один или более из следующих остатков аминокислот: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, причем липидацилтрансфераза при сравнительном анализе первичной структуры либо с консенсусной последовательностью SEQ ID NO: 2, либо с SEQ ID NO: 37, либо с обеими указанными последовательностями включает блок GANDY, в рафинировании пищевых масел гидратацией для удаления фосфолипидов и повышения уровня образования сложных стериновых эфиров и/или сложных станоловых эфиров в масле.

25. Применение по п.24, при котором не происходит существенного повышения уровня свободных жирных кислот в масле после обработки.

26. Применение по п.24 или 25, в котором фосфолипид представляет собой лецитин.

27. Применение по любому из пп.24-26, в котором липидацилтрансфераза представляет собой природную липидацилтрансферазу.

28. Применение по любому из пп.24-27, в котором липидацилтрансфераза представляет модифицированный вариант природной липидацилтрансферазы.

29. Применение по любому из пп.24-28, в котором указанная липидацилтрансфераза получена из организма, принадлежащего к одному из следующих родов: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfotobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Candida*, *Thermobifida* и *Corynebacterium*.

30. Применение по любому из пп.24-29, в котором липидацилтрансфераза получена из одного или более организмов, выбранных из группы, включающей *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces thermosacchari*, *Streptomyces avermitilis*, *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Desulfotobacterium dehalogenans*, *Bacillus sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Candida parapsilosis*, *Thermobifida fusca* и *Corynebacterium efficiens*.

31. Применение по любому из пп.24-30, в котором X мотива GDSX представляет собой L.

32. Применение по любому из пп.24-31, в котором липидацилтрансфераза включает по меньшей мере одну из следующих последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41,

SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50 или последовательность аминокислот, которая имеет с ними идентичность 75% или более.

33. Применение по п.32, в котором липидацилтрансфераза включает по меньшей мере одну последовательность из следующих последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 14 либо последовательность аминокислот, которая имеет с ними идентичность 75% или более.

34. Применение по п.32, в котором липидацилтрансфераза включает по меньшей мере одну последовательность из следующих последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50 или последовательность аминокислот, которая имеет с ними идентичность 75% или более.

35. Применение по п.32, в котором липидацилтрансфераза включает по меньшей мере одну последовательность из SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18 либо последовательность аминокислот, гомологичную указанным на 75% или более.

36. Применение по п.32, в котором липидацилтрансфераза включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16 или последовательность аминокислот, гомологичную указанным на 75% или более.

37. Применение по п.32, в котором липидацилтрансфераза включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16.

38. Применение по п.28, в котором липидацилтрансфераза отличается тем, что фермент включает мотив последовательности аминокислот GDSX, в котором X представляет собой один или более из следующих остатков аминокислот: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S и в котором вариант фермента включает одну или более модификаций аминокислот сравнительно с исходной последовательностью в любом одном или более остатков аминокислот: Ser3; Phe13Ser; Asp15Asn, Leu17; Ser18x (где x выбирают из Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Try или Tyr), Lys22, Met23, Tyr30x (где x выбирают из Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Try); Gly40; Asn80; Pro81; Lys82, Asn87; Asn88; Trp111; Val112; Ala114; Asp116Asn или Glu; Tyr117; Leu118; Pro156; Asp157Asn; Gly159; Gln160; Asn161; Pro162; Ser163; Ala164; Arg165; Ser166; Gln167; Lys168; Val169; Val170; Gln171; Ala172; Tyr179; His180; Asn181; Gln182; Met209; Leu210; Arg211; Asn215; Tyr226x (где x выбирают из Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Try); Asp228Asn; Try230x (где x выбирают из Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Try); Lys284; Met285; Gln289; Val290; Glu309; Ser310 и 318.

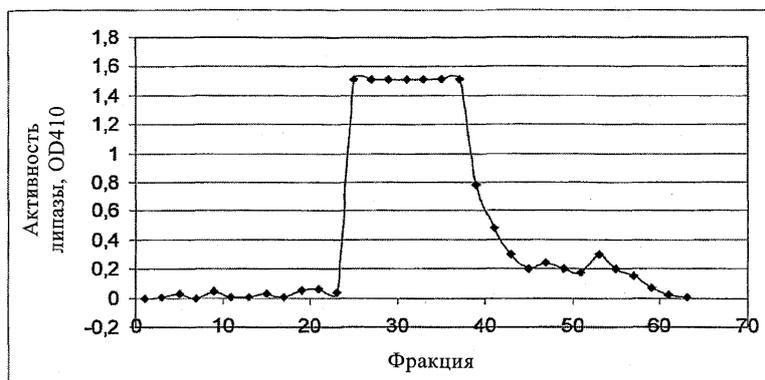
39. Применение по п.28, в котором липидацилтрансфераза включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16 или последовательность аминокислот, гомологичную указанной на 75% или более.

40. Применение по п.39, в котором липидацилтрансфераза включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16.

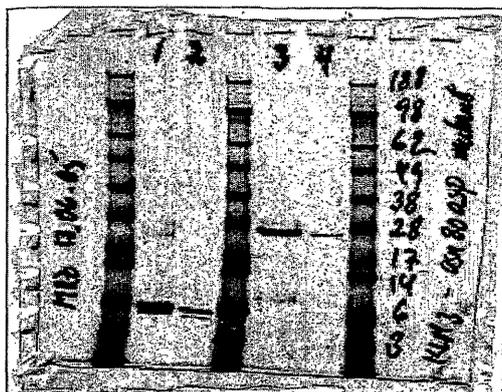
41. Применение по любому из пп.24-40, в котором пищевое масло во время обработки включает менее чем 1% воды.

42. Применение по п.41, в котором масло включает менее чем 0,5% воды.

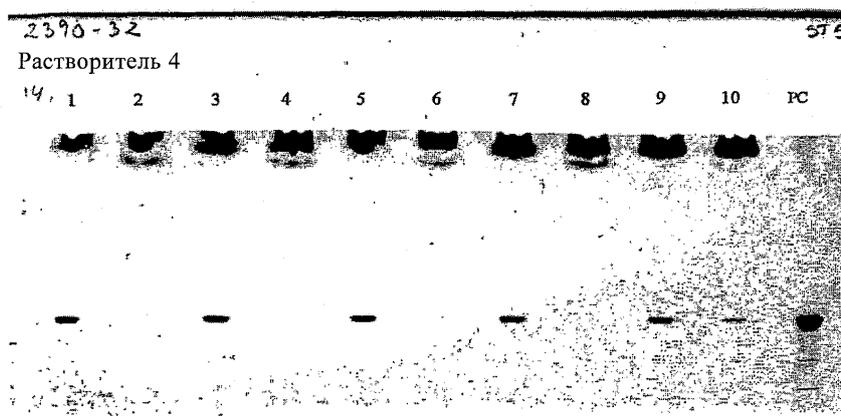
43. Применение по п.42, в котором масло включает менее чем 0,1% воды.



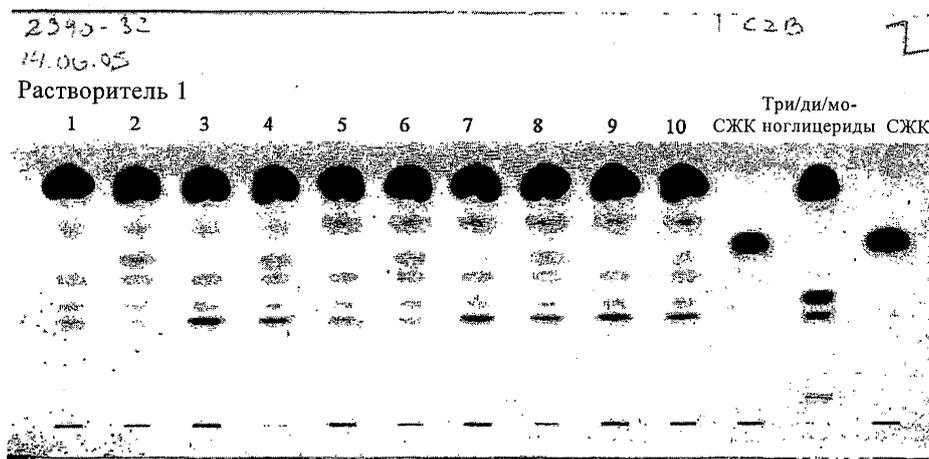
Фиг. 1



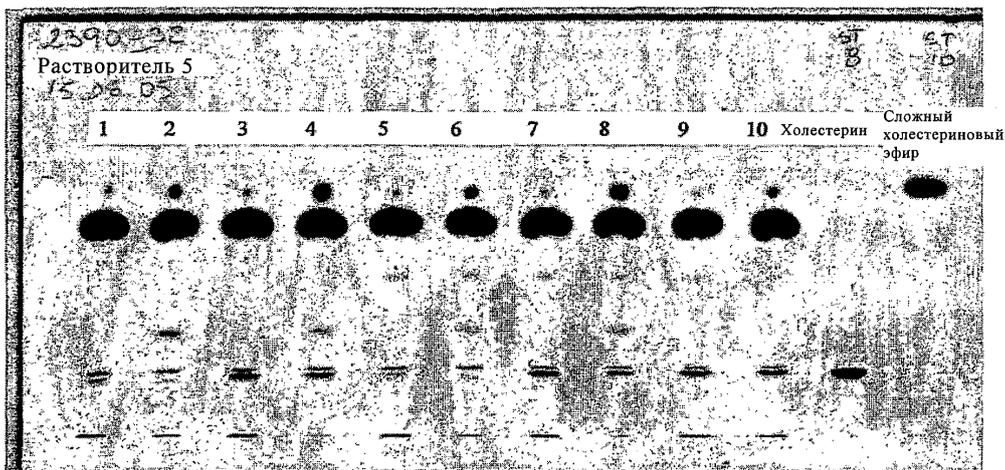
Фиг. 2



Фиг. 3



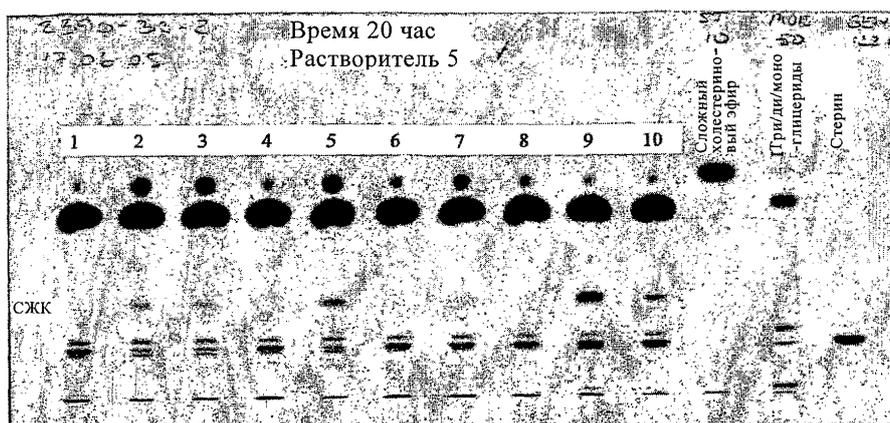
Фиг. 4



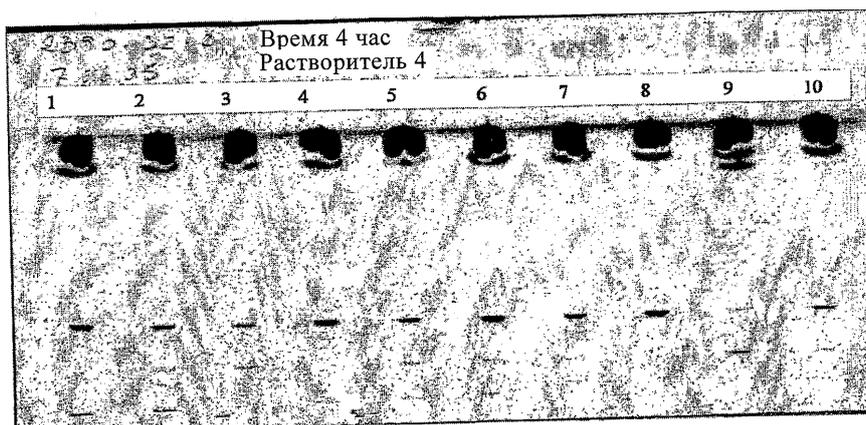
Фиг. 5



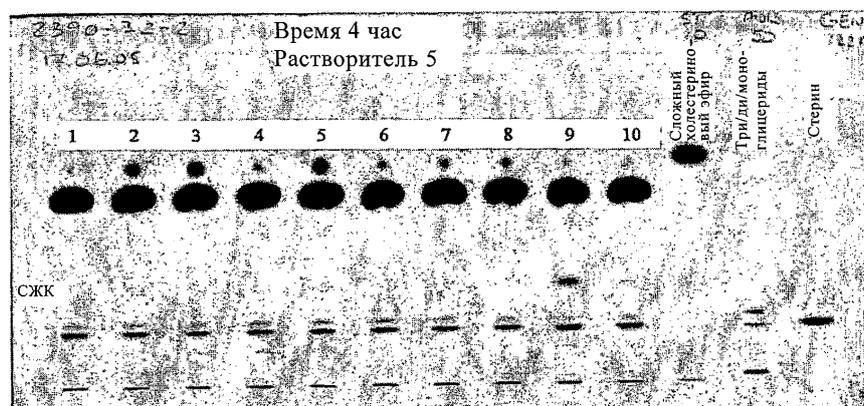
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

SEQ ID NO: 16

```

1  ADTRPAFSRI  VMFGDSLSDT  GKMYSKMRGY  LPSSPPYYEG  RFSNGPVWLE  QLTQFPGLT
61  IANAEGGAT  AVAYNKISWD  PKYQVINNLD  YEVTQFLQKD  SFKPDLLVIL  WVGANDYLAY
121  GWNTEQDAKR  VRDAISDAAN  RMVLNGAKQI  LLFNLFDLGG  NPSARSQKVV  EAVSHVSAYH
181  NKLLLNLARQ  LAPTMVKLKF  EIDKQFAEML  RDPQNFGLSD  VENPCYDGGY  VWKPFATRSV
241  STDRQLSAFS  PQRERLATAGN  PLLAQAVASP  MARRSASPLN  CEGKMFWDQV  HPTTVVHAAL
301  SERAATFIET  QYEFLAHG

```

Фиг. 10

SEQ ID NO: 1

```

1 MKKWFVCLLG LVALTVQAAD SRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51 SSPPYEGRF SNGPVLLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNP
101 YQVINNL DYE VTQFLQKDSF KPDDLVLVW GANDYLAYGW NTEQDAKRV
151 DAISDAANRM VINGAKQILL FNLPDLGQNP SARSQKVVEA VSHVSAYHNQ
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPMA RRSASPLNCE
301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAATFTIANQY EFLAH*

```

Фиг. 11

SEQ ID NO: 2

```

1 ivafGDSlTd geayygdsgd ggwgagladr Ltallrlrar prgvdfnrg isGrtsdGrl
61 ivDalvallF laqslglpnl pPYLsgdflr GANFAsagAt llptsqppli QvqFkdfksq
121 vlelrqalgl lqellrllpv ldakspdlvt imiGtNDlit saffgpkste sdrnrvsvpef
181 kdnlrqlikr Lrsnngarii vlitlvilnl gplGClPlkl alalassknv dasgclerln
241 eavadfneal relaiskled qlrkdglp dv kgadvpyvDl ysifqldgi qnpsayvyGF
301 ettkaCCGyG gryNynrvCG naglcnvtak aCnpssylls flfwDgfGps ekGykavAea
361 l

```

Фиг. 12

SEQ ID NO: 3

```

1 mkkwfvcllg lvaltvqaad srpafsrivm fgdsldstgk myskmrgylyl sspyyeegrif
61 sngpwwleql tnefpglitia neaeggptav aynkiswnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlingakeill fnlpldgqnp
181 sarsqkvvea ashvsayhnq lllnlarqla ptgmvklfei dkqfaemlrd pqnfglsdqr
241 nacyggsyvw kpfarsast dsqlsafnpq erlaiagnpl laqavaspmarsastlnce
301 gkmfwdqvhp ttvvhhaalse paatfiesqy eflah

```

Фиг. 13

SEQ ID NO: 4

```

1 mkkwfvcllg lialtvqaad trpafsrivm fgdsldstgk myskmrgylyl sspyyeegrif
61 sngpwwleql tkqfpglitia neaeggatav aynkiswnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlingakqill fnlpldgqnp
181 sarsqkvvea vshvsayhnk lllnlarqla ptgmvklfei dkqfaemlrd pqnfglsdve
241 npcydggyvw kpfatrsvst drqlsafspq erlaiagnpl laqavaspmarsasplnce
301 gkmfwdqvhp ttvvhhaalse raatfietqy eflahg

```

Фиг. 14

SEQ ID NO: 5

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anlcllrsta nyphviadt garltdvtcg aaqtadftra qypgvapqld alggtldlvt
121 ltiggndnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgywitpat adpscflklp laagdvpplr aiqahndav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgr wiepllfghs lvpvhpналg errmaehtmd vlgld

```

Фиг. 15

SEQ ID NO: 6

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anlcllrsta nyphviadt garltdvtcg aaqtadftra qypgvapqld alggtldlvt
121 ltiggndnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgywitpat adpscflklp laagdvpplr aiqahndav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgr wiepllfghs lvpvhpналg errmaehtmd vlgld

```

Фиг. 16

SEQ ID NO: 7

```

1 mdyekfillfg dsitefamt rpiedgkdy algaalvney trkmdilqrg fkygtsrwal
61 kilpeilkhe snivmatifl gandacsagp qsvplpefid nirqmvslmk syhirpiig
121 pglvdreke kekseeialg yftrnenfai ysdalaklan eekvpvaln kafqgegda
181 wqqltldgln fsgkykifh dellkvietf ypqyhpknmq yklkdwrdvl ddsnims

```

Фиг. 17

SEQ ID NO: 8

	10	20	30	40	50	60
	MNLRQWMGAA	TAALALGLAA	CGGGGTDQSG	NPNVAKVQRM	VVFGDSLSDI	GYTTPVAQAV
	70	80	90	100	110	120
	GGGKFTTNPQ	PIWAETVAAQ	LGVTLTPAVM	GYATSVQNCQ	KAGCFDYAQQ	GSRVTDPNQI
	130	140	150	160	170	180
	GHNGGAGALT	YPVQQQLANF	YAASNNTFNG	NNDVVFLVLAG	SNDIFFWTTA	AATSGSGVTP
	190	200	210	220	230	240
	AIATAQVQQA	ATDLVGYVKD	MIKQATQVY	VFNLPDSSLT	PDGVASGTTG	QALLHALVGT
	250	260	270	280	290	300
	FNTTLQSGLA	GTSARIIDFN	AQLTAAIQNG	ASFGFANTSA	RACDATKINA	LVPSAGGSSL
	310	320	330	340		
	FCSANTLVAS	GADQSYLFAD	GVHPTTAGER	LIASNVLARL	LADNVAH	

Фиг. 18

SEQ ID NO: 9

1 migsyvavgd sftegvdpq pdgafvgwad riavladrr pegdfitynl avrgllldqi
 61 vaeqvrvvg lapdlvsfaa ggndiirpqt dpdevaerfe lavaaitaaa gvlvltfgid
 121 tggvplkhl rgkiatyng h vraiadrygc pvidlwsirs vqdrwadad rihispeght
 181 rvaalragqal glrvpadpdq pwpplprgt ldvrrddvhw areylvpwig rirgessgd
 241 hvtagkftsp daiktriaav a

Фиг. 19

SEQ ID NO: 10

1 mqtinpaytsl vavgsdfteg msdlipdgsy rgwadllatr maarspgfry anlavrgkli
 61 gqivdeqvvd aaamgadvit ivggindtir pkcdmarvrd litqaverla phceqivlmr
 121 spgrqgvle rfrpmealf aviddlagr h gavvdyga qsladprmw dvrhltaeg
 181 hrvaavvwq slghepedpe whapipatpp pgwvrrtad vrfarqhlip wigrirtgrs
 241 sgdgipakrp dlipyedpar

Фиг. 20

SEQ ID NO: 11

1 mtrgrdggag apptkhrall aaivliivai saaiyagasa ddgsrdhalq aggrlprgda
 61 apastgawvg awatapaaae pgteltglag rsvmvvhts vggigaritl snlygqspit
 121 vthasialaa gpdtaaaiaid tmriltfggs arviipaggq vmsdrlarai pyganvlvt
 181 yspipsgpvt yhpqarqtsy ladgdrtdv tavayttptp ywryltaldv lsheadgtvv
 241 afgdsltdga rqsqdanhrw tdvlaarthe aagdgdrdpr ysvvnegisg nrlltsrppr
 301 padnpsglsr fqrdrlerin vkavvvvlgv ndvinspela drdailtir tivdraharg
 361 lrvvgaftp fgygygytea relmrqevne eirsgrvfdt vvdfdkalrd pydprmrtd
 421 ydsgdhlhfpq dkgymrgav idlaalkgaa pvka

Фиг. 21

SEQ ID NO: 12

1 mtsmsrarva rriaagaayg gggiglagaa avglvvaevq larmvgvt ptrvpnaqgl
 61 yggltptagd pprlmmldg staagqgvhr agqtpgalla sglaavaerp vrigsvaqpg
 121 acsddldrvq alvlaepdrv pdicvimvga ndvthmpat rsvrhissav rritagaev
 181 vvgtdpdigt iervrqlrw larrasqla aactigaveq ggrtvsldl lqpefaqrpr
 241 elfpndnyhp saegyataam avlpsvcaal glwpaadehp dalregfip varaaaaaas
 301 eagtevaam ptgprgpwal lkrrrrrvs eaepsspsgv

Фиг. 22

014985

SEQ ID NO: 13

1 mgrtdqtr ygrarval aaltaavgv gvagodsvvg dspapsgsps krtrpapwd
61 tpsasvaavg dsitrgfdac avlsdcpevs wafgssakvd slavrllgka daaehswnya
121 vtgamadit aqvtraaqre pelvavmaga ndacrtsa mtpvadfraa feeamairk
181 klpkacqvys sipdlkrlws qgrinpigkq vwkldcpcsm lgdadsidsa atlrmtvrd
241 tvadynevir evcakdncr sddgavhefr fgtdqjshwd wfhpvsdvgq rlaelayrav
301 taknp

Фиг. 23

SEQ ID NO: 14

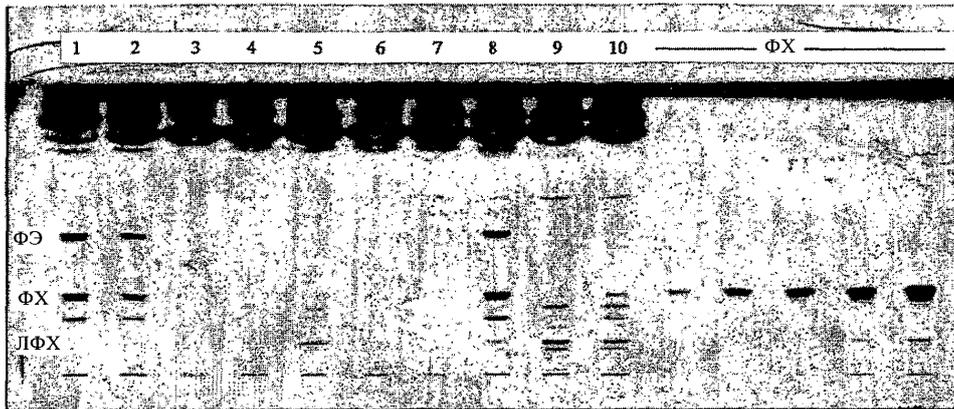
1 mrisraata sallipala ifgasaavs priqatdya lqdsyssvgv agsydsssgs
61 cksksypa lwaashtgr infitacsar tgdvlakqit pvnsqdlvs itggndagf
121 admittcnlq gesaclaria karayiqqi paqidqvyda ldsrapaaqv vlygyprfyk
181 lggscavgl eksraaina addinavtak raadhgfafg dvntifaghe lcsgapwlhs
241 vtipvensyh ptangqskgy lpinvat

Фиг. 24

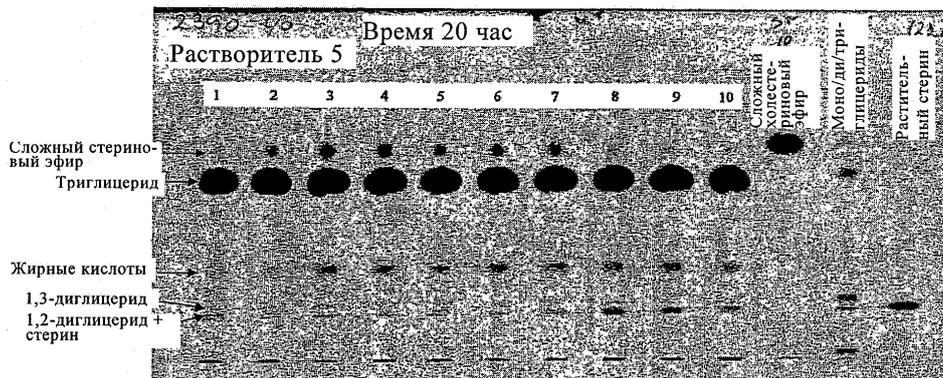
SEQ ID NO: 15

1 MKKWFVCLLG LIALTVOAAD TRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51 SSPFYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPLTIA NEAEGGATAV AYNKISWPK
101 YQVINLDYE VTQFLQKDSF KPDDLVLWV GANDYLAVGW NTEQDAKRV
151 DAISDAANRM VINGAKQILF FNLPDLGQNP SARSQKVVEA VSHVSAIHNK
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASFMA RRSASPLNCE
301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAATFLETQY EFLAHG*

Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27

SEQ ID NO: 17

Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala
 1 5 10 15
 Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro
 20 25 30
 Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg
 35 40 45
 Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln
 50 55 60
 Asn Ala Trp Gln Leu Leu Val Arg Ser Glu Asp Thr Phe Gly Asn Pro
 65 70 75 80
 Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp
 85 90 95
 Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys
 100 105 110
 Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr
 115 120 125
 Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr
 130 135 140
 Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Leu Gln Ser Gly Arg Ala Thr Leu Asn Ser Leu Arg Ala Thr Leu
 165 170 175
 Lys Ser Gly Asn Leu Thr Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Thr Leu Leu
 180 185 190
 Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ile
 195 200 205
 Gln Lys Glu Tyr Ala Pro Glu Leu Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ala Ala
 210 215 220
 Leu Gly Gly Phe Val Thr Asn Ile Thr Ala Thr Ala Glu Ala Val Asp
 225 230 235 240
 Ser Gly Pro Phe Ala Gly Ile Ile Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly
 245 250 255
 Asn Glu Tyr Pro Asp Phe Lys Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Val Ser Pro
 260 265 270
 Leu Leu Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Asn Thr His Cys Leu Leu Asp
 275 280 285
 Gly Gly Ile Ala Tyr Phe Gly Lys Ser Phe Phe Ser Arg Ile Ile Arg
 290 295 300
 Tyr Phe Pro Asp Gly Trp Asp Leu Val Asn Gln Glu Pro Ile Lys Thr
 305 310 315 320
 Ile Leu Gln Asp Asn Gly Leu Val Tyr Gln Pro Lys Asp Leu Thr Pro
 325 330 335
 Gln Ile Pro Leu Phe Ile Tyr His Gly Thr Leu Asp Ala Ile Val Pro
 340 345 350

Ile Val Asn Ser Arg Lys Thr Phe Gln Gln Trp Cys Asp Trp Gly Leu
 355 360 365
 Lys Ser Gly Glu Tyr Asn Glu Asp Leu Thr Asn Gly His Ile Thr Glu
 370 375 380
 Ser Ile Val Gly Ala Pro Ala Ala Leu Thr Trp Ile Ile Asn Arg Phe
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Pro Val Asp Gly Cys Gln His Asn Val Arg Ala Ser
 405 410 415
 Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu
 420 425 430
 Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys
 435 440 445
 Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala
 450 455 460
 Phe
 465

Фиг. 28

SEQ ID NO: 18

Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala
 1 5 10 15
 Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro
 20 25 30
 Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg
 35 40 45
 Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln
 50 55 60
 Asn Ala Trp Gln Leu Leu Val Arg Ser Glu Asp Thr Phe Gly Asn Pro
 65 70 75 80
 Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp
 85 90 95
 Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys
 100 105 110
 Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr
 115 120 125
 Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr
 130 135 140
 Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Leu Gln Ser Gly Arg Ala Thr Leu Asn Ser Leu Arg Ala Thr Leu
 165 170 175
 Lys Ser Gly Asn Leu Thr Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Thr Leu Leu
 180 185 190
 Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ala Ile
 195 200 205
 Gln Lys Glu Tyr Ala Pro Glu Leu Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ala Ala
 210 215 220
 Leu Gly Gly Phe Val Thr Asn Ile Thr Ala Thr Ala Glu Ala Val Asp
 225 230 235 240
 Ser Gly Pro Phe Ala Gly Ile Ile Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly
 245 250 255
 Asn Glu Tyr Pro Asp Phe Lys Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Val Ser Pro
 260 265 270
 Leu Leu Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Asn Thr His Cys Leu Leu Asp
 275 280 285
 Gly Gly Ile Ala Tyr Phe Gly Lys Ser Phe Phe Ser Arg Ile Ile Arg
 290 295 300
 Tyr Phe Pro Asp Gly Trp Asp Leu Val Asn Gln Glu Pro Ile Lys Thr
 305 310 315 320
 Ile Leu Gln Asp Asn Gly Leu Val Tyr Gln Pro Lys Asp Leu Thr Pro
 325 330 335

Gln Ile Pro Leu Phe Ile Tyr His Gly Thr Leu Asp Ala Ile Val Pro
 340 345 350
 Ile Val Asn Ser Arg Lys Thr Phe Gln Gln Trp Cys Asp Trp Gly Leu
 355 360 365
 Lys Ser Gly Glu Tyr Asn Glu Asp Leu Thr Asn Gly His Ile Thr Glu
 370 375 380
 Ser Ile Val Gly Ala Pro Ala Ala Leu Thr Trp Ile Ile Asn Arg Phe
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Pro Val Asp Gly Cys Gln His Asn Val Arg Ala Ser
 405 410 415
 Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu
 420 425 430
 Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys
 435 440 445
 Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala
 450 455 460
 Phe His His His His His His
 465 470

Фиг. 29

SEQ ID NO: 27

ZP_00058717

1 mlphpagerg evgaffallv gtpqdrirl echetprlg rcgcgerrvp pltipgdgvl
 61 cttstrdae tvwrkhlqpr pdggfphlg vgcclaggqs pgvlwcereg crfevordt
 121 pglstrngd ssppfragws lppkcgelsq sarktpavpr yslrtdrpd gprgrfvsg
 181 praatrrrf lgipalvlt altvliavpt greifwrmwc eatqdwclgv pvdsrgqpae
 241 dgefillspv qaatwgnyya lgdsyssgd ardyypgtav kggcwsana ypelvacayd
 301 faghlsflac sgqrgyamld aidevgsqld wnsphstlvt igiggndlgf stvlktcmvr
 361 vplldskact dqedairkm akfettfeel isevrtrapd arilvvgypr ifpeeptgay
 421 yltasnqrw lnstiqefnq qlaeavavhd ceiaasggvg svefvdvyha ldgheigsde
 481 pwwngvqlrd latgvtvdrs tfnpnaaghr avgervicqi etgprplya tfavvagatv
 541 dtlagevg

Фиг. 34

SEQ ID NO: 28

1 mgsgpraatr rrlfigipal vlvialtivi avptgretiw rmwccatqdw clgvpvdsrg
 61 qpaedgefil lsvqaatwg nyyalgdsys sgdgadyyp gtavkggcwr sanaypelva
 121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqldwnspbt slvtigiggn dlgstvlkt
 181 cmvrvpllds kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilvv gyprifpeep
 241 tgayyiltas nqrwlnefiq efnqqlaeav avhdeciaas ggvgsvfvd vyhaldehei
 301 gsdepwngv qlrdlatgvt vdrstfnpna aghravgerv iqietgpr plyatfavva
 361 gatvdtlage vg

Фиг. 35

SEQ ID NO: 29

1 mrttviaasa lllagcadg arectagapp gessggiree gaeastsitd vyialgdsya
 61 amggrdqpr gepfclrssg nypellhaev tdltcqgavt gdllprtlig ertlpaqvda
 121 ltedtlvlt siggndlgfg evagcileri agenaddcvd llgetigeql dqlppqldrv
 181 heairdragd aqvvtgylp lvsagdcpeh gdvseadrww aveltgqine tvreaaerhd
 241 alfvlpddad ehtscappqq rwadiqqqt dayplhptsa gheamaaavr dalglepvqp

Фиг. 36

SEQ ID NO: 30

ZP_00094165

1 mgqvklfarr capvllalag lapaatvare aplaegaryv algssfaagp gvgnpapgsp
 61 ercgrgtlly phllacalk dlvdatsga tthhvlpgwn evppqidsvn gdtrilvlti
 121 ggndvsfvgn ifaaacekma spdprcgkwr eiteewqad eermrsivrq iharaplary
 181 vvvdyitvlp psqtcaamai spdriaqrs aakrlarita rvareegasl lkfshisrh
 241 hpcsakpwsn glsapaddgi pvhnrlgha eaaaalvklv klmk //

Фиг. 37

SEQ ID NO: 31

NP_625998.

1 mrrfrlvgl ssvlaagaa ltaataqaa qpaaadgyva lgdsyssgv agsyisssgd
 61 ckrstkahpy lwaaahspst fdftacsgr tgdvlsgqlg plssgtglvs isiggnagf
 121 admtttovlq scssclria tacayvdstl pgkldgvysa isdkapnahv vvigyprfyk
 181 lgttciglse tkrtainkas dhlntvlaqr aaahgfifgd vrttfighel csgspwlhsv
 241 nwinigesyh ptaagqsggy lpvlingaa
 //

Фиг. 38

014985

SEQ ID NO: 32

NP_827753.

1 mrrsritayv tslllavgca lgaataqas paaatgyva lgdsyssgvv agsylvssgd
61 ckrsskaypy lwqaahspss fsfmaccgar tgdvlnqlg tlnstglvs liiggndagf
121 sdvmttcvlq sdsaclsrin takayvdstl pgqldsvyta istkapsahv avlgyprfyk
181 lggscslgls etkrsainda adylnsaiak raadhgfifg dvkstifghe icssstwlhs
241 ldlnigqsy hptaagqsgg ylpvmnsva

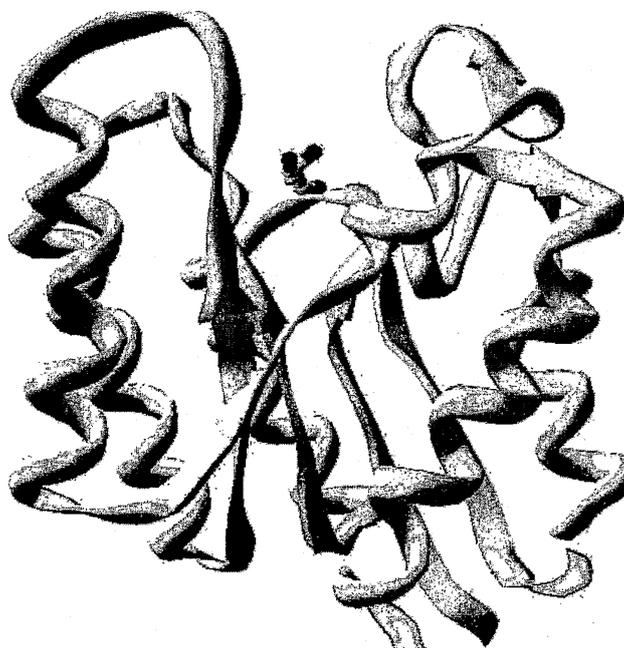
//

Фиг. 39

SEQ ID NO: 33

MRLTRLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVITDVINNQLGALNASTGLVSTIGGNDAGFADAMTT
CVTSSDSTCLNRLATATNYINTILLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNPWYC
LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTPVWE
SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

Фиг. 40



Фиг. 41

SEQ ID NO: 35

1 ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNPGVWLE QLTQFPGLT
61 IANEAEggGAT AVAYNKISWN PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVLV WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVNLNGAKQI LLENLPLDGG NPSARSQKVV EAVSHVSAYH
181 NKLLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPFATRSV
241 STDRQLSAFS PQRERLAIAGN PLLAQAVASP MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL
301 SERAATFIET QYEFLAHG

Фиг. 45

SEQ ID NO: 36

ACAGGGCGATGCACGGAACCGTACCTTCCGCGAGTGAAGCGCTCTCCCCCATCGTTCCG
CGGGACTTCATCCCGGATTTTGGCATGAACACTTCCTTCAACGCGGTAGCTTGCTACAA
GTGCGGCAGCAGACCCGCTCGTTGGAGGCTCAGTGAGATTGACCCGATCCCTGTGCGGCC
CATCCGTCATCGTCTTCGCCCTGCTGCTCGCGCTGCTGGGCATCAGCCCGGCCAGGCAG
CCGGCCCGCCCTATGTGGCCCTGGGGGATTCCATTCTCGGGCAACGGCGCCGGAAGTT
ACATCGATTGAGCGGGTACTGTACCGCAGCAACAACCGGTACCCCGCCCGCTGGCGCG
CGGCCAACGCACCGTCTCTTCACTTCCGCGGCTGCTCGGGAGCGGTGACCACGGATG
TGATCAACAATCAGCTGGCGCCCTCAACGCGTCCACCGGCTGGTGAGCATCACCATCG
GCGGCAATGACGCGGGCTTCGCGGACGCGATGACCACCTGCGTCAACGAGCTCGGACAGCA
CCTGCTCAACCGGCTGGCCACCGCCACCACTACATCAACACCACCGTCTGCGCCGGC
TCGACGCGGTCTACAGCCAGATCAAGGCCGTGCCCCCAACGCCCGGTGGTCTGCTCG
GCTACCCGCGCATGTACCTGGCCTCGAACCCTGGTACTGCTGCGGCTGAGCAACACCA
AGCGCGCGGCCATCAACACCACCGCCGACACCTCAACTCGGTGATCTCTCCCGGGCCA
CCGCCACGGATTCCGATTGCGCGATGTCCGCCGACCTTCAACAACACGAACTGTTCT
TGGCAACGACTGGCTGCACTCACTCACCCTGCCGGTGTGGGAGTCTGACACCCACCA
GCACGGGCCATCAGAAGCGGCTATCTGCGGCTCCTCAACGCCAACAGCTCGACCTGATCAA
CGCACGGCCGTGCCCGCCCGCGCTCAGCTCGGCGCGGGCGCCGACGCGTTGATCA
GCCACAGTGCCGGTGACGGTCCACCGTCACGGTCGAGGGTGTACGTACGGTGGCGCC
GCTCCAGAAGTGGAACGTCAGCAGGACCGTGGAGCCGTCCTGACCTCGTCAAGAAGTCT
CGGGGTGAGCGTATCACCCTCCCGTAGCCGGGGCGGAAGGCGCGCCGAACTCCTT
GTAGGACGTCAGTGTGCGGCCCGGCGTTGCCACCGTCCCGTAGACCGCTTCCATGTT
CGCCAGCCGGTCCCGCGGAACTCGGTGGGGATGTCCTGTCGCCAAGGTGCTCCCGTGGT
GTCCGAGAGCACCGGGGGCTCGTACCGGATGATGTGCAGATCCAAGAATT

Фиг. 46

SEQ ID NO: 37

MRLTRSLSAASVIVFALLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNLGALNASTGLVSIITIGGNDAGFADAMTT
CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNPWYC
LGLSNTKRAAINTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPWVE
SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

Фиг. 47

SEQ ID NO: 38

1 mlphpagerg evgaffallv gtpqdrirl echetrplrg rcgcgerrvp pltipgdgvl
61 cttssrdae tvwrkhlqpr pdggtrphlg vgcilagggs pgvllwgreg crfevcrrdt
121 pglstrngd ssppfragws lppkgeisq earktpavpr yslltrdrpd gprgrfvsg
181 praatrrif lgipaivlt altviaipt gretiwrmwc eatqdwclgv pvdsrgqpae
241 dgefillspv qaatwgnyya lgdsyssgdg ardyypgtav kggcwrsana ypelvaeayd
301 faghlsflac sqrgyamid aldevsqid wnsptsiltv igigndlgf stvikcmvr
361 vpildskact dqedairkrm akfeltfeel isevrtrapd arilyvgypr ifpeeptgay
421 yttasnqrw lnetaqefnq qlaeavavhd eelaasggvg svefvdvyha ldgheigsde
481 pwwngvqird latgvtvdrs tthpnaaghr avgervieqi etgpgprlya tfavvagatv
541 dtlagevg

Фиг. 48

SEQ ID NO: 39

1 ggtggtgaac cagaacaccc ggtcgtcggc gtggggctcc aggtgcaagg gcaggttctt
 61 caactgctcc agcaggatgc cgcctgggcc gtcacgatg gccttgggca ggctgtggtt
 121 ccccgacgag tacagcaacc atagcggatg gtcgaaocgg agcgggggtga actcoaagttc
 181 cgcgcclfcg cccgcggctt cgaactccgc ccaggacagg gttcggcga cagggccgca
 241 gccagggtac ggcaaggaca cgggtgtcgt caggctgggc atgccgtcgc gcagggctt
 301 gaggacgta cggcggtcga agtccctacc gccglagcgg tagccgtcca cggccagcag
 361 cacttcggtt tegtctgcg cgaaccggtc gaggacgctg cgcaccccga agtcggggga
 421 acaggacgac caggtcgac cgtcgcggc gcagggcagg aatgcggccg tgcctcggc
 481 gatgtcggc aggtaggcca cgaccggtc gccggggccc accccagggc tgcggaggcc
 541 cgcagcgatc gcggcggcgg gggctccgag ttctcccag gtcaccctgg tcaaccggcc
 601 gagtcggac gcgtcggga tccaccggc tgatgggtca cggtcggga agatgtctc
 661 ggogtagttg agggggcgc cggggaacca gacggcggcc ggcatggcgt cggaggcggg
 721 cactgtggtg tacgggggg cggcgcgac ccggtagtac tccagatcg cggaccagaa
 781 tctctgagg tgggtaccg accagcgcga cagtgcctcg tagtccggtg cgtccacacc
 841 gcggtgctc cgcacccagc ggggaaacgc ggtgagggtg gcgcttctt tgcctcctc
 901 gtcgggactc cacaggatcg gcggctcggg cttgaggtc atgaaacgcg acccctctg
 961 ggacggtcgc gatcgggtga cgcctgggtg cctcccfaa cgcctcccgg tgaccggagtg
 1021 tttgaccaca catctagcac gcgggacgcg gaaaccctat ggagaaaaca cctacaaccc
 1081 cggccgggac gttgggttcg gccacactta ggggtcgggt gccctgctgc cggccaggcc
 1141 agtcccggg tgcctgtggt cggcggggag ggcctgctc tgcaggtggt cggcgggac
 1201 actccgggcc tccagcgtac ccgcaacggg gacagttctc ctcccctccg ggcctgagtg
 1261 tccctccc cgaalgcgg cagatctcc cagtcagcc ggaaaacacc cgtctgccc
 1321 aggtactctt tgcctcgaac agacaggccg gacggccac gggggagggt tggggcagc
 1381 ggaccacglt cggcggaccag acgacggtt ttctcggta tcccgcctc tgtactgtg
 1441 acagcgtca cgtctgctt ggcctgccc acggggcgcg agacgctgtg gcgcatgtg
 1501 tftgaggcca cccaggactg gtcctgggg gtcgggtcg actcccggg acagcctcg
 1561 gaggacggcg agttctcgt gcttctccg gtcaggcag cagcctgggg gaactattc
 1621 gcgctggggg attcgtactc ttccggggac gggggcccgc actactatcc cggcaccgcg
 1681 gtaagggcg gttgctggc gtcgctaac gcctatccg agctgtgctc cgaagcctac
 1741 gacttcggc gacactgtc gttctggcc tgcagcggc agcgcggcta cgcctatgtt
 1801 gacgctatcg acgaggtcgg ctgcagctg gactggaact cccctacac gtcctgtgtg
 1861 acgatcggga tggcggcaa cgtctgggg ttctccacgg ttigaagac ctgcatgtg
 1921 cgggtgcccg tgcgtgacag caaggcgtg acggaccagg aggacgctat ccgcaagcgg
 1981 atggcgaat tgcagcgcg gttgaagag ctcatcagc aagtcgcac ccgcgcgccg
 2041 gacgcccgga tctgtcgt gggctacccc cggalttct cggaggaaac gaccggccg
 2101 tactacacgc tgaccgcgag caaccagcgg tggctcaacg aaaccattca ggagtcaac
 2161 cagcagctcg ccgagggcgt cgcggtccac gacgaggaga ttgccgctc gggcggggg
 2221 ggcagcgtg agtctgtgga cgtctaccac gcgtggagc gccacagat cggctcggac
 2281 gagccgtgg tgaacgggg gacgttgcgg gacctgccca cgggggtgac tgggaccgc
 2341 agtaccctc accccaacgc cgtctggcac cggcgggtcg gtagcgggtt catcagcag
 2401 atcgaaaccc gccccggcgg tccgtctat gccacttcc cgttgggtgc gggggcgaac
 2461 gtggaactc tgcggggcga ggtgggtgga cccgctfac cgtccggccc gcaggtctg
 2521 gagcactcg cgtatctgt ccactgccc gtcagttcg tctcgggtga tgaaccggg
 2581 cggggagagc cggatctgt agcctgtcgt gctttgacg agcacacccc gctcaggag
 2641 ccgtcgcac agttctctc cggtgccag agtcgggtcg acgtgatcc cagcccacg
 2701 ccgatgctg cggggcgcga ccacgctgt gccgaccagt tggctgagg gggcggcag
 2761 caoggggcg agggcgcgga catggtccag gtaagggccg tgcgggacga ggcaccac
 2821 ggcagtgcc accgcgagg cgaaggcgtt gccgcccag gtcctcgtt gctggccggg
 2881 gcggtacag tgaagactt cgcgtcgc taccgccc gccacggga ggtgcccgc
 2941 gccagcgtt tgcogaaca ggtagatc ggcgtgact cgcctgtgt cgcaggccc

Фиг. 49

SEQ ID NO: 40

1 vgspraatr rrfigpal vltaltivi avptgretiw rmwceatqdw clgvpvsrg
 61 qpaedgefil lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva
 121 eaydfaghts flacsqgrgy amldaidevg sqldwnspht slvtgiggn dlgtstvtkt
 181 cmvrpllds kactdqedai rkmakfett feelisevrt rapdarilrv gyprifpeep
 241 tgayytitas nqrwlnetiq efnqqlaeav avhdeelaas ggvgsvfvd vyhaldghei
 301 gsdepwvngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravgerv ieqietpgpr plyatfavva
 361 gatvdtlage vg

Фиг. 50

SEQ ID NO: 41

1 mrtviaasa lllagcadg aretagapp gessggiree gaeastsitd vyalgdsya
 61 amggrdqplr gepfclrssg nypellhaev idltcggavt gdleprtig ertlpaqvda
 121 ltedtlvtl siggndlgf evagcireri agenaddcvd lltetigeql dqlppqldrv
 181 heairdragd aqvvtgylp lvsagdcpef gdvseadrw aveltgqine tvreaaerhd
 241 alfvlpddad ehtscappqq rwadiqqqt dayplhpsa gheamaaavr dalglepvqp

Фиг. 51

SEQ ID NO: 42

1 ttctgggggt ttatgggggt gttatcggct cgtcctgggt ggatcccgc aggtggggta
 61 ttcacggggg acittgtgt ccaacagccg agaatgagtg cctgagcgg tgggaatgag
 121 gtgggccccg cgtgtcgc atgagggggc ggcgggctct gtggtcccc gcgacccccg
 181 gccccgggga ggggtgaatg aaatccggct gtaacagca tcccgtcccc accccgtcgg
 241 ggaggtcagc gccccgagtg tctacgcagt cggatcctct cggactcggc catgctgtcg
 301 gcagcatcgc gctcccgggt ctggcgtcc ctcggctgt ctgcctgtcg tcccggaaag
 361 gcgaatgat caccggggag tgatacccg gtgtctcat cccggaigcc cactcggcg
 421 ccatccggca atcgggag ctcgggtgg aagtaggtgg catccgatgc gtcggtgacg
 481 ccatagtggt cgaagatctc atcctgtctg aggggtctca gcccactctc cggatcgata
 541 tggggggcgt ccttgatggc gtcctgtctg aaaccgaggt gcagctgtg ggttccaat
 601 ttcgaccac ggagcgggac gaggctggaa tgacggcca agagcccgtg tggaccca
 661 acgaaggtgg gtatcccggt gtcacttg aggaacacgc cctccaccgc acccgctg
 721 tggccgaggt gctcgtggc gctgcatcc agaagggaaa cgtatcata ttgtcgggtg
 781 tgcacagaca tgatctctc ttgctgtcg tgcigtac taccacgta gggctgaatg
 841 caactgttat tttctgta ttttaggaat tggccaat cccacaggct ggcgtgtgctc
 901 aatcgtcat caagtaatcc ctgtcacaca aaatgggtgg tggagccct ggtcgggt
 961 cgtggggagg cgcctgccc cgcagatcg tcggatcgg cggatctggc cggtaccccg
 1021 cgtgataaa aatcattctg taacctcat cacgggtgtg tttaggtatc ccccccttc
 1081 gtcctgacc cgtccccgc gcgcgggagc cgcgggtg cggtagacag gggagacgtg
 1141 gaccatga ggaacaaggt catcgagca agcgcattac tctctcgc cggatcgcg
 1201 gatggggccc gggagggagc cgcgggtgca cgcgggtg agtctctcgg gggcaccgg
 1261 gaggaggggg cggagggcgc gacaagcacc accgagctct acatgccct cggggaltcc
 1321 taigcggcga tgggcccggc ggalcagcc ttacgggtg agccgtctc cctgcctcg
 1381 tccgtaat acccgaact cctccacgca gaggcacc atctaccctg ccaggggcg
 1441 gtgacgggg atctgtcga acccaggagc ctgggggagc gcacgtgcc ggcgaggtg
 1501 gatgcgtga cggagggacac caccctggt acccttcca tgggggcaa tgacctgga
 1561 ttcggggagg tggcgggat catccgggaa cggatcgcc gggagaacc tgatgatg
 1621 gtggaccctg tgggggaaac catcggggag cagctcgtc agctcccc ccagctggac
 1681 cgcgtgcagc aggcctacc ggaccgcgc ggggacgcgc aggtgtgtg caccggtac
 1741 ctgcccctg tgcctcgg ggactcccc gaactgggg atgtctcga ggcggatcgt
 1801 cgtggggcgg ttgagctgac cgggcagatc aacgagacc tgcgagggc ggcggaacga
 1861 cagatgccc tctgtctc gcccgagat gccgatgagc acaccagtg tgcacccca
 1921 cagcagcgt gggcggat cccagggcca cagaccgat cctatccgt gcaccggacc
 1981 tccgcccgc atgagggcat gcccggccc gtcgggagc cgtgggct ggaaccggc
 2041 cagccgtagc gccgggccc cgtctgtcga cgaaccaacc atgccaggct gcagtcacat
 2101 ccgcacatag cgcgcgggg cgatggagta cgcacatag aggatgacc cgtgcccag
 2161 gatgatgagc agcacactgc cgaaggggtg tccccgagg gtcgagag ccgagtcag
 2221 acctcggcc tgcctggat catgggccc accggcgtg acgatcaaca cccccaggat
 2281 ccgaaggcg ataccacggc cgaataacc ggcgtctcgt gtgatgata tgcggctcc
 2341 gaactgcct gacccccac ccctccag atctccccg aaatccccgg tggccccct
 2401 ccagggtg tagacaccgc ccccagtac caccagccc gcgaccaca ccagcaccac
 2461 acccagggt tggatagga cgttggcgt gacatcgtg gcggtctccc catcgagggt
 2521 gtcggccc cgggcgaagg tggaggtgt caccgcccagg gagaagtaga ccatggccat
 2581 gaccgcccc tggccctt cctgaggtc ctgcccgc agcagctggc tcaattgcca
 2641 gagtccagg gccgcccagg cgatgacggc aaccacagg aggaactgcc caocggagc
 2701 ctcccgatg gggccagg caccgaat cgaggcctca taccogaac ccgggatcc
 2761 agtgcgatg cgcaccgca tccaccgat gaggatgct agtatccca ggacaatgaa
 2821 accactctg gccagggtg tcaagcggg gtgtctctg gccgtctcg cagcccgtc
 2881 gatcgtcgt ttcgggac tgggtctgc ctatccata gctcccattg aaccgctg
 2941 aggggtgggc ggccactgc agggcggat gtgatgaa ctgtgtgt ccatcaacc

Фиг. 52

SEQ ID NO: 43

1 mrrrlvqfl ssvlaagaa ltaataqaa qpaaadgyva lgdsyssvg agsyissgd
 61 ckrstkahpy lwaaahspst fdftacsgr tgdvlsgqlg plssgtglvs isigndagf
 121 adtmittvlq sessclsria taeaydstl pgkldgvysa isdkapnahv vvigyprfyk
 181 lgtfciglse tkrtainkas dhlnvlaqr aaahgftgd vrtftghel csgspwlhsv
 241 nwlngesyh ptaagqsggy lpvlnгаа

Фиг. 53

SEQ ID NO: 44

1 cccggcggcc cgtgcaggag cagcagccgg cccgcgatgt cctcggggcgt cgtctctac
61 agggcgtcca tgcgctggc gaccggcgcc gtagtggtg cccggaccct gtcccagggt
121 cccggcgca tctggcgggt ggtgcgggtc gggccgcgcc gaggggagac gtaccagaag
181 cccatctca cgtctccgg ctgcggttc ggctctccg ccgctccgc cgtcgcctc
241 ccgagcact tctcggcgag gtcggcgctg gtcggcgtca ccgtgacgtc ggcgccccgg
301 cccagcgcg agatcagcag cgtccagccg tccctcccg ccagcgtcgc gctgcggtc
361 tctcgcggg cgtatccag cagcgcgccc cccggcgcca gacgcgtgc gccggaccgt
421 acgggctga tttcggcgc gtcgagtag ggtgctcac ccgtggcgaa accggcagg
481 aacagcgcgt cagcagcgtc ggcgggggag tctgtctgt ccactgtgag ccggatcggc
541 agggctctg tggggctcac gacatgttc ccatgatcgg gcaaccggcc gccgctgca
601 cccgtcttc cgggcacgca cagcaggggc tttctcggc tctcctctc gaactgaac
661 gagtgcagc ctttctgg catggacact tccagtaac gcgcgtagt gctaccaagg
721 ttgtggcagc aatctctga agggagggtc catgagcgt ttccgactg tggcttct
781 gagtgcgtc gctctcggc cggcgccgc cctaccggg gcagcgaccg cccaggcggc
841 ccaacccgc gccgcgacg gctatgtgc cctcggcgc tctactctc cccgggtcgg
901 agcggcagc facatcagct cagcggcga ctgcaagcg agcacgaagg cccatccca
961 cctgtgggg gccgcccact cgcctccac gttcacttc accgctgt cccggcggc
1021 tacgggtgat gttctctc gacagctgg cccgctcag tccggcaccg gcctcgtc
1081 gatcagcgc ggcggcaacg acgcccgtt cgcgcagacc atgacgacct gttgtctca
1141 gtcgagagc tctcctctg cgcggatgc caccggcag gcgtactgc actcagcgt
1201 gcccggaag ctgcagcgg tctactggc aatcagcagc aaggcgcga acccccact
1261 cgtctcact ggtaccgcg cctctcaaa gctcggcacc accgtcagc gctctcga
1321 gaccaagcg acggcgatca acaaggcctc cgaaccctc aacaccgtc tcccccagc
1381 gccgcccgc cagggctca cctcggcga cgtacgacc acctcaccg gccacgagct
1441 gttctccgc agcccctgc tgcacagct caactggct aacatcggc agtctacca
1501 ccccaccgc gccggccagt cgggtgcta cctcgggtc ctcaacggc cccctgacc
1561 tcaggcggaa ggagaagaag aaggagcga gggagacag gagtgggagg cccgcggca
1621 cgggtctcc gtcctcctc cgtctcctc cccggtccg caagtcaccg agaacggcc
1681 cgcctcggc gtcggcggca ccggactcc cactccacg cgcacggcac tctgaacgc
1741 gccggtctg tctgtcctg taccatcac gccgtctgg cgcgagcgt cggcggcga
1801 cgggaaggc agcctcctc acccggatc ggcagcagc ccgtccggc taccaccgc
1861 gtacccgac tccgcgggc gcccccagc cgtgaacgt gccgtgaaag cgggtgccc
1921 gtcgtcggc ggcggacag ccccgagta gttgggtgc gagcccaca cgttaccct
1981 caccgactg cgtcggggc

Фиг. 54

SEQ ID NO: 45

1 mrrsitayv tsllavga ltaataqas paaaatgyva lgdsyssgvv agsylsssgd
61 ckrsskaypy lwqaahspss fsmacsgar tgdvianqig tlnsstglvs ttggndagf
121 sdvmttcvlg sdsaclsrin takayvdstl pgqlidsvyta istkapsahv avlgyprfyk
181 lggscilagls etkrsainda adylnsaiak raadhgftfg dvkstftghe icsstwlhs
241 ldllnigqsy hptaagqsgg ylpvmnsva

Фиг. 55

SEQ ID NO: 46

1 ccaccgcggg gtcggcggcg agtctctgg cctcggctgc ggagagggtg gccgtgtagc
61 cgttcagcgc ggcgcggaac gttctctca ccgtcggcc gtaactcgt atcaggccct
121 tgccttctc cgaagcggcc tgaagcggg tgcctctct gagcgtgagc atgtagctc
181 cctgatcgc ggtgggggag ccggcgccga gcaaccgtcc ctcggccggg gtcgctggg
241 cgggcagtc ggtgaatccg cccacgaggg cgcgggtcgc cagggcggtt atcggcgga
301 tccggatct cttgctacg agctgtgca tacgagggag tctctctc ggcagcggg
361 cgcctgggtg gggcgcacgg ctgtgggggg tgcgcgcgtc atcacgcaca cggccctgga
421 gctcgtgtt cggccctggg ttgagtaaag cctcggccat ctacgggggt ggtcaaggg
481 agttgagacc ctgtcatgag tctgataga gcaacgacc aacggggccc ttagcaccgc
541 ggggcgacc cggaaaagtc cagaaaagtc tggcatgac acttctctc aacacgcta
601 gctgtgaca cggttacggc agagatcct ctaaagggag gttccatgag acgttccga
661 attacggatc actgaccctc actctctc cgcgtggct gcgccctac cggggcagc
721 acggcgagg cgtcaccag cgcggcgcc acgggctatg tggccctcgg cactcgtac
781 tctcgggtg tggcgccgg cagctaccct agctccagc gcgactgca gcgcagttc
841 aaggcctatc cgtaccctc gacggccgc cattaccct cgtcgtcag ttcatggct
901 tctcggggc ctctacggg tcatgtctg gccaatcagc tggcaccct gaactcgtc
961 accggcctg tctccctac catcgaggc aacgacgcgg gcttctcga cgtcatgag
1021 acctgtgtc tccagtcga cagcgcctc cctcggcga tcaacacggc gaaggcgtac
1081 gtcgactcca cctcggccg ccaactcagc agcgtgaca cggcgatcag cacgaaggcc
1141 cgtcggccc atgtggcctg gctgggctac cccgctctc acaaacgtgg cggctcctc
1201 ctcggggcc tctcggagc caagcgttc gccatcaacg acgcgccga ctatctaac
1261 agcgcctat ccaagcgcg cgcggaccac ggtctaccct tggcgagct caagagcacc
1321 ttaccggcc atgagatct ctcagcagc acctggctgc acagctcga cctcgtgac
1381 atggccagt cctaccacc gaccggccg gcccagtcg cggctatct gccggtcatg
1441 aacagcgtg cctgagctc cagggccta atttttaagg cctgaattt taaggcgaag
1501 gtgaaccgga agcggaggcc cgtcctcgg ggtctcctc cgcacaggtc accgagaacg
1561 gacggaggt ggacgtctg cgcaccgggt cgcgaccct gacggcgatc tcttcgaga
1621 tcttccctc cgtgtctac gttgtgaca acactgctt cgtcgggtc ttccggcgc
1681 tgcggggaa ggcagcgtc tccagcccg gatccgggaa ctcgcccctc ttgtcacc
1741 agcgtactc cacctcagc ggcaccggc ccaaccgtga ggtcggcgt aacgtggcg
1801 cctgggggt gggcggggg caggcaccg agtagctgt gtcacggcc gtagcgtca
1861 cctcaccga ctggggcgg ggggtctgc taccggccc gccaccggc cctccggag
1921 tggagccga gctgtgtg ccccgccgt cggcgtgtc gtcctgggg gttttgaac

Фиг. 56

SEQ ID NO: 47

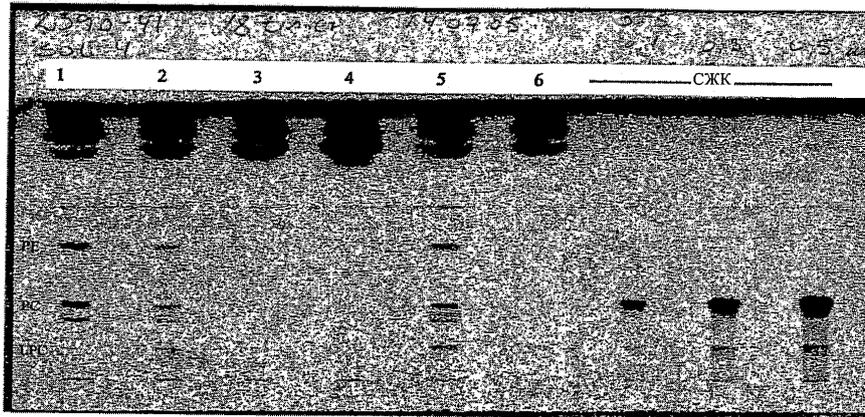
1 mgsgraatr rrlfigipal vivtaltlvi avptgreflw rrwceatqdw clgvpvdsrg
 61 qpaedgfeill lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gfavkggcwr sanaypelva
 121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn digfstvikt
 181 cmrvrplids kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilv gyprifpeep
 241 fgayyiltas nqrwlneti qefnqqlaeav avhdeeiaas ggvgsvefvd vyhaldghei
 301 gsdepwvngv qlrdlatgtv vdrstfhpna aghravgerv ieqietgpgr piyatfavva
 361 gatvdtlage vg

Фиг. 57

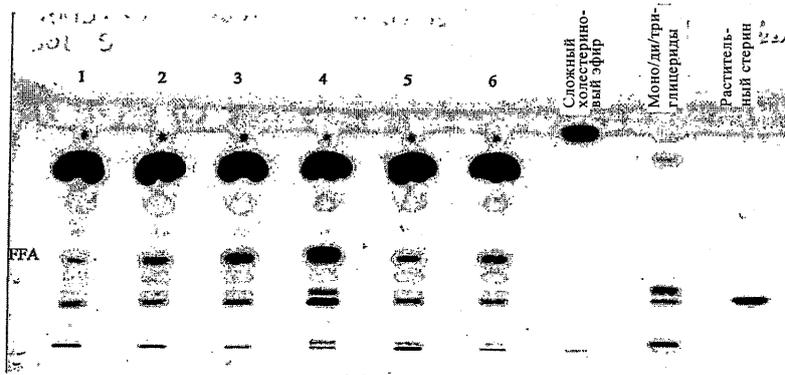
SEQ ID NO: 48

1 ctgcagacac cggccccgcc ttctccgga tegtcatgtt cggcgactcc ctcagcgaca
 61 cggcaagat gtactcaag atgogeggtt acctgcgctc ctccccgcc tactacgagg
 121 gccgttctc gaacggccc gtctggctgg agcagctgac gaagcagttc cccggccfga
 181 cgaicgccaa cgaggccgag gggggccgca ccgcagctgc ctacaacaag atctctctgga
 241 accogaagta ccaggtcatt aacaacctg actacgaggtt caccagttc ttgcagaagg
 301 actcgticaa gcccgacgac ctggtcatcc tgggggggg cggcaacgac tacctggcct
 361 acggllggaa cacggagcag gacgccaagc ggggtgcgca cgcacatctg gacgcggcaa
 421 accgatggt cctgaacggc gcaagcaga tctgtgttt caacctgcc gacctgggccc
 481 agaaccgctc cggccgctcc cagaaggctg tggaggccgt ctggcacgtg tccgctacc
 541 acaacaagct gctctcaac ctggccggc agctgcccc gacgggcatg gtcaagctgt
 601 tggagatga caagcagttc gcgagatgc tgcgcgacc ccaagaactc ggccctgagcg
 661 acgtggagaa cccgtgctac gacggcggct acgtgtggaa gccgttcgcc acccggtccg
 721 tctgaccga ccggcagctg tggcctctc cggcccagga ggcctctggc atcgctggca
 781 accgcctctc ggcacagcgg glagctcgc cgalggccc cgcctcgccc tggccctca
 841 actgcgagg caagatgctc tgggaccagg tccacccac caccgtggtc cagcgcgcc
 901 tctggagcg cggccacc ttcacgaga ccagtaoga gttctctgcc cactagtcta
 961 gaggatcc

Фиг. 58



Фиг. 59



Фиг. 60

1. Ll31
2. S. avermitilis
3. T. fusca
4. Консечуц

```

1 (1) -----MRLTRSLSAASVIVFALLIALLGISPAQAAG----- 50
2 (1) -----MRRSRITAYVTSLLLAVGCALFGAATQAQSPA-----
3 (1) VSGSPRAATRRLRFLGIPALVLTALTLVLAAPTGRETLWRMWCEATQDW
4 (1) MRRSRFLA ALIILTLA AL GAA ARAAP

1 (32) -----P-AYVALGDSYSSGNGAGSYID 100
2 (33) -----AAATGYVALGDSYSSGNGAGSYLS
3 (51) CLGVPVDSRGQPAEDGEFLLLSFVQAATWGNYYALGDSYSSGDGARDYYP
4 (51) A A YVALGDSYSSG GAGSY

1 (53) SSGD---CHRSNNAYPARWAAANAP---SSETFAACSGAVTTDVIN--- 150
2 (57) SSGD---CKRSSKAYPYLWQAAHSP---SSFSFMACSGARTGDVLA---
3 (101) G'PAVKGGCWRSANAYPELVAEAYDFA---GHLSFLACSGQRGYAMLDAIDE
4 (101) SSGD C RSTKAYPALWAAHA SSFSF ACSGARTYDVLA

1 (93) --NQLGALNAST--GLVSIITGGNDAGFADAMTTCVTS-----SDSTCL 200
2 (97) --NQLGTLNSST--GLVSLITGGNDAGFSDVMTTCVLQ-----SDSACL
3 (149) VGSQLDWNSPHT--SLVTIITGGNDLGFSTVLKTCMVR-----VPLLDS
4 (151) QL LNS T LVSITGGNDAGFAD MTTCVL SDSACL

1 (133) NRLATATNYINTTLA-----RLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMY 250
2 (137) SRINTAKAYVDSTLPG-----QLDSVYTAISTKAPSAHVAVLGYPRFY
3 (191) KACTDQEDAIRKMAKF-----ETTFEELISEVTRAPDARILVVGYPRIY
4 (201) RIA AK YI TLFA RLDSVYSAI TRAP ARVVVLGYPRIY

1 (176) LASNPWYCLGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAH-----GF 300
2 (180) KLGGSCLAGLSETKRSAINDAADYLNSAIAKRAADH-----GF
3 (237) PEEPTGAYYTLTASNQRWLNETIQEFNQQLAEAVAVHDEEIAASGGVGSV
4 (251) SG LGLS TKRAINDAAD LNSVIAKRAADH GF

1 (215) RFGDVRPFTFNNHELFFGNDWLHSLTLP-----VWESYH 350
2 (218) TFGDVKSTFTGHEICSSSTWLHSLDLLN-----IGQSYH
3 (287) EFDVYHALDGHGHEIGSDEPWVNGVQLRDLATG-----VTVDRSTFH
4 (301) TFGDV TF GHELCSA PWLHSLTLP V SYH

1 (248) PTSTGHQSGYLPVLNANSST----- 395
2 (252) PTAAGQSGGYLPVMNSVA-----
3 (328) PNAAGHRAVGERVIEQIETGPGRPLYATFAVVAGATVDTLAGEVG
4 (351) PTA GHAAGYLPVLSI T

```

Фиг. 61



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2