

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037776**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.20

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

(21) Номер заявки
201891967

(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) **A 667/2013**

(32) **2013.08.28**

(33) **AT**

(43) **2019.02.28**

(62) **201690471; 2014.08.27**

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

(72) Изобретатель:
**Фрухауф Себастьян, Тамхель
Михаэла, Пфеффер Мартин, Молль
Дитер, Шатцмаир Герд, Биндер Ева
Мария (AT)**

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

(56) WO-A1-2012113827
DATABASE UniProt [Online], 16 April
2014 (2014-04-16), "SubName: Full=Hydrolase
{ECO:0000313|EMBL:АНН94730.1};", XP002732829,
gefunden im EBI accession no. UNIPROT:W5W1S2,
Database accession no. W5W1S2, Sequenz
DATABASE UniProt [Online], 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

DATABASE UniProt [Online], 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

DATABASE UniProt [Online], 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

DATABASE UniProt [Online], 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

WO-A1-03053161

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

TAKAHASHI-ANDO N. ET AL.: "A novel
lactonohydrolase responsible for the detoxification of
zearealnone: 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

YUANSHAN YU ET AL.: "Oxidation of
zearealnone 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

(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.

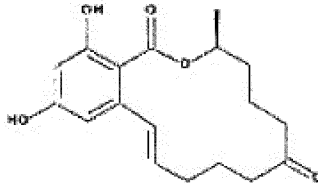
037776 B1

037776 B1

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 23781 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-(гидрокси-симетил)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 20000 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 концентра-

ции 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 мин 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%-ным 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 mucotoxinivorans*, *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 delafeldii* 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 удается 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 исходный 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 родства 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 про-

изводного 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 удастся 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 c^{-1} , преимущественно по меньшей мере 0,6 c^{-1} и предпочтительно по меньшей мере 5 c^{-1} , и/или константой v_{max} гидролитического расщепления ZEN, равной по меньшей мере 0,00001 $мкМ^{-1} \cdot c^{-1}$, преимущественно по меньшей мере 0,0001 $мкМ^{-1} \cdot c^{-1}$ и предпочтительно по меньшей мере 0,001 $мкМ^{-1} \cdot c^{-1}$, ZEN и/или производные соединения ZEN могут быть особенно быстро и полностью гидролизованы 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 pH-зависимая стабильность полипептида при pH 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 pH-зависимую стабильность полипептидов определяют как процентную остаточную активность полипептидов при pH 5,0 по отношению к активности при соответствующем оптимальном значении pH.

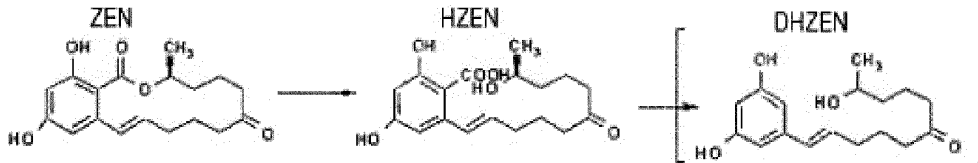
Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 5-7, 9, 11 и 15, или ее функциональный вариант, причем функциональный вариант имеет по меньшей мере 40% идентичности 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, гидролизует или детоксифицируется 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 темпе-

ратуру, при которой полипептиды после 15-минутной предварительной инкубации обладают 50%-ной 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 независимого 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 удается 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, A, 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, Δ 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, относительно SEQ ID NO: 1. Полипептидом такого рода удается полностью гидролизовать и предпочтительно детоксифицировать ZEN в течение короткого вре-

мени, 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_s 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 удается 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 удается 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 удается 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 каче-

стве 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 саузерн-блоттинга в стандартных условиях, причем материал носителя в конце промывают три раза по 15 мин 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 pH 7,6, 6 mM ЭДТА, 0,5% NP-40, 1-кратный раствор Денхардта, 1 mM пиродифосфата натрия, 1 mM дигидрофосфата 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 саузерн-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 мин 6-кратным буферным раствором SSC, содержащим 0,1% SDS, и два раза по 15 мин 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 гидролизованный 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 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 глюканазы, 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, эрготамингидролазы, эрготаминамидазы, зеараленонэстеразы, зеараленонлактоназы, охратоксинамидазы, фумонизинкарбоксилэстеразы, фумонизинаминотрансферазы, аминокполиоламинооксидазы, 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 10000 ед./г, предпочтительно не более 1000 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 покрытия могут быть использованы стандартные способы, такие как, например, способы, описанные в WO 92/12645. Благодаря капсулированию или покрытию удастся 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 покрытию удастся 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 удастся гидролизовать или детоксицировать 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 удастся 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 гидролизуются 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. 1A полипептид не имеет метки, на фиг. 1B полипептид имеет C-концевую метку 6His, а на фиг. 1C имеет N-концевую метку 6His;

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

на фиг. 3 - зависимости от времени степени разложения ZEN и увеличения количества метаболитов

HZEN и DHZEN в случае очищенных полипептидов с SEQ ID NO: 1 (фиг. 3A), 2 (фиг. 3B), (фиг. 3C), 6 (фиг. 3D), 7 (фиг. 3E), 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 (табл. 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; Extension (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, Н - 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 табл. 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 20000 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 1:1000, 1:10000 или 1:100000. 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 квадруполом, компания "Applied Biosystems") в "расширенном режиме". Не позже чем через 24 ч 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 1:10000 раствора клеточного лизата в случае полипептида с SEQ ID NO: 1 как без метки (фиг. 1А), так и с С-концевой меткой 6His (фиг. 1В) и N-концевой меткой 6His (фиг. 1С). 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 1:10000. В качестве исходного раствора субстрата вместо 2,08 мМ раствора ZEN (40 об.% ACN + 60 об.% H₂O) применяли эквимолярные, 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 Р. Krenn et al. (2007, *Mycotoxin Research*, 23, 4, 180-184) и М. 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 М. Sulyok et al. (2010, *Food Chemistry*, 119, 408-416). α -ZAL, β -ZAL и ZAN определяли способом Р. 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 максимум 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 $[\epsilon]$ 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 двухкратное определение.

С учетом коэффициентов поглощения ZEN и HZEN 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 [с⁻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

$$\text{удельная активность [ед/мг]} = \frac{v_{max} [\text{мкМ/с}] \cdot 60 [\text{с/мин}]}{\text{концентрация фермента [мг/л]}}$$

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 табл. 3 приведены значения скорости реакции при соответствующих концентрациях субстрата ZEN, для которых на фиг. 2 представлены соответствующие графики Михаэлиса-Ментен, а в табл. 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 табл. 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

№	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	ΔG5/ΔT6/ΔR7/ΔS8/ΔE9/ ΔA10/ΔA11/ΔD12/ΔA13/ ΔA14/ΔT15/ΔQ16/ΔA17/ ΔR18/ΔQ19/ΔP212/ ΔN327/ΔD328/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	ΔG5/ΔT6/ΔR7/ΔS8/ΔE9/ ΔA10/ΔA11/ΔD12/ΔA13/ ΔA14/ΔT15/ΔQ16/ΔA17/ ΔR18/ΔQ19/ΔP212/ ΔN327/ΔD328/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

Позиции мутаций указаны относительно аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1. Идентичность последовательностей определена по программе BLAST соответственно описанию примера 2.

Таблица 6. Значения удельной активности функциональных вариантов полипептида с SEQ ID NO: 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

Позиции мутаций указаны относительно аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2. Идентичность последовательностей определена по программе BLAST соответственно описанию примера 2.

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 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 табл. 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 микрод.	83%	$\geq 80\%$	70%	78%	80%
	1 микрод.	96%	$\geq 80\%$	76%	$\geq 80\%$	92%
	10 микрод.	97%	$\geq 80\%$	$\geq 85\%$	$\geq 80\%$	94%
SEQ ID NO: 2	0,1 микрод.	87%	$\geq 80\%$	73%	$\geq 80\%$	84%
	1 микрод.	97%	$\geq 80\%$	78%	$\geq 80\%$	90%
	10 микрод.	99%	$\geq 80\%$	$\geq 85\%$	$\geq 80\%$	96%
SEQ ID NO: 3	0,1 микрод.	79%	79%	67%	73%	75%
	1 микрод.	85%	$\geq 80\%$	72%	79%	82%
	10 микрод.	92%	$\geq 80\%$	78%	$\geq 80\%$	88%
SEQ ID NO: 4	0,1 микрод.	82%	78%	65%	76%	80%
	1 микрод.	89%	$\geq 80\%$	73%	$\geq 80\%$	86%
	10 микрод.	93%	$\geq 80\%$	82%	$\geq 80\%$	91%
SEQ ID NO: 5	0,1 микрод.	79%	76%	66%	78%	80%
	1 микрод.	83%	$\geq 80\%$	73%	$\geq 80\%$	81%
	10 микрод.	91%	$\geq 80\%$	79%	$\geq 80\%$	86%
SEQ ID NO: 6	0,1 микрод.	93%	$\geq 80\%$	75%	$\geq 80\%$	90%
	1 микрод.	95%	$\geq 80\%$	82%	$\geq 80\%$	92%
	10 микрод.	98%	$\geq 80\%$	$\geq 85\%$	$\geq 80\%$	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 микрофильтрации и ультрафильтрации (граница отсечки: 10 кД) в стандартных условиях очищали и концентрировали до концентрации сухого вещества около 9 мас.%. 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 мас.% добавки Z1, Z2, Z6 или Z13 и 99 мас.% 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 мас.% добавки Z1, Z2, Z6 или Z13, 0,9 мас.% концентрата витаминов и микроэлементов и 99 мас.% 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 E, 6,5 мг витамина K3, 6,5 мг витамина B1, 1,14 мг витамина B2, 15 мг витамина B6, 0,15 мг витамина B12, 50 мг никотиновой кислоты, 30 мг пантотеновой кислоты и 5,3 мг фолиевой кислоты.

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

Затем определяли расщепляющее зеоараленон 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.B, 92 ед./г в случае Z2.B, 90 ед./г в случае Z2.C, 57 ед./г в случае Z13.B, 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.B, Z2.B, Z6.B, Z13.B, 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. Ztschrft., 1938, 299: S. 416-419) 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. 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 4,6×150 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 табл. 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 +/-10°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%-ной остаточной активностью по сравнению с температурным оптимумом. В качестве меры активности принимали подъем кривых разложения. Значения термической стабильности представлены в табл. 9.

Таблица 9. Термическая стабильность полипептидов (50%-ная 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 табл. 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 табл. 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 ч. 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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Добавка, которая гидролитически расщепляет зераленон и/или по меньшей мере одно производное зераленона 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 гидролизуются 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. Применение полипептида для гидролитического расщепления зеараленона и/или по меньшей мере одного производного соединения зеараленона, отличающееся 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. Применение по п.10, отличающееся 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. Применение по п.10 или 11, отличающееся тем, что функциональный вариант имеет по меньшей мере одну модификацию аминокислот, выбранную из группы замен, делеций и инсерций соответственно одной или нескольких аминокислот.

13. Применение по любому из пп.10, 11 или 12, отличающееся 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 s^{-1} , преимущественно по меньшей мере 0,6 s^{-1} и предпочтительно по меньшей мере 5 s^{-1} , и/или имеет константу v_{max} гидролитического расщепления зеараленона, равную по меньшей мере 0,00001 $мкМ^{-1} \cdot с^{-1}$, преимущественно по меньшей мере 0,0001 $мкМ^{-1} \cdot с^{-1}$ и предпочтительно по меньшей мере 0,001 $мкМ^{-1} \cdot с^{-1}$.

14. Применение по любому из пп.10-13, отличающееся 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 по меньшей мере с одной из аминокислотных последовательностей, и стабильность pH полипептида при pH 5,0 составляет по меньшей мере 15%, предпочтительно 50% и, в частности, предпочтительно 90%.

15. Применение по любому из пп.10-13, отличающееся тем, что полипептид содержит аминокис-

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

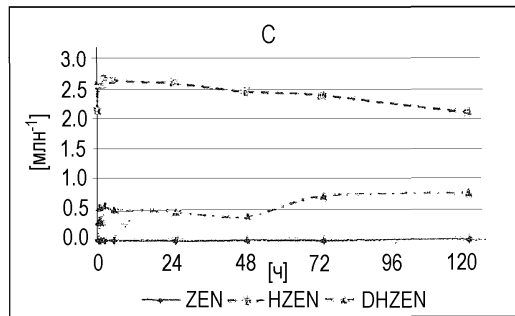
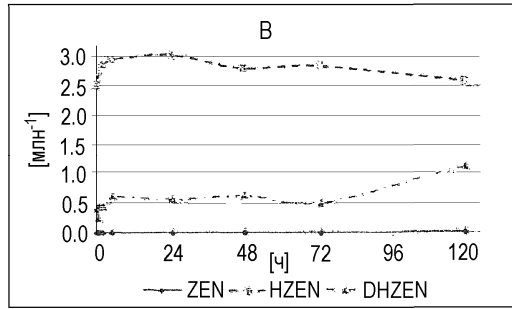
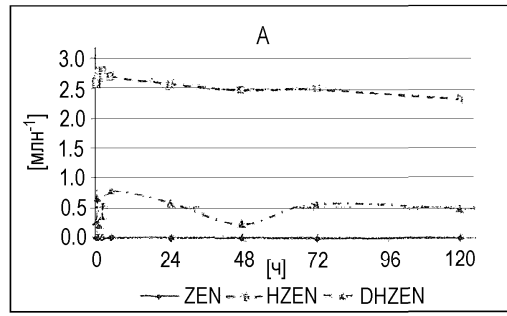
16. Применение по любому из пп.10-13, отличающееся тем, что полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей SEQ ID NO: 2, 5, 6, 9, 11 и 15, или ее функционального варианта, причем функциональный вариант имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности 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. Применение по любому из пп.10-16, отличающееся 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.

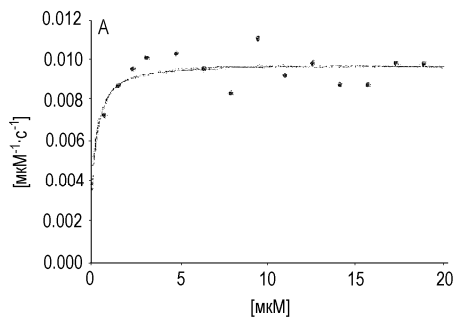
18. Применение по п.17, отличающееся тем, что полипептид имеет по меньшей мере одну мутацию аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 1, выбранную из группы: D22A, S23Q, S23L, N25D, I26V, F27Y, F27H, S29P, R31A, F32Y, R35K, R35Q, V37A, V42I, V43T, F46Y, S51E, S51D, D53G, N54M, N54R, L57V, 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, Δ 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. Применение по любому из пп.10-17, отличающееся тем, что полипептид содержит по меньшей мере один из следующих аминокислотных мотивов, выбранных из группы последовательностей SEQ ID NO: 32-69.

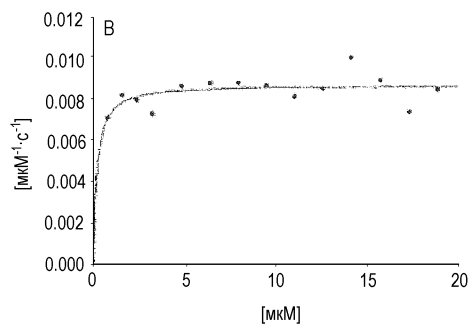
20. Применение по п.18, отличающееся тем, что полипептид содержит по меньшей мере одну консервативную замену аминокислоты по меньшей мере в одной позиции, а консервативная замена аминокислоты выбрана из замен G на A, или A на G, S, или V на I, L, A, T, S, или I на V, L, M, или L на I, M, V, или M на 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.



Фиг. 1



A



B

Фиг. 2

