

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036664**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.07

(51) Int. Cl. **C12N 9/02 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201791911

(22) Дата подачи заявки
2015.03.27

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ТРИХОТЕЦЕН-ПРЕВРАЩАЮЩЕЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ, СПОСОБ ПРЕВРАЩЕНИЯ ТРИХОТЕЦЕНОВ И ТРИХОТЕЦЕН-ПРЕВРАЩАЮЩАЯ ДОБАВКА

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/AT2015/000048**

(87) **WO 2016/154640 2016.10.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭРБЕР АКЦИЕНГЕЗЕЛЛЬШАФТ
(AT)**

(72) Изобретатель:
**Биндер Ева-Мария, Вебер Барбара,
Бернард Клаудиа (AT)**

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

(56) DATABASE WPI, Week 200377, Thomson Scientific, London, GB; AN 2003-818681, XP002744030, & JP 2003 159079 A (FUJISAWA PHARM CO LTD), 3 June 2003 (2003-06-03), abstract

MUKHERJEE PRANAB K. ET AL.: "Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 7, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 3804-3816, XP002543233, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.00161-06, abstract and page 3805

US-A1-2006105061
WO-A1-2009133461
WO-A1-2014180939

(57) Применение алкогольдегидрогеназы с последовательностью, имеющей ID № 1, содержащей ионы металла и хиноновый кофактор, или в дополнение функционального варианта, проявляющего идентичность последовательности, равную по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 86%, особенно предпочтительно по меньшей мере 89% и по меньшей мере одного окислительно-восстановительного кофактора для превращения по меньшей мере одного трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3, а также способ ферментативного превращения трихотеценов и трихотецен-превращающая добавка.

B1

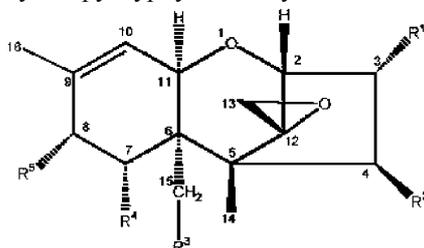
036664

**036664
B1**

Изобретение относится к применению трихотецен-превращающей алкогольдегидрогеназы, способу превращения трихотеценов и трихотецен-превращающей добавке. Трихотецены представляют часто встречающуюся группу микотоксинов, которая включает дезоксиниваленол (DON, CAS № 51481-10-8), токсин Т-2 (CAS № 21259-20-1), токсин НТ-2 (CAS № 26934-87-2), ниваленол (CAS № 23282-20-4), фузерианон-Х (CAS № 23255-69-8), скрипентриол, 15-ацетоксискирпенол (CAS № 2623-22-5), 4,15-диацетоксискирпенол (CAS № 2270-40-8), триходермол (CAS № 2198-93-8), веррукарин А (CAS № 3148-09-2), веррукарин J (CAS № 4643-58-7), изотриходермин (CAS № 91423-90-4), гидроксизотриходермин (CAS № 344781-02-8), калонектрин (CAS № 38818-51-8), Т-2 тетраол (CAS № 34114-99-3), деацетилнеосоляниол (CAS № 74833-39-9), неосоляниол (CAS № 36519-25-2), ацетилнеосоляниол (CAS № 65041-92-1), споротрихиол (CAS № 101401-89-2), трихотриол (CAS № 109890-37-1), самбуцинол (CAS № 90044-33-0) и кулморин (CAS № 18374-83-9), среди других. Трихотецены, в особенности DON, также известный как vomitоксин, могут продуцироваться рядом грибов *Fusarium*, особенно, *F.graminearum* и *F.culmorum*. Эти грибки поражают сельскохозяйственные культуры, такие как кукуруза, различные типы зерновых культур, такие как пшеница, овес или ячмень, в то время как обычно грибковое поражение происходит перед сбором урожая, а рост грибов или образование микотоксинов могут также происходить до или, в случае неправильного хранения, после сбора урожая.

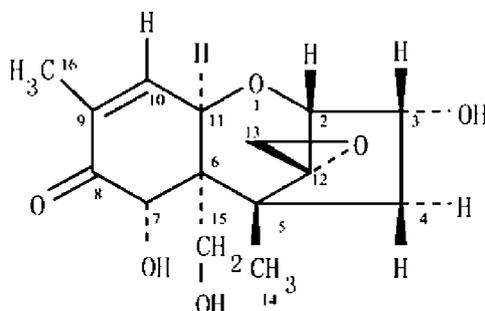
По оценке Всемирной Продовольственной Организации (FAO) в мировом масштабе 25% сельскохозяйственных продуктов загрязнены микотоксинами, что приводит к значительным экономическим потерям. В более современном исследовании, выполненном в мировом масштабе I. Rodrigues и K. Naehrer, Toxins, 2012, 4, 663-675, в течение периода времени от января 2009 г. до декабря 2011 г., было проанализировано всего 23781 образцов, из которых 81% показал положительный результат тестирования по меньшей мере на один микотоксин, а 59% показали положительный результат тестирования на трихотецены, в особенности DON. Трихотецены, в особенности DON, могут быть обнаружены с частотой до 100% во всех районах мира, а также во всех тестируемых классах зерна и кормов, таких как кукуруза, соевая мука, пшеница, пшеничные отруби, DDGS (сушеная барда с экстрактами), и в полученных кормовых смесях. Помимо основных, не прошедших обработку продуктах питания, доказательство присутствия трихотеценов было также обнаружено в полуфабрикатах, таких как мука, зерновые завтраки, штампованные макаронные изделия, хлеб, мучные кондитерские изделия и пицца на пшеничной основе для детей и младенцев.

Трихотецены имеют следующую структурную основу:



в которой различные замещающие остатки R^1 - R^5 отличаются в зависимости от типа трихотецена. Является известным фактом, что в дополнение к эпоксигруппе, немодифицированная α -гидроксигруппа на атоме С-3 у трихотеценов в совокупности отвечает за их токсическое воздействие. Типы трихотеценов с гидроксигруппой на атоме С-3 включают дезоксиниваленол, токсин Т-2, токсин НТ-2, ниваленол, фузерианон-Х, 15-ацетоксискирпенол, 4,15-диацетоксискирпенол, триходермол, Т-2 тетраол, деацетилнеосоляниол, ацетилнеосоляниол, споротрихиол, трихотриол, самбуцинол и кулморин.

Дезоксиниваленол (DON) имеет характерную карбонильную группу на атоме С-8 и обладает следующей структурной формулой:



и имеет согласно номенклатуре IUPAC наименование (3 α ,7 α)-3,7,15-тригидрокси-12,13-эпокси-трихотец-9-ен-8-он. В природе, несколько токсичных подтипов DON также встречаются с гидроксигруппой на атоме С-3. Примерами таких подтипов являются ацетилированный DON (например, 15 ацил-DON), гликозилированный DON, DON-сульфонат (например, DONS-1, DONS-2) или DON-сульфат

(DON-15-сульфат). Эти подтипы DON также принадлежат к типам трихотеценов с гидроксигруппой или замещенной гидроксигруппой на атоме С-3.

Вследствие токсического воздействия DON пределы или максимальные уровни были определены уполномоченными инстанциями для пищевых продуктов и кормов. Таким образом, Европейский Союз установил допустимое содержание DON в пищевых продуктах (ЕС № 1881/2006, ЕС № 1126/2007) и рекомендовал максимальные уровни для кормов (2006/576/ЕС). В США, FDA опубликовала максимальные уровни.

Заболевания, которые вызываются приемом внутрь микотоксинов у людей или животных, именуют микотоксикозами. В случае трихотеценов или типов трихотеценов эти заболевания также именуют "трихотеценовыми микотоксикозами", более конкретно как "микотоксикозы, вызванные трихотеценами, имеющими гидроксильную группу на атоме С-3" или даже более конкретно как "DON-микотоксикозы". Является известным фактом, что токсические воздействия трихотеценов на животных и людей основаны на нескольких факторах. Эти факторы включают ингибирование биосинтеза белка, возможное взаимодействие с серотониновыми и дофаминовыми рецепторами и повышающую регуляцию провоспалительных цитокинов (EFSA Journal 2004, 73, 1-41). Кроме того, DON-микотоксикозы вызывают изменения биомаркеров, как диагностируют по увеличению концентрации IgA в крови, увеличению концентрации SOCS3 в печени или снижению уровней IGFALS в плазме (Pestka et al. 2004, Toxicol. Lett. 153, 61-73), а также снижению концентрации клаудина в кишечнике (Pinton et al. 2009, Tox. Appl. Pharmacol. 237, 41-48).

Например, трихотеценовые микотоксикозы проявляются у свиней сниженным потреблением корма, уменьшением роста, наступлением рвоты и диареи, а также иммунологической дисфункцией и нарушенным всасыванием питательных веществ в кишечнике. В случае домашней птицы трихотеценовые микотоксикозы вызывают, среди прочего, ухудшение потребления корма, снижение прироста массы, случаи диареи и уменьшение массы яичной скорлупы. В случае жвачных животных были описаны сниженное потребление корма и меньшая удойность. У аквакультур трихотеценовые микотоксикозы вызывают снижение потребления корма и скорости роста у рыб (например, лосося, сома или форели) и креветок, в том числе (Binder et al., Guide to Mykotoxins; ISBN 978-0-9573721-0-8). Токсические эффекты также были описаны у собак и кошек (EFSA Journal, 2004, 73, 1-41). У людей, трихотеценовые микотоксикозы могут вызывать, среди прочего, тошноту, рвоту, диарею, боли в животе, головную боль или жар (Sobrova et al., Interdisc. Toxicol. 2010, 3 (3), 94-99).

Главной стратегией снижения загрязнения пищи или корма трихотеценами или DON является ограничение поражения грибками, например, посредством приведения в соответствие с "надлежащей сельскохозяйственной практикой". Это включает применение семян, которые не содержат паразитов и грибов или запарку остатков культур. Кроме того, рост грибков в полевых условиях может быть снижен правильным применением фунгицидов. После сбора урожая сельскохозяйственные культуры должны храниться при остаточной влажности ниже 15% и при низкой температуре для предотвращения роста грибков. Аналогично, сельскохозяйственные культуры, загрязненные грибковым заражением, должны удаляться перед любой дальнейшей переработкой. Несмотря на этот перечень мер I. Rodrigues и K. Naehger сообщили (в 2012 г.), что даже в областях с наивысшими сельскохозяйственными стандартами, такими как США и Центральная Европа, 79 или 72% всех образцов кукурузы, протестированных с 2009 до 2011, были загрязнены DON.

Другими вариантами действия для снижения загрязнения микотоксинами пищи или кормов являются их адсорбция или превращение. Для адсорбции необходимо, чтобы связывание микотоксина с адсорбентом было сильным и специфичным в широком интервале pH и чтобы оно оставалось устойчивым в желудочно-кишечной области во время всего процесса пищеварения. Несмотря на то что некоторые небиологические адсорбенты, такие как активированный уголь, силикаты или синтетические полимеры, такие как холестирамин, могут эффективно применяться для афлатоксинов, их применение для других микотоксинов, в особенности, для трихотеценов, не является эффективным. Биологические адсорбенты, такие как дрожжи или дрожжевые экстракты, также описаны в литературе, но имеют ограничение по аналогии с небиологическими адсорбентами. Существенным недостатком адсорбентов является их возможное неспецифичное связывание других молекул, которые могут быть незаменимыми для питания.

Превращение, в особенности детоксикация трихотеценов посредством физических и химических обработок также ограничено, поскольку DON является очень устойчивым и остается устойчивым даже при тепловых обработках вплоть до 350°C.

Возможное микробиальное превращение DON было описано в EP-B 1042449, согласно которому микроорганизм BBSH 797 (DSM 11798) применяют для детоксикации DON. В этом случае детоксикация основана на раскрытии эпоксидного кольца на атомах С-12 и С-13 DON. US 2012/0263827 А описывает биотрансформацию DON в 3-эпи-DON микроорганизмом с международным Канадским инвентарным номером 040408-1. Для многих технологических процессов переработки кормов или пищи, однако, получение смеси микроорганизмов или адсорбентов невозможно, или не является официально разрешенным, таким образом, превращение или детоксикация трихотеценов, таких как DON или подтипы DON, не является возможной.

Трихотецены, такие как подтипы DON и DON, быстро всасываются в желудочно-кишечный тракт

организмов человека или животных, по этой причине важной является быстрая и направленная детоксикация.

Алкогольдегидрогеназа с SEQ ID № 1 была впервые описана в JP-A 2003/159079 для получения 2-кетогулоновой кислоты. WO 2009/133464 описывает способ окисления сахаридов под действием фермента с SEQ ID № 1 в пищевых продуктах и кормах для окисления крахмала, в особенности, в хлебопекарной отрасли, чтобы замедлить процессы старения в хлебе. В этом случае, алкогольдегидрогеназу применяют для окисления гидроксильной группы углеводов.

Алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 2 и 3 были идентифицированы в процессе секвенирования генома микроорганизмов *Devosia* sp. и хранятся онлайн на сервере Национального центра биотехнологической информации (NCBI) под идентификационными номерами GI:737041022 и GI:630002266. Более точная характеристика алкогольдегидрогеназ с SEQ ID № 2 и 3 не была представлена в процессе этой работы.

Вследствие разнообразия токсических воздействий трихотеценов и частоты их распространенности, следовательно, существует потребность в веществах или группах веществ, таких как ферменты, которые могут применяться для специфичного, безопасного и допустимого превращения, в особенности, детоксикации трихотеценов.

Настоящее изобретение направлено на применение специфичной алкогольдегидрогеназы и ее вариантов, с которыми возможно осуществить превращение по меньшей мере одного трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3 для уменьшения токсичных продуктов.

Чтобы решить задачу, неожиданно было продемонстрировано, что применение алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1, содержащей ионы металла и хиноновый кофактор, или, в дополнение, функционального варианта, проявляющего идентичность последовательности, равную по меньшей мере 80%, предпочтительно 86%, особенно предпочтительно по меньшей мере 89% и по меньшей мере одного окислительно-восстановительного кофактора для превращения по меньшей мере одного трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3, делает возможным специфично и надежно превращать трихотецены, имеющие гидроксильную группу на атоме С-3, такие как DON, токсин Т-2 или ниваленол.

Понимают, что превращение происходит, когда изменяется структура токсинов, где токсины предпочтительно преобразуются в нетоксичные или менее токсичные метаболиты, т.е. превращаются. В данном случае происходит структурное изменение, в особенности на атоме С-3 трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, обусловленное каталитическим преобразованием С-3 гидроксильной группы в кето-группу. Неожиданно, применение алкогольдегидрогеназы согласно изобретению производит превращение трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, особенно, DON, в большинстве разнообразных химических и биологических окружающих средах, как, например, в буфере, мешаных средах, слюне или корме, содержащем желудочные соки, или в содержимом кишечника, содержащем корм. Это является необычным, поскольку в соответствующих окружающих средах для проявления ферментативной активности, важные параметры, такие как значение pH, концентрация протеаз, ионная сила или матрицы веществ очень сильно различаются. Как результат, активность фермента может быть гарантирована при добавлении воды к пищевым продуктам и кормам, для его перорального поглощения, а также в ротовой полости и желудочно-кишечном тракте. Неожиданно, что для некоторых окружающих сред, добавления внешних окислительно-восстановительных факторов можно избежать; это применимо, в частности, к кормовым смесям, слюне и желудочным сокам.

Алкогольдегидрогеназа с SEQ ID № 1 представляет собой зависимую от хинонового кофактора алкогольдегидрогеназу. Для продуцирования активного полного фермента или активной алкогольдегидрогеназы, хиноновый кофактор, предпочтительно пирролохинолинхинон (PCC) в присутствии иона металла, предпочтительно Ca^{2+} , может быть связан с ферментом. Следовательно, активированная алкогольдегидрогеназа содержит как хиноновый кофактор, так и ион металла, где молярное отношение фермента к хиноновому кофактору равно 1:1. Кроме того, окислительно-восстановительный кофактор требуется для каталитической активности алкогольдегидрогеназы, где он либо используется в форме синтетически продуцируемого окислительно-восстановительного фактора в дополнение к активированной алкогольдегидрогеназе, или может применяться окислительно-восстановительный фактор, также присутствующий в пище или корме и в секретах животных или людей. Например, эти природные окислительно-восстановительные кофакторы могут образовываться, и, при необходимости, экстрагироваться из пищи или корма в процессе обеспечения, переработки или расщепления пищи или корма в полости рта и желудочно-кишечном тракте людей или животных. Примерами человеческих или животных секретов, которые содержат такой природный окислительно-восстановительный кофактор, являются пищеварительные секреты, такие как слюна, желудочный сок, кишечный сок, панкреатический сок, желчь или сок рубца.

Выражения "полипептидный вариант" или "вариант" относятся к функциональным полипептидам, которые, в сравнении с SEQ ID № 1, по меньшей мере имеют аминокислотную замену, где ферментативная функция сохраняется. Превращение, особенно, окисление гидроксильной группы на атоме С-3 трихотеценов до кето-группы, понимают как ферментативную функцию. Кроме того, "полипептидный вариант" может также иметь аминокислотные вставки или делеции, особенно, удлиненную или укороченную по С или N-концу последовательности относительно полипептидной последовательности с SEQ ID № 1. Ферментативная функция тогда "сохраняется по существу", если механизм ферментативной реакции ос-

тается неизменным, т.е. трихотецен окисляется в том же самом месте, и ферментативная активность варианта составляет по меньшей мере 10%, предпочтительно, по меньшей мере 50%, более предпочтительно, по меньшей мере 90%, особенно > 100% от активного исходного, родительского полипептида с SEQ ID № 1.

Термин "идентичность последовательности" относится к проценту идентичности последовательности. Для аминокислотных последовательностей и нуклеотидных последовательностей идентичность последовательности может быть определена визуально, но предпочтительно рассчитана с использованием компьютерной программы. Аминокислотная последовательность с SEQ ID № 1 задается как эталонная последовательность. Сравнение последовательностей также проводят внутри сегментов последовательности и в этом случае под сегментом понимают непрерывную последовательность эталонной последовательности. Длина сегментов последовательности для пептидных последовательностей обычно составляет от 3 до 200, предпочтительно от 15 до 65, наиболее предпочтительно от 30 до 50 аминокислот. Существует много биоинформационных программ, доступных для продажи или в свободном доступе, которые могут применяться, чтобы определить гомологию и которые непрерывно дополнительно реализуются. Их примерами являются: GCG Wisconsin BestFit package (Devereux et al. 1984), BLAST (Altschul et al. 1990) или BLAST 2 (Tatusova и Madden 1999). Вследствие различных опций настройки для этих алгоритмов возможно, что они приводят к различным результатам для одинаковых исходных последовательностей. Следовательно, должны быть заданы алгоритм поиска и ассоциированная установка. В данном случае программу NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), в особенности вместе с BLASTP для полипептидов, которая является доступной из домашней страницы "Национального центра биотехнологической информации" (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) применяли для расчета идентичности последовательности. Таким образом, возможно сравнить две или более последовательностей друг с другом согласно алгоритму Altschul et al., 1997 (Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). В данном случае применяли программные версии от 12 августа 2014 г. Основные установки применяли в качестве настроек программы, особенно, для сравнения аминокислот: "макс целевая последовательность"=100; "ожидаемый порог"=10; "размер слова"=3; "матрикс"=BLOSUM62; "штрафы за пробель"="существование: 11; удлинение: 1"; "вычислительное корректирование"="корректирование условного композиционного балльного матрикса".

Посредством применения алкогольдегидрогеназы, содержащей ионы металла и хиноновый кофактор согласно изобретению или ее функционального варианта, возможно превращать по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 50%, особенно по меньшей мере 90% по меньшей мере одного трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3, в особенности, DON, где является достаточным привести алкогольдегидрогеназу, содержащую ионы металла и хиноновый кофактор, или ее функциональный вариант в контакт по меньшей мере с одним трихотеценом, имеющим гидроксильную группу на атоме С-3, в течение по меньшей мере 1 мин, предпочтительно по меньшей мере 5 мин, особенно по меньшей мере 60 мин.

Согласно дополнительному варианту осуществления изобретения применяют аминокислотную последовательность функционального варианта, выбранного из группы последовательностей с номерами SEQ ID 2-4. С использованием этих функциональных вариантов, которые имеют идентичность последовательности, равную по меньшей мере 86% для алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1, возможно проводить превращение трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, в особенности, DON, со стабильно хорошими результатами.

Согласно дополнительному варианту осуществления изобретения применяли хиноновый кофактор, выбранный из группы PCC, TTC, TPC, LTC и CTC, предпочтительно PCC. Используя один из хиноновых кофакторов, пирролохинолинхинон (PCC, CAS № 72909-34-3), триптофантриптофилхинон (TTQ, CAS № 134645-25-3), топахинон (TPC, CAS № 64192-68-3), лизинтирозилхинон (LTQ, CAS № 178989-72-5) или цистеинтриптофилхинон (CTC, CAS № 400616-72-0) в алкогольдегидрогеназах, возможно осуществить превращение трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, подобно DON, в производные, которые являются либо нетоксичными или безвредными с токсикологической точки зрения.

В особенности, быстрого и полного связывания хинонового кофактора с алкогольдегидрогеназой достигают посредством связывания по меньшей мере с одним ионом металла, выбранным из группы Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} и Co^{3+} , предпочтительно Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Также посредством связывания по меньшей мере одного окислительно-восстановительного кофактора, выбранного из группы феназинметосульфата (PMS), производных PMS, гексацианоферрата калия (III), гексацианоферрата натрия (III), цитохрома С, кофермента Q1, кофермента Q10, метиленового синего и N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамина (TMPD), предпочтительно феназинметосульфата (PMS, CAS №: 299-11-6), кофермента Q1 и кофермента Q10, полное и быстрое превращение трихотеценов возможно исключительно в присутствии влаги, таким образом, чтобы гарантировать то, что трихотецены, содержащиеся в компонентах уже превратились в нетоксичные производные в процессе производства корма, в любом случае, до употребления животными, например. Примерами производных PMS являются: 1-гидроксифеназин, 2-(пентапренилокси)дигидрофеназин, 5,10-дигидро-9-диметилаллилфеназин-1-карбоновая кислота, 5,10-дигидрофеназин-1-карбоновая кислота, 5-метилфеназин метилсульфат, 6-

ацетофеназин-1-карбоновая кислота, бентофенин, клофазимин, дигидрометанофеназин, эсмеральдиновая кислота, эсмеральдин В, изумифеназин А-С, катион Янус Грин В, метанофеназинпелагиомицин А, феназин, феназин-1,6-дикарбоновая кислота, феназин-1-карбоксамид, феназин-1-карбоновая кислота, феносафранин, пиоцианин, сафенамицин или метиловый эфир сафеновой кислоты. Вследствие превращения трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, в пищевых продуктах и кормах, в особенности кормах для свиней, домашней птицы, крупного рогатого скота, лошадей, рыбы, аквакультур и домашних животных, и в необработанных материалах из растительного сырья, применяемых для производства или переработки пищевых продуктов и кормов, возможно предотвратить вредное воздействие на здоровье животных и людей посредством применения согласно изобретению.

Кроме того, настоящее изобретение направлено на предоставление способа, с помощью которого возможно осуществить превращение трихотеценов, в особенности, трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, безопасно и надежно, в менее токсичные продукты, независимо от того, были ли переработаны или нет сельскохозяйственные продукты, в которых они присутствуют.

Чтобы решить эту задачу, способ согласно изобретению для ферментативного превращения трихотеценов характеризуется, по существу, тем, что по меньшей мере один трихотецен, имеющий гидроксильную группу на атоме С-3, приводят в контакт с алкогольдегидрогеназой с SEQ ID № 1, содержащей ионы металла и хиноновый кофактор, или с функциональным вариантом, дополнительно проявляющим идентичность последовательности, равную по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 86%, особенно предпочтительно по меньшей мере 89%, по меньшей мере с одним окислительно-восстановительным кофактором и водой и, при необходимости, по меньшей мере одним вспомогательным веществом. Посредством приведения трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3, в контакт с алкогольдегидрогеназой с SEQ ID № 1, содержащей ионы металла и хиноновый кофактор, и, в дополнение, по меньшей мере одним окислительно-восстановительным кофактором и водой, возможно окислить гидроксильную группу, присутствующую на атоме С-3 трихотеценов, в кетон, и в данном случае сам трихотецен детоксифицируется и превращается в нетоксичное или низкотоксичное соединение.

Продолжая использовать функциональный вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы с SEQ ID номерами 2-4 вместо аминокислотной последовательности с SEQ ID № 1, могут быть достигнуты преимущества, идентичные тем, которых достигают посредством использования алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1, и превращение трихотеценов, содержащихся в пищевых продуктах и кормах, могут быть достигнуты особенно быстро и надежно, вне зависимости от их статуса переработки, т.е. независимо от того, переработаны уже сельскохозяйственные продукты или нет.

Особенно быстрого и полного превращения трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3, достигают с помощью способа согласно изобретению при температуре между 5 и 55°C, предпочтительно между 10 и 50°C, особенно предпочтительно между 28 и 45°C. Поскольку способ согласно изобретению может выполняться в таком широком температурном интервале, алкогольдегидрогеназа с SEQ ID № 1 или ее функциональные варианты, которые имеют последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% с SEQ ID № 1, могут применяться в самых разнообразных областях, таких как аквакультура, или также технологических процессах при повышенных температурах. Примеры таких технологических процессов, в которых превращение трихотеценов при повышенных температурах является важным, могли бы являться способами переработки кормов, производства макаронных изделий и других продуктов из кукурузы, таких как полента, попкорн, кукурузные хлопья, кукурузный хлеб или тортильи, а также процессами сжижения крахмала, процессами осахаривания или способами ферментации, такими как процессы растирания или процессы ферментации, в особенности, производство биоэтанола. В этом случае важно гарантировать, что пища или корм, производимые посредством этих процессов, не содержат каких-либо вредных количеств трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3.

Согласно дополнительному варианту осуществления способа согласно изобретению его проводят таким образом, что по меньшей мере один трихотецен, имеющий гидроксильную группу на атоме С-3, приводят в контакт с алкогольдегидрогеназой, содержащей ионы металла и хиноновый кофактор, или по меньшей мере ее функциональным вариантом, с окислительно-восстановительным фактором, с водой, и, при необходимости, со вспомогательным веществом, в течение по меньшей мере одной минуты, предпочтительно, в течение по меньшей мере 5 мин, особенно предпочтительно в течение по меньшей мере 60 мин. Поскольку значения времени контакта между 1 мин и более чем 60 мин являются достаточными, чтобы достичь адекватного превращения трихотеценов в нетоксичные или низкотоксичные производные, способ согласно изобретению может применяться, например, в способе переработки основных сельскохозяйственных материалов для пищи или корма. С другой стороны, он также может вводиться фермером непосредственно перед кормлением, например, при добавлении воды к корму и обеспечении оттаивания в течение времени между 1 мин и вплоть до приблизительно 1 ч при температуре между 5 и 55°C, что будет инициировать превращение трихотеценов в нетоксичные продукты.

Особенно быстрое и полное превращение является возможным, если хиноновый кофактор выбирают из группы РСС, ТТС, РТС, ЛТС и СТС, предпочтительно РСС, так как это соответствует дополнительному варианту осуществления способа согласно изобретению. Такой хиноновый кофактор быстро и надежно обеспечивает атаку алкогольдегидрогеназами гидроксильной группы на атоме С-3 трихотеценов

и превращение ее в кето-группу, которую содержит нетоксичное производное.

Дополнительное завершение реакции и, в частности, ускорение реакции являются возможными, если кофактор в способе согласно изобретению связан с алкогольдегидрогеназой посредством по меньшей мере одного иона металла, выбранного из группы Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} и Co^{3+} , предпочтительно Ca^{2+} и Mg^{2+} . Выполнение способа таким образом производит не только сильное связывание хинонового кофактора с алкогольдегидрогеназой, но также обеспечивает быстрое и надежное превращение трихотеценов.

Для дополнительного усовершенствования превращения трихотеценов, в особенности для завершения реакции превращения, способ согласно изобретению продолжают таким образом, что применяют окислительно-восстановительный фактор, выбранный из группы, состоящей из PMS, производных PMS, гексацианоферрата калия (III), гексацианоферрата натрия (III), цитохрома С, кофермента Q1, кофермента Q10, метиленового синего и TMPD, предпочтительно PMS, кофермента Q1 и кофермента Q10. Посредством добавления такого окислительно-восстановительного кофактора возможно осуществить превращение трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, в водной среде, например, таким образом, как в суспензии корма или корме, который вводят животным в аквакультуре, без окислительно-восстановительных факторов, которые могут быть получены из слюны, желудочного сока или кишечного сока, например, которые подлежат добавлению или присутствуют, или животному, уже принявшему суспензию корма или корм, и в этом случае повторное всасывание трихотеценов животными, принявшими корм, может быть предотвращено.

Окончательно, изобретение направлено на предоставление трихотецен-превращающей добавки, с помощью которой возможно безопасно и надежно осуществить превращение трихотеценов в корме или пище в нетоксичные производные.

Чтобы решить эту задачу, добавка согласно изобретению, по существу, отличается тем, что она содержит алкогольдегидрогеназу с SEQ ID № 1, содержащую ионы металла и хиноновый кофактор, или функциональный вариант, дополнительно проявляющий идентичность последовательности, равную по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 86%, особенно предпочтительно по меньшей мере 89% и при необходимости дополнительно по меньшей мере один дополнительный компонент, выбранный из группы, состоящей из синтетического окислительно-восстановительного кофактора и по меньшей мере одного вспомогательного вещества. Такие добавки могут быть смешаны с традиционными кормами в низких концентрациях, например приблизительно от 10 г до 1 кг на тонну корма, и в такой низкой концентрации обеспечивают превращение трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, в нетоксичные производные, таким образом, что совокупно здоровье и работоспособность животных, которым скармливают этот корм, например, будут улучшаться, и, таким образом, будет возможно не только снизить частоту неудач, но также улучшить эффективность использования кормов.

Стабильно хороших результатов можно достичь с использованием добавки согласно изобретению, которая вместо алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1 содержит ее функциональный вариант, выбранный из группы с номерами 2-4.

Для, по существу, полного превращения гидроксильной группы, присутствующей на атоме С-3 трихотеценов, посредством добавки согласно изобретению ее дополнительно осуществляют так, чтобы она содержала хиноновый кофактор, выбранный из группы PCC, TTC, TPC, LTC, и CTC, а также ион металла, выбранный из группы Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} и Co^{3+} . При использовании такого дополнительного варианта осуществления, с одной стороны, возможно безопасно и надежно связывать хиноновый кофактор с алкогольдегидрогеназой и, с другой стороны, с алкогольдегидрогеназой, которая содержит такие добавки, и может быть достигнуто полное превращение трихотеценов, таких как дезоксиниваленол, которые имеют гидроксильную группу на атоме С-3 молекулы.

Чтобы такая реакция выполнялась также без присутствия окислительно-восстановительных кофакторов, таких как кофакторы, содержащиеся естественным образом в слюне, желудочном соке или кишечном соке или т.п., добавку согласно изобретению дополнительно осуществляют таким образом, что в дополнение в качестве дополнительного окислительно-восстановительного кофактора синтетический окислительно-восстановительный кофактор дополнительно выбирают из группы, состоящей из PMS, производных PMS, гексацианоферрата калия (III), гексацианоферрата натрия (III), цитохрома С, кофермента Q1, кофермента Q10, метиленового синего и TMPD, предпочтительно PMS, кофермента Q1 и кофермента Q10.

Согласно дополнительному варианту осуществления изобретения добавку разрабатывают таким образом, что вспомогательное вещество выбирают из группы инертных носителей, витаминов, минеральных веществ, фитогенетических веществ, ферментов и дополнительных компонентов для детоксикации микотоксинов, таких как микотоксин-разрушающие ферменты, в особенности афлатоксин-оксидазы, эрготамина-гидролазы, эрготамин-амидазы, зеараленон-эстеразы, зеараленон-лактоназы, зеараленон-гидролазы, окспатоксин-амидазы, фузонизин-аминотрансферазы, фузонизин-карбоксилтрансферазы, аминокполиоламинооксидазы, дезоксиниваленон-эпоксидгидролазы, дезоксиниваленон-дегидрогеназы, дезоксиниваленон-оксидазы, трихотецен-дегидрогеназы, трихотецен-оксидазы, и микотоксин-

превращающие микроорганизмы, такие как DSM 11798; и микотоксин-связывающих веществ, таких как микробные клеточные стенки или неорганические материалы, такие как бентонит или смектит. Например, применение такой добавки может обеспечить то, что любые количества трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, которые могут содержаться в корме или пище, а также любые дополнительные микотоксины, такие как токсины *Fusarium*, эрготамины, окспатоксины, достоверно детоксифицируются до той степени, при которой вредное воздействие микотоксина на организм субъекта, потребляющего этот корм или эту пищу, отсутствует.

Дополнительными направлениями применения для изобретения являются добавки, которые в дополнение по меньшей мере к одной алкогольдегидрогеназе согласно изобретению дополнительно содержат по меньшей мере один фермент, который вовлечен в разрушение белков, например, такой как протеаза, или фермент, который вовлечен в метаболизм крахмала или волокон или жира или гликогена, такой как амилаза, целлюлаза или глюканаза, и, например, гидролазы, липолитические ферменты, маннозидазы, оксидазы, оксидоредуктазы, фитазы или ксиланазы.

Само собой разумеется, что добавка может несомненно присутствовать в инкапсулированной форме или форме с покрытием, и в этом случае могут применяться стандартные методы, такие как описанные в WO 92/12645. Посредством инкапсулирования или покрытия возможно перемещать добавку к местоположению, где она будет использоваться без модификации, в особенности без какого-либо разрушения или повреждения, таким образом, что полипептид начинает оказывать воздействие только после растворения оболочки, как в пищеварительном тракте животных, например, что позволяет достичь даже более целенаправленного, быстрого и более полного распада трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, даже в кислотном, обогащенном протеазами и анаэробном окружении. Кроме того, посредством инкапсулирования или покрытия, также возможно увеличить температурную устойчивость алкогольдегидрогеназы в добавке, и в этом случае, например, улучшается ее применение в процессе гранулирования корма.

Добавка согласно изобретению может применяться в широком диапазоне разнообразных областей применения, таких как получение соединения, для предотвращения и/или лечения трихотеценовых микотоксикозов, предпочтительно микотоксикозов, вызванных трихотеценами, которые имеют гидроксильную группу на атоме С-3, особенно таких, как микотоксикозы, вызванные дезоксиниваленолом. Такие микотоксикозы имеют серьезные последствия для людей и животных. При таком применении добавки в случае профилактики возможно поддерживать состояние здоровья людей и животных, по существу, на том же самом уровне, как без перорального поглощения токсинов или при сниженном пероральном поглощении токсинов, несмотря на пероральное поглощение трихотеценов, в особенности трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3, в особенности дезоксиниваленола. В случае лечения микотоксикозов возможно облегчить симптомы такого заболевания, и, в частности, нормализовать концентрацию SOCS3 в печени или уровни IGFALS в плазме, а также концентрацию клаудина в кишечнике.

Кроме того, посредством такого применения возможно улучшить продуктивность сельскохозяйственных животных, особенно потребление корма и увеличение массы, и снизить показатель смертности.

Изобретение поясняется ниже на основании вариантов осуществления и чертежа.

На чертеже

фиг. 1 показывает хронологическое превращение дезоксиниваленола для активированной алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1, а также результат проверочного теста (CTR) в качестве сравнения; и

фиг. 2 - представление хронологического превращения DON с использованием активированных алкогольдегидрогеназ с SEQ ID № 1-4, а также результат проверочного теста (CTR) в качестве сравнения.

Пример 1. Клонирование генов и очистка алкогольдегидрогеназы.

Кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности алкогольдегидрогеназы с SEQ ID номерами 1-4 для соответствующей клетки-хозяина были взяты от DNA2.0 и содержали сайты рестрикции на уровне нуклеиновой кислоты на 5'-конце и на 3'-конце последовательности, и на уровне аминокислоты, дополнительно С-или N-терминальную 6xHis метку. Эти нуклеотидные последовательности были интегрированы посредством стандартных методов в векторы экспрессии для экспрессии *Escherichia coli* или *Komagataella pastoris*, и трансформированы в *E.coli* или *K.pastoris*, и экспрессированы в *E.coli* или *K.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).

Алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1-4 селективно обогащали хроматографически из клеточных лизатов в случае экспрессии в *E.coli* и из межклеточной экспрессии в *K.pastoris* или из супернатанта культуры в случае внеклеточной экспрессии в *K.pastoris* посредством стандартных методов с использованием колонок с никель-сефарозой. Селективно обогащенные элюаты инкубировали и активировали в присутствии ионов металла и хиноновых кофакторов, причем в этом случае "активировали" означает, что алкогольдегидрогеназы имеют связанные как ион металла, так и хиноновый кофактор. Эти активированные алкогольдегидрогеназы применяли, чтобы определить ферментативные свойства алкогольдегидрогеназ с SEQ ID № 1-4 в примерах 3-7, приведенных ниже. Общую концентрацию белка определяли фотометрически с помощью реагента Брэдфорда (Sigma # B6916), и в этом случае значения поглощения

измеряли в фотометре для микропланшетов (считывающее устройство для планшетов, Biotek, Synergy HT) при длине волны, равной 595 нм. Концентрацию белка устанавливали по калибровочной кривой, которую строили, используя аналитический тест Брэдфорда посредством измерения растворов альбумина бычьей сыворотки (BSA, Sigma #A4919) с концентрациями вплоть до максимальной, равной 1500 мкг/мл.

Пример 2. Определение идентичности последовательностей.

Процент идентичности последовательностей на протяжении полной длины аминокислотной последовательности алкогольдегидрогеназ с SEQ ID № 1-4 относительно друг друга определяли, используя программу BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), в особенности BLASTP, которая является доступной для применения на домашней странице Национального центра биотехнологической информации (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), с помощью которой возможно сравнивать две или более последовательности друг с другом в соответствии с алгоритмом Altschul et al., 1997 (Nucleic Acids Res. (1997) 25:3389-3402). Основные установки применяли в качестве настроек программы, особенно для сравнения аминокислот: "максимальная целевая последовательность"=100; "ожидаемый порог"=10; "размер слова"=3; "матрикс"=BLOSUM62; "штрафы за пробелы"="существование: 11; удлинение: 1"; "вычислительное корректирование"="корректирование условного композиционного балльного матрикса". Процентные значения идентичности аминокислотных последовательностей друг с другом показаны в табл. 1.

Таблица 1

	SEQ ID № 1	SEQ ID № 2	SEQ ID № 3	SEQ ID № 4
SEQ ID № 1	100%	87%	89%	86%
SEQ ID № 2	87%	100%	99%	90%
SEQ ID № 3	89%	99%	100%	91%
SEQ ID № 4	86%	90%	91%	100%

Пример 3. Превращение трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3.

Чтобы определить их пригодность для превращения трихотеценов, которые имеют гидроксильную группу на атоме С-3, в особенности DON, ниваленола и токсин Т-2, получали алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1-4 с С-концевой 6xHis меткой в E.coli, как описано в примере 1.

Превращение имеет место тогда, когда количество трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3, уменьшается посредством приведения его в контакт с активированной алкогольдегидрогеназой, т.е. алкогольдегидрогеназой, которая содержит ионы металла и хиноновый кофактор.

В каждом случае 100 мл культуры E.coli с оптической плотностью (OD600 нм), равной 2,0-2,5 собирали посредством центрифугирования при 4°C и ресуспендировали в 20 мл буфера из фосфата калия. Суспензии клеток лизировали посредством обработки прессом Френча 3 раза при 20000 фунт/кв. дюйм. Клеточные лизаты разделяли на растворимую и нерастворимую части центрифугированием. Супернатант стерильно фильтровали и алкогольдегидрогеназу обогащали стандартными методами с использованием колонок с никель-сефарозой. Далее, посредством диализа проводили замену буферу с использованием специфических пробирок с отделением десяти килодальтонов. Полученную в результате общую концентрацию белка измеряли анализом по Брэдфорду.

Хиноновые кофакторы и ионы металла связывали с алкогольдегидрогеназой посредством инкубации в водном растворе. В этом случае хиноновый кофактор, такой пирролохинолинхинон (PCC, CAS № 72909-34-3), триптофантриптофилхинон (TTC, CAS № 134645-25-3), топахинон (TPC, CAS № 64192-68-3), лизинтирозилхинон (LTC, CAS № 178989-72-5) и цистеинтриптофилхинон (CTC, CAS № 400616-72-0), добавляют к существующей общей концентрации белка в виде водного раствора при приблизительно двадцатикратном молярном избытке. Ионы металла, выбранные из Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Zn³⁺, Mn²⁺, Mn³⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Cu³⁺, Co²⁺ и Co³⁺ применяют в виде водного раствора его соли. Если не указано иначе, алкогольдегидрогеназы обычно применяли вместе с PCC (Sigma Aldrich #D7783) и Ca²⁺, активированного как раствор 5 мМ CaCl₂. Ферменты, очищенные и активированные таким образом, применяли для аналитических тестов на превращение in vitro трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3. Если не указано иначе, термины "фермент или "алкогольдегидрогеназа" всегда понимают, как относящиеся к соответствующим образом активированным алкогольдегидрогеназам, содержащим ионы металла и хиноновый кофактор.

Аналитические тесты на превращение проводили в водном растворе с использованием следующих компонентов: 100 мМ Tris-HCl pH 7,5 или 10% Торелл-Стенхаген pH 7,5; синтетический окислительно-восстановительный кофактор, выбранный из группы 1 мМ феназина метосульфата PMS (Sigma Aldrich #P9625), 1 мМ метиленового синего (Sigma #M9140), 1 мМ кофермента Q10 (Sigma #C9538), 1 мМ кофермента Q1 (Sigma #C9538) и 20 мМ гексацианоферрата натрия (III) PFC (III) (Fluka #60300); 10 ч./млн вплоть до максимального значения 100 ч./млн трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3 посредством добавления желательного количества исходного раствора субстрата токсина; и от 10 до 100 нМ, максимально 300 нМ активированных алкогольдегидрогеназ с SEQ ID № 1, 2, 3 или 4, содержащих ионы металла и хиноновый кофактор. Если не указано иначе, обычно применяют буфер Tris-HCl,

окислительно-восстановительный кофактор PMS, DON и алкогольдегидрогеназу с SEQ ID № 1. Каждый тест на превращение проводили в коричневых реакционных пробирках Эппендорфа объемом 1,5 мл. Реакционные смеси инкубировали при 30°C в термоблоке в течение времени вплоть до 120 мин, по меньшей мере 40 мин. Через 0, 10, 20, 30, и 40 мин, образец объемом 0,1 мл отбирали в каждом случае и смешивали с 0,1 мл метанола и хранили при -20°C, или альтернативно анализировали сразу же посредством ЖХ-МС/МС или ВЭЖХ.

Стерильно отфильтрованный водный раствор 2000 ч./млн DON применяли в качестве исходного раствора субстрата DON. Для получения этого раствора, DON в кристаллической форме (Biopure Standard from Romer Labs, art. no. 001050, с чистотой по меньшей мере 98%) взвешивали и растворяли.

Для количественной оценки трихотеценов, имеющих гидроксильную группу на атоме С-3 и их метаболитов после превращения, проводили анализы ВЭЖХ, где вещества отделяли хроматографически посредством колонки Phenomenex C18 Gemini NX с размерами 150×4,6 мм и размером частиц, равным 5 мкм. Смесь метанол/вода с концентрацией ацетата аммония, равной 5 мМ, применяли в качестве элюента. Сигнал УФ регистрировали и оценивали при 220 нм. Для количественного определения посредством анализов ЖХ-МС/МС, вещества разделяли хроматографически посредством колонки Zorbax eclipse C8 с размерами 150×4,6 мм и размером частиц, равным 5 мкм. Смесь метанол/вода с концентрацией ацетата аммония, равной 5 мМ, применяли в качестве элюента. Сигнал УФ регистрировали при 220 нм. Ионизацию электрораспылением (ЭРИ) использовали в качестве источника ионизации. Трихотецены, имеющие гидроксильную группу на атоме С-3, количественно оценивали посредством QTrap/ЖХ/МС/МС (тройной квадруполь, Applied Biosystems) в "расширенном режиме".

Отрицательный угол наклона кривых превращения (=снижению концентрации токсина с течением времени) в линейном интервале применяли в качестве стандарта для активности алкогольдегидрогеназ. Чтобы определить остаточные активности, использовали измеренные активности для различных параметров относительно исходной активности, измеренные в стандартных условиях, конкретно, 30°C и pH 7,5, и обычно представляли в процентном виде. фиг. 1 показывает хронологическое превращение DON для активированной алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1, а фиг. 2 показывает активированные алкогольдегидрогеназы с SEQ ID номерами 2-4 (фиг. 1B). Из иллюстраций отчетливо видно, что превращение DON происходит, так как концентрация DON снижалась в реальном времени.

Фиг. 1 показывает превращение DON с использованием алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1 в 100 мМ Tris HCl pH 7,5 в присутствии 50 ч./млн DON и 1 мМ PMS. Результаты измерений получали посредством анализов ЖХ-МС/МС (А) и превращение DON с использованием алкогольдегидрогеназ с SEQ ID номерами 1-4 показано на фиг. 2. Результаты измерений получали посредством анализов ВЭЖХ (В). CTR применяли в тестах в качестве проверки на отрицательное значение, которая содержала все компоненты аналитического теста на превращение вплоть до алкогольдегидрогеназ с SEQ ID номерами 1-4.

Для сравнения эффективности хиноновых кофакторов в аналитических тестах на превращение, каждую из 10 нМ алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1, активированной хиноновыми кофакторами PCC, TTC, TPC, LTC и CTC, 10 ч./млн DON, и 1 мМ синтетического окислительно-восстановительного фактора PMS смешивали в 100 мМ Tris-HCl pH 7,5 и инкубировали при 30°C. Концентрации DON определяли посредством ЖХ-МС/МС через 30 мин. Результаты показаны в табл. 2.

Для сравнения эффективности окислительно-восстановительных кофакторов в аналитических тестах на превращение, 10 нМ активированного фермента (алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1), 10 ч./млн DON, и 1 или 20 мМ синтетических окислительно-восстановительных кофакторов, подлежащих тестированию, соответственно смешивали в 100 мМ Tris-HCl pH 7,5 и инкубировали при 30°C. Концентрации DON определяли посредством ЖХ-МС/МС через 30 мин. Результаты показаны в табл. 2.

Таблица 2

Хиноновый кофактор	DON [чнм]	Окислительно-восстановительный кофактор	DON [чнм]
PCC	1,94	1 мМ PMS	1,95
TTC	2,32	20 мМ PFC (III)	2,11
TPC	2,41	1 мМ кофермента Q1	8,58
LTC	2,04	1 мМ метиленового синего	6,88

Чтобы проверить влияние ионов металла в активированном ферменте на превращение, алкогольдегидрогеназу с SEQ ID № 1 и PCC активировали, но с различными ионами металла в каждом случае, а именно Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ и Cu²⁺. В тестах на превращение содержалось 10 нМ активированной алкогольдегидрогеназы, 10 ч./млн DON и 1 мМ PMS в 100 мМ Tris-HCl pH 7,5 соответственно, и инкубацию проводили при 30°C. Концентрации DON определяли посредством ЖХ-МС/МС через 30 мин. Ре-

зультаты показаны в табл. 3.

Таблица 3

Ион металла	DON [чнм]	Ион металла	DON [чнм]
Mg ²⁺	1,90	Mn ²⁺	2,57
Ca ²⁺	1,98	Fe ²⁺	2,17
Zn ²⁺	2,46	Cu ²⁺	2,61

По аналогии с указанными выше аналитическими тестами на превращение DON аналитические тесты на превращение проводили с другими трихотеценами, имеющими гидроксильную группу на атоме С-3. В этих аналитических тестах вместо 50 ч./млн DON, использовали 50 ч./млн токсина Т-2 или 50 ч./млн ниваленола. Все четыре алкогольдегидрогеназы с SEQ ID номерами 1-4, содержащие ионы металла и хиноновый кофактор также были способны превращать токсин Т-2 и ниваленол, и в каждом случае более половины исходно используемого токсина превращалось в пределах 30 мин.

Пример 4. Измерение областей активности.

Чтобы определить способность алкогольдегидрогеназ с SEQ ID номерами 1-4 превращать DON при различных условиях, алкогольдегидрогеназу с SEQ ID № 1 применяли в качестве примера.

Алкогольдегидрогеназу с SEQ ID № 1 получали и активировали с Ca²⁺ и PCC, как описано в примере 3. Чтобы определить активность фермента в температурном интервале от 10 до 50°C и в интервале pH от 3,0 до 9,0, буфер Торелла-Стенхагена применяли вместо 100 мМ буфера Tris-HCl pH 7,5.

Аналитические тесты на превращение, для определения активностей при различных температурах выполняли в водном растворе со следующими компонентами: 10% Торелл-Стенхаген pH 7,5, 1 мМ синтетический окислительно-восстановительный кофактор PMS, 50 ч./млн DON и 10 нМ активированной алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1. Аналитические тесты на превращение инкубировали до 60 мин в термоциклере (Эппендорф) с градиентом температуры от 10 до 50°C. Через 0, 10, 20, 30, 40, и 60 мин образец объемом 0,05 мл отбирали в каждом случае и смешивали с 0,05 мл метанола для остановки реакции, и сохраняли при -20°C. Получали образцы для ЖХ-МС/МС как описано в примере 3, и анализировали посредством ЖХ-МС/МС. Прохождение снижения DON определяли для каждой температуры, и активность рассчитывали, как описано в примере 3. Угол наклона линейного интервала кривой превращения при 30°C применяли в качестве эталонного значения для расчета остаточной активности при других температурах. Табл. 4 показывает температуры при °C и ассоциированные остаточные активности в процентах. Неожиданно, было показано, что алкогольдегидрогеназа с SEQ ID № 1 является активной на протяжении широкого температурного интервала. При 10°C измеряли остаточную активность, равную 48%, и при приблизительно 50°C, остаточную активность, равную 67%.

Таблица 4

Температура [°C]	Остаточная активность [%]	Температура [°C]	Остаточная активность [%]
10,0	48	32,8	105
12,7	60	33	108
15	69	35,3	105
17,6	73	38,4	120
20,5	86	40,7	116
23,3	89	43,2	108
26,2	82	45,9	96
28,3	100	48,2	89
30,2	100	49,8	67

Аналитические тесты на превращение для определения активности в интервале pH от 4,0 до 9,0 выполняли в водном растворе со следующими компонентами: 10% Торелла-Стенхагена от pH 4,0 до 10,0, 20 мМ синтетического окислительно-восстановительного кофактора PFC, 100 ч./млн DON и 20 нМ активированных алкогольдегидрогеназ с SEQ ID № 1. Аналитические тесты на превращение инкубировали до 60 мин в термоциклере при 30°C. Через 0, 10, 20, 30, 40 и 60 мин образец объемом 0,05 мл отбирали в каждом случае и смешивали с 0,05 мл метанола для остановки реакции, и сохраняли при -20°C. Как описано в примере 3, образцы разбавляли и анализировали посредством ЖХ-МС/МС. Прохождение снижения DON определяли при каждом значении pH, и активность рассчитывали, как описано в примере 3. Угол наклона линейного интервала кривой превращения при pH 7,5 применяли в качестве эталонного значения для расчета остаточной активности при других температурах. Таблица 5 показывает значения pH и ассоциированные остаточные активности (снижение DON, основанное на эталонном значении pH, равном 7,5) в процентах.

Таблица 5

pH	Остаточная активность	pH	Остаточная активность
4,0	10%	7,0	105%
5,0	18%	7,5	100%
6,0	20%	8,0	69%
6,5	52%	9,0	105%

Пример 5. Определение температурной устойчивости.

Температурную устойчивость алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1 определяли в интервале от 30 до 55°C. Для выполнения активированную алкогольдегидрогеназу инкубировали в буфере 100 мМ Tris-HCl, pH 7,5 в течение времени до 60 мин при конкретной температуре в термоциклере (Эппендорф). Через 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 и 60 мин отбирали аликвоту алкогольдегидрогеназы и активность определяли в аналитическом тесте на превращение DON, как описано в примере 3. Аналитические тесты на превращение содержали следующие компоненты: 100 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ PMS, 50 ч./млн DON, 10 нМ активированной алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1. Как описано в примере 3, реакционные смеси инкубировали и отбор образцов для определения активности проводили через 0, 10, 20, 30, 40 и 60 мин. Прохождение снижения DON определяли для каждой температуры для каждого значения времени инкубации. Угол наклона линейного диапазона кривой превращения DON рассчитывали, чтобы определить температурную устойчивость. Угол наклона линейного диапазона кривой превращения DON для соответствующей температуры на время t=0 мин использовали в качестве эталонного значения для расчета остаточных активностей. Табл. 6 показывает температуры в °C, время инкубации в минутах, и ассоциированные остаточные активности в процентах. Алкогольдегидрогеназа с SEQ ID № 1 была наиболее устойчивой при хранении в течение часа при температурах 30 и 37°C. В сравнении с этим результатом алкогольдегидрогеназа все еще имела 73% остаточную активность при 40°C после часового хранения. 50% остаточную активность измеряли после хранения при 45°C в течение 30 мин. Неожиданно, остаточную активность, равную 84%, обнаружили после хранения в течение 5 мин при 50°C.

Таблица 6

	Время инкубации							
	0 мин	5 мин	10 мин	15 мин	20 мин	30 мин	40 мин	60 мин
30°C	100%	99%	98%	94%	88%	99%	100%	95%
37°C	100%	92%	94%	92%	90%	91%	47%	79%
40°C	100%	90%	83%	77%	75%	83%	82%	73%
45°C	100%	85%	78%	77%	60%	57%	47%	19%
50°C	100%	84%	30%	36%	13%	12%	10%	0%

Пример 6. Определение pH-устойчивости.

pH-устойчивость активированной алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1 определяли в интервале от pH 4,0 до pH 10,0. Для выполнения десятикратную концентрацию активированной алкогольдегидрогеназы (100 нМ) хранили в 10% буфере Торелла-Стенхагена от pH 4,0 до 10,0 в течение до 120 мин при температура 30°C. Через 0, 60 и 120 мин отбирали аликвоту алкогольдегидрогеназы и определяли активность в аналитическом тесте на превращение, как описано в примере 3, выполняя при 30°C со следующими компонентами: 100 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ PMS, 50 ч./млн DON, 10 нМ активированной алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1. Отбор образцов для определения активности проводили через 0, 10, 20, 30 и 40 мин. Прохождение снижения DON определяли для каждого значения pH для каждого момента времени. Чтобы определить устойчивость, угол наклона линейного интервала кривой превращения DON рассчитывали для каждого значения pH при соответствующем значении времени. Угол наклона линейного диапазона кривой превращения DON для соответствующего значения pH для времени t=0 мин использовали в качестве эталонного значения для расчета активностей следующих значений времени инкубации. Табл. 7 показывает значение pH, время pH инкубации в минутах, и ассоциированные остаточные активности в процентах. Алкогольдегидрогеназа с SEQ ID № 1 была устойчивой при от pH 5,0 до pH 9,0 после 60-минутной инкубации. Неожиданно, алкогольдегидрогеназа проявляла особенно хорошую стабильность в кислотном окружении (никакой потери активности при pH 5,0) и в сильнощелочном окружении (никакой потери активности при инкубации через 120 мин при pH 9,0).

Таблица 7

	Время инкубации	
	60 мин	120 мин
pH 4,0	72%	51%
pH 5,0	111%	109%
pH 6,0	92%	88%
pH 7,0	87%	85%
pH 8,0	83%	73%
pH 9,0	93%	60%
pH 10,0	69%	55%

Пример 7. Превращение DON в комплексных матрицах.

Чтобы определить способность активированных алкогольдегидрогеназ превращать трихотецены в комплексных матрицах также без внешнего добавления синтетических окислительно-восстановительных кофакторов, активированную алкогольдегидрогеназу с SEQ ID № 1 получали, как описано в примере 3, и аналитические тесты на превращение DON проводили в комплексных матрицах. В этом случае комплексные матрицы определяют как сок рубца крупного рогатого скота, содержимое кишечника из тонкого кишечника свиней, желудочный сок свиней, слюна людей и свиней, гранулированный корм для поросят, и гранулированный корм для поросят, смешанный со слюной, соком рубца, или содержимым кишечника среди прочих. Чтобы провести сравнение с буферной системой, проверки проводили с Tris-HCl, как описано в примере 3. Для корма поросят применяли стандартный корм на основе кукурузы, сои и ячменя.

Чтобы определить активность алкогольдегидрогеназы в соке рубца (pH 5,9), 1 мл стерильного фильтрата сока рубца добавляли к 100, 200 и 300 нМ активированной алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1 и 50 ч./млн DON в каждом случае. Контрольные загрузки тестировали в водном растворе, как описано в примере 3.

Аналитические тесты на превращение инкубировали при 30°C в термоблоке в течение до 24 ч. Образцы отбирали через 0, 0,5, 1,0, 5,0, и 24,0 ч, в каждом таком случае образец объемом 0,1 мл отбирали для каждого значения времени и реакцию останавливали 0,1 мл метанола. Образцы хранили при -20°C, размораживали и центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об/мин с использованием настольной центрифуги Эппендорфа и стерильно отфильтровывали с использованием фильтра Spartan 0,2 мкм. Для ЖХ-МС/МС образцы разбавляли, как описано в примере 3, и анализировали посредством ЖХ-МС/МС. Концентрацию DON для времени t=0 ч использовали в качестве эталонного значения (100%) для следующих значений. Табл. 8 показывает процентную долю концентрации DON, которую измеряли в определенное время относительно времени t=0 ч. Для активности в Tris-HCl буфере, присутствие добавленного извне синтетического окислительно-восстановительного кофактора является необходимым, поскольку превращение DON происходит медленно, и было обнаруживаемым только 24 ч спустя с использованием концентрации алкогольдегидрогеназы, равной 300 нМ. Неожиданно, было продемонстрировано, что DON превращается без добавления внешнего синтетического окислительно-восстановительного кофактора в стерильном фильтрате сока рубца при значении pH, равном 5,9. Этот результат ясно показывает, что в соке рубца есть вещества, которые служат в качестве природных окислительно-восстановительных кофакторов. При концентрации 300 нМ только 42% первоначального количества DON содержится в препарате после 5 ч инкубации. Через 24 ч инкубации DON обнаруживается только в низких количествах при концентрации алкогольдегидрогеназы свыше 200 нМ.

Таблица 8

	Сок рубца с синтетическим окислительно-восстановительным кофактором	Сок рубца без синтетического окислительно-восстановительного кофактора			Tris-HCl pH 7,5 без синтетического окислительно-восстановительного кофактора		
		100 нМ	200 нМ	300 нМ	100 нМ	200 нМ	300 нМ
0 ч	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
0,5 ч	0%	100%	100%	87%	100%	99%	95%
1,0 ч	0%	100%	100%	83%	100%	99%	89%
5,0 ч	0%	94%	75%	42%	99%	88%	86%
24,0 ч	0%	53%	3%	0%	97%	84%	67%

Чтобы определить активность алкогольдегидрогеназы в желудочном соке свиней без комбикорма при значении pH, равном приблизительно 3, в содержимом кишечника свиней при значении pH, равном приблизительно 6, и в свиной и человеческой слюне, 300 нМ активированной алкогольдегидрогеназы SEQ ID № 1, приблизительно 20 ч./млн DON, смешивали с 1 мл желудочного сока (стерильно отфильтрованного), 1 мл кашеобразного содержимого кишечника, или 1 мл слюны в каждом случае. Для проверки на отрицательное значение были включены аналитические тесты, содержащие только пищеварительные текущие среды с 20 ч./млн DON, и для проверки на положительное значение, использовали тесты на превращение, содержащие все компоненты, включая 20 мМ синтетического окислительно-восстановительного кофактора PFC (III). Образцы отбирали через 0, 3,0, 5,0 и 24,0 ч, в каждом случае образец объемом 0,1 мл отбирали при каждом значении времени и реакцию останавливали 0,1 мл метанола. Образцы хранили при 20°C, размораживали и центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об/мин, используя настольную центрифугу Эппендорфа, и стерильно отфильтровывали (0,2 мкм фильтр Spartan). Для ЖХ-МС/МС, образцы разбавляли 1:10 в элюенте (см. пример 3) и анализировали посредством ЖХ-МС/МС как в примере 3. Табл. 9 показывает соответствующие концентрации DON, которые измеряли при отборе образцов. Неожиданно, снижение DON в слюне происходило без добавленного извне синтетического окислительно-восстановительного кофактора (независимо от типа). Этот результат ясно показывает, что в секретах слюны людей и свиней существуют вещества, которые являются подходящими в качестве природных окислительно-восстановительных кофакторов для превращения DON с использованием алкогольдегидрогеназы SEQ ID № 1. Никакого существенного снижения концентрации DON не было измерено в чистом желудочном соке без каши. Снижение концентрации DON происходило в содержимом кишечника только при добавлении синтетического окислительно-восстановительного кофактора.

Таблица 9

		DON [чнм]			
Образец		0 ч	3 ч	5 ч	24 ч
Слюна (человека)	Проверка на отрицательное значение	20	19	18	18
	0 мМ PFC (III)	20	13	12	8
	Проверка на положительное значение 20 мМ PFC (III)	18	0	0	0
Слюна (свиньи)	Проверка на отрицательное значение	20	20	19	18
	0 мМ PFC (III)	21	10	8	5
	Проверка на положительное значение 20 мМ PFC (III)	20	0	0	0
Желудочный сок	Проверка на отрицательное значение	22	22	21	21
	0 мМ PFC (III)	22	21	21	20
	Проверка на положительное значение 20 мМ PFC (III)	24	21	19	18
Содержимое кишечника	Проверка на отрицательное значение	21	20	20	20
	0 мМ PFC (III)	24	23	22	22
	Проверка на положительное значение 20 мМ PFC (III)	23	9	8	4

Чтобы определить активность алкогольдегидрогеназы в корме для поросят, 100 мг корма для поросят смешивали с 400 мкл 100 мМ буфера Tris-HCl, pH 7,5, 400 мкл свиной слюны, 400 мкл стерильного свиного желудочного сока или 400 мкл содержимого кишечника свиней, соответственно. Эти суспензии корма для поросят хранили в течение ночи при 4°C. Затем ко всем образцам добавляли приблизительно 20 ч./млн DON и/или 300 нМ активированной алкогольдегидрогеназы с SEQ ID № 1 и/или 20 мМ синтетического окислительно-восстановительного кофактора PFC (III). Препараты без алкогольдегидрогеназы

и без внешнего синтетического окислительно-восстановительного кофактора использовали в качестве проверки на отрицательное значение. Препараты с добавленными алкогольдегидрогеназой и синтетическим окислительно-восстановительным кофактором использовали в качестве проверки на положительное значение. Образцы отбирали через 0, 3,0, 5,0 и 24,0 ч. Каждый раз применяли один полный образец. Для образца добавляли 500 мкл метанола с последующей 30-минутной гомогенизацией на шейкере с 300 об/мин. После этой операции образцы центрифугировали в течение 15 мин (настольная центрифуга Эппендорфа, 13000 об/мин) и супернатант отфильтровывали с использованием шприца через 0,2 мкм фильтр Spartan. Супернатанты хранили при -20°C, размораживали и для ЖХ-МС/МС разбавляли 1:10 в элюенте, и анализировали посредством ЖХ-МС/МС, как описано в примере 3.

Табл. 10 показывает концентрацию DON, которая присутствовала в образцах при соответствующих значениях времени. В буферной смеси корма для поросят присутствовали вещества, которые могут взять на себя роль добавленных извне синтетических окислительно-восстановительных кофакторов, поскольку концентрация DON снижается непрерывно в отсутствии внешнего синтетического окислительно-восстановительного кофактора. Эти вещества поступают из корма для поросят, так как, как показано прежде, никакое превращение DON не могло быть измерено в буфере без внешнего синтетического окислительно-восстановительного кофактора. В присутствии внешнего синтетического окислительно-восстановительного кофактора, превращение DON в буферной смеси корма для поросят происходит быстрее при сравнении.

В смеси корма для поросят и слюны алкогольдегидрогеназа также проявляла активность независимо от присутствия внешнего синтетического окислительно-восстановительного кофактора; в то время как более быстрое снижение DON происходило в аналитических тестах на превращение, в которых сохранился внешний синтетический окислительно-восстановительный кофактор.

Неожиданно, алкогольдегидрогеназа с SEQ ID № 1 в кормовой смеси для поросят также является активной без добавления внешнего синтетического окислительно-восстановительного кофактора. При добавлении корма для поросят к желудочному соку, с одной стороны, увеличивался pH желудочного сока, а с другой стороны, природные окислительно-восстановительные кофакторы, которые могут заменить внешний синтетический окислительно-восстановительный кофактор, высвобождались из корма для поросят. Активность алкогольдегидрогеназы устанавливали в содержимом кишечника только тогда, когда внешний синтетический окислительно-восстановительный кофактор добавляли в аналитический тест на превращение.

Таблица 10

Образец		DON [чнм]			
		0 ч	3 ч	5 ч	24 ч
Корм для поросят в буфере	Проверка на отрицательное значение	21	20	20	20
	0 мМ PFC (III)	20	10	9	5
	Проверка на положительное значение 20 мМ PFC (III)	21	0	0	0
Корм для поросят в слюне	Проверка на отрицательное значение	20	20	20	20
	0 мМ PFC (III)	20	12	9	8
	Проверка на положительное значение 20 мМ PFC (III)	21	1	0,8	0,5
Корм для поросят в желудочном соке	Проверка на отрицательное значение	21	21	20	20
	0 мМ PFC (III)	20	7	5	2
	Проверка на положительное значение 20 мМ PFC (III)	20	5	0,7	0
Корм для поросят в содержимом кишечника	Проверка на отрицательное значение	21	20	20	20
	0 мМ PFC (III)	21	20	18	16

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение алкогольдегидрогеназы с SEQ ID NO: 1 или ее функционального варианта, имеющего последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1, находящихся в комплексе с ионами металла и хиноновым кофактором, в комбинации по меньшей мере с одним окислительно-восстановительным кофактором для превращения по меньшей мере одного трихотецена, имеющего гидроксильную группу на атоме С-3, в менее токсичные метаболиты, где указанный хиноновый кофактор связан с алкогольдегидрогеназой посредством по меньшей мере одного иона металла, выбранного из группы Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} и Co^{3+} , и где указанный по меньшей мере один окислительно-восстановительный кофактор выбирают из группы, состоящей из феназинметосульфата (PMS), производных PMS, гексацианоферрата калия (III), гексацианоферрата натрия (III), цитохрома С, кофермента Q1, кофермента Q10, метиленового синего и N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамина (TMPD), где производные PMS представляют собой 1-гидроксифеназин, 2-(пентапренилокси)дигидрофеназин, 5,10-дигидро-9-диметилаллилфеназин-1-карбоновая кислота, 5,10-дигидрофеназин-1-карбоновая кислота, 5-метилфеназиния метилсульфат, 6-ацетофеназин-1-карбоновая кислота, бентофенин, клофазимин, дигидрометанофеназин, эсмеральдиновая кислота, эсмеральдин В, изумифеназин А-С, катион Янус Грин В, метанофеназинпелагиомицин А, феназин, феназин-1,6-дикарбоновая кислота, феназин-1-карбоксамид, феназин-1-карбоновая кислота, феносафранин, пиоцианин, сафенамицин или метиловый эфир сафеновой кислоты.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что аминокислотную последовательность функционального варианта выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-4.

3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что аминокислотная последовательность функционального варианта идентична SEQ ID NO: 1 по меньшей мере на 86%, предпочтительно по меньшей мере на 89%.

4. Применение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что хиноновый кофактор выбирают из группы, состоящей из пирролохинолинхинона (PCC), триптофантриптофилхинона (TTC), топахинона (TRC), лизинтирозилхинона (LTC) и цистеинтриптофилхинона (CTC), предпочтительно PCC.

5. Применение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанный по меньшей мере один ион металла выбран из группы, состоящей из Ca^{2+} и Mg^{2+} .

6. Применение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что указанный по меньшей мере один окислительно-восстановительный кофактор выбирают из группы, состоящей из PMS, кофермента Q1 и кофермента Q10.

7. Способ ферментативного превращения трихотеценов в менее токсичные метаболиты, отличающийся тем, что по меньшей мере один трихотецен, имеющий гидроксильную группу на атоме С-3, приводят в контакт с алкогольдегидрогеназой с SEQ ID NO: 1 или ее функциональным вариантом, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1, находящимися в комплексе с ионами металла и хиноновым кофактором, по меньшей мере с одним окислительно-восстановительным кофактором и водой,

где указанный хиноновый кофактор связан с алкогольдегидрогеназой посредством по меньшей мере одного иона металла, выбранного из группы Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} и Co^{3+} , и

где указанный по меньшей мере один окислительно-восстановительный кофактор выбирают из группы, состоящей из феназинметосульфата (PMS), производных PMS, гексацианоферрата калия (III), гексацианоферрата натрия (III), цитохрома С, кофермента Q1, кофермента Q10, метиленового синего и N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамина (TMPD), где производные PMS представляют собой 1-гидроксифеназин, 2-(пентапренилокси)дигидрофеназин, 5,10-дигидро-9-диметилаллилфеназин-1-карбоновая кислота, 5,10-дигидрофеназин-1-карбоновая кислота, 5-метилфеназиния метилсульфат, 6-ацетофеназин-1-карбоновая кислота, бентофенин, клофазимин, дигидрометанофеназин, эсмеральдиновая кислота, эсмеральдин В, изумифеназин А-С, катион Янус Грин В, метанофеназинпелагиомицин А, феназин, феназин-1,6-дикарбоновая кислота, феназин-1-карбоксамид, феназин-1-карбоновая кислота, феносафранин, пиоцианин, сафенамицин или метиловый эфир сафеновой кислоты,

где указанное превращение осуществляют в пищевых продуктах, или кормах, или в необработанных материалах из растительного сырья, применяемых для производства или переработки пищевых продуктов и кормов.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность функционального варианта идентична SEQ ID NO: 1 по меньшей мере на 86%, предпочтительно по меньшей мере на 89%.

9. Способ по п.7 или 8, отличающийся тем, что аминокислотную последовательность функционального варианта выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-4.

10. Способ по любому из пп.7-9, отличающийся тем, что трихотецен, имеющий гидроксильную группу на атоме С-3, превращают при температуре между 5 и 55°C, предпочтительно между 10 и 50°C, особенно предпочтительно между 28 и 45°C.

11. Способ по любому из пп.7-10, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют в те-

чение по меньшей мере одной минуты, предпочтительно по меньшей мере 5 мин, в особенности по меньшей мере 60 мин.

12. Способ по любому из пп.7-11, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один ион металла выбран из группы, состоящей из Ca^{2+} и Mg^{2+} .

13. Способ по любому из пп.7-12, отличающийся тем, что по меньшей мере один окислительно-восстановительный кофактор выбирают из группы, состоящей из PMS, кофермента Q1 и кофермента Q10.

14. Способ по любому из пп.7-13, отличающийся тем, что хиноновый кофактор выбран из группы PCC, TTC, TPC, LTC и CTC, предпочтительно PCC.

15. Трихотецен-превращающая добавка, отличающаяся тем, что добавка содержит алкогольдегидрогеназу с SEQ ID NO: 1 или ее функциональный вариант, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1, находящиеся в комплексе с ионами металла и хиноновым кофактором, где указанный хиноновый кофактор связан с алкогольдегидрогеназой посредством по меньшей мере одного иона металла, выбранного из группы Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} и Co^{3+} .

16. Добавка по п.15, отличающаяся тем, что указанная добавка дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный компонент, выбранный из группы, состоящей из окислительно-восстановительного кофактора и по меньшей мере одного эксципиента.

17. Добавка по п.15 или 16, отличающаяся тем, что аминокислотная последовательность функционального варианта идентична SEQ ID NO: 1 по меньшей мере на 86%, предпочтительно по меньшей мере на 89%.

18. Добавка по любому из пп.15-17, отличающаяся тем, что аминокислотную последовательность функционального варианта выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 2-4.

19. Добавка по любому из пп.15-18, отличающаяся тем, что хиноновый кофактор выбран из группы PCC, TTC, TPC, LTC и CTC, предпочтительно PCC.

20. Добавка по любому из пп.15-19, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один ион металла выбран из группы, состоящей из Ca^{2+} и Mg^{2+} .

21. Добавка по п.16, отличающаяся тем, что окислительно-восстановительный кофактор выбирают из группы, состоящей из PMS, производных PMS, гексацианоферрата калия (III), гексацианоферрата натрия (III), цитохрома C, кофермента Q1, кофермента Q10, метиленового синего и TMPD, предпочтительно PMS, кофермента Q1 и кофермента Q10, где производные PMS представляют собой 1-гидроксифеназин, 2-(пентапренилокси)дигидрофеназин, 5,10-дигидро-9-диметилаллилфеназин-1-карбоновая кислота, 5,10-дигидрофеназин-1-карбоновая кислота, 5-метилфеназиния метилсульфат, 6-ацетофеназин-1-карбоновая кислота, бентофенин, клофазимин, дигидрометанофеназин, эсмеральдиновая кислота, эсмеральдин В, изумифеназин А-С, катион Янус Грин В, метанофеназинпелагиомицин А, феназин, феназин-1,6-дикарбоновая кислота, феназин-1-карбоксамид, феназин-1-карбоновая кислота, феносафранин, пиоцианин, сафенамицин или метиловый эфир сафеновой кислоты.

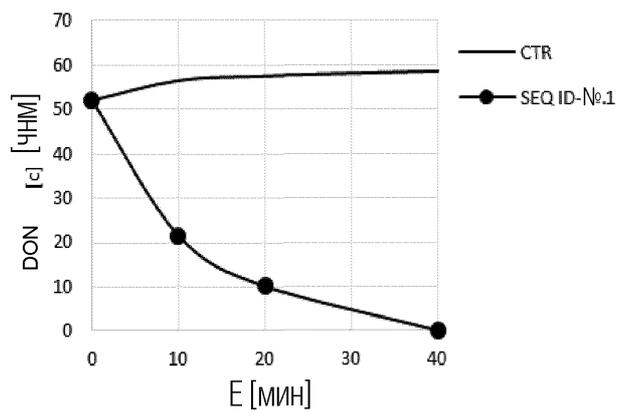
22. Добавка по п.16, отличающаяся тем, что эксципиент выбирают из группы, состоящей из инертных носителей, витаминов, минеральных веществ, фитогенетических веществ, ферментов и дополнительных компонентов для детоксикации микотоксинов, таких как микотоксин-разрушающие ферменты, в особенности афлатоксин-оксидазы, эрготамин-гидролазы, эрготамин-амидазы, зеараленон-эстеразы, зеараленон-лактоназы, зеараленон-гидролазы, охратоксин-амидазы, фумонизин-аминотрансферазы, фумонизин-карбоксилтрансферазы, аминокполиаминоксидазы, дезоксиниваленол-эпоксидгидролазы, дезоксиниваленол-дегидрогеназы, дезоксиниваленол-оксидазы, трихотецен-дегидрогеназы, трихотецен-оксидазы; и микотоксин-превращающие микроорганизмы, такие как DSM 11798; и микотоксин-связывающие вещества, такие как микробные клеточные стенки или неорганические материалы, такие как бентонит.

23. Добавка по любому из пп.15-22 в инкапсулированной форме или форме с покрытием.

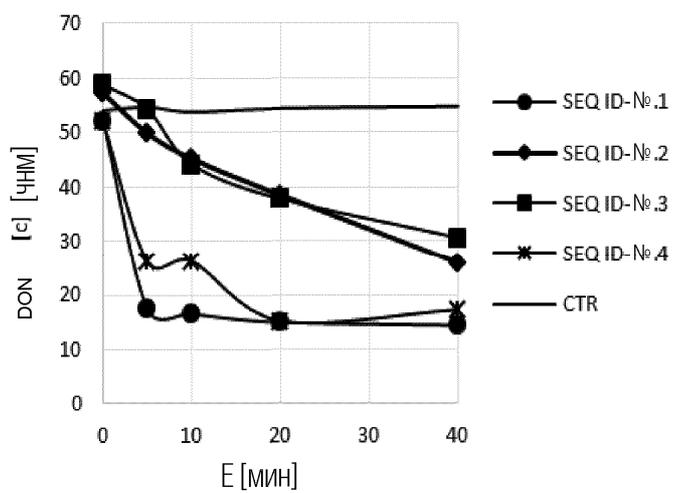
24. Применение по меньшей мере одной добавки по любому из пп.15-23 для получения средства для предотвращения и/или лечения трихотеценовых микотоксикозов.

25. Применение по п.24, где трихотеценовые микотоксикозы представляют собой микотоксикозы, вызываемые трихотеценами, которые обладают гидроксильной группой на атоме С-3.

26. Применение по п.25, где микотоксикозы, вызываемые трихотеценами, которые обладают гидроксильной группой на атоме С-3, представляют собой дезоксиниваленольные микотоксикозы.



Фиг. 1



Фиг. 2

