

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201891967** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2019.02.28

(51) Int. Cl. *C12N 9/14* (2006.01)
A23K 1/165 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.08.27

(54) **ПОЛИПЕПТИД ДЛЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ЗЕАРАЛЕНОНА И/ИЛИ ПРОИЗВОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЗЕАРАЛЕНОНА, ПОЛИНУКЛЕОТИД, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ НЕГО, А ТАКЖЕ СОДЕРЖАЩАЯ ПОЛИПЕПТИД ДОБАВКА, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ, А ТАКЖЕ СПОСОБ**

(31) А 667/2013

(32) 2013.08.28

(33) АТ

(62) 201690471; 2014.08.27

(71) Заявитель:
ЭРБЕР АКЦИЕНГЕЗЕЛЛЬШАФТ
(АТ)

(72) Изобретатель:
**Фрухауф Себастьян, Тамхесль
Михаэла, Пфедфер Мартин, Молль
Дитер, Шатцмаир Герд, Биндер Ева
Мария** (АТ)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Полипептид, гидролитически расщепляющий зеараленон и/или по меньшей мере одно производное соединение зеараленона и представляющий собой гидролазу с аминокислотной последовательностью из группы последовательностей SEQ ID NO: 1-15 или ее функциональным вариантом, причем идентичность последовательности между функциональным вариантом и по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей составляет по меньшей мере 40%, добавка, содержащая полипептид, а также изолированный выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, и способ гидролитического расщепления полипептидом зеараленона и/или по меньшей мере одного производного соединения зеараленона.

A1

201891967

201891967

A1

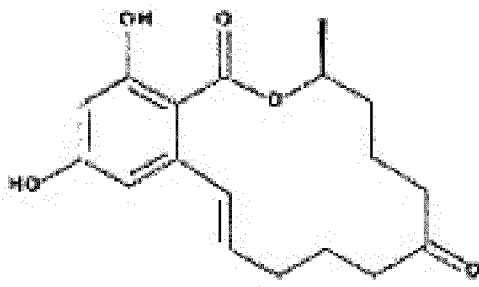
**ПОЛИПЕПТИД ДЛЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ЗЕАРАЛЕНОНА И/ИЛИ
ПРОИЗВОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЗЕАРАЛЕНОНА, ПОЛИНУКЛЕОТИД, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ
НЕГО, А ТАКЖЕ СОДЕРЖАЩАЯ ПОЛИПЕПТИД ДОБАВКА, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ, А
ТАКЖЕ СПОСОБ**

Настоящее изобретение относится к полипептиду для гидролитического расщепления зеараленона и/или по меньшей мере одного производного соединения зеараленона, к изолированному полинуклеотиду, кодирующему полипептид такого рода, к добавке, содержащей полипептид такого рода, к применению полипептида такого рода, а также к способу для гидролитического расщепления зеараленона и/или по меньшей мере одного производного соединения зеараленона.

Микотоксины представляют собой вторичные метаболиты, продуцируемые нитевидными грибами. Важным представителем микотоксинов является распространенный во всем мире зеараленон (ZEN), ранее известный как токсин F-2, продуцируемый большинством грибов рода *Fusarium*. Эти грибы поражают, в частности, культурные растения, такие, как различные виды зерновых, причем, как правило, грибковое поражение появляется перед сбором урожая, при этом рост грибов или продуцирование микотоксинов может происходить перед хранением или при ненадлежащем хранении, а также после сбора урожая. FAO оценивает, что во всем мире 25% сельскохозяйственных продуктов загрязнены микотоксинами, что ведет к значительным экономическим потерям. Во время исследования, проведенного в недавнее время во всем мире с января 2009 года по декабрь 2011 года, в целом была проанализирована 23 781 проба, причем 81% оказался положительным по меньшей мере на один микотоксин и 45% оказались положительными на ZEN. ZEN был найден также во всех регионах мира как во всех испытываемых зерновых и фуражных классах, таких, как, например, кукуруза, соевая мука, пшеница, пшеничные отруби, DDGS (высушенная барда), так и в готовых кормовых смесях с частотой до 100%.

ZEN представляет собой нестероидный, эстрогенный макроциклический лактон, синтезируемый вследствие обмена веществ

с участием поликетидов, имеющий структурную формулу:



и называемый по номенклатуре ИЮПАК (2E,11S)-15,17-дигидрокси-11-метил-12-оксабицикло [12.4.0]октадека-1(18),2,14,16-тетраен-7,13-дион.

Однако в природе встречается также большое число производных соединений ZEN, которые образуются благодаря ферментативной или химической модификации ZEN. Примерами тому являются гликозидные или сульфатсодержащие конъюгаты ZEN, которые образуются вследствие метаболизма в грибах, растениях или млекопитающих, а также метаболиты ZEN, которые образуются, в частности, в организме человека или животного. В последующем тексте под производными соединениями ZEN понимают как встречающиеся в природе, так и получающиеся вследствие химического или биохимического синтеза конъюгаты ZEN или метаболиты ZEN и предпочтительно α -зеараленол (α -ZEL; (2E,7R,11S)-7,15,17-тригидрокси-11-метил-12-оксабицикло [12.4.0]октадека-1(18),2,14,16-тетраен-13-он), β -зеараленол (β -ZEL; (2E,7S,11S)-7,15,17-тригидрокси-11-метил-12-оксабицикло [12.4.0]октадека-1(18),2,14,16-тетраен-13-он), α -зеараланол (α -ZAL; (7R,11S)-7,15,17-тригидрокси-11-метил-12-оксабицикло [12.4.0]октадека-1(18),14,16-триен-13-он), β -зеараланол (β -ZAL; (7S,11S)-7,15,17-тригидрокси-11-метил-12-оксабицикло [12.4.0]октадека-1(14),15,17-триен-13-он), зеараленон-14-сульфат (Z14S; [(2E,11S)-15-гидрокси-11-метил-7,13-диоксо-12-оксабицикло [12.4.0]октадека-1(18),2,14,16-тетраен-17-ил] гидросульфат), зеараленон-14-гликозид (Z14G; (2E,11S)-15-гидрокси-11-метил-17-[(3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил) тетрагидропиран-2-ил]окси-12-оксабицикло [12.4.0]октадека-1(18)2,14,16-тетраен-7,13-дион), а также зеараланон (ZAN; (11S)-15,17-дигидрокси-11-метил-12-

оксабицикло [12.4.0]октадека-1(18),14,16-триен-7,13-дион).

ZEN, также как и производные соединения ZEN, в первую очередь α -ZEL, β -ZEL, Z14S, α -ZAL, β -ZAL, Z14G и ZAN, вследствие своей высокой химической и физической стабильности могут быть обнаружены также в переработанных пищевых продуктах или кормах, таких, как, например, хлеб или пиво.

ZEN связывается с рецептором эстрогена и может обуславливать гормональные расстройства, причем он абсорбируется непосредственно после орального приема и превращается млекопитающими в два стереоизомерных метаболита α -ZEL или β -ZEL. При этом, например, α -ZEL, а также α -ZAL или ZAN, оказывают эстрогенное действие намного более сильное, чем ZEN. Конъюгированные производные соединения ZEN иногда проявляют эстрогенизм более низкий, чем ZEN, однако из этих производных соединений ZEN в пищеварительном тракте может вновь высвободиться ZEN.

Хотя ZEN обладает относительно низкой острой токсичностью и имеет значение оральной LD₅₀ до 20 000 мг/на кг массы тела, при длительном приеме может встречаться подострое и/или начальное хроническое токсическое действие, такое, как, например, тератогенное, карциногенное, эстрогенное и иммуносупрессивное действие у животных или людей. Корм, загрязненный ZEN, ведет к нарушениям развития у млекопитающих, причем свиньи, в особенности молодые животные, являются крайне чувствительными по отношению к ZEN. Концентрации ZEN в корме больше 0,5 млн⁻¹ ведут к нарушениям развития, причем, например, концентрации больше 1,5 млн⁻¹ могут вести к гиперэстрогенизму у свиней, а концентрации ZEN больше 12 млн⁻¹ были ответственными за выкидыши у крупного рогатого скота. Так как зеараленон быстро абсорбируется слизистыми оболочками, в частности слизистой оболочкой желудка, а также полости рта, то необходима немедленная и, в первую очередь, количественная дезактивация. Уже через 30 минут после перорального введения ZEN он может быть обнаружен в крови. При этом применение изолированных ферментов по сравнению с микроорганизмами имеет преимущества, заключающиеся в более

высокой удельной активности или в более быстром действии. Вследствие вредного действия ZEN в Европейском Союзе установлены обязательные верхние границы содержания ZEN в пищевых продуктах, а также рекомендованы верхние границы содержания ZEN в кормах (№ ЕС: 1881/2006).

Первичная стратегия для уменьшения загрязнения ZEN пищевых продуктов или кормов состоит в ограничении роста грибов, например, за счет соблюдения "надлежащей сельскохозяйственной практики". С этой целью, в частности, семенной материал освобождают от вредителей и грибкового поражения, а сельскохозяйственные отходы своевременно удаляют с полей. При этом благодаря применению фунгицидов может быть уменьшен рост грибов в условиях поля. После сбора урожай должен храниться с остаточной влажностью меньше 15% и при низкой температуре для предотвращения роста грибов. При этом продукт, затронутый грибковым поражением, должен быть удален перед дальнейшей переработкой. Несмотря на этот перечень мероприятий, I. Rodrigues и K. Naehrer (2012) сообщили, что даже в регионах с наивысшими сельскохозяйственными стандартами, таких, как США и Центральная Европа, в период с 2009 по 2011 год соответственно 29% и 39% проверенных проб кукурузы были загрязнены ZEN.

Другие возможности удаления ZEN из кормовых или пищевых продуктов предоставляет адсорбция или трансформация микотоксина. Для этого необходимо, чтобы связь микотоксина с адсорбентом была сильной и специфической в широкой области значений pH и оставалась стабильной в течение всего процесса пищеварения в желудочно-кишечном тракте. Хотя некоторые из адсорбентов небиологического происхождения, такие, как, например, активированный уголь, силикаты или синтетические полимеры, такие, как холестирамин, могут быть эффективно использованы в случае афлатоксинов, их применение в случае других микотоксинов является ограниченным. Существенный недостаток адсорбирующих агентов представляет собой неспецифическая связь с другими молекулами, которые частным порядком являются существенными для питания. Адсорбенты биологического происхождения, такие, как, например, дрожжи или дрожжевые экстракты, в литературе также

описаны, однако имеют похожие ограничения как и адсорбенты небиологического происхождения.

Детоксификация ZEN за счет физической и химической обработки также ограничена. ZEN не может быть эффективно деактивирован термической обработкой, однако содержание ZEN может быть уменьшено экструдированием и обработкой окислительными агентами, например в течение 16 ч при 80°C 10%-м раствором пероксида водорода, на 83,9%. Применение способов экструзии и окислительных агентов, таких, как озон или пероксид водорода, при производстве кормов и пищевых продуктов является ограниченным вследствие высоких расходов, потери качества, относительно низкой эффективности и низкой специфичности.

Биотрансформация ZEN посредством микроорганизмов, таких, как, например, штаммы *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Gliocladium roseum* или *Bacillus subtilis*, или выделенных из них ферментов, таких, как гидролазы или пероксидазы, описана, например, E. Vekiru et al. в "Appl. and Environ. Microb.", 2010, 76, 7, 2353-2359".

Из EP 0938575 B1 известны свойства бактерий вида *Rhodococcus* и *Nocardia*, предпочтительно *R. globerulus*, *R. erythropolis* и *N. globerula* в отношении расщепления ZEN.

Из WO 02/076205 может быть получена информация о расщепляющем ZEN действии ферментов, выделенных из *Gliocladium roseum*, в частности α/β -гидролазы, зеараленонгидролазы-1 (ZHD1), которая катализирует разложение ZEN посредством каталитической триады.

Из WO 2012/113827 можно получить информацию о рекомбинантных зеараленонгидролазах, а именно о расщепляющих ZEN ферментах, которые остаются стабильными в желудочно-кишечном тракте, в частности, там описаны такие микроорганизмы, как *Thermobifidia fusca*, *Streptomyces exfoliatus*, *Acidovorans delafieldii* и *Streptomyces sp.*

Полипептиды или ферменты, которые могут гидролизовать ZEN и/или по меньшей мере одно производное соединение ZEN, также могут быть обозначены как зеараленонгидролазы.

Используемые далее термины относятся к профессиональному языку и соответственно, если не указано иное, используются в традиционном значении. Так, например, термин "полинуклеотид" относится к любым видам генетического материала любых длин и последовательностей, таких, как, например, одинарная спираль и двойная спираль молекул ДНК и РНК, включая регуляторные элементы, структурные элементы, группы генов, плазмиды, полные геномы и их фрагменты. Термин "полипептид" охватывает белки, такие, как, например, ферменты, антитела, а также полипептиды, содержащие до 500 аминокислот, такие, как, например, пептидные ингибиторы, белковые домены, а также короткие полипептиды с малыми длинами последовательностей, например меньше 10 аминокислот, такие, как рецепторы, лиганды, пептидные гормоны, метки и т.п. Термин "позиция" в полинуклеотиде или полипептиде относится к отдельному, специфическому основанию или аминокислоте в последовательности полинуклеотида или полипептида.

Таким образом, настоящее изобретение направлено на разработку полипептида, с которым удастся ZEN и/или по меньшей мере одно производное соединение ZEN быстро и надежно трансформировать в гидролизованный ZEN и/или в гидролизованные производные соединения ZEN. С целью решения этой задачи настоящее изобретение по существу отличается тем, что полипептид представляет собой гидролазу с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей SEQ ID NO: 1-15, или ее функциональным вариантом, причем идентичность последовательности между функциональным вариантом и по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей составляет по меньшей мере 40%.

Термин "идентичность последовательности" соответственно настоящему изобретению относится к процентной идентичности последовательности. Для аминокислотных и нуклеотидных последовательностей идентичность последовательности может быть определена визуально, но предпочтительно ее рассчитывают посредством компьютерной программы. Сравнение последовательностей осуществляют также внутри участков

последовательностей, причем в качестве участка следует понимать непрерывную последовательность опорной последовательности, и предпочтительно охватывают консервативную область последовательности.

В данном случае идентичность последовательностей устанавливают посредством программы NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (программа поиска основных локальных выравниваний)), предпочтительно программы BLASTP в случае полипептидов и программы BLASTN в случае полинуклеотидов, которые доступны для использования на интернет-странице "National Center for Biotechnology Information" (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Таким образом, две или несколько последовательностей можно сравнивать друг с другом по алгоритму Altschul et al. (1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). С этой целью в настоящем изобретении была использована программа в версии от 15 мая 2013 года. В качестве программных установок были приняты базовые установки и, в частности, для выравнивания аминокислотных последовательностей: "max target sequence" (максимальное число целевых последовательностей) = 100; "expected threshold" (ожидаемый порог) = 10; "word size" (длина слова) = 3; "matrix" (матрица) = BLOSUM62; "gap costs" (штрафы за разрыв) = "Existence (существование): 11; Extension (продолжение): 1"; "computational adjustment" (вычислительная корректировка) = "Conditional compositional score matrix adjustment" (условная композиционная корректировка матрицы счета); а также для Word Size (длина слова) при выравнивании нуклеотидных последовательностей: 11; Expect value (ожидаемая значимость): 10; Gap costs (штрафы за разрыв): Existence (существование) = 5, Extension (продолжение) = 2; Filter (фильтр) = low complexity activated (активирована сложность низкого уровня); Match/Mismatch Scores (счет соответствий/несоответствий): 2, -3; Filter String (строка фильтра): L; m.

Выражения "функциональный вариант полипептида" или "функциональный вариант" относятся, во-первых, к "аллельным вариантам" полипептида и к "функциональным фрагментам"

полипептида, а во-вторых, к "модификации" полипептида, причем ферментативная функция по существу не изменяется. Термин "аллельный вариант" относится к полипептиду, который возникает благодаря одной или нескольким случайно происходящим в природе мутациям нуклеотидной последовательности и способствует изменению аминокислотной последовательности, причем на его ферментативную функцию влияние не оказывается. "Модификации" могут представлять собой, например, С- или N-концевые слияния с полипептидами или мутированные полипептиды, причем мутации могут быть получены заменой, вставкой или удалением по меньшей мере одной аминокислоты, предпочтительно сайт-специфическим мутагенезом или случайным мутагенезом, рекомбинацией и/или любым другим биоинженерным способом. Термины "замена", "инсерция" и "делеция" являются традиционными в генной инженерии и используются специалистами в данной области техники в традиционно понимаемом значении. Выражение "функциональный фрагмент" относится к части или к частичной последовательности полипептида или к части или к частичной последовательности его функционального варианта, причем ферментативная функция по существу сохраняется. Ферментативная функция по существу сохраняется тогда, когда неизменным остается механизм ферментативной реакции, т.е. микотоксин гидролизуетсЯ благодаря одному и тому же сайту, а удельная остаточная активность "функционального варианта" составляет по меньшей мере 5%, преимущественно по меньшей мере 10% и предпочтительно по меньшей мере 50% в расчете на изначальный полипептид. В случае полипептидов с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 1-15 речь идет о функциональных аллельных вариантах друг с другом или одного и того же фермента, причем последовательности соответственно происходят из различных микроорганизмов. Это ясно видно из близкого сродства друг к другу, различимым образом определяемого по процентной идентичности последовательностей, а также из того факта, что все полипептиды воздействуют на ZEN и производные соединения ZEN по одному и тому же механизму разложения.

На основе сходства между собой аминокислотных

последовательностей полипептидов с SEQ ID NO: 1-15 обеспечивается возможность того, что функциональный вариант одного из этих полипептидов обладает идентичностью последовательности по меньшей мере на 40% больше, чем один из задействованных полипептидов с SEQ ID NO: 1-15.

Благодаря выбору аминокислотной последовательности такого рода или ее функционального варианта обеспечивается поразительно быстрый и полный гидролиз ZEN и/или по меньшей мере одного производного соединения ZEN.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая содержит по меньшей мере один консервативный участок аминокислотной последовательности или его функциональный вариант, причем функциональный вариант участка аминокислотной последовательности имеет идентичность последовательности по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 84%, более предпочтительно по меньшей мере 92% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% и по меньшей мере один консервативный участок аминокислотной последовательности выбран из группы аминокислотных последовательностей от +24 до +50, от +52 до +77, от +79 до +87, от +89 до +145, от +150 до +171, от +177 до +193, от +223 до +228, от +230 до +237, от +239 до +247, от +249 до +255, от +257 до +261, от +263 до +270, от +272 до +279, от +297 до +301, от +303 до +313, от +24 до 328, от +1 до +328 последовательности с SEQ ID NO: 1. Благодаря наличию по меньшей мере одного консервативного участка аминокислотной последовательности такого рода удается разработать полипептид, который наряду с быстрым и полным гидролизом ZEN и/или по меньшей мере одного производного соединения ZEN обладает также особенно высокой активностью по сравнению с известными в настоящее время полипептидами, разлагающими ZEN.

Стабильно хорошие результаты удалось достигнуть тогда, когда соответственно другому варианту осуществления настоящего изобретения функциональный вариант содержал по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, выбранную из группы замен, делеций и

инсерций одной или нескольких аминокислот.

Благодаря дальнейшей разработке настоящего изобретения, так что полипептид характеризуется удельной активностью, равной по меньшей мере 0,01 ед/мг, преимущественно по меньшей мере 0,1 ед/мг и предпочтительно по меньшей мере 1 ед/мг, и/или константой K_M гидролитического расщепления ZEN, равной не более 50 мкМ, преимущественно не более 3,5 мкМ и предпочтительно не более 0,5 мкМ, и/или константой k_{cat} гидролитического расщепления ZEN, равной по меньшей мере 0,05 с⁻¹, преимущественно по меньшей мере 0,6 с⁻¹ и предпочтительно по меньшей мере 5 с⁻¹, и/или константой v_{max} гидролитического расщепления ZEN, равной по меньшей мере 0,00001 мкМ⁻¹·с⁻¹, преимущественно по меньшей мере 0,0001 мкМ⁻¹·с⁻¹ и предпочтительно по меньшей мере 0,001 мкМ⁻¹·с⁻¹, ZEN и/или производные соединения ZEN могут быть особенно быстро и полностью гидролизированы и предпочтительно детоксифицированы.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей SEQ ID NO: 2, 5-7, 9, 11, 12 и 15, или ее функциональный вариант, причем функциональный вариант имеет по меньшей мере 40% идентичности последовательности по сравнению по меньшей мере с одной из аминокислотных последовательностей, а рН-зависимая стабильность полипептида при рН=5,0 составляет по меньшей мере 15%, предпочтительно 50% и особенно предпочтительно по меньшей мере 90%. Благодаря другому варианту осуществления такого рода может быть обеспечено то, что полипептид будет расщеплять или детоксифицировать зеараленон и/или по меньшей мере одно производное соединение зеараленона также и в кислой среде, такой, как, например, среда, имеющаяся в желудках млекопитающих. При этом рН-зависимую стабильность полипептидов определяют как процентную остаточную активность полипептидов при рН=5,0 по отношению к активности при соответствующем оптимальном значении рН.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей SEQ

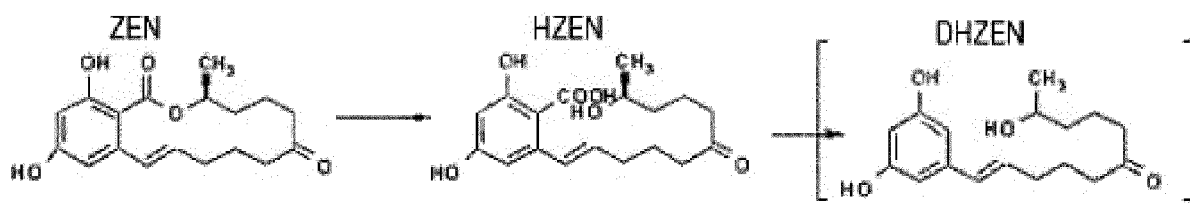
ID NO: 1, 2, 5-7, 9, 11 и 15, или ее функциональный вариант, причем функциональный вариант имеет по меньшей мере 40% идентичности последовательности по сравнению по меньшей мере с одной из аминокислотных последовательностей, а полипептид обладает наиболее высокой ферментативной активностью в температурном интервале от 30 до 75°C, предпочтительно от 38 до 55°C и особенно предпочтительно от 38 до 52°C. Благодаря другому варианту осуществления такого рода по настоящему изобретению обеспечивается то, что зеараленон и/или по меньшей мере одно производное соединение зеараленона также и при мезофильных температурах, как, в частности, в случае температуры тела человека и сельскохозяйственных животных, гидролизуются или детоксифицируются полипептидом. Температуру, при которой полипептид обладает наибольшей ферментативной активностью, определяют как значение температурного оптимума полипептида.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей SEQ ID NO: 1, 5, 6, 9, 11, 12 и 15, или ее функциональный вариант, причем функциональный вариант имеет по меньшей мере 40% идентичности последовательности по сравнению по меньшей мере с одной из аминокислотных последовательностей, а полипептид является термически стабильным до температуры 90°C, предпочтительно 75°C и особенно предпочтительно 60°C. Благодаря этому обеспечивается то, что полипептид и собственно его ферментативная функция остаются по существу неизменными при повышенной тепловой нагрузке, которая может иметь место, например, во время транспортировки в контейнере или во время гранулирования кормов. Термическую стабильность полипептидов определяют как температуру, при которой полипептиды после 15-минутной предварительной инкубации обладают 50%-й остаточной активностью по сравнению с активностью при соответствующем значении температурного оптимума.

Полипептид может быть выбран так, чтобы он представлял собой α/β -гидролазу, которая является приемлемой для независящего от

кислорода и в отсутствие кофакторов гидролитического расщепления сложноэфирной группировки зеараленона и/или производных соединений ZEN, и содержит катализирующую гидролитическое расщепление аминокислотную триаду, состоящую из серина, аминокислоты с кислой реакцией, выбранной из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты и предпочтительно из аспарагиновой кислоты, а также из гистидина, и представляющую собой каталитическую триаду, например S128, D264 и H303, причем позиционирование приведено относительно SEQ ID NO: 1.

Гидролиз ZEN и производных соединений ZEN каждым из полипептидов с SEQ ID NO: 1-15 происходит по сложноэфирной группе зеараленона или его производных соединений согласно следующему механизму реакции:



Гидролиз ZEN до неядовитого гидролизованного зеараленона (HZEN) или гидролизованных производных соединений ZEN происходит благодаря полипептидам по настоящему изобретению и предпочтительно α/β -гидролазам. Последующее декарбокислирование HZEN до декарбокислированного гидролизованного ZEN (DHZEN) или декарбокислированных гидролизованных производных соединений ZEN происходит, как правило, спонтанно.

В частности, посредством указанной ранее каталитической триады удастся полностью гидролизовать ZEN и производные соединения ZEN, причем реакция разложения характеризуется хорошей pH-зависимой стабильностью, в частности в случае значений pH в кислой области.

Неожиданно было выявлено, что с полипептидом, который на участке последовательности, состоящем из 3 аминокислот перед серином и 3 аминокислот после серина указанной ранее каталитической триады, содержит по меньшей мере одну полярную аминокислоту, выбранную из Y, Q, N, T, K, R, E, D, и по меньшей мере одну неполярную аминокислоту, выбранную из F, M, L, I, V,

А, G, P, удается достигать стабильно хорошие результаты и, кроме того, улучшить по меньшей мере одну ферментативно-кинетическую характеристику.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид имеет по меньшей мере одну мутацию аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 1 по меньшей мере в одной из следующих позиций: 22, 23, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 35, 37, 42, 43, 46, 51, 53, 54, 57, 60, 69, 72, 73, 78, 80, 84, 88, 95, 97, 99, 114, 118, 119, 123, 132, 141, 146, 148, 149, 154, 163, 164, 165, 169, 170, 172, 176, 180, 182, 183, 190, 191, 194, 196, 197, 198, 201, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 212, 213, 214, 216, 217, 220, 221, 222, 229, 231, 233, 238, 240, 244, 245, 246, 248, 249, 251, 254, 256, 260, 262, 263, 266, 269, 271, 277, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 292, 296, 298, 302, 307, 308, 309, 311, 314, 317, 319, 321, 323, 325 и 326. Эти позиции следуют из различий последовательности полипептида с SEQ ID NO: 1 и особенно активных полипептидов с SEQ ID NO: 2-6, имеющих с этой последовательностью высокую степень идентичности. Благодаря тому, что полипептид с SEQ ID NO: 1 изменяют по меньшей мере в одной из этих позиций так, что получают варианты аминокислот последовательностей SEQ ID NO: 2-6 в этой позиции, удается показать, что эти позиции оказывают значительное влияние на ферментативно-кинетические характеристики полипептида, при этом комбинации последовательности SEQ ID NO: 1 с одной из последовательностей SEQ ID NO: 2-6, имеющих высокую степень идентичности последовательности, ведут к более высокой активности.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения полипептид имеет в аминокислотной последовательности по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы: D22A, S23Q, S23L, N25D, I26V, F27Y, F27H, S29P, R31A, F32Y, R35K, R35Q, V37A, V42I, V43T, F46Y, S51E, S51D, D53G, N54M, N54R, L57V, L60I, S69G, P72E, V73A, A78S, N80H, F84Y, I88L, T95S, T97A, R99K, I114M, I118V, K119R, V123I, L132V, A141S, I146V, I146L, A148G, A149V, A154P, P163T, A164T, Y165C, Y165H, V169I, L170R, A172G, A176M, A176V, Y180F, D182T, F183Y, I190V, G191S, K194T,

K194E, F196Y, V197C, V197R, E198R, E198S, K201D, K201G, P204S, P204A, A205S, K206P, A207M, M208A, Q209R, L210A, L210S, ΔP212, T213V, P214A, E216T, E216G, A217I, N220H, L221M, K222R, K222Q, G229A, A231V, F233W, F233Y, F233H, A238G, H240N, H240S, D244E, R245Q, M246L, S248T, S248N, S248G, Q249R, K251N, I254V, I256L, A260M, T262D, T262G, I263T, E266D, E269H, E269N, L271V, L277E, E280A, E280L, H281R, H281Q, A282V, Q283R, D284L, D284R, I285L, I286M, R287E, R287D, R292K, R292T, Q296A, Q296E, H298V, L302S, L307Q, F308S, D309A, A311P, A314V, L317F, S319Q, S319P, S319R, S321A, S321T, T323A, P325A, A326P, относительно SEQ ID NO: 1. Полипептидом такого рода удается полностью гидролизовать и предпочтительно детоксифицировать ZEN в течение короткого времени, причем удельная активность полипептида составляет по меньшей мере 6,00 ед/мг, преимущественно по меньшей мере 7,00 ед/мг и предпочтительно по меньшей мере 8,00 ед/мг. Размерность "ед" или также "единица" представляет собой меру абсолютной каталитической активности и определяется по гидролизу 1 мкмоль ZEN в минуту при 32°C в 50 мМ буферном растворе Tris-HCl (pH=8,2), причем под "каталитической активностью" понимают ферментативное превращение субстрата в определенных условиях реакции, а под "удельной активностью" понимают соотношение каталитической активности и массовой концентрации полипептида (масса на единицу объема).

Благодаря тому, что полипептид сформирован так, что содержится по меньшей мере один из следующих аминокислотных мотивов с SEQ ID NO: 32-50, удается разработать полипептиды, которые имеют удельную активность по меньшей мере 7,00 ед/мг и предпочтительно по меньшей мере 8,00 ед/мг. Неожиданно оказалось, что когда содержится по меньшей мере один из следующих аминокислотных мотивов с последовательностью с SEQ ID NO: 51-58, ферментативная активность полипептида, например, по сравнению с мотивом, содержащим 7 аминокислот, еще больше повышается. Еще более высокая удельная активность достигается тогда, когда содержится по меньшей мере один из следующих аминокислотных мотивов с последовательностью с SEQ ID NO: 59-69.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения полипептид имеет по меньшей мере одну консервативную замену аминокислоты по меньшей мере в одной позиции, причем консервативная замена аминокислоты выбрана из замен G на A или A на G, S, или V на I, L, A, T, S, или I на V, L, M, или L на I, M, V, или M на L, I, V, или P на A, S, N, или F на Y, W, H, или Y на F, W, H, или W на Y, F, H, или R на K, E, D, или K на R, E, D, или H на Q, N, S, или D на N, E, K, R, Q, или E на Q, D, K, R, N, или S на T, A, или T на S, V, A, или C на S, T, A, или N на D, Q, H, S, или Q на E, N, H, K, R. При этом выражение "консервативная замена аминокислоты" относится к замене одной аминокислоты другой аминокислотой, которая рассматривается специалистами в данной области техники в качестве консервативной, то есть обладающей похожими специфическими свойствами. Такие специфические свойства представляют собой, например, размеры, полярность, гидрофобность, заряд или константа pK_a аминокислоты. Под консервативной мутацией понимают, например, замену одной аминокислоты с кислой реакцией другой аминокислотой с кислой реакцией, одной аминокислоты с щелочной реакцией другой аминокислотой с щелочной реакцией или одной аминокислоты с полярным характером другой аминокислотой с полярным характером.

Консервативной заменой аминокислот такого рода удастся получать функциональные варианты полипептидов, удельная активность которых по сравнению с исходным полипептидом приблизительно равна по силе, однако предпочтительно выше по меньшей мере на 0,1 ед/мг.

Настоящее изобретение направлено также на разработку изолированного полинуклеотида, с которым удастся получить полипептид для быстрого и надежного гидролитического расщепления ZEN и/или по меньшей мере одного производного соединения ZEN.

С целью решения этой задачи настоящее изобретение отличается тем, что изолированный полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, причем полипептид обладает свойством гидролизовать зеараленон и/или по меньшей мере одно производное соединение зеараленона, и

нуклеотидная последовательность кодирует по меньшей мере один полипептид по любому из пп.1-11 и/или нуклеотидная последовательность имеет степень идентичности последовательности по меньшей мере с одной из последовательностей, выбранных из группы последовательностей SEQ ID NO: 16-31, причем выбранная нуклеотидная последовательность составляет по меньшей мере 40%, и/или нуклеотидная последовательность в среднежестких условиях гибридизуется по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы последовательностей SEQ ID NO: 16-31, и/или ее частичной последовательностью по меньшей мере из 200 нуклеотидов и предпочтительно по меньшей мере из 100 нуклеотидов, и/или комплементарной цепью нуклеотидной последовательности или ее частичной последовательностью.

Сверхэкспрессирующие нуклеотидные последовательности, предпочтительно их триплеты (кодоны), изменяются, как правило, в зависимости от клетки-хозяина, так что отклонение кодона оптимизируется в зависимости от клетки-хозяина. Результат этого состоит в том, что полинуклеотиды со степенью идентичности последовательности значительно меньше 80%, а также меньше 70% или меньше 60% также могут кодировать один и тот же полипептид. Сравнение последовательностей для определения степени идентичности последовательности должно осуществляться также внутри участков последовательностей, причем участок следует понимать в качестве непрерывной последовательности опорной последовательности. Длина участков последовательностей в случае нуклеотидных последовательностей, как правило, составляет от 15 до 600.

Посредством предложенных изолированных нуклеотидных последовательностей или участков последовательностей удастся генерировать зонды из нуклеиновых кислот, длина которых, как правило, составляет по меньшей мере 15, 30, или 40 нуклеотидов. Благодаря таким зондам, которые, как правило, дополнительно метят, например, посредством ^3H , ^{32}P , ^{35}S , биотина или авидина, могут быть при применении стандартных способов идентифицированы нуклеотидные последовательности, которые кодируют полипептиды с разлагающим действием в отношении ZEN и/или производных

соединений ZEN. В качестве исходного материала для идентификации таких последовательностей могут быть использованы, например, ДНК, РНК или кДНК отдельных микроорганизмов, геномные библиотеки ДНК или библиотеки кДНК.

Для нуклеотидных последовательностей или нуклеотидных зондов с длинами по меньшей мере в 100 нуклеотидов среднежесткие условия определяют как предгибридизацию и гибридизацию при 42°C в 5-кратном буферном растворе Na-ЭДТА с добавкой NaCl (SSPE, 0,9M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 6 mM ЭДТА), содержащем 0,3% додецилсульфата натрия (SDS), 200 мкг/мл дефрагментированной и денатурированной ДНК спермиев лосося и 35% формамида, с последующим осуществлением саузэрн-блоттинга в стандартных условиях, причем материал носителя в конце промывают три раза по 15 минут 2-кратным натрийхлоридно-цитратным буферным раствором SSC, 300 mM NaCl и 30 mM тринатрийцитрата, 0,2% SDS) при 55°C.

Для нуклеотидных последовательностей или нуклеотидных зондов с длинами от 15 до 100 нуклеотидов среднежесткие условия определяют как предгибридизацию и гибридизацию в буферном растворе, в который входят 0,9M NaCl, 0,09M раствор Tris-HCl с рН=7,6, 6 mM ЭДТА, 0,5% NP-40, 1-кратный раствор Денхардта, 1 mM пиродифосфата натрия, 1 mM дигидродифосфата натрия, 0,1 mM АТФ и 0,2 мг/мл РНК дрожжей, причем предгибридизацию и гибридизацию осуществляют при температуре ниже расчетной температуры плавления (T_m) на значение от 5 до 10°C, причем T_m определяют расчетом по Bolton и McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390). Затем осуществляют саузэрн-блоттинг в стандартных условиях (J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York). Материал носителя в конце промывают один раз в течение 15 минут 6-кратным буферным раствором SCC, содержащим 0,1% SDS, и два раза по 15 минут 6-кратным буферным раствором SSC соответственно при температуре ниже расчетной T_m на значение от 5 до 10°C.

Настоящее изобретение направлено также на разработку добавки, с которой достигается быстрое и надежное

гидролитическое расщепление ZEN и/или по меньшей мере одного производного соединения ZEN в определенной или сложной матрице, такой, как, например, корма или пищевые продукты.

С целью решения этой задачи разработана добавка, гидролитически расщепляющая зеараленон и/или по меньшей мере одно производное соединение зеараленона, причем добавка содержит по меньшей мере один полипептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей SEQ ID NO: 1-15, или ее функциональным вариантом, причем идентичность последовательности между функциональным вариантом и по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей составляет по меньшей мере 40%, и при необходимости содержит вспомогательные вещества.

С добавкой такого рода достигается биохимическое превращение ZEN и/или по меньшей мере одного производного соединения ZEN в гидролизированный ZEN и/или гидролизованное производное соединения ZEN. Эта добавка может быть использована также, например, для стереоселективного гидролиза ZEN и/или производных соединений ZEN в промышленном масштабе.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения добавка сформирована так, что вспомогательные вещества выбирают по меньшей мере из одного инертного носителя, а также при необходимости из других компонентов, таких, как витамины и/или минеральные вещества, и/или ферменты, и/или другие компоненты для детоксификации микотоксинов. Благодаря применению добавки такого рода, например, в кормах или пищевых продуктах может быть обеспечено то, что содержащееся при некоторых условиях количество ZEN и/или производных соединений ZEN безопасно гидролизуется и предпочтительно детоксифицируется так, что вредное действие на организм субъекта, употребляющего этот корм или пищевой продукт, не оказывается.

При этом полипептид по настоящему изобретению может находиться также в ферментной композиции, которая наряду по меньшей мере с одним полипептидом по настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один фермент, который, например, участвует в разложении протеинов, такой, как,

например, протеазы, или участвует в метаболизме крахмала или волокон, или жиров, или гликогена, такой, как, например, амилаза, целлюлаза или глюканаза, а также, например, гидролазы, липолитические ферменты, маннозидазы, оксидазы, оксидоредуктазы, фитазы, ксиланазы и/или их комбинации.

Другие аспекты применения настоящего изобретения относятся к ферментным композициям, которые наряду по меньшей мере с одним полипептидом по настоящему изобретению дополнительно содержат по меньшей мере один компонент для детоксификации микотоксинов, такой, как разлагающий микотоксины фермент, такой, как, например, афлатоксиноксидаза, эрготаминагидролазы, эрготаминамидазы, зеараленонэстеразы, зеараленонлактоназы, охратоксинамидазы, фумонизинкарбоксилэстеразы, фумонизинаминотрансферазы, аминополиоламинооксидазы, дезоксиниваленолэпоксидгидролазы, и/или содержат по меньшей мере один разлагающий микотоксины микроорганизм, такой, как *Bacillus subtilis*, и/или по меньшей мере один связывающий микотоксины компонент, например бактериальные клеточные стенки или неорганические материалы, такие, как бентонит.

Согласно особенно предпочтительному другому варианту осуществления настоящего изобретения полипептид содержится в добавке в концентрации не более 10 000 ед/г, предпочтительно не более 1 000 ед/г, более предпочтительно не более 100 ед/г и наиболее предпочтительно не более 10 ед/г, благодаря чему удается ZEN и/или производные соединения ZEN быстро и, в частности, уже перед их резорбцией в теле субъекта, употребляющего загрязненный корм или пищевой продукт, предпочтительно млекопитающего, превращать в нетоксичные или малотоксичные метаболиты, предпочтительно в HZEN и DHZEN.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения полипептид находится в капсулированной или покрытой форме, причем для капсулирования или покрывания могут быть использованы стандартные способы, такие, как, например, способы, описанные в WO 92/12645. Благодаря капсулированию или покрыванию удается транспортировать полипептид без изменения, в частности без разложения и повреждения, к месту его применения, так что

только после растворения защитной оболочки, например, в пищеварительном тракте животных полипептид начинает действовать, вследствие чего может быть достигнуто еще более целенаправленное, быстрое и полное разложение ZEN и/или производных соединений ZEN также и в кислых, обогащенных протеазой и анаэробных средах. При этом благодаря капсулированию или покрыванию удается повысить также термическую стабильность полипептидов в добавке.

Настоящее изобретение относится также к применению добавки для гидролитического расщепления зеараленона и/или по меньшей мере одного производного соединения зеараленона в кормах предпочтительно для свиней, домашней птицы и аквакультуры, в пищевых продуктах или в высушенной барде. Благодаря применению добавки по настоящему изобретению удается гидролизовать или детоксифицировать ZEN и/или производные соединения ZEN, содержащиеся в пищевом продукте или в корме, или в высушенной барде, причем детоксикация такого рода достигается уже при концентрации полипептидов около 1 ед/г загрязненного корма или пищевого продукта.

Настоящее изобретение направлено также на разработку способа, с которым удается обеспечить быстрое и надежное гидролитическое расщепление ZEN и/или по меньшей мере одного производного соединения ZEN.

С целью решения этой задачи способ осуществляют так, что зеараленон и/или по меньшей мере одно производное соединение зеараленона гидролизуют полипептидом с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей SEQ ID NO: 1-15, или ее функциональным вариантом, причем идентичность последовательности между функциональным вариантом и по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей составляет по меньшей мере 40%.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения способ осуществляют так, что полипептид используют в одной из добавок по настоящему изобретению.

Согласно другому предпочтительному варианту способ осуществляют так, что полипептид или добавку прибавляют к корму

или пищевому продукту, загрязненному зеараленоном и/или по меньшей мере одним производным соединением зеараленона, так что загрязненный корм или пищевой продукт приводится в контакт с влагой, а полипептид или добавка гидролизуют зеараленон и/или по меньшей мере одно производное соединение зеараленона, содержащиеся в загрязненном корме или пищевом продукте. В случае влажных кормов или пищевых продуктов, таких, как пульпы или кашицы, гидролиз зеараленона и/или по меньшей мере одного производного соединения зеараленона будет происходить во влажном корме или пищевом продукте перед оральным приемом. Благодаря такому способу может быть обеспечено то, что вредящее действие зеараленона и производных соединений зеараленона на человека и животное устраняется в значительной степени. При этом в качестве влаги понимают присутствие воды или водосодержащих жидкостей, причем в их число входят также, например, слюна или другие жидкости, имеющиеся в пищеварительном тракте. В качестве пищеварительного тракта понимают полость рта, глотку (зев), пищевод и желудочно-кишечный тракт или их эквиваленты, причем в случае животных могут использоваться разные термины или в пищеварительном тракте животных могут отсутствовать отдельные компоненты.

Способ по настоящему изобретению может быть осуществлен также в варианте, когда корм или пищевой продукт гранулируют перед оральным приемом.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения способ осуществляют так, что гидролизуется по меньшей мере 70%, преимущественно по меньшей мере 80% и предпочтительно по меньшей мере 90% зеараленона и/или по меньшей мере одного производного соединения зеараленона. Благодаря этому может быть предотвращено подострое и/или начальное хроническое токсическое действие, такое, как, например, тератогенное, карциногенное, эстрогенное и иммуносупрессивное действие у животных или людей.

В последующем описании настоящее изобретение более подробно поясняется примерами осуществления и фигурами. На фигурах показано:

на фиг. 1 показаны зависимости от времени степени разложения ZEN и увеличения количества метаболитов HZEN и DHZEN в случае полипептида с SEQ ID NO: 1, причем на фиг. 1А полипептид не имеет метки, на фиг. 1В полипептид имеет С-концевую метку 6His, а на фиг. 1С имеет N-концевую метку 6His;

на фиг. 2 показана кинетика согласно уравнению Михаэлиса-Ментен в случае полипептида с SEQ ID NO: 1;

на фиг. 3 показаны зависимости от времени степени разложения ZEN и увеличения количества метаболитов HZEN и DHZEN в случае очищенных полипептидов с SEQ ID NO: 1 (фиг. 3А), 2 (фиг. 3В), (фиг. 3С), 6 (фиг. 3D), 7 (фиг. 3Е), 9 (фиг. 3F), (фиг. 3G), (фиг. 3H) и 15 (фиг. 3I), причем все последовательности имеют С-концевую метку 6His.

Пример 1. Модификация, клонирование и экспрессия полинуклеотидов, кодирующих полипептиды, которые могут гидролитически расщеплять ZEN и/или по меньшей мере одно производное соединение ZEN

Замены, инсерции или делеции аминокислот осуществляли мутацией нуклеотидных последовательностей посредством ПЦР с применением набора "Quick-change Site-directed Mutagenesis Kits" (компания "Stratagene") согласно инструкции. Альтернативно этому были использованы также полные нуклеотидные последовательности (компания "GeneArt"). Нуклеотидные последовательности, генерированные с использованием набора для мутагенеза посредством ПЦР или полученные от компании "GeneArt", необязательно дополнительно имели на аминокислотном уровне С- или N-концевую метку 6His и стандартными способами были интегрированы в экспрессирующие векторы для экспрессии в *E. coli* или *P. pastoris*, трансформированы в *E. coli* или *P. pastoris*, а также экспрессированы в *E. coli* или *P. pastoris* (J.M. Cregg, *Pichia Protocols*, second Edition, ISBN-10: 1588294293, 2007; J. Sambrook et al. 2012, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 4th Edition, Cold Spring Harbor), причем для этой задачи может быть использована также любая другая приемлемая клетка-хозяин.

Термин "экспрессирующий вектор" относится к конструкции ДНК, которая в состоянии экспрессировать ген *in vivo* или *in vitro*. В

частности, под конструкциями ДНК понимают также конструкции, которые являются приемлемыми для переноса нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, в клетку-хозяин, чтобы там быть интегрированной в геном или свободно находиться в экстрахромосомальном пространстве и внутриклеточно экспрессировать нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и при необходимости для вывода полипептида из клетки.

Термин "клетка-хозяин" относится ко всем клеткам, которые содержат сверхэкспрессирующую нуклеотидную последовательность или экспрессирующий вектор и могут продуцировать полипептид по настоящему изобретению. В частности, под прокариотическими и/или эукариотическими клетками предпочтительно понимают *P. pastoris*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Hansenula*, *Trichoderma*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, клетки растений и/или споры *Bacillus*, *Trichoderma* или *Aspergillus*.

Для определения каталитических свойств полипептидов использовали растворимый клеточный лизат в случае *E. coli* или надосадочную жидкость культуры в случае *P. pastoris*. Для определения констант K_m , v_{max} , k_{cat} и удельной активности полипептиды селективно концентрировали стандартными способами в хроматографических колонках с насадкой из никельсефарозы. Определение концентрации белка осуществляли стандартными способами, например способом BCA (Pierce BCA Protein Assay KitProd # 23225), однако предпочтительно определяли фотометрически с удельными коэффициентами поглощения для соответствующих белков, рассчитываемыми по программе "ProtParam", доступной для использования по интернет-адресу "<http://web.expasy.org/protparam>" (Gasteiger E. et al.; *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 2005, pp. 571-607).

Пример 2. Определение идентичности последовательности и консервативных участков аминокислотной последовательности

Определение процентной идентичности последовательности по всей длине полипептидов с аминокислотными последовательностями с

SEQ ID NO: 1-15 относительно друг друга (таблица 1) осуществляли по программе BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (программа поиска основных локальных выравниваний)) и предпочтительно по программе BLASTP, которыми можно воспользоваться на интернет-странице "National Center for Biotechnology Information" (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Таким образом, две или несколько последовательностей можно сравнивать друг с другом по алгоритму Altschul et al. (1997, *Nucleic Acids Res.*, (1997) 25:3389-3402). В качестве программных установок были приняты базовые установки и предпочтительно: "max target sequence" (максимальное число целевых последовательностей) = 100; "expected threshold" (ожидаемый порог) = 10; "word size" (длина слова) = 3; "matrix" (матрица) = BLOSUM62; "gap costs" (штрафы за разрыв) = "Existence (существование): 11; Extention (продолжение): 1"; "computational adjustment" (вычислительная корректировка) = "Conditional compositional score matrix adjustment" (условная композиционная корректировка матрицы счета).

Для определения консервативных участков аминокислотных последовательностей полипептиды с SEQ ID NO: 1-6, имеющими идентичность последовательности по меньшей мере 70% по сравнению друг с другом, сравнивали посредством компьютерной программы COBALT (J.S. Papadopoulos und R. Agarwala, 2007, COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences, *Bioinformatics* 23:1073-79) с использованием стандартных параметров и предпочтительно следующих параметров: ("Gap penalties" (штрафы за разрыв): -11, -1; "End-Gap Penalties" (штрафы за окончание разрыва): -5, -1; "Use RPS BLAST" (использование "RPS BLAST"): on (включено); "Blast E-value" (ожидаемая значимость): 0,003; "Find Conserved columns and Recompute" (нахождение консервативных столбцов и перерасчет): on (включено); "use query Clusters" (использование запроса кластеров): on (включено); "word size" (длина слова): 4; "max Cluster distance" (максимальное расстояние между кластерами): 0,8; "Alphabet" (алфавит): regular (нормальный); "Homology conversation setting" (задание связи гомологии): 3 bits (3 бита)). Результат этого анализа характеризует консервативные

аминокислоты. В качестве консервативных участков аминокислотных последовательностей были определены следующие области, состоящие по меньшей мере из 5 следующих друг за другом консервативных аминокислот, а именно участки по сравнению с последовательностью с SEQ ID NO: 1: А - с позиции +24 до позиции +50, В - с позиции +52 до позиции +77, С - с позиции +79 до позиции +87, D - с позиции +89 до позиции +145, Е - с позиции + 150 до позиции +171, F - с позиции +177 до позиции +193, G - с позиции +223 до позиции +228, H - с позиции +230 до позиции +237, I - с позиции +239 до позиции +247, J - с позиции +249 до позиции +255, К - с позиции +257 до позиции +261, L - с позиции +263 до позиции +270, М - с позиции +272 до позиции +279, N - с позиции +297 до позиции +301 и О - с позиции +303 до позиции +313.

Определение процентной идентичности последовательностей полипептидов по сравнению друг с другом, а также консервативных участков аминокислотных последовательностей отдельных полипептидов относительно консервативных участков аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 осуществляли соответственно описанному ранее. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1.

Процентная идентичность последовательностей полипептидов по сравнению друг с другом

	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 1	-	70%	71%	71%	71%	71%	64%
SEQ ID NO: 2	70%	-	81%	83%	81%	83%	63%
SEQ ID NO: 3	71%	81%	-	95%	99%	92%	60%
SEQ ID NO: 4	71%	83%	95%	-	95%	95%	60%
SEQ ID NO: 5	71%	81%	99%	95%	-	93%	60%
SEQ ID NO: 6	71%	83%	92%	95%	93%	-	61%

SEQ ID NO: 7	64%	63%	60%	60%	60%	61%	-
SEQ ID NO: 8	57%	54%	54%	53%	53%	53%	53%
SEQ ID NO: 9	50%	50%	53%	53%	53%	55%	51%
SEQ ID NO: 10	55%	52%	55%	54%	55%	53%	52%
SEQ ID NO: 11	53%	51%	53%	51%	51%	52%	54%
SEQ ID NO: 12	50%	49%	50%	50%	50%	49%	51%
SEQ ID NO: 13	55%	49%	51%	51%	51%	52%	54%
SEQ ID NO: 14	73%	65%	69%	70%	69%	68%	80%
SEQ ID NO: 15	79%	68%	71%	71%	71%	72%	63%

	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: 15
SEQ ID NO: 1	57%	50%	55%	53%	50%	55%	73%	79%
SEQ ID NO: 2	54%	50%	52%	51%	49%	49%	65%	68%
SEQ ID NO: 3	54%	53%	55%	53%	50%	51%	69%	71%
SEQ ID NO: 4	53%	53%	54%	51%	50%	51%	70%	71%
SEQ ID NO: 5	53%	53%	55%	51%	50%	51%	69%	71%
SEQ ID NO: 6	53%	55%	53%	52%	49%	52%	68%	72%
SEQ ID NO: 7	53%	51%	52%	54%	51%	54%	80%	63%
SEQ ID NO: 8	-	50%	49%	51%	49%	48%	83%	51%

SEQ ID NO: 9	50%	-	51%	52%	69%	51%	67%	51%
SEQ ID NO: 10	49%	51%	-	76%	52%	52%	63%	56%
SEQ ID NO: 11	41%	50%	76%	-	52%	51%	58%	52%
SEQ ID NO: 12	49%	52%	52%	52%	-	49%	71%	51%
SEQ ID NO: 13	48%	51%	52%	51%	49%	-	54%	53%
SEQ ID NO: 14	83%	67%	63%	58%	71%	55%	-	72%
SEQ ID NO: 15	51%	51%	56%	52%	51%	53%	72%	-

Таблица 2.

Процентная идентичность последовательностей консервативных участков аминокислотных последовательностей от А до О

Полипептид	Идентичность последовательности относительно SEQ ID NO: 1					
	Участок А	Участок В	Участок С	Участок D	Участок Е	Участок F
SEQ ID NO: 1	100%	100%	100%	100%	100%	100
SEQ ID NO: 2	59,6%	76,9%	88,9%	87,7%	77,3%	76,5
SEQ ID NO: 3	63,0%	76,9%	77,8%	89,5%	86,4%	76,5
SEQ ID NO: 4	63,0%	80,8%	77,8%	91,2%	86,4%	76,5
SEQ ID NO: 5	63,0%	76,9%	77,8%	87,7%	86,4%	76,5
SEQ ID NO: 6	63,0%	80,8%	77,8%	91,2%	86,4%	76,5
SEQ ID NO: 7	44,7%	69,2%	77,8%	78,9%	68,2%	64,7
SEQ ID NO: 8	40,7%	50,0%	66,7%	82,5%	59,1%	64,7
SEQ ID NO: 9	51,9%	57,7%	55,6%	73,7%	45,5%	58,8
SEQ ID NO: 10	44,4%	61,5%	77,8%	75,4%	47,8%	76,5
SEQ ID NO: 11	44,4%	50,0%	66,7%	71,9%	43,5%	58,8
SEQ ID NO: 12	51,9%	53,8%	55,6%	71,9%	50,0%	58,8
SEQ ID NO: 13	18,5%	61,5%	55,6%	77,2%	54,5%	52,9
SEQ ID NO: 14	55,6%	69,2%	77,8%	84,2%	54,5%	52,9
SEQ ID NO: 15	74,1%	86,7%	88,9%	89,0%	77,3%	88,2

Полипептид	Идентичность последовательности относительно SEQ ID NO: 1					
	Участок G	Участок H	Участок I	Участок J	Участок K	Участок L
SEQ ID NO: 1	100%	100%	100%	100%	100%	100%
SEQ ID NO: 2	100%	87,5%	66,7%	85,7%	80,0%	75,0%
SEQ ID NO: 3	100%	87,5%	77,8%	57,1%	80,0%	75,0%
SEQ ID NO: 4	100%	87,5%	77,8%	57,1%	80,0%	75,0%
SEQ ID NO: 5	100%	87,5%	77,8%	57,1%	80,0%	75,0%
SEQ ID NO: 6	100%	75,0%	77,8%	85,7%	80,0%	87,5%
SEQ ID NO: 7	100%	87,5%	66,7%	71,4%	100%	50,0%
SEQ ID NO: 8	100%	62,5%	44,4%	57,1%	80,0%	62,5%
SEQ ID NO: 9	100%	12,5%	44,4%	42,9%	60,0%	62,5%
SEQ ID NO: 10	100%	62,5%	55,6%	71,4%	80,0%	50,0%
SEQ ID NO: 11	100%	50,0%	55,6%	57,1%	80,0%	50,0%
SEQ ID NO: 12	100%	12,5%	22,2%	57,1%	80,0%	52,5%
SEQ ID NO: 13	100%	50,0%	44,4%	57,1%	80,0%	75,0%
SEQ ID NO: 14	0%	8,3%	0%	14,3%	0%	25,0%
SEQ ID NO: 15	100%	87,5%	100%	85,7%	100%	75,0%

Полипептид	Идентичность последовательности относительно SEQ ID NO: 1		
	Участок M	Участок N	Участок O
SEQ ID NO: 1	100%	100%	100%
SEQ ID NO: 2	87,5%	80,0%	81,8%
SEQ ID NO: 3	87,0%	80,0%	81,8%
SEQ ID NO: 4	87,5%	80,0%	81,8%
SEQ ID NO: 5	87,5%	80,0%	81,8%
SEQ ID NO: 6	87,5%	80,0%	72,7%
SEQ ID NO: 7	75,0%	40,0%	36,4%
SEQ ID NO: 8	75,0%	60,0%	54,5%
SEQ ID NO: 9	62,5%	40,0%	54,5%
SEQ ID NO: 10	62,5%	40,0%	54,5%
SEQ ID NO: 11	75,0%	40,0%	54,5%
SEQ ID NO: 12	100%	40,0%	54,5%
SEQ ID NO: 13	50,0%	40,0%	63,6%

SEQ ID NO: 14	6,2%	0%	0%
SEQ ID NO: 15	87,5%	80,0%	63,6%

Пример 3. Гидролиз ZEN полипептидами в клеточных лизатах

Для определения способности расщеплять ZEN в нетоксичные или малотоксичные метаболиты HZEN и DHZEN был получен полипептид с SEQ ID NO: 1, кодированный нуклеотидной последовательностью с SEQ ID NO: 17, в качестве таковой, и с С- или N-концевой меткой 6His в *E. coli*, как описано в примере 1. Полипептиды с аминокислотными последовательностями с SEQ ID NO: 2-15, которые были кодированы нуклеотидными последовательностями с SEQ ID NO: 18-31, были помечены меткой 6His только на С-концевом участке. 100 мл раствора культуры *E. coli* с оптической плотностью 2,0-2,5 (OD при 600 нм) разделяли центрифугированием при 4°C и ресуспендировали в 20 мл минеральной среды Бруннера (DSMZ microorganisms medium number 462, 2012). Клеточные суспензии после 3-кратной обработки во французском прессе при 20 000 футах на кв. дюйм подвергали лизису. Полученные таким образом клеточные лизаты применяли с разбавлениями 1:10, 1:100 или 1:1000, которые получали с минеральной средой Бруннера, содержащей 0,1 мг/мл BSA (альбумин сыворотки крови крупного рогатого скота). Для опытов по разложению ZEN к 9,9 мл минеральной среды Бруннера, содержащей 0,1 мг/мл BSA, прибавляли 0,1 мл разбавленного клеточного лизата и 31 мкл исходного раствора субстрата ZEN. Таким образом, в итоге клеточные лизаты разбавляли с соотношением 1:1 000, 1:10 000 или 1:100 000. В качестве исходного раствора субстрата ZEN использовали 2,08 мМ раствор ZEN (40 об.% ACN + 60 об.% H₂O). Для получения этого раствора соответственно взвешивали и растворяли ZEN в кристаллической форме (стандарт биочистоты, компания "Romer Labs", артикул № 001109, чистота не менее 98%). Расщепляемые смеси переносили в склянки вместимостью 25 мл и инкубировали при 25°C при встряхивании с частотой 100 об/мин в течение 120 ч. В моменты времени 0, 0,5, 1, 2, 5, 24, 47, 72 и 120 ч соответственно отбирали пробы объемом 1 мл, полипептиды инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 99°C и хранили

при -20°C . После размораживания проб нерастворимые компоненты отделяли центрифугированием. ZEN, HZEN и DHZEN анализировали способом ЖХ-МС-МС. С этой целью метаболиты хроматографически разделяли посредством колонки "Phenomenex Luna C18(2)" с размерами 250×3 мм и с частицами крупностью 5 мкм. В качестве элюента использовали смесь "ацетонитрил-вода" с концентрацией муравьиной кислоты 1 мл/л. УФ-сигнал регистрировали при 270 нм. В качестве средства ионизации использовали ионизацию электрораспылением (ИЭР). ZEN, HZEN и DHZEN количественно определяют посредством Qtrap-ЖХ-МС-МС (жидкостной хромато-масс-спектрометр с тройным квадруполем, компания "Applied Biosystems") в "расширенном режиме". Не позже чем через 24 часа ни в одной из смесей невозможно было уже обнаружить существенное количество ZEN. Преобладающая часть, более 80%, ZEN была превращена в HZEN или DHZEN.

На фиг. 1 можно видеть зависимость от времени степени разложения ZEN и увеличения количества HZEN, а также DHZEN на примере разбавленного с соотношением 1:10 000 раствора клеточного лизата в случае полипептида с SEQ ID NO: 1 как без метки (фиг. 1A), так и с С-концевой меткой 6His (фиг. 1B) и N-концевой меткой 6His (фиг. 1C). Из этого ясно следует, что, во-первых, превращение ZEN происходит непосредственно и полностью, так как уже в первых пробах (0 ч), которые были отобраны непосредственно после начала опыта, почти невозможно было больше детектировать ZEN, и, во-вторых, вследствие присоединения С- или N-концевой метки не происходило существенной потери активности.

Пример 4. Гидролиз производных соединений ZEN полипептидами в клеточных лизатах

Для определения способности полипептидов наряду с ZEN превращать в нетоксичные или малотоксичные метаболиты также и производные соединения ZEN получали полипептиды с SEQ ID NO: 1-15 с С-концевыми метками His, как и описанные в примере 3, а в качестве клеточных лизатов при разложении использовали соответствующие синтетические нуклеотидные последовательности с SEQ ID NO: 17-31.

Опыты по разложению осуществляли согласно описанию примера 3, причем каждый полипептид был испытан с каждым из производных соединений ZEN, выбранных из группы α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL, Z14G, Z14S и ZAN. Клеточные лизаты применяли с общим разбавлением 1:10 000. В качестве исходного раствора субстрата вместо 2,08 мМ раствора ZEN (40 об.% ACN + 60 об.% H₂O) применяли эквимоллярные, т.е. 2,08 мМ растворы производных соединений ZEN. α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL и ZAN были получены от компании "Sigma" и применялись в качестве стандарта для анализа. Z14G и Z14S с чистотой по меньшей мере 90% были получены способами, описанными P. Krenn et al. (2007, Mykotoxin Research, 23, 4, 180-184) и M. Sulyok et al. (2007, Anal. Bioanal. Chem., 289, 1505-1523), и применялись в качестве стандарта для анализа. Другое отличие от примера 3 состояло в том, что отбирали только одну пробу и при этом через 24 ч. Уменьшение концентрации производных соединений ZEN в течение опыта по разложению количественно определяли способом ЖХ-МС-МС. α -ZEL, β -ZEL, Z14G и Z14S определяли способом M. Sulyok et al. (2010, Food Chemistry, 119, 408-416). α -ZAL, β -ZAL и ZAN определяли способом P. Songsermaskul et al. (2011, J. of Animal Physiol. and Animal Nutr., 97, 155-161). Неожиданно было выявлено, что во всех опытах по разложению через 24 ч инкубации в наличии оставалось только от 0 до максимально 13% исходного количества производных соединений ZEN.

Пример 5. Удельная активность и ферментативно-кинетические характеристики полипептидов и их вариантов

Определение удельной активности полипептидов и их вариантов осуществляли фотометрически, причем у всех примененных полипептидов была С-концевая метка 6His. Получение, обогащение и очистку полипептидов или их вариантов осуществляли соответственно описанию примера 1. Разложение ZEN до HZEN определяли по уменьшению поглощения при длине волны 315 нм. Молярные коэффициенты поглощения [ϵ] ZEN и HZEN были определены экспериментально и составили 0,0078895 и 0,0030857 л·мкмоль⁻¹·см⁻¹. Коэффициенты поглощения сильно зависят от значений pH, поэтому

определение активности следует осуществлять всегда точно при таком же значении pH и предпочтительно в такой же матрице. Измерения осуществляли в 50 мМ буферном растворе Tris-HCl с pH=8,2 в кварцевых кюветах в диапазоне длин волн от 200 до 2500 нм фотометром для видимой и ультрафиолетовой областей (Hitachi U-2001) при 32°C.

В качестве исходного раствора субстрата ZEN использовали 2,08 мМ раствор ZEN (40 об.% ACN + 60 об.% H₂O). Для получения этого раствора соответственно взвешивали и растворяли ZEN в кристаллической форме (стандарт биочистоты, компания "Romer Labs", артикул № 001109, чистота не менее 98%). Получали разбавления субстрата ZEN (0,79, 1,57, 2,36, 3,14, 4,71, 6,28, 7,85, 9,42, 10,99, 12,56, 14,13, 15,71, 17,28, 18,85 мкМ) с 50 мМ раствором Tris-HCl с pH=8,2. Растворы полипептидов разбавляли 50 мМ буферным раствором Tris-HCl с pH=8,2 до конечной концентрации около 70 нг/мл. Разбавления субстрата ZEN подогревали на водяной бане до 32°C.

К 100 мкл соответствующего разбавления субстрата ZEN прибавляли 0,2 мкл раствора полипептида и через 5 мин определяли поглощение, причем для любой комбинации "раствор полипептида - разбавление субстрата ZEN" осуществляли по меньшей мере двукратное определение.

С учетом коэффициентов поглощения ZEN и NZEN по повышению поглощения во времени рассчитывали скорость реакции для каждой концентрации субстрата.

Термины "константа K_M " или "константа Михаэлиса-Ментен" относятся к параметру для описания ферментативного сродства, выражаемому в [мкМ] или [мМ] и рассчитываемому посредством линеаризации по Хейнсу согласно Н. Bisswang (2002, Enzyme Kinetics, ISBN 3-527-30343-X, Seite 19), причем для этого предпочтительно используют функцию "Enzymkinetik, Single Substrat" (кинетика ферментации, простой субстрат) программы "SigmaPlot 12.0". Термины "каталитическая постоянная ферментативной реакции" или "константа k_{cat} " относятся к параметру для описания скорости превращения полипептида или

фермента, выражаемому в $[c^{-1}]$ и предпочтительно рассчитываемому посредством функции "Enzymkinetik, Single Substrat" программы "SigmaPlot 12.0". Параметр "максимальная скорость ферментативной реакции" или "константа v_{max} " выражают в $[мкМ/с]$ или $[мм/с]$ и определяют аналогично константе K_M посредством линеаризации по Хейнсу, причем для этого предпочтительно используют функцию "Enzymkinetik, Single Substrat" программы "SigmaPlot 12.0".

Используя значения v_{max} и применяемой концентрации фермента, удельную активность рассчитывали по формуле:

$$v_{уд} [c/è] = \frac{v_{max} [è/ñ] \cdot 60 [c/è]}{[è/ñ] + K_M [è/ñ]}$$

причем за единицу принимают гидролиз 1 мкмоль ZEN в минуту при 32°C в 50 мМ буферном растворе Tris-HCl с pH=8,2.

Далее приведены исходные данные для определения характеристик ферментативной реакции K_M , v_{max} , k_{cat} , а также удельной активности на примере полипептида с SEQ ID NO: 1. В таблице 3 приведены значения скорости реакции при соответствующих концентрациях субстрата ZEN, для которых на фиг. 2 представлены соответствующие графики Михаэлиса-Ментен, а в таблице 4 приведены соответствующие ферментативно-кинетические характеристики. Концентрация применяемого раствора фермента составляла 68 нг/л.

Таблица 3.

Скорости реакции полипептида с SEQ ID NO: 1 при различных концентрациях ZEN

Разбавление субстрата ZEN, мкМ	1-е измерение скорости реакции, мкМ/с	2-е измерение скорости реакции, мкМ/с
0,79	0,0073	0,0071
1,57	0,0087	0,0082
2,36	0,0095	0,0080
3,14	0,0101	0,0073
4,71	0,0103	0,0087
6,28	0,0096	0,0088
7,85	0,0084	0,0088

9,42	0,0111	0,0087
10,99	0,0093	0,0081
12,56	0,0100	0,0086
14,13	0,0089	0,0101
15,71	0,0089	0,0090
17,28	0,0100	0,0074
18,85	0,0100	0,0085

Таблица 4.

Ферментативно-кинетические характеристики полипептида с SEQ ID NO: 1

Измерение	V_{\max} , мкМ/с		K_M , мкМ		k_{cat} , с ⁻¹		Удельная активность, ед/мг	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Значение	0,00993	0,008756	0,2172	0,1898	5,44	4,79	8,76	7,73
Среднее значение	0,009343		0,2035		5,12		8,25	

Значения удельной активности исследованных полипептидов составили 8,25 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 1, 10,56 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 2, 8,36 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 3, 8,33 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 4, 8,56 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 5, 9,95 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 6, 3,83 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 7, 2,57 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 8, 4,87 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 9, 5,12 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 10, 13,88 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 11, 2,78 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 12, 6,43 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 13, 3,33 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 14 и 7,76 ед/мг для последовательности SEQ ID NO: 15.

Значения удельной активности исследованных вариантов полипептидов приведены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Удельная активность функциональных вариантов

полипептида с SEQ ID NO: 1, консервативные участки аминокислотных последовательностей с одной или несколькими мутациями и идентичность последовательностей функциональных вариантов с исходной последовательностью с SEQ ID NO: 1. Позиции мутаций указаны относительно аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1. Идентичность последовательностей определена по программе BLAST соответственно описанию примера 2.

№	Мутации	Мутации в области	Идентичность по сравнению с SEQ ID NO: 1	Удельная активность, ед/мг
ZH1-A-001	N25D	A	99,7%	8,10
ZH1-A-002	F27Y	A	99,7%	7,93
ZH1-A-003	F27H	A	99,7%	7,78
ZH1-A-004	R35K	A	99,7%	8,98
ZH1-A-005	R35Q	A	99,7%	8,56
ZH1-A-006	N25D/S29P/V42I/V43T	A	98,8%	7,84
ZH1-A-007	I26V/R31A/F32Y/F46Y	A	98,8%	8,61
ZH1-A-S02	N25D/I26V/F27Y/S29P/R31A/F32Y/R35K/V37A/V42I/V43T/F46Y	A	96,6%	8,73
ZH1-A-S03	N25D/I26V/F27H/S29P/R31A/F32Y/R35Q/V42I/V43T/F46Y	A	97,0%	8,52
ZH1-B-001	D53G	B	99,7%	8,10
ZH1-B-002	N54M	B	99,7%	8,41
ZH1-B-003	N54R	B	99,7%	8,33
ZH1-B-004	S69G	B	99,7%	8,06
ZH1-B-005	P72E	B	99,7%	8,65
ZH1-B-006	P72R	B	99,7%	8,78
ZH1-B-S02	N54M/L57V/L60I/S69G/P72E/V73A	B	98,2%	8,51
ZH1-B-S03	D53G/N54R/L57V/L60I/P72E/V73A	B	98,2%	8,56
ZH1-B-S04	N54R/L57V/L60I/P72E/V73A	B	98,5%	8,96

ZH1-B-S14	N54R/L58V/L59P/L60V/ T64G/P72R/G75P/L77P	B	97,6%	8,68
ZH1-C-001	N80H	C	99,7%	8,24
ZH1-C-002	N80D	C	99,7%	8,48
ZH1-C-003	F84Y	C	99,7%	8,65
ZH1-C-S06	N80H/F84Y	C	99,4%	8,88
ZH1-C-S10	N80H/F84H	C	99,4%	8,32
ZH1-C-S14	E79R/N80D	C	99,4%	8,45
ZH1-D-001	T95S	D	99,7%	8,53
ZH1-D-002	R99K	D	99,7%	8,25
ZH1-D-003	V123I	D	99,7%	8,17
ZH1-D-004	A125G	D	99,7%	8,36
ZH1-D-005	G126A	D	99,7%	8,41
ZH1-D-006	G130A	D	99,7%	8,69
ZH1-D-007	G130V	D	99,7%	8,54
ZH1-D-008	G131A	D	99,7%	8,71
ZH1-D-009	N127D	D	99,7%	8,29
ZH1-D-010	N127Q	D	99,7%	8,34
ZH1-D-011	A141S	D	99,7%	8,67
ZH1-D-012	F106W	D	99,7%	7,84
ZH1-D-013	I118V	D	99,7%	8,37
ZH1-D-014	I118V/V123L	D	99,4%	8,55
ZH1-D-015	I118V/K119R/L132V	D	99,1%	8,86
ZH1-D-016	W96Q/F106W/L116G/ V122A	D	98,8%	8,65
ZH1-D-017	Q91R/N105D/K119G/A141 S/M142K	D	98,5%	8,46
ZH1-D-S02	T95S/T97A/R99K/I118V/ V123I/L132V/A141S	D	97,7%	8,66
ZH1-D-S03	T95S/R99K/I118V/ K119R/L132V/A141S	D	98,2%	9,32
ZH1-D-S04	T95S/R99K/I118V/ L132V/A141S	D	98,5%	9,15
ZH1-D-S05	T95S/R99K/I114M/ I118V/K119R/L132V/ A141S	D	97,7%	8,84
ZH1-D-S07	R99G/A115D/K119G/ P121T/V123I/A125S/	D	96,3%	8,79

	L132V/L133V/S138A/ Y140F/A141S/M142L			
ZH1-D-S08	R93K/W96Q/R99G/D104N/ N105L/F106M/A115S/ V123I/A125S/G144N	D	97,0%	8,86
ZH1-D-S09	R99G/S102N/D104N/N105 T/F106W/L110V/V111E/ A115D/K119G/V122T/ V123L/L132V/L133I/ S138A/M142K	D	95,4%	8,99
ZH1-D-S10	W96R/S102T/F106I/I114 L/A115S/L116G/K119G/ V122A/V123F/A125S/ A134S/Y140F/M142E	D	96,0%	9,12
ZH1-D-S11	W96R/R99G/S102T/ F106V/I114L/A115D/ L116G/K119G/V122A/ V123F/A125S/N127L/ L133A/A134S/Y140F/ M142K	D	95,1%	8,54
ZH1-D-S12	S94T/R99G/S102T/ N105I/L110V/A115D/ K119G/P121E/V122T/ V123L/V124I/L133I/ A134G/S138A/Y140F/ M142K	D	95,1%	8,69
ZH1-D-S13	R93Q/R99G/N105T/ R112K/A115D/L116I/ A125S/N127L/L132V/ L133V/A134S/Y140F/ M142K	D	96,0%	8,47
ZH1-D-S14	Q91R/W96R/N105D/ I114L/I118V/K119R/ V122A/L132V/L137S	D	97,3%	8,55
ZH1-E-001	Y165C	E	99,7%	8,46
ZH1-E-002	Y165H	E	99,7%	8,33
ZH1-E-003	P163T	E	99,7%	7,95
ZH1-E-004	A154P/Y165C	E	99,4%	8,13

ZH1-E-S02	P163T/A164T/Y165C/ V169I/L170R	E	98,5%	8,83
ZH1-E-S05	A154P/Y165H/L170R	E	99,1%	9,65
ZH1-F-001	Y180F	F	99,7%	8,35
ZH1-F-002	D182T	F	99,7%	8,41
ZH1-F-003	D182K	F	99,7%	8,19
ZH1-F-004	Y180F/R181V/I190V	F	99,1%	8,56
ZH1-F-S04	Y180F/D182T/F183Y/ I190V/G191S	F	98,5%	8,56
ZH1-F-S06	Y180F/D182T/F183Y/ I190V	F	98,8%	8,64
ZH1-F-S10	E178A/R181V/D182K/ F183Y	F	98,8%	7,55
ZH1-H-001	T236K	H	99,7%	8,09
ZH1-H-002	V237F	H	99,7%	8,11
ZH1-H-003	E234G	H	99,7%	8,54
ZH1-H-S02	F233W	H	99,7%	8,37
ZH1-H-S03	F233Y	H	99,7%	8,64
ZH1-H-S04	F233H	H	99,7%	8,36
ZH1-H-S06	A231V/F233Y	H	99,4%	8,54
ZH1-H-S09	F232W/F233A/E234T/ G235D/L239A	H	98,5%	8,83
ZH1-I-001	H240N	I	99,7%	8,54
ZH1-I-002	H240S	I	99,7%	8,79
ZH1-I-003	D244E/R245Y	I	99,4%	8,42
ZH1-I-S02	D244E/R245Q/M246L	I	99,1%	8,36
ZH1-I-S03	H240N/D244E	I	99,4%	9,26
ZH1-I-S06	H240S/D244E	I	99,4%	9,02
ZH1-I-S07	L239Q/H240T/R245Y	I	99,1%	8,41
ZH1-J-001	Q249R	J	99,7%	8,36
ZH1-J-002	T252V	J	99,7%	7,94
ZH1-J-S02	I254V	J	99,7%	8,55
ZH1-J-S03	Q249R/K251N/I254V	J	99,1%	9,03
ZH1-J-S07	T252V/I254M	J	99,4%	7,81
ZH1-J-S10	T252V/I254V	J	99,4%	7,97
ZH1-K-S05	A260M	K	99,7%	8,64
ZH1-K-S11	A260F	K	99,7%	8,82
ZH1-K-S13	A260S	K	99,7%	9,01

ZH1-L-001	E266Y	L	99,7%	8,46
ZH1-L-002	E266D	L	99,7%	8,31
ZH1-L-003	T262G	L	99,7%	8,32
ZH1-L-004	T262D/E266D	L	99,4%	8,56
ZH1-L-005	T262G/I263T	L	99,4%	8,68
ZH1-L-S02	E266D/E269H	L	99,4%	8,59
ZH1-L-S04	I263T/E269N	L	99,4%	8,73
ZH1-L-S06	E269N	L	99,7%	8,69
ZH1-L-S13	E266Y/E269N	L	99,4%	8,33
ZH1-M-001	L274M	M	99,7%	8,29
ZH1-M-002	L274C	M	99,7%	8,37
ZH1-M-S02	L277E	M	99,7%	8,96
ZH1-M-S07	L274M/A279V	M	99,4%	8,23
ZH1-M-S08	L274T/L277F	M	99,4%	8,63
ZH1-M-S11	L274C/L277I	M	99,4%	8,51
ZH1-N-001	H297L	N	99,7%	8,27
ZH1-N-002	H298V/L302S	N	99,4%	9,03
ZH1-N-S02	H298V	N	99,7%	8,94
ZH1-N-S09	H298L/P299D	N	99,4%	8,37
ZH1-O-001	L307Q	O	99,7%	8,62
ZH1-O-002	F308S	O	99,7%	8,57
ZH1-O-S02	L307Q/A311P	O	99,4%	8,34
ZH1-O-S03	L307Q/F308S	O	99,4%	8,74
ZH1-O-S06	L307Q/F308S/D309A	O	99,1%	9,18
ZH1-B/H-001	D53G/N54R/L57V/L60I/ P72E/V73A/F233V/ E234G/V237F	B+H	97,3%	9,26
ZH1-C/D-001	N80H/F84Y/T95S/R99K/ I118V/K119R/L132V/ A141S	C+D	97,6%	9,31
ZH1-D/K-001	T95S/T97A/R99K/I118V/ V123I/L132V/A141S/ A260M	D+K	97,6%	9,66
ZH1-D/M-001	T95S/T97A/R99K/I118V/ V123I/L132V/A141S/ L277E	D+M	97,6%	10,63
ZH1-K/N-001	A260M/H298V	K+N	99,4%	8,94

ZH1-K/L-001	A260M/T262D/E266D/ E269H	K+L	98,8%	9,03
ZH1-K/L-002	A260M/T262G/I263T/ E269N	K+L	98,8%	8,84
ZH1-N/O-001	Q296A/H298V/L307Q/ A311P	N+O	98,8%	9,26
ZH1-N/O-002	Q296E/H298V/L302S/ L307Q/F308S	N+O	98,5%	9,46
ZH1-C/D/ J-001	N80H/F84Y/T95S/R99K/ I118V/L132V/A141S/ Q249R/K251N/I254V	C+D+J	97,0%	9,97
ZH1-B/D/ K-001	D53G/N54R/L57V/L60I/ P72E/V73A/T95S/R99K/ I114M/I118V/K119R/ L132V/A141S/A260M	B+D+K	95,7%	10,78
ZH-J/K/ L-001	I254V/I256L/A260M/ T262G/I263T/E269N	J+K+L	98,2%	9,11
ZH1-J/K/ LM-001	I254V/I256L/A260M/ T262D/E266D/E269H/ L271V	J+K+L+M	97,7%	9,14
ZH1- B/C/D/ J-002	E79R/N80D/D53G/N54R/ L57V/L60I/P72E/V73A/ W96R/R99G/S102T/ F106V/I114L/A115D/ L116G/K119G/V122A/ V123F/A125S/N127L/ L133A/A134S/Y140F/ M142K/T252V/I254V	B+C+D+J	92,1%	11,31
ZH1-DEL-001	$\Delta P212$	-	99,7%	8,56
ZH1-DEL-002	$\Delta G5/\Delta T6/\Delta R7/\Delta S8/\Delta E9/\Delta A10/\Delta A11/\Delta D12/\Delta A13/\Delta A14/\Delta T15/\Delta Q16/\Delta A17/\Delta R18/\Delta Q19$	-	95,4%	8,37
ZH1-DEL-003	$\Delta N327/\Delta D328$	-	99,4%	8,27
ZH1- A/B/C-001	N25D/I26V/F27Y/S29P/ R31A/F32Y/R35K/V37A/	A+B+C	89,6%	9,54

	V42I/V43T/F46Y/N54R/ L58V/L59P/L60V/T64G/ P72R/G75P/L77P/R99G/ S102N/D104N/N105T/ F106W/L110V/V111E/ A115D/K119G/V122T/ V123L/L132V/L133I/ S138A/M142K			
ZH1- DEL/B/ C/D/ J-001	Δ G5/ Δ T6/ Δ R7/ Δ S8/ Δ E9/ Δ A10/ Δ A11/ Δ D12/ Δ A13/ Δ A14/ Δ T15/ Δ Q16/ Δ A17/ Δ R18/ Δ Q19/ Δ P212/ Δ N327/ Δ D328/E79R/ N80D/D53G/N54R/L57V/ L60I/P72E/V73A/W96R/ R99G/S102T/F106V/ I114L/A115D/L116G/ K119G/V122A/V123F/ A125S/N127L/L133A/ A134S/Y140F/M142K/ T252V/I254V	B+C+D+J	86,6%	11,52
ZH1- DEL/A/ B/C/D/ J-001	Δ G5/ Δ T6/ Δ R7/ Δ S8/ Δ E9/ Δ A10/ Δ A11/ Δ D12/ Δ A13/ Δ A14/ Δ T15/ Δ Q16/ Δ A17/ Δ R18/ Δ Q19/ Δ P212/ Δ N327/ Δ D328/N25D/ I26V/F27Y/S29P/R31A/ F32Y/R35K/V37A/V42I/ V43T/F46Y/E79R/N80D/ D53G/N54R/L57V/L60I/ P72E/V73A/W96R/R99G/ S102T/F106V/I114L/ A115D/L116G/K119G/ V122A/V123F/A125S/ N127L/L133A/A134S/ Y140F/M142K/T252V/ I254V	A+B+C+ D+J	83,3%	10,92

ZH1-001	L302S	-	99,7%	8,31
---------	-------	---	-------	------

Таблица 6.

Значения удельной активности функциональных вариантов полипептида с SEQ ID NO: 2. Положиции мутаций указаны относительно аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2. Идентичность последовательностей определена по программе BLAST соответственно описанию примера 2.

Вариант	Мутации	Идентичность по сравнению с SEQ ID NO: 2	Удельная активность, ед/мг
ZH2-001	D3D(GTRSEADAATQARQL)	93,6%	10,15
ZH2-002	D8N/V9I/Y10F	99,0%	10,42
ZH2-003	M37N/E55P/A56V/V101I/S124A/ F194FP/T146P/T147A/C148Y	97,0%	10,58
ZH2-004	S187P/S188A/P189K/M190A/ A191M/R192Q/Y193L	97,7%	10,43
ZH2-005	A262E/R263H/R265Q/L266D/ L267I/M268I/E269R	97,7%	10,68
ZH2-006	D3D(GTRSEADAATQARQL)/M37N/ E55P/A56V/V101I/S124A/F194FP/ T146P/T147A/C148Y/S187P/ S188A/P189K/M190A/A191M/ R192Q/Y193L/A262E/R263H/ R265Q/L266D/L267I/M268I/E269R	86,1%	10,71

Пример 6. Разложение ZEN и производных соединений ZEN в загрязненной кукурузе

Для определения способности полипептидов в сложной матрице и при низких значениях pH разлагать ZEN и производные соединения ZEN, встречающиеся естественным образом, к загрязненной кукурузе прибавляли с различными концентрациями каждый из полипептидов с SEQ ID NO: 1-6 и контролировали разложение ZEN и производных соединений ZEN.

Загрязненную кукурузу измельчали и использовали в опытах по разложению, причем исходная смесь состояла из 1 г измельченной загрязненной кукурузы, 8,9 мл 100 мМ ацетатного буферного раствора с pH=4,0 и 0,1 мл раствора полипептида. Получали обогащенные и очищенные растворы полипептидов соответственно

описанию примера 5, причем их разбавляли до концентраций 10, 100 или 1000 микроединица/мл. Таким образом, в исходной смеси применяли в абсолютном значении 1 микроединицу (=1 микроединица на грамм кукурузы), 10 микроединиц (=10 микроединиц на грамм кукурузы) или 100 микроединиц (=100 микроединиц на грамм кукурузы). Расщепляемые смеси переносили в склянки вместимостью 25 мл и при инкубировали при 37°C при встряхивании с частотой 100 об/мин. Перед прибавлением фермента или после 1-часовой инкубации соответственно отбирали пробы объемом 1 мл, полипептид инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 99°C и пробы хранили при -20°C. После размораживания проб нерастворимые компоненты отделяли центрифугированием. Концентрации ZEN, а также производных соединений ZEN определяли способом ЖХ-МС-МС соответственно описанию M. Sulyok et al. (2007, Anal. Bioanal. Chem., 289, 1505-1523). Содержание ZEN и производных соединений ZEN в указанной кукурузе составляло 238 млрд⁻¹ в случае ZEN, 15 млрд⁻¹ в случае α -ZEL, 23 млрд⁻¹ в случае β -ZEL, 32 млрд⁻¹ в случае Z14G и 81 млрд⁻¹ в случае Z14S. В таблице 7 представлено процентное уменьшение содержания ZEN и производных соединений ZEN в опытах по разложению.

Таблица 7.

Уменьшение содержания ZEN и производных соединений ZEN в процентах относительно начального содержания в опытах по разложению разными полипептидами в разных количествах

Полипептид	Количество в исходной смеси	ZEN	α -ZEL	β -ZEL	Z14G	Z14S
SEQ ID NO: 1	0,1 микроед.	83%	≥80%	70%	78%	80%
	1 микроед.	96%	≥80%	76%	≥80%	92%
	10 микроед.	97%	≥80%	≥85%	≥80%	94%
SEQ ID NO: 2	0,1 микроед.	87%	≥80%	73%	≥80%	84%
	1 микроед.	97%	≥80%	78%	≥80%	90%
	10 микроед.	99%	≥80%	≥85%	≥80%	96%
SEQ ID NO: 3	0,1 микроед.	79%	79%	67%	73%	75%
	1 микроед.	85%	≥80%	72%	79%	82%
	10 микроед.	92%	≥80%	78%	≥80%	88%

SEQ ID NO: 4	0,1 микрод.	82%	78%	65%	76%	80%
	1 микрод.	89%	≥80%	73%	≥80%	86%
	10 микрод.	93%	≥80%	82%	≥80%	91%
SEQ ID NO: 5	0,1 микрод.	79%	76%	66%	78%	80%
	1 микрод.	83%	≥80%	73%	≥80%	81%
	10 микрод.	91%	≥80%	79%	≥80%	86%
SEQ ID NO: 6	0,1 микрод.	93%	≥80%	75%	≥80%	90%
	1 микрод.	95%	≥80%	82%	≥80%	92%
	10 микрод.	98%	≥80%	≥85%	≥80%	96%

Пример 7. Добавки, содержащие полипептиды, для гидролитического расщепления ZEN и/или производных соединений ZEN

Для получения добавок для гидролитического расщепления ZEN надосадочные жидкости после ферментации, содержащие экспрессированные *P. pastoris* полипептиды с SEQ ID NO: 1, 2, 6 и 13, посредством микрофльтрации и ультрафльтрации (граница отсеки: 10 кД) в стандартных условиях очищали и концентрировали до концентрации сухого вещества около 9 масс.%. Затем растворы, содержащие полипептиды, обрабатывали в распылительной сушилке, ("Mini B290", компания "Büchi") также в стандартных условиях до получения сухих порошков. Полученные четыре порошка далее обозначены как Z1, Z2, Z6 и Z13. Порошки Z1, Z2, Z6 или Z13 были смешаны в поворотном встряхивателе с бентонитом со средним размером частиц около 1 мкм в соотношении 1 масс.% добавки Z1, Z2, Z6 или Z13 и 99 масс.% бентонита. Полученные таким образом добавки были обозначены как добавки Z1.B, Z2.B, Z6.B и Z13.B. Порошки Z1, Z2, Z6 и Z13 также были смешаны в поворотном встряхивателе с бентонитом и концентратом витаминов и микроэлементов в соотношении 0,1 масс.% добавки Z1, Z2, Z6 или Z13, 0,9 масс.% концентрата витаминов и микроэлементов и 99 масс.% бентонита. Полученные таким образом добавки были обозначены как добавки Z1.BVS, Z2.BVS, Z6.BVS и Z13.BVS. Добавки Z1.BVS, Z2.BVS, Z6.BVS и Z13.BVS в расчете на 100 г содержали 200 мг сульфата железа, 50 мг сульфата меди, 130 мг оксида олова, 130 мг оксида марганца, 2,55 мг карбоната кальция, 160 мг

витамина Е, 6,5 мг витамина К3, 6,5 мг витамина В1, 1,14 мг витамина В2, 15 мг витамина В6, 0,15 мг витамина В12, 50 мг никотиновой кислоты, 30 мг пантотеновой кислоты и 5,3 мг фолиевой кислоты.

Добавки экстрагировали 50 мМ буферным раствором Tris-HCl с рН=8,2 в течение 30 минут и тем же самым буферным раствором разбавляли дальше так, чтобы конечная концентрация полипептида составила около 70 нг/мл.

Затем определяли расщепляющее зеараленон действие этих растворов соответственно описанию примера 5. Соответствующие значения активности составили 8,230 ед/г в случае Z1, 9,310 ед/г в случае Z2, 9,214 ед/г в случае Z6, 83 ед/г в случае Z1.В, 92 ед/г в случае Z2.В, 90 ед/г в случае Z2.С, 57 ед/г в случае Z13.В, 8 ед/г в случае Z1.BVS, 9 ед/г в случае Z2.BVS, 9 ед/г в случае Z6.BVS и 6 ед/г в случае Z13.BVS.

Способность разлагать производные соединения ZEN типа α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL, Z14G, Z14S и ZAN добавками Z1, Z2, Z6, Z13, Z1.В, Z2.В, Z6.В, Z13.В, Z1.BVS, Z2.BVS, Z6.BVS и Z13.BVS определяли соответственно описанию примера 4, однако вместо 100 мкл клеточного лизата применяли 100 мкл раствора полипептида с концентрацией полипептида около 70 нг/мл. После 6-часовой инкубации в форме негидролизованного производного соединения ZEN оставалось только не больше 15% от исходного количества.

Пример 8. Температурные оптимумы

Для определения температурных оптимумов полипептидов с SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12 и 15 их клонировали с С-концевой меткой 6His соответственно описанию примера 1, экспрессировали в *E. coli* и очищали. В предварительных испытаниях для каждого полипептида определяли концентрацию, при которой в опытных условиях (буферный раствор Теорелла-Стенхагена (Teorell und Stenhagen. Ein Universalpuffer für den pH-Bereich 2,0 bis 12.0. Biochem. Ztschrift., 1938, 299: S. 416-419) при рН=7,5 и с содержанием 0,1 мг/мл BSA при 30°C) через 3 ч протекания опыта могло быть обеспечено полное превращение ZEN. Композиции применяли при найденных концентрациях в расщепляемых смесях для

определения температурных оптимумов. Испытания осуществляли в реакторе для ПЦР (компания "Eppendorf") с функцией задания температурного градиента при значениях 20 +/- 10°C, 40 +/- 10°C и при необходимости 60 +/- 10°C (10 значений температуры в соответствующей области; предварительно заданные значения температуры в реакторе для ПЦР). К исходным смесям прибавляли буферный раствор Теорелла-Стенхагена при соответствующем оптимальном значении pH, содержащий фермент с соответствующей концентрацией, а также 0,1 мг/мл BSA, и 5 млн⁻¹ ZEN. В качестве отрицательных контрольных проб использовали исходные смеси, содержавшие 0,1 мг/мл BSA и 5 млн⁻¹ ZEN без прибавления фермента. После инкубации в течение 0, 0,5, 1, 2 и 3 ч при соответствующей температуре инкубации отбирали пробы, инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 99°C и хранили при -20°C. После размораживания пробы переносили во флаконы для ВЭЖХ. ZEN, HZEN и DHZEN анализировали способом ВЭЖХ-ДМД. С этой целью метаболиты хроматографически разделяли посредством колонки "Zorbax SB-Aq C18" с размерами 4,6x150 мм и с частицами крупностью 5 мкм. В качестве элюента использовали смесь "метанол-вода" с 5 мМ ацетата аммония. УФ-сигнал регистрировали при 274 нм. Количественное определение метаболитов осуществляли с привлечением параллельно анализируемых стандартных образцов. Определение температурных оптимумов осуществляли по найденным подъемам кривых разложения, причем температуру, при которой наблюдался наибольший подъем, принимали в качестве температурного оптимума. Значения температурных оптимумов представлены в таблице 8.

Таблица 8.

Температурные оптимумы полипептидов

SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 15
38°C	41°C	50°C	51°C	31°C	35°C	50°C	26°C	41°C

Пример 9. Термическая стабильность

Для определения термической стабильности полипептидов с SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12 и 15 их клонировали с С-концевой

меткой 6His соответственно описанию примера 1, экспрессировали в *E. coli* и очищали. Полипептиды инкубировали в реакторе для ПЦР с функцией задания градиента при соответствующем значении температурного оптимума $\pm 10^\circ\text{C}$. Через 0, 15, 30 и 60 мин отбирали пробы каждой из исходных смесей при каждой из температур. Затем эти предварительно инкубированные пробы применяли в опытах по разложению в буферном растворе Теорелла-Стенхагена при соответствующем оптимальном значении pH и с содержанием 0,1 мг/мл BSA и 5 млн^{-1} ZEN в исходной смеси. В предварительных испытаниях для каждого полипептида определяли концентрацию, при которой в опытных условиях (буферный раствор Теорелла-Стенхагена при pH=7,5 и с содержанием 0,1 мг/мл BSA при 30°C) через 3 ч протекания опыта могло быть обеспечено полное превращение ZEN. Соответствующие найденные значения концентрации фермента применяли в исходных смесях. Исходные расщепляемые смеси инкубировали при 30°C . Отбор проб осуществляли после инкубации в течение 0, 0,5, 1, 2 и 3 ч. Затем полипептиды инактивировали нагреванием при 99°C в течение 10 мин и пробы хранили при -20°C . После размораживания пробы переносили во флаконы для ВЭЖХ и анализировали способом ВЭЖХ-ДМД соответственно описанию примера 8.

Термическую стабильность определяли как температуру, при которой полипептиды после 15-минутной предварительной инкубации обладали 50%-й остаточной активностью по сравнению с температурным оптимумом. В качестве меры активности принимали подъем кривых разложения. Значения термической стабильности представлены в таблице 9.

Таблица 9.

Термическая стабильность полипептидов (50%-я остаточная активность после 15-минутной предварительной инкубации)

SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 15
38°C	34°C	54°C	61°C	28°C	44°C	55°C	40°C	49°C

Пример 10. Оптимальные значения pH

Для определения оптимальных значений pH полипептидов с SEQ

ID NO: 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12 и 15 их клонировали с С-концевой меткой 6His соответственно описанию примера 1, экспрессировали в *E. coli* и очищали. В предварительных испытаниях для каждого полипептида была определена концентрация, при которой в опытных условиях (буферный раствор Теорелла-Стенхагена при pH=7,5 и с содержанием 0,1 мг/мл BSA при 30°C) через 3 ч протекания опыта могло быть обеспечено полное превращение ZEN. Соответствующие значения концентрации фермента применяли в исходных смесях. Исходные расщепляемые смеси помещали в буферный раствор Теорелла-Стенхагена при значениях pH, равных 3,0, 4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 11,0 и 12,0. Исходные расщепляемые смеси с 0,1 мг/мл BSA и 5 млн⁻¹ ZEN инкубировали при 30°C. В качестве отрицательных контрольных проб использовали исходные смеси в буферном растворе Теорелла-Стенхагена при pH=3,0, pH=7,0 и pH=12,0 и с содержанием 0,1 мг/мл BSA и 5 млн⁻¹ ZEN. Отбор проб осуществляли после инкубации в течение 0, 0,5, 1, 2 и 3 ч. Затем полипептиды инактивировали нагреванием при 99°C в течение 10 мин и пробы хранили при -20°C. После размораживания пробы переносили во флаконы для ВЭЖХ и анализировали способом ВЭЖХ-ДМД соответственно описанию примера 8. Определение оптимальных значений pH осуществляли по найденным подъемам кривых разложения, причем значение pH, при котором наблюдался наибольший подъем, принимали в качестве оптимального значения pH. Оптимальные значения pH представлены в таблице 10.

Таблица 10.

Оптимальные значения pH полипептидов

SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 15
8,2	8,5	7,0-8,0	7,0-7,5	7,5-8,5	7,0-7,5	8,0	7,0-7,5	7,5

Пример 11. Стабильность при pH=5,0

Для определения pH-зависимой стабильности полипептиды по примеру 10 инкубировали в буферном растворе Теорелла-Стенхагена при pH=5,0 и при соответствующем оптимальном значении pH в течение 1 ч при 25°C. Эти предварительно инкубированные пробы использовали в опытах по разложению с равными концентрациями

соответствующего полипептида, использованными для определения оптимальных значений pH, в 100 мМ буферного раствора Tris-HCl при соответствующем оптимальном значении pH и с содержанием 0,1 мг/мл BSA и 5 млн⁻¹ ZEN в исходной смеси. Исходные смеси инкубировали при соответствующем температурном оптимуме. Отбор проб осуществляли после инкубации в течение 0, 0,5, 1, 2 и 3 ч. Затем полипептиды инактивировали нагреванием при 99°C в течение 10 мин и пробы хранили при -20°C. После размораживания пробы переносили во флаконы для ВЭЖХ и анализировали способом ВЭЖХ-ДМД соответственно описанию примера 8. pH-зависимую стабильность определяли как процентную остаточную активность полипептидов при pH=5 по отношению к активности при соответствующем оптимальном значении pH. Значения pH-зависимой стабильности при pH=5,0 представлены в таблице 11.

Таблица 11.

pH-зависимая стабильность полипептидов при pH=5,0

SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 15
3%	17%	79%	80%	100%	22%	87%	98%	19%

Пример 12. Опыты по разложению ZEN

Разложение ZEN до HZEN и DHZEN осуществляли на примере полипептидов с SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12 и 15. Исходные расщепляемые смеси получали в буферном растворе Теорелла-Стенхагена при pH=7,5 и с содержанием 0,1 мг/мл BSA и 5 млн⁻¹ ZEN. Исходные расщепляемые смеси инкубировали при 30°C. Отбор проб осуществляли после инкубации в течение 0, 0,5, 1, 2 и 3 ч. Затем полипептиды инактивировали нагреванием при 99°C в течение 10 мин и пробы хранили при -20°C. После размораживания пробы переносили во флаконы для ВЭЖХ и анализировали способом ВЭЖХ-ДМД соответственно описанию примера 8. Концентрацию полипептида выбирали так, чтобы полное разложение достигалось приблизительно через 3 часа. Кривые кинетики разложения представлены на фиг. 3, причем на оси y показаны концентрации ZEN, HZEN и DHZEN в микромолях в литре (мкмоль/л), а на оси x показаны длительность инкубации в часах (ч).

* мкМ означает микромолярный и соответствует размерности мкмоль/л.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Эрбер Акциенгезелльшафт

<120> Полипептид для гидролитического расщепления зеараленона и/или производных зеараленона

<130> P05341PCT

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 328

<212> ППТ

<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 1

Met Ala Glu Glu Gly Thr Arg Ser Glu Ala Ala Asp Ala Ala Thr Gln
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Thr Leu Pro Ala Asn Asp
325

<210> 2

<211> 308

<212> IIPT

<213> Streptomyces violaceusniger

<400> 2

Met Ala Asp Pro Ala Gln Arg Asp Val Tyr Val Pro His Ala Tyr Pro
1 5 10 15

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

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

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

His Val Tyr Ala Val Asp Leu Arg Gly Gln Gly Arg Ser Ser Trp Ala

65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Ala Ala
305

<211> 309
<212> ΠPT
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Ala Pro
305

<210> 4
<211> 309
<212> IIPT
<213> Streptomyces rapamycinicus

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Ala Pro
305

<210> 5
<211> 309
<212> IPT
<213> Streptomyces lividans

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Ala Pro
305

<210> 6
<211> 309
<212> IPT
<213> Streptomyces coelicoflavus

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

210

215

220

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Ala Pro
305

<210> 7

<211> 300

<212> IIPT

<213> Rhodococcus triatome

<400> 7

Met Pro His Asp Tyr Glu Glu Lys Leu Val Asp Leu Gly Glu Ile Asp
1 5 10 15

Leu Asn Tyr Ala Glu Ala Gly Ser Pro Asp Lys Pro Ala Leu Leu Leu
20 25 30

Ile Pro Ser Gln Ser Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Glu Ala Met Gly
35 40 45

Leu Leu Ala Glu Asp Tyr His Val Phe Ala Val Asp Met Arg Gly Gln
50 55 60

Gly Arg Ser Thr Trp Thr Pro Gly Arg Tyr Ser Leu Asp Asn Phe Gly
65 70 75 80

Asn Asp Leu Val Arg Phe Ile Asp Leu Val Ile Gly Arg Thr Val Ile
85 90 95

Val Ser Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val Val Ala Ala Trp Leu Ala Ala
100 105 110

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

Phe Phe Ala Ser Glu Leu Asp Pro Lys Val Gly His Thr Ile Arg Gln
130 135 140

Ala Ala Gly His Ile Phe Val Asn Trp Arg Asp Tyr Leu Gly Asp Gln
145 150 155 160

Trp Ser Val Gly Asp Tyr Ala Gly Phe Leu Lys Ala Met Lys Ser Ser
165 170 175

Glu Val Pro Met Leu Arg Gln Val Pro Leu Pro Glu Thr Ala Pro Gln
180 185 190

Asn Leu Leu Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Ala Arg Ala Phe Tyr Glu Gly
195 200 205

Thr Val Ala Gln Thr Cys Pro His Asp Tyr Met Leu Ser Gln Val Lys
210 215 220

Val Pro Met Leu Val Thr His His Ala Arg Met Ile Asp Glu Ala Thr
225 230 235 240

Ser Gly Leu Val Gly Ala Met Ser Asp Leu Gln Val Gln Lys Ala Ala
245 250 255

Glu Ile Ile Arg Gly Thr Gly Val Gln Val Asp Val Val Asp Leu Pro
260 265 270

Glu Ala Pro His Ile Leu His Gln Leu Ala Pro Lys Glu Tyr Val Glu
275 280 285

Ile Leu Asn Asn Trp Val Glu Lys Leu Pro Pro Val
290 295 300

<210> 8

<211> 307

<212> ПРТ

<213> *Hirschia baltica*

<400> 8

Met Ile Gln Asn Asn Lys Thr Ala Pro Tyr Lys Tyr Lys Glu Lys Leu
1 5 10 15

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

Val Ser Pro Ala Leu Leu Leu Ile Pro Gly Gln Thr Glu Ser Trp Trp
35 40 45

Gly Phe Glu Ala Ala Ile Glu Lys Leu Glu Ser Asn Phe Gln Val Phe
 50 55 60

Ala Ile Asp Leu Arg Gly Gln Gly Lys Ser Thr Gln Thr Pro Gly Arg
 65 70 75 80

Tyr Ser Leu Asn Leu Met Gly Asn Asp Leu Val Arg Phe Ile Ser Leu
 85 90 95

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

Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ala Met Pro Asn Gln Ile Arg Ala
 115 120 125

Ile His Cys Glu Asp Ala Pro Phe Phe Thr Ala Glu Lys Ala Pro Leu
 130 135 140

Tyr Gly His Ala Ile Gln Gln Ala Ala Gly Pro Ile Phe Ser Leu Met
 145 150 155 160

Ser Lys Phe Leu Gly Asp Gln Trp Ser Ile Asn Asn Trp Glu Gly Leu
 165 170 175

Lys Ala Ala Gln Ala Lys Asp Thr His Pro Ala Asn Lys Met Ile Ser
 180 185 190

Gln Val Glu Gln Pro Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp Pro Glu Trp
 195 200 205

Gly Arg Ala Phe Ile Glu Gly Lys Phe Asn Leu Asn Ser Pro His His
 210 215 220

Thr Leu Leu Ser Asp Ile Lys Thr Pro Met Leu Tyr Thr His His Met
 225 230 235 240

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

Phe Gln Ala Ser Lys Ile Lys Glu Ile Ala Leu Lys Thr Gly Asn Ser
 260 265 270

Phe Glu Leu Ile Asp Ala Pro Asp Ala Phe His Ser Met His Glu Ala
 275 280 285

Asp Pro Gln Arg Phe Val Asp Ile Leu Thr Ser Trp Ile Glu Arg Leu
 290 295 300

Asn Leu Gln
305

<210> 9
<211> 321
<212> IPT
<213> *Nocardia brasiliensis*

<400> 9

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

Lys Phe Glu Glu Gln Leu Val Asp Leu Gly Glu Ile Arg Met Asn Tyr
20 25 30

Val Ala Ala Gly Asp Pro Thr Ser Pro Ala Leu Leu Leu Ile Pro Ala
35 40 45

Gln Gly Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Asn Ala Ile Thr Leu Leu Ala
50 55 60

Asn Asp Phe Arg Val Phe Ala Ile Asp Leu Arg Gly Gln Gly Arg Ser
65 70 75 80

Thr Trp Thr Pro Gly Arg Tyr Asn Leu Asn Thr Trp Gly Asn Asp Val
85 90 95

Glu Arg Phe Ile Asp Leu Val Ile Gly Arg Pro Thr Leu Val Ala Gly
100 105 110

Asn Ser Ser Gly Gly Val Ile Ala Ala Trp Leu Ala Ala Tyr Ala Lys
115 120 125

Pro Gly Gln Ile Arg Gly Ala Met Leu Glu Asp Pro Pro Leu Phe Ala
130 135 140

Ser Gln Ala Ala Pro Pro Tyr Gly Pro Gly Ile Met Gln Thr Leu Gly
145 150 155 160

Pro Ile Phe Val Leu Trp Ala Lys Trp Leu Gly Pro Gln Trp Ser Val
165 170 175

Gly Asp Trp Asp Gly Met Val Ala Ala Ala Pro Arg Glu Leu Pro Glu
180 185 190

Phe Leu His Pro Gly Ile Ala Phe Leu Phe Gly Asp Gly Thr Gly Glu
195 200 205

Gly Ala Ala Ala Thr Pro Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp Pro Glu
210 215 220

Trp Ala Gln Ala Trp Ala Thr Asp Val Ala Asn Ala Gly Cys Asp His
225 230 235 240

Ala Thr Met Leu Ala Gln Asn Arg Val Pro Val Leu Leu Thr His His
245 250 255

Phe His Leu Thr Asp Pro Asp Thr Gly Gln Leu Met Gly Ala Met Thr
260 265 270

Asp Ile Gln Ala Gln Gln Ala Arg Arg Leu Leu Ala Ala Thr Gly Gln
275 280 285

Pro Val Thr Phe Thr Ala Leu Asp Ala Pro His Thr Met His Asp Pro
290 295 300

Glu Pro Glu Arg Tyr Phe Glu Val Leu Thr Glu Trp Ala Ser Ala Leu
305 310 315 320

Asp

<210> 10
<211> 319
<212> IIPT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 10

Met Gly Arg Tyr Ala Gly Val Phe Gly Pro His Ala Pro Glu Ser Thr
1 5 10 15

Tyr Val Gly His Ala Tyr Pro Glu Gln Leu Phe Asp Thr Gly Glu Val
20 25 30

Arg Leu Asn Tyr Ala Val Ala Gly Asp Ala Ser Ala Ser Pro Leu Leu
35 40 45

Leu Ile Pro Gly Gln Thr Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Pro Ala Met
50 55 60

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

Gln Gly Arg Ser Thr Arg Thr Pro Arg Arg Tyr Thr Leu Asp Asn Ile
85 90 95

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

100

105

110

Phe Val Ser Gly Leu Ser Ser Gly Gly Leu Leu Ser Ala Trp Leu Ser
115 120 125

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

Pro Phe Phe Ser Ser Glu Leu Asp Pro Val Ile Gly Pro Gly Leu Met
145 150 155 160

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

Gln Trp Ser Ile Gly Asp Trp Asp Gly Phe Val Ala Gly Ala Pro Gln
180 185 190

Glu Leu Ala Gly Trp Gln Ala His Val Ala Leu Ala Gly Gly Thr Ala
195 200 205

Glu Pro Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Gly Arg Ala
210 215 220

Phe Val Gly Gly Thr Phe Thr Thr Gly Cys Pro His Gln Val Met Leu
225 230 235 240

Ser Gln Val Lys Val Pro Val Leu Phe Thr His His Phe Arg Met Leu
245 250 255

Asp Asp Glu Ser Gly Ser Leu Ile Gly Ala Ala Thr Asp Asp Gln Ala
260 265 270

Ala Arg Val Val Glu Leu Val Glu Asn Ser Gly Ala Pro Leu Thr Tyr
275 280 285

Arg Ser Phe Pro Met Met Gly His Ser Met His Ala Gln Asp Pro Ala
290 295 300

Leu Phe Ala Gly Thr Leu Val Asp Trp Phe Thr Ala Ala Arg Ser
305 310 315

<210> 11

<211> 319

<212> ΠPT

<213> Mycobacterium gilvum

<400> 11

Met Gly Arg Tyr Ala Gly Val Phe Gly Pro His Ala Pro Glu Ala Thr
1 5 10 15

Tyr Val Glu His Gly Tyr Pro Glu Arg Leu Phe Asp Thr Gly Glu Val
 20 25 30

Gln Leu Asn Tyr Val Val Ala Gly Asp Ala Ala Ala Pro Pro Leu Leu
 35 40 45

Leu Ile Pro Gly Gln Ser Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Ala Ala Ile
 50 55 60

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

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

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

Phe Val Ser Gly Leu Ser Ser Gly Gly Leu Ala Ser Ala Trp Leu Ser
 115 120 125

Ala Phe Ala Lys Pro Gly Gln Val Val Ala Ala Cys Trp Glu Asp Pro
 130 135 140

Pro Phe Phe Ser Ser Glu Thr Ala Pro Ile Val Gly Pro Pro Ile Thr
 145 150 155 160

Asp Ser Ile Gly Pro Leu Phe Gly Met Trp Ala Arg Tyr Leu Gly Asp
 165 170 175

Gln Trp Ser Val Gly Asp Trp Asp Gly Phe Val Ala Ala Val Pro Thr
 180 185 190

Glu Leu Ala Asp Trp Gln Ala His Val Ala Leu Val Val Gly Thr Ala
 195 200 205

Asp Pro Pro Gln Asn Leu Arg Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Gly Lys Ala
 210 215 220

Phe Ile Thr Gly Thr Phe Ala Ala Ser Cys Pro His His Val Met Leu
 225 230 235 240

Ser Lys Val Lys Val Pro Val Leu Tyr Thr His His Phe Arg Met Ile
 245 250 255

Asp Glu Gly Ser Gly Gly Leu Ile Gly Ala Cys Ser Asp Ile Gln Ala
 260 265 270

Gly Arg Val Thr Gln Leu Ala Lys Ser Gly Gly Arg Ser Val Thr Tyr
275 280 285

Arg Ser Phe Pro Met Met Ala His Ser Met His Gly Gln Asp Pro Ala
290 295 300

Leu Phe Ser Glu Thr Leu Val Glu Trp Phe Ser Arg Phe Thr Gly
305 310 315

<210> 12
<211> 322
<212> IIPT
<213> *Gordonia effusa*

<400> 12

Met Pro Lys Ser Glu Ala Ala Asp Arg Ala Asp Ser Phe Val Ser His
1 5 10 15

Asp Phe Lys Glu Asn Ile Val Asp Leu Gly Glu Ile Arg Met Asn Tyr
20 25 30

Val Val Gln Gly Asn Lys Lys Ser Pro Ala Leu Leu Leu Ile Pro Ala
35 40 45

Gln Gly Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Ala Ala Ile Pro Leu Leu Ala
50 55 60

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

Thr Trp Thr Pro Gly Arg Tyr Thr Leu Asp Ile Phe Gly Asn Asp Val
85 90 95

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

Asn Ser Ser Gly Gly Leu Ile Gly Ala Trp Leu Ala Ala Phe Ala Lys
115 120 125

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

Ser Glu Ile Arg Pro Pro Tyr Gly Pro Gly Ile Trp Gln Gly Leu Gly
145 150 155 160

Pro Met Phe Ala Ala Trp Ala Lys Trp Leu Gly Pro Gln Trp Ser Ile
165 170 175

Gly Asp Trp Asp Gly Met Val Lys Ala Leu Pro Asp Glu Leu Pro Glu
180 185 190

Asp Leu Leu Pro Gly Ile Gly Phe Met Leu Gly Asp Gly Glu Ser Asp
195 200 205

Gly Ala Ala Pro Thr Pro Pro Gln His Leu Lys Glu Tyr Asp Pro Glu
210 215 220

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

Glu Ala Val Ile Ser Gln Val Arg Val Pro Val Leu Leu Thr His His
245 250 255

Phe Arg Gln Ile Asn Glu Glu Thr Gly His Leu Met Gly Ala Leu Ser
260 265 270

Asp Leu Gln Ala Ala Gln Val Arg His Ile Ile Glu Glu Val Ala Gly
275 280 285

Gln Glu Val Thr Tyr Val Ser Leu Asp Ala Pro His Thr Met His Glu
290 295 300

Pro Gln Pro Glu Arg Tyr Thr Asp Val Leu Leu Asp Trp Val Lys Lys
305 310 315 320

Leu Gly

<210> 13
<211> 328
<212> IIPT
<213> Togninia minima

<400> 13

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

Val Pro Gly Gln Ser Glu Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Met Ala Met Trp
20 25 30

Leu Leu Lys Asp Asp Tyr Gln Val Phe Ala Val Asp Met Arg Gly Gln
35 40 45

Gly Gln Ser Thr Trp Thr Pro Gly Arg Tyr Ser Leu Asp Thr Phe Gly
50 55 60

Asn Asp Leu Val Lys Phe Ile Asp Ile Val Ile Lys Arg Pro Val Val
 65 70 75 80

Val Ser Gly Leu Ser Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Trp Leu Ser Ala
 85 90 95

Phe Ala Lys Pro Gly Gln Ile Arg Ala Ala Val Tyr Glu Asp Pro Pro
 100 105 110

Leu Phe Ala Ser Gln Ser Lys Pro Ala Ile Gly Gln Ser Val Met Gln
 115 120 125

Thr Val Ala Gly Pro Phe Phe Asn Leu Trp Tyr Lys Trp Leu Gly Ala
 130 135 140

Gln Trp Thr Ile Gly Asp Gln Ala Gly Met Val Ala Ala Met Pro Lys
 145 150 155 160

Glu Ile Pro Ala Trp Ile Leu Gln Tyr Leu Gly Asn Thr Thr Ser Gly
 165 170 175

Pro Thr Gly Leu Asp Leu Thr Leu Asn Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Gly
 180 185 190

His Gly Phe Val Ser Gly Thr Val Asp Ala Thr Cys Asp His Glu Ala
 195 200 205

Met Leu Thr His Val Lys Val Pro Val Leu Phe Thr His His Ser Arg
 210 215 220

Ala Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Asn Leu Ile Gly Ser Val Ser Asp Thr
 225 230 235 240

Gln Val Ser Tyr Ala Gln Gly Leu Ile Thr Thr Asn Gly Asn Gln Ser
 245 250 255

Phe Thr Leu Lys Asn Phe Pro Leu Ala Ser His Asp Met His Asn Ser
 260 265 270

Asp Pro Ala Thr Tyr Val Ser Ala Ile Thr Thr Trp Met Ala Ser Leu
 275 280 285

Gly Ile Gly Ser Ala Val Ile Pro Gly Pro Val Lys Val Ala Ser Ala
 290 295 300

Ser Ala Gln Val Ser Ala Ala Ser Thr Ala Pro Pro Ser Cys Thr Ser
 305 310 315 320

Thr Ser Ala Pro Ser Thr Gly His
325

<210> 14

<211> 280

<212> ΠPT

<213> Actinosynnema mirum

<400> 14

Met Thr Val Val Asp Pro Pro Ala Pro Arg Asp Phe Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Leu Gly Glu Val Val Leu Asn His Ala Glu Ala Gly Ser Pro
20 25 30

Asp Arg Pro Ala Leu Val Pro Val Pro Glu Gln Gly Gly Ser Trp Trp
35 40 45

Ser Tyr Glu Arg Val Met Pro Leu Pro Ala Arg Asp Phe His Val Phe
50 55 60

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

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

Val Val Arg Arg Pro Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val
100 105 110

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

Val Leu Leu Glu Asp Pro Pro Leu Phe Ser Ser Glu Leu Thr Pro Val
130 135 140

Cys Gly Pro Gly Val Arg Gln Ala Ala Gly Pro Leu Phe Glu Leu Leu
145 150 155 160

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

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

Val Ala Arg Arg Ala Ala Ala Thr Asp Ala Arg Gly Arg Pro Gly Ala
195 200 205

Ala Arg Gly Arg Pro Ala Gly Val Gly Gly Ala Ala Arg Arg Gly Arg

210

215

220

Gly Gly Arg Glu Arg Thr Gly Thr Thr Thr Val Leu Ser Gly Leu Thr
225 230 235 240

Gly Ser Arg Thr Ser Gly Thr Gly Arg Cys Arg Lys Pro Phe Arg Leu
245 250 255

Arg Gln Trp Trp Ala Gly Gly Ala Arg Gly Pro Pro Pro Pro Arg Gln
260 265 270

Ile Arg Ala Asp Val Arg Thr Arg
275 280

<210> 15

<211> 326

<212> ΠPT

<213> Kutzneria albida

<400> 15

Met Ser Val Pro Val Thr Pro Ser Ala Arg Asn Val Phe Val Pro His
1 5 10 15

Ala Phe Pro Glu Lys Gln Ile Asp Leu Gly Glu Val Val Leu Asn Tyr
20 25 30

Ala Glu Ala Gly Thr Pro Asp Lys Pro Ala Leu Leu Leu Leu Pro Glu
35 40 45

Gln Thr Gly Ser Trp Trp Ser Tyr Glu Pro Ala Met Gly Leu Leu Ala
50 55 60

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

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

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

Cys Ser Ser Gly Gly Val Leu Ala Ala Trp Leu Ser Ala Tyr Ala Leu
115 120 125

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

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

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

Gly Asp Trp Ala Gly Leu Val Ala Ala Ala Gln Ala Ser Pro Ala Lys
180 185 190

Met Met Ser Leu Phe Lys Met Pro Gly Glu Pro Pro Gln Asn Leu Arg
195 200 205

Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Ala Arg Val Phe Phe Glu Gly Thr Val Gly
210 215 220

Leu His Cys Pro His Asp Arg Met Leu Ser Gln Val Lys Thr Pro Val
225 230 235 240

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

Leu Gly Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ala Glu Arg Ala Gln Ala Ile Ile
260 265 270

Arg Ala Ala Gly Val Pro Val Asp Tyr Gln Ser Phe Pro Asp Ala Ala
275 280 285

His Ala Met His Thr Thr Glu Pro Ala Arg Tyr Ala Ala Val Leu Thr
290 295 300

Ala Trp Ala Ala Lys Leu Pro Pro Val Ala Asp Thr Ser Pro Ser Ala
305 310 315 320

Ala Ala Ser Ala His Val
325

<210> 16
<211> 987
<212> DNA
<213> Rhodococcus erythropolis

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид
с SEQ ID NO: 1

<400> 16
atggccgaag aaggaactag gtccgaagca gcggatgctg ccacacaagc gagacagcta 60
cccgattcgc ggaacatctt tgtctcgcac cgatttccgg aaaggcaggt cgatctcggg 120
gaagtgggtga tgaacttcgc ggaggcgggc tctccggaca acccggcact gctcctcctc 180

cccgagcaga ccgggtcgtg gtggagttac gagccagtga tgggtcttct ggcagagAAC 240
tttcatgtct ttgccgtcga tatccgtggg caaggtcgcA gtacctggac gccacggcga 300
tacagcctgg acaacttcgg caatgatctg gtgCGtttca tcgctctggt catcaagcgc 360
cctgtcgtcg tggcagggaa ctctcggggg gggctgctgg ccgcctggct ctCGgcgtac 420
gCGatgcccc gccagatccg tgcagcattg tgtgaggacg caccgttctt tgcgtcggag 480
ttggtccccg catacgggtca ctCGgttctg caggcggcgg gtccggcatt cGagttgtac 540
cgggacttcc tcggggacca gtggtcgatt ggggactgga aagggttctg tGagggcagcc 600
aaagcgtcgc cggcaaaggc tatgcaatta tttccgacct cggatgaggc gccgcagaat 660
ctcaaggaat acgaccCGga atgggggCGc gCattcttcg aagggactgt ggcactgcac 720
tgcccacacg acaggatgct ctCGcaagtc aagacaccaa ttctcatcac tcaccacgCG 780
cggacgatcg accccgagac gggcgagctg ttgggCGCGc tctccgacct tcaggcagag 840
catgCGcagg acatcattcg gtctgCGggc gttcgggtgg actatcagtc gCaccccgac 900
gCGcttcaca tgatgcatct gttcGatccc gctCGttacg cggagatctt gacatcctgg 960
tccgcaacac tgcctgCGaa cGactag 987

<210> 17
<211> 987
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ОРС была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<400> 17
atggcagaag aaggcaccCG tagcgaagca gcagatgcag caaccCGgc acgtcagctg 60
ccggatagcc gtaacatttt tgttagccat cgttttccgg aacgtcaggT tgatctgggt 120
gaagtgttta tgaattttgc agaagcaggT agtccggata atccggcatt actgctgctg 180
ccggaacaga ccggtagttg gtggtcttat gaaccggtta tgggtctgct ggcagaaaac 240
tttcatgttt ttgcagttga tattcgtggT cagggtcGta gCacctggac accgCGctgT 300
tatagcctgg ataattttgg taatgatctg gtgCGtttta ttGCCctggt tattaaacgt 360
ccggttgTtg ttgcaggtaa tagcagcggT ggcctgctgg ctgcatggct gagcgcctat 420
gcaatgctg gtcagattcg tgcagcactg tgtgaagatg caccgttttt tgcaagCGaa 480
ctggttctcg cctatggtca tagcgttctg caggcagcag gtccggcatt tgaactgtat 540
cgtgattttc tgggtgatca gtggtcaatt ggtgattgga aaggttttgt tgaagcagca 600
aaagcaagtc cggctaaagc aatgcagctg tttccgacac cggatgaagc accgcagaat 660
ctgaaagaat atgatccgga atggggctcg gCattttttg aaggcaccgt tgcactgcat 720
tgtccgcatg atcgtatgct gagccaggTt aaaacccCGa ttctgattac ccatcatgca 780

cgtaccatcg atccggaaac cgggtgaactg ctgggtgcac tgagtgatct gcaggccgaa 840
catgcacagg atattattcg tagtgccggt gttcgtgttg attatcagag ccatcctgat 900
gcactgcaca tgatgcacct gtttgatccg gcacgttatg cagaaattct gaccagttgg 960
agcgcaacc tgcctgcaaa tgattaa 987

<210> 18
<211> 927
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ОРС была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 2

<400> 18
atggcagatc cggcacagcg tgatgtttat gttccgcatg catatccgga aaaacaggca 60
gatctgggtg aaattacat gaattatgcc gaagccggtg aacctgatat gcctgcagtt 120
ctgctgattc cggaacagac cggtagttgg tggggttatg aagaagcaat gggctctgctg 180
gcagaaaact ttcattgtta tgcagttgat ctgcgtggtc agggtcgtag cagctgggca 240
ccgaaacgtt atagcctgga taattttggt aatgatctgg tgcgttttat tgccctgggt 300
gttaaacgtc cggttattgt tgcaggtaat agcagcgggtg gtgttctggc agcatggctg 360
agcgcatata gcatgcctgg tcaggttcgt ggtgcactgt gtgaagatgc accgtttttt 420
gcaagcgaac tggttaccac ctgtggtcac agcattcgtc aggcagcagg tccgatgttt 480
gaactgtttc gtacctatct gggcgatcag tggtcagttg gtgattggac cggctattgt 540
cgtgcagcag atgcaagcag cagcccgatg gcacgttatt ttgttgcaaga tgaaattccg 600
cagcacatgc gtgaatatga tccggaatgg gcacgtgcat tttgggaagg caccgttgca 660
ctgcattgtc cgcatgaaca gctgctgacc cagggttaaaa caccggtgct gctgacacat 720
cacatgcgcy atattgatcc tgataccggt catctggttg gtgccctgag tgatgaacag 780
gcagcccgtg cacgtctgct gatggaaagt gccggtgtta aagttgatta tgcaagcgtt 840
ccggatgcac tgcacatgat gcaccagttt gatccgcctc gttatgttga aatctttacc 900
cagtgggcag caaccctggc agcataa 927

<210> 19
<211> 930
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> OPC была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 3

<400> 19
atggttacca gtccggcact gcgtgatggt catgttccgc atgcatatcc ggaacagcag 60
gttgatctgg gtgaaattac catgaattat gccgaagccg gtgatccggg tcgtccggca 120
gttctgctga tcccggaaca gaccggtagt tgggtggtctt atgaagaagc aatgggtctg 180
ctggcagaac attttcatgt ttatgcagtt gatctgcgtg gtcagggtcg tagcagctgg 240
accccgaaac gttatagcct ggataatfff ggtaatgatc tgggtgcgttt tattgcctcg 300
gttgttcgtc gtccggttgt tgttgcaggt aatagcagcg gtgggtgttct ggcagcatgg 360
ctgagcgcac atagcatgcc tggtcagatt cgtgggtgtgc tgtgtgaaga tccgcctttt 420
tttgcaagcg aactggttcc ggacacatggt catagcgttc gtcaggggtgc aggtccggtt 480
tttgaactgt ttcgtaccta tctgggcgat cagtggtcag ttgggtgattg ggaaggtttt 540
cgtagcgcag cacatgcaag cgcaagcccg atggcacgta gctttgttgc agataccatt 600
ccgcagcatc tgaagaata tgatccgga tgggcacgtg cattttatga aggcaccggt 660
ggtctgaatt gtccgcatga acgtatgctg aatcgtgtta atacaccggt gctgctgacc 720
catcacatgc gtggcaccca tccggaacc ggtaatctgc tgggtgcaact gagtgatgaa 780
caggcagcac aggtgcgtcg tctgatggaa agtgccggtg ttaaagttga ttatgaaagc 840
gttccggatg caagccacat gatgcaccag agcgatccgg cacgttatgc agaaattctg 900
accccgtaga ccgcagcact ggcaccgtaa 930

<210> 20
<211> 930
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> OPC была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 4

<400> 20
atggttacca gtccggcact gcgtgatggt catgttccgc atgcatatcc ggaacagcag 60
gttgatctgg gtgaaattac catgaattat gccgaagccg gtgatcctga tcgtccggca 120

gttctgctga tcccggaaca gaccggtagt tgggtggtcat atgaagaagc aatgggtctg 180
 ctggcagaac attttcatgt ttatgcagtt gatctgctg gtcagggctg tagcagctgg 240
 accccgaaac gttatagcct ggataatttt ggtaatgatac tgggtgcgttt tattgccttg 300
 gttgttaaac gtccggttgt tgttgcaggt aatagcagcg gtggtgttct ggcagcatgg 360
 ctgagcgcat atagcatgcc tggtcagctg cgtggtgtgc tgtgtgaaga tccgcctttt 420
 tttgcaagcg aactggttcc ggcacatggt catagcgttc gtcaggggtgc aggtccggtt 480
 tttgaactgt ttcgtaccta tctgggcat cagtggctcag ttagcgattg ggaagggttt 540
 tgtcgtgcag ccggtgcaag cgcaagccc atggcacgta gctttgttgc agatggtatt 600
 ccgagcatc tgaagaata tgatccgga tgggcacgtg catttcatga aggcaccgtt 660
 ggtctgaatt gtccgcatga acgtatgctg ggtcgtgtta atacaccggt gctgctgacc 720
 catcatatgc gtggcaccga tccggaacc ggtaatctgc tgggtgact gagtgatgaa 780
 caggcagcac aggcagctct gctgatgaa agtgccggtg ttcgtgttga ttatgaaagc 840
 gttccgatg caagccatat gatgcaccag agcgatccgg cacgttatgc agaaatcttt 900
 acccggtggg cagcagccct ggcaccgtaa 930

<210> 21
 <211> 930
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> OPC была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 5

<400> 21
 atggttacca gtccggcact gcgtgatgtt catgttccgc atgcatatcc ggaacagcag 60
 gttgatctgg gtgaaattac catgaattat gccgaagccg gtgatccggg tcgtccggca 120
 gttctgctga tcccggaaca gaccggtagt tgggtggtcct atgaagaagc aatgggtctg 180
 ctggcagaac attttcatgt ttatgcagtt gatctgctg gtcagggctg tagcagctgg 240
 accccgaaac gttatagcct ggataatttt ggtaatgatac tgggtgcgttt tatggcactg 300
 gttgttcgtc gtccggttgt tgttgcaggt aatagcagcg gtggtgttct ggcagcatgg 360
 ctgagcgcat atagcatgcc tggtcagatt cgtggtgtgc tgtgtgaaga tccgcctttt 420
 tttgcaagcg aactggttcc ggcacatggt catagcgttc gtcaggggtgc aggtccggtt 480
 tttgaactgt ttcgtaccta tctgggcat cagtggctcag ttggtgattg ggaagggttt 540
 cgtagcgcag ccggtgcaag cgcaagccc atggcacgta gctttgttgc agataccatt 600

ccgcagcatc tgaagaata tgatccgga tgggcacgtg cattttatga aggcaccggt 660
ggctctgaatt gtccgcatga acgtatgctg aatcgtgtta atacaccggt gctgctgacc 720
catcacatgc gtggcaccga tccggaacc ggtaatctgc tgggtgact gagtgatgaa 780
caggcagcac aggcacgtcg tctgatgga agtgccggtg ttaaagttga ttatgaaagc 840
gttccggatg caagccacat gatgcaccag agcgatccgg cacgttatgc agaaattctg 900
accccgtagg cagcagccct ggcaccgtaa 930

<210> 22
<211> 930
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ОРС была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 6

<400> 22
atggttacca gtccggcact gcgtgatgtt catgttccgc atgcatatcc ggaacagcag 60
gttgatctgg gtgaaattac catgaattat gccgaagccg gtgatcctga tcgtccggca 120
gttctgctga tcccggaaca gaccggtagt tgggtgctt atgaagaagc aatgggtctg 180
ctgagcgaac attttcatgt ttatgcagtt gatctgcgtg gtcagggctg tagcagctgg 240
accccgaaac gttatagcct ggataatttt ggtaatgatc tgggtgcgtt tattgcctg 300
gttgtaaac gtccggttgt tgttgacaggt aatagcagcg gtggtgttct ggcagcatgg 360
ctgagcgcac atagcatgcc tggtcagctg cgtggtgtgc tgtgtgaaga tccgcctttt 420
tttgcaagcg aactggttcc ggcacatggt catagcgttc gtcaggggtg aggtccggtt 480
tttgaactgt ttcgtaccta tctgggcatg cagtggctcag ttggtgattg ggaaggtttt 540
tgtcgtgcag ccggtgcaag cgcaagcccg atggcacgta gctttgttgc agatggtatt 600
ccgcagcatc tgcaagaata tgatccgga tgggcacgtg ttttttatga aggcaccggt 660
ggctctgagct gtccgcatga acgtatgctg ggtcagggtta aaacaccggt gctgctgacc 720
catcacatgc gtggtatcga tccggaacc ggtaatctgc tgggtgact gagtgatgaa 780
caggccctgc gtgcacgtcg tctgatggat agtgccggtg ttaccggtga ttatgaaagc 840
gttccggatg caagccacat gatgcaccag agcgcaccgg cacgttatgt tgaaatcttt 900
acccgtagg cagcagccct ggcaccgtaa 930

<210> 23

<211> 903
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ORF была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 7

<400> 23
atgccgcacg attatgaaga aaaactgggt gatctgggcg aaatcgatct gaattatgca 60
gaagcaggta gtccggataa accggcactg ctgctgattc cgagccagag cgaaggttgg 120
tggggctatg aagaagcaat gggctctgctg gccgaagatt atcatgtttt tgcagttgat 180
atgctgtggc agggctgtag cacctggaca ccgggtcggt atagcctgga taattttggt 240
aatgatctgg tgcgctttat cgatctgggt attggctgta ccgttattgt tagcggtaat 300
agcagcggtg gtgttggtgc agcatggctg gcagcattta gcctgcctgg tcaggttcgt 360
gcagcactgg cagaagatgc accgtttttt gcaagcgaac tggaccgaa agtgggtcat 420
accattcgtc aggcagcagg tcatattttt gttaactggc gtgattatct gggtgatcag 480
tggtcagttg gtgattatgc aggttttctg aaagcaatga aaagcagcga agttccgatg 540
ctgcgtcagg ttccgctgcc ggaaacgca ccgcagaatc tgctggaata tgatccggaa 600
tgggcacgtg cattttatga aggcaccgtt gcacagacct gtccgcatga ttatatgctg 660
agccaggtta aagtgcctat gctggttacc catcatgcac gtatgattga tgaagcaacc 720
agcggctctg ttgggtgcaat gagcgatctg caggttcaga aagcagcaga aattattcgt 780
ggcaccggtg ttcaggttga tgttgttgat ctgccggaag caccgcatat tctgcatcag 840
ctggcaccga aagaatatgt ggaaattctg aataactggg tggaaaaact gcctccggtt 900
taa 903

<210> 24
<211> 924
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ORF была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 8

<400> 24

atgatccaga acaataaaaac cgcaccgtat aaatacaaag aaaaactggt tgatctgggc 60
gaaatcaaaa tgaactatat tgttgccggg gcagatgtta gtccggcact gctgctgatt 120
ccgggtcaga ccgaaagttg gtgggggtttt gaagcagcaa ttgagaaact ggaaagcaac 180
tttcaggtgt ttgcaattga tctgcgtggg cagggtaaaa gcaccagac accgggtcgt 240
tatagcctga atctgatggg taatgatctg gttcgtttta ttagcctggg tattaacgt 300
ccggttattg ttagcggtaa tagcagcggg ggtctgctgg cagcatggct gagcgctat 360
gcaatgccga atcagattcg tgcaattcat tgtgaagatg caccgttttt taccgcagaa 420
aaagcaccgc tgtatggtca tgcaattcag caggcagcag gtccgatttt tagcctgatg 480
agcaaatttc tgggtgatca gtggtcaatt aacaattggg aaggctctgaa agcagcacag 540
gcaaaagata cccatccggc aaacaaaatg attagccagg ttgaacagcc tccgcagcat 600
ctgaaagaat atgatccgga atggggctcg gcattttattg aaggcaaatt taacctgaac 660
agtccgcac ataccctgct gagcgacatt aaaaccccgga tgctgtatac ccatcacatg 720
cgttttgaag atccgcagac aggtctgctg attggtgcaa ccagcgattt tcaggcaagc 780
aaaatcaaag aaattgcctt gaaaaccggc aatagcttcg aactgattga tgcaccggat 840
gcatttcata gtatgcatga agccgatccg cagcgttttg ttgatattct gaccagctgg 900
attgaacgtc tgaatctgca gtaa 924

<210> 25
<211> 966
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ОРС была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 9

<400> 25
atgggtatta gcgaagcagc agatcgtgca gatacctttg ttgcacataa atttgaagaa 60
cagctggttg atctgggtga aattcgtatg aattatgttg cagccgggtga tccgaccagt 120
ccggcactgc tgctgattcc ggcacagggg gaaagttggg ggggttatga aaatgcaatt 180
accctgctgg caaatgattt tcgtgttttt gcaattgatc tgctggttca gggctgtagc 240
acctggacac cgggtcgtaa taatctgaat acctggggta atgatgtgga acgctttatt 300
gatctggtta ttggctgccc gaccctgggt gcaggtaata gcagcgggtg tgttattgca 360
gcatggctgg cagcctatgc aaaaccgggt cagattcgtg gtgcaatgct ggaagatccg 420
cctctgtttg caagccaggc agcaccgcct tatgggtccgg gtattatgca gaccctgggt 480

ccgatttttg ttctgtgggc aaaatggctg ggtccgcagt ggtcagttgg tgattgggat 540
 ggtatgggtg cagcggcacc gcgtgaactg ccggaatttc tgcattccggg tatcgcattt 600
 ctgtttgggtg atggcaccgg tgaaggtgca gcagcaaccc ctccgcagca tctgaaagaa 660
 tatgatccgg aatgggcaca ggcatgggca accgatgttg caaatgcagg ttgtgatcat 720
 gcaaccatgc tggcacagaa tcgtgttccg gttctgctga cccatcattt tcatctgacc 780
 gatccggata caggccagct gatgggtgca atgaccgata ttcaggcaca gcaggcacgt 840
 cgtctgctgg cagcaaccgg tcagccggtt acctttaccg cactggatgc accgcatacc 900
 atgcatgata ctgaacctga acgttatttt gaagttctga ccgaatgggc aagtgcactg 960
 gattaa 966

<210> 26
 <211> 960
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ОРС была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 10

<400> 26
 atgggtcggtt atgccggtgt ttttgggtccg catgcaccgg aaagcaccta tgttgggtcat 60
 gcatatccgg aacaactggt tgataccggt gaagttcgtc tgaattatgc agttgccggt 120
 gatgcaagcg caagtccgct gctgctgatt ccgggtcaga ccgaaagttg gtgggggttat 180
 gaaccggcaa tgggtctgct ggcagaacat tttcatgttc atgcagttga tctgcgtggt 240
 cagggtcgta gcaccctac accgcgtcgt tataccctgg ataattattgg taatgatctg 300
 gtgcgttttc tggatggtgt tattgggtcgt ccggcatttg ttagcgggtct gagcagcgggt 360
 ggtctgctga gcgcatggct gagcgccttt gcagaaccgg gtcagggttct ggcagcatgt 420
 tatgaagatc cgcctttttt tagcagcga ctggaccggg tgattgggtcc gggctctgatg 480
 agcaccgttg gtccgctggt tgcaactgat gttaaatac tgggtgatca gtgggtcaatt 540
 ggtgattggg atggttttgt tgcaggcgca ccgcaagaac tggcagggtg gcaggcacat 600
 gttgcaactg caggcggtag agcagaaccg cctcagcatc tgaagaata tgatccggaa 660
 tggggtcgtg catttggttg tggcaccttt accaccgggt gtccgcatca ggttatgctg 720
 agccaggtta aagttccggt tctgtttacc catcattttc gtatgctgga tgatgaaagc 780
 ggtagcctga ttgggtgcagc aaccgatgat caggcagcac gtgttggtga actgggttga 840

aatagtgggtg caccgctgac ctatcgtagc tttccgatga tgggtcatag tatgcatgca 900
caagatccgg cactgtttgc aggcaccctg gttgattggt ttaccgcagc acgtagctaa 960

<210> 27
<211> 960
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ОРС была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 11

<400> 27
atgggtcggt atgccggtgt ttttgggtccg catgcaccgg aagcaacctg tgttgaacat 60
ggttatccgg aacgtctggt tgataccggg gaagtgcagc tgaattatgt tgttgccggg 120
gatgcagcag caccgcctct gctgctgatt ccgggtcaga gcgaaagttg gtgggggttat 180
gaagcagcaa ttccgctgct ggcacgtcat tttcatgttc atgcagttga tctgctgggt 240
cagggtcgta gcaccctac accgggtcgc tataccctgg ataagtgttg taatgatctg 300
gtgctgtttc tggatgggtg tattgggtcgt ccggcatttg ttagcgggtct gagcagcggg 360
ggctctggcaa gcgcatggct gagcgcattt gcaaaaccgg gtcagggttg tgcagcatgt 420
tgggaagatc cgcctttttt tagcagcгаа accgcaccga ttgttgggtcc gcctattacc 480
gatagcattg gtccgctggt tggatgtggt gcacgttatc tgggtgatca gtgggtcagtt 540
ggtgattggg atggttttgt tgccgcagtt ccgaccgaac tggcagattg gcaggcacat 600
gttgactggt ttgttggcac cgcagatcct ccgcagaatc tgcgtgaata tgatccggaa 660
tggggtaaag catttattac cggcaccttt gcagcaagct gtccgcatca tgttatgctg 720
agcaaagtta aagttccggg tctgtatacc catcactttc gcatgattga tgaaggtagt 780
ggtggtctga ttggtgcatg tagcgatatt caggcaggtc gtgttaccca gctggcaaaa 840
tcaggtgggt gtagcgttac ctatcgtagc tttccgatga tggcacatag catgcatggt 900
caagatccgg cactgttttag cгааaccctg gttgaatggt ttagccggtt taccgggttaa 960

<210> 28
<211> 969
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ОРС была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид
с SEQ ID NO: 12

<400> 28
atgccgaaaa gcgaagcagc agatcgtgca gatagctttg ttagccatga tttcaaagaa 60
aacattgtgg atctgggcga aatccgcatg aattatgttg ttcagggcaa caaaaaaagt 120
ccggcactgc tgctgattcc ggcacagggt gaaagttggt ggggttatga agcagcaatt 180
ccgctgctgg caaaacattt tcaggttttt gcaattgacg tgcgtggtca gggctgtacc 240
acctggacac cgggtcgtta taccctggat atttttggta atgatgtggt gcgctttatc 300
gatctgggta ttggctgctga aaccctgatt gcaggtaata gcagcgggtg tctgattggt 360
gcatggctgg cagcatttgc aaaaccgggt caggttcgtg cagttatgct ggaagatccg 420
cctctgtttg caagcgaat tcgtccgcct tatgggccgg gtatttggca gggctcgggt 480
ccgatgtttg cagcatgggc aaaatggctg ggtccgcagt ggtcaattgg tgattgggat 540
ggtatgggta aagcactgcc ggatgaactg ccggaagatc tgctgcctgg tattgggttt 600
atgctgggtg atggtgaaag tgatggtgca gcaccgacct ctccgcagca tctgaaagaa 660
tatgatccgg aatgggggtgc aagctgggca agcgggtttt ccaataccgg ttgtgaacat 720
gaagcagtta ttagccaggt gcgtgttccg gttctgctga cccatcattt tcgtcagatt 780
aatgaagaaa ccggctcatc gatgggtgca ctgagcgatc tgcaggcagc acaggttcgt 840
catatcattg aagaagttgc aggtcaagag gttacctatg ttagcctgga tgcaccgcat 900
accatgcatg aaccgcagcc ggaacgttat accgatgttc tgctggattg ggttaaaaaa 960
ctgggttaa 969

<210> 29
<211> 987
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ОРС была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась
от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид
с SEQ ID NO: 13

<400> 29
atgaattatg caaccgcagg tagcagcgat aaaccggcac tgctgctggt tccgggtcag 60
agcgaagatt ggtgggggta tgaatggca atgtggctgc tgaagatga ttatcaggtt 120
tttgagttg atatgcgtgg tcagggtcag agtacctgga caccgggtcg ttatagcctg 180
gatacctttg gtaatgatct ggtgaaattc atcgatatcg tgattaaacg tccggttggt 240

gtttagcggtc tgagcagcgg tgggtgttg agcgcacatggc tgagcgcatt tgcaaaacct 300
 ggtagcagattc gtgcagcagc ttatgaagat ccgcctctgt ttgcaagcca gagcaaacccg 360
 gcaattgggc agagtgttat gcagaccggt gcaggtccgt tttttaacct gtggtataaa 420
 tggctgggtg cacagtggac cattgggtgat caggcaggta tggttgcagc aatgccgaaa 480
 gaaattccgg catggattct gcagtatctg ggtaatacca ccagtgggtcc gaccgggtctg 540
 gatctgacac tgaatgaata tgatccggaa tgggggtcatg gttttgtagg tggcaccggt 600
 gatgcaacct gtgatcatga agcaatgctg acccatgtta aagttccgggt tctgtttacc 660
 catcatagcc gtgcaattga tccgtatacc ggtaatctga ttggtagcgt tagcgatacc 720
 caggtagct atgcacaggg tctgattacc accaatggca atcagagctt taccctgaaa 780
 aactttccgc tggcaagcca tgatatgcat aattctgatc cggcaacctg tgtagcgcga 840
 attaccacct ggatggcaag cctgggtatt ggtagtgcag ttattccggg tccgggtaaa 900
 gttgcaagcg caagcgcaca ggtagcgcga gcaagcaccg caccgcctag ctgtaccagc 960
 accagcgcac cgagcaccgg tcattaa 987

<210> 30
 <211> 843
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ОРС была кодон-оптимизирована и, таким образом, отличалась от последовательности ДНК, встречающейся в природе.

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид с SEQ ID NO: 14

<400> 30
 atgaccggtg ttgatccgcc tgcaccgcgt gattttccgg aactgctggg tgatctgggt 60
 gaagttgttc tgaatcatgc agaagcaggt agtccggatc gtccggcact ggttccgggtg 120
 ccggaacagg gtggtagttg gtggctttat gaacgtgtta tgccgctgcc tgcacgcgat 180
 tttcatgttt ttgcagttga tctgcgtggg cgtgggtcgtg gcaccctgac accgcgtcgt 240
 tatagcctgg atgattttgg taatgatctg gttcgttttc tggccctggg tgttcgccgt 300
 ccggcagttg ttgcaggtaa tagcagcggg ggtgttctgg cagcatgggc aagcgcctat 360
 gcaatgcctg gtcaggttcg tgcagttctg ctggaagatc cgcctctggt tagcagcga 420
 ctgacaccgg tttgtgggtc ggggtgttcgt caggcagcag gtccgctggt tgaactgctg 480
 agcaccatc tgggcgatca gtgggggtgg ggtcgtccgg gtcgtgttca tgggtggcgtt 540
 ccgctctggt gtctggcagc cgcagcagca gttcgtgttg cacgtcgtgc agcagcaacc 600

gatgcacgtg gtcgccctgg tgcagcacgt ggacgtcctg cccgtggttg tgggtgcagct 660
cgtcgcggtc gcgggtggtc tgaacgcacc ggtacaacca cccgttctgag cgggtctgacc 720
ggtagccgta ccagcggcac cggtcgttgt cgtaaaccgt ttcgtctgcg tcagtgggtg 780
gcaggcggtg cccgtggtcc tcctccgect cgtcagattc gcgcagatgt tcgtaccctg 840
taa 843

<210> 31
<211> 981
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> misc_feature
<223> Искусственная последовательность ДНК, кодирующая полипептид
с SEQ ID NO: 15

<400> 31
atgagcgttc cggttacccc gagcgcacgt aatgtttttg ttccgcatgc atttccagag 60
aaacaaattg atctgggtga agtggttctg aattatgcag aagcaggtag accggataaa 120
ccggcattac tgctgctgcc ggaacagacc ggtagtgggt ggtcttatga accggcaatg 180
ggtctgctgg cagaacattt tcatgttttt gcagttgatc tgcgtggtca gggtcgtagc 240
acctggacac cgggtcgtta tagcctggat aattttggta atgatctggt gcgttttatt 300
gactggcaa ttcgtcgctc ggttggtggt gcaggttgta gcagcgggtg tgttctggca 360
gcatggctga gcgcctatgc actgcctggt cagattcgtg gtgcactgtg tgaagatgca 420
ccgctgtttg caagcgaact gacaccggca catggtcatg gtgttcgtca ggggtgcaggt 480
ccggtttttg aactgtatcg tgattatctg ggcgatcagt ggtcagttgg tgattgggca 540
ggtctgggtg cagcagcaca ggcaagtccg gcaaaaatga tgagcctggt taaaatgcct 600
ggtgaaccgc ctcagaatct gcgtgaatat gatccggaat gggcacgtgt tttttttgaa 660
ggcaccggtg gtctgcattg tccgcatgat cgtatgctga gccagggtta aacaccggtt 720
ctgattacc atcatgcacg taccaccgat ccggaaccg gtgaatttct ggggtgactg 780
agcgaactgc aggcagaacg tgcacaggcc attattcgtg cagccgggtg tccggttgat 840
tatcagagct ttccggatgc agcacatgca atgcatacca cagaaccggc acgttatgca 900
gcagttctga ccgcatgggc agcaaaactg cctccgggtg cagataccag cccgtcagca 960
gcagcaagcg cacatgttta a 981

<210> 32
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<400> 32

Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 33

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<400> 33

Arg Thr Ile Asp Pro Glu Thr
1 5

<210> 34

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<400> 34

Asp Ala Leu His Met Met His
1 5

<210> 35

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<400> 35

Ala Gly Asp Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 36

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<400> 36

Ala Gly Asp Ser Ser Leu Gly
1 5

<210> 37

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<400> 37

Ala Gly Gln Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 38

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<400> 38

Ala Gly His Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 39

<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 39

Ala Gly Ser Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 40

Ser Gly Asn Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 41

Ser Gly Asp Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 42
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 42

Ser Gly Gln Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 43
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 43

Ser Gly His Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 44
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 44

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 45
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 45

Arg Thr Ile Asp Pro Glu Thr
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 46

Arg Asp Ile Asp Pro Asp Thr
1 5

<210> 47
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 47

Arg Gly Thr Asp Pro Glu Thr
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 48

Arg Gly Ile Asp Pro Glu Thr
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<400> 49

Asp Ala Leu His Met Met His

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<400> 50

Asp Ala Ser His Met Met His

1 5

<210> 51

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(11)

<400> 51

Val Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Leu Leu

1 5 10

<210> 52

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(11)

<400> 52

Ile Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val Leu
1 5 10

<210> 53
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(11)

<400> 53

His Ala Arg Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Glu
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(11)

<400> 54

His Met Arg Asp Ile Asp Pro Asp Thr Gly His
1 5 10

<210> 55
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(11)

<400> 55

His Met Arg Gly Thr Asp Pro Glu Thr Gly Asn
1 5 10

<210> 56
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(11)

<400> 56

His Pro Asp Ala Leu His Met Met His Leu Phe
1 5 10

<210> 57
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(11)

<400> 57

Val Pro Asp Ala Leu His Met Met His Gln Phe
1 5 10

<210> 58
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(11)

<400> 58

Val Pro Asp Ala Ser His Met Met His Gln Ser
1 5 10

<210> 59
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> АМИНОКИСЛОТНЫЙ МОТИВ

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(21)

<400> 59

Ile Lys Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Trp Leu Ser
20

<210> 60
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> АМИНОКИСЛОТНЫЙ МОТИВ

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(21)

<400> 60

Val Lys Arg Pro Val Ile Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val Leu
1 5 10 15

Ala Ala Trp Leu Ser
20

<210> 61
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> АМИНОКИСЛОТНЫЙ МОТИВ

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(21)

<400> 61

Val Arg Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val Leu
1 5 10 15

Ala Ala Trp Leu Ser
20

<210> 62
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> АМИНОКИСЛОТНЫЙ МОТИВ

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(21)

<400> 62

Val Lys Arg Pro Val Val Val Ala Gly Asn Ser Ser Gly Gly Val Leu
1 5 10 15

Ala Ala Trp Leu Ser
20

<210> 63
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> АМИНОКИСЛОТНЫЙ МОТИВ

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(21)

<400> 63

Ile Leu Ile Thr His His Ala Arg Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Glu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ala Leu
20

<210> 64
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> АМИНОКИСЛОТНЫЙ МОТИВ

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(21)

<400> 64

Val Leu Leu Thr His His Met Arg Asp Ile Asp Pro Asp Thr Gly His
1 5 10 15

Leu Val Gly Ala Leu
20

<210> 65
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(21)

<400> 65

Val Leu Leu Thr His His Met Arg Gly Thr Asp Pro Glu Thr Gly Asn
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ala Leu
20

<210> 66
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(21)

<400> 66

Val Leu Leu Thr His His Pro Asp Ala Leu His Met Met His Leu Phe
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ala Leu
20

<210> 67
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотный мотив

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(21)

<400> 67

Val Asp Tyr Gln Ser His Pro Asp Ala Leu His Met Met His Leu Phe
1 5 10 15

Asp Pro Ala Arg Tyr
20

<210> 68

<211> 21

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотный мотив

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(21)

<400> 68

Val Asp Tyr Ala Ser Val Pro Asp Ala Leu His Met Met His Gln Phe
1 5 10 15

Asp Pro Pro Arg Tyr
20

<210> 69

<211> 21

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(21)

<400> 69

Val Asp Tyr Glu Ser Val Pro Asp Ala Ser His Met Met His Gln Ser
1 5 10 15

Ala Pro Ala Arg Tyr
20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Добавка, которая гидролитически расщепляет зеараленон и/или по меньшей мере одно производное зеараленона для получения продуктов питания для свиней, птицы или аквакультуры для добавления к пищевым продуктам или к высушенной барде, где добавка содержит по меньшей мере один полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 2-15 или ее функциональный вариант, где идентичность последовательности между функциональным вариантом и по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей составляет по меньшей мере 70%, а также, присутствуют вспомогательные вещества.

2. Добавка по п.1, где вспомогательные вещества выбраны из по меньшей мере одного инертного носителя, а также необязательных дополнительных ингредиентов, таких как витамины и/или минералы и/или ферменты и/или другие компоненты для детоксификации микотоксинов.

3. Добавка по п.1 или 2, где по меньшей мере один полипептид по любому из пп.1 или 2 присутствует в добавке в концентрации не более 10000 ед/г, предпочтительно не более 1000 ед/г, более предпочтительно не более 100 ед/г и наиболее предпочтительно не более 10 ед/г.

4. Добавка по любому из пп.1, 2 или 3, где добавка присутствует в капсулированной или покрытой форме.

5. Применение добавки по любому из пп.1-4 для гидролитического расщепления зеараленона и/или по меньшей мере одного производного зеараленона в кормах, предпочтительно для свиней, птицы или аквакультуры или в пищевых продуктах или в высушенной барде.

6. Способ гидролитического расщепления зеараленона и/или по меньшей мере одного производного зеараленона, отличающийся тем, что зеараленон и/или по меньшей мере одно производное зеараленона гидролизуется по меньшей мере одним полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 2-15 или их функционального варианта, где идентичность последовательности между функциональным вариантом и аминокислотной последовательностью составляет по меньшей мере

70%.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что по меньшей мере один полипептид применяют в добавке по любому из пп.1-4.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что по меньшей мере один полипептид или добавку смешивают с пищевым продуктом или кормом для животного, загрязненным зеараленоном и/или по меньшей мере одним производным зеараленона; загрязненный пищевой продукт или корм для животного приводят в контакт с влагой, а полипептид или добавка гидролизует зеараленон и/или по меньшей мере одно производное соединение зеараленона, содержащееся в загрязненном пищевом продукте или корме для животного.

9. Способ по любому из пп.6-8, отличающийся тем, что по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, в частности, по меньшей мере 90% зеараленона и/или по меньшей мере одного производного зеараленона гидролизуются.

10. Полипептид, гидролитически расщепляющий зеараленон и/или по меньшей мере одно производное соединение зеараленона, отличающийся тем, что полипептид представляет собой гидролазу с аминокислотной последовательностью выбранную из группы SEQ ID NO: 2-15 или ее функциональный вариант, причем идентичность последовательности между функциональным вариантом и по меньшей мере одной аминокислотной последовательностью составляет по меньшей мере 70%.

11. Полипептид по п.10, отличающийся тем, что полипептид содержит по меньшей мере один консервативный участок аминокислотной последовательности или его функциональный вариант, причем функциональный вариант участка аминокислотной последовательности имеет идентичность последовательности по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 84%, более предпочтительно по меньшей мере 92% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% и по меньшей мере один консервативный участок аминокислотной последовательности выбран из группы аминокислотных последовательностей от +24 до +50, от +52 до +77, от +79 до +87, от +89 до +145, от +150 до +171, от +177 до +193, от +223 до +228, от +230 до +237, от +239 до +247, от +249 до +255, от +257 до +261, от +263 до +270, от +272 до +279, от +297

до +301, от +303 до +313, от +24 до 328, от +1 до +328 последовательности с SEQ ID NO: 1.

12. Полипептид по п.10 или 11, отличающийся тем, что функциональный вариант имеет по меньшей мере одну модификацию аминокислот, выбранную из группы замен, делеций и инсерций соответственно одной или нескольких аминокислот.

13. Полипептид по любому из пп.10, 11 или 12, отличающийся тем, что полипептид имеет удельную активность, равную по меньшей мере 0,01 ед/мг, преимущественно по меньшей мере 0,1 ед/мг и предпочтительно по меньшей мере 1 ед/мг, и/или имеет константу K_m гидролитического расщепления зеараленона, равную не более 50 мкМ, преимущественно не более 3,5 мкМ и предпочтительно не более 0,5 мкМ, и/или имеет константу k_{cat} гидролитического расщепления зеараленона, равную по меньшей мере 0,05 с⁻¹, преимущественно по меньшей мере 0,6 с⁻¹ и предпочтительно по меньшей мере 5 с⁻¹, и/или имеет константу v_{max} гидролитического расщепления зеараленона, равную по меньшей мере 0,00001 мкМ⁻¹·с⁻¹, преимущественно по меньшей мере 0,0001 мкМ⁻¹·с⁻¹ и предпочтительно по меньшей мере 0,001 мкМ⁻¹·с⁻¹.

14. Полипептид по любому из пп.10-13, отличающийся тем, что полипептид может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 9, 11 и 15, или ее функциональный вариант, причем функциональный вариант имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности с по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, и стабильность рН полипептида при рН 5,0 составляет по меньшей мере 15%, предпочтительно 50% и, в частности, предпочтительно 90%. 15. Полипептид по любому из пп.10-13, отличающийся тем, что полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 9, 11 и 15, или ее функциональный вариант, причем функциональный вариант имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности по сравнению по меньшей мере с одной из аминокислотных последовательностей, и полипептид обладает наиболее высокой ферментативной активностью в температурном интервале от 30 до 75°С, предпочтительно от 38 до

55°C и особенно предпочтительно от 38 до 52°C.

16. Полипептид по любому из пп. 10-13, отличающийся тем, что полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей SEQ ID NO: 2, 5, 6, 9, 11 и 15, или ее функционального варианта, причем функциональный вариант имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности по сравнению по меньшей мере с одной из аминокислотных последовательностей, и полипептид является термически стабильным до температуры 90°C, предпочтительно 75°C и особенно предпочтительно 60°C.

17. Полипептид по любому из пп.10-16, отличающийся тем, что полипептид имеет по меньшей мере одну мутацию аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 1 по меньшей мере в одной из следующих позиций, выбранных из группы: 22, 23, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 35, 37, 42, 43, 46, 51, 53, 54, 57, 60, 69, 72, 73, 78, 80, 84, 88, 95, 97, 99, 114, 118, 119, 123, 132, 141, 146, 148, 149, 154, 163, 164, 165, 169, 170, 172, 176, 180, 182, 183, 190, 191, 194, 196, 197, 198, 201, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 212, 213, 214, 216, 217, 220, 221, 222, 229, 231, 233, 238, 240, 244, 245, 246, 248, 249, 251, 254, 256, 260, 262, 263, 266, 269, 271, 277, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 292, 296, 298, 302, 307, 308, 309, 311, 314, 317, 319, 321, 323, 325 и 326.

18. Полипептид по п.17, отличающийся тем, что он имеет по меньшей мере одну мутацию аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 1, выбранную из группы: D22A, S23Q, S23L, N25D, I26V, F27Y, F27H, S29P, R31A, F32Y, R35K, R35Q, V37A, V42I, V43T, F46Y, S51E, S51D, D53G, N54M, N54R, L57V, L60I, S69G, P72E, V73A, A78S, N80H, F84Y, I88L, T95S, T97A, R99K, I114M, I118V, K119R, V123I, L132V, A141S, I146V, I146L, A148G, A149V, A154P, P163T, A164T, Y165C, Y165H, V169I, L170R, A172G, A176M, A176V, Y180F, D182T, F183Y, I190V, G191S, K194T, K194E, F196Y, V197C, V197R, E198R, E198S, K201D, K201G, P204S, P204A, A205S, K206P, A207M, M208A, Q209R, L210A, L210S, P212, T213V, P214A, E216T, E216G, A217I, N220H, L221M, K222R, K222Q, G229A, A231V, F233W, F233Y, F233H, A238G, H240N, H240S, D244E, R245Q, M246L, S248T,

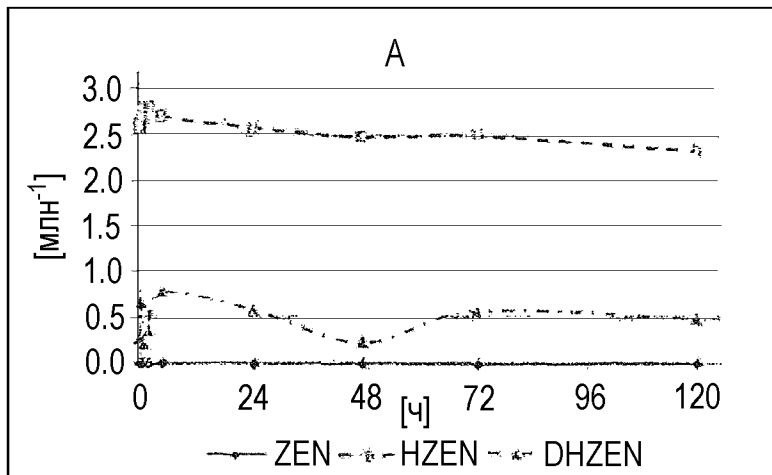
S248N, S248G, Q249R, K251N, I254V, I256L, A260M, T262D, T262G, I263T, E266D, E269H, E269N, L271V, L277E, E280A, E280L, H281R, H281Q, A282V, Q283R, D284L, D284R, I285L, I286M, R287E, R287D, R292K, R292T, Q296A, Q296E, H298V, L302S, L307Q, F308S, D309A, A311P, A314V, L317F, S319Q, S319P, S319R, S321A, S321T, T323A, P325A, A326P.

19. Полипептид по любому из пп.10-17, отличающийся тем, что он содержит по меньшей мере один из следующих аминокислотных мотивов, выбранных из группы последовательностей SEQ ID NO: 32-69.

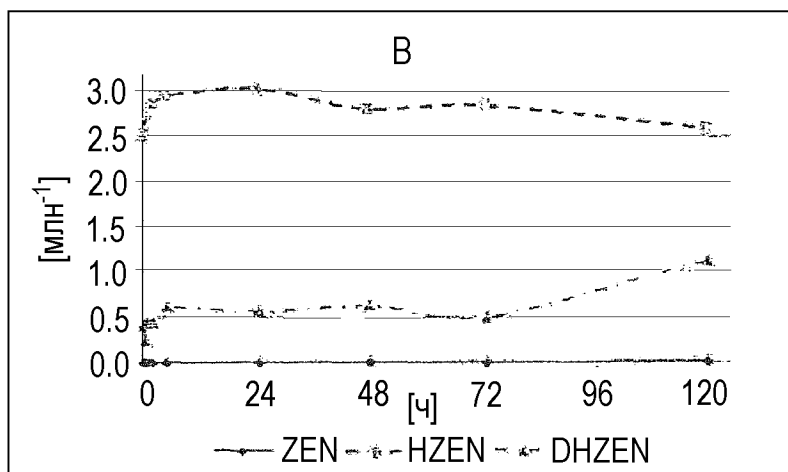
20. Полипептид по п.18, отличающийся тем, что полипептид содержит по меньшей мере одну консервативную замену аминокислоты по меньшей мере в одной позиции, а консервативная замена аминокислоты выбрана из замен G на A или A на G, S, или V на I, L, A, T, S, или I на V, L, M, или L на I, M, V, или M на L, I, V, или P на A, S, N, или F на Y, W, H, или Y на F, W, H, или W на Y, F, H, или R на K, E, D, или K на R, E, D, или H на Q, N, S, или D на N, E, K, R, Q, или E на Q, D, K, R, N, или S на T, A, или T на S, V, A, или C на S, T, A, или N на D, Q, H, S, или Q на E, N, H, K, R.

По доверенности

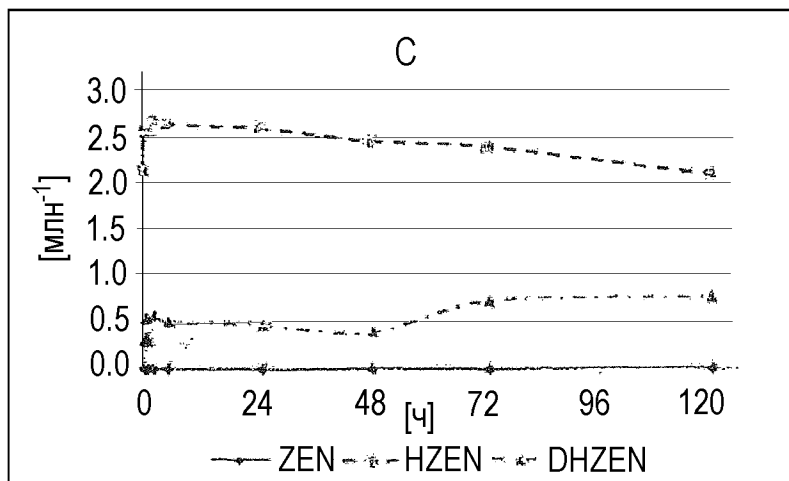
ФИГ.1



ФИГ.1А

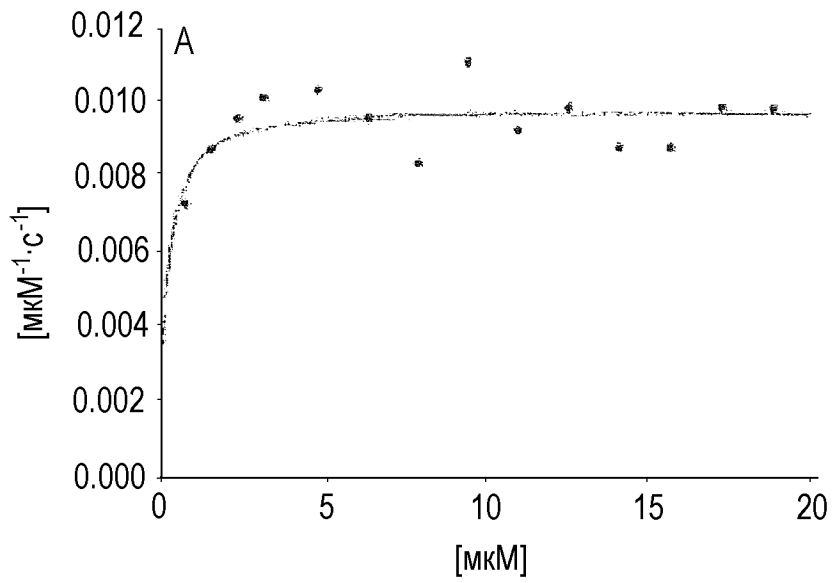


ФИГ.1В

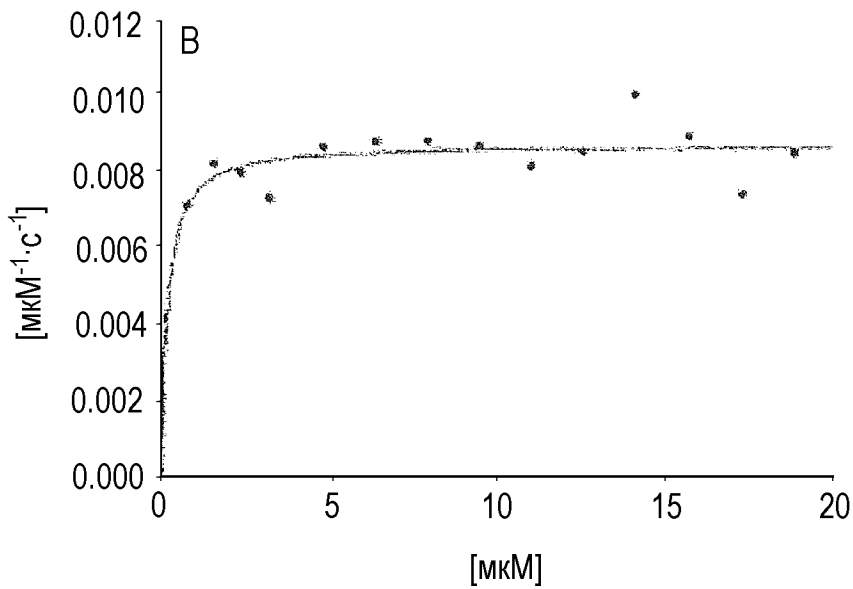


ФИГ.1С

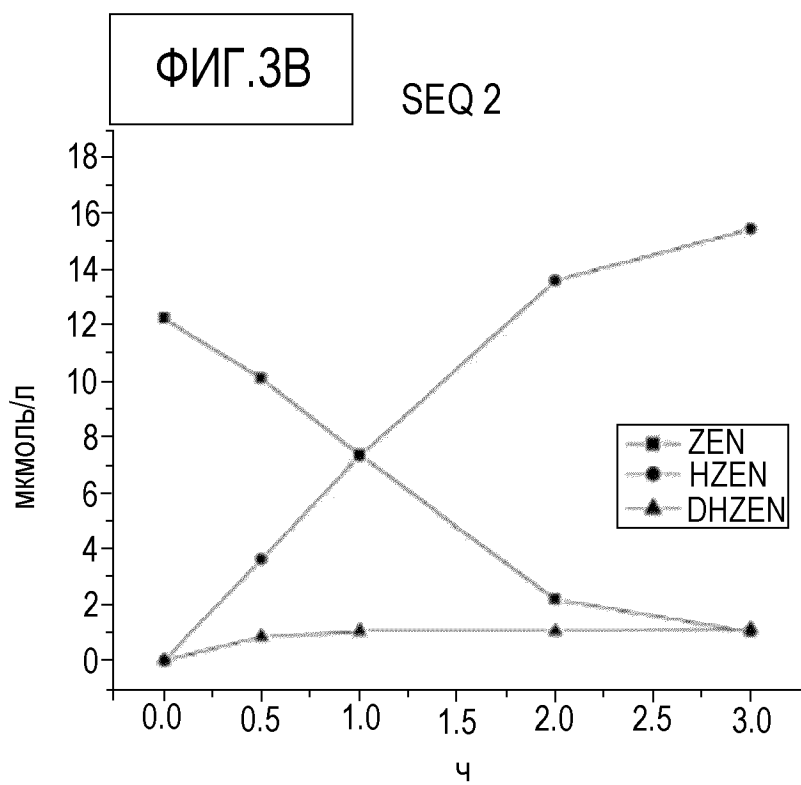
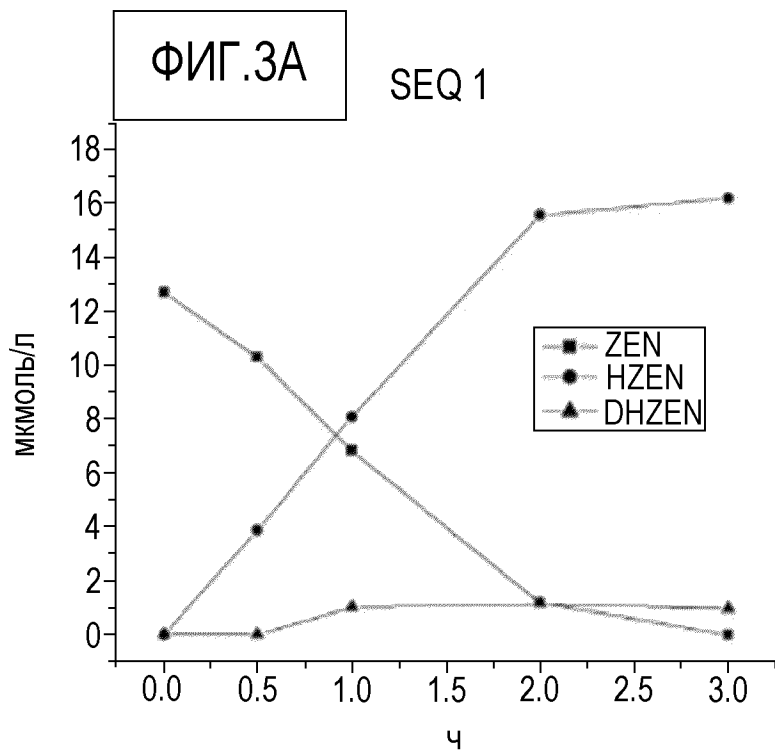
ФИГ.2

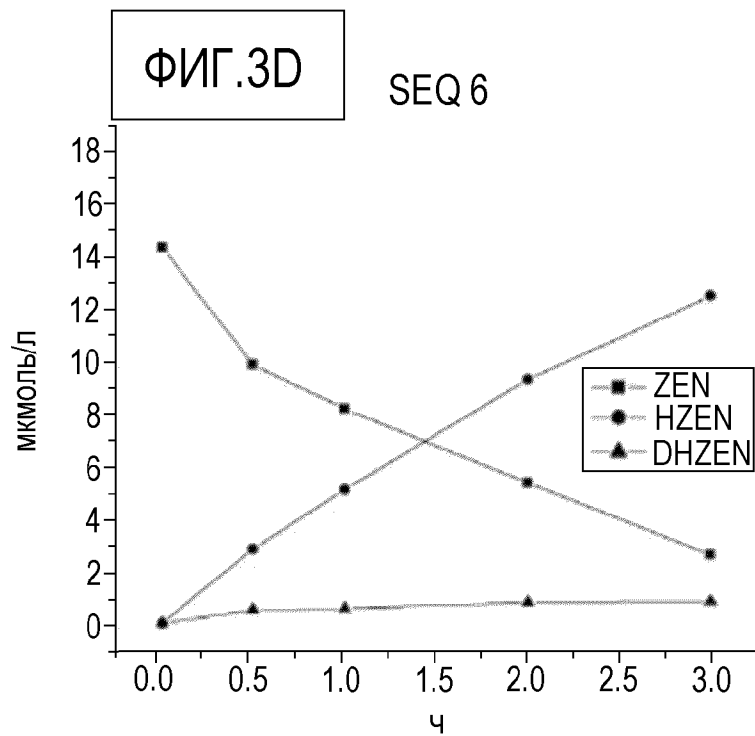
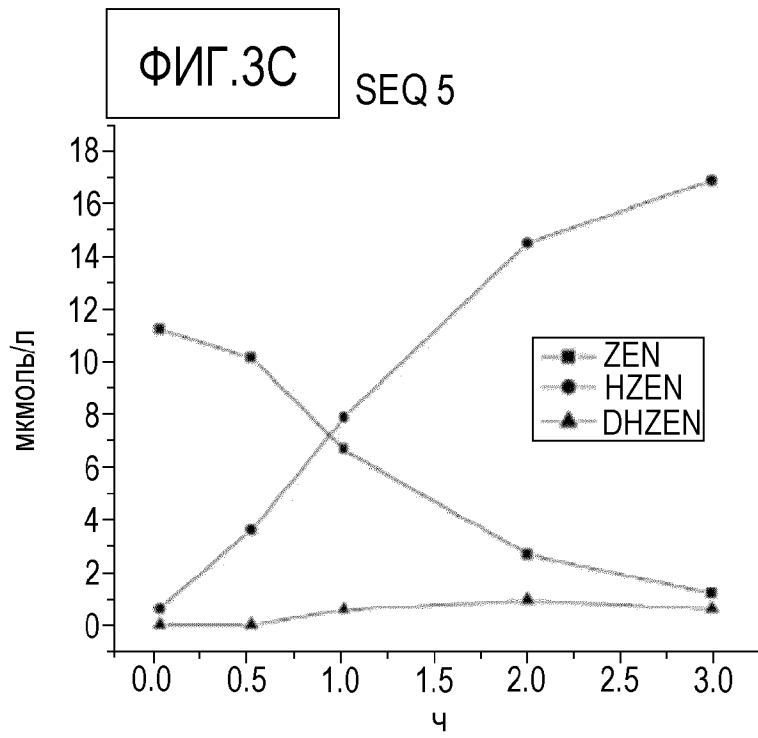


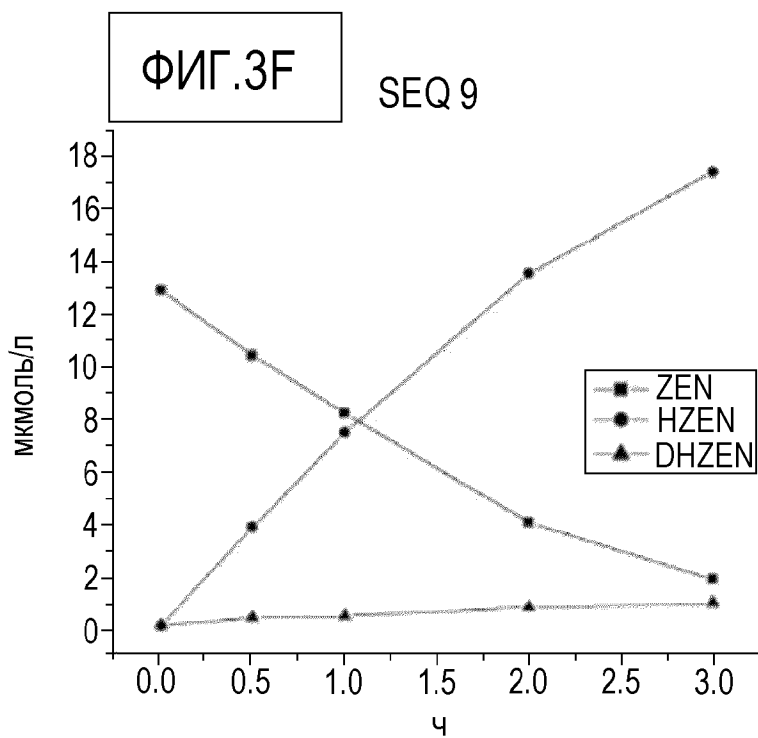
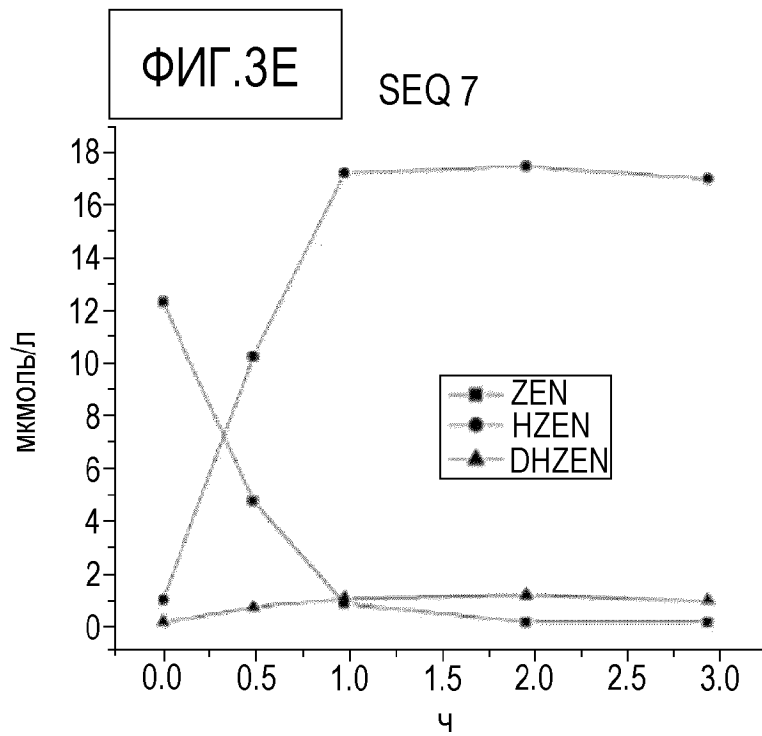
ФИГ.2А

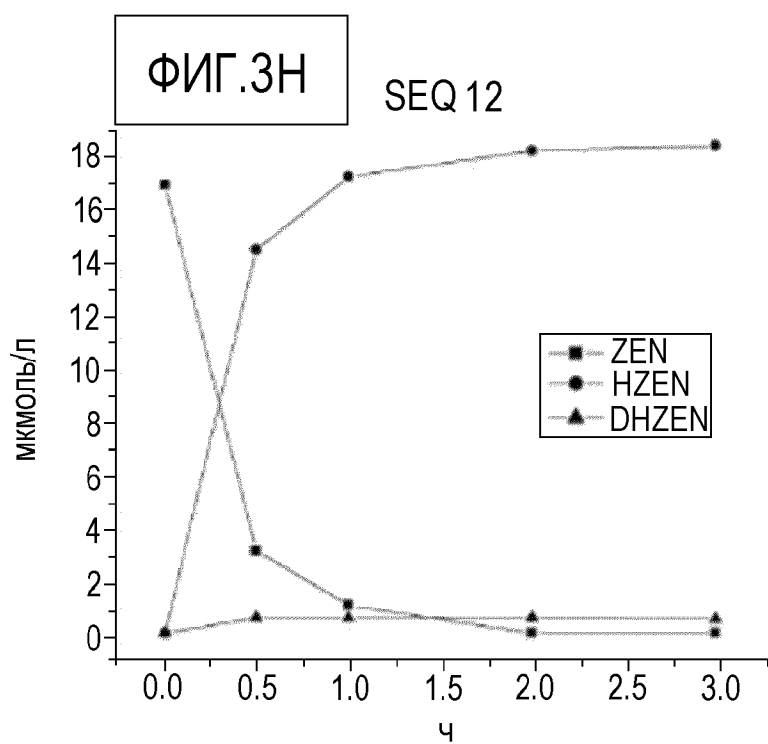
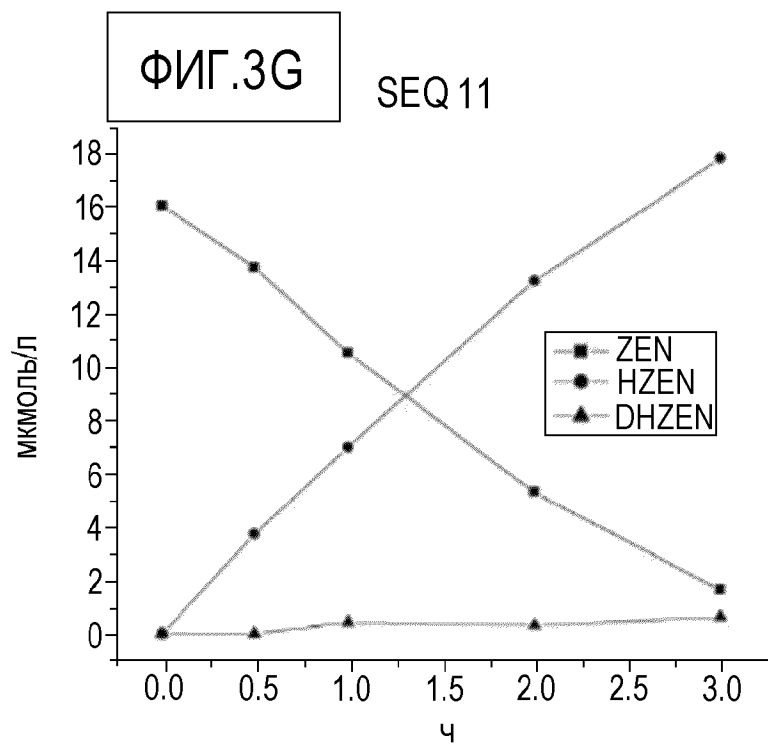


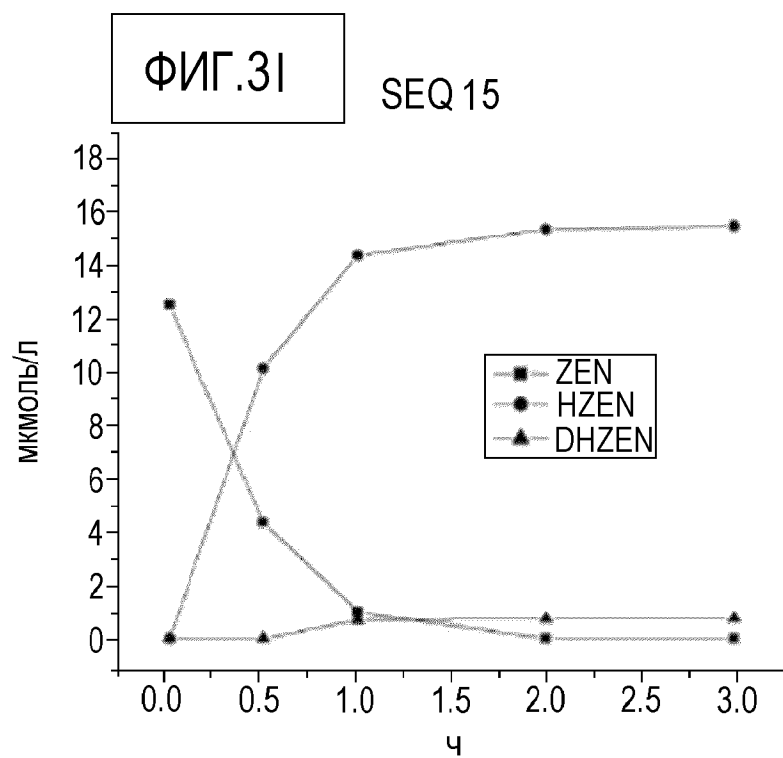
ФИГ.2В











A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N9/14 A23K1/165 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N A23K		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 2012/113827 A1 (EUCODIS BIOSCIENCE GMBH [AT]; BERLINGER MARC [AT]; KALISZ HENRYK [AT];) 30. August 2012 (2012-08-30) in der Anmeldung erwähnt Sequenzen 3, 4	1-22
X,P	----- DATABASE UniProt [Online] 16. April 2014 (2014-04-16), "SubName: Full=Hydrolase {ECO:0000313 EMBL:AHH94730.1}";", XP002732829, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:W5W1S2 Database accession no. W5W1S2 Sequenz ----- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
30. Januar 2015		17/02/2015
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Schmitz, Till

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>16. November 2011 (2011-11-16), "SubName: Full=Alpha/beta hydrolase fold containing protein {ECO:0000313 EMBL:AEM80235.1}";", XP002732830, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:G2P9U4 Database accession no. G2P9U4 Sequenz</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>21. März 2012 (2012-03-21), "SubName: Full=Hydrolase {ECO:0000313 EMBL:EHN79176.1}";", XP002734870, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:H1Q8U7 Database accession no. H1Q8U7 Sequenz</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>1. Mai 2013 (2013-05-01), "SubName: Full=Alpha/beta hydrolase {ECO:0000313 EMBL:EME22619.1}";", XP002734871, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:M2XGD3 Database accession no. M2XGD3 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>22. September 2009 (2009-09-22), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313 EMBL:ACU38472.1}; Flags: Precursor";", XP002734872, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:C6WMV9 Database accession no. C6WMV9 Sequenz</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
A	<p>WO 03/053161 A1 (ERBER AG [AT]; SCHATZMAYR GERD [AT]; HEIDLER DIAN [AT]; FUCHS ELISABET) 3. Juli 2003 (2003-07-03) das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-22

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>I. Rodrigues ET AL: "Microorganisms and their enzymes for detoxifying mycotoxins posing a risk to livestock animals" In: "Cellulose Solvents: For Analysis, Shaping and Chemical Modification", 20. Dezember 2009 (2009-12-20), American Chemical Society, Washington, DC, XP055103712, ISSN: 0097-6156 ISBN: 978-0-84-120007-4 Bd. 1031, Seiten 107-117, DOI: 10.1021/bk-2009-1031.ch008, das ganze Dokument</p>	1-22
A	<p>TAKAHASHI-ANDO N ET AL: "A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning", BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS LTD, GB, Bd. 365, 1. Juli 2002 (2002-07-01), Seiten 1-6, XP002967677, ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/BJ20020450 das ganze Dokument</p>	1-22
A	<p>YUANSHAN YU ET AL: "Oxidation of zearalenone by extracellular enzymes from SM04 into smaller estrogenic products", WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, Bd. 27, Nr. 11, 26. April 2011 (2011-04-26), Seiten 2675-2681, XP019959940, ISSN: 1573-0972, DOI: 10.1007/S11274-011-0741-3 das ganze Dokument</p>	1-4,6-22

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die
1-22 (teilweise)

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-22(teilweise)

Zearalenon-spaltenden Hydrolase gemäß SEQ ID NOs 1, 2.
Außerdem sich darauf beziehende Polynukleotide,
Zusatzstoffe, Verwendungen und Verfahren.

2-14. Ansprüche: 1-22(teilweise)

Wie Erfindung 1, jedoch jeweils basierend auf SEQ ID NOs
3-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT2014/000164

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2012113827 A1	30-08-2012	EP 2677881 A1	01-01-2014
		WO 2012113827 A1	30-08-2012

WO 03053161 A1	03-07-2003	AT 394034 T	15-05-2008
		AT 413540 B	15-03-2006
		AU 2002363819 A1	09-07-2003
		BR 0207398 A	10-02-2004
		CA 2467392 A1	03-07-2003
		CY 1108107 T1	12-02-2014
		DK 1455595 T3	11-08-2008
		EP 1455595 A1	15-09-2004
		ES 2303563 T3	16-08-2008
		HU 0402278 A2	29-03-2005
		IL 161847 A	30-11-2010
		MA 26256 A1	01-08-2004
		MX PA04005985 A	31-03-2005
		NO 20033664 A	13-10-2003
		PL 207048 B1	29-10-2010
		PT 1455595 E	01-08-2008
		SI 1455595 T1	31-08-2008
		TW 200302053 A	01-08-2003
		US 2004208956 A1	21-10-2004
		US 2009098244 A1	16-04-2009
		WO 03053161 A1	03-07-2003
		ZA 200403653 A	25-04-2007
