

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **020035**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2014.08.29

(21) Номер заявки
201001003

(22) Дата подачи заявки
2008.12.11

(51) Int. Cl. **C11B 3/00** (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ

(31) **0725035.0; 0809177.9; 61/058,378**

(32) **2007.12.21; 2008.05.20; 2008.06.03**

(33) **GB; GB; US**

(43) **2011.06.30**

(86) **PCT/GB2008/004064**

(87) **WO 2009/081094 2009.07.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЮПОН НЬЮТРИШН
БАЙОСАЙЕНСИЗ АПС (DK)**

(72) Изобретатель:
**Сёе Йорн Борк (DK), Браун Анне
Виктория (US)**

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

(56) WO-A-03102118
WO-A-9953001
CLAUSEN K.: "ENZYMATIC OIL-
DEGUMMING BY A NOVEL MICROBIAL
PHOSPHOLIPASE". EUROPEAN JOURNAL OF
LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY, WILEY
VCH VERLAG WEINHEIM, DE, vol. 103,
no. 6, 1 June, 2001 (2001-06-01), pages 333-340,
XP001039221, ISSN: 1438-7697, abstract, paragraphs
[3.1.1], [3.1.2], [3.1.4]; tables 1, 2, citations 3, 8-18
JP-A-11228986
WO-A-9818912
EP-A-1788080
WO-A-2006008508
WO-A-2008094847
US-A1-2008070287
WO-A-2009024736
WO-A-03100044
EP-A-1762622

(57) Способ рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно неочищенного пищевого масла), включающий стадии а) смешивания приблизительно 0,1-5% мас./мас. воды с пищевым маслом (предпочтительно неочищенным пищевым маслом) и липидацилтрансферазой; б) перемешивания этой смеси в течение от приблизительно 10 до приблизительно 180 мин при температуре от приблизительно 45 до приблизительно 90°C и с) разделения масляной фазы и смоляной фазы. Предпочтительно указанная липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, обладающий липидацилтрансферазной активностью, где полипептид получают экспрессией нуклеотидной последовательности, показанной как SEQ ID No. 49, или нуклеотидной последовательности, которая имеет 70% или большую идентичность с ней; и/или получают экспрессией нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется при условиях средней жесткости с нуклеиновым зондом, содержащим нуклеотидную последовательность, показанную как SEQ ID No. 49; и/или представляет собой полипептид, имеющий липидацилтрансферазную активность, где полипептид включает аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID No. 68, или аминокислотную последовательность, которая имеет 70% или большую идентичность с ней. В одном варианте воплощения липидацилтрансферазу предпочтительно используют в комбинации с фосфолипазным С ферментом. Также описан способ модифицирования смоляной фазы рафинированного масла с использованием липидацилтрансферазы.

B1**020035****020035****B1**

Ссылки на родственные заявки

Ссылка сделана на следующие родственные заявки: US 2002-0009518, US 2004-0091574, WO 2004/064537, WO 2004/064987, WO 2005/066347, WO 2005/066351, заявка США под серийным номером 60/764430, поданная 2 февраля 2006 г., WO 2006/008508, международная патентная заявка под номером PCT/IB 2007/000558 и заявка США под серийным номером 11/671953. Каждая из этих заявок и каждый из документов, которые цитируются в этих заявках ("цитируемые в заявках документы"), а также каждый документ, упомянутый или цитируемый в документах, цитируемых в заявках, или в тексте, или в процессе рассмотрения этих заявок, а также все аргументы в поддержку патентоспособности, выдвинутые в процессе рассмотрения, введены в данное описание в качестве ссылок. Различные документы также цитируются в данном тексте ("цитируемые в данном описании документы"). Каждый из цитируемых в данном описании документов либо упомянутый в цитируемых в данном описании документах полностью введен в данное описание в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу рафинирования пищевого масла (предпочтительно растительного масла), используя липидацилтрансферазу. Далее настоящее изобретение относится к способу обработки пищевого масла (предпочтительно неочищенного пищевого масла) (например, растительного масла) и/или смоляной фазы пищевого масла (предпочтительно растительного масла), используя липидацилтрансферазу.

Предпосылки создания настоящего изобретения

Липидацилтрансферазы являются известными как такие, которые обладают преимуществами в пищевой промышленности. Липидацилтрансферазы, как было обнаружено, обладают значительной ацилтрансферазной активностью в пищевых продуктах. Эта активность обладает весьма преимущественным применением в способах получения продуктов питания.

Например, WO 2004/064537 раскрывает способ для *in situ* получения эмульгатора при использовании липидацилтрансферазы и преимущества, связанные с этим.

Международная патентная заявка под номером PCT/IB 2001/000558 демонстрирует экспрессию липидацилтрансферазы в (гетерологичной) хозяйской клетке и является введенной в данное описание в качестве ссылки.

Цель рафинирования пищевого масла заключается в том, чтобы удалить нежелательные примеси, которые влияют на качество (например, вкус, запах и внешний вид) и стабильность при хранении.

Из-за большого разнообразия этих примесей - свободные жирные кислоты, ионы металлов, красящие соединения, ароматизирующие вещества, смолы и т.д. - для рафинирования применяют целый ряд способов химической и физической природы (см., например, Bailey's Industrial Oil and Fat Products - 2006, John Wiley & Sons, Sixth Edition).

Как правило, для рафинирования масла применяют два способа, которые представляют собой способы физического рафинирования и химического рафинирования.

В так называемом химическом рафинировании почти всё содержание свободных жирных кислот удаляют путём начальной обработки большим избытком NaOH. Также содержание фосфолипидов снижают до уровня фосфора, как правило, ниже 10 ppm. Далее масло осветляют и дезодорируют.

Так называемое физическое рафинирование в основном заключается в стадии рафинирования гидратацией, которую сопровождают рафинированием кислотой, нейтрализацией, осветлением, отгонкой с помощью водяного пара для удаления свободных жирных кислот и дезодорированием.

Вместо применения рафинирования кислотой при физических способах очищения было принято использовать ферментативное рафинирование.

Способ ферментативного рафинирования был разработан на основе применения фосфолипазы поджелудочной железы. Поскольку данный фермент некошерный, фосфолипазу со временем заменили микробной фосфолипазой Al (Lecitase Ultra™ - Novozymes, Denmark) (Oil Mill Gazetteer, vol. 111, July 2005, p. 2-4).

Ферментативный способ имеет некоторые преимущества относительно химического или физического способов рафинирования гидратацией, включая снижение себестоимости, повышенный выход и процесс, более благоприятный для окружающей среды.

Способ ферментативного рафинирования масла основывается на добавлении фосфолипазы к маслу, которое уже прошло рафинирование гидратацией.

В WO 2006/008508 описано, что липидацилтрансферазы применяют в ферментативном рафинировании пищевых масел. В WO 2006/008508 раскрыто добавление липидацилтрансферазы к рафинированному гидратацией маслу или добавление липидацилтрансферазы к неочищенному маслу без необходимости подвергать это масло процессу рафинирования гидратацией.

"Рафинированное гидратацией масло", как правило, может быть получено с помощью обычного "способа рафинирования гидратацией", который включает смешивание 1-2% мас./мас. горячей мягкой воды с тёплым (70-90°C) сырым маслом (AOCS Introduction to the Processing of Fats and Oils - Table 8 - Degumming Processes - <http://www.aocs.org/meetings/education/mod3sample.pdf>). Практическое правило заключается в том, что количество воды, добавляемой к неочищенному маслу, как правило, приблизи-

тельно равно количеству фосфолипидов в неочищенном масле. Обычные периоды обработки составляют 30-60 мин. Стадия рафинирования гидратацией удаляет фосфатиды и клейкие смолы, которые становятся нерастворимыми в масле при гидрировании. Гидратированные фосфатиды и смолы могут быть отделены от масла путём осаждения, фильтрования или центрифугирования - на практике центрифугирование более распространено. Главная цель в указанном процессе рафинирования гидратацией заключается в отделении гидратированных фосфатидов от масла. Смешивание горячей воды с маслом, описанной выше, в данном описании должно пониматься в широком смысле как смешивание водного раствора с маслом в соответствии со стандартными процедурами рафинирования гидратацией в данной области техники.

В общепринятом способе рафинирования гидратацией основную часть фосфатидов удаляют в высококипящую смоляную фазу. В конце способа рафинирования гидратацией масляную фазу отделяют от смоляной фазы. Хотя смоляная фаза может быть дополнительно переработана в коммерческие продукты, по сути, она рассматривается как побочный продукт рафинирования масла. Именно масляная фаза является коммерчески важной. Однако, так как фосфатиды могут быть хорошими эмульгаторами, некоторое количество масла неизменно теряется в смоляной фазе в процессе рафинирования гидратацией. Это ведёт к сниженным выходам масла в масляной фазе после рафинирования гидратацией.

С повышением цены на масло и увеличением необходимости в растительном масле для биодизельного топлива важно оптимизировать переработку пищевых масел для получения более высоких выходов масла.

Краткое изложение аспектов настоящего изобретения

Аспекты настоящего изобретения представлены в пунктах формулы изобретения и в следующих комментариях.

Неожиданно было найдено, что добавлением одной или большего количества липидацилтрансфераз к неочищенному пищевому маслу в процессе или до проведения способа рафинирования гидратацией выход масла в масляной фазе может быть существенно увеличен. Другими словами, потери масла в смоляной фазе могут быть существенно снижены.

Кроме того, неожиданно было найдено, что при добавлении одной или большего количества липидацилтрансфераз к неочищенному пищевому маслу в процессе или до проведения способа рафинирования гидратацией полученная смоляная фаза является значительно менее вязкой. Это может обеспечить более удобные параметры для центрифугирования.

Также неожиданно было найдено, что при добавлении одной или большего количества липидацилтрансфераз к неочищенному пищевому маслу в процессе или до проведения способа рафинирования гидратацией смоляная фаза, полученная из этого способа, может инкубироваться или храниться и (благодаря остаточной активной липидацилтрансферазе) может наблюдаться дополнительный гидролиз фосфолипидов в смоляной фазе. Затем изобретатели обнаружили, что далее можно выделить масляную фазу, содержащую свободные жирные кислоты (кислое масло) и остаточные триглицериды в смоляной фазе. Это кислое масло может продаваться за большую цену, чем нормальная смоляная фаза, которую добавляют в еду. Кроме того, неожиданно было найдено, что оставшаяся твёрдая фаза (после отделения кислого масла) имеет более высокий уровень фосфора, чем нормальная смола и, таким образом, может быть использована как источник органического фосфора.

Также неожиданно было найдено, что комбинирование ферментов одной или большего количества липидацилтрансфераз и одной или большего количества фосфолипаз C (PLC) приводит к синергетическим эффектам при применении в рафинировании пищевых масел (например, растительных масел).

Детальные аспекты настоящего изобретения

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения обеспечивается способ рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно неочищенного пищевого масла), который включает следующие стадии:

- а) смешивание приблизительно 0,1-5% мас./мас. воды с пищевым маслом (предпочтительно неочищенным пищевым маслом) и липидацилтрансферазой;
- б) энергичное перемешивание смеси в течение от приблизительно 10 до 180 мин при температуре от приблизительно 45 до приблизительно 90°C и
- с) разделение масляной фазы и смоляной фазы.

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения обеспечивается применение липидацилтрансферазы в процессе рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно в процессе рафинирования гидратацией неочищенного пищевого масла) для увеличения выхода масла в масляной фазе после завершения процесса рафинирования гидратацией.

В соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения обеспечивается применение липидацилтрансферазы в процессе рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно в процессе рафинирования гидратацией неочищенного пищевого масла) для уменьшения вязкости смоляной фазы после завершения процесса рафинирования гидратацией.

Увеличение в выходе и/или уменьшение в вязкости происходит в сравнении с масляной фазой и/или смоляной фазой сравнимого масла, рафинированного (или рафинированного гидратацией или ферментативно рафинированного гидратацией) без применения липидацилтрансферазы.

В соответствии с четвёртым аспектом настоящего изобретения обеспечивается способ рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно неочищенного пищевого масла), который включает следующие стадии:

- а) смешивание приблизительно 0,1-5% мас./мас. воды с пищевым маслом (предпочтительно неочищенным пищевым маслом) и липидацилтрансферазой;
- б) энергичное перемешивание смеси в течение от приблизительно 10 до 180 мин при температуре от приблизительно 45 до приблизительно 90°C;
- с) разделение масляной фазы и смоляной фазы;
- д) инкубирование смоляной фазы, включающей активный липидацилтрансферазный фермент в течение от минимум приблизительно 2 ч до максимум 7 дней (предпочтительно до приблизительно 1-2 дней) и
- е) отделение (например, путём центрифугирования) масла от смоляной фазы.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способ обработки смоляной фазы (предпочтительно получаемой или полученной после рафинирования, например рафинирования гидратацией или ферментативного рафинирования или их комбинации, пищевого масла), где смоляную фазу инкубируют с одним или большим количеством (активных) липидацилтрансферазных ферментов (отдельно или в комбинации с одним или большим количеством фосфолипазных С ферментов) в течение от минимум приблизительно 2 ч до максимум 7 дней (предпочтительно до приблизительно 1-2 дней) и отделяют (например, путём центрифугирования) масло от смоляной фазы.

Настоящее изобретение ещё дополнительно обеспечивает применение липидацилтрансферазы (отдельно или в комбинации с фосфолипазой С) в инкубировании смоляной фазы (получаемой или полученной после рафинирования, например рафинирования гидратацией или ферментативного рафинирования или их комбинации, пищевого масла) для увеличения выхода масла и/или производства твёрдой фазы (после отделения кислого масла) с более высоким уровнем фосфора, чем в нормальной смоле.

Применение фермента(ов) увеличивает ценность кислого масла в сравнении со смолой, так как кислое масло может быть использовано для получения жирных кислот. Жирная кислота имеет более высокую ценность, чем смола, которую в противном случае добавляют в еду.

Улучшения и/или увеличения наблюдаются в сравнении со смоляной фазой, которая не была обработана липидацилтрансферазой (отдельно или в комбинации с фосфолипазой С).

Подходяще один или большее количество липидацилтрансферазных ферментов в смоляной фазе могут иметь остаточный активный фермент, который может быть перенесён в смоляную фазу после ферментативного рафинирования пищевого масла. Альтернативно, к смоляной фазе может быть добавлен липидацилтрансферазный фермент, липидацилтрансфераза, где фермент может быть добавлен в начале или в процессе инкубации смоляной фазы.

В особенности масло в конце процесса в четвёртом аспекте (и других обработок смоляной фазы) представляет собой "кислое масло". Это кислое масло может продаваться за большую цену, чем нормальная смоляная фаза, которую добавляют в еду. Оставшуюся смоляную фазу (после отделения кислого масла) иногда называют твёрдой фазой. Неожиданно было найдено, что оставшаяся твёрдая фаза (после отделения кислого масла) имеет более высокий уровень фосфора, чем нормальная смола и, таким образом, может быть использована как источник органического фосфора.

Предпочтительно смоляная фаза может быть инкубирована с липидацилтрансферазой (или отдельно, или с одним или большим количеством фосфолипазных С ферментов) при температуре от приблизительно 30 до приблизительно 10°C, предпочтительно от приблизительно 40 до приблизительно 60°C, предпочтительно от приблизительно 40 до приблизительно 50°C, предпочтительно от приблизительно 40 до приблизительно 45°C.

Предпочтительно смоляная фаза, полученная из ферментативного рафинирования гидратацией неочищенного масла с липидацилтрансферазой, может быть инкубирована при температуре от приблизительно 30 до приблизительно 70°C, предпочтительно от приблизительно 40 до приблизительно 60°C, предпочтительно от приблизительно 40 до приблизительно 50°C, предпочтительно от приблизительно 40 до приблизительно 45°C.

Преимущественно липидацилтрансфераза представляет собой такую, которая классифицирована Номенклатурной классификацией ферментов (Е.С. 2.3.1.43).

В одном варианте воплощения предпочтительно липидацилтрансферазу используют в комбинации с фосфолипазой С (Е.С. 3.1.4.3).

В одном предпочтительном варианте воплощения липидацилтрансферазу (Е.С. 2.3.1.43) используют в комбинации с фосфолипазой С (Е.С. 3.1.4.3).

Поэтому в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения обеспечивается способ рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно неочищенного пищевого масла), который включает следующие стадии:

- а) смешивание приблизительно 0,1-5% мас./мас. воды с пищевым маслом (предпочтительно неочищенным пищевым маслом) и комбинацией липидацилтрансферазы и фосфолипазы С;
- б) энергичное перемешивание смеси в течение от приблизительно 10 до приблизительно 180 мин

при температуре от приблизительно 45 до приблизительно 90°C и

с) разделение масляной фазы и смоляной фазы.

Не желая связываться теорией, неожиданно было найдено, что липидацилтрансфераза может использовать диглицерид (полученный с помощью реакции фосфолипазы С) как акцепторную молекулу для получения триглицерида. Таким образом, когда липидацилтрансферазу используют в комбинации с фосфолипазой С, взаимодействие между этими ферментами приводит к синергичному повышению количества триглицерида в масле, содержащем оба фермента, в сравнении с маслом, содержащим только один любой фермент, или в сравнении с маслом, не содержащим никакого фермента. Предпочтительно, когда липидацилтрансферазу используют в комбинации с фосфолипазой С, взаимодействие между этими ферментами приводит к синергичному уменьшению количества диглицеридов в масле, содержащем оба фермента, в сравнении с маслом, содержащим только один любой фермент, или в сравнении с маслом, не содержащим никакого фермента. Когда липидацилтрансферазу используют в комбинации с фосфолипазой С, взаимодействие между этими ферментами приводит к синергичному увеличению выхода масла в масле, содержащем оба фермента, в сравнении с маслом, содержащим только один любой фермент, или в сравнении с маслом, не содержащим никакого фермента.

Применение комбинации этих ферментов имеет значительные преимущества перед применением только фосфолипазы С, так как накопление диглицеридов в масле (которое может происходить, когда используют только фосфолипазу С) может быть вредным для масла, потому что это может иметь негативное влияние на "температуру образования копоти" масла и/или может иметь негативное влияние на кристаллизационные свойства источников более насыщенных жиров.

Следовательно, в настоящем изобретении другое преимущество применения липидацилтрансфераз (в частности, в комбинации с фосфолипазой С) заключается в том, что количество диглицеридов в масле может быть уменьшено по сравнению с аналогичным маслом без липидацилтрансферазы и/или особенно по сравнению с аналогичным маслом, обработанным только фосфолипазой С.

В другом аспекте настоящего изобретения обеспечивается применение липидацилтрансферазы в комбинации с фосфолипазой С в процессе рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно в процессе рафинирования гидратацией неочищенного пищевого масла) для увеличения выхода масла и/или для увеличения уровней триглицеридов в масляной фазе после завершения процесса рафинирования гидратацией и/или для уменьшения уровня диглицеридов в масляной фазе после завершения процесса рафинирования гидратацией.

В соответствии с ещё одним другим аспектом настоящего изобретения обеспечивается применение липидацилтрансферазы в комбинации с фосфолипазой С в процессе рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно в процессе рафинирования гидратацией неочищенного пищевого масла) для уменьшения вязкости смоляной фазы после завершения процесса рафинирования гидратацией.

Эти увеличения и/или уменьшения наблюдаются при сравнении со сравниваемым рафинированным пищевым маслом, которое не было обработано липидацилтрансферазой в комбинации с фосфолипазой С.

В основном увеличении и/или уменьшения, оговоренные выше, наблюдаются при сравнении со сравниваемым способом или сравниваемым маслом, которое не было обработано липидацилтрансферазой (или только ею или в комбинации с фосфолипазой С).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения обеспечивается способ рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно неочищенного пищевого масла), который включает следующие стадии:

- а) смешивание приблизительно 0,1-5% мас./мас. воды с пищевым маслом (предпочтительно неочищенным пищевым маслом) и липидацилтрансферазы в комбинации с фосфолипазой С;
- б) энергичное перемешивание этой смеси в течение от приблизительно 10 до приблизительно 180 мин при температуре от приблизительно 45 до приблизительно 90°C;
- с) разделение масляной фазы и смоляной фазы;
- д) инкубирование смоляной фазы, содержащей активную липидацилтрансферазу, в течение от минимум приблизительно 2 ч до максимум 7 дней (предпочтительно до приблизительно 1-2 дней) и
- е) отделение (например, путём центрифугирования) масла от смоляной фазы.

Когда фермент, разлагающий фосфолипиды (предпочтительно липидацилтрансферазу), используют в комбинации с фосфолипазой С, фосфолипаза С может быть добавлена до, в то же время или после добавления липидацилтрансферазного фермента.

В одном варианте воплощения предпочтительно фосфолипазу С добавляют к липидацилтрансферазе.

Неожиданно было найдено, что применение комбинации липидацилтрансферазы и фосфолипазы С значительно увеличивает выход масла в масляной фазе после завершения процесса рафинирования гидратацией.

Не желая связываться теорией, предполагают, что фосфолипаза С гидролизует фосфолипид (например, фосфатидилхолин) до диглицеридов (например, 1,2-диацилглицерин) и фосфатного остатка (например, холинфосфат) и липидацилтрансфераза затем переносит жирную кислоту на диглицерид, образованный с помощью фосфолипазы С, таким образом образуя больше триглицеридов и увеличивая вы-

ход масла. Этот эффект приводит к синергетическому (т.е. предпочтительно больше, чем к аддитивному) увеличению выхода масла.

В одном варианте воплощения предпочтительно способ рафинирования пищевого масла и/или применение в соответствии с настоящим изобретением могут быть выполнены при температуре в интервале приблизительно 45-90°C, предпочтительно приблизительно 45-70°C.

В другом варианте воплощения предпочтительно способ рафинирования пищевого масла и/или применение в соответствии с настоящим изобретением могут быть выполнены при температуре выше приблизительно 44°C, более предпочтительно выше приблизительно 45°C, более предпочтительно выше приблизительно 50°C.

В другом варианте воплощения предпочтительно способ и/или применение в соответствии с настоящим изобретением могут быть выполнены при температуре ниже приблизительно 60°C, предпочтительно ниже приблизительно 65°C, предпочтительно ниже приблизительно 70°C.

В одном варианте воплощения предпочтительно способ и/или применение в соответствии с настоящим изобретением могут быть выполнены при температуре в интервале приблизительно 45-70°C, предпочтительно в интервале приблизительно 45-68°C, более предпочтительно в интервале приблизительно 50-65°C.

Соответственно, температура масла и/или воды может составлять желательную температуру реакции при смешивании с ферментом.

Масло и/или вода могут быть нагреты и/или охлаждены до желательной температуры до и/или в процессе добавления фермента. Поэтому в одном варианте воплощения предполагают, что дополнительная стадия способа в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой охлаждение и/или нагревание масла и/или воды.

Предпочтительно содержание воды для способа в соответствии с настоящим изобретением может составлять приблизительно 0,1-4% мас./мас., более предпочтительно приблизительно 0,1-3% мас./мас., более предпочтительно приблизительно 0,5-3% мас./мас.

В одном варианте воплощения содержание воды для способа в соответствии с настоящим изобретением может составлять приблизительно 1-3% мас./мас.

В одном варианте воплощения содержание воды для способа в соответствии с настоящим изобретением может составлять меньше чем приблизительно 3% мас./мас., предпочтительно меньше чем приблизительно 2%.

В одном варианте воплощения содержание воды для этого способа может составлять меньше чем 1%. Уменьшение количества воды меньше чем приблизительно до 1% может приводить к значительному финансовому преимуществу в способе рафинирования гидратацией. Поэтому возможность уменьшения количества воды меньше чем приблизительно до 1% может привести к значительным сокращениям затрат.

Соответственно, время реакции (т.е. период времени, в течение которого смесь перемешивают) может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 180 мин, предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 180 мин, более предпочтительно от приблизительно 15 до 60 мин, даже более предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 35 мин.

В одном варианте воплощения предпочтительно время реакции может составлять от приблизительно 30 до приблизительно 180 мин, предпочтительно от приблизительно 30 до приблизительно 60 мин.

В одном варианте воплощения способ предпочтительно выполняют при выше приблизительно pH 4,5, при выше приблизительно pH 5 или при выше приблизительно pH 6.

Предпочтительно способ выполняют при pH от приблизительно 4,6 до приблизительно 10,0, более предпочтительно от приблизительно 5,0 до приблизительно 10,0, более предпочтительно от приблизительно 6,0 до приблизительно 10,0, более предпочтительно от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0, более предпочтительно от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,5 и даже более предпочтительно от приблизительно 5,5 до 6,0.

В одном варианте воплощения способ может быть выполнен при pH от приблизительно 5,3 до 8,3.

В одном варианте воплощения способ может быть выполнен при pH от приблизительно 6 до 6,5, предпочтительно приблизительно при 6,3.

Предпочтительно pH может быть нейтральным (pH приблизительно 5,0-7,0) в способах и/или применениях настоящего изобретения.

Предпочтительно обработка ферментом происходит в процессе рафинирования без корректировки pH масла и/или воды. Поэтому, как правило, pH будет составлять приблизительно 5,5-7,5. Это приводит к значительному преимуществу по сравнению со способами предыдущего уровня техники, используя фосфолипазные А ферменты, которые, как правило, являются высокоактивными только в кислых pH условиях, т.е. pH 4-5. Поэтому, как правило, в способах предыдущего уровня техники (например, используя фосфолипазные А ферменты) pH масла должен быть доведен до более кислых условий.

Кроме того, применение липидацитрансферазы с фосфолипазным С ферментом имеет значительное преимущество по сравнению с применением указанной фосфолипазы А с фосфолипазным С ферментом, так как оптимальный pH для липидацитрансфераз, как правило, совпадает значительно лучше с

оптимальным рН для фосфолипазных С ферментов. Поэтому в основном не происходит никакого "рН-конфликта", когда липидацилтрансферазы применяют в комбинации с фосфолипазными С ферментами. Это резко контрастирует с применением фосфолипазных А ферментов в комбинации с фосфолипазными С ферментами. Поэтому применение липидацилтрансфераз в комбинации с фосфолипазными С ферментами обеспечивает значительное улучшение, так как оба фермента могут работать в их оптимальном рН интервале или одновременно.

Разделение масляной фазы и смоляной фазы может быть выполнено с помощью любого общепринятого способа разделения. Предпочтительно разделение проводят с помощью центрифугирования.

Одно значительное преимущество применения липидацилтрансфераз (или отдельно, или предпочтительно в комбинации с фосфолипазным С ферментом) заключается в том, что ферментативная обработка дает возможность настроить центрифугу для контролирования количества фосфора в конечном масле. Не желая связываться теорией, это достижимо, потому что вязкость масла значительно снижена в сравнении с маслом, не обработанным липидацилтрансферазой (или отдельно, или предпочтительно в комбинации с фосфолипазным С ферментом). Это значительное преимущество по сравнению со способами предыдущего уровня техники. Как правило, в общепринятых способах рафинирования центрифугирование приводит к получению уровня фосфора в масле приблизительно 50 ppm. Фактически, технические характеристики для уровня фосфора в пищевом масле регламентируют, что он должен быть меньше чем 200 ppm. В действительности, оптимально иметь масла с уровнем фосфора как можно более близким к уровню 200 ppm. Применение липидацилтрансферазы (или отдельно, или предпочтительно в комбинации с фосфолипазным С ферментом) приводит к получению масла, которое может быть центрифугировано до уровня фосфора от приблизительно 100 до 200 ppm, предпочтительно приблизительно 170-190 ppm, более предпочтительно приблизительно 180 ppm. Установка центрифуги для получения этих уровней фосфора до настоящего изобретения была очень сложной и обеспечивает значительное улучшение настоящего изобретения.

Соответственно, вода может быть смешана с пищевым маслом, до или во время смешивания с ферментом. Альтернативно, пищевое масло и фермент могут быть смешаны до смешивания с водой.

В одном варианте воплощения масло, воду и фермент можно прокачивать в потоке одновременно или по сути одновременно через миксер и в бак выдержки.

Предпочтительно фермент может быть инактивирован в течение и/или в конце способа.

Фермент может быть инактивирован до или после разделения масляной фазы и смоляной фазы.

Предпочтительно фермент может быть инактивирован теплом путём нагревания в течение 10 мин при 75-85°C или при температуре выше 92°C.

В одном варианте воплощения предпочтительно фермент может быть не инактивирован в смоляной фазе. Таким образом, когда смоляную фазу собирают и инкубируют, фермент может дополнительно разлагать фосфолипиды в смоляной фазе. После продолжительной инкубации смоляной фазы может быть выполнено дополнительное разделение (например, с помощью центрифугирования) для того, чтобы получить ещё больше масла из смоляной фазы. Это ещё больше может увеличить выход масла.

Не желая связываться теорией, считают, что фермент разлагает фосфолипиды до свободных жирных кислот в смоляной фазе, таким образом высвобождая триацилглицерид, который до этого был эмульсирован с фосфолипидами. Это снижает вязкость смоляной фазы и позволяет разделить триацилглицериды и свободные жирные кислоты, например, с помощью центрифугирования.

В одном варианте воплощения предпочтительно способ настоящего изобретения может быть выполнен без добавления щёлочи, такой как, например, NaOH.

В другом варианте воплощения предпочтительно способ настоящего изобретения может быть выполнен в присутствии щёлочи, такой как, например, NaOH. Когда добавляют NaOH, предпочтительно её не добавляют в количестве, которое превышает приблизительно 0,2 мл (4% раствор) NaOH на 100 г масла.

Ферменты, подходящие для применения в способах и/или применениях данного изобретения, могут иметь липидацилтрансферазную активность, что определяют, используя "Исследование трансферазы (холестерин:фосфолипид) (TrU)", описанное ниже.

Определение трансферазной активности "Исследование трансферазы (холестерин:фосфолипид)" (TrU).

Субстрат: 50 мг холестерина (Sigma C8503) и 450 мг соевого фосфатидилхолина (PC), Avanti # 441601, растворяют в хлороформе и хлороформ выпаривают при 40°C в вакууме.

300 мг PC:холестерин 9:1 диспергируют при 40°C в 10 мл 50 mM HEPES буфера pH 7.

Ферментация:

250 мкл субстрата добавляют в стакан с крышкой при 40°C.

25 мкл раствора фермента добавляют и инкубируют при энергичном перемешивании в течение 10 мин при 40°C.

Добавленный фермент должен эстерифицировать 2-5% холестерина в данном исследовании.

Также анализируют контрольную пробу с 25 мкл воды вместо раствора фермента.

Через 10 мин добавляют 5 мл гексан:изопропанол 3:2.

Количество эстера холестерина анализируют с помощью ВЭТСХ, используя холестеринстеарат (Sigma C3549), стандарт для калибрования.

Трансферазную активность рассчитывают как количество образования эстера холестерина в минуту при условиях исследования.

Одна трансферазная единица (TrU) определяется как мкмоль эстера холестерина, получаемого в минуту при 40°C и pH 7 в соответствии с исследованием трансферазы, представленным выше.

Предпочтительно липидацилтрансфераза, используемая в способе и применениях настоящего изобретения, будет иметь специфическую трансферазную единицу (TrU) на 1 мг фермента по крайней мере 25 TrU/мг ферментного белка.

Преимущественно липидацилтрансфераза для применения в настоящем изобретении может дозироваться в количестве от 0,05 до 50 TrU на 1 г масла, предпочтительно в количестве от 0,5 до 5 TrU на 1 г масла.

Более предпочтительно ферменты, подходящие для применения в способах и/или применениях настоящего изобретения, обладают липидацилтрансферазной активностью, как определено с помощью протокола ниже.

Протокол для определения % ацилтрансферазной активности.

Пищевое масло, к которому добавляют липидацилтрансферазу в соответствии с настоящим изобретением, может быть экстрагировано после ферментативной реакции с $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 и органическую фазу, содержащую липидный материал, выделяют и анализируют с помощью ГЖХ и ВЭЖХ в соответствии с процедурой, детально описанной ниже. Из ГЖХ и ВЭЖХ анализов определяют количество свободных жирных кислот и одного или большего количества эстеров стерина/станола. Контрольное пищевое масло, к которому не добавляют никакого фермента в соответствии с настоящим изобретением, анализируют тем же способом.

Расчёты.

Из результатов ГЖХ и ВЭЖХ анализов может быть рассчитано увеличение в свободных жирных кислотах и эстерах стерина/станола:

Δ % жирной кислоты = % жирной кислоты (фермент) - % жирной кислоты (контроль);

Mv жирной кислоты = средняя молекулярная масса жирных кислот;

$A = \Delta$ % эстера стерина/Mv эстера стерина (где Δ % эстера стерина = % эстера стерина/станола (фермент) - % эстера стерина/станола (контроль) и Mv эстера стерина = средняя молекулярная масса эстеров стерина/станола).

Трансферазную активность рассчитывают как процент от общей ферментативной активности:

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

Если количество свободных жирных кислот в пищевом масле увеличивается, оно не увеличивается предпочтительно существенно, т.е. в значительной степени. Под этим авторы имеют в виду, что увеличение в количестве свободных жирных кислот не влияет негативно на качество пищевого масла.

Пищевое масло, используемое для исследования ацилтрансферазной активности, предпочтительно представляет собой соевое масло, дополненное растительным стеринном (1%) и фосфатидилхолином (2%), используя способ.

Растительный стерин и фосфатидилхолин растворяют в соевом масле путём нагревания до 95°C при перемешивании. Затем это масло охлаждают до 40°C и добавляют ферменты. Воду добавляют до общей концентрации 5% масляной фазы. Этот образец поддерживают при 40°C с перемешиванием на магнитной мешалке и образцы отбирают через 4 и 20 ч и анализируют с помощью ТСХ.

Для этого исследования используемая доза фермента составляет предпочтительно 0,2 TPU-K/г масла, более предпочтительно 0,08 TPU-K/г масла, предпочтительно 0,01 TPU-K/г масла. Уровень фосфолипидов, присутствующих в масле, и/или % превращения стерина предпочтительно определяют через 0,5, 1, 2, 4 и 20 ч, более предпочтительно через 20 ч.

Когда используемый фермент представляет собой липидацилтрансферазный фермент, предпочтительно время инкубирования является эффективным для обеспечения по крайней мере 5% трансферазной активности, предпочтительно по крайней мере 10% трансферазной активности, предпочтительно по крайней мере 15, 20, 25, 26, 28, 30, 40, 50, 60 или 75% трансферазной активности.

% трансферазной активности (т.е. трансферазная активность как процент от общей ферментативной активности) может быть определён протоколом, заданным выше.

В некоторых аспектах настоящего изобретения термин "без существенного увеличения количества свободных жирных кислот", как использовано в данном описании, означает, что количество свободной жирной кислоты в пищевом масле, обработанном с помощью липидацилтрансферазы в соответствии с настоящим изобретением, меньше, чем количество свободной жирной кислоты, полученное в пищевом масле, когда используют фермент, другой, чем липидацилтрансфераза, в соответствии с настоящим изобретением, например, в сравнении с количеством свободной жирной кислоты, полученным, когда ис-

пользуют обычный фосфолипазный фермент, например Lecitase Ultra® (Novozymes A/S, Denmark).

Кроме того, или вместо, может быть использовано оценивание % трансферазной активности в масле (выше), для определения липидацилтрансферазных ферментов, наиболее предпочтительных для использования в способах данного изобретения следуя исследованию, озаглавленному как "Протокол для определения липидацилтрансферазы для использования в настоящем изобретении".

Протокол для определения липидацилтрансферазы.

Липидацилтрансфераза в соответствии с настоящим изобретением представляет собой такую, которая приводит к:

i) удалению фосфолипида, присутствующего в соевом масле, дополненном растительным стеринем (1%) и фосфатидилхолином (2%) (используя способ: Растительный стерин и фосфатидилхолин растворяют в соевом масле путём нагревания до 95°C при перемешивании. Затем это масло охлаждают до 40°C и добавляют ферменты. Этот образец поддерживают при 40°C с перемешиванием на магнитной мешалке и образцы отбирают через 0,5, 1, 2, 4 и 20 ч и анализируют с помощью ТСХ); и/или

ii) превращению (% превращения) добавленного стерина в эстер стерина (используя способ, раскрытый в i) выше). Может быть использован способ ГЖХ для определения уровня стерина и эстера стерина, как описано в примере 2.

Для этого исследования используемая доза фермента может составлять предпочтительно 0,2 TPU-K/г масла, более предпочтительно 0,08 TPU-K/г масла, предпочтительно 0,01 TPU-K/г масла. Уровень фосфолипидов, присутствующих в масле, и/или превращение (% превращения) стерина предпочтительно определяют через 0,5, 1, 2, 4 и 20 ч, более предпочтительно через 20 ч.

В протоколе для определения липидацилтрансфераз, после ферментативной обработки, предпочтительно добавляют 5% воды и тщательно перемешивают с маслом. Затем это масло разделяют на масляную и водную фазу, используя центрифугирование (см. "Enzyme-catalyzed degumming of vegetable oils" Buchold, H. и Laurgi A.-G., Fett Wissenschaft Technologie (1993), 95(8), 300-4, ISSN: 0931-5985), и потом масляная фаза может быть проанализирована на содержание фосфора, используя следующий протокол ("Исследование содержания фосфора").

Исследование содержания фосфора.

Уровень фосфолипидов, присутствующих в масле после рафинирования гидратацией, определяют первым получением образца масла в соответствии с получением образца, раскрытым в AOAC Official Method 999.10 (>Lead, Cadmium, Zinc, Copper, and Iron in Foods Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion, First Action 1999 NMKL-AOAC Method). Количество фосфолипидов в масле затем измеряют путём анализа содержания фосфора в образце масла после рафинирования в соответствии с AOAC Official Method Ca 20-99: Analysis Phosphorus in oil by inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy.

Количество фосфора, присутствующего в масляной фазе после использования настоящего изобретения, как правило, не значительно отличается от содержания фосфора в масляной фазе после обычного рафинирования гидратацией (т.е. без фермента).

Выход масла, используя настоящее изобретение, в масляной фазе, используя настоящее изобретение, существенно повышается в сравнении с масляной фазой после использования обычного способа рафинирования гидратацией (т.е. без фермента). Предпочтительно способ и/или применение в соответствии с настоящим изобретением улучшают выход приблизительно на 0,25-7%, например приблизительно на 0,25-3%, или приблизительно 0,5-2%, или приблизительно 1-2% в сравнении с тем же маслом, которое подвергли тому же способу рафинирования гидратацией без добавления фермента.

Неожиданно было найдено, что добавление фермента в способ в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает значительно более высокий выход масла в масляной фазе без обязательного значительного уменьшения содержания фосфора в масляной фазе в сравнении со сравниваемой масляной фазой, полученной с использованием сравнительного способа рафинирования гидратацией, но без добавления фермента.

Соответственно, количество фосфора в масляной фазе, когда масло обработано в соответствии со способом или применением настоящего изобретения, может составлять на 0-80%, предпочтительно 0-50%, предпочтительно 0-10%, предпочтительно 0-1% меньше, чем содержание фосфора в масляной фазе, полученной с использованием сравнительного способа рафинирования гидратацией, но без добавления фермента.

В частности, масляная фаза, полученная в способе в соответствии с настоящим изобретением, может быть дополнительно рафинирована для удаления фосфатидов и/или фосфолипидов. Например, масляная фаза может подвергаться или ферментативному рафинированию и/или кислотному рафинированию.

% превращения стерина, присутствующего в масле, составляет по крайней мере 1%, предпочтительно по крайней мере 5%, предпочтительно по крайней мере 10%, предпочтительно по крайней мере 20%, предпочтительно по крайней мере 30%, предпочтительно по крайней мере 40%, предпочтительно по крайней мере 50%, предпочтительно по крайней мере 60%, предпочтительно по крайней мере 70%.

предпочтительно по крайней мере 80%, предпочтительно по крайней мере 90%, предпочтительно по крайней мере 95%.

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

В некоторых аспектах липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может включать GDSX мотив и/или GANDY мотив.

Предпочтительно фермент липидацилтрансфераза характеризуется как фермент, который обладает ацилтрансферазной активностью и который включает аминокислотный мотив GDSX, где X представляет собой один или более из следующих аминокислотных остатков: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S.

Предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу или липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, может быть получаемой, предпочтительно полученной, из организмов, выбранных из одного или более следующих родов: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfotobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* и *Candida*. Предпочтительно липидацилтрансфераза является получаемой, предпочтительно полученной, из организма рода *Aeromonas*.

В некоторых аспектах настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, кодирует липидацилтрансферазу, которая включает остаток аспарагиновой кислоты в положении, соответствующем N-80 в аминокислотной последовательности липидацилтрансферазы *Aeromonas salmonicida*, которая представлена как SEQ ID No. 35.

В некоторых аспектах настоящего изобретения липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая включает остаток аспарагиновой кислоты в положении, соответствующем N-80 в аминокислотной последовательности липидацилтрансферазы *Aeromonas salmonicida*, которая представлена как SEQ ID No. 35.

В дополнение или в качестве альтернативы, нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, кодирует липидацилтрансферазу, которая может включать аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 16, или аминокислотную последовательность, которая обладает 75% или более гомологией по отношению к ней. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу, кодирует липидацилтрансферазу, которая может включать аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 16.

В дополнение или в качестве альтернативы, нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, кодирует липидацилтрансферазу, которая может включать аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 68, или аминокислотную последовательность, которая обладает 75% или более гомологией по отношению к ней. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу, кодирует липидацилтрансферазу, которая может включать аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 68.

В одном воплощении липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No. 16 или SEQ ID No. 68, или имеет аминокислотную последовательность, которая обладает по крайней мере 75%-ной идентичностью с ней, предпочтительно по крайней мере 80%, предпочтительно по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 95%, предпочтительно по крайней мере 98% идентичностью с ней.

В одном варианте воплощения предпочтительно липидацилтрансфераза для применения в любом из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая экспрессируется в *Bacillus licheniformis* путём трансформирования указанного *B.licheniformis* нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID No. 1, или нуклеотидной последовательностью, имеющей по крайней мере 75% идентичность с ней (более предпочтительно по крайней мере 80%, более предпочтительно по крайней мере 85%, более предпочтительно по крайней мере 95%, более предпочтительно по крайней мере 98% идентичность с ней); культивирования указанного *B.licheniformis* и выделения липидацилтрансферазы (липидацилтрансфераз), полученной в нём.

Термин "пищевое масло", как использовано в данном описании, может включать растительные масла.

Предпочтительно пищевое масло до обработки в соответствии с настоящим изобретением представляет собой пищевое масло, которое включает негидратируемый фосфор с содержанием приблизительно 50-3000 ppm, более предпочтительно приблизительно 50-1400 ppm, более предпочтительно приблизительно 200-1400 ppm и даже более предпочтительно приблизительно 400-1200 ppm.

В одном аспекте неочищенное пищевое масло, до проведения способа настоящего изобретения,

имеет содержание фосфора выше 350 ppm, более предпочтительно выше 400 ppm, ещё более предпочтительно выше 500 ppm и наиболее предпочтительно выше 600 ppm.

Предпочтительно пищевое масло представляет собой растительное масло.

Масла, охватываемые способом в соответствии с настоящим изобретением, могут включать, но не ограничиваются указанными, одно или большее количество из таких как соевое масло, масло канолы, кукурузное масло, хлопковое масло, пальмовое масло, кокосовое масло, рисовое масло, арахисовое масло, оливковое масло, сафлоровое масло, пальмоядровое масло, рапсовое масло и подсолнечное масло.

Предпочтительно масло представляет собой одно или большее количество из таких как соевое масло, кукурузное масло, подсолнечное масло и рапсовое масло (иногда называется маслом канолы).

Более предпочтительно масло представляет собой одно или большее количество из таких как соевое масло, подсолнечное масло или рапсовое масло.

Наиболее предпочтительно масло представляет собой соевое масло.

Как использовано в данном описании, "неочищенное масло" (также называется в данном описании нерафинированным маслом) может представлять собой выжатое или экстрагированное масло или их смесь.

Содержание фосфатидов в сиром масле может изменяться от 0,5 до 3% мас./мас., что соответствует содержанию фосфора в интервале 200-1200 ppm, более предпочтительно в интервале 250-1200 ppm.

Помимо фосфатидов, неочищенное масло также может содержать небольшие концентрации углеводов, соединения сахаров и металл/фосфатидные кислотные комплексы Ca, Mg и Fe.

Преимущественно способ и применения настоящего изобретения могут рафинировать пищевые масла в средах с низким уровнем воды (<5%, предпочтительно меньше чем 2%, более предпочтительно меньше чем 1%). Поэтому рафинирование гидратацией может быть проведено с добавлением меньшего количества воды, чем при использовании обычного способа рафинирования гидратацией.

Дополнительное преимущество настоящего изобретения заключается в выработке эстеров стерина в масляной фазе.

Предпочтительно фермент может быть дозирован в интервале приблизительно 0,01-10 TIPIU-K/г масла, предпочтительно фермент может быть дозирован в интервале приблизительно 0,05-1,5 TIPIU-K/г масла, более предпочтительно 0,2-1 TIPIU-K/г масла.

Когда фермент представляет собой липидацилтрансферазу, предпочтительно она может быть дозирована в интервале от приблизительно 0,01 до 5 TIPIU-K единиц/г масла. В одном варианте воплощения липидацилтрансфераза может быть дозирована в интервале от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 TIPIU-K единиц/г масла, более предпочтительно липидацилтрансфераза может быть дозирована в интервале от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 TIPIU-K единиц/г масла, более предпочтительно липидацилтрансфераза может быть дозирована в интервале от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,3 TIPIU-K единиц/г масла.

Когда фермент представляет собой фосфолипазу, предпочтительно она может быть дозирована в интервале приблизительно 0,5-10 TIPIU-K единиц/г масла. В одном варианте воплощения фосфолипаза может быть дозирована в интервале приблизительно 0,5-5 TIPIU-K единиц/г масла, предпочтительно фосфолипаза может быть дозирована в интервале приблизительно 0,5-1,5 TIPIU-K единиц/г масла. Предпочтительно фосфолипаза может быть дозирована в интервале приблизительно 1,0-3 TIPIU-K единиц/г масла.

Фосфолипазная активность, TIPIU-K.

Субстрат: 1,75% L-растительного фосфатидилхолина 95% (441601, Avanti Polar Lipids), 6,3% Тритона X-100 (# T9284, Sigma) и 5 mM CaCl₂ растворяют в 0,05 mM HEPES буфере pH 7,0.

Процедура исследования: Образцы, калибровочные растворы и контроль разводят в 10 mM HEPES pH 7,0, 0,1% Тритона X-100 (# T9284, Sigma). Анализ проводят, используя автоанализатор Конелаба (Konelab Autoanalyzer) (Thermo, Finland). Исследование проводят при 30°C. 34 мкл субстрата термостатируют в течение 180 с перед добавлением 4 мкл образца. Ферментация длится 600 с. Количество свободной жирной кислоты, высвобожденной в процессе ферментации, измеряют, используя NEFA C набор (999-75406, WAKO, Germany). 56 мкл NEFA A добавляют и смесь инкубируют в течение 300 с. После этого 113 мкл NEFA B добавляют и смесь инкубируют в течение 300 с. Затем измеряют ОП (оптическая плотность) 520 нм. Ферментную активность (мкмоль FFA/мин·мл) рассчитывают в пересчёте на стандартный ферментный препарат.

Ферментную активность TIPIU-K рассчитывают как микромоли свободной жирной кислоты (FFA), полученные в минуту в условиях исследования.

В настоящем изобретении способ предпочтительно не представляет собой способ щелочной нейтрализации (т.е. не способ кислотного рафинирования гидратацией и/или не способ кислотного-щелочного рафинирования). Другими словами, способ предпочтительно не включает добавление кислот (таких как фосфорная, лимонная, аскорбиновая, серная, фумаровая, малеиновая, соляная и/или уксусная кислоты) или щелочей (таких как КОН и NaOH) или не включает добавление существенных количеств кислот или щелочей. Другими словами, если в способе настоящего изобретения добавляют кислоты и/или щёлочи, их добавляют менее чем при 0,004%.

Для удобства поиска, эти и дополнительные аспекты настоящего изобретения далее раскрыты под соответствующими заголовками разделов. Однако информация в каждом разделе не обязательно ограничивается каждым определённым разделом.

Фосфолипаза С.

Как описано выше, фермент, разлагающий фосфолипиды (предпочтительно липидацилтрансфераза), может быть использован в комбинации с фосфолипазой С (Е.С. 3.1.4.3).

Фосфолипаза С может представлять собой любой доступный фосфолипазный С фермент и может быть выбрана из одного или больше из следующих фосфолипазных С ферментов: Purifine® (имеется в наличии у Verenium, US); фосфолипаза С из *Clostridium perfringens* (такая как фосфолипаза С, имеющаяся в наличии у Sigma, Ref P7633); фосфолипаза С из *Bacillus cereus* (такая как фосфолипаза С, имеющаяся в наличии у Sigma, Ref P6621); фосфолипазный С фермент, описанный в WO 2008/036863 (включённом в данное описание путём ссылки).

Преимущества.

Одно преимущество настоящего изобретения заключается в том, что в конце способа рафинирования гидратацией получают повышенный выход масла. Повышение в выходе масла сравнивают с аналогичным способом рафинирования гидратацией, но без добавления фермента в соответствии с настоящим изобретением.

Не желая связываться теорией, повышенный выход может быть благодаря уменьшенному эмульгирующему эффекту, что вызывается удалением фосфолипидов в смоляную фазу. Фосфолипиды являются хорошими эмульгаторами и могут быть эмульгированы с триацилглицеридами, таким образом, когда фосфолипиды удаляют в смоляную фазу, некоторое количество масла в форме триацилглицерида (масло) также удаляют. Уменьшение в вязкости смоляной фазы благодаря деградации фосфолипидов помогает предотвратить потерю масла в смоляной фазе (так как разделение смоляной фазы и масла значительно проще).

Кроме того или альтернативно (не желая связываться теорией), когда липидацилтрансферазу используют в соответствии с настоящим изобретением, эстеры стерина образуют путём переноса остатка жирной кислоты от фосфолипидов к стерину. Этот остаток жирной кислоты, эстерифицированный до стерина с помощью липидацилтрансферазной ферментной реакции, найден в масляной фазе и не выявляется в смоляной фазе. В обычных способах рафинирования гидратацией (без добавления липидацилтрансферазы) эти остатки жирной кислоты теряются, переходя в смоляную фазу.

Дополнительное преимущество настоящего изобретения заключается в том, что, когда используют липидацилтрансферазу, нет необходимости корректировать pH в способе рафинирования гидратацией (от приблизительно pH 5,0 или 5,5 до приблизительно pH 6,5 или 7). Этот pH приводит к получению высокой реакционной способности липидацилтрансферазы.

Другое преимущество настоящего изобретения при применении липидацилтрансферазы заключается в том, что жирная кислота от фосфолипидов переносится на стерин с образованием эстеров стерина. Это само по себе может способствовать получению от 0,1 до 0,15% увеличения в выходе в масляной фазе.

Дополнительное преимущество настоящего изобретения (в частности, при применении липидацилтрансферазы) заключается в том, что смоляная фаза является менее вязкой в сравнении со смоляной фазой из аналогичного способа рафинирования гидратацией, но без добавления фермента в соответствии с настоящим изобретением. Более низкая вязкость в смоляной фазе приводит к тому, что она легче отделяется от масляной фазы, т.е. путём центрифугирования.

Кроме того, смоляная фаза может иметь более низкое содержание воды, следовательно, она может быть легче высушена.

Ещё одно дополнительное преимущество настоящего изобретения заключается в том, что получается сниженная концентрация триглицеридов в смоляной фазе.

Способ настоящего изобретения может приводить к уменьшенному засорению отложениями на оборудовании для переработки. Это означает, что очищение оборудования может быть легче.

Не желая связываться теорией, неожиданно было найдено, что липидацилтрансфераза может использовать диглицерид (полученный реакцией фосфолипазы С) как акцепторную молекулу для получения триглицерида. Таким образом, когда липидацилтрансферазу используют в комбинации с фосфолипазой С, взаимодействие между этими ферментами приводит к синергетичному увеличению количества триглицерида в масле, содержащем оба фермента, в сравнении с аналогичным маслом, содержащим только любой фермент, или с аналогичным маслом, не содержащим никакого фермента. Когда липидацилтрансферазу используют в комбинации с фосфолипазой С, взаимодействие между этими ферментами приводит к синергетичному увеличению выхода масла в масле, содержащем оба фермента, в сравнении с аналогичным маслом, содержащим только любой фермент, или с аналогичным маслом, не содержащим никакого фермента.

Применение комбинации этих ферментов имеет значительные преимущества по сравнению с применением только фосфолипазы С, так как накопление диглицеридов в масле (которое может происходить, когда используют только фосфолипазу С) может быть вредным для масла, потому что это может

иметь негативный эффект на "температуру образования копоти" масла и/или может иметь негативный эффект на кристаллизационные свойства источников более насыщенных жиров.

Следовательно, в настоящем изобретении другое преимущество применения липидацилтрансфераз (в частности, в комбинации с фосфолипазой С) заключается в том, что количество диглицерида в масле может быть уменьшено по сравнению с аналогичным маслом без липидацилтрансферазы и/или особенно по сравнению с аналогичным маслом, обработанным только фосфолипазой С.

Применение фермента(ов) в соответствии с настоящим изобретением может уменьшить количество воды, необходимой в способе, меньше чем приблизительно до 1%. Это может привести к значительному финансовому преимуществу в способе рафинирования гидратацией. Поэтому возможность уменьшения количества воды меньше чем приблизительно до 1% может привести к значительным сокращениям затрат.

Предпочтительно обработка ферментом происходит в процессе рафинирования без корректировки рН масла и/или воды. Это приводит к значительному преимуществу по сравнению со способами предыдущего уровня техники, используя фосфолипазные А ферменты, которые, как правило, являются высококоактивными только в кислых рН условиях. Поэтому, как правило, в способах предыдущего уровня техники (например, используя фосфолипазные А ферменты) рН масла должен быть доведен до и/или при проведении процесса рафинирования. В настоящем изобретении в этом нет необходимости.

Кроме того, применение липидацилтрансферазы в комбинации с фосфолипазным С ферментом имеет значительное преимущество по сравнению с применением указанной фосфолипазы А с фосфолипазным С ферментом, так как оптимальный рН для липидацилтрансфераз, как правило, совпадает значительно лучше с оптимальным рН для фосфолипазных С ферментов. Поэтому в основном не происходит никакого "рН-конфликта", когда липидацилтрансферазы применяют в комбинации с фосфолипазными С ферментами. Это резко контрастирует с применением фосфолипазных А ферментов в комбинации с фосфолипазными С ферментами. Поэтому применение липидацилтрансфераз в комбинации с фосфолипазными С ферментами обеспечивает значительное улучшение, так как оба фермента могут работать в их оптимальном рН интервале или одновременно.

В особенности в способе, который включает обработку смоляной фазы с помощью липидацилтрансферазы (или отдельно, или в комбинации с фосфолипазой С), "кислое масло", полученное в конце этого способа, может продаваться за более высокую цену, чем нормальная смоляная фаза, которую добавляют в еду. Кроме того, неожиданно было найдено, что оставшаяся смоляная фаза (после отделения кислого масла) имеет более высокий уровень фосфора, чем нормальная смоляная фаза и, таким образом, может быть использована как источник органического фосфора.

Хозяйская клетка.

Хозяйский организм может представлять собой прокариотический или эукариотический организм.

В одном воплощении настоящего изобретения липидацилтрансфераза в соответствии с настоящим изобретением экспрессируется в хозяйской клетке, например бактериальных клетках, таких как *Bacillus spp.*, например в хозяйской клетке *Bacillus licheniformis*.

Альтернативные хозяйские клетки могут представлять собой, например, грибы, дрожжи или растения.

Было обнаружено, что применение хозяйской клетки *Bacillus licheniformis* приводит к повышенной экспрессии липидацилтрансферазы по сравнению с другими организмами, такими как *Bacillus subtilis*.

Липидацилтрансфераза из *Aeromonas salmonicida* была встроена в ряд традиционных экспрессионных векторов, предназначенных для оптимальной экспрессии в *Bacillus subtilis*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Aspergillus tubigensis* соответственно. Однако очень низкие уровни определялись также в *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Aspergillus tubigensis*. Уровни экспрессии были ниже 1 мкг/мл, и не было возможности отобрать клетки, которые вырабатывают достаточное количество белка для начала коммерческого получения (результаты не представлены). В отличие от этого, *Bacillus licheniformis* является способным продуцировать уровни белка, которые являются привлекательными для экономически рентабельного производства.

В частности, было обнаружено, что экспрессия в *B.licheniformis* является приблизительно в 10 раз большей, чем экспрессия в *B.subtilis* под контролем *argE* промотора, или является приблизительно в 100 раз большей, чем экспрессия в *S.lividans* под контролем промотора A4 и слитого с целлюлозой (результаты не представлены в данном описании).

Хозяйская клетка может представлять собой клетку *Bacillus*, отличную от *B.subtilis*. Предпочтительно, когда указанная хозяйская клетка *Bacillus* принадлежит к одному из следующих видов: *Bacillus licheniformis*; *B.alkalophilus*; *B.amyloliquefaciens*; *B.circulans*; *B.clausii*; *B.coagulans*; *B.firmus*; *B.lautus*; *B.lentus*; *B.megaterium*; *B.pumilus* или *B.stearothermophilus*.

Термин "хозяйская клетка" в отношении настоящего изобретения включает любую клетку, которая включает либо нуклеотидную последовательность, кодирующую липидацилтрансферазу, как определено в данном описании, либо экспрессионный вектор, как определено в данном описании и который используется в рекомбинантном получении липидацилтрансферазы, обладающей специфическими свойствами, как определено в данном описании.

Предпочтительно хозяйская клетка может быть дефектной по протеазе или представлять собой штамм протеаза минус и/или быть дефектной по α -амилазе или представлять собой штамм α -амилаза минус.

Термин "гетерологичный", как используется в данном описании, означает последовательность, которая имеет происхождение от отличного генетического источника или видов. Гетерологичная последовательность представляет собой нехозяйскую последовательность, модифицированную последовательность, последовательность из отличного штамма хозяйской клетки или гомологичную последовательность из другого участка хромосомы хозяйской клетки.

"Гомологичная" последовательность представляет собой последовательность, которая обнаружена в том же генетическом источнике или видах, т.е. является существующей в природе в релевантных видах хозяйской клетки.

Термин "рекомбинантная липидацилтрансфераза", как используется в данном описании, означает, что липидацилтрансфераза была получена с помощью генетической рекомбинации. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу, встраивали в клонирующий вектор, что приводило к получению клетки *B.licheniformis*, характеризующейся присутствием гетерологичной липидацилтрансферазы.

Регуляторные последовательности.

В некоторых применениях последовательность липидацилтрансферазы для использования в способах и применениях настоящего изобретения может быть получена путем оперативного связывания нуклеотидной последовательности, кодирующей ту же регуляторную последовательность, которая является способной обеспечить экспрессию нуклеотидной последовательности, что и выбранной хозяйской клеткой (такой клетки, как *B.licheniformis*).

В качестве примера, может использоваться вектор, включающий нуклеотидную последовательность настоящего изобретения, оперативно связанную с такой регуляторной последовательностью, т.е. вектор, который представляет собой экспрессионный вектор.

Термин "оперативно связанный" относится к размещенным рядом компонентам, где описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать в соответствии с предназначенным способом. Регуляторная последовательность, "оперативно связанная" с кодирующей последовательностью, лигируется таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается при условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

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

Термин "промотор" используется в обычном смысле, как принято в данной области техники, например, сайт связывания РНК-полимеразы.

Улучшенная экспрессия нуклеотидной последовательности, кодирующей фермент, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, может также быть достигнута с помощью селекции регуляторных участков, например промотора, лидерных и терминаторных участков секции, которые не являются регуляторными участками для нуклеотидной последовательности, кодирующей фермент в природе.

Предпочтительно нуклеотидная последовательность настоящего изобретения может быть оперативно связана, по крайней мере, с промотором.

Предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу, может быть оперативно связанной с нуклеотидной последовательностью, кодирующей последовательность терминатора. Примеры приемлемых последовательностей терминатора для использования в каком-либо из векторов, хозяйских клеток, способов и/или применений настоящего изобретения включают:

последовательность терминатора α -амилазы (например, CGGGACTTACCGAAAGAAACCAT-CAATGATGGTTTCTTTTTGTTTCATAAA - SEQ ID No. 64),

последовательность терминатора щелочной протеазы (например, CAAGACTAAA-GACCGTTCGCGGTTTTGCAATAAGCGGGCGAATCTTACATAAAAATA - SEQ ID No. 65),

последовательность терминатора, специфического для глутаминовой кислоты (например, ACGGCCGTTAGATGTGACAGCCCGTTCCAAAAGGAAGCGGGCTGTCTTCGTGTATTATTGT - SEQ ID No. 66),

последовательность терминатора леваназы (например, TCTTTTAAAG-GAAAGGCTGGAATGCCCGGCATTCCAGCCACATGATCATCGTTT - SEQ ID No. 67) и

последовательность терминатора субтилина Е (например, GCTGACAAATAAAAAGAAG-CAGGTATGGAGGAACCTGCTTCTTTTACTATTATTG).

Предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу, может быть оперативно связана с терминатором α -амилазы, таким как терминатор α -амилазы *B.licheniformis*.

Промотор.

Последовательность промотора, которая используется в соответствии с настоящим изобретением, может быть гетерологичной или гомологичной последовательности, кодирующей липидацилтрансфера-

зу.

Последовательность промотора может представлять собой последовательность промотора, способную направлять экспрессию липидацилтрансферазы в выбранной хозяйской клетке.

Предпочтительно последовательность промотора может быть гомологичной для видов *Bacillus*, например *B.licheniformis*. Предпочтительно последовательность промотора является гомологичной выбранной хозяйской клетке.

Предпочтительно последовательность промотора может быть гомологичной хозяйской клетке. "Гомологичная хозяйской клетке" означает такую, которая имеет происхождение от хозяйского организма; т.е. последовательность промотора, которая обнаружена в природе в хозяйском организме.

Предпочтительно последовательность промотора может быть выбрана из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности, кодирующей промотор α -амилазы, промотор протеазы, промотор субтилизина, промотор протеазы, специфической для глутаминовой кислоты, и промотор левансахаразы.

Предпочтительно последовательность промотора может представлять собой нуклеотидную последовательность, кодирующую LAT (например, промотор α -амилазы из *B.licheniformis*, также известный как AmyL), AprL (например, промотор субтилизина Карлсберга), EndoGluC (например, промотор, специфический для глутаминовой кислоты из *B.licheniformis*), AmyQ (например, промотор α -амилазы из *B.amyloliquefaciens*) и SacB (например, промотор левансахаразы *B.subtilis*).

Другие примеры промоторов, приемлемых для направления транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты в способах настоящего изобретения, включают промотор гена щелочной протеазы *Bacillus lentus* (aprH); промотор гена α -амилазы *Bacillus subtilis* (amyE); промотор гена мальтогенной амилазы *Bacillus stearothermophilus* (amyM); промотор гена пенициллиназы *Bacillus licheniformis* (penP); промоторы генов xylA и xylB *Bacillus subtilis* и/или промотор гена CryIIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*.

В предпочтительном воплощении последовательность промотора представляет собой промотор α -амилазы (такой как промотор α -амилазы *Bacillus licheniformis*). Предпочтительно, когда последовательность промотора включает от -35 до -10 последовательность промотора α -амилазы *B.licheniformis* - см. фиг. 53 и 55.

"Последовательность от -35 до -10" описывает положение относительно сайта начала транскрипции. Как "-35", так и "-10" представляют собой блоки, т.е. некое количество нуклеотидов, каждый из которых включает 6 нуклеотидов, и эти блоки разделены 17 нуклеотидами. Эти 17 нуклеотидов часто называют "спейсером". Это иллюстрируется на фиг. 55, где блоки -35 и -10 подчеркнуты. Во избежание неоднозначного трактования, там где "последовательность от -35 до -10" используется в данном описании, это относится к последовательности от начала -35 блока до конца -10 блока, т.е. включая как -35 блок, так и спейсер длиной 17 нуклеотидов и -10 блок.

Сигнальный пептид.

Липидацилтрансфераза, которая вырабатывается хозяйской клеткой путем экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей липидацилтрансферазу, может секретироваться или может содержаться внутри клетки в зависимости от используемой последовательности и/или вектора.

Сигнальная последовательность может использоваться для непосредственной секреции кодирующих последовательностей через определенную клеточную мембрану. Сигнальные последовательности могут быть природными или чужеродными по отношению к последовательности, кодирующей липидацилтрансферазу. Например, последовательность, кодирующая сигнальный пептид, может быть получена из гена амилазы или протеазы из видов *Bacillus*, предпочтительно из *Bacillus licheniformis*.

Приемлемые последовательности, кодирующие сигнальный пептид, могут быть получены из одного или более из следующих генов: гена мальтогенной α -амилазы, гена субтилизина, гена бета-лактамазы, гена нейтральной протеазы, prsA гена и/или гена ацилтрансферазы.

Предпочтительно, когда сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид α -амилазы *B.licheniformis*, ацилтрансферазы *Aeromonas* (например, mkkwfvcllgialtvqa - SEQ ID No. 21), субтилизин *B.subtilis* (например, mrskklwisllfaltlftmfnmsaqa - SEQ ID No. 22) или субтилизин *B.licheniformis* (например, mmrkksfwfgmltafmlvftmefdsasa - SEQ ID No. 23). Предпочтительно сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид α -амилазы *B.licheniformis*.

Однако может использоваться любая последовательность, кодирующая сигнальный пептид, способная направлять экспрессированную липидацилтрансферазу по секреторному пути выбранной хозяйской клетки *Bacillus* (предпочтительно хозяйской клетки *B.licheniformis*).

В некоторых воплощениях настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, может быть оперативно связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей выбранную липидацилтрансферазу.

Выбранная липидацилтрансфераза может экспрессироваться в хозяйской клетке, как определено в данном описании, в виде слитого белка.

Экспрессионный вектор.

Термин "экспрессионный вектор" означает конструкцию, способную к *in vivo* или *in vitro* экспрессии.

Предпочтительно, когда экспрессионный вектор встраивается в геном организма, такого как хозяйская клетка *B.licheniformis*. Термин "встроенный" предпочтительно охватывает стабильное встраивание в геном.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу, как определено в данном описании, может быть представлена в векторе, в котором нуклеотидная последовательность является оперативно связанной с регуляторными последовательностями, так, что регуляторные последовательности являются способными обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности приемлемым хозяйским организмом (таким как *B.licheniformis*), т.е. вектор представляет собой экспрессионный вектор.

Векторы в соответствии с настоящим изобретением могут быть трансформированы в хозяйскую клетку так, как описано выше, для обеспечения экспрессии полипептида, обладающего липидацилтрансферазной активностью, как определено в данном описании.

Выбор вектора, например плазмиды, космиды, вирусного или фагового вектора, геномной вставки, часто зависит от хозяйской клетки, в которую он встраивается. Настоящее изобретение может охватывать разные формы экспрессионных векторов, которые служат для осуществления эквивалентных функций, которые являются известными в области техники.

Трансформированный в выбранную хозяйскую клетку вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяйской клетки или может быть интегрированным в геном сам по себе.

Векторы могут содержать один или более генов селективируемых маркеров, таких как ген, который придает устойчивость к антибиотикам, например устойчивость к ампициллину, канамицину, хлорафениколу или тетрациклину. Альтернативно, селекция может осуществляться путем совместной трансформации (как описано в WO 91/17243).

Векторы могут использоваться *in vitro*, например, для получения РНК или использоваться для трансфекции или трансформации хозяйской клетки.

Вектор может дополнительно включать нуклеотидную последовательность, позволяющую вектору реплицироваться в рассматриваемой хозяйской клетке. Примеры таких последовательностей представляют собой точки начала репликации плазмид pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 и pIJ702.

Липидацилтрансфераза.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, может кодировать природную липидацилтрансферазу или вариант липидацилтрансферазы.

Липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может быть природной липидацилтрансферазой или вариантом липидацилтрансферазы.

Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в настоящем изобретении, может быть одной из тех, что описаны в WO 2004/064537, WO 2004/064987, WO 2005/066347 или WO 2006/008508. Эти документы введены в данное описание в качестве ссылки.

Термин "липидацилтрансфераза", как используется в данном описании, предпочтительно означает фермент, который обладает ацилтрансферазной активностью (который обычно классифицируется как E.C. 2.3.1.x, например 2.3.1.43), где фермент является способным к переносу ацильной группы из липида на один или более акцепторных субстратов, таких как один или более из приведенных далее: стерин, станол; углевод; белок; белковая субъединица; сахарный спирт, такой как аскорбиновая кислота, и/или глицерин, предпочтительно глицерин и/или стерин, такой как холестерин.

Предпочтительно, когда липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая является способной к переносу ацильной группы из фосфолипидов (как определено в данном описании) на сахарный спирт, такой как аскорбиновая кислота, и/или глицерин, и/или стерин, предпочтительно глицерин или стерин, наиболее предпочтительно стерин (например, холестерин).

В некоторых аспектах "акцептор ацила" в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой соединение, включающее гидроксигруппу (-ОН), такое как, например, поливалентные спирты, включая глицерин; стерин; станола; углевод; гидроксикислоты, включая фруктовые кислоты, лимонную кислоту, винную кислоту, молочную кислоту и аскорбиновую кислоту; белки или их субъединицы, такие как аминокислоты, белковые гидролизаты и пептиды (частично гидролизованный белок), например; и их смеси, а также их производные. Предпочтительно, когда "акцептор ацила" в соответствии с настоящим изобретением не является водой.

Акцептор ацила предпочтительно не является моноглицеридом.

В одном варианте выполнения акцептор ацила может представлять собой диглицерид.

В одном аспекте липидацилтрансфераза для использования в способах и/или применениях настоящего изобретения является способной переносить группу ацила из липида на стерин и/или станол.

В другом аспекте липидацилтрансфераза для использования в способах и/или применениях настоящего изобретения является способной переносить группу ацила из липида на стерин и/или станол, дополнительно может переносить группу ацила из липида на одно или более из следующих соединений: углевод, белок, белковая субъединица, глицерин, жирный спирт.

Предпочтительно акцептор ацила естественно может быть найден в масле. Альтернативно, акцептор ацила может быть добавлен к маслу (например, акцептор ацила может быть инородным для масла). Например, в некоторых вариантах воплощения стерин и/или станол могут быть добавлены к маслу до или в процессе рафинирования. Это особенно важно, если количество акцептора ацила является ограничивающим скорость ацилтрансферазной реакции. Добавление акцептора ацила может приводить к уменьшениям в количествах свободных жирных кислот и/или большему образованию эстера акцептора ацила в сравнении с маслом, к которому не добавляли дополнительного акцептора ацила.

Предпочтительно, когда липидный субстрат, на основе которого действует липидный ацил, представляет собой один или более из следующих липидов: фосфолипид, такой как лецитин, например фосфатидилхолин и/или фосфатидилэтаноламин.

Этот липидный субстрат может называться в данном описании "донор липидного ацила". Термин "лецитин", как используется в данном описании, охватывает фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин и фосфатидилглицерин.

Предпочтительные липидацилтрансферазы для применения в настоящем изобретении определяются как такие, которые имеют высокую активность, например высокую фосфолипидгидролитическую активность или высокую фосфолипид-трансферазную активность на фосфолипиды в масляной среде, наиболее предпочтительно липидацилтрансферазы для применения в настоящем изобретении имеют высокую трансферазную активность от фосфолипидов до стерина.

Как детально описано выше, другие ацилтрансферазы, подходящие для применения в способах данного изобретения, могут быть определены путём идентифицирования присутствия GDSX, GANDY и HPT блоков или путём выравнивания rFam00657 консенсусной последовательности (SEQ ID No. 1) и/или выравнивания к GDSX ацилтрансферазе, например SEQ ID No. 28. Для того чтобы оценить их пригодность для рафинирования, т.е. определить те ферменты, которые имеют трансферазную активность по крайней мере 5%, более предпочтительно по крайней мере 10%, более предпочтительно по крайней мере 20%, более предпочтительно по крайней мере 30%, более предпочтительно по крайней мере 40%, более предпочтительно 50%, более предпочтительно по крайней мере 60%, более предпочтительно по крайней мере 70%, более предпочтительно по крайней мере 80%, более предпочтительно по крайней мере 90% и более предпочтительно по крайней мере 98% от общей ферментной активности, такие ацилтрансферазы тестируют, используя исследование "Протокол для определения % ацилтрансферазной активности", детально раскрытый в данном описании выше.

Для некоторых аспектов является предпочтительным, когда липидацилтрансфераза для способов и применений в соответствии с настоящим изобретением представляет собой липидацилтрансферазу, которая является не способной или существенно не способной воздействовать на триглицерид, и/или 1-моноглицерид, и/или 2-моноглицерид.

Для некоторых аспектов является предпочтительным, когда липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая не демонстрирует активности триацилглицеринлипазы (E.C. 3.1.1.3) или не демонстрирует значительной активности триацилглицеринлипазы (E.C. 3.1.1.3).

Способность к гидролизу триглицерида (E.C. 3.1.1.3 активность) может быть определена с помощью липазной активности, определяемой в соответствии с Кодексом пищевых химикатов (3-е изд., 1981, стр. 492-493), модифицированной для подсолнечного масла и pH 5,5 вместо оливкового масла и pH 6,5. Липазная активность измеряется как LUS (липазные единицы подсолнечника), где 1 LUS определяется как количество фермента, который может высвободить 1 мкмоль жирных кислот в минуту из подсолнечного масла при указанных выше условиях анализа. Альтернативно, может использоваться LUT анализ, как определено в WO 9845453. Это упоминание введено в данное описание в качестве ссылки.

Липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может быть липидацилтрансферазой, которая является существенно не способной воздействовать на триглицерид, и может иметь значение LUS/мг менее чем 1000, например менее чем 500, такое как менее чем 300, предпочтительно менее чем 200, более предпочтительно менее чем 100, более предпочтительно менее чем 50, более предпочтительно менее чем 20, более предпочтительно менее чем 10, такое как менее чем 5, менее чем 2, более предпочтительно менее чем 1 LUS/мг. Альтернативно, активность LUT/мг является меньшей чем 500, такой как менее чем 300, предпочтительно менее чем 200, более предпочтительно менее чем 100, более предпочтительно менее чем 50, более предпочтительно менее чем 20, более предпочтительно менее чем 10, такой как менее чем 5, менее чем 2, более предпочтительно менее чем 1 LUT/мг.

Липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая является существенно не способной воздействовать на моноглицерид. Это может быть определено при использовании моноолеата (M7765 1-

олеил-гас-глицерина 99%) вместо подсолнечного масла в LUS анализе. 1 MGHU определяется как количество, которое может высвободить 1 мкмоль жирной кислот в минуту из моноглицерида при указанных выше условиях анализа.

Липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая предпочтительно является существенно не способной воздействовать на триглицерид и может иметь значение менее чем 5000, например менее чем 1000, например менее чем 500, такое как менее чем 300, предпочтительно менее чем 200, более предпочтительно менее чем 100, более предпочтительно менее чем 50, более предпочтительно менее чем 20, более предпочтительно менее чем 10, такое как менее чем 5, менее чем 2, более предпочтительно менее чем 1 MGHU/мг.

Предпочтительно, когда липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая дополнительно к своей липидацилтрансферазной активности также может демонстрировать одну или более из следующих активностей фосфолипазы: активность фосфолипазы A2 (Е.С. 3.1.1.4) и/или активность фосфолипазы A1 (Е.С. 3.1.1.32). Липидацилтрансфераза может также обладать активностью фосфолипазы B (Е.С. 3.1.1.5).

Предпочтительно для некоторых аспектов липидацилтрансфераза может быть способной к переносу группы ацила из фосфолипида на станол и/или стерин, предпочтительно холестерин.

Для некоторых аспектов является предпочтительным, когда липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения кодирует липидацилтрансферазу, которая является способной к переносу группы ацила из фосфолипида на стерин и/или станол с образованием, по крайней мере, эстера стерина и/или эстера станола.

Таким образом, в одном воплощении "акцептор ацила" в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой растительный стерин/станол.

Предпочтительно, когда фермент липидацилтрансфераза может быть охарактеризован при использовании следующих критериев:

фермент обладает ацилтрансферазной активностью, которая может быть определена как активность переноса эстера, посредством чего ацильная часть исходной связи эстера донора липидного ацила переносится на акцептор ацила, с образованием нового эстера; и

фермент включает аминокислотный мотив GDSX, где X представляет собой один или более из следующих аминокислотных остатков: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S.

Предпочтительно, когда X мотив GDSX представляет собой L или Y. Более предпочтительно, когда X мотив GDSX представляет собой L. Таким образом, предпочтительно фермент в соответствии с настоящим изобретением включает аминокислотный мотив GDSL.

GDSX мотив состоит из четырех консервативных аминокислот. Предпочтительно, когда серин в мотиве представляет собой серин фермента липидацилтрансферазы. Предпочтительно, когда серин GDSX мотива может находиться в положении, соответствующем Ser-16 в ферменте липидацилтрансферазы *Aeromonas hydrophila*, как описывается у Brumlik & Buckley (Journal of Bacteriology. Apr. 1996, vol. 178, No. 7, p. 2060-2064).

Для определения того, что белок имеет GDSX мотив в соответствии с настоящим изобретением, последовательность предпочтительно сравнивают с профилями скрытой марковской модели (HMM профили) базы данных rfam в соответствии с процедурами, описанными в WO 2004/064537 или WO 2004/064987, которые введены в данное описание в качестве ссылки.

Предпочтительно фермент липидацилтрансфераза может подвергаться выравниванию при использовании rfam00657 консенсусной последовательности (для полного объяснения см. WO 2004/064537 или WO 2004/064987).

Предпочтительно, когда позитивное соответствие профилю скрытой марковской модели (HMM профиль) семейства домена rfam00657 свидетельствует о присутствии GDSL или GDSX домена в соответствии с настоящим изобретением.

Предпочтительно, когда соответствующая rfam00657 консенсусная последовательность липидацилтрансферазы для использования в способах или применениях в соответствии с изобретением будет иметь по крайней мере один, предпочтительно более чем один, предпочтительно более двух из следующих: GDSX блок, GANDY блок, HPT блок. Предпочтительно липидацилтрансфераза может иметь GDSX блок и GANDY блок. Альтернативно, фермент может иметь GDSX блок и HPT блок. Предпочтительно, когда фермент включает, по крайней мере, GDSX блок. См. WO 2004/064537 или WO 2004/064987 для дополнительной информации.

Предпочтительно, когда остатки GANDY мотива выбирают из GANDY, GGND, GGNDL, более предпочтительно GANDY.

Предпочтительно, когда соответствующая rfam00657 консенсусная последовательность фермента для использования в способах или применениях в соответствии с настоящим изобретением имеет по крайней мере 1, предпочтительно более 1, предпочтительно более 2, предпочтительно более 3, предпочтительно более 4, предпочтительно более 5, предпочтительно более 6, предпочтительно более 7, предпочтительно более 8, предпочтительно более девяти, предпочтительно более 10, предпочтительно более

11, предпочтительно более 12, предпочтительно более 13, предпочтительно более 14 следующих аминокислотных остатков при сравнении со стандартной полипептидной последовательностью A.hydrophila, в частности SEQ ID No. 1: 28hid, 29hid, 30hid, 31hid, 32gly, 33Asp, 34Ser, 35hid, 130hid, 131Gly, 132Hid, 133Asn, 134Asp, 135hid, 309His.

Домен pfam00657 GDSX представляет собой уникальный идентификатор, который отличает белки, обладающие этим доменом от других ферментов.

pfam00657 консенсусная последовательность представлена на фиг. 3 как SEQ ID No. 2. Она получена путем идентификации pfam семейства 00657, версии базы данных 6, которая также называется как pfam00657,6 в данном описании.

Консенсусная последовательность может быть обновлена при использовании последующих выпусков pfam базы данных (например, см. WO 2004/064537 или WO 2004/064987).

В одном воплощении фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая может быть охарактеризована при использовании следующих критериев:

(i) фермент обладает ацилтрансферазной активностью, которая может быть определена как активность переноса эстера, посредством чего ацильная часть связи исходного эстера донора липидного ацила переносится на акцептор ацила с образованием нового эстера;

(ii) фермент включает аминокислотный мотив GDSX, где X представляет собой один или более из следующих аминокислотных остатков: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S;

(iii) фермент включает His-309 или включает остаток гистидина в положении, соответствующем His-309 в ферменте липидацилтрансферазе Aeromonas hydrophila, показанном на фиг. 2 и 4 (SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 3).

Предпочтительно аминокислотный остаток GDSX мотива представляет собой L.

В SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1 первые 18 аминокислотных остатков образуют сигнальную последовательность. His-309 последовательности полной длины, т.е. белка, включающего сигнальную последовательность, приравнивается к His-291 зрелой части белка, т.е. последовательности, не содержащей сигнальной последовательности.

В одном воплощении фермент липидацилтрансфераза для использования в любом из способов и применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая включает следующую каталитическую триаду: Ser-34, Asp-306 и His-309 или включает остаток серина, остаток аспарагиновой кислоты и остаток гистидина соответственно в положениях, соответствующих Ser-34, Asp-306 и His-309 в ферменте липидацилтрансферазы Aeromonas hydrophila, показанном на фиг. 4 (SEQ ID No. 3) или фиг. 2 (SEQ ID No. 1). Как указано выше, в последовательности, показанной в SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1, первые 18 аминокислотных остатков образуют сигнальную последовательность. Ser-34, Asp-306 и His-309 последовательности полной длины, т.е. белка, включающего сигнальную последовательность, приравнивается к Ser-16, Asp-288 и His-291 зрелой части белка, т.е. последовательности, не содержащей сигнальной последовательности. В pfam00657 консенсусной последовательности, как представлено на фиг. 3 (SEQ ID No. 2), остатки активного сайта соответствуют Ser-7, Asp-345 и His-348.

В одном воплощении фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая может быть охарактеризована при использовании следующих критериев:

фермент обладает ацилтрансферазной активностью, которая может быть определена как активность переноса эстера, посредством чего ацильная часть исходной связи эстера первого донора липидного ацила переносится на акцептор ацила с образованием нового эстера; и

фермент включает, по крайней мере, Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 и His-309 или включает остатки глицина, аспарагиновой кислоты, серина, аспарагиновой кислоты и гистидина в положениях, соответствующих Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-306 и His-309 соответственно, в ферменте липидацилтрансферазе Aeromonas hydrophila, представленном в SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1.

Предпочтительно, когда фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может кодироваться одной из следующих нуклеотидных последовательностей:

- (a) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 36 (см. фиг. 29);
- (b) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 38 (см. фиг. 31);
- (c) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 39 (см. фиг. 32);
- (d) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 42 (см. фиг. 35);
- (e) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 44 (см. фиг. 37);
- (f) нуклеотидная последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 46 (см. фиг. 39);
- (g) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 48 (см. фиг. 41);
- (h) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 49 (см. фиг. 57);
- (i) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 50 (см. фиг. 58);
- (j) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 51 (см. фиг. 59);
- (k) нуклеотидной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 52 (см. фиг. 60);

ностью с одной или более последовательностями, которые представлены как SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14 или SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34 или SEQ ID No. 35.

Предпочтительно фермент липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая включает либо аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 68, или как SEQ ID No. 3, или как SEQ ID No. 4, или SEQ ID No. 1, или SEQ ID No. 15, или SEQ ID No. 16, или SEQ ID No. 34, или SEQ ID No. 35, или включает аминокислотную последовательность, которая обладает 75% или более, предпочтительно 80% или более, предпочтительно 85% или более, предпочтительно 90% или более, предпочтительно 95% или более идентичностью с аминокислотной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 68, или аминокислотной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 3, или аминокислотной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 4, или аминокислотной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 1, или аминокислотной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 15, или аминокислотной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 16, или аминокислотной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 34, или аминокислотной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 35.

Предпочтительно фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая включает аминокислотную последовательность, которая обладает 80% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более и даже более предпочтительно 95% или более идентичностью с одной или более последовательностями, которые представлены как SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34 или SEQ ID No. 35.

Предпочтительно фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая включает одну или более из следующих аминокислотных последовательностей:

(a) аминокислотную последовательность, которая представлена как аминокислотные остатки 1-100 SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1;

(b) аминокислотную последовательность, которая представлена как аминокислотные остатки 101-200 SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1;

(c) аминокислотную последовательность, которая представлена как аминокислотные остатки 201-300 SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1; или

(d) аминокислотную последовательность, которая обладает 75% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, даже более предпочтительно 95% или более идентичностью с любой одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a)-(c), как указано выше.

Предпочтительно фермент липидацилтрансфераза для использования в способах и применениях настоящего изобретения может включать одну или более из следующих аминокислотных последовательностей:

(a) аминокислотную последовательность, которая представлена как аминокислотные остатки 28-39 SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1;

(b) аминокислотную последовательность, которая представлена как аминокислотные остатки 77-88 SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1;

(c) аминокислотную последовательность, которая представлена как аминокислотные остатки 126-136 SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1;

(d) аминокислотную последовательность, которая представлена как аминокислотные остатки 163-175 SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1;

(e) аминокислотную последовательность, которая представлена как аминокислотные остатки 304-311 SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 1; или

(f) аминокислотную последовательность, которая обладает 75% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, даже более предпочтительно 95% или более идентичностью с любой одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a)-(e), как указано выше.

В одном аспекте фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая может представлять собой липидацилтрансферазу из *Candida parapsilosis*, описанную в EP 1275711. Таким образом, в одном аспекте липидацилтрансфераза для использования в способе и применениях настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую одну из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID No. 17 или SEQ ID No. 18.

Еще более предпочтительно когда фермент липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая может являться липидацилтрансферазой, включающей аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 16, или аминокислотную последовательность, которая обладает 75% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, даже более предпочтительно 95% или более, даже более предпочтительно 98% или более или даже более предпочтительно 99% или более идентичностью с SEQ ID No. 16. Такой фермент может рассматриваться в качестве варианта фермента.

В одном аспекте фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая может являться лецитин:холестерин ацилтрансферазой (LCAT) или ее вариантом (например, вариантом, полученным с помощью молекулярной эволюции).

Приемлемые LCAT являются известными в области техники и могут быть получены из одного или более следующих организмов, например: млекопитающих, крыс, мышей, кур, *Drosophila melanogaster*, растений, включая *Arabidopsis* и *Oryza sativa*, нематод, грибов и дрожжей.

В одном воплощении фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая может являться липидацилтрансферазой, получаемой, предпочтительно полученной, из штаммов *E.coli* TOP 10, которые несут pPet12aAhydro и pPet12aASalmo, депонированных Danisco A/S, Langebrogade 1, DK-1001 Copenhagen K, Denmark в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры при Национальной коллекции промышленных, морских и пищевых бактерий (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen Scotland, GB 22 декабря 2003 г. под депозитными номерами NCIMB 41204 и NCIMB 41205 соответственно.

Фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой фосфолипид глицеринацилтрансферазу. Фосфолипид глицеринацилтрансферазы включают те, что изолированы из *Aeromonas* spp., предпочтительно из *Aeromonas hydrophila* или *A.salmonicida*, наиболее предпочтительно из *A.salmonicida* или их варианты.

Наиболее предпочтительно липидацилтрансферазы для использования в настоящем изобретении кодируются SEQ ID No. 1, 3, 4, 15, 16, 34 и 35. При этом специалисту в данной области техники будет понятно, что является предпочтительным, когда сигнальные пептиды ацилтрансферазы были вырезаны во время экспрессии трансферазы. Сигнальный пептид последовательностей SEQ ID No. 1, 3, 4, 15 и 16 представляет собой аминокислоты 1-18. Таким образом, наиболее предпочтительные участки представляют собой аминокислоты 19-335 для SEQ ID No. 1 и SEQ ID No. 3 (*A.hydrophilia*) и аминокислоты 19-336 для SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16 (*A.salmonicida*). При использовании для определения гомологии или идентичности аминокислотных последовательностей является предпочтительным, чтобы при выравниваниях, как описано в данном изобретении, использовалась зрелая последовательность.

В одном воплощении липидацилтрансфераза для использования в настоящем изобретении предпочтительно включает (или состоит из) аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID No. 16, или включает (или состоит из) аминокислотную последовательность, которая обладает по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 95%, по крайней мере 98% идентичностью с SEQ ID No. 16.

В одном воплощении липидацилтрансфераза для использования в настоящем изобретении предпочтительно кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность, включающую (или состоящую из) аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID No. 68, или включающей (или состоящей из) аминокислотную последовательность, которая обладает по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 95%, по крайней мере 98% идентичностью с SEQ ID No. 68.

Таким образом, наиболее предпочтительные участки для определения (идентичности) представляют собой аминокислоты 19-335 для SEQ ID No. 1 и 3 (*A.hydrophilia*) и аминокислоты 19-336 для SEQ ID No. 4, 15 и 16 (*A.salmonicida*). Последовательности SEQ ID No. 34 и 35 представляют собой последовательности зрелого белка липидацилтрансферазы из *A.hydrophilia* и *A.salmonicida* соответственно, которые могут подвергаться или могут не подвергаться дальнейшей посттрансляционной модификации.

Фермент липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая также может быть изолирована из *Thermobifida*, предпочтительно *T.fusca*, наиболее предпочтительно ту, которая кодируется SEQ ID No. 28.

Приемлемые липидацилтрансферазы для использования в соответствии с настоящим изобретением и/или в способах настоящего изобретения могут включать любую из следующих аминокислотных последовательностей и/или кодируются следующими нуклеотидными последовательностями:

а) нуклеиновой кислотой, которая кодирует полипептид, демонстрирующий липидцилтрансферазную активность и является по крайней мере на 70% идентичным (предпочтительно по крайней мере на

80%, более предпочтительно по крайней мере на 90% идентичным) полипептидной последовательности, показанной в SEQ ID No. 16, или полипептиду, показанному в SEQ ID No. 68;

b) (изолированный) полипептид, включающий (или состоящий из) аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID No. 16 или SEQ ID No. 68, или аминокислотную последовательность, которая является по крайней мере на 70% идентичной (предпочтительно по крайней мере на 80% идентичной, более предпочтительно по крайней мере на 90% идентичной) последовательности SEQ ID No. 16 или SEQ ID No. 68;

c) нуклеиновой кислотой, кодирующей липидацилтрансферазу, где нуклеиновая кислота включает (или состоит из) нуклеотидную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 49, или нуклеотидную последовательность, которая является по крайней мере на 70% идентичной (предпочтительно по крайней мере на 80%, более предпочтительно по крайней мере на 90% идентичной) нуклеотидной последовательности, которая представлена как SEQ ID No. 49;

d) нуклеиновой кислотой, которая гибридизуется при условиях средней и высокой жесткости с образцом нуклеиновой кислоты, включающим нуклеотидную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 49 и кодирует полипептид, демонстрирующий липидацилтрансферазную активность;

e) нуклеиновой кислотой, которая представляет собой фрагмент последовательностей нуклеиновой кислоты, указанных в a), c) или d); или

f) полипептид, который представляет собой фрагмент полипептида, указанного в b).

Фермент липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая также может быть изолированной из *Streptomyces*, предпочтительно *S. avermitis*, наиболее предпочтительно такую, которая кодируется SEQ ID No. 32. Другие возможные ферменты из *Streptomyces* для использования в настоящем изобретении включают такие, которые кодируются последовательностями SEQ ID No. 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 31 и 33.

Фермент для использования в данном изобретении может также быть изолированным из *Corynebacterium*, предпочтительно *C. efficiens*, наиболее предпочтительно таким, который кодируется SEQ ID No. 29.

Предпочтительно фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая включает какую-либо из аминокислотных последовательностей, которые представлены как SEQ ID No. 37, 38, 40, 41, 43, 45 или 47, или аминокислотную последовательность, которая обладает с ней по крайней мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% идентичностью, или может кодироваться какой-либо из нуклеотидных последовательностей, которые представлены как SEQ ID No. 36, 39, 42, 44, 46, или 48, или нуклеотидной последовательностью, которая обладает с ней по крайней мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% идентичностью.

В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, выбирается из группы, которая состоит из:

a) нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID No. 36;

b) нуклеиновой кислоты, которая является родственной с нуклеотидной последовательностью SEQ ID No. 36 с учетом вырожденности генетического кода;

c) нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, которая обладает по крайней мере 70% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID No. 36.

В одном воплощении фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой липидацилтрансферазу, которая включает аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID No. 37, или аминокислотную последовательность, которая обладает с ней по крайней мере 60% идентичностью.

В дополнительном воплощении фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая включает одну или более аминокислотных последовательностей, которые представлены как SEQ ID No. 37, 38, 40, 41, 43, 45 или 47, или аминокислотную последовательность, которая обладает с ней по крайней мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% идентичностью, или может кодироваться одной или более из нуклеотидных последовательностей, которые представлены как SEQ ID No. 39, 42, 44, 46 или 48, или нуклеотидной последовательностью, которая обладает с ней по крайней мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% идентичностью.

В дополнительном воплощении фермент липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая включает одну из аминокислотных последовательностей, которые представлены как SEQ ID No. 38, 40, 41, 45 или 47, или аминокислотную последовательность, которая обладает с ней по крайней мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% идентичностью, для применений, описанных в данном изобретении.

В дополнительном воплощении липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая включает одну из аминокислотных последовательностей, которые представлены как SEQ ID No. 38, 40 или 47, или аминокислотную последовательность, которая обладает с ней по крайней мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% идентичностью, для применений, описанных в данном изобретении.

Более предпочтительно в одном воплощении липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая включает аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 47, или аминокислотную последовательность, которая обладает с ней по крайней мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% идентичностью.

В другом воплощении липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, включающую аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 43 или 44, или аминокислотную последовательность, которая обладает с ней по крайней мере 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% идентичностью.

В другом воплощении липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая включает аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 41, или аминокислотную последовательность, которая обладает по крайней мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97 или 98% идентичностью с ней.

В одном воплощении липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может кодироваться нуклеиновой кислотой, выбранной из группы, состоящей из:

a) нуклеиновой кислоты, которая включает нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID No. 36;

b) нуклеиновой кислоты, которая является родственной с нуклеотидной последовательностью SEQ ID No. 36 с учетом вырожденности генетического кода; и

c) нуклеиновой кислоты, которая включает нуклеотидную последовательность, которая обладает по крайней мере 70% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID No. 36.

В одном воплощении липидацилтрансфераза в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой липидацилтрансферазу, получаемую, предпочтительно полученную, из штаммов *Streptomyces* L130 или L131, депонированных Danisco A/S of Langebrogade 1, DK-1001 Copenhagen K, Denmark в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры при Национальной коллекции промышленных, морских и пищевых бактерий (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen Scotland, GB 25 июня 2004 г., под депозитными номерами NCIMB 41226 и NCIMB 41227 соответственно.

Приемлемые нуклеотидные последовательности, кодирующие липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, могут представлять собой полинуклеотид, кодирующий липидацилтрансферазу (SEQ ID No. 16 или SEQ ID No. 68); или могут кодировать аминокислотную последовательность липидацилтрансферазы (SEQ ID No. 16 или SEQ ID No. 68).

Приемлемые липидацилтрансферазы для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения могут представлять собой аминокислотную последовательность, которая может быть идентифицирована путем выравнивания с L131 (SEQ ID No. 37) последовательностью при использовании Align X, Clustal W алгоритма попарного выравнивания Vector NTI при использовании параметров по умолчанию.

Выравнивание L131 и гомологов из *S. avermitilis* и *T. fusca* иллюстрирует, что сохранение GDSX мотива (GDSY в L131 и *S. avermitilis* и *T. fusca*), GANDY блока, который представляет собой либо GGND A, либо GGND L, и HPT блока (считается консервативным каталитическим гистидином). Эти три консервативных блока являются выделенными на фиг. 42.

При выравнивании или с pfam pfam00657 консенсусной последовательностью (как описано в WO 04/064987) и/или с L131 последовательностью, раскрытой в данном описании (SEQ ID No. 37), является возможным идентифицировать три консервативных участка, GDSX блок, GANDY блок и HPT блок (см. WO 04/064987 для дополнительной информации).

При выравнивании или с pfam pfam00657 консенсусной последовательностью (как описано в WO 04/064987) и/или с L131 последовательностью, раскрытой в данном описании (SEQ ID No. 37):

i) липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая содержит GDSX мотив, более предпочтительно GDSX мотив, выбранный из GDSL или GDSY мотива; и/или

ii) липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая содержит GANDY блок, более предпочтительно GANDY блок, включающий аминокислоты GGNDx, более предпочтительно GGND A или GGND L; и/или

iii) липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая содержит предпочтительно НТР блок; предпочтительно

iv) липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая содержит предпочтительно GDSX или GDSY мотив, и GANDY блок, включающий аминокислоты GGNDx, предпочтительно GGNDL или GGNDL, и НТР блок (консервативный гистидин).

В одном варианте выполнения фермент в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно не является ферментом фосфолипазой, таким как фосфолипаза A1, классифицированная как E.C. 3.1.1.32, или фосфолипаза A2, классифицированная как E.C. 3.1.1.4.

Вариант липидацилтрансферазы.

В предпочтительном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, может кодировать липидацилтрансферазу, которая представляет собой вариант липидацилтрансферазы.

Могут использоваться варианты, которые обладают повышенной активностью по отношению к фосфолипидам, такой как повышенная гидролитическая активность и/или повышенная трансферазная активность, предпочтительно повышенная трансферазная активность по отношению к фосфолипидам.

Предпочтительно вариант липидацилтрансферазы получают с помощью одной или более модификаций аминокислот липидацилтрансфераз, как определено в данном описании выше.

Предпочтительно липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой липидацилтрансферазу, которая может быть вариантом липидацилтрансферазы, в случае чего фермент может быть охарактеризован тем, что фермент включает аминокислотный мотив GDSX, в данном описании X представляет собой один или более из следующих аминокислотных остатков: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, и в данном описании вариант фермента включает одну или более модификаций аминокислот по сравнению с исходной последовательностью в каком-либо одном или более аминокислотных остатках, определенных в наборе 2, или наборе 4, или наборе 6, или наборе 7 (как определено в WO 2005/066347 и в данном описании ниже).

Например, вариант липидацилтрансферазы может быть охарактеризован тем, что фермент включает аминокислотный мотив GDSX, в данном описании X, который представляет собой один или более из следующих аминокислотных остатков: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, и в данном описании вариант фермента включает одну или более модификаций аминокислот по сравнению с исходной последовательностью в каком-либо одном или более аминокислотных остатках, определенных в наборе 2, или наборе 4, или наборе 6, или наборе 7 (как определено в WO 2005/066347 и в данном описании ниже), идентифицированном с помощью указанной исходной аминокислотной последовательности, являющейся структурно выровненной со структурной моделью P10480, определенной в данном описании, которая является предпочтительно полученной с помощью структурного выравнивания P10480 координат кристаллической структуры с 1IVN.PDB и/или 1DEO.PDB, как определено в WO 2005/066347 и в данном описании ниже.

В дополнительном воплощении липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения может представлять собой вариант липидацилтрансферазы, который может быть охарактеризован тем, что фермент включает аминокислотный мотив GDSX, в данном описании X представляет собой один или более из следующих аминокислотных остатков: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S, и в данном описании вариант фермента включает одну или более модификаций аминокислот по сравнению с исходной последовательностью в каком-либо одном или более аминокислотных остатках, определенных в наборе 2, идентифицированном тогда, когда указанная исходная последовательность является выровненной с pfam консенсусной последовательностью (SEQ ID No. 2, фиг. 3) и модифицированной в соответствии со структурной моделью P10480 для обеспечения наибольшего соответствия перекрытия, как определено в WO 2005/066347 и в данном описании ниже.

Предпочтительно липидацилтрансфераза для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения может представлять собой вариант фермента липидацилтрансферазы, который может включать аминокислотную последовательность, где аминокислотная последовательность представляет собой такую, которая представлена как SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 или SEQ ID No. 35, за исключением одной или более модификаций аминокислот в одном или более аминокислотных остатках, определенных в наборе 2, или наборе 4, или наборе 6, или наборе 7 (как определено в WO 2005/066347 и в данном описании ниже), идентифицированном с помощью выравнивания последовательности с SEQ ID No. 34.

Альтернативно, липидацилтрансфераза может представлять собой вариант фермента липидацилтрансферазы, включающий аминокислотную последовательность, где аминокислотная после-

довательность представляет собой такую, которая представлена как SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 или SEQ ID No. 35, за исключением одной или более модификаций аминокислот в одном или более аминокислотных остатках, определенных в наборе 2, или наборе 4, или наборе 6, или наборе 7, как определено в WO 2005/066347 и в данном описании ниже, идентифицированном с помощью структурного выравнивания указанной исходной последовательности со структурной моделью P10480, определенной в данном описании, которая является предпочтительно полученной с помощью структурного выравнивания координат кристаллической структуры P10480 с 1IVN.PDB и/или 1DEO.PDB, как описывается в WO 2005/066347 и в данном описании ниже.

Альтернативно, липидацилтрансфераза может представлять собой вариант фермента липидацилтрансферазы, включающий аминокислотную последовательность, где аминокислотная последовательность представляет собой такую, которая представлена как SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 68 или SEQ ID No. 35, за исключением одной или более модификаций аминокислот в одном или более аминокислотных остатках, определенных в наборе 2, идентифицированном тогда, когда указанная исходная последовательность выравнивается с rfam консенсусной последовательностью (SEQ ID No. 2) и модифицируется в соответствии со структурной моделью P10480 для обеспечения наибольшего соответствия перекрытия, как определено в WO 2005/066347 и в данном описании ниже.

Предпочтительно исходный фермент представляет собой фермент, который включает или является гомологичным, аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 34 и/или SEQ ID No. 15 и/или SEQ ID No. 35.

Предпочтительно липидацилтрансфераза может представлять собой вариант фермента, который включает аминокислотную последовательность, где аминокислотная последовательность представляет собой такую, которая представлена как SEQ ID No. 34 или SEQ ID No. 35, за исключением одной или более модификаций аминокислот в любом одном или более аминокислотных остатках, определенных в наборе 2, или наборе 4, или наборе 6, или наборе 7, как определено в WO 2005/066347 и в данном описании ниже.

Определение наборов.

Аминокислотный набор 1.

Аминокислотный набор 1 (примечание: эти аминокислоты представляют собой таковые в 1IVN - фиг. 53 и 54):

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

Высококонсервативные мотивы, такие как GDSX и каталитические остатки, отсеивали из набора 1 (остатки подчеркнуты). Во избежание сомнений, набор 1 определяет аминокислотные остатки в пределах 10 Å центрального атома углерода глицерина в активном сайте 1IVN модели.

Аминокислотный набор 2.

Аминокислотный набор 2 (примечание: нумерация аминокислот относится к аминокислотам в зрелой последовательности P10480):

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

Таблица выбранных из набора 1 остатков по сравнению с набором 2.

[illegible]

Аминокислотный набор 3.

Аминокислотный набор 3 является идентичным набору 2, но относится к кодирующей последовательности *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID No. 4), т.е. номера аминокислотных остатков являются на 18 выше в наборе 3, поскольку это отражает отличие между нумерацией аминокислот в зрелом белке (SEQ ID No. 34) по сравнению с белком, включающим сигнальную последовательность (SEQ ID No. 25).

Зрелые белки *Aeromonas salmonicida* GDSX (SEQ ID No. 4) и *Aeromonas hydrophila* GDSX (SEQ ID No. 34) отличаются пятью аминокислотами. Таковые представляют собой Thr3Ser, Gln182Lys, Glu309Ala, Ser310Asn и Gly318-, где *salmonicida* остаток указывается первым, а *hydrophila* остаток указывается последним. Белок *hydrophila* имеет длину только 317 аминокислот и не содержит остатка в положении 318. *Aeromonas salmonicida* GDSX имеет в значительной степени более высокую активность на полярных липидах, таких как субстраты на основе галактолипида, чем белок *Aeromonas hydrophila*. Сканирование сайтов осуществляли во всех пяти аминокислотных положениях.

Аминокислотный набор 4.

Аминокислотный набор 4 представляет собой S3, Q182, E309, S310 и -318.

Аминокислотный набор 5:

F13S, D15N, S18G, S18V, Y30F, D1 16N, D116E, D157N, Y226F, D228N Y230F.

Аминокислотный набор 6.

Аминокислотный набор 6 представляет собой

Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80,
Pro81, Lys82, Asn 87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159,
Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169,
Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211,
Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318.

Нумерация аминокислот в наборе 6 относится к аминокислотным остаткам в P10480 (SEQ ID No. 25) - соответствующие аминокислоты в других каркасных последовательностях могут быть определены с помощью гомологичного выравнивания и/или структурного выравнивания до P10480 и/или 11VN.

Аминокислотный набор 7.

Аминокислотный набор 7 представляет собой

Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80,
Pro81, Lys82, Asn 87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159,
Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169,
Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211,
Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318, Y30X

(где X является выбранным из A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W), Y226X (где X является выбранным из A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W), Y230X (где X является выбранным из A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W), S18X (где X является выбранным из A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W или Y), D157X (где X является выбранным из A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y).

Нумерация аминокислот в наборе 6 относится к аминокислотным остаткам в P10480 (SEQ ID No. 25) - соответствующие аминокислоты в других каркасных последовательностях могут быть определены с помощью гомологичного выравнивания и/или структурного выравнивания до P10480 и/или 11VN.

Предпочтительно вариант фермента включает одну или более из следующих модификаций аминокислот по сравнению с исходным ферментом:

S3E, A, G, K, M, Y, R, P, N, T или G;
E309Q, R или A, предпочтительно Q или R;
-318Y, H, S или Y, предпочтительно Y.

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

Предпочтительно указанная первая исходная липидацилтрансфераза может включать любую из следующих аминокислотных последовательностей: SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 или SEQ ID No. 35.

Предпочтительно указанная вторая родственная липидацилтрансфераза может включать любую из следующих аминокислотных последовательностей: SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 или SEQ ID No. 35.

Вариант фермента должен включать по крайней мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходным ферментом. В некоторых воплощениях вариант фермента может включать по крайней мере 2, предпочтительно по крайней мере 3, предпочтительно по крайней мере 4, предпочтительно по крайней мере 5, предпочтительно по крайней мере 6, предпочтительно по крайней мере 7, предпочтительно по крайней мере 8, предпочтительно по крайней мере 9, предпочтительно по крайней мере 10 модификаций аминокислот по сравнению с исходным ферментом.

При ссылке на специфические аминокислотные остатки в данном описании представляет собой такую, полученную из выравнивания вариантной последовательности со стандартной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 34 или SEQ ID No. 35.

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

S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y; и/или
 L17A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 S18A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W или Y; и/или
 K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 Y30A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W; и/или
 G40A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 K82A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 N87A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 W111A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W или Y; и/или
 A114C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 Y117A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W; и/или
 L118A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 P156A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 G159A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 Q160A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W или Y; и/или
 N161A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 P162A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 S163A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y; и/или
 A164C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 R165A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W или Y; и/или
 S166A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y; и/или
 Q167A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W или Y; и/или
 K168A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 V169A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W или Y; и/или
 V170A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W или Y; и/или
 E171A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 A172C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W; и/или
 H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 N181A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 Q182A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W или Y, предпочтительно K; и/или
 M209A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 L210 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 R211 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 N215 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 Y226A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W; и/или
 Y230A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W; и/или
 K284A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 M285A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W или Y; и/или
 V290A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W или Y; и/или
 E309A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и/или
 S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y.

В дополнение к этому или альтернативно к этому, может существовать одно или более С-терминальных удлинений. Предпочтительно, когда дополнительное С-терминальное удлинение состоит

из одной или более алифатических аминокислот, предпочтительно полярной аминокислоты, более предпочтительно I, L, V или G. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно обеспечивает вариант фермента, включающий одно или более из следующих С-терминальных удлинений: 318I, 318L, 318V, 318G.

Предпочтительные варианты ферментов могут обладать сниженной гидролитической активностью в отношении фосфолипида, такого как фосфатидилхолин (ФХ), они могут также обладать повышенной трансферазной активностью из фосфолипида.

Предпочтительные варианты ферментов могут обладать трансферазной активностью из фосфолипида, такого как фосфатидилхолин (ФХ), таковые могут также обладать повышенной гидролитической активностью в отношении фосфолипида.

Модификация одного или более из следующих остатков может приводить к получению варианта фермента, обладающего повышенной абсолютной трансферазной активностью против фосфолипида:

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

Специфические предпочтительные модификации, которые могут обеспечивать вариант фермента, обладающего улучшенной трансферазной активностью из фосфолипида, могут быть выбраны из одного или более из следующих:

S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y; предпочтительно N, E, K, R,

A, P или M, наиболее предпочтительно S3A

D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно D157S,

R, E, N, G, T, V, Q, K или C

S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y; предпочтительно S310T

-318 E

E309A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W или Y; предпочтительно E309 R,

E, L, R или A

Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или W; предпочтительно Y179 D,

T, E, R, N, V, K, Q или S, более предпочтительно E, R, N, V, K или Q

N215A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно N215 S,

L, R или Y

K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно K22 E, R,

C или A

Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно Q289 R,

E, G, P или N

M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно M23 K, Q,

L, G, T или S

H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно H180 Q, R

или K

M209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно M209 Q,

S, R, A, N, Y, E, V или L

L210A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно L210 R,

A, V, S, T, I, W или M

R211A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W или Y; предпочтительно R211T

P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно P81G

V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W или Y; предпочтительно V112C

N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно N80 R, G,

N, D, P, T, E, V, A или G

L82A, C, D, E, F, G, H, I, M, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно L82N, S или E

N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно N88C

N87A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y; предпочтительно N87M или

G

Предпочтительные модификации одного или более из следующих остатков приводят к получению варианта фермента, обладающего повышенной абсолютной трансферазной активностью против фосфолипида:

S3 N, R, A, G

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

H180 R

L82 G

Y179 E, R, N, V, K или Q

E309 R, S, L или A

Одна предпочтительная модификация представляет собой N80D. Это, в частности, является случаем, когда стандартная последовательность SEQ ID No. 35 используется в качестве остова. Так, стандартная последовательность может представлять собой SEQ ID No. 16. Эта модификация может быть в комбинации с одной или более дополнительных модификаций. Таким образом, в предпочтительном воплощении настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в любом из способов и применений настоящего изобретения, может кодировать липидацилтрансферазу, которая включает SEQ ID No. 35, или аминокислотную последовательность, которая обладает 75% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, даже более предпочтительно 95% или более, даже более предпочтительно 98% или более или даже более предпочтительно 99% или более идентичностью по отношению к SEQ ID No. 35.

Как отмечалось выше, при ссылке на специфические аминокислотные остатки в соответствии с данным изобретением нумерация представляет собой такую, которая получена из выравнивания вариантной последовательности со стандартной последовательностью, которая представлена как SEQ ID No. 34 или SEQ ID No. 35

Еще более предпочтительно когда нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в любом из способов или применений настоящего изобретения, может кодировать липид, включающий аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 16, или аминокислотную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 68, или аминокислотную последовательность, которая обладает 70% или более, предпочтительно 75% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, даже более предпочтительно 95% или более, даже более предпочтительно 98% или более или даже более предпочтительно 99% или более идентичностью по отношению к SEQ ID No. 16 или SEQ ID No. 68. Этот фермент может считаться вариантом фермента.

Для целей настоящего изобретения степень идентичности основывается на количестве элементов последовательности, которые являются одинаковыми. Степень идентичности в соответствии с настоящим изобретением для аминокислотных последовательностей может быть предпочтительно определена с помощью компьютерных программ, которые являются известными в области техники, например, такой как Vector NTI 10 (Invitrogen Corp.). Для попарного выравнивания используемая оценка предпочтительно представляет собой BLOSUM62 со штрафом за внесение делеции в выравнивание 10,0 и со штрафом за продолжение делеции 0,1.

Предпочтительно степень идентичности по отношению к аминокислотной последовательности определяется на протяжении по крайней мере 20 смежных аминокислот, предпочтительно на протяжении по крайней мере 30 смежных аминокислот, предпочтительно на протяжении по крайней мере 40 смежных аминокислот, предпочтительно на протяжении по крайней мере 50 смежных аминокислот, предпочтительно на протяжении по крайней мере 60 смежных аминокислот.

Предпочтительно степень идентичности по отношению к аминокислотной последовательности может определяться на протяжении всей последовательности.

Предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу или фермент липидацилтрансферазу для использования в настоящем изобретении, может быть получаемой, предпочтительно полученной, из организмов, выбранных из одного или более следующих родов: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfotobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Candida*, *Thermobifida* и *Corynebacterium*.

Предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу или фермент липидацилтрансферазу для использования в настоящем изобретении, может быть получаемой, предпочтительно полученной, из одного из следующих организмов: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptomyces thermosacchari*, *Streptomyces avermitilis*, *Lactobacillus helveticus*, *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Bacillus* sp., *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Candida parapsilosis*, *Thermobifida fusca* и *Corynebacterium efficiens*.

В одном аспекте предпочтительно, когда нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, кодирует фермент липидацилтрансферазу в соответствии с настоящим изобретением, является получаемой, предпочтительно полученной, или имеет происхождение из одного или более организмов *Aeromonas* spp., *Aeromonas hydrophila* или *Aeromonas salmonicida*.

В одном аспекте предпочтительно, когда липидацилтрансфераза для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения представляет собой фермент липидацилтрансферазу, получаемый, предпочтительно полученный, или имеет происхождение из одного или более организмов *Aeromonas* spp., *Aeromonas hydrophila* или *Aeromonas salmonicida*.

Термин "трансфераза", как используется в данном описании, употребляется попеременно с термином "липидацилтрансфераза".

Предпочтительно липидацилтрансфераза, как определено в данном описании, катализирует одну или более из следующих реакций: интерэстерификацию, трансэстерификацию, алкоголиз, гидролиз.

Термин "интерэстерификация" относится к катализируемому ферментом переносу ацильных групп между липидным донором и липидным акцептором, в данном описании липидный донор не представляет собой свободную группу ацила.

Термин "трансэстерификация", как используется в данном описании, означает катализируемый ферментом перенос ацильной группы из липидного донора (отличного от свободной жирной кислоты) на акцептор ацила (отличный от воды).

Как используется в данном описании, термин "алкоголиз" относится к ферментативному расщеплению ковалентной связи кислотной производной с помощью реакции с участием ROH спирта так, что один из продуктов объединяется с H спирта, а другой продукт соединяется с OR группой спирта.

Как используется в данном описании, термин "спирт" относится к алкильному соединению, содержащему гидроксильную группу.

Как используется в данном описании, термин "гидролиз" относится к ферментативному катализируемому переносу ацильной группы из липида на OH группу молекулы воды.

Термин "без повышения или без существенного повышения уровня свободных жирных кислот", как используется в данном описании, означает, что предпочтительно липидацилтрансфераза в соответствии с настоящим изобретением обладает 100% трансферазной активностью (т.е. переносит 100% ацильных групп из донора ацила на акцептор ацила, при отсутствии гидролитической активности); однако фермент может переносить менее чем 100% ацильных групп, присутствующих в доноре липидного ацила, на акцептор ацила. В этом случае ацилтрансферазная активность предпочтительно составляет по крайней мере 5%, более предпочтительно по крайней мере 10%, более предпочтительно по крайней мере 20%, более предпочтительно по крайней мере 30%, более предпочтительно по крайней мере 40%, более предпочтительно 50%, более предпочтительно по крайней мере 60%, более предпочтительно по крайней мере 70%, более предпочтительно по крайней мере 80%, более предпочтительно по крайней мере 90% и более предпочтительно по крайней мере 98% общей активности фермента. % трансферазной активности (т.е. трансферазная активность как процент общей ферментативной активности) может быть определена с помощью приведенного "Анализа на трансферазную активность", приведенного выше.

В некоторых аспектах настоящего изобретения термин "без существенного повышения уровня свободных жирных кислот", как используется в данном описании, означает, что количество свободной жирной кислоты в съедобном масле, обработанном с помощью липидацилтрансферазы в соответствии с настоящим изобретением, является меньшим, чем количество свободной жирной кислоты, образовавшейся в съедобном масле тогда, когда использовался фермент, отличный от липидацилтрансферазы в соответствии с настоящим изобретением, так, как, например, по сравнению с количеством свободной жирной кислоты, образовавшейся тогда, когда использовался традиционный фермент фосфолипаза, например Lecitase Ultra™ (Novozymes A/S, Denmark).

Термин "существенно состоит из", как используется в данном описании, когда относится к продукту или композиции, предпочтительно означает, что продукт или композиция могут состоять из других продуктов или композиций, но только до максимальной концентрации предпочтительно 10%, такой как 5%, такой как 3%, такой как 2%, или 1%, или 0,5%, или 0,1%.

В одном предпочтительном воплощении липидацилтрансфераза используется в комбинации с липазой, обладающей одной или более из следующих ферментных характеристик: гликолипазная активность (Е.С. 3.1.1.26, фосфолипазная А2 активность (Е.С. 3.1.1.4) или фосфолипазная А1 активность (Е.С. 3.1.1.32). Предпочтительно, когда липазные ферменты являются хорошо известными в уровне техники и включают в качестве примера следующие липазы: фосфолипазу А1 LECITASE[®] ULTRA (Novozymes A/S, Denmark), фосфолипазу А2 (например, фосфолипазу А2 из LIPOMOD[®] 22L от Biocatalysts, LIPOMAX[®] и LysoMax PLA2[®] от Genecor), LIPOLASE[®] (Novozymes A/S, Denmark).

Также может быть предпочтительным объединять применение липидацилтрансферазы с фосфолипазой, такой как фосфолипаза А1, фосфолипаза А2, фосфолипаза В, фосфолипаза С и/или фосфолипаза D.

Сочетанное применение может осуществляться последовательно или одновременно, например обработка с помощью липидацилтрансферазы может осуществляться до или во время дополнительной ферментной обработки. Альтернативно, дополнительная ферментная обработка может осуществляться до или во время обработки с помощью липидацилтрансферазы.

В случае последовательных ферментных обработок в некоторых воплощениях может быть желательным удалять первый используемый фермент, например, с помощью тепловой дезактивации или при использовании иммобилизованного фермента, перед обработкой с помощью второго (и/или третьего и т.д.) фермента.

Посттранскрипционная и посттрансляционная модификации.

Предпочтительно липидацилтрансфераза в соответствии с настоящим изобретением может кодироваться любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в данном патенте.

В зависимости от используемой хозяйской клетки могут осуществляться посттранскрипционная и/или посттрансляционная модификации. Предусматривается, что липидацилтрансфераза для использования в способах и/или применениях в соответствии с настоящим изобретением охватывает липидацилтрансферазы, которые подверглись посттранскрипционной и/или посттрансляционной модификации.

Только в качестве примера, экспрессия нуклеотидной последовательности, показанной в данном описании как SEQ ID No. 49 (см. фиг. 57), в хозяйской клетке (такой как *Bacillus licheniformis*, например) приводит к посттранскрипционной и/или посттрансляционной модификациям, что ведет к получению аминокислотных последовательностей, представленных в данном описании как SEQ ID No. 68 (см. фиг. 73).

SEQ ID No. 68 является такой же, как и SEQ ID No. 16 (представлена на фиг. 1), за исключением того, что SEQ ID No. 68 подверглась посттрансляционной и/или посттранскрипционной модификациям для удаления 38 аминокислот.

Изолированная.

В одном аспекте липидацилтрансфераза представляет собой извлеченную/изолированную липидацилтрансферазу. Таким образом, полученная липидацилтрансфераза может быть в изолированной форме.

В другом аспекте нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в настоящем изобретении, может быть в изолированной форме.

Термин "изолированный" означает, что последовательность или белок является, по крайней мере, существенно свободным по крайней мере от одного другого компонента, с которым последовательность или белок обычно ассоциируется в природе или как он обнаружен в природе.

Очищенная.

В одном аспекте липидацилтрансфераза может быть в очищенной форме.

В другом аспекте нуклеотидная последовательность, кодирующая у липидацилтрансферазу для использования в настоящем изобретении, может быть в очищенной форме.

Термин "очищенная" означает, что последовательность находится в относительно чистом состоянии, например является по крайней мере приблизительно на 51% чистой, или по крайней мере приблизительно на 75%, или по крайней мере приблизительно на 80%, или по крайней мере приблизительно на 90% чистой, или по крайней мере приблизительно на 95% чистой, или по крайней мере приблизительно на 98% чистой.

Клонирование нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид в соответствии с настоящим изобретением.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая либо полипептид, который обладает специфическими свойствами, как определено в данном описании, либо полипептид, который является приемлемым для модификации, может быть изолирована из любой клетки или организма, продуцирующего указанный полипептид. В области техники являются хорошо известными различные способы для изоляции нуклеотидных последовательностей.

Например, может быть сконструирована геномная ДНК и/или кДНК библиотека при использовании хромосомной ДНК или информационной РНК из организма, продуцирующего этот полипептид. Если аминокислотная последовательность полипептида является известной, то могут быть синтезированы и

использованы меченые олигонуклеотидные зонды для идентификации клонов, кодирующих полипептид из геномной библиотеки, полученной из организмов. Альтернативно, меченые олигонуклеотидные зонды, содержащие последовательности, гомологичные гену другого известного полипептида, могут использоваться для идентификации клонов, кодирующих полипептид. В последнем случае используются условия гибридизации и промывания более низкой жесткости.

Альтернативно, клоны, кодирующие полипептид, могут быть идентифицированы путем встраивания фрагментов геномной ДНК в экспрессионный вектор, такой как плаزمид, трансформации негативной по ферменту бактерии с помощью полученной ДНК библиотеки и последующего высевания трансформированных бактерий на агар, содержащий фермент, который ингибируется полипептидом, с помощью чего могут быть идентифицированы клоны, экспрессирующие полипептид.

Еще в одном альтернативном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, может быть получена синтетически с помощью установленных стандартных способов, например с помощью фосфорамидатного способа, описанного Beucage S.L. et al. (1981), *Tetrahedron Letters*. 22, p. 1859-1869, или способа, описанного Matthes et al. (1984), *EMBO J.* 3, p. 801-805. При фосфоамидадном способе олигонуклеотиды синтезируются, например, в автоматическом ДНК синтезаторе, очищаются, отжигаются, лигируются и клонируются в приемлемые векторы.

Нуклеотидная последовательность может иметь смешанное геномное и синтетическое происхождение, смешанное синтетическое и кДНК происхождения или смешанное геномное и кДНК происхождения, полученное с помощью лигирования фрагментов синтетического, геномного или кДНК происхождения (если это является приемлемым) в соответствии со стандартными методиками. Каждый лигированный фрагмент соответствует различным частям цельной нуклеотидной последовательности. ДНК последовательность может также быть полученной с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) при использовании специфических праймеров, например, как описано в US 4683202 или у Saiki R.K et al. (*Science* (1988), 239, p. 487-491).

Нуклеотидные последовательности.

Настоящее изобретение также охватывает нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, обладающие специфическими свойствами, как определено в данном описании. Термин "нуклеотидная последовательность", как используется в данном описании, относится к олигонуклеотидной последовательности или полинуклеотидной последовательности, а также варианту, гомологам, фрагментам и их производным (таким как их части). Нуклеотидная последовательность может иметь геномное, или синтетическое, или рекомбинантное происхождение, при этом она может быть двухцепочечной или одноцепочечной, представляя собой либо смысловую, либо антисмысловую цепочку.

Термин "нуклеотидная последовательность" в отношении настоящего изобретения включает геномную ДНК, кДНК, синтетическую ДНК и РНК. Предпочтительно это означает ДНК, более предпочтительно кДНК для кодирующей последовательности.

В предпочтительном воплощении нуклеотидная последовательность *per se*, кодирующая полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, не охватывает нативную нуклеотидную последовательность в ее природном окружении, когда она является связанной с природной(ыми), ассоциированной(ыми) с ней последовательность(ями), которая(ые) также пребывает(ют) в своем природном окружении. Для облегчения ссылки, будем называть это предпочтительное воплощение "ненативной нуклеотидной последовательностью". В этой связи термин "нативная нуклеотидная последовательность" означает цельную нуклеотидную последовательность, которая находится в своем нативном окружении и когда является оперативно связанной с цельным промотором, с которым она обычно ассоциируется, при этом промотор также находится в своем нативном окружении. Таким образом, полипептид настоящего изобретения может экспрессироваться нуклеотидной последовательностью в ее нативном организме, но где нуклеотидная последовательность не находится под контролем промотора, с которым она обычно ассоциируется в таком организме.

Предпочтительно полипептид не является нативным полипептидом. В этой связи термин "нативный полипептид" означает цельный полипептид, который находится в своем нативном окружении и тогда, когда он экспрессирован его нативной нуклеотидной последовательностью.

Типично, нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, обладающие специфическими свойствами, как определено в данном описании, получают при использовании методик рекомбинантной ДНК (т.е. при использовании рекомбинантной ДНК). Однако в альтернативном воплощении изобретения нуклеотидная последовательность может быть синтезирована, полностью или частично, при использовании химических способов, хорошо известных в уровне техники (см. Caruthers M.H. et al. (1980), *Nuc. Acid. Res. Symp. Ser.* 215-23 и Horn T. et al. (1980), *Nuc. Acid. Res. Symp. Ser.* 225-232).

Молекулярная эволюция.

Когда нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент, была изолирована, или путативная нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент, была идентифицирована, то может быть желательным модифицировать выбранную нуклеотидную последовательность, например может быть желательным мутировать последовательность для того, чтобы получить фермент в соответствии с настоящим изобретением.

Мутации могут быть введены при использовании синтетических олигонуклеотидов. Такие олигонуклеотиды содержат нуклеотидные последовательности, фланкирующие желаемые сайты мутаций.

Приемлемый способ является раскрытым у Morinaga et al. (Biotechnology (1984), 2, p. 646-649). Другой способ введения мутаций в нуклеотидные последовательности, кодирующие фермент, описаны у Nelson и Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p. 147-151).

Вместо сайт-направленного мутагенеза так, как описано выше, можно вводить мутации случайным образом, например, при использовании коммерческого набора, такого как набор для ПЦР мутагенеза GeneMorph PCR от Stratagene, или диверсифицированного набора для ПЦР случайного мутагенеза от Clontech. EP 0583265 относится к способам оптимизации мутагенеза на основе ПЦР, которые могут также сочетаться с применением мутагенных ДНК аналогов, таких как те, что описаны в EP 0866796. Методики подверженной ошибкам ПЦР являются приемлемыми для получения вариантов липидацилтрансфераз с желательными характеристиками. WO 02/06457 относится к молекулярной эволюции липаз.

Третий способ для получения новых последовательностей представляет собой фрагментацию неидентичных нуклеотидных последовательностей либо при использовании любого числа рестрикционных ферментов, либо фермента, такого как ДНКаза I, и повторную сборку полных нуклеотидных последовательностей, кодирующих функциональные белки. Альтернативно, можно использовать одну или множественные неидентичные нуклеотидные последовательности и вводить мутации во время повторной сборки цельной нуклеотидной последовательности. Методики перестановки в ДНК и перестановки в семействах являются приемлемыми для получения вариантов липидацилтрансфераз с желательными характеристиками. Приемлемые способы для осуществления "перестановки" могут быть найдены в EP 0752008, EP 1138763, EP 1103606. Перестановка может также сочетаться с другими формами ДНК мутагенеза, как описано в US 6180406 и WO 01/34835.

Таким образом, является возможным получать многочисленные сайт-направленные или случайные мутации в нуклеотидной последовательности либо *in vivo*, либо *in vitro* и осуществлять последующий скрининг на улучшенную функциональность кодируемого полипептида различными способами. При использовании компьютерного моделирования биологического эксперимента и экзопосредованных способов рекомбинации (см. WO 00/58517, US 6344328, US 6361974), например, молекулярную эволюцию можно осуществлять тогда, когда полученный вариант сохраняет очень низкую гомологию с известными ферментами или белками. Такие варианты, полученные таким образом, могут обладать значительной структурной аналогией с известными трансферазными ферментами, но имеют очень низкую гомологию аминокислотной последовательности.

В качестве нелимитирующего примера, в дополнение, мутации или природные варианты полинуклеотидной последовательности могут подвергаться рекомбинации либо с мутациями дикого типа, либо с другими мутациями или природными вариантами с получением новых вариантов. Такие новые варианты могут также подвергаться скринингу на улучшенную функциональность кодируемого полипептида.

Применение упомянутых выше и подобных способов молекулярной эволюции позволяет идентифицировать и отобрать варианты ферментов настоящего изобретения, которые обладают желательными характеристиками без каких-либо предварительных знаний о структуре или функции белка, а также позволяет получить неспрогнозированные, но благоприятные мутации или варианты. Существуют многочисленные примеры применения молекулярной эволюции в области техники для оптимизации или изменения ферментативной активности, такие примеры включают, но без ограничения, один или более из перечисленных выше: оптимизированная экспрессия и/или активность в хозяйской клетке или *in vitro*, повышенная ферментативная активность, измененная специфичность в отношении субстрата и/или продукта, повышенная или сниженная ферментативная или структурная стабильности, измененная ферментативная активность/специфичность в предпочтительных условиях окружающей среды, например температура, pH, субстрат.

Как будет очевидным для специалиста в данной области техники, при использовании методик молекулярной эволюции фермент может подвергаться изменению для улучшения функциональности фермента.

Предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу, используемую в данном изобретении, может кодировать вариант липидацилтрансферазы, т.е. липидацилтрансфераза может содержать по крайней мере одну аминокислотную замену, делецию или присоединение, по сравнению с исходным ферментом. Вариантные ферменты сохраняют по крайней мере 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 99% гомологии с исходным ферментом. Приемлемые исходные ферменты могут включать любой фермент с эстеразной или липазной активностью. Предпочтительно исходный фермент выравнивают до pfam00657 консенсусной последовательности.

В предпочтительном воплощении вариантный фермент липидацилтрансферазы сохраняет или включает по крайней мере один или более аминокислотных остатков pfam00657 консенсусных последовательностей, обнаруженных в GDSX, GANDY и HPT блоках.

Ферменты, такие как липазы с отсутствующей или низкой липидацилтрансферазной активностью, в водном окружении могут подвергаться мутации при использовании методик молекулярной эволюции для введения или совершенствования трансферазной активности, полученный таким образом фермент

липидацилтрансферазы со значительной трансферазной активностью является приемлемым для использования в композициях и способах настоящего изобретения.

Предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения, может кодировать липидацилтрансферазу, которая может представлять собой вариант с улучшенной ферментативной активностью на полярных липидах, предпочтительно фосфолипидах и/или гликолипидах, по сравнению с исходным ферментом. Предпочтительно такие варианты также обладают низкой или не обладают активностью на лизополярных липидах. Улучшенная активность на полярных липидах, фосфолипидах и/или гликолипидах может быть результатом гидролиза и/или трансферазной активности или их комбинацией.

Вариант липидацилтрансферазы может иметь сниженное влияние на триглицериды, и/или моноглицериды, и/или диглицериды по сравнению с исходным ферментом.

Предпочтительно вариант фермента может не обладать влиянием на триглицериды и/или моноглицериды и/или диглицериды.

Альтернативно, вариант фермента может обладать повышенной термостабильностью. Вариант фермента может иметь повышенную активность в отношении одного или более из следующих: полярные липиды, фосфолипиды, лецитин, фосфатидилхолин, гликолипиды, дигалактозил моноглицерид, моногалактозил моноглицерид.

Варианты липидацилтрансферазы являются известными, и один или более таких вариантов могут быть приемлемыми для использования в способах и применениях в соответствии с настоящим изобретением и/или в ферментных композициях в соответствии с настоящим изобретением. Только в качестве примера, варианты липидацилтрансферазы описываются в следующих ссылках, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением: Hilton & Buckley J. Biol. Chem. 1991 Jan. 15: 266(2):997-1000; Robertson et al. J. Biol. Chem. 1994 Jan. 21; 269(3):2146-50; Brumlik et al. J. Bacteriol. 1996 Apr.; 178(7):2060-4; Peelman et al. Protein Sci. 1998 Mar.; 7(3):587-99.

Аминокислотные последовательности.

Настоящее изобретение также охватывает применение аминокислотных последовательностей, которые кодируются нуклеотидной последовательностью, которая кодирует липидацилтрансферазу для использования в одном из способов и/или применений настоящего изобретения.

Как используется в данном описании, термин "аминокислотная последовательность" является синонимом с термином "полипептид" и/или термином "белок". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимичным с термином "пептид".

Аминокислотная последовательность может быть получена/изолирована из приемлемого источника, или она может быть получена синтетически, или она может быть получена при использовании методик рекомбинантной ДНК.

Предпочтительно аминокислотные последовательности могут быть получены из изолированных полипептидов, описанных в данном патенте, с помощью стандартных методик.

Один приемлемый способ для определения аминокислотных последовательностей из изолированных полипептидов представляет собой следующий

Очищенный полипептид может быть лиофилизирован, и 100 мкг лиофилизованного материала может растворяться в 50 мкл смеси 8 М мочевины и 0,4 М гидрокарбоната аммония, pH 8,4. Растворенный белок может быть денатурирован и восстановлен в течение 15 мин при 50°C после покрытия азотом и прибавления 5 мкл 45 мМ дитиотреитола. После охлаждения до комнатной температуры 5 мкл 100 мМ йодацетамида может прибавляться для дериватизации остатков цистеина в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте в атмосфере азота.

135 мкл воды и 5 мкг эндопротеиназы Lys-C в 5 мкл воды может прибавляться к упомянутой выше реакционной смеси, и переваривание может осуществляться при 37°C в атмосфере азота в течение 24 ч.

Полученные пептиды могут быть разделены с помощью ВЭЖХ с обратной фазой на VYDAC C18 колонке (0,46×15 см; 10 мкм; The Separation Group, California, USA) при использовании растворителя А: 0,1% ТФУ в воде и растворителя В: 0,1% ТФУ в ацетонитриле. Выбранные пептиды могут повторно подвергаться хроматографии на Develosil C18 колонке при использовании той же системы растворителей, перед N-терминальным секвенированием. Секвенирование может быть осуществлено при использовании секвенатора 476А от Applied Biosystems с помощью импульсных жидкостных быстрых циклов в соответствии с инструкциями производителя (Applied Biosystems, California, USA).

Идентичность последовательностей или гомология последовательностей.

В данном описании термин "гомолог" означает сущность, обладающую определенной гомологией с аминокислотными последовательностями, представляющими предмет данного изобретения, и нуклеотидными последовательностями, представляющими предмет данного изобретения. В данном описании термин "гомология" может быть эквивалентным с "идентичностью".

Гомологичная аминокислотная последовательность и/или нуклеотидная последовательность будут обеспечивать и/или кодировать полипептид, который сохраняет функциональную активность и/или улучшает эту активность фермента.

В контексте данного изобретения гомологичная последовательность взята для включения аминокислотной последовательности, которая может быть по крайней мере на 75, 85 или 90% идентичной, предпочтительно по крайней мере на 95 или 98% идентичной последовательности, которая составляет предмет данного изобретения. Типично, гомологи будут включать те же активные сайты и т.п., что и аминокислотная последовательность, представляющая предмет изобретения. Несмотря на то что гомология также может рассматриваться с точки зрения подобия (т.е. аминокислотные остатки, обладающие подобными химическими свойствами/функциями), в контексте настоящего изобретения является предпочтительным выражать гомологию с точки зрения идентичности последовательности.

В контексте данного изобретения гомологичная последовательность взята для включения нуклеотидной последовательности, которая может быть по крайней мере на 75, 85 или 90% идентичной, предпочтительно по крайней мере на 95 или 98% идентичной последовательности, кодирующей полипептид настоящего изобретения (последовательность, которая представляет собой предмет данного изобретения). Типично, гомологи будут включать одинаковые последовательности с теми, которые кодируют активные сайты и т.п., что и последовательность, представляющая предмет изобретения. Несмотря на то что гомология также может рассматриваться с точки зрения подобия (т.е. аминокислотные остатки, обладающие подобными химическими свойствами/функциями), в контексте настоящего изобретения является предпочтительным выражать гомологию с точки зрения идентичности последовательности.

Сравнение на гомологию может осуществляться визуально, или чаще, с использованием легкодоступных программ сравнения последовательностей. Такие коммерчески доступные компьютерные программы могут подсчитывать % гомологии между двумя или более последовательностями.

% гомологии может подсчитываться на протяжении смежных последовательностей, т.е. одна последовательность представляет собой выровненную с другой последовательностью, и каждая аминокислота в одной последовательности непосредственно сравнивается с соответствующей аминокислотой в другой последовательности, один остаток одновременно. Это называется выравнивание "без пробелов". Типично, такие выравнивания без пробелов осуществляют только на протяжении относительно небольшого количества остатков.

Несмотря на то что это очень простой и унифицированный способ, он не принимает во внимание, что, например, могут существовать иным образом идентичные пары последовательностей, одна вставка или делеция будут причиной того, что последующие аминокислотные остатки не будут подвергаться выравниванию, потенциально приводя, таким образом, к большому снижению % гомологии, когда осуществляется общее выравнивание. Следовательно, наилучшие способы сравнения последовательностей предназначены для получения оптимальных выравниваний, которые принимают во внимание возможные инсерции и делеции при отсутствии неправильного наложения штрафных санкций на общий балл гомологии. Этого достигают путем встраивания "пробелов" в выравнивание последовательностей для того, чтобы постараться максимизировать локальную гомологию.

Однако эти более сложные способы назначают "штраф за пробел в последовательности" на каждый пробел, который появляется в выравнивании, так что для одинаковых номеров идентичных аминокислот выравнивание последовательностей с настолько малым количеством пробелов, насколько это является возможным - отражение более высокого родства между двумя сравниваемыми последовательностями - будет достигаться более высокий балл, чем для таковой с большим количеством пробелов. "Цена подобных пробелов" типично используется, чтобы назначить относительно высокую цену за существования пробела для каждого последующего остатка в пробеле. Это представляет собой наиболее часто используемую систему балльного оценивания пробела. Высокие штрафы за пробел будут, безусловно, получать оптимизированные выравнивания с меньшим количеством пробелов. Наиболее оптимизированные программы выравнивания позволяют модифицировать штрафы за пробелы в последовательности. Однако является желательным применять значения по умолчанию при использовании такого программного обеспечения для сравнения последовательностей.

Подсчет максимального % гомологии, таким образом, прежде всего требует получения оптимального выравнивания, принимая во внимание штрафы за пробелы в последовательности. Приемлемая компьютерная программа для осуществления такого выравнивания представляет собой Vector NTI (Invitrogen Corp.). Примеры других программ, которые могут осуществлять сравнение последовательностей, включают, но без ограничения, BLAST программное обеспечение (см. Ausubel et al. 1999, Short Protocols in Molecular Biology, 4-е изд. - Глава 18) и FASTA (Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol. 403-410). Как BLAST, так и FASTA являются доступными для автономного поиска и поиска в режиме on-line (см. Ausubel et al. 1999, p. 7-58 - 7-60). Однако для некоторых применений является предпочтительным использовать программу Vector NTI. Новое средство BLAST 2 Sequences также является доступным для сравнения белковой и нуклеотидной последовательностей (см. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 174(2):247-50; FEMS Microbiol. Lett. 1999, 177(1):187-8 и tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Несмотря на то что заключительный % гомологии может измеряться с точки зрения идентичности, процесс выравнивания сам по себе типично не основывается на попарном сравнении все-или-ничего. В качестве альтернативы, обычно используется пересчитанный балл подобия матрицы для каждого попарного сравнения на основе химического подобия или эволюционной отдаленности. Пример такой обычно

используемой матрицы представляет собой BLOSUM62 матрицу - матрицу по умолчанию для BLAST пакета программ. Программы Vector NTI в общем случае используют либо общедоступные параметры по умолчанию, либо обыкновенную таблицу сравнения символов, если такая обеспечивается (см. руководство для пользователей для дополнительных деталей). Для некоторых применений является предпочтительным использовать параметры по умолчанию для Vector NTI программного обеспечения.

Альтернативно, процент гомологии может быть подсчитан при использовании множественного элемента выравнивания в Vector NTI (Invitrogen Corp.) на основе алгоритма, аналогичного CLUSTAL (Higgins D.G. & Sharp P.M. (1988), Gene 73(1), 237-244).

Если программное обеспечение дает оптимальное выравнивание, то является возможным подсчитать % гомологии, предпочтительно % идентичности последовательностей. Программное обеспечение представляет собой часть сравнения последовательностей и обеспечивает числовое выражение результата.

В случае если будут использоваться штрафы за пробелы при определении идентичности последовательности, то предпочтительно используются следующие параметры для попарного выравнивания.

ДЛЯ BLAST			
ОТКРЫТИЕ ПРОБЕЛА		0	
УДЛИНЕНИЕ ПРОБЕЛА		0	
ДЛЯ CLUSTAL	ДНК	БЕЛОК	
ДЛИНА СЛОВА	2	1	К тройка
ШТРАФ ЗА ПРОБЕЛ В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	15	10	
УДЛИНЕНИЕ ПРОБЕЛА	6,66	0,1	

В одном воплощении идентичность последовательности предпочтительно для нуклеотидных последовательностей определяется при использовании CLUSTAL при использовании штрафа за пробел в последовательности и удлинение пробела, как определено выше.

Предпочтительно степень идентичности в отношении нуклеотидной последовательности определяется на протяжении по крайней мере 20 смежных нуклеотидов, предпочтительно на протяжении по крайней мере 30 смежных нуклеотидов, предпочтительно на протяжении по крайней мере 40 смежных нуклеотидов, предпочтительно на протяжении по крайней мере 50 смежных нуклеотидов, предпочтительно на протяжении по крайней мере 60 смежных нуклеотидов, предпочтительно на протяжении по крайней мере 100 смежных нуклеотидов.

Предпочтительно степень идентичности в отношении нуклеотидной последовательности может быть определена на протяжении всей последовательности.

В одном воплощении степень идентичности аминокислотной последовательности в соответствии с настоящим изобретением может быть предпочтительно определена с помощью компьютерных программ, известных из уровня техники, таких как Vector NTI 10 (Invitrogen Corp.). Для попарного выравнивания используемая матрица предпочтительно представляет собой BLOSUM62 со штрафом за открытие пробела 10,0 и со штрафом за удлинение пробела 0,1.

Предпочтительно степень идентичности в отношении аминокислотной последовательности определяется на протяжении по крайней мере 20 смежных аминокислот, предпочтительно на протяжении по крайней мере 30 смежных аминокислот, предпочтительно на протяжении по крайней мере 40 смежных аминокислот, предпочтительно на протяжении по крайней мере 50 смежных аминокислот, предпочтительно на протяжении по крайней мере 60 смежных аминокислот.

Предпочтительно степень идентичности в отношении аминокислотной последовательности может быть определена на протяжении всей последовательности.

Последовательности могут также содержать делеции, инсерции или замены аминокислотных остатков, которые обеспечивают молчащие изменения и приводят к получению функционально эквивалентного вещества. Преднамеренная замена аминокислот может быть осуществлена на основе их подобия в полярности, заряде, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы остатков при условии, что сохраняется вторичная связывающая активность вещества. Например, негативно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; позитивно заряженные аминокислоты включают лизин и аргинин; а аминокислоты с незаряженными полярными концевыми группами, обладающие подобными значениями гидрофильности, включают лейцин, изолейцин, валин, глицин, аланин, спаргин, глутамин, серин, треонин, фенилаланин и тирозин.

Консервативные замены могут быть осуществлены, например, в соответствии с таблицей, приведенной ниже. Аминокислоты в том же блоке во второй колонке и предпочтительно в той же строке третьей колонки могут быть замещены друг другом.

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

Настоящее изобретение также охватывает гомологичные замещения (термины замещения и замены, оба, используются в данном описании для понимания замены существующего аминокислотного остатка альтернативным остатком), которые могут осуществляться, т.е. замещения подобного на подобный, такие как основной на основной, кислый на кислый, полярный на полярный и т.п. Могут также осуществляться негомологичные замещения, т.е. замены остатков одного класса на остаток другого класса, или альтернативно, при вовлечении неприродных аминокислот, таких как орнитин (в данном описании далее обозначается как Z), орнитин диаминомасляная кислота (в данном описании далее обозначается как B), норлейцин орнитин (в данном описании далее обозначается как O), пириилаланин, тиенилаланин, нафтилаланин и фенилглицин.

Замены могут также осуществляться с помощью неприродных аминокислот.

Варианты аминокислотных последовательностей могут включать приемлемые спейсерные группы, которые могут быть встроены между любыми двумя аминокислотными остатками последовательности, включая алкильные группы, такие как группы метила, этила или пропила в дополнение к аминокислотным спейсерам, таким как остатки глицина или β -аланина. Дополнительная форма вариации вовлекает присутствие одного или более аминокислотных остатков в форме пептоида, что является хорошо понятным квалифицированному специалисту в данной области техники. Во избежание сомнений, "форма пептоида" используется для обозначения варианта аминокислотных остатков, в котором группа заместителя α -углерода на остатке атома азота является более предпочтительной, чем α -углерод. Способы получения пептидов в форме пептоида являются хорошо известными в области техники, например, Simon R.J. et al., PNAS (1992), 89(20), 9367-9371 и Horwell D.C., Trends Biotechnol. (1995), 13(4), 132-134.

Нуклеотидные последовательности для использования в настоящем изобретении или кодирующие полипептид, обладающий специфическими свойствами, определенными в данном описании, могут включать в себя синтетические или модифицированные нуклеотиды. Ряд различных типов модификаций олигонуклеотидов является известным в области техники. Такие включают метилфосфонатные и фосфориотатные скелеты и/или добавления цепей акридина или полилизина на 3'- и/или 5'- концах молекулы. Для целей настоящего изобретения является понятным, что нуклеотидные последовательности, описанные в данном изобретении, могут быть модифицированы с помощью любого из способов, известных в области техники. Такие модификации могут осуществляться для того, чтобы улучшить *in vivo* активность или длительность существования нуклеотидных последовательностей.

Настоящее изобретение также охватывает применение нуклеотидных последовательностей, которые являются комплементарными последовательностям, которые обсуждаются в данном описании, или любой производной, фрагменту или их производной. Если последовательность является комплементарной их фрагменту, то такая последовательность может использоваться в качестве зонда для идентификации подобных кодирующих последовательностей в других организмах и т.п.

Полинуклеотиды, которые не являются на 100% гомологичными последовательностям настоящего изобретения, но подпадают под объем изобретения, могут быть получены разными путями. Другие варианты последовательностей, описанных в данном изобретении, могут быть получены, например, путем зондирования ДНК библиотек, полученных из спектра индивидуумов, например индивидуумов из различных популяций. Кроме того, могут быть получены другие вирусные/бактериальные или клеточные гомологи, в частности клеточные гомологи, обнаруженные в клетках млекопитающих (например, клетках крыс, мышей, коров и приматов), и такие гомологи и их фрагменты в общем случае будут способными селективно гибридизоваться с последовательностями, показанными в списке последовательностей в данном описании. Такие последовательности могут быть получены путем зондирования кДНК библиотек или геномных ДНК библиотек, полученных из других видов животных, и зондирования таких библиотек с помощью зондов, включающих всю или часть любой из последовательностей, приведенных в приложенном списке последовательностей, при условиях от средней до высокой степени жесткости. Подобные рассуждения применяются для получения видовых гомологов и аллельных вариантов полипептидных или нуклеотидных последовательностей в соответствии с изобретением.

Варианты и штаммо/видоспецифичные гомологи могут также быть получены при использовании выработанной ПЦР, которая будет использовать праймеры, которые предназначены для нацеливания последовательностей в вариантах и гомологах, кодирующих консервативные аминокислотные последовательности в рамках последовательностей настоящего изобретения. Консервативные последовательности могут быть предсказаны, например, путем прибавления аминокислотных последовательностей из нескольких вариантов/гомологов. Выравнивание последовательностей будет осуществляться при использовании

компьютерной программы, известной в области техники. Например, широко используется программа GCG Wisconsin PileUp.

Праймеры, которые используются в вырожденной ПЦР, будут содержать одно или более вырожденное положение и будут использоваться при условиях жесткости, более низких, чем те, которые используются для клонирования последовательностей с праймерами единичной последовательности против известных последовательностей.

Альтернативно, такие полинуклеотиды могут быть получены с помощью сайт-направленного мутагенеза охарактеризованных последовательностей. Это может быть полезным, например, тогда, когда изменения последовательности молчащего кодона требуются для оптимизации предпочтительности кодонов для частной хозяйской клетки, в которой полинуклеотидные последовательности экспрессируются. Другие изменения последовательности могут быть желательными для того, чтобы ввести сайты узнавания рестрикции полипептида или для того, чтобы изменить свойство или функцию полипептидов, кодируемых полинуклеотидами.

Полинуклеотиды (нуклеотидные последовательности) в соответствии с изобретением могут использоваться для получения праймера, например ПЦР праймера, праймера для альтернативной реакции амплификации, зонда, например, меченых с помощью метки, способной к выявлению, с помощью традиционных средств при использовании радиоактивных или нерадиоактивных меток, или полинуклеотиды могут быть клонированы в векторы. Такие праймеры, зонды и другие фрагменты будут иметь длину по крайней мере 15, предпочтительно по крайней мере 20, например по крайней мере 25, 30 или 40 нуклеотидов и также охватываются термином полинуклеотид в соответствии с изобретением, как используется в данном описании.

Полинуклеотиды, такие как ДНК полинуклеотиды и зонды, в соответствии с изобретением могут быть получены рекомбинантным путем, синтетически или с помощью любого способа, доступного специалисту в данной области техники. Они могут быть также клонированы с помощью стандартных методов.

В общем случае праймеры будут получать путем синтетических способов, вовлекающих пошаговое получение желаемой последовательности нуклеиновой кислоты по одному нуклеотиду за один прием. Методики для осуществления этого с использованием автоматических способов являются доступными в области техники.

Более длинные полинуклеотиды в общем случае будут получать при использовании рекомбинантных способов, например при использовании методик клонирования на основе ПЦР (полимеразная цепная реакция). Это будет вовлекать создание пары праймеров (например, содержащих приблизительно 15-30 нуклеотидов), фланкирующих липид-нацеливающий участок последовательности, который является желательным для клонирования, приведение праймеров в контакт с иРНК или кДНК, полученной из клеток животных или человека, осуществление полимеразной цепной реакции в условиях, которые приводят к амплификации желаемого участка, изолирование амплифицированного фрагмента (например, путем очистки реакционной смеси на агарозном геле) и получение амплифицированной ДНК. Праймеры могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать приемлемые сайты распознавания рестрикционных ферментов, так, чтобы амплифицированная ДНК могла быть клонирована в приемлемый клонирующий вектор.

Гибридизация.

Настоящее изобретение также охватывает применение последовательностей, которые являются комплементарными последовательностям настоящего изобретения или последовательностям, которые являются способными к гибридизации либо с последовательностями настоящего изобретения, либо с последовательностями, которые являются комплементарными к ним.

Термин "гибридизация", как используется в данном описании, будет включать "процесс, с помощью которого цепочка нуклеиновой кислоты объединяется с комплементарной цепью путем спаривания пар основ", а также процесс амплификации, как осуществляется с помощью методик на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Настоящее изобретение также охватывает применение нуклеотидных последовательностей, которые являются способными гибридизоваться с последовательностями, которые являются комплементарными последовательностям, которые составляют предмет изобретения и обсуждаются в данном описании, или любой производной, фрагменту или их производным.

Настоящее изобретение также охватывает последовательности, которые являются комплементарными последовательностям, которые способны гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном описании.

Условия гибридизации основываются на температуре плавления (T_m) нуклеотидсвязывающего комплекса, как описывается Berger и Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, vol. 152, Academic Press, San Diego CA), и на обеспечении определенной "жесткости", как объясняется ниже.

Максимальная жесткость типично возникает при температурах приблизительно $T_m - 5^\circ\text{C}$ (на 5°C ниже T_m зонда); высокая - при температурах приблизительно на $5-10^\circ\text{C}$ ниже T_m ; средняя жесткость -

при температурах приблизительно на 10-20°C ниже T_m и низкая жесткость при температурах приблизительно на 20-25°C ниже T_m . Как будет понятно квалифицированному специалисту в данной области техники, гибридизация при максимальной жесткости может использоваться для идентификации или определения идентичных нуклеотидных последовательностей, в то время как гибридизация при средней (или низкой) жесткости может использоваться для идентификации или определения подобных или родственных нуклеотидных последовательностей.

Предпочтительно настоящее изобретение охватывает применение последовательностей, которые являются комплементарными последовательностям, способным гибридизоваться при условиях высокой жесткости или средней жесткости с нуклеотидными последовательностями, кодирующими полипептиды, обладающие специфическими свойствами, как определено в данном описании.

Более предпочтительно настоящее изобретение охватывает применение последовательностей, которые являются комплементарными последовательностям, способным гибридизоваться при условиях высокой жесткости (например, 65°C и $0,1 \times \text{SSC}$ { $1 \times \text{SSC} = 0,15 \text{ M NaCl}$, $0,015 \text{ M Na-цитрат pH } 7,0$ }) с нуклеотидными последовательностями, кодирующими полипептиды, обладающие специфическими свойствами, как определено в данном описании.

Настоящее изобретение также относится к применению нуклеотидных последовательностей, которые могут гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном описании (включая последовательности, комплементарные тем, что обсуждаются в данном описании).

Настоящее изобретение также относится к применению нуклеотидных последовательностей, которые являются комплементарными последовательностям, способным гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, которые обсуждаются в данном описании (включая последовательности, комплементарные тем, что обсуждаются в данном описании).

Также в объем настоящего изобретения включаются применения полинуклеотидных последовательностей, которые способны гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном описании, при условиях от средней до максимальной жесткости.

В предпочтительном аспекте настоящее изобретение охватывает применение нуклеотидных последовательностей, которые могут гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном описании или их комплементом, при жестких условиях (например, при 50°C и $0,2 \times \text{SSC}$).

В более предпочтительном аспекте настоящее изобретение охватывает применение нуклеотидных последовательностей, которые могут гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, обсуждаемыми в данном описании или их комплементом, при условиях высокой жесткости (например, при 65°C и $0,1 \times \text{SSC}$).

Экспрессия полипептидов.

Нуклеотидная последовательность для использования в настоящем изобретении или кодирующая полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, могут быть введены в рекомбинантный вектор, способный к репликации. Вектор может использоваться для репликации и экспрессии нуклеотидной последовательности в форме полипептида в и/или из совместимой хозяйской клетки. Экспрессия может контролироваться при использовании контрольных последовательностей, которые включают промоторы/энхансеры и другие сигналы для регуляции экспрессии. Могут использоваться прокариотические промоторы и промоторы, функциональные в эукариотических клетках. Могут использоваться тканеспецифические и стимулоспецифические промоторы. Также могут использоваться химерные промоторы, включающие элементы последовательности из двух или более различных промоторов, описанных выше.

Полипептид, который продуцируется рекомбинантной клеткой путем экспрессии нуклеотидной последовательности, может секретироваться или может быть содержаться внутриклеточно в зависимости от используемой последовательности и/или вектора. Кодирующие последовательности могут быть сконструированы с сигнальными последовательностями, которые направляют секрецию вещества, кодируемого последовательностями, через мембрану определенной прокариотической или эукариотической клетки.

Конструкции.

Термин "конструкция", который является синонимичным с такими терминами, как "конъюгат", "кассета" и "гибрид", включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, для использования в соответствии с настоящим изобретением, непосредственно или опосредованно связанную с промотором. Пример непосредственного присоединения представляет собой обеспечение приемлемой спейсерной группы, такой как последовательность интрона, такого как Sh1-интрон или ADH интрон, между промотором и нуклеотидной последовательностью настоящего изобретения. То же самое касается термина "слитый" в отношении настоящего изобретения, который включает непосредственное или опосредованное присоединение. В некоторых случаях термины не охватывают природную комбинацию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, обычно ассоциированный с промотором гена дикого типа и когда они оба находятся в своем природном окружении.

Конструкция может даже содержать или экспрессировать маркер, который позволяет осуществлять селекцию генетической конструкции.

Для некоторых применений является предпочтительным, когда конструкция включает, по крайней мере, нуклеотидную последовательность настоящего изобретения или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, оперативно связанную с промотором.

Организм.

Термин "организм" относительного настоящего изобретения включает любой организм, который может включать нуклеотидную последовательность в соответствии с настоящим изобретением или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, и/или продукты, полученные из него.

Термин "трансгенный организм" в отношении настоящего изобретения включает любой организм, который включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, и/или продукты, полученные из него, и/или в данном описании промотор может позволять осуществлять экспрессию нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, в организме. Предпочтительно нуклеотидная последовательность встраивается в геном организма.

Термин "трансгенный организм" не охватывает нативных нуклеотидных кодирующих последовательностей в их природном окружении, когда они находятся под контролем их нативного промотора, который также находится в своем природном окружении.

Таким образом, трансгенный организм настоящего изобретения включает организм, включающий какую-либо одну или комбинацию нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, конструкции, как определено в данном описании, векторы, как определено в данном описании, плазмиды, как определено в данном описании, клетки, как определено в данном описании, или их продукты. Например, трансгенный организм может также включать нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий специфическими свойствами, как определено в данном описании, под контролем промотора, не ассоциированного с последовательностью, кодирующей липидацилтрансферазу в природе.

Трансформация хозяйских клеток/организма.

Хозяйский организм может представлять собой прокариотический или эукариотический организм.

Примеры приемлемых прокариотических хозяев включают бактерии, такие как *E.coli* и *Bacillus licheniformis*, предпочтительно *B.licheniformis*.

Руководства по трансформации прокариотических хозяев являются хорошо описанными в уровне техники, например, см. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-е изд., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Если используется прокариотический хозяин, то нуклеотидная последовательность предпочтительно может требовать модификации перед осуществлением трансформации, такой как удаление интронов.

В другом воплощении трансгенный организм может представлять собой дрожжи.

Клетки нитчатых грибов могут трансформироваться при использовании различных способов, известных в уровне техники, таких как процесс, вовлекающий получение протопласта и трансформацию протопластов, после чего осуществляют регенерацию клеточной стенки известным способом. Применение *Aspergillus* в качестве хозяйского микроорганизма описывается в EP 0238023.

Другой хозяйский организм может представлять собой растение. Обзор общих методик, используемых для трансформации растений, может быть найден в статьях Potrykus (Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. [1991], 42:205-225) и Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994, 17-27). Дополнительные методики по трансформации растений могут быть найдены в EP-A-0449375.

Общие методики по трансформации грибов, дрожжей и растений представлены в следующих разделах.

Трансформированные грибы.

Хозяйский организм может представлять собой грибы, такие как мицелиальные грибы. Примеры таких приемлемых хозяев включают любой член, принадлежащий к семействам *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* и т.п.

Обзор способов трансформации мицелиальных грибов приведен в US-A-5741665, который показывает, что стандартные методики для трансформации мицелиальных грибов и культивирования грибов являются хорошо известными в области техники. Обширный обзор методик применительно к *N.crassa* может быть найден, например, у Davis и de Serres, Methods Enzymol. (1971), 17A: 79-143.

Дополнительные методики по трансформации мицелиальных грибов рассматриваются в US-A-5674707.

В одном аспекте хозяйский организм может представлять собой род *Aspergillus*, такой как *Aspergillus niger*.

Трансгенный *Aspergillus* в соответствии с настоящим изобретением может также быть получен, например, в соответствии с методиками Turner G. 1994 (Vectors for genetic manipulation, в Martinelli S.D.,

Kinghorn J.R. (ред.), *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology*, vol. 29. Elsevier Amsterdam, 1994, p. 641-666).

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

Трансформированные дрожжи.

В другом воплощении трансгенный организм может представлять собой дрожжи.

Обзор принципов гетерологичной генной экспрессии в дрожжах обеспечивается, например, в *Methods Mol. Biol.* (1995), 49: 341-54 и *Curr. Opin. Biotechnol.* (1997), Oct.; 8(5): 554-60.

В этой связи дрожжи, такие как виды *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris* (см. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000, 24(1): 45-66), могут использоваться в качестве вектора для гетерологичной генной экспрессии.

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

Для трансформации дрожжей было разработано несколько прописей трансформации. Например, трансгенный *Saccharomyces* в соответствии с настоящим изобретением может быть получен в соответствии с методиками Hinnen et al. (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 75, 1929); Beggs, J.D. (1978, *Nature*, London, 275, 104) и Ito, H. et al. (1983, *J. Bacteriology.* 153, 163-168).

Трансформированные дрожжевые клетки могут быть отобраны при использовании различных селективных маркеров, таких как ауксотрофные маркеры доминантной устойчивости к антибиотикам.

Приемлемый дрожжевой хозяйский организм может быть отобран из биотехнологически релевантных видов дрожжей, таких как, но без ограничения, виды дрожжей, выбранных из *Pichia* spp., *Hansenula* spp., *Kluyveromyces*, *Yarrowinia* spp., *Saccharomyces* spp., включая *S.cerevisiae*, или *Schizosaccharomyces* spp., включая *Schizosaccharomyces pombe*.

Штамм метилотрофных дрожжей вида *Pichia pastoris* может использоваться в качестве хозяйского организма.

В одном воплощении хозяйский организм может представлять собой виды *Hansenula*, такие как *H.polymorpha* (как описано в WO 01/39544).

Трансформированные растения/растительные клетки.

Хозяйский организм, приемлемый для настоящего изобретения, может представлять собой растение. Обзор общих методик может быть найден в статьях Potrykus (*Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* (1991), 42: 205-225) и Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994*, 17-27) или в WO 01/16308. Трансгенное растение может продуцировать, например, повышенные уровни эстеров фитостерина и эстеров фитостанола.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу получения трансгенного растения с повышенными уровнями эстеров фитостерина и эстеров фитостанола, включающий этапы трансформации растительной клетки с помощью липидацилтрансферазы, как определено в данном описании (в частности, с помощью экспрессионного вектора или конструкции, включающей липидацилтрансферазу, как определено в данном описании), и выращивание растения из трансформированной растительной клетки.

Секретиция.

Часто является желательным, чтобы полипептид секретировался из хозяина экспрессии в культуральную среду, из которой фермент может быть более легко получен. В соответствии с настоящим изобретением лидерная последовательность для секретиции может быть отобрана на основе желательного экспрессионного хозяина. Гибридные сигнальные последовательности могут также использоваться в контексте настоящего изобретения.

Типичные примеры лидерных последовательностей секретиции не являются ассоциированными с нуклеотидной последовательностью, кодирующей липидацилтрансферазу в природе, и представляют собой такие, которые имеют происхождение из гена грибковой амилогликозидазы (AG) (*glaA* - аминокислотные версии 18 и 24, например, из *Aspergillus*), гена α -фактора (дрожжи, например *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* и *Hansenula*) или гена α -амилазы (*Bacillus*).

Определение.

В области техники являются известными разнообразные прописи для определения и измерения экспрессии аминокислотной последовательности. Примеры включают твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Квалифицированному специалисту в данной области техники известно широкое разнообразие методов и методик конъюгации, которые могут использоваться в различных анализах нуклеиновой кислоты и аминокислотном анализе.

Ряд компаний, таких как Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) и US Biochemical Corp. (Cleveland, OH), обеспечивают коммерческие наборы и прописи для осуществления этих процедур.

Приемлемые репортерные молекулы или метки включают такие на основе радионуклидов, ферментов, флуоресцентных веществ, хемилюминисцентных веществ или хромогенных агентов, а также субстраты, кофакторы, ингибиторы, магнитные частицы и т.п. Патенты, описывающие применение таких меток, включают US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 и US-A-4366241.

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

Слитые белки.

Липидацилтрансфераза для использования в настоящем изобретении может быть получена в виде слитого белка, например, с целью его экстракции и очистки. Примеры партнеров слияния белка включают глутатион-S-трансферазу (GST), 6×His, GAL4 (ДНК-связывающие домены и/или домены активации транскрипции) и β-галактозидазу. Также может быть приемлемым включать сайт для воздействия протеолитических ферментов между партнером слияния белка и белковой последовательностью, которая представляет интерес, для того, чтобы вычленить последовательности белка. Предпочтительно слитый белок не будет препятствовать активности белковой последовательности.

Системы для экспрессии слитых генов в *E.coli* были рассмотрены в Curr. Opin. Biotechnol. (1995), 6(5): 501-6.

Аминокислотная последовательность полипептида, обладающего специфическими свойствами, как определено в данном описании, может быть лигирована с ненативной последовательностью для кодирования слитого белка. Например, для скрининга пептидных библиотек на агенты, способные влиять на активность вещества, может быть полезным кодировать химерное вещество, экспрессирующее ненативный эпитоп, который узнается коммерчески доступным антителом.

Изобретение будет далее описываться, только в качестве примера, со ссылкой на следующие фигуры и примеры:

фиг. 1 показывает аминокислотную последовательность мутантной зрелой липидацилтрансферазы *Aeromonas salmonicida* (GCAT) с мутацией Asn80Asp (в частности, аминокислота 80 содержится в зрелой последовательности) (SEQ ID No. 16);

фиг. 2 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 1) липидацилтрансферазы из *Aeromonas hydrophila* (ATCC # 7965);

фиг. 3 показывает pfam00657 консенсусную последовательность из базы данных версии 6 (SEQ ID No. 2);

фиг. 4 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 3), полученную из организма *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051);

фиг. 5 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 4), полученную из организма *Aeromonas salmonicida* (AAG098404; GI:9964017);

фиг. 6 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 5), полученную из организма *Streptomyces coelicolor* A3(2) (деPOSITный номер Genbank: NP 631558);

фиг. 7 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 6), полученную из организма *Streptomyces coelicolor* A3(2) (деPOSITный номер Genbank: CAC42140);

фиг. 8 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 7), полученную из организма *Saccharomyces cerevisiae* (деPOSITный номер Genbank: P41734);

фиг. 9 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 8), полученную из организма *Ralstonia* (деPOSITный номер Genbank: AL646052);

фиг. 10 показывает SEQ ID No. 9. Код доступа CAB39707,1 Scoe1 NCBI белка GI:4539178 консервативный гипотетический белок [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 11 показывает аминокислоту, которая представлена как SEQ ID No. 10. Код доступа CAC01477,1 Scoe2 NCBI белка GI:9716139 консервативный гипотетический белок [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 12 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 11). Код доступа CAB88833,1 Scoe3 NCBI белка GI:7635996 путативный секретрируемый белок [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 13 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 12). Код доступа CAB89450,1 Scoe4 NCBI белка GI:7672261 путативный секретрируемый белок [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 14 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 13). Код доступа CAB62724,1 Scoe5 NCBI белка GI:6562793 путативный липопротеин [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 15 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 14). Код доступа AAK.84028,1 Srim1 NCBI белка GI:15082088 GDLS-липаза [*Streptomyces rimosus*];

фиг. 16 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 15) липидацилтрансферазы из *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (ATCC # 14174);

фиг. 17 показывает SEQ ID No. 19. Код доступа CAB39707,1 Scoe1 NCBI белка GI:4539178 консервативный гипотетический белок [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 18 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 25) слитой конструкции, ис-

пользуемой для мутагенеза гена липидацилтрансферазы *Aeromonas hydrophila*. Подчеркнутые аминокислоты представляют собой сигнальный пептид ксиланазы;

фиг. 19 показывает полипептидную последовательность фермента липидацилтрансферазы из *Streptomyces* (SEQ ID No. 26);

фиг. 20 показывает полипептидную последовательность фермента липидацилтрансферазы из *Thermobifida* (SEQ ID No. 27);

фиг. 21 показывает полипептидную последовательность фермента липидацилтрансферазы из *Thermobifida* (SEQ ID No. 28);

фиг. 22 показывает полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Corynebacterium efficiens* GDSX 300 аминокислот (SEQ ID No. 29);

фиг. 23 показывает полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Novosphingobium aromaticivorans* GDSX 284 аминокислоты (SEQ ID No. 30);

фиг. 24 показывает полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Streptomyces coelicolor* GDSX 269 aa (SEQ ID No. 31);

фиг. 25 показывает полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Streptomyces avermitilis*/GDSX 269 аминокислот (SEQ ID No. 32);

фиг. 26 показывает полипептид фермента липидацилтрансферазы из *Streptomyces* (SEQ ID No. 33);

фиг. 27 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 34), полученную из организма *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051) (в частности, таковая представляет собой зрелую последовательность);

фиг. 28 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 35) мутанта зрелой липидацилтрансферазы *Aeromonas salmonicida* (GCAT) (в частности, таковая представляет собой зрелую последовательность);

фиг. 29 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 36) из *Streptomyces thermosacchari*;

фиг. 30 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 37) из *Streptomyces thermosacchari*;

фиг. 31 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 38) из *Thermobifida fusca*/GDSX 548 аминокислот;

фиг. 32 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 39) из *Thermobifida fusca*;

фиг. 33 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 40) из *Thermobifida fusca*/GDSX;

фиг. 34 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 41) из *Corynebacterium efficiens*/GDSX 300 аминокислот;

фиг. 35 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 42) из *Corynebacterium efficiens*;

фиг. 36 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 43) из *S.coelicolor*/GDSX 268 аминокислот;

фиг. 37 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 44) из *S.coelicolor*;

фиг. 38 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 45) из *S.avermitilis*;

фиг. 39 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 46) из *S.avermitilis*;

фиг. 40 показывает аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 47) из *Thermobifida fusca*/GDSX;

фиг. 41 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 48) из *Thermobifida fusca*/GDSX;

фиг. 42 показывает выравнивание L131 и гомологов из *S.avermitilis* и *T.fusca*, иллюстрирует сохранение GDSX мотива (GDSY в L131 и *S.avermitilis* и *T.fusca*), GANDY блока, который представляет собой либо GGNDL, либо GGNDL, и HPT блока (считается консервативным каталитическим гистидином). Эти три консервативных блока являются выделенными;

фиг. 43 показывает SEQ ID No. 17, которая представляет собой аминокислотную последовательность липидацилтрансферазы из *Candida parapsilosis*;

фиг. 44 показывает SEQ ID No. 18, которая представляет собой аминокислотную последовательность липидацилтрансферазы из *Candida parapsilosis*;

фиг. 45 показывает представление кристаллической структуры 1IVN.PDB в виде полоски, которая содержит глицерин в активном сайте, фигура получена при использовании устройства для визуального просмотра Deep View Swiss-PDB;

фиг. 46 показывает боковой вид кристаллической структуры 1IVN.PDB при использовании устройства для визуального просмотра Deep View Swiss-PDB, с глицерином в активном сайте - остатки в пределах 10 Å активного сайта глицерина закрашены черным;

фиг. 47 показывает вид сверху кристаллической структуры 1IVN.PDB при использовании устройства для визуального просмотра Deep View Swiss-PDB, с глицерином в активном сайте - остатки в пределах 10 Å активного сайта глицерина закрашены черным;

фиг. 48 показывает выравнивание 1;

фиг. 49 показывает выравнивание 2;

фиг. 50 и 51 показывают выравнивание IIVN к P10480 (P10480 представляет собой последовательность базы данных для фермента *A. hydrophila*), Это выравнивание получали из PFAM базы данных и использовали в процессе построения модели;

фиг. 52 показывает выравнивание, где P10480 представляет собой последовательность базы данных для *Aeromonas hydrophila*. Эта последовательность используется для конструирования модели и селекции сайта. Следует отметить, что показан полный белок (SEQ ID No. 25), зрелый белок (эквивалент SEQ ID No. 34) начинается на остатке 19. *A. sal* представляет собой GDSX липазу *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID No. 4), *A. hyd* представляет собой GDSX липазу *Aeromonas hydrophila* (SEQ ID No. 34). Консенсусная последовательность содержит а * в положении отличия между приведенными последовательностями;

фиг. 53 показывает генную конструкцию, которая используется в примере 1;

фиг. 54 показывает оптимизированную по кодам генную конструкцию (№ 052907), которая используется в примере 1;

фиг. 55 показывает последовательность вставки XhoI, содержащей LAT-KLM3' предшественник гена, -35 и -10 блоки являются подчеркнутыми;

фиг. 56 показывает BML780-KLM3'CAP50 (включающую SEQ ID No. 16 - верхняя колонка) и BML780 (хозяйский штам без конструкции - нижняя колонка) через 48 ч роста при 37°C на 1% трибутириновом агаре;

фиг. 57 показывает нуклеотидную последовательность из *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID No. 49), включающую сигнальную последовательность (preLAT - положения 1-87);

фиг. 58 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 50), кодирующую липидацилтрансферазу в соответствии с настоящим изобретением, полученную из организма *Aeromonas hydrophila*;

фиг. 59 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 51), кодирующую липидацилтрансферазу в соответствии с настоящим изобретением, полученную из организма *Aeromonas salmonicida*;

фиг. 60 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 52), кодирующую липидацилтрансферазу в соответствии с настоящим изобретением, полученную из организма *Streptomyces coelicolor* A3(2) (депозитный номер Genbank NC 003888, 1:8327480, 8328367);

фиг. 61 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 53), кодирующую липидацилтрансферазу в соответствии с настоящим изобретением, полученную из организма *Streptomyces coelicolor* A3(2) (депозитный номер Genbank AL939131, 1:265480, 266367);

фиг. 62 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 54), кодирующую липидацилтрансферазу в соответствии с настоящим изобретением, полученную из организма *Saccharomyces cerevisiae* (депозитный номер Genbank Z75034);

фиг. 63 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 55), кодирующую липидацилтрансферазу в соответствии с настоящим изобретением, полученную из организма *Ralstonia*;

фиг. 64 показывает нуклеотидную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 56, кодирующую NCBI белок с кодом доступа CAB39707,1 GI:4539178 консервативный гипотетический белок [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 65 показывает нуклеотидную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 57, кодирующую Scoe2 NCBI белок с кодом доступа CAC01477,1 GI:9716139 консервативный гипотетический белок [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 66 показывает нуклеотидную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 58, кодирующую Scoe3 NCBI белок с кодом доступа CAB88833,1 GI:7635996 путативный секретиремый белок [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 67 показывает нуклеотидную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 59, кодирующую Scoe4 NCBI белок с кодом доступа CAB89450,1 GI:7672261 путативный секретиремый белок [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 68 показывает нуклеотидную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 60, кодирующую Scoe5 NCBI белок с кодом доступа CAB62724,1 GI:6562793 путативный липопротеин [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

фиг. 69 показывает нуклеотидную последовательность, которая представлена как SEQ ID No. 61, кодирующую Srim1 NCBI белок с кодом доступа AAK84028,1 GI:15082088 GDSL-липаза [*Streptomyces rimosus*];

фиг. 70 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 62), кодирующую липидацилтрансферазу из *Aeromonas hydrophila* (ATCC # 7965);

фиг. 71 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 63), кодирующую липидацилтрансферазу из *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (ATCC # 14174);

фиг. 72 показывает нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 24), кодирующую фермент из *Aeromonas hydrophila*, включая сигнальный пептид ксиланазы;

фиг. 73 показывает аминокислотную последовательность мутантной зрелой липидацилтрансферазы (GCAT) *Aeromonas salmonicida* с мутацией Asn80Asp (в частности, аминокислота 80 находится в зрелой последовательности), представленной в данном описании как SEQ ID No. 16, и после осуществления посттрансляционной модификации как SEQ ID No. 68 - аминокислотные остатки 235 и 236 SEQ ID No. 68 не являются ковалентно связанными после осуществления посттрансляционной модификации. Два образованных пептида удерживаются вместе с помощью одного или более S-S мостиков. Аминокислота 236 в SEQ ID No. 68 соответствует аминокислотному остатку под номером 274 в SEQ ID No. 16, показанной в данном описании;

фиг. 74a показывает общепринятый способ рафинирования гидратацией/очистки неочищенного пищевого масла. В конце процедуры рафинирования гидратацией масляную фазу и смоляную фазы разделяют. После этого масляная фаза и смоляная фаза могут быть далее обработаны обычными/известными из уровня техники способами;

фиг. 74b показывает способ в соответствии с настоящим изобретением для рафинирования гидратацией/очистки неочищенного пищевого масла при помощи фермента. Масляная фаза, полученная при разделении масляной и смоляной фаз, имеет значительно больший выход, в сравнении с масляной фазой сравнительного способа (например, показанного на фиг. 74a, т.е. рафинирование гидратацией без добавления фермента). Масляная фаза и/или смоляная фаза могут, по желанию, подвергаться дальнейшей переработке, такой как последующая обычная переработка;

фиг. 75 показывает структурную схему способа рафинирования гидратацией лабораторного масштаба в соответствии с настоящим изобретением;

фиг. 76 показывает диаграмму для анализа смоляной фазы и масляной фазы после рафинирования гидратацией (т.е. стадия 1 фиг. 74a или 74b);

фиг. 77 показывает смоляную фазу через 3 ч после рафинирования гидратацией неочищенного соевого масла в соответствии с настоящим изобретением;

фиг. 78 показывает % смолы через 30 мин рафинирования гидратацией неочищенного соевого масла с и без применения фермента;

фиг. 79 показывает влияние количества воды (1,5, 2 или 2,5%) на количество смолы после рафинирования гидратацией неочищенного соевого масла;

фиг. 80 показывает влияние с и без применения фермента при помощи рафинирования с различными количествами воды (1,5, 2 или 2,5%) на количество смолы после рафинирования гидратацией неочищенного соевого с и без применения фермента;

фиг. 81 показывает ppm фосфора в масляной фазе после рафинирования гидратацией неочищенного соевого масла с различным количеством фермента. Колонка 1 представляет собой контроль без фермента;

фиг. 82 показывает % триглицерида в смоляной фазе после рафинирования гидратацией неочищенного соевого масла с различным количеством фермента. Колонка 1 представляет собой контроль без фермента;

фиг. 83 показывает относительный % РА в смоляной фазе после рафинирования гидратацией неочищенного соевого масла с различным количеством фермента. Колонка 1 представляет собой контроль без фермента;

фиг. 84 показывает относительный % РЕ в смоляной фазе после рафинирования гидратацией неочищенного соевого масла с различным количеством фермента. Колонка 1 представляет собой контроль без фермента;

фиг. 85 показывает увеличенный выход масла (%), полученный при ферментативном рафинировании, относительно контроля. Масла центрифугированы при различных относительных центрифугирующих силах в течение 3 мин;

фиг. 86 показывает содержание (%) смолы и количество триглицерида в смоле, полученной из масел, центрифугированных различное время (минуты показаны в полосах) и при различных относительных центрифугирующих силах. Партия 3: контроль, 55°C, 4: с ферментом (KLM3'), 55°C;

фиг. 87 показывает вязкость как функцию скорости сдвига. Измерения основываются на смоле из партии 1: контроль, 70°C и партии 2: с ферментом, 70°C;

фиг. 88 показывает выход масла (%), рассчитанный из количества смолы (контроль) за вычетом количества смолы (ферментативный образец);

фиг. 89 показывает результаты анализа ТСХ смоляной фазы. Содержание триглицерида (%) в смолах, полученных рафинированием с возрастающим количеством NaOH (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 и 1,9 мл 4%-ного раствора);

фиг. 90 показывает GC-результаты. Содержание (%) свободных жирных кислот, фитостеринов и эстеров фитостеринов в маслах, рафинированных возрастающими количествами в мл NaOH - Образец 1: контроль (без фермента и NaOH); Образец 2-8: ферментативные образцы с KLM3' (0,1 TIPIU-K/r) и возрастающими количествами NaOH (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 и 1,9 мл 4%-ного раствора);

фиг. 91 показывает результаты анализа ТСХ смоляной фазы. Относительная деградация фосфолипидов (РА, РЕ, РС и PI) в смолах. Образец 1: контроль (без фермента и NaOH), Образец 2-7: фермента-

тивные образцы с KLM3' (0,1 TPU-K/г) и возрастающими количествами NaOH;

фиг. 92 показывает микроскопический анализ смол, полученных обычным рафинированием гидратацией и ферментативным рафинированием гидратацией в соответствии с настоящим изобретением (рисунки с 200- и 400-кратным увеличением при 25°C);

фиг. 93 показывает рентгеноскопический анализ смоляных фаз, полученных обычным рафинированием и ферментативным рафинированием;

фиг. 94 показывает воронки осаждения (день 3). Левая: контроль, правая: масло, обработанное ферментом;

фиг. 95 показывает микроскопический анализ смол, полученных обычным рафинированием гидратацией и ферментативным рафинированием гидратацией;

фиг. 96 показывает увеличенный выход масла, полученный при ферментативном рафинировании, относительно контроля;

фиг. 97 показывает потери масла в контроле и образце, полученном ферментативным рафинированием гидратацией (в соответствии с настоящим изобретением), которые выполняли с 1, 1,5 и 2% воды. Расчет потери масла: $(\% \text{ смолы} / \% \text{ триглицеридов в смоле}) \times 100\%$;

фиг. 98 показывает относительную деградацию фосфатидной кислоты и фосфатидилэтаноламина в ферментативных (KLM3') образцах смолы, по сравнению с контролем (без фермента);

фиг. 99 показывает измерение вязкости ферментативных смоляных фаз, полученных после рафинирования с различными количествами воды (1,25, 1,5, 1,75 и 2%);

фиг. 100 показывает смоляную фазу после рафинирования гидратацией неочищенной соли при помощи KLM3' и с добавлением акцептора, как показано в табл. 1 примера 9;

фиг. 101 показывает относительное количество фосфолипида в смоляной фазе, проанализированной при помощи ВЭТСХ;

фиг. 102 показывает ICP анализ фосфора в масле, полученном после рафинирования гидратацией неочищенного соевого масла (табл. 1 примера 9);

фиг. 103: Пример 13. ТСХ (пропускаемый буфер 1) образцов с 1 по 9 через 30 мин инкубации;

фиг. 104: Пример 13. ТСХ (пропускаемый буфер 1) образцов с 1 по 9 через 240 мин инкубации;

фиг. 105: Пример 13. ТСХ (пропускаемый буфер 6) образцов с 1 по 9 через 30 мин инкубации. PE = фосфатидилэтаноламин, PA = фосфатидная кислота, PI = фосфатидилинозитол и PC = фосфатидилхолин;

фиг. 106: Пример 13. ТСХ (пропускаемый буфер 6) образцов с 1 по 9 через 240 мин инкубации. PE = фосфатидилэтаноламин, PA = фосфатидная кислота, PI = фосфатидилинозитол и PC = фосфатидилхолин;

фиг. 107: Пример 13. Относительная деградация фосфолипидов ферментативной обработкой неочищенного масла при помощи липидацилтрансферазы (KLM3') и фосфолипазы C (PLC). Время реакции 240 мин;

фиг. 108: Пример 13. Реакция фосфолипиддиглицеридацилтрансферазы;

фиг. 109: Пример 13. Взаимосвязь фосфолипазы C и KLM3' на уровень диглицерида (DAG) при рафинировании неочищенного соевого масла;

фиг. 110: Пример 13. ТСХ анализа;

фиг. 111 показывает влияние добавления фермента на триглицерид;

фиг. 112 показывает влияние времени реакции на триглицерид;

фиг. 113 показывает ТСХ анализ диглицерид/PC субстрат, инкубированный с ацилтрансферазой в течение 30 и 90 мин, как подробно описано в примере 13;

фиг. 114 показывает ТСХ анализ диглицерид/PC субстрат, инкубированный с ацилтрансферазой в течение 30 и 90 мин, как подробно описано в примере 13;

фиг. 115 показывает влияние фермента ацилтрансферазы на формирование триглицерида в субстрате диглицерид/PC 80/20;

фиг. 116 показывает влияние времени инкубации на формирование триглицерида в субстрате диглицерид/PC 80/20;

фиг. 117 показывает структурную схему для ферментативного рафинирования гидратацией;

фиг. 118 показывает ТСХ анализ образцов смоляной фазы после рафинирования гидратацией при 55°C и инкубации в течение 0, 1 или 7 дней, как подробно описано в примере 15;

фиг. 119 показывает ТСХ анализ образцов смоляной фазы после рафинирования гидратацией при 45°C и инкубации в течение 0, 1 или 7 дней, как подробно описано в примере 15.

Пример 1.

Экспрессия KLM3' в *Bacillus licheniformis*.

Нуклеотидную последовательность (SEQ ID No. 49), кодирующую липидацилтрансферазу (SEQ ID No. 16, далее в данном описании KLM3'), экспрессировали в *Bacillus licheniformis* в виде слитого белка с сигнальным пептидом *B.licheniformis* [альфа]-амилазы (LAT) (см. фиг. 53 и 54). Для оптимальной экспрессии в *Bacillus* оптимизированную по кодонам генную конструкцию (№ 052907) заказывали на Geneart (Geneart AG, Regensburg, Germany).

Конструкция № 052907 содержала неполный LAT промотор (только -10 последовательность) в передней части LAT-KLM3' предшественника гена и LAT транскрипции (Tlat), расположенный ниже от LAT-KLM3' предшественника гена (см. фиг. 53 и 55). Для создания XhoI фрагмента, который содержит LAT-KLM3' предшественник гена, фланкированный полным LAT промотором на 5'-конце и LAT терминатор на 3'-конце, осуществляли ПЦР (полимеразную цепную реакцию) амплификацию с помощью праймеров Plat5XhoI FW и EBS2XhoI RV и генной конструкции 052907 в качестве матрицы.

Plat5XhoI_FW:

```
ccccgctcgcaggcttttcttttgaagaaaatatagggaatggtactgttaaaattc
ggaatattatacaatatcatatgtttcacattgaaagggg
```

EBS2XhoI_RV: tggaatctcgcagggtttatcctttaccttgcctcc

ПЦР осуществляли на термоциклере с использованием Phusion High Fidelity ДНК-полимеразы (Finnzymes OY, Espoo, Finland) в соответствии с инструкциями производителя (температура отжига 55°C).

Полученный ПЦР фрагмент переваривали с помощью рестрикционного фермента XhoI и лигировали с T4 ДНК лигазой в XhoI переваренную pICatH в соответствии с инструкциями поставщика (Invitrogen, Carlsbad, Calif. USA).

Смесь лигирования трансформировали в штамм *B. subtilis* SC6,1 так, как описано в патентной заявке США US20020182734 (публикация международной заявки WO 02/14490). Последовательность XhoI вставки, содержащую LAT-KLM3' предшественник гена, подтверждали с помощью секвенирования ДНК (BaseClear, Leiden, The Netherlands), и один из правильных клонов плазмиды обозначали как pICatH-KLM3'(oril) (фиг. 53). pICatH-KLM3'(oril) трансформировали в штамм *B. licheniformis* BML780 (производный от BRA7 и BML612, см. WO 2005/111203) при перmissive температуре (37°C).

Выбирали один резистентный к неомицину (neoR) и резистентный к хлорамфениколу (CmR) трансформант, обозначали его как BML780 (pICatH-KLM3' (oril)). Плазмиду в BML780 (pICatH-KLM3'(oril)) интегрировали в CatH участок в геноме *B. licheniformis* путем выращивания штамма при неpermissive температуре (50°C) в среде с 5 мкг/мл хлорамфеникола. Отбирали один CmR резистентный клон и обозначали его как BML780-pICatH-KLM3' (oril). BML780-pICatH-KLM3'(oril) вновь выращивали при permissive температуре в течение нескольких поколений без антибиотиков для размыкания векторных последовательностей и потом отбирали один чувствительный к неомицину (neoS) CmR клон. В этом клоне векторные последовательности pICatH в хромосоме вырезали (включая ген устойчивости к неомицину) и оставляли только CatH-LATKLM3' кассету. Потом CatH-LATKLM3' кассету в хромосоме подвергали амплификации путем выращивания штамма в/на среде с увеличивающимися концентрациями хлорамфеникола. После различных циклов амплификации один клон (резистентный к 50 мкг/мл хлорамфеникола) отбирали и обозначали как BML780-KLM3'CAP50. Для проверки KLM3' экспрессии BML780-KLM3'CAP50 и BML780 (хозяйский штамм, не содержащий конструкции) выращивали в течение 48 ч при 37°C на агаровых пластинках сердечном настое (Bacto) с 1% трибутирином. Свободная зона, что является показателем для липидацилтрансферазной активности, была четко заметной вокруг BML780-KLM3'CAP50, но не вокруг хозяйского штамма BML780 (см. фиг. 56). Этот результат показывает, что существенное количество KLM3' экспрессируется в штамме *B. licheniformis* BML780-KLM3'CAP50 и что эти молекулы KLM3' являются функциональными.

Сравнительный пример 1.

Векторная конструкция.

Плазмидная конструкция являлась pCS32new N80D, которая представляет собой pCCmini производную, несущую последовательность, кодирующую зрелую форму нативной глицерофосфолипид-холестерин ацилтрансферазы из *Aeromonas salmonicida*, содержащей замену Asp на Asp в положении 80 (KLM3'), под контролем p32 промотора и с сигнальной последовательностью CGT-азы.

Хозяйский штамм, используемый для экспрессии, представляет собой штамм *Bacillus subtilis* OS21ΔAprE.

Уровень экспрессии измеряли как трансферазную активность, выраженную в виде % эстерифицированного холестерина, вычисленного из разницы между свободным холестерином в контрольном образце и свободным холестерином в образце фермента в реакции ФХ (Т_{ФХ}) в качестве донора и холестерина в качестве акцепторной молекулы.

Условия культивирования.

5 мл LB бульона (продукт ферментативного переваривания казеина, 10 г/л; дрожжевой экстракт с низким содержанием натрия, 5 г/л; хлорид натрия, 5 г/л; инертные таблетированные добавки, 2 г/л) с добавкой 50 мг/л канамицина инокулировали при использовании одной колонки и инкубировали при 30°C в течение 6 ч при 205 об/мин. 0,7 мл этой культуры использовали для инокуляции 50 мл SAS среды

(K₂HPO₄, 10 г/л; MOPS (3-морфолинопропан сульфоновая кислота), 40 г/л; хлорид натрия, 5 г/л; противопенивающий агент (Sin 260), 5 капель/л; обезжиренная соевая мука, 20 г/л; Biospringer 106 (100% dw YE), 20 г/л) с добавлением 50 мг/л канамицина и раствора гидролизатов с высоким содержанием мальтозного крахмала (60 г/л). Инкубацию осуществляли в течение 40 ч при 30°C и 180 об/мин перед отделением культуральных супернатантов путем центрифугирования при 19000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант переносили в чистую пробирку и непосредственно использовали для измерения трансферазной активности.

Получение субстратов и осуществление ферментативной реакции.

ФХ (Avanti Polar Lipids # 441601) и холестерин (Sigma C8503) пересчитывали в соотношении 9:1, растворяли в хлороформе и выпаривали до осушения.

Субстрат получали путем диспергирования 3% ФХ:Холестерин 9:1 в 50 мМ Hepes буфера pH 7.

0,250 мл раствора субстрата переносили в 3 мл стеклянную колбу с закручивающейся крышкой. Прибавляли 0,025 мл супернатанта культуры и смесь инкубировали при 40°C в течение 2 ч. Также готовили стандартный образец с водой вместо фермента. Нагревание реакционной смеси в кипящей водяной бане в течение 10 мин останавливало ферментную реакцию. К реакционной смеси прибавляли 2 мл 99% этанола перед тем, как подвергнуть анализу на определение холестерина.

Определение холестерина.

100 мкл субстрата, содержащего 1,4 ед./мл холестериноксидазы (SERVA Electrophoresis GmbH кат. № 17109), 0,4 мг/мл ABTS (Sigma A-1888), 6 ед./мл пероксидазы (Sigma 6782) в 0,1 М Трис-НСl, pH 6,6 и 0,5% Тритон X-100 (Sigma X-100) инкубировали при 37°C в течение 5 мин перед прибавлением и смешиванием с 5 мкл образца реакционной смеси. Реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 5 мин и измеряли значение OD₄₀₅. Содержание холестерина подсчитывали из анализов стандартных растворов холестерина, содержащих 0,4, 0,3, 0,20, 0,1, 0,05 и 0 мг/мл холестерина в 99% EtOH.

Результаты.

Таблица показывает среднее значение 8 различных экспрессий культур.

Штамм	Т _{PC} ^a
OS21ΔAprE[pCS32new]	74,2 ± 10,1 ^b
^a Т _{ФХ} представляет собой трансферазную активность, выраженную как % эстерифицированного холестерина, вычисленного из разницы между свободным холестерином в контрольном образце и свободным холестерином в образце фермента в реакции ФХ (Т _{PC}) в качестве донора и холестерина в качестве акцепторной молекулы.	
^b Среднее значение 8 различных экспрессий культуры	

Пример 2.

Использование липидацилтрансферазы в рафинировании гидратацией.

Материалы и методы.

Фермент:

KLM3': липидацилтрансфераза, изученная в примере 1, имеющая SEQ ID No. 68 (также упомянутая авторами как "K932") - 1128 ТИРЕ/мл.

Масло:

SBO 1: Неочищенное соевое масло от Solae, Aarhus, DK. 27.09.2007 Delite (на основании бобов из Канады).

SBO2: Неочищенное соевое масло из Бразилии.

RSO 3: Неочищенное экстрагированное рапсовое масло из Karlshamn Aarhus.

RSO 4: Неочищенное прессованное рапсовое масло от Scanola, Aarhus, DK.

Стандартная смесь соевых лецитинов (ST16) от Spectra Lipid, Германия.

Методы.

ВЭ-ТСХ:

Аппликатор: Автоматический сэмплер для ТСХ 4, CAMAG.

Пластика для ВЭ-ТСХ: 20×10 см, Merck № 1.05641. Активируется за 10 мин при 160°C перед использованием.

Нанесение.

Масляная фаза: 5 мкл 8% раствора масла в хлороформе:метаноле 2:1 были нанесены на пластину для ВЭ-ТСХ, используя автоматический сэмплер для ТСХ.

Фаза смолы: фаза смолы из 10 г масла была растворена в 7,5 мл смеси хлороформ:метанол 2:1.

1 мкл образца нанесли на пластинку для ВЭ-ТСХ.

Аппликатор для ТСХ.

Пропускаемый буфер 6: хлороформ:1-пропанол:метилацетат:метанол: 0,25% KCl в воде 25:25:25:10:9.

Пропускаемый буфер 5: Р-эфир: МТВЕ 30:70.

Элюирование: пластинка была элюирована 7 см с использованием автоматической камеры хроматографирования ADC2 от Camag.

Хроматографирование.

Пластина была высушена в печи в течение 10 мин при 160°C, охлаждена и погружена в 6% ацетат меди в 16% H₃PO₄. Высушивалась дополнительно 10 мин при 160°C и сразу же оценивалась.

После хроматографирования пластины были просканированы на сканере Camag и была вычислена площадь каждого компонента (пятна) на пластинке ТСХ.

Вычисление.

Масляная фаза.

Количество фосфолипида в масляной фазе было вычислено путем анализа стандартного лецитина с известными концентрациями фосфолипидов (PE, PA, PI, PC, PS) при различных концентрациях на той же пластине ТСХ, как и в случае образцов масла. На основании стандартной смеси была построена кривая калибровки для каждого фосфолипида, и она использовалась для вычисления концентрации для каждого фосфолипида в образце масла.

На основании молекулярной массы концентрации фосфолипидов были преобразованы в м.д. Р (фосфора).

Фаза смолы.

Содержание триглицерида в фазе смолы было вычислено на основании анализа стандарта очищенного растительного масла на той же пластине, как в случае фазы смолы. На основании анализа растительного масла была построена кривая калибровки, и она использовалась для вычисления триглицерида в фазе смолы.

Анализ фосфолипидов в фазе смолы был основан на применении различных объемов фазы смолы из контроля (без добавленного фермента) на той же пластине, как и в случае других фаз смолы. На основании анализа фосфолипидов (PE и PA) в контрольной смоле была построена кривая калибровки, и она использовалась для вычисления количества фосфолипидов в обработанных ферментом образцах относительно количества фосфолипида в контроле, которое было определено как 100%.

Измерение pH.

pH образцов при рафинировании масла был проанализирован методом флуоресценции, описанным в <<http://www.3i-usa.com/downloads/hydrop-man.pdf>>, т.е. измерение pH проводилось при использовании HydroPlate® HP96C от Presens, Josef Engert Str. 11, D-93053 Регенсбург, Германия.

HydroPlate® представляет собой стерильный, полистироловый микротитровальный планшет, как правило, с 96 лунками с 96 интегрированными датчиками. Датчик иммобилизован внизу каждой лунки. Датчик может быть считан снизу. Это может быть сделано почти любым коммерчески доступным ридером для флуоресцентного планшета. Количественное определение базируется на 2 различных флуоресцентных красителях: чувствительный к pH индикатор и инертный референтный краситель. Эта комбинация гарантирует точный сигнал с внутренним эталоном для того, чтобы достигнуть самых точных результатов экспериментов.

pH может альтернативно быть измерен при использовании pH электрода согласно Bo Yang et al. JAOCS, vol. 83, No. 7 (2006), p. 653-658.

Определение воды в масле.

Остаточная вода в масле определяется методом AOCS Ca 2c-25 или эквивалентным.

Анализ ГЖХ.

Капиллярный газовый хроматограф Perkin Elmer Autosystem 9000, оборудованный WCOT спаянной кварцевой колонкой 12,5 м×0,25 мм ВД×пленки толщиной 0,1 мкм из 5% фенилметил силикона (CP Sil 8 CB от Chrompack).

Газ-носитель: гелий.

Инжектор. PSSI охлажденная расщепленная инъекция (начальная темп. 50°C, нагревают до 385°C), объем 1,0 мкл.

ПИД датчик: 395°C.

Программа печи (используемая с 30.10.2003):	1	2	3
Температура печи, °C.	90	280	350
Изотермический, время, мин.	1	0	10
Скорость изменения температуры, °C/мин.	15	4	

Приготовление образца: 50 мг образца растворили в 12 мл пиридина, содержащего внутренний стандарт гептадекан, 0,5 мг/мл. 500 мкл раствора образца затем перенесли в закупоренный флакон, добавили 100 мкл MSTFA:TMCS - 99:1 (N-метил-N-триметилсилил-трифторацетамид) и проводили реакцию в течение 20 мин при 60°C.

Вычисление: факторы ответа для стерина, стеринпальмитата и стеарата стерина были определены на основании чистого материала сравнения (взвешивание и добавление 8-10 мг чистого материала в 12 мл пиридина, содержащего внутренний стандарт гептадекан, 0,5 мг/мл).

Количественное определение фермента, TИPU.

Субстрат.

0,6% L-α 95% растительного фосфатидилхолина (Avanti # 441601), 0,4% Тритон-X 100 (Сигма

X-100) и 5 мМ CaCl₂ растворили в 0,05 М HEPES буфере с pH 7.

Процедура испытания.

34 мкл субстрата добавили в кювету, используя автоматический анализатор KoneLab.

Во время T=0 мин было добавлено 4 мкл ферментативного раствора. Также был проанализирован холостой раствор с водой вместо фермента. Образец смешали и инкубировали при 30°C в течение 10 мин.

Содержание свободных жирных кислот в образце было проанализировано при использовании комплекта NEFA C от WAKO GmbH.

Ферментативная активность TИРU pH 7 была вычислена как микромоль жирной кислоты, полученной в минуту при условиях испытания.

Процедура рафинирования в лабораторном масштабе.

100 г неочищенного соевого масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 50, или 55, или 60, или 65, или 70°C.

Затем к маслу добавили воду, что сопровождалось добавлением фермента. Масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30, 120 или 180 мин 10 мл масла перенесли в 12-мл центрифужную пробирку (предварительно масштабированную). Масло нагрели до 97°C в бане с кипящей водой в течение 10 мин и затем немедленно центрифугировали при 5000g в течение 5 мин. Масло декантировали от смоляной фазы и пробирку дренировали в течение 30 мин и определяли вес обеих фаз (см. фиг. 75).

Масляная фаза была проанализирована на свободные стеринны, стеринные эстеры и свободные жирные кислоты путем ГЖХ, а масляная фаза была также проанализирована с помощью ТСХ (см. фиг. 76).

Результаты.

Пример 2а.

В этом эксперименте KLM3' была проверена в процессе рафинирования гидратацией неочищенного SBO 1.

Были протестированы различные дозировки KLM3' от 0,1 до 0,5 TИРU/г масла, а также было проверено воздействие смешивания Ultra Turrax.

Таблица ниже вместе с фиг. 77 показывает четкое сокращение фазы смолы и улучшенный выход масла (в масляной фазе) в образцах, обработанных KLM3'.

Отмечалось увеличение приблизительно на 2% масла и наблюдалась тенденция того, что был получен увеличенный выход путем повышения дозировки фермента.

Смешивание также оказало влияние на фазу смолы. Было замечено, что обработка масла Ultra Turrax в течение 30 с сразу после добавления фермента давало меньшую фазу смолы, но эффект добавления фермента был почти таким же со смешиванием Ultra Turrax или без него. В промышленности нормально накачивать масло через статический миксер или динамический миксер после добавления и, чтобы подражать этому в лабораторном масштабе, было решено использовать смешивание Ultra Turrax.

2460-150 (Пример 2а)		1*	2	3	4	5*	6	7	8
Неочищенное соевое масло Solae d.27-9-07	г	100	100	100	100	100	100	100	100
KLM3' 100 TИРU/мл	мл	0	0,1	0,25	0,5	0	0,1	0,25	0,5
Дополнительная вода	мл	2,00	1,90	1,75	1,50	2,00	1,90	1,75	1,50
TИРU/г масла		0,00	0,10	0,25	0,50	0,00	0,10	0,25	0,50
% воды		2	2	2	2	2	2	2	2
Ultra Turrax		-	-	-	-	+	+	+	+
pH		5,39	5,7	5,91	5,72	5,55	5,99	5,72	5,49
Фаза смолы, %		8,48	6,36	5,73	4,76	6,19	4,63	4,44	4,19
Масляная фаза %		91,5	93,6	94,3	95,2	93,8	95,4	95,6	95,8

* Контроль без добавления фермента

Пример 2b.

Два различных неочищенных SBO были протестированы при рафинировании гидратацией согласно стандартной процедуре с добавлением KLM3' фермента или без него. Дозировка фермента составляла 0,25 TIPE/г.

Рецепт.

2460-151 (Пример 2b)		1	2	3	4
SBO 1	г	100	100		
SBO 2	г			100	100
KLM3' 100 TIPE/мл	мл	0	0,25	0	0,25
Дополнительная вода	мл	2,00	1,75	2,00	1,75
TIPE/г масла		0,00	0,25	0,00	0,25
% воды		2	2	2	2
pH		5,78	5,75	5,73	5,68

Результаты, показанные в таблице ниже, указывают на четкое сокращение фазы смолы и через 30 и через 120 мин реакции, что соответствует более высокому выходу масла. Анализ стерина и стеринового эстера в масляной фазе показал высокую конверсию стерина в стеринный эстер в обработанных ферментом образцах. Также замечено, что количество свободной жирной кислоты (СЖК) увеличилось, потому что также имела место гидролитическая активность.

Результаты.

2460-151	SBO 1	SBO 1	SBO 2	SBO 2
KLM3', масло Е/г	0	0,25	0	0,25
% Смола, 30 мин	6,20	5,21	5,66	4,80
% Смола, 120 мин	5,59	4,86	5,24	3,90
% Масло, 30 мин	93,8	94,79	94,34	95,2
% Масло, 120 мин	94,41	95,14	94,76	96,1
Масляная фаза				
Общее количество СЖК	0,37	0,53	0,64	0,85
Стерины	0,31	0,09	0,27	0,07
Стеринный эстер	0,14	0,47	0,12	0,50

Пример 2с.

В этом эксперименте были протестированы различные дозировки KLM3' в рафинировании гидратацией SBO2 при 50°C. Были также протестированы различные уровни воды, а именно 1,5, 2 и 2,5%, в процессе с добавлением фермента и без него.

Рецепт.

2460-152 (Пример 2с)	1	2	3	4	5	6	7	8
SBO 2	г	100	100	100	100	100	100	100
KLM3' 100 TIPE/мл	мл	0	0,1	0,25	0,4	0	0,25	0
Дополнительная вода	мл	2,00	1,90	1,75	1,60	1,50	1,25	2,25
Масло TIPE/г		0,00	0,10	0,25	0,40	0,00	0,25	0,00
% вода		2	2	2	2	1,5	1,5	2,5
pH		5,32	5,92	5,72	5,59	5,58	5,73	5,30

Результаты, показанные в таблицах, а также на фиг. 78-84, четко указывают уменьшенное количество фазы смолы и, поскольку сумма фазы смолы и масляной фазы составляет 100%, приходят к заключению, что ацилтрансфераза (KLM3') способствует улучшению выхода масла в масляной фазе.

Было также замечено, что содержание фосфолипида в фазе смолы было уменьшено в обработанных ферментом образцах. И фосфатидилэтаноламин (PE) и фосфатидная кислота (PA) были уменьшены в фазе смолы относительно количества этих фосфолипидов в фазе смолы без обработки ферментом. Количество триглицерида в фазе смолы было также меньшим в обработанных ферментом фазах смолы, что также подтверждает увеличение выхода масла (в масляной фазе) в обработанных ферментом образцы.

Количество воды, добавленной к неочищенному соевому маслу, также показало, как ожидалось, воздействие на количество фазы смолы, но результаты также подтвердили эффект ацилтрансферазы на выход при различном добавлении воды относительно контроля без добавления фермента (см. фиг. 80).

В экспериментах рафинирования гидратацией pH был в диапазоне от 5,5 до 6, что объясняет высокую активность фермента при низкой дозировке и высокую конверсию стерина в стеринные эстеры.

Результаты.

2460-152		1	2	3	4	5	6	7	8
Фаза смолы									
Смола, 30 мин	%	6,48	5,14	5,68	5,19	5,73	4,85	7,06	6,03
Смола, 120 мин	%	5,79	5,88	4,86	4,94	5,65	5,07	6,12	5,96
Анализ ТСХ									
Фосфор	м.д.	66	73	64	58	76	62	65	62
РА,	% отн.	100	61	45	35	86	47	105	50
РЕ	% отн.	100	45	24	18	88	26	102	34
Триглицерид	%	65	26	37	29	62	41	62	38
Анализ ГЖХ									
СЖК	%	0,63	0,71	0,78	0,87	0,57	0,79	0,57	0,73
Свободные стеринны		0,27	0,12	0,06	0,05	0,27	0,06	0,26	0,11
Стериновые эстеры		0,18	0,41	0,47	0,51	0,12	0,53	0,13	0,40

Исследования были сделаны в двойном повторении, и результаты использовались для статистической оценки результатов с использованием программного обеспечения StatGraphic S Plus.

Пример 2d.

Чтобы исследовать эффект KLM3' на выход масла в различной температуре, фермент был протестирован в рафинировании гидратацией SBO2 при 55, 60, 65 и 70°C.

Рецепт.

2460-154, 155, 156 и 157		1	2	3	4
SBO 2	г	100	100	100	100
KLM3' 100 TIPE/мл	мл	0	0,10	0,20	0,30
Дополнительная вода	мл	2,00	1,90	1,80	1,70
Масло TIPE/г		0,00	0,10	0,20	0,30
% воды		2	2	2	2

Результаты, показанные в таблице ниже, четко иллюстрируют эффект KLM3' на количество фазы смолы. Дозировка 0,1 TIPE/г масла при всех температурах дала существенное сокращение количества смолы. Увеличение количества фермента до 0,2 и 0,3 дополнительно немного уменьшило фазу смолы.

Результаты.

% фаза смолы путем рафинирования гидратацией SBO2 при различной температуре, времени реакции и дозировке фермента.

Температура °C	Время реакции минуты	Фермент 0 TIPE/г	Фермент 0,1 TIPE/г	Фермент 0,2 TIPE/г	Фермент 0,3 TIPE/г
55	30	6,53	4,77	5,12	5,54
60	30	6,64	4,83	4,73	4,55
65	30	6,79	5,63	5,05	4,94
70	30	6,49	4,58	4,36	4,23
55	120	6,29	4,94	4,72	4,80
60	120	5,79	4,76	4,47	4,05
65	120	6,70	5,37	4,84	5,39
70	120	5,05	4,41	3,39	3,00

Пример 3.

Ферментативное рафинирование гидратацией на экспериментальном заводе.

Рецепт.

Компоненты применяли в экспериментальных испытаниях рафинирования гидратацией.

Партия 1: контроль, 70°C.

Партия 2: с ферментом (а именно, липидацилтрансфераза K932 - иногда упоминаемая авторами как KLM3' - которая имеет аминокислотную последовательность, показанную авторами как SEQ ID No. 68), 70°C.

Партия 3: контроль, 55°C.

Партия 4: с ферментом (а именно, липидацилтрансфераза K932 - иногда упоминаемая авторами как KLM3' - которая имеет аминокислотную последовательность, показанную авторами как SEQ ID No. 68), 55°C.

Количество		Партия			
		1	2	3	4
№ в журнале		2460-158		2460-160	
Неочищенное соевое масло	кг	20	20	20	20
K932, 1128 TIPE/мл	Мл	0	3,55	0	3,55
Дополнительная вода	Мл	400,30	396,10	400,1	396,47
Масло TIPE-К/г		0,00	0,2	0,00	0,2
Вода	%	2	2	2	2

Экспериментальная заводская процедура рафинирования гидратацией.

Масло было первоначально нагрето под N_2 и при встряхивании в 50-литровом резервуаре. Впоследствии к маслу была добавлена вода (и фермент). В начальных экспериментах (партии 1 и 2) масло было рециркулировано после добавления воды и фермента с помощью гомогенизатора (Silverson, Chesham, Швеция). В партиях 3 и 4 для снижения встряхивания в резервуаре использовался только рециркуляционный насос.

Образцы масла были собраны (партии 1-4) для лабораторного анализа через 30 мин ферментативной активности и их поместили в баню с кипящей водой (10 мин), чтобы инактивировать фермент. Инактивация оставшегося масла в резервуаре была осуществлена путем нагрева масла до 75°C (при встряхивании). Впоследствии, центрифугирование было выполнено в предварительно подогретой (горячей водой) центрифуге (Alfa Laval) и масляная фаза была набрана в ведра и взвешена. Тестировались различные регуляторы емкости центрифуги, не было возможности контролировать отделенную фазу смолы, поскольку объем центрифуги был слишком большой по сравнению с количеством масла. Фаза смолы была, таким образом, собрана с крышки центрифуги, где она накопилась.

Лабораторное рафинирование гидратацией и центрифугирование.

100 г неочищенного соевого масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C. К маслу добавили воду, что сопровождалось добавлением фермента. Масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30 мин 10 мл масла перенесли в 12-мл центрифужную пробирку (предварительно масштабированную). Масло нагрели до 97°C в бане с кипящей водой в течение 10 мин и затем немедленно центрифугировали при различных относительных силах центрифугирования (500, 1000, 2500 и 5000) в течение разного периода времени (3, 6 и 10 мин).

Масло декантировали из фазы смолы и пробирки дренировали в течение 15 мин и определяли вес обеих фаз. Масляная фаза была проанализирована на свободные фитостерины, стеринэстеры и свободные жирные кислоты путем ГЖХ, а масляная фаза была проанализирована с помощью ВЭ-ТСХ.

Результаты и обсуждение.

Выход масла.

Фиг. 85 показывает увеличение выхода масла, полученного из ферментативного рафинирования неочищенного соевого масла в соответствии с существующим изобретением по сравнению с контролем. Масло центрифугируется при увеличенной относительной центрифугирующей силе (rcf) (500, 1000, 2500 и 5000) в течение 3 мин, и выход масла вычисляют из количества (%) смолы в контроле с вычетом количества смолы в ферментативных образцах.

Четко замечено, что выход масла увеличивается при ферментативном рафинировании по сравнению с контролем и что выход масла увеличивается с уменьшением ОЦС.

Эффект центрифугирования.

Количество триглицеридов в смоле и количество смолы, полученной из образцов масла, центрифугируемых в разное время (минуты в столбцах), показано для партий 3 и 4 на фиг. 86.

Результаты иллюстрируют, что ОЦС влияет на количество (%) смолы, полученной в результате обычного рафинирования (синие столбцы). Первоначально, при низкой ОЦС (500-1000) количество смолы является высоким (высокое содержание триглицеридов) по сравнению с количеством, полученным при относительных силах центрифугирования, составляющих 2500-5000. Время центрифугирования (3, 6 и 10 мин), по-видимому, не влияет на количество смолы, по крайней мере, не при центрифугировании при 5000 ОЦС.

При инспектировании смолы, полученной при ферментативном рафинировании согласно существующему изобретению, обнаружено, что на количество, по-видимому, не влияет ОЦС и время. Не ограничиваясь теорией, этот факт может объясняться различиями в вязкости между смолами, полученными из обычного и ферментативного рафинирования согласно существующему изобретению. На фиг. 87 показаны показатели вязкости на основании фаз смолы. Вязкость уменьшается с увеличением скорости сдвига для обоих типов смолы, однако вязкость уменьшается до более высокой степени в смолах, полученных при ферментативном рафинировании в соответствии с существующим изобретением.

Кроме того, увеличение выхода масла, уменьшение вязкости, достигнутые с помощью существующего изобретения, могут иметь другую выгоду для промышленного рафинирования гидратацией. Вероятно, что может быть увеличена производительность.

Пример 4.

Оценка NaOH при рафинировании гидратацией неочищенного соевого масла.

Рецепт.

Таблица 1

Образцы для испытаний рафинирования гидратацией

Журнал 2460-181		1	2	3	4	5	6	7	8
Неочищенное соевое масло	г	100	100	100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPE/мл	мл	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
4% раствор NaOH	мл	0	0	0,1	0,2	0,5	1	1,5	1,9
Дополнительная вода	мл	2,00	1,90	1,80	1,70	1,40	0,90	0,40	0,00
Масло TIPE-K/г		0,00	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
% воды		2	2	2	2	2	2	2	2

Лабораторная процедура рафинирования гидратацией.

100 г неочищенного соевого масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C. К маслу добавили воду и NaOH, что сопровождалось добавлением фермента. Масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30 мин приблизительно 10 мл масла перенесли в 12-мл центрифужную пробирку (предварительно масштабированную). Масло нагрели до 97°C в бане с кипящей водой в течение 10 мин.

Результаты и обсуждение.

Анализ выхода масла.

Фиг. 88 показывает увеличение выхода масла, полученное при ферментативном рафинировании с KLM3' (а именно, липидацилтрансфераза K932 - иногда упоминаемая авторами как KLM3' - которая имеет аминокислотную последовательность, показанную авторами как SEQ ID No. 68) (0,1 TIPE-K/г) и увеличивающемся количестве NaOH (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 и 1,9 мл 4%-ного раствора). Вычисления основаны на количестве смолы в контроле за вычетом количества смолы в ферментативных образцах.

Самое высокое увеличение выхода масла достигается ферментативным рафинированием без NaOH, и вообще увеличенный выход масла (%) уменьшается с увеличением количества NaOH. Это наиболее вероятно можно объяснить увеличением омыления триглицеридов с увеличением количества NaOH. Однако, инспектируя триглицериды в контроле и ферментативных образцах смолы (фиг. 89), обнаружено, что содержание не заметно выше в обработанной NaOH смоле, чем то, которое обычно наблюдается без NaOH. Уровень триглицерида в ферментативных образцах без NaOH аналогично является сопоставимым с предыдущими наблюдениями.

Анализ жирных кислот, фитостеринов и фитостеринового эстера в масле.

Содержание фитостеринов, фитостериновых эстеров и свободных жирных кислот в контроле и ферментативно обесмоленных маслах изображено на фиг. 90. Содержание фитостериновых эстеров увеличивается с 0,19% (контроль) до 0,42% (0,2 мл NaOH), где оно достигает максимума. После этой точки фитостериновые эстеры уменьшаются до 0,15%. Соответственно, наблюдается начальное уменьшение фитостеринов от 0,3-0,12%, что сопровождается увеличением с 0,12-0,28%.

СЖК также увеличиваются до pH 6,3 (0,2 мл NaOH) наиболее вероятно из-за увеличенного омыления.

Результаты четко иллюстрируют, что проведение рафинирования гидратацией при более высоких значениях pH увеличивает трансферазную активность липидацилтрансферазы KLM3'. Даже небольшое увеличение pH (например, 0,1 мл NaOH) увеличивает образование фитостериновых эстеров приблизительно с 50%, почти не влияя на образование СЖК в масле (увеличивает 0,02%). Увеличение уровня СЖК важно учитывать, поскольку СЖК испаряются во время стадии устранения запаха и, таким образом, расцениваются как потеря масла.

Анализ содержания фосфолипида в масле.

Табл. 2 показывает содержание (м.д) фосфолипидов (фосфатидил-этаноламина и фосфатидной кислоты) в маслах (контроль и ферментативные образцы), обесмоленных с помощью возрастающих количеств (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1 и 1,9 мл) NaOH.

Таблица 2

Содержание (м.д.) фосфора из ЗФ, РЕ, РС и общий фосфор в маслах, рафинированных возрастающим количеством (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 и 1,9 мл) 4%-ного раствора NaOH.

	Образец							
pH	5,3	5,9	6,3	6,6	7,4	7,8	8,2	8,3
KLM3' (ТИРЕ-К/г)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
NaOH (мл)	0	0	0,1	0,2	0,5	1	1,5	1,9
РА	34,0	33,8	35,3	38,4	36,8	36,7	34,8	38,8
РЕ	6,8	5,9	5,0	5,6	4,9	4,0	5,0	4,6
РС	1,9	0,8	0	0	0	0,7	2,8	0,9
Общее содержание фосфора	42,8	40,6	40,2	44,1	41,8	41,5	42,6	44,3

Самое высокое сокращение (40,2 м.д.) фосфора наблюдается в маслах, рафинированных с 0,1 мл NaOH (pH 6,3), однако сопоставимое содержание получено при нормальных условиях рафинирования (0 мл NaOH). Следовательно, по-видимому, увеличение pH на 1,0 единицу действительно влияет на гидролитическую активность KLM3'. При pH выше 6,3 (>0,2 мл NaOH) наблюдается уменьшенная деградация фосфолипида по сравнению с "нормальными" ферментативными условиями.

Анализ содержания фосфолипида в смоле.

Фиг. 91 показывает относительную деградацию фосфатидной кислоты (РА), фосфатидилэтанолamina (РЕ), фосфатидилхолина и фосфатидилинозита (РІ) в ферментативных образцах смолы по сравнению с контролем. Деградация фосфолипидов в контроле установлена на 100%, и содержание в ферментативных образцах вычисляется по отношению к контролю.

Деградация фосфолипида в ферментативных образцах с помощью 0, 0,1 и 0,2 мл NaOH аналогична. Следовательно, применение NaOH в количестве меньше чем 0,2 мл не ослабляет деградацию фосфолипидов по сравнению с ферментативным рафинированием с помощью только KLM3'. Напротив, уменьшенная деградация наблюдается в маслах при применении NaOH в большем количестве (0,5, 1 и 1,9 мл).

Закключение.

Увеличение pH с помощью NaOH при рафинировании гидратацией неочищенного соевого масла привело, как ожидалось, к увеличению активности KLM3'. Образование фитостериновых эстеров увеличилось параллельно с увеличением количества NaOH. Максимальный уровень фитостериновых эстеров (0,42%) был получен при pH 6,3 (0,2 мл NaOH), за которым последовало непрерывное уменьшение. Подобное поведение наблюдалось для СЖК в масле, уровень которых увеличился с 0,46% в контроле до 0,60% в маслах, рафинированных с помощью 0,2 мл NaOH, после чего уменьшился.

Маленькое количество NaOH не влияло на гидролитическую активность KLM3', как наблюдается у сопоставимых уровней фосфолипидов в маслах, рафинированных с помощью 0 и 0,1 мл NaOH. Деградация фосфолипидов в фазе смолы была уменьшена по сравнению с нормальным ферментативным рафинированием (только KLM3') при pH выше 7,5 (>0,5 мл NaOH).

Самое высокое увеличение выхода масла было достигнуто с помощью ферментативного рафинирования без NaOH, и вообще % увеличение выхода масла уменьшалось с увеличением количества NaOH.

Закключение данного эксперимента состоит в том, что маленькое количество NaOH может быть выгодным для образования фитостериновых эстеров при рафинировании гидратацией, однако NaOH не оказывает положительного влияния на выход масла и деградацию фосфолипида.

Пример 5.

Анализ фазы смолы из ферментативного рафинирования гидратацией - Микроскопия и рентгенографический анализ.

Рецепт.

	1	2
Неочищенное соевое масло Solae	г 100	100
K932 100 ТИРЕ-К/мл	мл 0	0,20
Дополнительная вода	мл 2,00	1,80
Масло ТИРЕ-К/Г	0,00	0,20
% воды	2	2

Лабораторная процедура рафинирования гидратацией.

100 г неочищенного соевого масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C. К маслу добавили воду, что сопровождалось добавлением фермента. Масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30 мин масло центрифугировали (2000 gcf в течение 3 мин). Фаза смолы была взята для микроскопии и рентгенографического анализа.

Результаты и обсуждение.

Микроскопия/рентгенографический анализ.

Смола из контрольных испытаний и испытаний ферментативного рафинирования гидратацией (последние в соответствии с существующим изобретением) была собрана для рентгенографического анализа

и микроскопии. Фазы смолы были изучены под микроскопом (плоскополяризованный свет) при различных температурах (25, 35, 45, 55 и 65°C). При всех температурах смола была в чешуйчатой фазе (двойные слои липида, разделенные водными слоями), что наблюдается для контрольного и ферментативного образцов (25°C) на фиг. 92.

Несколько различий появляется между контрольным и ферментативным образцами. Контрольная смола кажется более грубой, чем ферментативно рафинированный образец в соответствии с существующим изобретением. Различия между контрольным и ферментативным образцом также могут наблюдаться при рентгенографическом анализе, как видно на фиг. 93.

Большой интервал, составляющий приблизительно 20 Å, в контроле по сравнению с обработанным ферментом образцом соответствует длине цепи жирной кислоты (C 18). Интервал выражает водный и фосфолипидный слой, следовательно, большой интервал в контроле может объяснить, что контроль содержит дополнительный монослой жирных кислот или что больше воды поглощается фазой смолы.

Пример 6.

Исследование седиментации.

Рецепт.

	1	2
Неочищенное соевое масло Solae	г 200	200
K932 100 TIPE-K/мл	мл 0	0,4
Дополнительная вода	мл 4,00	3,60
Масло TIPE-K/г	0,00	0,20
% воды	2	2

Процедура.

100 г неочищенного соевого масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C. К маслу добавили воду, что сопровождалось добавлением фермента. Масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30 мин образцы поместили в делительные воронки. Снимки фазы смолы делались через 1, 3 и 6 дней. После 6-го дня смола была взята для анализа микроскопией.

Результаты.

Снимки фаз смолы /микроскопии.

На фиг. 94 фазы масла и смолы могут наблюдаться для контроля и ферментативного образца. Седиментация под действием силы тяжести происходила в течение 3 дней. Между контролем и ферментативным образцом существуют четкие различия, что отмечается как для фазы масла, так и смолы.

Масляная фаза ферментативно обработанного масла (т.е. обработанного в соответствии с существующим изобретением) прозрачнее, чем контроль, и наблюдается уменьшенное количество смолы по сравнению с контролем. Результаты могут быть объяснены на основе анализа микроскопией (фиг. 95). Ферментативно обработанная смола наблюдается в виде эмульсии, в то время как контрольная смола представляет собой чешуйчатую фазу.

Пример 7.

Оценка переменного количества воды при ферментативном рафинировании неочищенного соевого масла

Рецепты.

Журнал 2460-165	1	2	3	4	5	6	7	8
Неочищенное соевое масло Solae	г 100	100	100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPE-K/мл	Мл 0	0,2	0	0,2	0	0,2	0	0,2
Дополнительная вода	Мл 1,00	0,800	1,50	1,30	2,00	1,80	2,50	2,30
KLM3' активность (масло TIPE-K/г)	0,00	0,20	0,00	0,20	0,00	0,20	0,00	0,20
% воды	1	1	1,5	1,5	2	2	2,5	2,5

Журнал 2460-169	1	2	3	4	5	6
Неочищенное соевое масло Solae	г 100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPE-K/мл	мл			0,2	0,2	0,2
Дополнительная вода	мл 1,00	1,50	2,00	0,80	1,30	1,80
KLM3' активность (масло TIPE-K/g)				0,20	0,20	0,20
% воды	1	1,5	2	1	1,5	2

Журнал 2460-170	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Неочищенное соевое масло Solae	г 100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPE-K/мл	мл 0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Дополнительная вода	мл 1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	0,80	1,05	1,30	1,55	1,80
KLM3' активность (масло TIPE-K/г)	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
% воды	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00

Процедура лабораторного рафинирования гидратацией.

100 г неочищенного соевого масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C. К маслу добавили воду, что сопровождалось добавлением фермента. Масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30 мин 10 мл масла перенесли в 12-мл центрифужную пробирку (предварительно масштабированную). Масло нагрели до 97°C в бане с кипящей водой в течение 10 мин. Пробирки центрифугировали при 300 оцс в течение 3 мин. Масло декантировали из фазы смолы и пробирки дренировали в течение 15 мин, переворачивая пробирку вверх дном. На основании массы фазы смолы был вычислен выход масла.

Результаты и обсуждение.

Выход масла.

Фиг. 96 показывает увеличенный выход масла, полученный при ферментативном рафинировании гидратацией неочищенного соевого масла с разными количествами воды. Увеличенный выход масла вычисляют из количества смолы в контроле за вычетом количества смолы в ферментативных образцах.

Ферментативное рафинирование позволяет получить увеличенный выход масла по сравнению с контролем, и, по-видимому, выход масла увеличивается с уменьшением количества воды. Выход масла увеличивается приблизительно на 50% при ферментативном рафинировании по сравнению с контролем, в то время как содержание воды уменьшается от 2 до 1%.

Эти вычисления основаны на количестве смолы и, следовательно, также включают содержание триглицеридов в фазе смолы. При инспектировании фактической потери масла (на основании количества смолы и содержания триглицерида в смоле) (фиг. 97), потеря масла уменьшается в контроле с увеличением содержания воды. Однако при ферментативном рафинировании количество воды оказывает некоторое влияние на потерю масла. Приблизительно 2% масла теряется при ферментативном рафинировании по сравнению с 3,5-6,5% в контроле.

Уменьшенное количество воды при ферментативном рафинировании гидратацией может быть финансовым преимуществом для промышленности (меньше промышленной воды) и наиболее вероятно также относительно экономии энергии во время высушивания фазы смолы.

Дегградация фосфолипида в фазе смолы.

Относительная дегградация (%) фосфатидной кислоты (РА) и фосфатидилэтаноламина (РЕ) в ферментативных фазах смолы относительно контроля показана на фиг. 98.

Дегградация фосфолипида с помощью KLM3', по-видимому, является более выраженной при более низких концентрациях воды. В целом ферментативное рафинирование с помощью KLM3' и 1% воды, по-видимому, является преимуществом относительно дегградации фосфолипидов по сравнению с рафинированием с 2% воды.

Измерения вязкости фазы смолы.

Вязкость ферментативных (KLM3' 0,2 TIPE-К/г) фаз смолы при рафинировании с различным количеством воды показана на фиг. 99. Различное содержание воды заметно не повлияло на вязкость. При более низкой скорости сдвига (до приблизительно 10) вязкость несколько подобна для всех образцов, однако после этой точки вязкость образцов с самым низким количеством (1,25%) воды увеличивается, в то время как образцов смолы с самым высоким количеством (2%) воды увеличивается.

Пример 8.

Рафинирование гидратацией неочищенного кукурузного масла.

Резюме.

Липидацилтрансфераза, KLM3' (иногда упоминаемая авторами как KLM3' и которая имеет аминокислотную последовательность, показанную авторами как SEQ ID No. 68, была протестирована на неочищенном кукурузном масле с целью изучить эффекты на выход масла при рафинировании гидратацией этого масла.

Материалы и методы.

Фермент:

KLM3' K932 - 1128 TIPE/г.

Масло:

Неочищенное кукурузное масло от Cargill, май 2008 г.

Процедура рафинирования.

100 г неочищенного кукурузного масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C.

Были добавлены вода и фермент и масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30 мин 10 мл масла перенесли в 12-мл герметичную центрифужную пробирку и отметили массу масла. Масло нагрели до 97°C в бане с кипящей водой в течение 10 мин, а затем немедленно центрифугировали при 3000 оцс в течение 3 мин. Масло декантировали из фазы смолы и пробирки дренировали в течение 15 мин, переворачивая пробирку вверх дном. На основании массы фазы смолы был вычислен выход масла по отношению к маслу, не обработанному ферментом. Затем фазу смолы проанализировали с помо-

щью ВЭ-ТСХ и была вычислена деградация фосфолипидов в фазе смолы.

Результаты.

Процесс рафинирования масла проводился с различными концентрациями KLM3'.

Таблица 1

Рецепт для рафинирования неочищенного кукурузного масла

2460-182		1	2	3	4	5
Неочищенное кукурузное масло	г	100	100	100	100	100
K932 100 TIPE-К/мл	мл	0	0,050	0,10	0,20	0,50
Дополнительная вода	мл	2,00	1,95	1,90	1,80	1,50
Масло TIPE/г		0,00	0,05	0,10	0,20	0,50
% воды		2	2	2	2	2

Образцы обрабатывали так, как описано в "процедуре рафинирования", и количество влажной смолы было определено в двойном повторении с результатами, показанными ниже.

Таблица 2

Фаза смолы, % при рафинировании гидратацией неочищенного кукурузного масла

Образец	Фермент, Единицы/г	Фаза смолы	Увеличение выхода
1	0	6,0	0,00
2	0,05	5,7	0,28
3	0,1	5,5	0,44
4	0,2	5,6	0,36
5	0,5	5,6	0,38

Из результата в табл. 2 видно, что KLM3' способствуют уменьшению количества фазы смолы путем рафинирования гидратацией неочищенного кукурузного масла. Уменьшенное количество фазы смолы соответствует увеличению масляной фазы от 0,28 до 0,44%.

Фаза смолы, изолированная при рафинировании гидратацией неочищенного кукурузного масла, была проанализирована с помощью ТСХ и сокращение содержания фосфатидилэтаноламина и фосфатидной кислоты было вычислено по отношению к количеству в смоле без обработки ферментом (табл. 3)

Таблица 3

ТСХ анализ фазы смолы

Дозировка фермента	РА	РЕ
Масло TIPE/г	Относительное %	Относительное %
0	100	100
0,05	88	85
0,1	73	68
0,2	75	72
0,5	72	64

РЕ = фосфатидилэтаноламин, РА = фосфатидная кислота.

Результаты из табл. 3 указывают на активность KLM3' на фосфолипидах в неочищенном кукурузном масле. Повышенная активность фермента отмечалась до дозировки, равной 0,1 TIPE/г масла. При более высокой дозировке активность фермента по отношению к фосфолипидам выравнивается.

Пример 9.

Рафинирование гидратацией неочищенного соевого масла и добавление акцепторов.

Липидацилтрансфераза, KLM3', была протестирована в неочищенном соевом масле от Solae с целью изучить эффекты добавления акцепторного субстрата для фермента KLM3'.

В этом исследовании были протестированы фитостериновый продукт Generol 122 от Henkel, Германия, а также жирный спирт и лауриловый спирт.

Добавление фитостерина к маслу позволило получить больше стеринового эстера, что способствует сокращению образования свободных жирных кислот. Пришли к заключению, что более высокая степень преобразования фосфолипида может быть достигнута без увеличения производства жирных кислот при наличии большего количества акцепторного субстрата.

Материалы и методы.

Фермент:

KLM3' K932 (имеющая аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID No. 68) - 1128 TIPE/г.

Фитостерин из сои: Generol 122 N, от Grünau, Illertissen, Германия.

Лауриловый спирт: Сигма L-5375.

Масло:

Неочищенное соевое масло от Solae, январь 2008 г.

Стандарт смеси соевых лецитинов (ST16) от Spectra Lipid, Германия.

Процедура рафинирования.

100 г неочищенного соевого масла, фитостерина и лаурилового спирта масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C. Фитостерин полностью растворили в масле перед дальнейшей обработкой.

Были добавлены вода и фермент и масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30 мин 10 мл масла перенесли в 12-мл герметичную центрифужную пробирку и отметили массу масла. Масло нагрели до 97°C в бане с кипящей водой в течение 10 мин, а затем немедленно центрифугировали при 3000 оцс в течение 3 мин. Масло декантировали из фазы смолы и пробирку дренировали в течение 15 мин, переворачивая пробирку вверх дном. На основании массы фазы смолы был вычислен выход масла. Затем фазу смолы и масляную фазу проанализировали с помощью ВЭ-ТСХ и было вычислено количество триглицерида в фазе смолы и деградация фосфолипидов в масляной фазе.

Результаты.

Процесс рафинирования масла проводился с различными концентрациями KLM3, фитостерина и жирного спирта, как показано в табл. 1.

Таблица 1

Рецепт для рафинирования неочищенного соевого масла										
2460-182		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Неочищенное соевое масло, Solae d,16-01-2008	г	100	100	100	100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPE-K/мл	мл	0	0,20	0,20	0,20	0,2	0,2	1	1	0,2
Generol 122 N	г		0	0,25	0,50	0,75	0,75		0,75	
4% NaOH	мл						0,2			
Лауриловый спирт	г									0,5
Дополнительная вода	мл	2,00	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,00	1,00	1,80
pH		4,90	5,65	5,55	5,48	5,41	6,18	5,29	5,27	5,57
Масло TIPE/г		0,00	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	1,00	1,00	0,20
% воды		2	2	2	2	2	2	2	2	2

Образцы обрабатывали, как описано в "процедуре рафинирования", и количество влажной смолы было определено в двойном повторении с результатами, показанными на фиг. 100.

Добавление возрастающего количества фитостерина не способствовало какому-либо уменьшению % смолы, и коррекция pH (испытание 6) не оказывала никакого существенного эффекта на количество смолы, хотя есть тенденция к большему количеству смолы в этом испытании. Добавление 0,2 TIPE/г KLM3' имело существенный эффект на содержание смолы, и было показано, что увеличение до 1 TIPE/г дополнительно уменьшило количество смолы. Лауриловый спирт не оказывал никакого эффекта на количество смолы.

Масляная фаза, отделенная от смолы, была проанализирована на свободные жирные кислоты, стерины и стеринные эстеры путем ГЖХ.

Результаты в табл. 2 указывают на увеличение свободных жирных кислот на 0,09% при ферментативной обработке с 0,2 TIPE/г (образец 2), но замечено, что образцы 3-5 с увеличенным уровнем фитостерина содержат меньше свободных жирных кислот. Также в образцах 7 и 8, обработанных 1 TIPE/г, наблюдается сокращение уровня свободных жирных кислот при добавлении к маслу большего количества стерина. Эти результаты указывают на то, что гидролитическая реакция уменьшается с увеличением количества стерина в масле.

Затем следует ожидать, что количество стеринного эстера увеличивается с увеличением стерина в масле. Это также замечено для образца 3, но с увеличением количества стерина (образцы 4 и 5) количество стеринных эстеров не изменяется. Даже наблюдается тенденция к уменьшенному количеству стеринного эстера в образце 5, но в пределах экспериментальной ошибки. Однако коррекция pH путем добавления NaOH имеет сильный эффект на образование стеринного эстера, как отмечалось прежде. Увеличенное количество фермента (образцы 7 и 8) также способствует увеличению образования стеринного эстера.

Таблица 2

ГЖХ анализы масляной фазы при рафинировании гидратацией образцов
(см. табл. 1)

Образец	Свободные жирные кислоты, %	Стерины %	Стериновый эстер, %
1	0,46	0,30	0,20
2	0,55	0,15	0,40
3	0,54	0,36	0,45
4	0,52	0,60	0,40
5	0,50	0,83	0,38
6	0,55	0,69	0,63
7	0,86	0,12	0,47
8	0,80	0,65	0,64
9	0,53	0,20	0,39

Фаза смолы, изолированная путем рафинирования гидратацией образцов (табл. 1), была проанализирована с помощью ВЭ-ТСХ, и деградация определенных фосфолипидов фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидной кислоты (PA) была определена количественно относительно контрольного образца № 1 (фиг. 101).

Результаты на фиг. 101 указывают на увеличенную деградацию PA и PE при добавлении 0,25% стерина.

Но увеличенная дозировка (0,5 и 0,75% стерина) не способствует дальнейшей деградации фосфолипида. Это соответствует наблюдениям за эффектом на образование стеринового эстера (см. табл. 2). Коррекция pH с помощью NaOH также оказывает сильный эффект на деградацию фосфолипида, но это связано с большей активностью фермента с увеличением pH.

Также замечено, что увеличение дозировки фермента до 1 TIPE/г дополнительно деградирует фосфолипиды.

Масляная фаза, изолированная форма при рафинировании гидратацией, была проанализирована ICP с целью проанализировать количество остаточного фосфора в масле.

Результаты на фиг. 102 указывают на то, что уровень фосфора в масле значительно не зависит от количества стерина в масле, но результаты указывают на то, что увеличение дозировки фермента (1 TIPE/г) оказывает эффект на уровень фосфора. Добавление лаурилового спирта (C12-спирта) оказывает отрицательный эффект на уровень фосфора в масляной фазе.

Заключение.

Добавление липидацилтрансферазы KLM3' к неочищенному маслу катализирует передачу остатка жирной кислоты от фосфолипида к стерину во время образования стериновых эстеров. На молекулярном уровне количество стерина меньше чем 1/3 количества фосфолипидов в неочищенном соевом масле. Поскольку ацильный акцептор стерин представляет собой ограничивающий фактор для KLM3' в неочищенном соевом масле, реакция гидролиза могла бы произойти в зависимости от дозировки фермента и времени реакции.

В этом исследовании было обнаружено, что добавление большего количества стерина к неочищенному маслу позволит получить больше стеринового эстера при обработке масла липидацилтрансферазой KLM3', и количество образованных свободных жирных кислот уменьшается по сравнению с маслом, к которому не был добавлен стерин.

Добавление дополнительного стерина не оказывает большого влияния на уровень фосфора в масляной фазе после рафинирования гидратацией, но замечено, что увеличение дозировки KLM3' уменьшает уровень фосфора в масляной фазе. Добавление 0,5% лаурилового спирта не оказывало большого эффекта на уровень свободной жирной кислоты, и анализом ГЖХ не было выявлено никакого эстера лаурилового спирта.

Пример 10.

Комбинация липидацилтрансферазы и фосфолипазы C.

Материалы и методы.

Фермент:

Липидацилтрансфераза KLM3' K932. 1128 LATE/г (имеющая аминокислотную последовательность, показанную авторами как SEQ ID No. 68).

Фосфолипаза C, Сигма P7633 15 единиц/мг.

Масло:

Неочищенное соевое масло от Solae, Орхус, ДК.

Процедура рафинирования.

100 г неочищенного соевого масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C. Добавили 0,14 мл 50% моногидрата лимонной кислоты. Масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Добавили 0,367 мл 1н. раствора NaOH, а затем 2,5% воды и 5 единиц/г масла фосфолипазы C. Масло снова гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 2 ч добавили

0,2 LATE/г масла фермента липидацилтрансферазы KLM3' и реакцию продолжали в течение еще 1 ч при перемешивании.

Масло нагрели до 97°C в бане с кипящей водой в течение 10 мин и затем немедленно центрифугировали при 300 оцс в течение 3 мин.

Масло декантировали из фазы смолы. Определили массу фазы смолы и масляной фазы. Масляную фазу проанализировали на остаточные фосфолипиды с помощью ТСХ и м.д. фосфора проанализировали ICP. Свободный стерин, стериновый эфир, свободную жирную кислоту и диэтиловый эфир проанализировали с помощью ГЖХ.

Фазу смолы проанализировали на триглицериды, диэтиловый эфир, остаточные фосфолипиды и свободные жирные кислоты.

Дегградация фосфолипидов в фазе смолы была проанализирована ТСХ.

Результаты.

Процесс рафинирования с комбинацией липидацилтрансферазы и фосфолипазы С, как ожидают, увеличивает выход масла больше чем на 2% по сравнению с маслом без обработки ферментом. Начальные исследования предполагают, что диэтиловый эфир был получен в масляной фазе в обработанном ферментом образце.

В масляной фазе после центрифугирования основная часть стеринов будет этерифицирована.

Предварительные исследования показывают, что уровень фосфора ниже 5 м.д. в масляной фазе и сильную дегградацию фосфолипидов в фазе смолы (т.е. фосфатидилхолин (PC) и фосфатидилэтаноламин (PE) почти полностью исчезают и происходит сильная дегградация фосфатидилинозита (PI) и фосфатидной кислоты (PA)).

Пример 11.

Липидацилтрансфераза в комбинации с фосфолипазой С.

Материалы и методы.

Фермент:

Липидацилтрансфераза KLM3' K932. 1128 LATE/г.

Фосфолипаза С Сигма P7633 15 единиц/мг.

Масло:

Неочищенное соевое масло от Solae, Орхуса, ДК.

Процедура рафинирования.

100 г неочищенного соевого масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C. Добавили 3% воды, а затем 0,1 единиц/г масла ацилтрансферазы KLM3' и 5 единиц фосфолипазы С. Масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 30 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30 мин 10 мл масла перенесли в 12-мл центрифужную пробирку и отметили массу масла. Масло нагрели до 97°C в бане с кипящей водой в течение 10 мин и затем немедленно центрифугировали при 300 оцс в течение 3 мин. Масляную фазу декантировали из фазы смолы и пробирку дренировали в течение 15 мин, переворачивая пробирку вверх дном. На основании массы фазы смолы был вычислен выход масла. Масляная фаза была проанализирована на остаточные фосфолипиды с помощью ТСХ и ICP. Свободный стерин, стериновый эфир, свободная жирная кислота и диэтиловый эфир были проанализированы с помощью ГЖХ. Фаза смолы была проанализирована на триглицериды, остаточные фосфолипиды и свободную жирную кислоту.

Результаты.

Предварительные исследования свидетельствуют, что процесс рафинирования гидратацией с комбинацией липидацилтрансферазы и фосфолипазы С приводит к существенному увеличению выхода масла больше чем на 2% по сравнению с маслом без обработки ферментом. Начальные исследования показывают, что в масляной фазе образуется диэтиловый эфир, и основная часть стеринов в масляной фазе - этерифицирована.

Пример 12.

Ферментативное рафинирование с помощью липидацилтрансферазы KLM3' и фосфолипазы С (PLC).

Материалы и методы.

Фермент:

Липидацилтрансфераза KLM3' K932. 1128 LATE/г.

Фосфолипаза С Сигма P7633 15 единиц/мг.

Масло:

Неочищенное соевое масло от Solae, Орхуса, ДК.

Процедура рафинирования.

100 г неочищенного соевого масла масштабировали в 250 мл колбе Blue Cap с крышкой и нагревали до 55°C. Добавили 3% воды, а затем 5 единиц/г масла фосфолипазы С. pH откорректировали до 5,5 с помощью NaOH. Масло гомогенизировали с помощью мешалки Ultra Turrax в течение 30 с и затем встряхивали в течение 15 мин при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 15 мин образец вынули и добавили 0,1 единиц/г масла ацилтрансферазы. Масло встряхивали в течение еще 15 мин при 55°C.

Через 2×15 мин 10 мл масла перенесли в 12-мл герметичную центрифужную пробирку и отметили массу масла. Масло нагрели до 97°C в бане с кипящей водой в течение 10 мин, а затем немедленно центрифугировали при 3000 оцс в течение 3 мин.

Масло декантировали из фазы смолы и дренировали в течение 15 мин, переворачивая пробирку вверх дном. На основании массы фазы смолы был вычислен выход масла.

Масляная фаза была проанализирована на остаточные фосфолипиды с помощью ТСХ и ИСР. Свободный стерин, стериновый эстер, свободная жирная кислота и диглицерид были проанализированы ГЖХ.

Фаза смолы была проанализирована на триглицериды, остаточные фосфолипиды и свободные жирные кислоты.

Результаты.

Начальные исследования свидетельствуют, что процесс рафинирования гидратацией с использованием комбинации липидацилтрансферазы и фосфолипазы С увеличивает выход масла больше чем на 2,5 % по сравнению с маслом без обработки ферментом. Предварительные исследования свидетельствуют, что диглицерид был получен в масляной фазе через 15 мин.

Основная часть стерина в масляной фазе будет этерифицирована.

Предварительные исследования свидетельствуют, что через 15 мин основная часть фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилхолина (PC) исчезла, но меньше активности может быть замечено по отношению к фосфатидилинозиту (PI) и фосфатидной кислоте (PA). В образце через 30 мин и центрифугирования также исчезнет основная часть PI и PA.

Пример 13.

Ферментативное рафинирование с липидацилтрансферазой KLM3' и фосфолипазой С (PLC).

Липидацилтрансфераза KLM3' и фосфолипаза С (PLC) от Сигма были протестированы по отдельности и в комбинациях при рафинировании гидратацией неочищенного соевого масла. Фосфолипаза С при рафинировании масла позволяет получить диглицерид из фосфолипидов в масле. К удивлению, было показано, что KLM3' может использовать диглицерид в качестве акцепторной молекулы во время производства триглицерида. Модельные эксперименты с субстратом, содержащим диглицерид и фосфатидилхолин, подтвердили, что липидацилтрансфераза (KLM3') катализирует реакцию передачи остатка жирной кислоты от фосфолипида диглицериду во время производства триглицерида.

Коммерческое значение результатов.

Это исследование было начато с целью показать, что комбинация KLM3' и фосфолипазы С (PLC) очень выгодна при рафинировании неочищенных растительных масел.

Фосфолипаза С от Verenium, США (а именно, Purifine®) была внедрена для использования при рафинировании масла (WO 2008/036863).

Этот фермент является активным на фосфолипидах (таких как фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин) в неочищенном масле, формируя диглицерид (диацилглицерин) и фосфорхолин, -этаноламин, -инозит или -кислоту. Диглицерид, произведенный во время этого процесса, является частью масла во время рафинирования масла и, таким образом, способствует улучшению выхода масла.

Изобретатели показали, что липидацилтрансферазы (такие как KLM3') могут поспособствовать улучшению выхода при рафинировании масла путем модификации фосфолипидов, сопутствующей образованию стеринового эстера.

Липидацилтрансферазы (такие как KLM3') могут использовать стерин в качестве ацильного акцептора, а также другие акцепторы, такие как спирты, включая жирные спирты.

Цель текущего исследования состояла в том, чтобы исследовать любой синергистический эффект при использовании липидацилтрансферазы (например, KLM3'), в комбинации с фосфолипазой С.

Материал и методы.

KLM3': Глицерофосфолипидхолестеринацилтрансфераза (FoodPro LysoMax Oil) (K932) (SEQ ID No. 68).

Партия № 102629600.

Активность 1128 LATE/г.

Фосфолипаза С P7633 Сигма, от *Clostridium perfringens*, 135,3 мг.

Твердая: 3,8 единицы/мг твердого вещества, 13,2 единицы/мг белка.

Фосфолипаза С P6621 Сигма, от *Bacillus cereus*, 250 единиц.

Диглицерид. Дистиллированный диглицерид из подсолнечного масла, Журн. 2641/064.

Фосфатидилхолин, Avanti # 441601 Моно-ди-тиглицерид: GRINDSTED® MONO-DI R 50/D.

Неочищенное соевое масло № 18: из Аргентины.

Анализ ВЭ-ТСХ.

Деградация фосфолипидов в фазе смолы из обработанных ферментом образцов была проанализирована путем ВЭ-ТСХ.

Аппликатор: Автоматический сэмплер для ТСХ 4, CAMAG.

Пластика для ВЭ-ТСХ: 20×10 см, Merck № 1.05641. Активируется за 10 мин при 160°C перед ис-

пользованием.

Нанесение.

Фазу смолы из 10 г масла растворили в 7,5 мл гексана:изопропанола 3:2.

1 мкл образца нанесли на пластину ВЭ-ТСХ.

Стандарт фосфолипида (0,5% фосфолипида (Spectra Lipid, Германия)) был нанесен (0,1, 0,3, 0,5, 0,8 и 1,5 мкл) и использовался для вычисления индивидуальных фосфолипидов в смоле.

В некоторых применениях содержание фосфолипида было вычислено по отношению к контрольной смоле, не обработанной ферментом. Этот контрольный образец был нанесен 0,1-0,3-0,5-0,8-1 мкл и использовался для того, чтобы сделать кривые калибровки.

Масляная фаза.

Приблизительно 90 мг были отобраны и растворены в 1 мл гексана:изопропанола 3:2.

5 мкл образца нанесли на пластину ВЭ-ТСХ. Монодиглицерид 5 мг/мл известной концентрации был нанесен в 0,1-0,3-0,5-0,8-1,5 мкл и использовался для вычисления индивидуальных глицеридных компонентов

Аппликатор ТСХ.

Пропускаемый буфер № 1: Р-эфир: метил-трет-бутилкетон: уксусная кислота 50:50:1.

Пропускаемый буфер № 6: хлороформ:1-пропанол:метилацетат:метанол: 0,25% KCl в воде 25:25:25:10:9.

Элюирование: пластина была элюирована на 7 см с использованием автоматической камеры хроматографирования ADC2 от Camag.

Хроматографирование.

Пластину высушили на нагревателе для пластин ТСХ Camag III в течение 6 мин при 160°C, охладили и опустили в 6% ацетат меди в 16% H₃PO₄. Дополнительно высушивали 10 мин при 160°C и сразу же оценивали.

Плотность компонентов на пластине ТСХ была проанализирована ТСХ сканером Camag 3.

Газовая хроматография.

Свободная жирная кислота в фазе смолы была проанализирована с помощью ГЖХ. Моно-диглицерид, стерин и стеринный эфир масляной фазы были также проанализированы с помощью ГЖХ

Аппарат.

Капиллярный газовый хроматограф Perkin Elmer Autosystem 9000, оборудованный WCOT спаянной кварцевой колонкой 12,5 м×0,25 мм ВД×пленка толщиной 0,1 мкм из 5% фенилметил силикона (CP Sil 8 CB от Chrompack).

Газ-носитель: гелий.

Инжектор: PSSI охлажденная расщепленная инъекция (начальная темп. 50°C, нагревают до 385°C), объем 1,0 мкл.

ПИД датчик: 395°C.

Программа печи (используемая с 30.10.2003):	1	2	3
Температура печи, °C.	90	280	350
Изотермический, время, мин.	1	0	10
Скорость изменения температуры, °C/мин.	15	4	

Подготовка образца.

Образец растворили в 12 мл гептана:пиридина, 2:1, содержащих внутренний стандарт гептадекан, 0,5 мг/мл. 500 мкл раствора образца перенесли в закупоренный флакон, добавили 100 мкл MSTFA (N-метил-N-триметилсилил-трифторацетамида) и провели реакцию в течение 15 мин при 60°C.

Вычисление.

На основании чистого материала сравнения были определены факторы ответа для стерина, стеринного эстера, свободных жирных кислот, моно-, ди- и триглицерида.

Экспериментальный.

Ацилтрансфераза KLM3' и PLC был протестированы в процессе рафинирования гидратацией с использованием неочищенного соевого масла с рецептами, показанными в табл. 1.

Таблица 1

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Неочищенное соевое масло из Аргентины	г	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Фосфолипаза С P7633	мл		0,2	0,2	0,2					
Фосфолипаза С P6621								0,2	0,2	0,2
K932 10 Е/мл	мл			0,01	0,05	0,01	0,05		0,01	0,05
Вода	мл	0,250	0,050	0,040	0,000	0,240	0,200	0,050	0,040	0,000
% воды		2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50

Фосфолипаза С P7633 Сигма, от *C.perfringens*, 135,3 мг твердой: 3,8 единицы/мг твердого вещества, 32,9 мг фермента в 0,5 мл воды.

Фосфолипаза С P6621 Сигма, от *Bacillus cereus*, 250 единиц, растворенных в 1 мл воды.

Ацилтрансфераза KLM3' (K932), растворенная до 10 LATE/мл.

Неочищенная соя была нагрета до 45°C в стакане Wheaton на 20 мл. Были добавлены вода и фермент.

Образец был гомогенизирован при интенсивном смешивании в течение 30 с.

Образцы поместили в нагревающийся блок при 45°C с магнитным перемешиванием.

По 1 мл образцов отобрали через 30 и 240 мин в эппендорфы и ферменты инактивировали в течение 10 мин при 97°C. Особенно, хотя дезактивация фермента выполнялась в экспериментах - это вообще не делается на практике в промышленности.

Дезактивация выполнялась только в экспериментах авторами таким образом, чтобы точно проанализировать деградацию фермента.

Образцы центрифугировали при 3000 оцс в течение 3 мин. Масляная фаза была отделена от фазы смолы, и обе фазы были проанализированы с помощью ТСХ и ГЖХ.

Результаты.

Анализ ТСХ.

Образцы, отображенные через 30 и 240 мин, были проанализированы ТСХ с результатами, показанными на фиг. 103-106.

Пластины ТСХ (фиг. 103 и 104) были просканированы и использовались для количественного определения 1,2-диглицерида (DAG sn1,2) с результатами, показанными в табл. 2 и 3 ниже.

Относительная деградация фосфолипидов показана на фиг. 107.

Таблица 2

Анализ ТСХ масляной фазы через 30 мин реакции

Тест №	Фосфолипаза С P7633 Е/г	Фосфолипаза С P6621 Е/г	K932 10 Е/мл LATE/г	DAG sn_1,2 %
1	0	0	0	0,33
2	5	0	0	0,72
3	5	0	0,01	0,67
4	5	0	0,05	0,60
5	0	0	0,01	0,37
6	0	0	0,05	0,29
7	0	5	0	1,28
8	0	5	0,01	1,22
9	0	5	0,05	1,19

Таблица 3

Анализ ТСХ масляной фазы через 240 мин реакции

Тест №	Фосфолипаза С P7633 Е/г	Фосфолипаза С P6621 Е/г	K932 LATE/г	DAG sn_1,2 %
1	0	0	0	0,27
2	5	0	0	0,64
3	5	0	0,01	0,60
4	5	0	0,05	0,50
5	0	0	0,01	0,34
6	0	0	0,05	0,27
7	0	5	0	1,06
8	0	5	0,01	1,04
9	0	5	0,05	1,01

Результаты из табл. 2 и 3 ясно указывают на образование диглицерида, вызванного PLC деградацией фосфолипидов. Замечено, что с использованной дозировкой PLC образование sn 1,2-диглицерида уже достигло максимума через 30 мин реакции. Также замечено, что количество sn 1,2-диглицерида умень-

шается при увеличении дозировки KLM3' при использовании в комбинации с PLC.

Этот эффект наблюдался для обоих ферментов фосфолипаз С, но эффект был самым выраженным при комбинации KLM3' с фосфолипазой С Р7633 Сигма, от *C.perfringens*. Это наиболее вероятно объясняется фактом, что PLC от *C.perfringens* деградировала только маленькую часть фосфолипидов, таким образом, больше субстрата было доступно для KLM3'.

Результаты на фиг. 107 также четко показывают, что фосфолипаза С Р7633 Сигма, от *C.perfringens* является, главным образом, активной на фосфатидилхолине (PC), а у фосфолипазы С Р6621 Сигма, от *Bacillus cereus* главная активность по отношению к фосфатидилхолину (PC) и фосфатидилэтаноламину (PE) и меньше активности по отношению к фосфатидной кислоте (PA) и фосфатидилинозиту (PI). Результаты также доказывают, что KLM3' может использовать все четыре типа фосфолипидов.

Поэтому пришли к заключению, что ацилтрансфераза KLM3' может использовать sn 1,2 диглицерид в качестве акцепторной молекулы и катализировать реакцию на фиг. 108.

Анализ ГЖХ.

Образцы № 1-6 масляной фазы из эксперимента в табл. 1 были также проанализированы ГЖХ.

Анализ ГЖХ общего количества диглицерид (DAG), стерина, стеринового эстера и СЖК перечислен в табл. 4.

Таблица 4
ГЖХ анализ масляной фазы через 30 и 240 мин инкубации

образец №	PLC Е/г	KLM3 Е/г	Время реакции минуты	DAG %	Стерин %	Стериновый эстер %	СЖК %
1	0	0	30	1,34	0,25	0,12	0,22
2	5	0	30	2,58	0,26	0,13	0,21
3	5	0,05	30	2,39	0,18	0,26	0,22
4	5	0,1	30	2,10	0,09	0,42	0,28
5	0	0,05	30	1,43	0,15	0,33	0,22
6	0	0,1	30	1,24	0,06	0,49	0,33
1	0	0	240	1,63	0,22	0,13	0,20
2	5	0	240	2,33	0,25	0,13	0,20
3	5	0,05	240	2,13	0,08	0,45	0,29
4	5	0,1	240	2,08	0,04	0,48	0,43
5	0	0,05	240	1,69	0,04	0,49	0,32
6	0	0,1	240	1,68	0,04	0,50	0,56

ГЖХ анализ образцов, отобранных через 30 и 240 мин реакции, подтвердил то, что уже наблюдалось при анализе ТСХ, что фосфолипаза С Р7633 Сигма, от *C.perfringens* производила диглицерид из фосфолипидов в масле. Результаты также подтверждают синергистический эффект уменьшенным количеством диглицерида при комбинации фосфолипазы С с KLM3'. Статистическая оценка ANOVA, использующая программное обеспечение Statgraphic, эффекта PLC и KLM3' на количество диглицерид четко указывает на эффект взаимодействия между этими двумя ферментами, см. фиг. 109.

PLC не оказывала никакого существенного эффекта на стерин в масле, но KLM3' преобразовывает свободные стерин в стериновые эстеры. Стерины - лучшая акцепторная молекула, чем DAG для KLM3', поэтому только 10-15% DAG в реакционной смеси были преобразованы в триглицерид.

PLC не оказывает большого влияния на уровень свободных жирных кислот (СЖК), но замечено, что KLM3' в высокой дозировке и при более длительной реакции способствуют увеличению уровня СЖК.

Jour. 2460-224.

Не ограничиваясь теорией уменьшения диглицерида путем комбинации ацилтрансферазы (KLM3') и фосфолипазы С (PLC) может быть вызвано конкуренцией субстратов (фосфолипида) при совместном использовании этих двух ферментов.

Чтобы доказать, что KLM3' в состоянии использовать диглицерид в качестве акцептора и катализировать реакцию, упомянутую на фиг. 108, проводился модельный эксперимент с рецептом, показанным ниже в табл. 5.

Таблица 5

Рецепт для исследования эффекта ацилтрансферазы KLM3' на субстрат диглицерид/фосфатидилхолин

		1	2	3	4	5	6
Диглицерид/РС 80/20	г	3	3	3	3	3	3
Ацилтрансфераза KLM3': 300 LATE/г	мл	0	0,01		0,01		0,01
Буфер	мл	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
3% водный раствор соли		0,01		0,01		0,01	
Буфер: 1 100 мМ ацетата pH 5,5		X	X				
Буфер 2: 100 мМ HEPES pH 7		-	-	X	X		
Буфер 3. 100 мМ MES pH 6						X	X

Дистиллированный диглицерид на основании подсолнечного масла и фосфатидилхолин (РС) были смешаны во время нагревания и встряхивании до 80°C, пока РС не растворился в диглицериде.

Субстрат поместили в стакан Dram на 7 мл с винтовой крышкой и нагревали до 55°C. Добавили фермент, буфер и воду и образец встряхивали при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30 и 180 мин отобрали образец и проанализировали с помощью ТСХ (фиг. 110).

Пластина ТСХ была просканирована, и содержание триглицерида в образцах было определено количественно на основании стандартной кривой, сделанной из анализа масла канолы, с результатами, показанными в табл. 6.

Таблица 6

pH буфера	Фермент Е/г	Время реакции минуты	Триглицерид %
5,5	0	30	1,42
5,5	1	30	1,74
6	0	30	1,63
6	1	30	1,79
7	0	30	1,49
7	1	30	1,55
5,5	0	180	1,75
5,5	1	180	1,79
6	0	180	1,76
6	1	180	1,80
7	0	180	1,67
7	1	180	2,01

Результаты, показанные в табл. 6, были проанализированы статистически ANOVA с использованием программного обеспечения Statgraphic с результатами, показанными на фиг. 111 и 112.

Статистическая оценка результатов для триглицерида из табл. 6 подтверждает существенное увеличение количества триглицерида при добавлении ацилтрансферазы KLM3' к субстрату, содержащему диглицерид и фосфатидилхолин.

Jour. 2460-228.

Эксперимент, упомянутый выше в табл. 5, был изучен в дальнейших деталях, чтобы исследовать эффект более высокого уровня воды на реакцию передачи остатка жирной кислоты от фосфолипида диглицериду во время образования триглицерида. Экспериментальные настройки перечислены в табл. 7.

Таблица 7

Рецепт для исследования эффекта ацилтрансферазы KLM3' на субстрат диглицерид/фосфатидилхолин

		1	2	3	4	5
Диглицерид/Фосфатидилхолин 80/20	г	3	3	3	3	3
Ацилтрансфераза KLM3': 1128 LATE/мл	мл	0	0,01	0,01	0,01	0,01
Буфер: 1 100 мМ Ацетата pH 5,5	мл	0,05	0,05	0,05	0,05	
Вода	мл	0,01		0,09	0,165	0,14
% воды		2,00	2,00	5,00	7,50	5,00
Субстрат LATE/г		0,0	3,8	3,8	3,8	3,8

Дистиллированный диглицерид на основании подсолнечного масла и фосфатидилхолин (РС) были смешаны во время нагревания и встряхивания до 80°C, пока РС не растворился в диглицериде.

Субстрат поместили в стакан Dram на 7 мл с винтовой крышкой и нагревали до 55°C. Добавили фермент, буфер и воду и образец встряхивали при магнитном перемешивании при 450 об/мин. Через 30, 90 и 240 мин отобрали образец и проанализировали с помощью ТСХ.

Хроматограммы ТСХ показаны на фиг. 113 и 114.

Пластина ТСХ была просканирована, и содержание триглицерида в образцах было определено количественно на основании стандартной кривой, сделанной из триглицерида (масло канолы). Результаты

определения триглицерида показаны в табл. 8.

Таблица 8

Анализ триглицерида в диглицериде/РС субстрате, инкубированном с ацилтрансферазой KLM3'

Тест №	Триглицерид, % 30 минут	Триглицерид, % 90 минут	Триглицерид, % 240 минут
1	1,33	1,36	1,58
2	1,55	1,91	2,56
3	1,59	2,02	2,65
4	1,57	1,81	2,29
5	1,56	1,91	2,46

Результаты в табл. 8 были проанализированы статистически ANOVA с использованием программного обеспечения Statgraphic с результатами, показанными на фиг. 115 и 116.

Результаты из табл. 8 и фиг. 115 и 116 четко демонстрируют способность ацилтрансферазы KLM3' производить триглицерид из субстрата диглицерида и фосфатидилхолина.

Заключение.

Липидацилтрансфераза KLM3', а также фосфолипаза С (PLC), как известно, способствуют увеличению выхода масла при рафинировании растительного масла.

Эффект липидацилтрансферазы KLM3' при рафинировании масла основан на реакции передачи остатка жирной кислоты от фосфолипида стерину во время производства лизофосфолипидов и стериновых эстеров.

Эффект фосфолипазы С (PLC) основывается на преобразовании фосфолипидов в диглицерид и водорастворимые производные фосфора. Диглицерид, произведенный в этой реакции, будет накапливаться в масляной фазе процессом рафинирования, но не всегда предпочтительно иметь высокий уровень диглицерида в масле, потому что он оказывает влияние на максимальную высоту некоптящего пламени масла и также окажет влияние на свойства кристаллизации большего количества источников насыщенного жира.

В текущем исследовании липидацилтрансфераза KLM3' и фосфолипаза С (PLC) были протестированы по отдельности и в комбинации в процессе рафинирования гидратацией. Эксперименты показали, что PLC при рафинировании гидратацией соевого масла производит диглицерид, который является частью масляной фазы. При использовании PLC в комбинации с KLM3', к удивлению, было показано, что количество диглицерида, произведенного PLC, уменьшилось, и стерин был преобразован в стериновые эстеры, что указывает на синергистический эффект между этими двумя ферментами потому, что KLM3' катализирует реакцию передачи остатка жирной кислоты от фосфолипида диглицериду во время образования триглицерида.

Реакция передачи, катализируемая KLM3', остатка жирной кислоты от фосфолипида диглицериду во время образования триглицерида, была подтверждена на модельной системе, состоящей из диглицерида и фосфолипида.

Результаты также показали, что у этих двух протестированных фосфолипидов нет одинаковой активности по отношению ко всем типам фосфолипидов, но у KLM3' есть почти такая же активность по отношению ко всем четырем типам фосфолипидов, найденных в неочищенном соевом масле. Это также открывает возможность использовать фосфолипазу С в комбинации с KLM3', чтобы получить дальнейшее преобразование фосфолипидов.

Пример 14.

Использование KLM3' при рафинировании гидратацией неочищенного соевого масла.

Растительное масло, включающее соевое масло, содержит от 1 до 3% фосфолипидов, которые удаляются в процессе рафинирования масла. Процесс рафинирования масла обычно делится на процесс рафинирования гидратацией и процесс нейтрализации. Неочищенное соевое масло с 1-3% фосфолипидов не может быть отправлено на экспорт без рафинирования гидратацией, нацеленного на сокращение содержания фосфора, до 200 м.д. фосфора или ниже, чтобы соответствовать спецификации для водорафинированного неочищенного масла.

Если уровень фосфора намного ниже 200 м.д., это может быть невыгодно. Типично обычное рафинирование приводит к уровню фосфора после центрифугирования, составляющему приблизительно 50 м.д. Это потому, что не возможно контролировать центрифугу, чтобы получить уровни фосфора, которые меньше чем 200 м.д, но как можно ближе к этому уровню.

Напротив, в данном случае использования липидацилтрансферазы водно-рафинированное масло могло бы предпочтительно быть приспособлено приблизительно до 180 м.д. фосфора.

Коррекция уровня фосфора в процессе ферментативного рафинирования гидратацией существующего изобретения может предпочтительно быть сделана путем коррекции межфазы между смолой и маслом в центрифуге, чтобы получить немного больше фосфолипида в масляной фазе. Однако в обычном процессе рафинирования гидратацией фаза смолы является очень толстой и вязкой, поэтому не легко отрегулировать межфазу в центрифуге.

Изобретатели, к удивлению, обнаружили, что, когда липидацилтрансфераза (например, KLM3') используется в рафинировании гидратацией, межфаза может быть отрегулирована в центрифуге без проблем и можно получить рафинированное масло, которое было ближе к спецификации максимально 200 м.д. фосфора.

Экспериментальный.

Липидацилтрансфераза KLM3' (SEQ ID No. 68) использовалась при рафинировании гидратацией неочищенного соевого масла в процессе, описанном на фиг. 117.

Неочищенное соевое масло, содержащее 1100 м.д. фосфора, подверглось процессу рафинирования гидратацией, показанному на фиг. 117. В первом эксперименте процесс рафинирования проводился без добавления фермента. Во втором эксперименте был добавлен фермент KLM3', и после анализа содержания фосфора водно-рафинированного масла была откорректирована к центру центрифуги межфаза между смолой и маслом в центрифуге. Когда процесс был снова уравновешен, фосфор был снова проанализирован.

Результаты испытаний показаны в табл. 1.

Рафинирование гидратацией	Таблица 1		
	1	2	3
Фермент KLM3', LATE/кг	0	200	200
Точная настройка блока центрифуги	185	185	195
Фосфор в масла после центрифуги, м.д.	44*	35*	185

* не существенный

Заклучение.

В эксперименте с ферментативным водным рафинированием с использованием KLM3' было показано, что межфаза между маслом и смолой в центрифуге могла легко быть приспособлена или контролироваться, чтобы получить воднорафинированное масло с уровнем фосфора, близким к спецификации (т.е. ближе, но меньше чем 200 м.д.).

При условиях обычного рафинирования гидратацией не всегда легко приспособить межфазу, потому что консистенция (высокая вязкость) фазы смолы не позволяет осуществить такое регулирование.

Пример 15.

Ферментативная реакция в "фазе смолы" после ферментативного рафинирования гидратацией растительных масел.

Липидацилтрансфераза, LysoMax Oil (KLM3') была протестирована при рафинировании гидратацией неочищенного соевого масла. Особенно, фермент не был инактивирован в конце процесса ферментативного водного рафинирования, - как будет обычным практически в промышленности. Поэтому процесс ферментативного рафинирования гидратацией был выполнен в соответствии с экспериментальным протоколом, показанным ниже. В особенности, фермент не был инактивирован после рафинирования.

Изолированная фаза смолы из этого процесса была инкубировали при 40°C и была проанализирована дальнейшая деградация фосфолипида в фазе смолы. К удивлению, результаты показали, что фермент далее гидролизировал фосфолипид в лизофосфолипиды и свободную жирную кислоту. Это объясняется фактом, что фермент связывается с фазой смолы, когда фаза смолы отделяется от масляной фазы центрифугированием.

Также лизофосфолипиды гидролизировались во время хранения, и после 7 дней хранения почти все фосфолипиды исчезли из фазы смолы.

Коммерческое значение результатов.

Ферментативное рафинирование неочищенного соевого масла с помощью KLM3' показало, что возможно улучшить выход масла от 0,5 до 1,5%. Фаза смолы, изолированная из этого процесса, как правило, все еще содержит немного масла и фосфолипидов (EP 1624047). Известно, что гидролизом фазы смолы масляная фаза может отделиться от смолы, которая может быть изолирована центрифугированием или другими средствами разделения. Эта масляная фаза, содержащая высокие уровни свободной жирной кислоты, может продаваться как кислотное масло с более высокой ценностью, чем нормальная фаза смолы, которая добавляется к еде.

Дальнейший аспект состоит в том, что остающаяся твердая фаза после отделения кислотного масла содержит более высокий уровень фосфора, чем нормальная смола, и может использоваться как источник органического фосфора.

Введение.

К удивлению, изобретатели показали, что липидацилтрансфераза LysoMax Oil (KLM3') является активной в фазе смолы, изолированной при ферментативном рафинировании гидратацией неочищенного соевого масла. Поэтому задумались, мог ли фермент далее деградировать фосфолипиды в свободные жирные кислоты, которые центрифугированием могли быть изолированы в виде кислотного масла вместе с остатками триглицерида в фазе смолы.

В этом исследовании был исследован эффект различных дозировок фермента и температур рафинирования гидратацией на деградацию фосфолипида в фазе смолы.

Материалы и методы.

KLM3': Глицерофосфолипидхолестеринацилтрансфераза (FoodPro LysoMax Oil) (K932).

Партия № 102629600. Активность 1128 LATE/г.

Неочищенное соевое масло № 18: из Аргентины.

Анализ ВЭ-ТСХ.

Деградация фосфолипидов в фазе смолы из обработанных ферментом образцов была проанализирована путем ВЭ-ТСХ.

Аппликатор: Автоматический сэмплер для ТСХ 4, CAMAG.

Пластика для ВЭ-ТСХ: 20×10 см, Merck № 1,05641. Активируется за 10 мин при 160°C перед использованием.

Нанесение.

Фазу смолы из 10 г масла растворили в 7,5 мл гексана:изопропанола 3:2.

1 мкл образца нанесли на пластину ВЭ-ТСХ.

Стандарт фосфолипида (0,5% фосфолипида (Spectra Lipid, Германия)) был нанесен (0,1, 0,3, 0,5, 0,8 и 1,5 мкл) и использовался для вычисления индивидуальных фосфолипидов в смоле.

В некоторых применениях содержание фосфолипида было вычислено по отношению к контрольной смоле, не обработанной ферментом. Этот контрольный образец был нанесен 0,1-0,3-0,5-0,8-1 мкл и использовался для того, чтобы сделать кривые калибровки.

Масляная фаза.

Приблизительно 90 мг были отобраны и растворены в 1 мл гексана:изопропанола 3:2.

5 мкл образца нанесли на пластину ВЭ-ТСХ. Моноглицерид 5 мг/мл известной концентрации был нанесен в 0,1-0,3-0,5-0,8-1,5 мкл и использовался для вычисления индивидуальных глицеридных компонентов.

Аппликатор ТСХ.

Пропускаемый буфер № 1: Р-эфир: метил-трет-бутилкетон: уксусная кислота 50:50:1.

Пропускаемый буфер № 6: хлороформ:1-пропанол:метилацетат:метанол: 0,25% KCl в воде 25:25:25:10:9.

Элюирование: пластина была элюирована на 7 см с использованием автоматической камеры хроматографирования ADC2 от Camag.

Хроматографирование.

Пластину высушили на нагревателе для пластин ТСХ Camag III в течение 10 мин при 160°C, охладили и опустили в 6% ацетат меди в 16% H₃PO₄. Дополнительно высушивали 10 мин при 160°C и непосредственно оценивали.

Плотность компонентов на пластине ТСХ была проанализирована ТСХ сканером Camag 3.

Газовая хроматография.

Свободная жирная кислота в фазе смолы была проанализирована с помощью ГЖХ.

Моно-ди-триглицерид, стерин и стеринный эфир масляной фазы были также проанализированы с помощью ГЖХ

Аппарат.

Капиллярный газовый хроматограф Perkin Elmer Autosystem 9000, оборудованный WCOT спаянной кварцевой колонкой 12,5 м×0,25 мм ВД×пленка толщиной 0,1 мкм из 5% фенилметил силикона (CP Sil 8 CB от Chrompack).

Газ-носитель: Гелий.

Инжектор: PSSI охлажденная расщепленная инъекция (начальная темп. 50°C, нагревают до 385°C), объем 1,0 мкл.

ПИД датчик: 395°C.

Программа печи (используемая с 30.10.2003):	1	2	3
Температура печи, °C.	90	280	350
Изотермический, время, мин.	1	0	10
Скорость изменения температуры, °C/мин	15	4	

Подготовка образца.

Образец растворили в 12 мл гептана:пиридина, 2:1, содержащих внутренний стандарт гептадекан, 0,5 мг/мл. 500 мкл раствора образца перенесли в закупоренный флакон, добавили 100 мкл MSTFA (N-метил-N-триметилсилил-трифторацетамида) и провели реакцию в течение 15 мин при 60°C.

Вычисление.

На основании чистого материала сравнения были определены факторы ответа для стерина, стеринного эфира, свободных жирных кислот, моно-, ди- и триглицерида.

Экспериментальный.

Липидацилтрансфераза KLM3' была протестирована в неочищенном соевом масле согласно рецептам, показанным в табл. 1.

Эксперименты по рафинированию в табл. 1 проводились при 45 и при 55°C.

Журн. 2460-220		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Неочищенное соевое масло	г	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
K932: 100 LATE-K/мл	мл	0	0,01	0,02	0,05	0,01	0,02	0,05	0,01	0,02	0,05
Дополнительная вода	мл	0,10	0,09	0,08	0,05	0,09	0,08	0,05	0,09	0,08	0,05
Масло LATE-K/г		0,00	0,10	0,20	0,50	0,10	0,20	0,50	0,10	0,20	0,50
% воды		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Неочищенную сою нагревали до 55°C (или 45°C) в стакане Wheaton на 20 мл. Были добавлены вода и фермент. Образец гомогенизировали при интенсивном смешивании в течение 30 с. Образцы поместили в нагревающийся блок при 55°C (или 45°C) при магнитном перемешивании (450 об/мин). После 30-минутной инкубации образцы центрифугировали при 3000 об/с в течение 3 мин.

Масляную фазу отделили от фазы смолы путем переворачивания пробирок в течение 15 мин, вследствие чего смола оставалась в пробирках.

Затем фазу смолы от каждого из образцов 1-4 немедленно заморозили.

Фазу смолы от каждого из образцов 5-8 инкубировали при 40°C в течение 1 дня и затем заморозили.

Фазу смолы от каждого из образцов 9-12 инкубировали 7 дней при 40°C.

Все образцы одновременно проанализировали ТСХ и ГЖХ.

Результаты.

Анализ ТСХ образцов фазы смолы от рафинирования при 55°C показан на фиг. 118, и образцы от рафинирования при 45°C показаны на фиг. 119.

На основании сканирования хроматограммы ТСХ было вычислено относительное содержание фосфолипида в обработанной ферментом фазе смолы по сравнению с фазой смолы без обработки ферментом (см. табл. 2 и 3).

Таблица 2

Относительное содержание фосфолипида в фазе смолы при рафинировании гидратацией при 55°C

образец №	Фермент LATE/г	Время дни	LPC Отн. %	PC Отн. %	PA Отн. %	PE Отн. %	PI Отн. %
1	0	0	100,0	100	100	100	100
2	0,1	0	571,2	31,2	35,8	26,1	55,0
3	0,2	0	144,5	18,0	24,1	13,1	39,6
4	0,5	0	45,6	3,3	17,1	3,0	16,3
5	0,1	1	452,5	4,6	17,6	3,0	24,6
6	0,2	1	26,7	1,0	15,5	0,4	9,5
7	0,5	1	2,0	0,0	6,2	0,0	2,5
8	0,1	7	3,0	0,0	8,0	0,0	3,2
9	0,2	7	1,0	0,0	4,0	0,0	2,1
10	0,5	7	0,2	0,0	0,0	0,0	2,6

Относительное содержание фосфолипида в фазе смолы при рафинировании гидратацией при 45°C

образец №	Фермент LATE/г	Время дни	PC Отн. %	PA Отн. %	PE Отн. %	PI Отн. %
1	0	0	100,0	100,0	100,0	100,0
2	0,1	0	40,5	48,6	38,5	43,0
3	0,2	0	21,5	33,7	22,4	26,9
4	0,5	0	7,4	23,1	9,0	15,6
5	0,1	1	6,4	41,9	6,0	17,2
6	0,2	1	2,3	25,7	1,9	12,5
7	0,5	1	1,3	10,7	0,0	4,2
8	0,1	7	0,0	17,1	0,0	8,1
9	0,2	7	2,5	9,4	0,0	4,8
10	0,5	7	0,0	0,0	0,0	3,7

Образцы фазы смолы с 0 дней были отобраны сразу же после реакции рафинирования и центрифугирования. В этой точке основная часть фосфолипида уже деградировала, и было замечено, что количество лизофосфолипида увеличивается (табл. 2). Во время инкубации фазы смолы происходит дальнейший гидролиз фосфолипидов, но также гидролизуют и лизофосфолипиды.

Фазы смолы были проанализированы с помощью ГЖХ на свободные жирные кислоты (СЖК) и триглицерид (см. табл. 3).

Фракция фазы смолы была дважды экстрагирована гексаном:изопропиловым спиртом 2:1, а нерастворимая часть была высушена и количественно определена гравиметрически.

Таблица 3

ГЖХ анализ СЖК и триглицерида в фазе смолы и нерастворимом материале

Образец	Инкубация	Фермент	Сухое основание	Сухое основание	Сухое основание	Гексан:IPA
№	Дни	LATE/T	% СЖК	% Триглицерид	% СЖК+Триглицерид	Нерастворимый, %.
1	0	0	1,9	64,0	66,0	2,7
2	0	0,1	7,0	41,5	48,6	3,6
3	0	0,2	8,2	42,5	50,7	6,0
4	0	0,5	7,4	43,1	50,5	26,9
5	1	0,1	16,3	36,4	52,7	15,7
6	1	0,2	16,6	39,8	56,4	без обозначения даты.
7	1	0,5	12,6	40,3	53,0	41,1
8	7	0,1	21,2	37,3	58,5	35,6
9	7	0,2	19,2	37,1	56,4	33,3
10	7	0,5	14,6	42,1	56,7	38,7

Результаты, показанные в табл. 3, четко подтверждают, что ферментативный гидролиз продолжается во время хранения фазы смолы при 40°C до 7 дней.

Содержание фазы смолы, которая не экстрагируется органическим растворителем (гексан изопропиловый спирт 2:1), является мерой для количества твердого вещества в фазе смолы. Когда фосфолипиды в фазе смолы гидролизуют в СЖК и фосфатидилглицерин, количество материала, которое не растворяется в гексане:изопропанол, увеличивается. После 7 дней инкубации более чем 90% фазы смолы состоит из СЖК, триглицерида и фосфатидилглицерина, и никаких фосфолипидов не остается в фазе смолы. Состав фазы смолы после инкубации позволяет более легко разделить ее на масляную фазу и твердую/водорастворимую фазу, потому что никаких эмульгаторов (фосфолипидов и лизофосфолипидов) не оставляется в смоле.

Заключение.

Во время ферментативного рафинирования с помощью липидацилтрансферазы (например, KLM3') выделяется фаза смолы, которая содержит активный фермент. Инкубация фазы смолы при 40°C дополнительно гидролизует фосфолипиды в фазе смолы. В зависимости от дозировки фермента все фосфолипиды, а также лизофосфолипиды, гидролизуются в жирные кислоты и фосфатидилглицерин. Удаление фосфолипидов в фазе смолы позволяет изолировать масляную фазу, содержащую свободные жирные кислоты и остаток триглицерида в фазе смолы.

В эксперименте по рафинированию, проводимом при 55°C, наблюдались более высокие уровни деградации фосфолипида, чем при проведении эксперимента при 45°C. В обоих экспериментах фермент был активным в фазе смолы после разделения и была тенденция к общей более высокой степени гидролиза во время хранения при 40°C при проведении рафинирования гидратацией при 55°C.

Все публикации, упомянутые в данном описании, введены в данное описание как ссылки. Различные модификации и вариации описанных способов и систем настоящего изобретения будут понятными квалифицированному специалисту в данной области техники без отступления от буквы и духа настоящего изобретения. Несмотря на то что настоящее изобретение было описано в связи со специфическими предпочтительными воплощениями, следует понимать, что изобретение, как оно заявлено, не является ограниченным такими специфическими воплощениями. На самом деле, различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые являются очевидными квалифицированному специалисту в области биохимии и биотехнологии или родственных областей, предназначены для включения в объем приведенных ниже пунктов формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ рафинирования гидратацией пищевого масла (предпочтительно неочищенного пищевого масла), который включает следующие стадии:

(а) смешивание приблизительно 0,1-5% мас./мас. воды с пищевым маслом (предпочтительно неочищенным пищевым маслом) и липидацилтрансферазой;

(b) перемешивание этой смеси в течение от приблизительно 10 до приблизительно 180 мин при температуре от приблизительно 45 до приблизительно 90°C и

(с) разделение масляной фазы и смоляной фазы,

где используемая липидацилтрансфераза имеет трансферазную активность (TrU на 1 мг фермента) по меньшей мере 25 TrU/мг протеина фермента, которую определяют с использованием следующего анализа:

а) 50 мг холестерина и 450 мг фосфатидилхолина сои растворяют в хлороформе и хлороформ выпаривают при 40°C в вакууме, 300 мг РС холестерина 9:1 диспергируют при 40°C в 10 мл 50 мМ буфера HEPES pH 7 для формирования субстрата;

б) 250 мкл субстрата добавляют в стакан с крышкой при 40°C, добавляют 25 мкл раствора фермента и инкубируют в течение агитации 10 мин при 40°C;

с) после 10 мин добавляют 5 мл гексан:изопропанол 3:2;

д) количество эфира холестерина анализируют с помощью HPTLC с использованием для калибровки в качестве стандарта холестерин-стеарат;

е) трансферазную активность рассчитывают как количество сформировавшегося в минуту эфира холестерина.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий (d) инкубирование смоляной фазы, содержащей активный липидацилтрансферазный фермент, в течение от минимум приблизительно 2 ч до максимум 7 дней и (е) отделение масла от смоляной фазы.

3. Способ обработки смоляной фазы (предпочтительно получаемой или полученной после рафинирования, такого как рафинирование гидратацией или ферментативное рафинирование либо их комбинация, пищевого масла), в котором смоляную фазу инкубируют с одним или большим количеством липидацилтрансферазных ферментов отдельно или в комбинации с одним или большим количеством фосфолипазных С ферментов в течение от минимум приблизительно 2 ч до максимум 7 дней и отделяют масло от смоляной фазы.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором pH составляет от приблизительно 5,0 до приблизительно 10,0.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором липидацилтрансфераза включает GDSX мотив и/или GANDY мотив.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором липидацилтрансферазный фермент характеризуется как фермент, который обладает ацилтрансферазной активностью и который включает мотив аминокислотной последовательности GDSX, где X представляет собой один или более из следующих аминокислотных остатков: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором липидацилтрансфераза получена из организмов, выбранных из одного или более следующих родов: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* и *Candida*.

8. Способ по п.7, в котором липидацилтрансфераза получена из организма рода *Aeromonas*.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, обладающий липидацилтрансферазной активностью, где полипептид получают экспрессией любой из нуклеотидных последовательностей, представленных как SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 62 или SEQ ID No. 63, или нуклеотидной последовательности, которая обладает 75% или большей идентичностью с ней.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, обладающий липидацилтрансферазной активностью, где полипептид получают экспрессией:

а) нуклеотидной последовательности, представленной как SEQ ID No. 49, или нуклеотидной последовательности, которая обладает 75% или большей идентичностью с ней;

б) нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанный полипептид, где указанный полипептид является по крайней мере на 70% идентичным с полипептидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 16, или с полипептидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 68; или

с) нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется при условиях средней жесткости с нуклеиновым

зондом, содержащим нуклеотидную последовательность, показанную как SEQ ID No. 49.

11. Способ по п.10, в котором липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, полученный экспрессией нуклеотидных последовательностей в *Bacillus licheniformis*.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, обладающий липидацилтрансферазной активностью, где полипептид включает любую из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 38, или аминокислотную последовательность, которая обладает 75% или большей идентичностью с ней.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, обладающий липидацилтрансферазной активностью, где полипептид включает аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID No. 68, или аминокислотную последовательность, которая обладает 75% или большей идентичностью с ней.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором фосфолипазу С дополнительно смешивают с маслом, и/или водой, и/или липидацилтрансферазой.

15. Применение липидацилтрансферазы в рафинировании гидратацией пищевого масла для увеличения выхода масла в масляной фазе после завершения процесса рафинирования гидратацией, где используемая липидацилтрансфераза имеет трансферазную активность (TrU на 1 мг фермента) по меньшей мере 25 TrU/мг протеина фермента, которую определяют с использованием следующего анализа:

а) 50 мг холестерина и 450 мг фосфатидилхолина соли растворяют в хлороформе и хлороформ выпаривают при 40°C в вакууме, 300 мг PC холестерина 9:1 диспергируют при 40°C в 10 мл 50 мМ буфера HEPES pH 7 для формирования субстрата;

б) 250 мкл субстрата добавляют в стакан с крышкой при 40°C, добавляют 25 мкл раствора фермента и инкубируют в течение агитации 10 мин при 40°C;

с) после 10 мин добавляют 5 мл гексан:изопропанол 3:2;

д) количество эфира холестерина анализируют с помощью HPTLC с использованием для калибровки в качестве стандарта холестерин-стеарат;

е) трансферазную активность рассчитывают как количество сформировавшегося в минуту эфира холестерина.

16. Применение липидацилтрансферазы в рафинировании гидратацией пищевого масла для уменьшения вязкости смоляной фазы после завершения процесса рафинирования гидратацией.

17. Применение липидацилтрансферазы в комбинации с фосфолипазой С в рафинировании гидратацией пищевого масла для увеличения выхода масла, и/или для увеличения уровней триглицерида в масляной фазе после завершения процесса рафинирования гидратацией, и/или для уменьшения уровня дилицерида в масляной фазе после завершения процесса рафинирования гидратацией.

18. Применение липидацилтрансферазы (отдельно или в комбинации с фосфолипазой С) в инкубировании смоляной фазы (которая получена после рафинирования пищевого масла, такого как рафинирование гидратацией, ферментативное рафинирование или их комбинация) для увеличения выхода масла и/или получения твердой фазы (после отделения кислого масла) с увеличенным уровнем фосфора по сравнению с необработанной смолой.

19. Применение по любому из пп.15-18, в котором 0,1-4% мас./мас. воды смешивают с пищевым маслом.

20. Применение по любому из пп.15-19, в котором фермент добавляют к пищевому маслу при температуре от приблизительно 45 до приблизительно 90°C.

21. Применение по любому из пп.15-20, в котором pH в способе рафинирования составляет от приблизительно 5,0 до приблизительно 10,0.

22. Применение по любому из пп.15-21, в котором липидацилтрансферазу вводят в реакцию с пищевым маслом на время от приблизительно 10 до 180 мин.

23. Применение по любому из пп.15-22, в котором липидацилтрансфераза включает GDSX мотив и/или GANDY мотив.

24. Применение по любому из пп.15-23, в котором липидацилтрансферазный фермент характеризуется как фермент, который обладает ацилтрансферазной активностью и который включает мотив аминокислотной последовательности GDSX, где X представляет собой один или более из следующих аминокислотных остатков: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M или S.

25. Применение по любому из пп.15-24, в котором липидацилтрансфераза получена из организмов, выбранных из одного или более следующих родов: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* и *Candida*.

26. Применение по п.25, в котором липидацилтрансфераза получена из организма рода *Aeromonas*.

27. Применение по любому из пп.15-26, в котором липидацилтрансферазу получают экспрессией

любой из нуклеотидных последовательностей, представленных как SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 62 или SEQ ID No. 63, или нуклеотидной последовательности, обладающей 75% или большей идентичностью с ней.

28. Применение по любому из пп.15-27, в котором липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, полученный экспрессией:

а) нуклеотидной последовательности, представленной как SEQ ID No. 49, или нуклеотидной последовательности, которая обладает 75% или большей идентичностью с ней;

б) нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанный полипептид, где указанный полипептид является по крайней мере на 70% идентичным с полипептидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 16, или с полипептидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 68; или

в) нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется при условиях средней жесткости с нуклеиновым зондом, содержащим нуклеотидную последовательность, показанную как SEQ ID No. 49.

29. Применение по п.28, в котором липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, полученный экспрессией нуклеотидной последовательности в *Bacillus licheniformis*.

30. Применение по любому из пп.15-29, в котором липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, включающий любую из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 38 или аминокислотную последовательность, обладающую 75% или большей идентичностью с ней.

31. Применение по любому из пп.15-30, в котором липидацилтрансфераза представляет собой полипептид, включающий аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID No. 68, или аминокислотную последовательность, обладающую 75% или большей идентичностью с ней.

32. Применение по любому из пп.15-31, в котором липидацилтрансферазу применяют в комбинации с фосфолипазой C.

Перечень последовательностей

<110> ДАНИСКО А/С
 <120> СПОСОБ
 <130> P032126W0
 <150> GB 0725035.0
 <151> 2007-12-21
 <150> GB 0809177.9
 <151> 2008-05-20
 <150> US 61/058,378
 <151> 2008-06-03
 <160> 119
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Aeromonas hydrophila
 <400> 1
 Met Lys Lys Trp Phe Val Cys Leu Leu Gly Leu Val Ala Leu Thr Val
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Asp Ser Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly
 20 25 30
 Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr
 35 40 45
 Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro
 50 55 60
 Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala
 65 70 75 80
 Asn Glu Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser
 85 90 95
 Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr
 100 105 110
 Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu
 115 120 125
 Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln
 130 135 140
 Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 2

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

Asp Ser Asp Gly Gly Gly Trp Gly Ala Gly Leu Ala Asp Arg Leu Thr
 20 25 30

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

020035

Arg Gly Ile Ser Gly Arg Thr Ser Asp Gly Arg Leu Ile Val Asp Ala
 50 55 60
 Leu Val Ala Leu Leu Phe Leu Ala Gln Ser Leu Gly Leu Pro Asn Leu
 65 70 75 80
 Pro Pro Tyr Leu Ser Gly Asp Phe Leu Arg Gly Ala Asn Phe Ala Ser
 85 90 95
 Ala Gly Ala Thr Ile Leu Pro Thr Ser Gly Pro Phe Leu Ile Gln Val
 100 105 110
 Gln Phe Lys Asp Phe Lys Ser Gln Val Leu Glu Leu Arg Gln Ala Leu
 115 120 125
 Gly Leu Leu Gln Glu Leu Leu Arg Leu Leu Pro Val Leu Asp Ala Lys
 130 135 140
 Ser Pro Asp Leu Val Thr Ile Met Ile Gly Thr Asn Asp Leu Ile Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Phe Phe Gly Pro Lys Ser Thr Glu Ser Asp Arg Asn Val Ser
 165 170 175
 Val Pro Glu Phe Lys Asp Asn Leu Arg Gln Leu Ile Lys Arg Leu Arg
 180 185 190
 Ser Asn Asn Gly Ala Arg Ile Ile Val Leu Ile Thr Leu Val Ile Leu
 195 200 205
 Asn Leu Gly Pro Leu Gly Cys Leu Pro Leu Lys Leu Ala Leu Ala Leu
 210 215 220
 Ala Ser Ser Lys Asn Val Asp Ala Ser Gly Cys Leu Glu Arg Leu Asn
 225 230 235 240
 Glu Ala Val Ala Asp Phe Asn Glu Ala Leu Arg Glu Leu Ala Ile Ser
 245 250 255
 Lys Leu Glu Asp Gln Leu Arg Lys Asp Gly Leu Pro Asp Val Lys Gly
 260 265 270
 Ala Asp Val Pro Tyr Val Asp Leu Tyr Ser Ile Phe Gln Asp Leu Asp
 275 280 285
 Gly Ile Gln Asn Pro Ser Ala Tyr Val Tyr Gly Phe Glu Thr Thr Lys
 290 295 300
 Ala Cys Cys Gly Tyr Gly Gly Arg Tyr Asn Tyr Asn Arg Val Cys Gly
 305 310 315 320

020035

Asn Ala Gly Leu Cys Asn Val Thr Ala Lys Ala Cys Asn Pro Ser Ser
 325 330 335

Tyr Leu Leu Ser Phe Leu Phe Trp Asp Gly Phe His Pro Ser Glu Lys
 340 345 350

Gly Tyr Lys Ala Val Ala Glu Ala Leu
 355 360

<210> 3
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Aeromonas hydrophila

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Val Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln

020035

```

195                200                205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

```

020035

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Asp Phe Ser Gly Val Ser Asp Gly His Asp Ala Cys Glu Ala
245 250 255

Pro Gly Thr Arg Trp Ile Glu Pro Leu Leu Phe Gly His Ser Leu Val
260 265 270

Pro Val His Pro Asn Ala Leu Gly Glu Arg Arg Met Ala Glu His Thr

020035

```

275                280                285

Met Asp Val Leu Gly Leu Asp
 290                295

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

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Leu Ala Ala Gly Asp Val Pro Tyr Leu Arg Ala Ile Gln Ala

```

020035

```

210
215
220
His Leu Asn Asp Ala Val Arg Arg Ala Ala Glu Glu Thr Gly Ala Thr
225 230 235 240

Tyr Val Asp Phe Ser Gly Val Ser Asp Gly His Asp Ala Cys Glu Ala
245 250 255

Pro Gly Thr Arg Trp Ile Glu Pro Leu Leu Phe Gly His Ser Leu Val
260 265 270

Pro Val His Pro Asn Ala Leu Gly Glu Arg Arg Met Ala Glu His Thr
275 280 285

Met Asp Val Leu Gly Leu Asp
290 295

<210> 7
<211> 238
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 7

Met Asp Tyr Glu Lys Phe Leu Leu Phe Gly Asp Ser Ile Thr Glu Phe
1 5 10 15

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

Gly Ala Ala Leu Val Asn Glu Tyr Thr Arg Lys Met Asp Ile Leu Gln
35 40 45

Arg Gly Phe Lys Gly Tyr Thr Ser Arg Trp Ala Leu Lys Ile Leu Pro
50 55 60

Glu Ile Leu Lys His Glu Ser Asn Ile Val Met Ala Thr Ile Phe Leu
65 70 75 80

Gly Ala Asn Asp Ala Cys Ser Ala Gly Pro Gln Ser Val Pro Leu Pro
85 90 95

Glu Phe Ile Asp Asn Ile Arg Gln Met Val Ser Leu Met Lys Ser Tyr
100 105 110

His Ile Arg Pro Ile Ile Ile Gly Pro Gly Leu Val Asp Arg Glu Lys
115 120 125

Trp Glu Lys Glu Lys Ser Glu Glu Ile Ala Leu Gly Tyr Phe Arg Thr
130 135 140

Asn Glu Asn Phe Ala Ile Tyr Ser Asp Ala Leu Ala Lys Leu Ala Asn
145 150 155 160

```

020035

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 295
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 5

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

020035

Glu Glu Lys Val Pro Phe Val Ala Leu Asn Lys Ala Phe Gln Gln Glu
165 170 175

Gly Gly Asp Ala Trp Gln Gln Leu Leu Thr Asp Gly Leu His Phe Ser
180 185 190

Gly Lys Gly Tyr Lys Ile Phe His Asp Glu Leu Leu Lys Val Ile Glu
195 200 205

Thr Phe Tyr Pro Gln Tyr His Pro Lys Asn Met Gln Tyr Lys Leu Lys
210 215 220

Asp Trp Arg Asp Val Leu Asp Asp Gly Ser Asn Ile Met Ser
225 230 235

<210> 8
<211> 347
<212> PRT
<213> Ralstonia sp.

<400> 8

Met Asn Leu Arg Gln Trp Met Gly Ala Ala Thr Ala Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15

Gly Leu Ala Ala Cys Gly Gly Gly Thr Asp Gln Ser Gly Asn Pro
20 25 30

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

Asp Ile Gly Thr Tyr Thr Pro Val Ala Gln Ala Val Gly Gly Gly Lys
50 55 60

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

Leu Gly Val Thr Leu Thr Pro Ala Val Met Gly Tyr Ala Thr Ser Val
85 90 95

Gln Asn Cys Pro Lys Ala Gly Cys Phe Asp Tyr Ala Gln Gly Gly Ser
100 105 110

Arg Val Thr Asp Pro Asn Gly Ile Gly His Asn Gly Gly Ala Gly Ala
115 120 125

Leu Thr Tyr Pro Val Gln Gln Gln Leu Ala Asn Phe Tyr Ala Ala Ser
130 135 140

Asn Asn Thr Phe Asn Gly Asn Asn Asp Val Val Phe Val Leu Ala Gly
145 150 155 160

020035

Ser Asn Asp Ile Phe Phe Trp Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser Gly Ser
165 170 175

Gly Val Thr Pro Ala Ile Ala Thr Ala Gln Val Gln Gln Ala Ala Thr
180 185 190

Asp Leu Val Gly Tyr Val Lys Asp Met Ile Ala Lys Gly Ala Thr Gln
195 200 205

Val Tyr Val Phe Asn Leu Pro Asp Ser Ser Leu Thr Pro Asp Gly Val
210 215 220

Ala Ser Gly Thr Thr Gly Gln Ala Leu Leu His Ala Leu Val Gly Thr
225 230 235 240

Phe Asn Thr Thr Leu Gln Ser Gly Leu Ala Gly Thr Ser Ala Arg Ile
245 250 255

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

Phe Gly Phe Ala Asn Thr Ser Ala Arg Ala Cys Asp Ala Thr Lys Ile
275 280 285

Asn Ala Leu Val Pro Ser Ala Gly Gly Ser Ser Leu Phe Cys Ser Ala
290 295 300

Asn Thr Leu Val Ala Ser Gly Ala Asp Gln Ser Tyr Leu Phe Ala Asp
305 310 315 320

Gly Val His Pro Thr Thr Ala Gly His Arg Leu Ile Ala Ser Asn Val
325 330 335

Leu Ala Arg Leu Leu Ala Asp Asn Val Ala His
340 345

<210> 9
<211> 261
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 9

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

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

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

020035

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ala Ala Val Ala
      260

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

<400> 10

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

Phe Thr Glu Gly Met Ser Asp Leu Leu Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Gly

```

020035

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

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

020035

<400> 11

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

020035

Gly Asp Gly Arg Asp Thr Pro Arg Tyr Ser Val Val Asn Glu Gly Ile
 275 280 285
 Ser Gly Asn Arg Leu Leu Thr Ser Arg Pro Gly Arg Pro Ala Asp Asn
 290 295 300
 Pro Ser Gly Leu Ser Arg Phe Gln Arg Asp Val Leu Glu Arg Thr Asn
 305 310 315 320
 Val Lys Ala Val Val Val Val Leu Gly Val Asn Asp Val Leu Asn Ser
 325 330 335
 Pro Glu Leu Ala Asp Arg Asp Ala Ile Leu Thr Gly Leu Arg Thr Leu
 340 345 350
 Val Asp Arg Ala His Ala Arg Gly Leu Arg Val Val Gly Ala Thr Ile
 355 360 365
 Thr Pro Phe Gly Gly Tyr Gly Gly Tyr Thr Glu Ala Arg Glu Thr Met
 370 375 380
 Arg Gln Glu Val Asn Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Val Phe Asp Thr
 385 390 395 400
 Val Val Asp Phe Asp Lys Ala Leu Arg Asp Pro Tyr Asp Pro Arg Arg
 405 410 415
 Met Arg Ser Asp Tyr Asp Ser Gly Asp His Leu His Pro Gly Asp Lys
 420 425 430
 Gly Tyr Ala Arg Met Gly Ala Val Ile Asp Leu Ala Ala Leu Lys Gly
 435 440 445
 Ala Ala Pro Val Lys Ala
 450
 <210> 12
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicolor
 <400> 12
 Met Thr Ser Met Ser Arg Ala Arg Val Ala Arg Arg Ile Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Tyr Gly Gly Gly Gly Ile Gly Leu Ala Gly Ala Ala Ala Val
 20 25 30
 Gly Leu Val Val Ala Glu Val Gln Leu Ala Arg Arg Arg Val Gly Val
 35 40 45

020035

Gly Thr Pro Thr Arg Val Pro Asn Ala Gln Gly Leu Tyr Gly Gly Thr
 50 55 60

Leu Pro Thr Ala Gly Asp Pro Pro Leu Arg Leu Met Met Leu Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Ala Ala Gly Gln Gly Val His Arg Ala Gly Gln Thr Pro Gly
 85 90 95

Ala Leu Leu Ala Ser Gly Leu Ala Ala Val Ala Glu Arg Pro Val Arg
 100 105 110

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

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

Val Ile Met Val Gly Ala Asn Asp Val Thr His Arg Met Pro Ala Thr
 145 150 155 160

Arg Ser Val Arg His Leu Ser Ser Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala
 165 170 175

Gly Ala Glu Val Val Val Gly Thr Cys Pro Asp Leu Gly Thr Ile Glu
 180 185 190

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

Leu Ala Ala Ala Gln Thr Ile Gly Ala Val Glu Gln Gly Gly Arg Thr
 210 215 220

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

Glu Leu Phe Gly Pro Asp Asn Tyr His Pro Ser Ala Glu Gly Tyr Ala
 245 250 255

Thr Ala Ala Met Ala Val Leu Pro Ser Val Cys Ala Ala Leu Gly Leu
 260 265 270

Trp Pro Ala Asp Glu Glu His Pro Asp Ala Leu Arg Arg Glu Gly Phe
 275 280 285

Leu Pro Val Ala Arg Ala Ala Glu Ala Ala Ser Glu Ala Gly Thr
 290 295 300

Glu Val Ala Ala Ala Met Pro Thr Gly Pro Arg Gly Pro Trp Ala Leu
 305 310 315 320

020035

Leu Lys Arg Arg Arg Arg Arg Val Ser Glu Ala Glu Pro Ser Ser
325 330 335

Pro Ser Gly Val
340

<210> 13
<211> 305
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 13

Met Gly Arg Gly Thr Asp Gln Arg Thr Arg Tyr Gly Arg Arg Arg Ala
1 5 10 15

Arg Val Ala Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Val Leu Gly Val Gly Val
20 25 30

Ala Gly Cys Asp Ser Val Gly Gly Asp Ser Pro Ala Pro Ser Gly Ser
35 40 45

Pro Ser Lys Arg Thr Arg Thr Ala Pro Ala Trp Asp Thr Ser Pro Ala
50 55 60

Ser Val Ala Ala Val Gly Asp Ser Ile Thr Arg Gly Phe Asp Ala Cys
65 70 75 80

Ala Val Leu Ser Asp Cys Pro Glu Val Ser Trp Ala Thr Gly Ser Ser
85 90 95

Ala Lys Val Asp Ser Leu Ala Val Arg Leu Leu Gly Lys Ala Asp Ala
100 105 110

Ala Glu His Ser Trp Asn Tyr Ala Val Thr Gly Ala Arg Met Ala Asp
115 120 125

Leu Thr Ala Gln Val Thr Arg Ala Ala Gln Arg Glu Pro Glu Leu Val
130 135 140

Ala Val Met Ala Gly Ala Asn Asp Ala Cys Arg Ser Thr Thr Ser Ala
145 150 155 160

Met Thr Pro Val Ala Asp Phe Arg Ala Gln Phe Glu Glu Ala Met Ala
165 170 175

Thr Leu Arg Lys Lys Leu Pro Lys Ala Gln Val Tyr Val Ser Ser Ile
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Arg Leu Trp Ser Gln Gly Arg Thr Asn Pro Leu Gly
195 200 205

020035

Lys Gln Val Trp Lys Leu Gly Leu Cys Pro Ser Met Leu Gly Asp Ala
210 215 220

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

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

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

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

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

Pro
305

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

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gln Gly Glu Ser Ala Cys Leu Ala Arg Ile Ala Lys Ala Arg Ala

020035

```

130          135          140

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 336
<212> PRT
<213> Aeromonas salmonicida

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

```

020035

```

          100              105              110
Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu
   115              120              125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400>  16

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

```

020035

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

020035

```

275                280                285

Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala
290                295                300

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

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

<400>  17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ala Ile

```

020035

195					200					205						
Gln	Lys	Glu	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Ser	Lys	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	
210					215					220						
Leu	Gly	Gly	Phe	Val	Thr	Asn	Ile	Thr	Ala	Thr	Ala	Glu	Ala	Val	Asp	
225					230					235					240	
Ser	Gly	Pro	Phe	Ala	Gly	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	Ala	Gly	Ile	Gly	
245					250					255						
Asn	Glu	Tyr	Pro	Asp	Phe	Lys	Asn	Tyr	Leu	Leu	Lys	Lys	Val	Ser	Pro	
260					265					270						
Leu	Leu	Ser	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Gly	Asn	Thr	His	Cys	Leu	Leu	Asp	
275					280					285						
Gly	Gly	Ile	Ala	Tyr	Phe	Gly	Lys	Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Ile	Ile	Arg	
290					295					300						
Tyr	Phe	Pro	Asp	Gly	Trp	Asp	Leu	Val	Asn	Gln	Glu	Pro	Ile	Lys	Thr	
305					310					315					320	
Ile	Leu	Gln	Asp	Asn	Gly	Leu	Val	Tyr	Gln	Pro	Lys	Asp	Leu	Thr	Pro	
325					330					335						
Gln	Ile	Pro	Leu	Phe	Ile	Tyr	His	Gly	Thr	Leu	Asp	Ala	Ile	Val	Pro	
340					345					350						
Ile	Val	Asn	Ser	Arg	Lys	Thr	Phe	Gln	Gln	Trp	Cys	Asp	Trp	Gly	Leu	
355					360					365						
Lys	Ser	Gly	Glu	Tyr	Asn	Glu	Asp	Leu	Thr	Asn	Gly	His	Ile	Thr	Glu	
370					375					380						
Ser	Ile	Val	Gly	Ala	Pro	Ala	Ala	Leu	Thr	Trp	Ile	Ile	Asn	Arg	Phe	
385					390					395					400	
Asn	Gly	Gln	Pro	Pro	Val	Asp	Gly	Cys	Gln	His	Asn	Val	Arg	Ala	Ser	
405					410					415						
Asn	Leu	Glu	Tyr	Pro	Gly	Thr	Pro	Gln	Ser	Ile	Lys	Asn	Tyr	Phe	Glu	
420					425					430						
Ala	Ala	Leu	His	Ala	Ile	Leu	Gly	Phe	Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Val	Lys	
435					440					445						
Arg	Asp	Lys	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Lys	Leu	Glu	Arg	Phe	Ala	
450					455					460						
Phe																

465

<210> 18
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Candida parapsilosis

<400> 18

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Phe Val Thr Asn Ile Thr Ala Thr Ala Glu Ala Val Asp
      225             230             235             240

```

020035

```

Ser Gly Pro Phe Ala Gly Ile Ile Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly
      245                      250                      255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe His His His His His His
      465                      470

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

```

020035

<400> 19

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ala Ala Val Ala

```

020035

260

```

<210> 20
<211> 230
<212> PRT
<213> Aspergillus aculeatus

<400> 20

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

Gly Ser Gly Thr Asn Gly Trp Gly Glu Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ser
20          25          30

Ala Thr Val Val Asn Asp Ala Val Ala Gly Arg Ser Ala Arg Ser Tyr
35          40          45

Thr Arg Glu Gly Arg Phe Glu Asn Ile Ala Asp Val Val Thr Ala Gly
50          55          60

Asp Tyr Val Ile Val Glu Phe Gly His Asn Asp Gly Gly Ser Leu Ser
65          70          75          80

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

Tyr Ser Val Tyr Asp Gly Val Asn Glu Thr Ile Leu Thr Phe Pro Ala
100         105         110

Tyr Leu Glu Asn Ala Ala Lys Leu Phe Thr Ala Lys Gly Ala Lys Val
115         120         125

Ile Leu Ser Ser Gln Thr Pro Asn Asn Pro Trp Glu Thr Gly Thr Phe
130         135         140

Val Asn Ser Pro Thr Arg Phe Val Glu Tyr Ala Glu Leu Ala Ala Glu
145         150         155         160

Val Ala Gly Val Glu Tyr Val Asp His Trp Ser Tyr Val Asp Ser Ile
165         170         175

Tyr Glu Thr Leu Gly Asn Ala Thr Val Asn Ser Tyr Phe Pro Ile Asp
180         185         190

His Thr His Thr Ser Pro Ala Gly Ala Glu Val Val Ala Glu Ala Phe
195         200         205

Leu Lys Ala Val Val Cys Thr Gly Thr Ser Leu Lys Ser Val Leu Thr
210         215         220

Thr Thr Ser Phe Glu Gly
225         230

```

<210> 21
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Aeromonas* sp.

<400> 21

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

Gln Ala

<210> 22
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 22

Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
 1 5 10 15

Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala
 20 25

<210> 23
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis*

<400> 23

Met Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Phe Gly Met Leu Thr Ala Phe Met
 1 5 10 15

Leu Val Phe Thr Met Glu Phe Ser Asp Ser Ala Ser Ala
 20 25

<210> 24
 <211> 1047
 <212> ДНК
 <213> *Aeromonas hydrophila*

<400> 24
 atgtttaagt ttaaaaagaa tttcttagtt ggattatcgg cagctttaat gagtattagc 60
 ttgttttcgg caaccgcctc tgcagctagc gccgacagcc gtcccgcctt ttcccggtac 120
 gtgatgttcg gcgacagcct ctccgatacc ggcaaaatgt acagcaagat gcgcgggttac 180
 ctccccctcca gcccgcccta ctatgagggc cgtttctcca acggaccogt ctggctggag 240
 cagctgacca aacagttccc gggctctgacc atcgccaacg aagcggaagg cggtgccact 300
 gccgtggcctt acaacaagat ctcttggaat cccaagtatc aggtcatcaa caacctggac 360
 tacgaggtca ccagttctt gcagaaagac agcttcaagc cggacgatct ggtgatcctc 420
 tgggtcgggtg ccaatgacta tctggcctat ggctggaaca cggagcagga tgccaagcgg 480

```

gttcgcgatg ccatacagcga tgcggccaac cgcattggtac tgaacgggtgc caagcagata      540
ctgctgttca acctgccgga tctgggccag aaccgcgtcag ctgcagtcga gaaggtgggc      600
gaggcggtca gccatgtctc cgcctatcac aaccagctgc tgctgaacct ggcacgccag      660
ctggccccc cgggcattggt aaagctgttc gagatcgaca agcaatttgc cgagatgctg      720
cgtgatccgc agaacttcgg cctgagcgac gtcgagaacc cctgctacga cggcggctat      780
gtgtggaagc cgtttgccac ccgcagcgtc agcaccgaac gccagctctc cgccttcagt      840
ccgcaggaac gcctcgccat cgcgcgcaac ccgctgctgg cacaggccgt tgccagtcct      900
atggcccgcc gcagcgccag cccctcaac tgtgagggca agatgttctg ggatcaggta      960
caccgcacca ctgtcgtgca cgcagccctg agcgagcgcg ccgccacctt catcgcgaa      1020
cagtacgagt tcctcgcca ctgatga      1047

```

<210> 25
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Конструкция слияния

<400> 25

Met Phe Lys Phe Lys Lys Asn Phe Leu Val Gly Leu Ser Ala Ala Leu
1 5 10 15

Met Ser Ile Ser Leu Phe Ser Ala Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ala Asp
20 25 30

Ser Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser
35 40 45

Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser
50 55 60

Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu
65 70 75 80

Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu
85 90 95

Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn Pro Lys
100 105 110

Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln
115 120 125

Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala
130 135 140

020035

Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu Asn Gly
 165 170 175
 Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro
 180 185 190
 Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val Ser Ala
 195 200 205
 Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr
 210 215 220
 Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu
 225 230 235 240
 Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro Cys Tyr
 245 250 255
 Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val Ser Thr
 260 265 270
 Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala
 275 280 285
 Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala Arg Arg
 290 295 300
 Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val
 305 310 315 320
 His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala Ala Thr
 325 330 335
 Phe Ile Ala Asn Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His
 340 345
 <210> 26
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp.
 <400> 26
 Met Arg Leu Thr Arg Ser Leu Ser Ala Ala Ser Val Ile Val Phe Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Gln Ala Ala Gly Pro
 20 25 30
 Ala Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asn Gly Ala Gly

020035

```

          35              40              45

Ser Tyr Ile Asp Ser Ser Gly Asp Cys His Arg Ser Asn Asn Ala Tyr
  50              55              60

Pro Ala Arg Trp Ala Ala Ala Asn Ala Pro Ser Ser Phe Thr Phe Ala
  65              70              75              80

Ala Cys Ser Gly Ala Val Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Gln Leu Gly
          85              90              95

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

Asp Ala Gly Phe Ala Asp Ala Met Thr Thr Cys Val Thr Ser Ser Asp
          115             120             125

Ser Thr Cys Leu Asn Arg Leu Ala Thr Ala Thr Asn Tyr Ile Asn Thr
          130             135             140

Thr Leu Leu Ala Arg Leu Asp Ala Val Tyr Ser Gln Ile Lys Ala Arg
          145             150             155             160

Ala Pro Asn Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Met Tyr Leu
          165             170             175

Ala Ser Asn Pro Trp Tyr Cys Leu Gly Leu Ser Asn Thr Lys Arg Ala
          180             185             190

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

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

Asn His Glu Leu Phe Phe Gly Asn Asp Trp Leu His Ser Leu Thr Leu
          225             230             235             240

Pro Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Thr Ser Thr Gly His Gln Ser Gly
          245             250             255

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

<210> 27
<211> 548
<212> PRT
<213> Thermobifida sp.

<400> 27

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

```

020035

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

020035

Asn Ala Tyr Pro Glu Leu Val Ala Glu Ala Tyr Asp Phe Ala Gly His
 290 295 300
 Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr
 325 330 335
 Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr
 340 345 350
 Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala
 355 360 365
 Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu
 370 375 380
 Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp
 385 390 395 400
 Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro
 405 410 415
 Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn
 420 425 430
 Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val
 435 440 445
 His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe
 450 455 460
 Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu
 465 470 475 480
 Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr
 485 490 495
 Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val
 500 505 510
 Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu
 515 520 525
 Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala
 530 535 540
 Gly Glu Val Gly
 545

020035

```

<210> 28
<211> 372
<212> PRT
<213> Thermobifida sp.

<400> 28
Met Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly
1          5          10          15

Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val
20          25          30

Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln
35          40          45

Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu
50          55          60

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

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

Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala
100         105         110

Asn Ala Tyr Pro Glu Leu Val Ala Glu Ala Tyr Asp Phe Ala Gly His
115         120         125

Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp
130         135         140

Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr
145         150         155         160

Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr
165         170         175

Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala
180         185         190

Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu
195         200         205

Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp
210         215         220

Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro
225         230         235         240

```

020035

Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn
245 250 255

Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val
260 265 270

His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe
275 280 285

Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu
290 295 300

Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr
305 310 315 320

Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val
325 330 335

Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu
340 345 350

Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala
355 360 365

Gly Glu Val Gly
370

<210> 29
<211> 300
<212> PRT
<213> Corynebacterium efficiens

<400> 29

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

Cys Ala Asp Gly Ala Arg Glu Glu Thr Ala Gly Ala Pro Pro Gly Glu
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Ile Arg Glu Glu Gly Ala Glu Ala Ser Thr Ser Ile
35 40 45

Thr Asp Val Tyr Ile Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ala Ala Met Gly Gly
50 55 60

Arg Asp Gln Pro Leu Arg Gly Glu Pro Phe Cys Leu Arg Ser Ser Gly
65 70 75 80

Asn Tyr Pro Glu Leu Leu His Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Cys Gln
85 90 95

020035

Gly Ala Val Thr Gly Asp Leu Leu Glu Pro Arg Thr Leu Gly Glu Arg
 100 105 110
 Thr Leu Pro Ala Gln Val Asp Ala Leu Thr Glu Asp Thr Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Leu Ser Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Gly Glu Val Ala Gly
 130 135 140
 Cys Ile Arg Glu Arg Ile Ala Gly Glu Asn Ala Asp Asp Cys Val Asp
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Glu Thr Ile Gly Glu Gln Leu Asp Gln Leu Pro Pro Gln
 165 170 175
 Leu Asp Arg Val His Glu Ala Ile Arg Asp Arg Ala Gly Asp Ala Gln
 180 185 190
 Val Val Val Thr Gly Tyr Leu Pro Leu Val Ser Ala Gly Asp Cys Pro
 195 200 205
 Glu Leu Gly Asp Val Ser Glu Ala Asp Arg Arg Trp Ala Val Glu Leu
 210 215 220
 Thr Gly Gln Ile Asn Glu Thr Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg His Asp
 225 230 235 240
 Ala Leu Phe Val Leu Pro Asp Asp Ala Asp Glu His Thr Ser Cys Ala
 245 250 255
 Pro Pro Gln Gln Arg Trp Ala Asp Ile Gln Gly Gln Gln Thr Asp Ala
 260 265 270
 Tyr Pro Leu His Pro Thr Ser Ala Gly His Glu Ala Met Ala Ala Ala
 275 280 285
 Val Arg Asp Ala Leu Gly Leu Glu Pro Val Gln Pro
 290 295 300
 <210> 30
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Novosphingobium aromaticivorans
 <400> 30
 Met Gly Gln Val Lys Leu Phe Ala Arg Arg Cys Ala Pro Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Gly Leu Ala Pro Ala Ala Thr Val Ala Arg Glu Ala Pro
 20 25 30
 Leu Ala Glu Gly Ala Arg Tyr Val Ala Leu Gly Ser Ser Phe Ala Ala

020035

```

      35              40              45

Gly Pro Gly Val Gly Pro Asn Ala Pro Gly Ser Pro Glu Arg Cys Gly
 50              55              60

Arg Gly Thr Leu Asn Tyr Pro His Leu Leu Ala Glu Ala Leu Lys Leu
 65              70              75              80

Asp Leu Val Asp Ala Thr Cys Ser Gly Ala Thr Thr His His Val Leu
      85              90              95

Gly Pro Trp Asn Glu Val Pro Pro Gln Ile Asp Ser Val Asn Gly Asp
      100              105              110

Thr Arg Leu Val Thr Leu Thr Ile Gly Gly Asn Asp Val Ser Phe Val
      115              120              125

Gly Asn Ile Phe Ala Ala Ala Cys Glu Lys Met Ala Ser Pro Asp Pro
      130              135              140

Arg Cys Gly Lys Trp Arg Glu Ile Thr Glu Glu Glu Trp Gln Ala Asp
      145              150              155              160

Glu Glu Arg Met Arg Ser Ile Val Arg Gln Ile His Ala Arg Ala Pro
      165              170              175

Leu Ala Arg Val Val Val Val Asp Tyr Ile Thr Val Leu Pro Pro Ser
      180              185              190

Gly Thr Cys Ala Ala Met Ala Ile Ser Pro Asp Arg Leu Ala Gln Ser
      195              200              205

Arg Ser Ala Ala Lys Arg Leu Ala Arg Ile Thr Ala Arg Val Ala Arg
      210              215              220

Glu Glu Gly Ala Ser Leu Leu Lys Phe Ser His Ile Ser Arg Arg His
      225              230              235              240

His Pro Cys Ser Ala Lys Pro Trp Ser Asn Gly Leu Ser Ala Pro Ala
      245              250              255

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

Ala Ala Ala Leu Val Lys Leu Val Lys Leu Met Lys
      275              280

<210> 31
<211> 268
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor

```

020035

<400> 31

Met Arg Arg Phe Arg Leu Val Gly Phe Leu Ser Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ala Gln Pro
 20 25 30
 Ala Ala Ala Asp Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
 35 40 45
 Val Gly Ala Gly Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser
 50 55 60
 Thr Lys Ala His Pro Tyr Leu Trp Ala Ala Ala His Ser Pro Ser Thr
 65 70 75 80
 Phe Asp Phe Thr Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ser
 85 90 95
 Gly Gln Leu Gly Pro Leu Ser Ser Gly Thr Gly Leu Val Ser Ile Ser
 100 105 110
 Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ala Asp Thr Met Thr Thr Cys Val
 115 120 125
 Leu Gln Ser Glu Ser Ser Cys Leu Ser Arg Ile Ala Thr Ala Glu Ala
 130 135 140
 Tyr Val Asp Ser Thr Leu Pro Gly Lys Leu Asp Gly Val Tyr Ser Ala
 145 150 155 160
 Ile Ser Asp Lys Ala Pro Asn Ala His Val Val Val Ile Gly Tyr Pro
 165 170 175
 Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Thr Thr Cys Ile Gly Leu Ser Glu Thr Lys
 180 185 190
 Arg Thr Ala Ile Asn Lys Ala Ser Asp His Leu Asn Thr Val Leu Ala
 195 200 205
 Gln Arg Ala Ala Ala His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Arg Thr Thr
 210 215 220
 Phe Thr Gly His Glu Leu Cys Ser Gly Ser Pro Trp Leu His Ser Val
 225 230 235 240
 Asn Trp Leu Asn Ile Gly Glu Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly Gln
 245 250 255
 Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Leu Asn Gly Ala Ala
 260 265

020035

```

<210> 32
<211> 269
<212> PRT
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 32

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

Val Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ser Pro Ala
          20          25          30

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

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

Ser Lys Ala Tyr Pro Tyr Leu Trp Gln Ala Ala His Ser Pro Ser Ser
65          70          75

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

Asn Gln Leu Gly Thr Leu Asn Ser Ser Thr Gly Leu Val Ser Leu Thr
          100          105          110

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

Leu Gln Ser Asp Ser Ala Cys Leu Ser Arg Ile Asn Thr Ala Lys Ala
          130          135          140

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

Ile Ser Thr Lys Ala Pro Ser Ala His Val Ala Val Leu Gly Tyr Pro
          165          170          175

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

Lys Arg Ser Ala Ile Asn Asp Ala Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Ala Ile
          195          200          205

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

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

```

020035

Leu Asp Leu Leu Asn Ile Gly Gln Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly
 245 250 255

Gln Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Met Asn Ser Val Ala
 260 265

<210> 33
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp.

<400> 33

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

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Gln Ala Ala Gly Pro
 20 25 30

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

Ser Tyr Ile Asp Ser Ser Gly Asp Cys His Arg Ser Asn Asn Ala Tyr
 50 55 60

Pro Ala Arg Trp Ala Ala Ala Asn Ala Pro Ser Ser Phe Thr Phe Ala
 65 70 75 80

Ala Cys Ser Gly Ala Val Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Gln Leu Gly
 85 90 95

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

Asp Ala Gly Phe Ala Asp Ala Met Thr Thr Cys Val Thr Ser Ser Asp
 115 120 125

Ser Thr Cys Leu Asn Arg Leu Ala Thr Ala Thr Asn Tyr Ile Asn Thr
 130 135 140

Thr Leu Leu Ala Arg Leu Asp Ala Val Tyr Ser Gln Ile Lys Ala Arg
 145 150 155 160

Ala Pro Asn Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Met Tyr Leu
 165 170 175

Ala Ser Asn Pro Trp Tyr Cys Leu Gly Leu Ser Asn Thr Lys Arg Ala
 180 185 190

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

020035

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

Asn His Glu Leu Phe Phe Gly Asn Asp Trp Leu His Ser Leu Thr Leu
225 230 235 240

Pro Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Thr Ser Thr Gly His Gln Ser Gly
245 250 255

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

<210> 34
<211> 317
<212> PRT
<213> Aeromonas hydrophila

<400> 34

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

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

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp
35 40 45

Leu Glu Gln Leu Thr Asn Glu Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu
50 55 60

Ala Glu Gly Gly Pro Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn
65 70 75 80

Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe
85 90 95

Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val
100 105 110

Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala
115 120 125

Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu
130 135 140

Asn Gly Ala Lys Glu Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln
145 150 155 160

Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Ala Ser His Val
165 170 175

Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala

020035

180 185 190

Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu
195 200 205

Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Gln Arg Asn Ala
210 215 220

Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Ser Arg Ser Ala
225 230 235 240

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

Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala
260 265 270

Ala Arg Ser Ala Ser Thr Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp
275 280 285

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

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

<210> 35
<211> 318
<212> PRT
<213> Aeromonas salmonicida

<400> 35

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

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

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp
35 40 45

Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu
50 55 60

Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn
65 70 75 80

Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe
85 90 95

Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val
100 105 110

020035

Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala
 115 120 125
 Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu
 130 135 140
 Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln
 145 150 155 160
 Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val
 165 170 175
 Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala
 180 185 190
 Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu
 195 200 205
 Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro
 210 215 220
 Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala
 245 250 255
 Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala
 260 265 270
 Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp
 275 280 285
 Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala
 290 295 300
 Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly
 305 310 315

<210> 36
 <211> 1311
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces thermosacchari

<400> 36
 cgaggacttca tccgcgattt tggcatgaac acttccttca acgcgcgtag cttgctacaa 60
 gtgcggcagc agaccgcgtc gttggaggct cagtgcgatt gaccgatcc ctgtcggcgcg 120
 catccgtcat cgtcttcgcc ctgctgctcg cgtgctggg catcagcccg gcccgagcag 180
 ccggcccgcc ctatgtggcc ctgggggatt cctattcctc gggcaacggc gccggaagtt 240

```

acatcgattc gagcgggtgac tgtcaccgca gcaacaacgc gtaccccgcc cgctggggcg 300
cgggccaacgc accgtctctc ttacaccttcg cggcctgttc gggagcgggtg accacgggatg 360
tgatcaacaa tcagctgggc gccctcaacg cgtccaccgg cctgggtgagc atcaccatcg 420
gcggaatga cgcgggcttc gcggacgga tgaccacctg cgtcaccagc tcggacagca 480
cctgcctcaa ccggtgggc accgccacca actacatcaa caccacctg ctgcgccggc 540
tcgacgcggt ctacagccag atcaaggccc gtgcccccaa cggcgcgtg gtcgtcctcg 600
gctacccgcg catgtacctg gctcgaacc cctggtactg cctgggcctg agcaacacca 660
agcgcggcgc catcaacacc accgccgaca ccctcaactc ggtgatctcc tcccgggcca 720
ccgccacgg attcggattc ggcgatgtcc gcccgacct caacaaccac gaactgttct 780
tcgggaacga ctggctgcac tcactcacc tgccgggtgtg ggagtcgtac caccacacca 840
gcacggggcca tcagagcggc tatctgccgg tcctcaacgc caacagctcg acctgatcaa 900
cgcacggcgc tgcccgcccc gcgcgtcacg ctgcgcgcgg gcgcgcgagc gcgttgatca 960
gcccacagt cgggtgacgg tcccaccgtc acggtcgagg gtgtacgtca cggtggcgcc 1020
gctccagaag tggaacgtca gcaggaccgt ggagccgtcc ctgacctgt cgaagaactc 1080
cggggtcagc gtgatcacc ctccccgta gccgggggcg aaggcggcgc cgaactcctt 1140
gtaggacgtc cagtcgtgcg gcccgcggt gccaccgtcc gcgtagaccg ctcccatggt 1200
cgccagccgg tcccgcgga actcggtgg gatgtcgtg cccaagggtg tcccggtggt 1260
gtccgagagc accgggggct cgtaccggat gatgtgcaga tcaaagaat t 1311

```

```

<210> 37
<211> 267
<212> PRT
<213> Streptomyces thermosacchari

```

```
<400> 37
```

```

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

```

```

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Gln Ala Ala Gly Pro
20           25           30

```

```

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

```

```

Ser Tyr Ile Asp Ser Ser Gly Asp Cys His Arg Ser Asn Asn Ala Tyr
50           55           60

```

```

Pro Ala Arg Trp Ala Ala Ala Asn Ala Pro Ser Ser Phe Thr Phe Ala
65           70           75           80

```

```

Ala Cys Ser Gly Ala Val Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Gln Leu Gly
85           90           95

```

020035

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

Asp Ala Gly Phe Ala Asp Ala Met Thr Thr Cys Val Thr Ser Ser Asp
115 120 125

Ser Thr Cys Leu Asn Arg Leu Ala Thr Ala Thr Asn Tyr Ile Asn Thr
130 135 140

Thr Leu Leu Ala Arg Leu Asp Ala Val Tyr Ser Gln Ile Lys Ala Arg
145 150 155 160

Ala Pro Asn Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Met Tyr Leu
165 170 175

Ala Ser Asn Pro Trp Tyr Cys Leu Gly Leu Ser Asn Thr Lys Arg Ala
180 185 190

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

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

Asn His Glu Leu Phe Phe Gly Asn Asp Trp Leu His Ser Leu Thr Leu
225 230 235 240

Pro Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Thr Ser Thr Gly His Gln Ser Gly
245 250 255

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

<210> 38
<211> 548
<212> PRT
<213> Thermobifida fusca

<400> 38

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

Ala Leu Leu Val Gly Thr Pro Gln Asp Arg Arg Leu Arg Leu Glu Cys
20 25 30

His Glu Thr Arg Pro Leu Arg Gly Arg Cys Gly Cys Gly Glu Arg Arg
35 40 45

Val Pro Pro Leu Thr Leu Pro Gly Asp Gly Val Leu Cys Thr Thr Ser
50 55 60

Ser Thr Arg Asp Ala Glu Thr Val Trp Arg Lys His Leu Gln Pro Arg

020035

65	70	75	80
Pro Asp Gly Gly Phe Arg Pro His Leu Gly Val Gly Cys Leu Leu Ala	85	90	95
Gly Gln Gly Ser Pro Gly Val Leu Trp Cys Gly Arg Glu Gly Cys Arg	100	105	110
Phe Glu Val Cys Arg Arg Asp Thr Pro Gly Leu Ser Arg Thr Arg Asn	115	120	125
Gly Asp Ser Ser Pro Pro Phe Arg Ala Gly Trp Ser Leu Pro Pro Lys	130	135	140
Cys Gly Glu Ile Ser Gln Ser Ala Arg Lys Thr Pro Ala Val Pro Arg	145	150	155
Tyr Ser Leu Leu Arg Thr Asp Arg Pro Asp Gly Pro Arg Gly Arg Phe	165	170	175
Val Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly	180	185	190
Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val	195	200	205
Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln	210	215	220
Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu	225	230	240
Asp Gly Glu Phe Leu Leu Leu Ser Pro Val Gln Ala Ala Thr Trp Gly	245	250	255
Asn Tyr Tyr Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Ala Arg	260	265	270
Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala	275	280	285
Asn Ala Tyr Pro Glu Leu Val Ala Glu Ala Tyr Asp Phe Ala Gly His	290	295	300
Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp	305	310	320
Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr	325	330	335
Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr			

020035

340	345	350
Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala 355 360 365		
Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu 370 375 380		
Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp 385 390 395 400		
Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro 405 410 415		
Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn 420 425 430		
Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val 435 440 445		
His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe 450 455 460		
Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu 465 470 475 480		
Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr 485 490 495		
Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val 500 505 510		
Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu 515 520 525		
Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala 530 535 540		
Gly Glu Val Gly 545		
<210> 39		
<211> 3000		
<212> ДНК		
<213> Thermobifida fusca		
<400> 39		
ggtggtgaac cagaacaccc ggtcgtcgcc gtgggcgtcc aggtgcaggt gcaggttctt	60	
caactgctcc agcaggatgc cgccgtggcc gtgcacgatg gccttgggca ggctgtggt	120	
ccccgacgag tacagcacc atagcggatg gtcgaacggc agcgggggtga actccagtcc	180	
cgcgccttcg cccgcggcctt cgaactccgc ccaggacagg gtgtcggcga cagggccgca	240	

gcccaggtac ggcaggacga cgggtgtgctg caggctgggc atgccgtcgc gcagggcttt	300
gagcacgtca cggcggtcga agtccttacc gccgtagcgg tagccgtcca cggccagcag	360
cactttcggc tcgatctcgc cgaaccggtc gaggaacgtg cgcaccccgga agtcggggga	420
acaggacgac caggtcgcac cgatcgcggc gcaggcgagg aatgcggcgg tcgcctcggc	480
gatgttcggc aggtaggcca cgaccgggc gccggggccc accccgaggc tcgaggaggc	540
cgcagcgatc gcggcgggtg ggggtccgag ttctccccag gtccactcgg tcaacggcgg	600
gagttcggac gcgtgccgga tcgccacggc tgatgggtca cggtcgcgga agatgtgctc	660
ggcgtagttg aggggtggcg cggggaacca gacggcgccg ggcatggcgt cggaggcgag	720
cactgtggtg tacgggggtg cggcgcgcac ccggtagtag tcccagatcg cggaccagaa	780
tccttcgagg tcggttaccg accagcgcca cagtgcctcg tagtcgggtg cgtccacacc	840
gcggtgctcc cgcacccagc ggggtgaacgc ggtgagggtg gcgcgttctt tgcgctcctc	900
gtcgggactc cacaggatcg gcggctgcgg cttgagtgtc atgaaacggc accccttcgt	960
ggacggtcgc gatgcgggtg gcgtcgggtg cctcccctaa cgctccccgg tgacggagtg	1020
ttgtgcacca catctagcac gcgggacgcg gaaaccgtat ggagaaaaca cctacaacct	1080
cggccggacg gtgggtttcg gccacactta ggggtcgggt gcctgcttgc cgggcagggc	1140
agtcccgggg tgctgtggtg cggcggggag ggtgtgcct tcgagggtg cggcgggac	1200
actccgggcc tcagccgtac ccgcaacggg gacagttctc ctcccttcgg ggctggatgg	1260
tccttcccc cgaaatgcgg cgagatctcc cagtcagccc ggaaaacacc cgctgtgccc	1320
aggtactctt tgcttcgaac agacaggccg gacggtccac gggggagggt tgtgggcagc	1380
ggaccacgtg cggcgaccag acgacggtg ttctctcgta tcccgcctct tgtacttgtg	1440
acagcgctca cgctggtctt ggctgtcccg acggggcgcg agacgctgtg gcgcatgtgg	1500
tgtgaggcca cccaggactg gtgcctgggg gtgcgggtcg actccgcgg acagcctgcg	1560
gaggacggcg agttttctgct gctttctccg gtccaggcag cgacctgggg gaactattac	1620
gcgctcgggg attcgtactc ttggggggac ggggcccgcg actactatcc cggcaccgcg	1680
gtgaaggcg gttgctggcg gtccgctaac gcctatccgg agctgggtcg cgaagcctac	1740
gacttcggcg gacacttgte gttcctggcc tgcagcggcc agcgcggtc cgcctgctt	1800
gacgtatcg acgaggtcgg ctgcgacgtg gactggaact cccctcacac gtcgctggtg	1860
acgatcggga tcggcgggcaa cgatctgggg ttctccacgg ttttgaagac ctgcatggtg	1920
cgggtgccgc tgctggacag caaggcgtgc acggaccagg aggacgctat ccgcaagcgg	1980
atggcgaaat tcgagacgac gtttgaagag ctcatcagcg aagtgcgcac ccgcgcgccg	2040
gacgcccgga tccttgctgt gggctacccc cggattttct cggagggaacc gaccggcgcc	2100
tactacacgc tgaccgcgag caaccagcgg tggctcaacg aaaccattca ggagttcaac	2160
cagcagctcg ccgaggctgt cgcgggtccac gacgaggaga ttgcgcgctc gggcggggtg	2220
ggcagcgtgg agttcgtgga cgtctaccac gcgttgagc gccacgagat cggtcggac	2280

gagccgtggg tgaacggggt gcagttgcgg gacctcgcca ccgggggtgac tgtggaccgc 2340
 agtacettcc accccaacgc cgctggggcac cgggcggtcg gtgagcgggt catcgagcag 2400
 atcgaaccgc gcccgggccg tccgctctat gccactttcg cggtggtggc gggggcgacc 2460
 gtggacactc tcgcgggcga ggtgggggtga cccggcttac cgtccggccc gcaggtctgc 2520
 gagcactgcg gcgatctggt ccactgcccc gtgcagttcg tcttcgggtga tgaccagcgg 2580
 cggggagagc cggatcgttg agccgtgcgt gtctttgacg agcacacccc gctgcaggag 2640
 ccgttcgcac agttctcttc cggtgggccag agtcgggtcg acgtcgatcc cagcccacag 2700
 gccgatgctg cgggcccgcga ccacgccgtt gccgaccagt tggtcgaggc gggcgcgag 2760
 cacggggggc agggcgcgga catggtccag gtaagggccg tcgcggacga ggctcaccac 2820
 ggcagtgccg accgcgcagg cgagggcggt gccgccgaag gtgctgccgt gctggccggg 2880
 gcggatcacg tcgaagactt ccgcgtcgcc taccgccgcc gccacgggca ggatgccgcc 2940
 gcccagcgct ttgccgaaca ggtagatata ggcgtcgact ccgctgtggt cgcaggcccc 3000

<210> 40
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Thermobifida fusca

<400> 40

Val Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly
1 5 10 15

Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val
20 25 30

Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln
35 40 45

Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu
50 55 60

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

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

Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala
100 105 110

Asn Ala Tyr Pro Glu Leu Val Ala Glu Ala Tyr Asp Phe Ala Gly His
115 120 125

Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp
130 135 140

020035

Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr
145 150 155 160

Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr
165 170 175

Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala
180 185 190

Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu
195 200 205

Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp
210 215 220

Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro
225 230 235 240

Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn
245 250 255

Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val
260 265 270

His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe
275 280 285

Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu
290 295 300

Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr
305 310 315 320

Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val
325 330 335

Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu
340 345 350

Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala
355 360 365

Gly Glu Val Gly
370

<210> 41
<211> 300
<212> PRT
<213> Corynebacterium efficiens
<400> 41

020035

```

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

Cys Ala Asp Gly Ala Arg Glu Glu Thr Ala Gly Ala Pro Pro Gly Glu
20           25           30

Ser Ser Gly Gly Ile Arg Glu Glu Gly Ala Glu Ala Ser Thr Ser Ile
35           40           45

Thr Asp Val Tyr Ile Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ala Ala Met Gly Gly
50           55           60

Arg Asp Gln Pro Leu Arg Gly Glu Pro Phe Cys Leu Arg Ser Ser Gly
65           70           75           80

Asn Tyr Pro Glu Leu Leu His Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Cys Gln
85           90           95

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

Thr Leu Pro Ala Gln Val Asp Ala Leu Thr Glu Asp Thr Thr Leu Val
115          120          125

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

Cys Ile Arg Glu Arg Ile Ala Gly Glu Asn Ala Asp Asp Cys Val Asp
145          150          155          160

Leu Leu Gly Glu Thr Ile Gly Glu Gln Leu Asp Gln Leu Pro Pro Gln
165          170          175

Leu Asp Arg Val His Glu Ala Ile Arg Asp Arg Ala Gly Asp Ala Gln
180          185          190

Val Val Val Thr Gly Tyr Leu Pro Leu Val Ser Ala Gly Asp Cys Pro
195          200          205

Glu Leu Gly Asp Val Ser Glu Ala Asp Arg Arg Trp Ala Val Glu Leu
210          215          220

Thr Gly Gln Ile Asn Glu Thr Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg His Asp
225          230          235          240

Ala Leu Phe Val Leu Pro Asp Asp Ala Asp Glu His Thr Ser Cys Ala
245          250          255

Pro Pro Gln Gln Arg Trp Ala Asp Ile Gln Gly Gln Gln Thr Asp Ala
260          265          270

```

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

Val Arg Asp Ala Leu Gly Leu Glu Pro Val Gln Pro
 290 295 300

<210> 42
 <211> 3000
 <212> ДНК
 <213> *Corynebacterium efficiens*

<400> 42
 ttctgggggtg ttatgggggtt gttatcggct cgtcctgggt ggatcccgcc aggtggggta 60
 ttcacggggg acttttgtgt ccaacagccg agaatgagtg ccctgagcgg tgggaatgag 120
 gtgggcgggg ctgtgtcgcc atgagggggc ggcggtctct gtggtgcccc gcgacccccg 180
 gccccggtga gcggtgaatg aaatccggct gtaatcagca tcccggtgcc acccgtcgg 240
 ggaggtcagc gcccgagtg tctacgcagt cggatcctct cggactcggc catgctgtcg 300
 gcagcatcgc gtcctcgggt cttggcgctc ctgggtgtt ctgcctgctg tccctggaag 360
 gcgaaatgat caccggggag tgatacaccg gtggtctcat ccgggatgcc cacttcggcg 420
 ccatccggca attcgggcag ctccgggtgg aagtaggtgg catccgatgc gtcggtgacg 480
 ccatagtggg cgaagatctc atcctgctcg aggggtctca ggccactctc cggatcgata 540
 tcggggggcg ccttgatggc gtccttgctg aaaccgaggt gcagcttggt ggcttccaat 600
 ttcgcaccac ggagcgggac gaggtcgaa tgacggccga agagcccggt gtggacctca 660
 acgaaggtgg gtagtcccggt gtcattcttg aggaacacgc cctccaccgc acccagcttg 720
 tggccggagt tgctgtaggc gctggcatcc agaagggaag cgatctcata tttgtcgggtg 780
 tgctcagaca tgatcttcct ttgctgtcgg tgtctggtac taccacggta gggctgaatg 840
 caactgttat ttttctgtta ttttaggaat tgggtccatat ccacagggct ggctgtggctc 900
 aaatcgctcat caagtaatcc ctgtcacaca aaatgggtgg tgggagccct ggtcgcgggtt 960
 ccgtgggagg cgccgtgccc cgcaggatcg tcggcatcgg cggatctggc cggtaccccg 1020
 cgggtgaataa aatcattctg taaccttcat cacgggttgg tttaggatat cgcctcttc 1080
 gtcttgaccc cgtccccggc gcgcgggagc ccgcgggttg cggtagacag gggagacgtg 1140
 gacaccatga ggacaacggc catcgcagca agcgcattac tccttctcgc cggatgcgcg 1200
 gatggggccc gggaggagac cgcgggtgca ccgcgggtg agtcctcccg gggcatccgg 1260
 gaggaggggg cggaggcgtc gacaagcatc accgacgtct acatcgccct cggggattcc 1320
 tatgcggcga tgggcgggcg ggatcagccg ttacggggtg agccgttctg cctgcgctcg 1380
 tccggtaat acccggaact cctccacgca gaggtcaccc atctcacctg ccagggggcg 1440
 gtgaccgggg atctgctcga acccaggacg ctgggggagc gcacgctgcc ggcgcagggtg 1500
 gatgcgctga cggaggacac caccctggtc accctctcca tcgggggcaa tgacctcgga 1560
 ttcgggggagg tggcgggatg catccgggaa cggatcgccg gggagaacgc tgatgattgc 1620

```

gtggacctgc tgggggaaac catcggggag cagctcgatc agcttcccc gcagctggac 1680
cgcgtagcacg aggcctatccg ggaccgcgcc ggggacgcgc aggttggtgt caccgggttac 1740
ctgccgctcg tgtctgccgg ggactgcccc gaactggggg atgtctccga ggcggatcgt 1800
cgttgggcgg ttgagctgac cgggcagatc aacgagaccg tgcgcgaggc ggcggaacga 1860
cacgatgccc tctttgtcct gcccgacgat gccgatgagc acaccagttg tgcaccccca 1920
cagcagcgct gggcgatat ccagggccaa cagaccgatg cctatccgct gcacccgacc 1980
tccgccggcc atgaggcgat ggccgccgcc gtccgggacg cgctgggcct ggaaccggtc 2040
cagccgtagc gccgggcgcg cgcttgctga cgaccaaccc atgccaggct gcagtcacat 2100
ccgcacatag cgcgcgcggg cgatggagta cgcaccatag aggatgagcc cgatgccgac 2160
gatgatgagc agcacactgc cgaagggttg tcccccgagg gtgcgcagag ccgagtccag 2220
acctgcgccc tgctccggat catgggcccc accggcgatg acgatcaaca cccccaggat 2280
cccgaaaggc ataccacggg cgacataacc ggctgttccg gtgatgatga tcgcgggtccc 2340
gacctgccct gaccccgcac ccgcctccag atcctcccg aaatcccggt tggccccctt 2400
ccagagggtg tagacacccg cccccagtac caccagccc gcgaccacaa ccagcaccac 2460
accccgaggt tgggatagga cgggtggcgt gacatcggtg gcggtctccc catcgaggt 2520
gctgcgccc cgggcgaagg tggagggtgt caccgccagg gagaagtaga ccatggccat 2580
gaccgcccc ttggcccttt ccttgaggtc ctgcgccgcc agcagctggc tcaattgcc 2640
gagtgccagg gccgccagg cgatgacggc aaccacagg aggaactgcc caccggagc 2700
ctccgcgatg gtggccagg cacctgaatt cgaggcctca tcacccgaac cgccggatcc 2760
agtggcgatg cgcaccgcga tccacccgat gaggatgtgc agtatgccc ggacaatgaa 2820
accacctctg gccagggtg tcagcgcggg gtggtctctg gcctggtcgg cagcccgttc 2880
gatcgtccgt ttcgcggatc tgggtgtcgc cttatccata gctcccattg aaccgccttg 2940
aggggtggg gccactgtc agggcggatt gtgatctgaa ctgtgatgtt ccatcaaccc 3000

```

```

<210> 43
<211> 268
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor

```

```
<400> 43
```

```
Met Arg Arg Phe Arg Leu Val Gly Phe Leu Ser Ser Leu Val Leu Ala
1           5           10           15
```

```
Ala Gly Ala Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ala Gln Pro
          20           25           30
```

```
Ala Ala Ala Asp Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
          35           40           45
```

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

020035

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

<210> 44
 <211> 2000
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 44
 cccggcgggcc cgtgcaggag cagcagccgg cccgcgatgt cctcgggcgt cgtcttcac 60
 aggcggtcca tcgctcggc gaccggcgcc gtgtagttgg cccggacctc gtcccagggtg 120
 cccgcggcga tctggcgggt ggtgcggtgc gggccgcgcc gaggggagac gtaccagaag 180
 cccatcgtea cgttctcgg ctgcgggttcg ggctcgtccg ccgctccgtc cgtcgccctcg 240

```

ccgagcacct tctcggcgag gtcggcgctg gtcgccgtca ccgtgacgtc ggcgccccgg 300
ctccagcgcg agatcagcag cgtccagccg tcgccctccg ccagcgtcgc gctgcggtcg 360
tcgtcgcggg cgatccgcag cacgcgcgcg ccgggcggca gcagcgtggc gccggaccgt 420
acgcggtcga tgttcgccgc gtgcgagtac ggctgctcac ccgtggcgaa acggccgagg 480
aacagcgcg tgcagcagtc ggacggggag tcgtgtcgt ccacgttgag ccggatcggc 540
agggcttcgt gcgggttcac ggacatgtcg ccatgatcgg gcacccggcc gccgcgtgca 600
cccgctttcc cgggcacgca cgacaggggc tttctcgccg tcttcctgcc gaacttgaac 660
gagtgtcagc catttcttgg catggacact tccagtcaac gcgcgtagct gctaccacgg 720
ttgtggcagc aatcctgcta agggaggttc catgagacgt ttccgacttg tcggcttcct 780
gagttcgtc gtcctcgccg ccggcgccgc cctcaccggg gcagcgaccg cccaggcgcc 840
ccaaaccgcc gccgccgacg gctatgtggc cctcgccgac tctactcct ccggggtcgg 900
agcgggcagc tacatcagct cgagcggcga ctgcaagcgc agcacgaagg cccatcccta 960
cctgtgggcg gccgccact cgccctccac gttcgacttc accgcctgtt ccggcgcccc 1020
tacgggtgat gttctctccg gacagctcgg ccgctcagc tccggcaccg gcctcgtctc 1080
gatcagcacc ggccggcaacg acgccggttt cgccgacacc atgacgacct gtgtgtccca 1140
gtccgagagc tctcgcctgt cgcggatcgc caccgccgag gcgtacgtcg actcgacgt 1200
gcccggaag ctcgacggcg tctactcggc aatcagcgac aaggcgccga acgcccagct 1260
cgtcgtcacc ggctaccgcg gcttctacaa gctcggcacc acctgcacg gccctgtccga 1320
gaccaagcgg acggcgatca acaaggcctc cgaccacctc aacaccgtcc tcgccagcg 1380
cgccgccgcc cacggcttca cttcggcgca cgtacgcacc accttcaccg gccacgagct 1440
gtgtcccgcc agccctggc tgcacagcgt caactggctg aacatcggcg agtcgtacca 1500
ccccaccgcg gccggccagt ccggtggcta cctgcgggtc ctcaacggcg ccgcctgacc 1560
tcaggcgga ggagaagaag aaggagcggg gggagacgag gagtgggagg ccccgccga 1620
cggggtcgcc gtccccgtct ccgtctccgt ccggtcccg caagtcaccg agaacgccac 1680
cgcgtcggac gtggcccgca ccggactcgg cacctccacg cgcacggcac tctcgaacgc 1740
gccgggtgtc tcgtgcgtcg tcaccaccac gccgtcctgg cgcgagcgct cgcgcgccga 1800
cgggaaggac agcgtccgcc accccggatc ggagaccgac ccgtcccgcg tcaccaccg 1860
gtagccgacc tccgcgggca gccgcccgc cgtgaacgtc gccgtgaacg cgggtgcccc 1920
gtcgtgcggc ggccggacagg ccccagta gtgggtgcgc gagcccacca cggtcacctc 1980
caccgactgc gctgcggggc 2000

```

```

<210> 45
<211> 269
<212> PRT
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 45

```

020035

Met Arg Arg Ser Arg Ile Thr Ala Tyr Val Thr Ser Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ser Pro Ala
 20 25 30
 Ala Ala Ala Thr Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
 35 40 45
 Val Gly Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser
 50 55 60
 Ser Lys Ala Tyr Pro Tyr Leu Trp Gln Ala Ala His Ser Pro Ser Ser
 65 70 75 80
 Phe Ser Phe Met Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ala
 85 90 95
 Asn Gln Leu Gly Thr Leu Asn Ser Ser Thr Gly Leu Val Ser Leu Thr
 100 105 110
 Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ser Asp Val Met Thr Thr Cys Val
 115 120 125
 Leu Gln Ser Asp Ser Ala Cys Leu Ser Arg Ile Asn Thr Ala Lys Ala
 130 135 140
 Tyr Val Asp Ser Thr Leu Pro Gly Gln Leu Asp Ser Val Tyr Thr Ala
 145 150 155 160
 Ile Ser Thr Lys Ala Pro Ser Ala His Val Ala Val Leu Gly Tyr Pro
 165 170 175
 Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Gly Ser Cys Leu Ala Gly Leu Ser Glu Thr
 180 185 190
 Lys Arg Ser Ala Ile Asn Asp Ala Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Ala Ile
 195 200 205
 Ala Lys Arg Ala Ala Asp His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Lys Ser
 210 215 220
 Thr Phe Thr Gly His Glu Ile Cys Ser Ser Ser Thr Trp Leu His Ser
 225 230 235 240
 Leu Asp Leu Leu Asn Ile Gly Gln Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly
 245 250 255
 Gln Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Met Asn Ser Val Ala
 260 265

<210> 46
 <211> 1980
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 46
 ccaccgccgg gtcggcggcg agtctcctgg cctcggtcgc ggagagggtg gccgtgtagc 60
 cgttcagcgc ggccgcgaac gtcttcttca ccgtgccgcc gtactcgttg atcaggccct 120
 tgccttctgt cgacgcggcc ttgaagccgg tgccttctt gagcgtgacg atgtagctgc 180
 ccttgatcgc ggtgggggag ccggcggcga gcaccgtgcc ctcgcccggtg gtggcctggg 240
 cgggcagtcg ggtgaatccg cccacgaggg cgcgggtcgc caccgcggtt atcgcggcga 300
 tccggatctt cttgctacgc agctgtgcc aacgagggag tcctcctctg ggcagcggcg 360
 cgctgggtg gggcgcacgg ctgtgggggg tgcgcgcgtc atcacgcaca cggccctgga 420
 gcgtcgtgtt ccgccctggg ttgagtaaag cctcggccat ctacgggggt ggtcaaggg 480
 agttgagacc ctgtcatgag tctgacatga gcacgcaatc aacggggccg tgagcaccac 540
 ggggcgaccc cggaaagtgc cgagaagtct tggcatggac acttcctgtc aacacgcgta 600
 gctggtagca cggttacggc agagatcctg ctaaaggagg gttccatgag acgttccoga 660
 attacggcat acgtgacctc actcctctc gccgtcggct gcgccctcac cggggcagcg 720
 acggcgacgg cgtccccagc cgcgcgggcc acgggctatg tggccctcgg cgaactcgtac 780
 tcgtccggtg tcggcgccgg cagctacctc agctccagcg gcgactgcaa gcgcagttcg 840
 aaggcctatc cgtacctctg gcaggcccg cattcacctc cgtcgttcag tttcatggct 900
 tgctcggcg ctcgtacggg tgatgtcctg gccaatcagc tcggcaccct gaactcgtcc 960
 accggcctgg tctccctcac catcggaggg aacgacgcgg gcttctccga cgtcatgacg 1020
 acctgtgtgc tccagtcoga cagcgctgc ctctcccgca tcaacacggc gaaggcgtag 1080
 gtcgactcca cctgcccgg ccaactcgac agcgtgtaca cggcgatcag caccgaaggcc 1140
 ccgtcggccc atgtggccgt gctgggctac ccccgcttct acaaactggg cggctcctgc 1200
 ctgcggggcc tctcggagac caagcggtec gccatcaacg acgcggccga ctatctgaac 1260
 agcgccatcg ccaagcgcgc cgcgcaccac ggcttcacct tcggcgacgt caagagcacc 1320
 ttcaccggcc atgagatctg ctccagcagc acctggctgc acagtctcga cctgctgaac 1380
 atcggccagt cctaccaccc gaccgcggcc ggccagtcgg cggctatct gccggtcagt 1440
 aacagcgtgg cctgagctcc caccggcctga atttttaagg cctgaatttt taaggcgaag 1500
 gtgaaccgga agcggaggcc ccgtccgtcg ggggtotcgt cgcacaggtc accgagaacg 1560
 gcacggagtt ggacgtcgtg cgcaccgggt cgcgcacctc gacggcgatc tcgttcgaga 1620
 tcgttccgtc cgtgtcgtac gtggtgacga acacctgctt ctgctgggtc tttccgcgc 1680
 tcgcccggaa ggacagcgtc ttccagccc gatccgggac ctgcccttc ttggtcacc 1740
 agcggtagtc caccctgacc ggcaccggcc ccaccgtgaa ggtcgcgtg aacgtgggcg 1800
 cctgggcgggt gggcgggggg caggcaccgg agtagtcgggt gtgcacgcg gtgaccgtca 1860

020035

ccttcacgga ctgggcccgc ggggtcgtcg taccgccgcc gccaccgccg cctccccgag 1920
 tggagcccga gctgtgggtcg cccccgccgt cggcgttgtc gtccctcgggg gttttcgaac 1980

<210> 47
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Thermobifida fusca

<400> 47

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

Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val
 20 25 30

Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln
 35 40 45

Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu
 50 55 60

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

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

Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala
 100 105 110

Asn Ala Tyr Pro Glu Leu Val Ala Glu Ala Tyr Asp Phe Ala Gly His
 115 120 125

Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp
 130 135 140

Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr
 145 150 155 160

Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr
 165 170 175

Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala
 180 185 190

Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu
 195 200 205

Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp
 210 215 220

020035

Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro
225 230 235 240

Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn
245 250 255

Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val
260 265 270

His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe
275 280 285

Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu
290 295 300

Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr
305 310 315 320

Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val
325 330 335

Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu
340 345 350

Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala
355 360 365

Gly Glu Val Gly
370

<210> 48
<211> 968
<212> ДНК
<213> Thermobifida fusca

<400> 48
ctgcagacac cgcggccgccc ttctcccga tcgtcatgtt cggcgactcc ctcagcgaca 60
ccggcaagat gtactccaag atgcgcggct acctgccgtc ctcggcgccg tactacgagg 120
gccgcttctc gaacggcccg gtctggctgg agcagctgac gaagcagttc cccggcctga 180
cgatcgccaa cgaggccgag gggggcgcca ccgcagtcgc ctacaacaag atctcctgga 240
acccgaagta ccaggtcatt aacaacctcg actacgaggt caccagttc ttgcagaagg 300
actcgttcaa gcccgacgac ctgggtcatcc tgtgggtggg cgccaacgac tacctggcct 360
acgggttgaa cacggagcag gacgccaagc ggggtgcgga cgccatctcg gacgcggcaa 420
accgcatggt cctgaacggc gcgaagcaga tcctgctgtt caacctgccc gacctgggcc 480
agaacctgct cgcccgctcc cagaaggctc tcgaggccgt ctcgcacgtg tccgcctacc 540
acaacaagct gctcctcaac ctcgcccggc agctcgcccc gacgggcatg gtcaagctgt 600
tcgagatcga caagcagttc gcggagatgc tgcgcgaccc ccagaacttc ggctgagcg 660

acgtggagaa cccgtgctac gacggcggct acgtgtggaa gccgttcgcc acccggtccg 720
 tctcgaccga cggcagctg tcggccttct cgcgccagga gcgcctggcg atcgctggca 780
 acccgctcct ggcacaggcg gtagcttcgc cgatggcccg ccgctcggcc tcgccctca 840
 actgcgaggg caagatgttc tgggaccagg tocacccac caccgtggtc cagccgccc 900
 tctcggagcg cgcgccacc ttcacgaga ccagtacga gttcctcgcc cactagtcta 960
 gaggatcc 968

<210> 49
 <211> 1044
 <212> ДНК
 <213> *Aeromonas salmonicida*

<400> 49
 atgaaacaac aaaaacggct ttacgccga ttgctgacgc tgttatttgc gtcacatctc 60
 ttgctgcttc attctgcagc ttcagcagca gatacaagac cggcgtttag ccggatcgtc 120
 atgtttggag atagcctgag cgatacgggc aaaatgtata gcaaatgag aggctatctt 180
 ccgtcaagcc cgcctatta tgaaggccgc tttagcaatg gaccggctcg gctggaacaa 240
 ctgacgaaac aatttcggg actgacgac gctaataag cagaaggagg agcaacagcg 300
 gtcgcctata acaaatcag ctgggaccg aaatatcagg tcatcaacaa cctggactat 360
 gaagtccac agtttcttca gaaagacagc tttaaaccgg atgatctggt catcctttgg 420
 glcggcgcca atgattatct ggcgtatggc tggaaacacag aacaagatgc caaaagagtc 480
 agagatgcca tcagcgatgc cgctaataga atggctctga acggcgccaa acaaatcctg 540
 ctgtttaacc tgccgatct gggacaaaat ccgagcgcca gaagccaaa agtcgctcga 600
 gcagtcagcc atgtcagcgc ctatcataac aaactgctgc tgaacctggc aagacaattg 660
 gcaccgacgg gaatggttaa attgtttgaa attgacaaac agtttgccga aatgctgaga 720
 gatccgcaaa attttggcct gagcgatgc gaaaaccgt gctatgatgg cggatatgtc 780
 tggaaaccgt ttgccacaag aagcgtcagc acggatagac aactgtcagc gtttagcccc 840
 caagaaagac tggcaatgc cggaaatccg cttttggcac aagcagttgc ttcaccgatg 900
 gcaagaagat cagcaagccc gctgaattgc gaaggcaaaa tgttttggga tcaggtccat 960
 ccgacaacag ttgtccatgc tgccctttca gaaagagcgg cgacgtttat cgaaacacag 1020
 tatgaatttc tggcccatgg ctga 1044

<210> 50
 <211> 1005
 <212> ДНК
 <213> *Aeromonas hydrophila*

<400> 50
 atgaaaaaat ggtttgtgtg ttatttgga ttggtcgcgc tgacagtcca ggcagccgac 60
 agccgtcccc ccttctcccg gatcgatg tttggcgaca gcctctccga taccggcaag 120
 atgtacagca agatgcggcg ttacctcccc tccagcccc cctactatga gggccgcttc 180

```

tccaacgggc cgtctggct ggagcagctg accaacgagt tcccgggcct gaccatagcc 240
aacgagggcg aaggcggacc gaccgcgctg gcttacaaca agatctcctg gaatcccaag 300
tatcagggtca tcaacaacct ggactacgag gtcacccagt tctgcaaaa agacagcttc 360
aagccggacg atctggtgat cctctgggtc ggcgccaacg actatctggc ctatggctgg 420
aacacagagc aggatgccaa gcgggtgcgc gacgccatca gcgatgcggc caaccgcatg 480
gtgctgaacg gcgccaagga gatactgctg ttcaacctgc cggatctggg ccagaacccc 540
tcggcccgcg gccagaaggt ggtcgaggcg gccagccatg tctccgccta ccacaaccag 600
ctgctgtga acctggcacg ccagctggct cccaccggca tggtaagct gttcgagatc 660
gacaagcagt ttgccgagat gctgctgat cgcagaact tcggcctgag cgaccagagg 720
aacgcctgct acggtggcag ctatgtatgg aagccgtttg cctccgcag cgcagcacc 780
gacagccagc tctccgcctt caaccgcag gacgcctcg ccacgcgg caaccgctg 840
ctggcccagg ccgtcgccag ccccatggct gcccgcagcg ccagcaccct caactgtgag 900
ggcaagatgt tctgggatca ggtccacccc accactgtcg tgcacgcgc cctgagcgag 960
ccgcgcgcca cttcatcga gagccagtac gagttcctcg cccac 1005

```

<210> 51
 <211> 1011
 <212> ДНК
 <213> *Aeromonas salmonicida*

```

<400> 51
atgaaaaaat ggtttgtttg ttatttgggg ttgatcgcg tgacagttca ggcagccgac 60
actgccccg cttctcccc gatcgtgatg ttcgcgaca gcctctcga taccggcaaa 120
atgtacagca agatgcgcgg ttacctcccc tcagcccg cctactatga gggcggttc 180
tccaacggac cgtctggct ggagcagctg accaagcagt tcccgggtct gaccatcgcc 240
aacgaagcgg aaggcggtc cactgcctg gcttacaaca agatctcctg gaatcccaag 300
tatcagggtct acaacaacct ggactacgag gtcacccagt tcttgcagaa agacagcttc 360
aagccggacg atctggtgat cctctgggtc ggtgccaatg actatctggc atatggctgg 420
aatacggagc aggatgccaa gcgagttcgc gatgccatca gcgatgcggc caaccgcatg 480
gtactgaacg gtccaagca gatactgctg ttcaacctgc cggatctggg ccagaacccg 540
tcagcccgcg gtcagaaggt ggtcgaggcg gtcagccatg tctccgccta tcacaacaag 600
ctgctgtga acctggcacg ccagctggcc cccaccggca tggtaaagct gttcgagatc 660
gacaagcaat ttgccgagat gctgctgat cgcagaact tcggcctgag cgacgtcgag 720
aaccctgct acgacggcg ctatgtgtgg aagccgtttg ccaccgcag cgtcagcacc 780
gaccgccagc tctccgcctt cagtccgcag gaacgcctcg ccacgcgg caaccgctg 840
ctggcacagg ccgttgccag tcctatggcc cgcgcagcg ccagccccct caactgtgag 900
ggcaagatgt tctgggatca ggtacacccg accactgtcg tgcacgcgc cctgagcgag 960
cgcgcgcca cttcatcga gaccagtac gagttcctcg cccacggatg a 1011

```

<210> 52
 <211> 888
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces coelicolor*

<400> 52
 atgccgaagc ctgcccttcg ccgtgtcatg accgcgacag tcgccgccgt cggcacgctc 60
 gccctcggcc tcaccgacgc caccgcccac gccgcgccg ccagggccac tccgacctg 120
 gactacgtcg ccctcggcga cagctacagc gccggctccg gcgtcctgcc cgtcgacccc 180
 gccaacctgc tctgtctgcg ctcgacggcc aactaccccc acgtcatcgc ggacacgacg 240
 ggcgcccgcc tcacggacgt cacctgcggc gccgcgcaga ccgccgactt cagcggggcc 300
 cagtaccggg gcgtcgacac ccagttggac gcgctcggca ccggcacgga cctgggtcacg 360
 ctcaccatcg gcggcaacga caacagcacc ttcattcaacg ccatcacggc ctgcggcacg 420
 gcgggtgtcc tcagcggcgg caagggcagc ccctgcaagg acaggcacgg cacctccttc 480
 gacgacgaga tcgaggccaa cacgtacccc gcgctcaagg aggcgtgct cggcgtccgc 540
 gccagggctc cccacgccag ggtggcggct ctcggctacc cgtggatcac cccggccacc 600
 gccgaccgct cctgcttcct gaagctcccc ctcgcgccg gtgacgtgcc ctacctgcgg 660
 gccatccagg cacacctcaa cgacgcggtc cggcgggccg ccgaggagac cggagccacc 720
 tacgtggact tctccggggt gtccgacggc cagcagcct gcgaggcccc cggcaccgcg 780
 tggatcgaac cgctgctctt cgggcacagc ctcgttcccc tccaccccaa cgccctgggc 840
 gagcggcgca tggccgagca cacgatggac gtcctcggcc tggactga 888

<210> 53
 <211> 888
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces coelicolor*

<400> 53
 tcagtccagg ccgaggacgt ccatcgtgtg ctcggccatg cgcgcctcgc ccagggcggt 60
 ggggtggacg ggaacgaggc tgtgccgaa gagcagcggc tcgatccagc ggggtgccggg 120
 ggccctcgag gcgtcgtggc cgtcggacac cccggagaag tccacgtagg tggctccggt 180
 ctccctcggc gcccgccgga ccgcgtcgtt gaggtgtgcc tggatggccc gcaggtaggg 240
 cagctacccg gcggcgaggg ggagcttcag gaagcaggac gggtcggcgg tggccgggggt 300
 gatccacggg tagccgagag ccgccaccct ggcgtagggg gccctggcgc ggacgccgag 360
 cagcgccctc ttgagcgcgg ggtacgtgtt gccctcgatc tcgtcgtcga aggaggtgcc 420
 gtgcctgtcc ttgcaggggc tgcccttgcc gccgctgagg acaccgcgcg tgccgcaggc 480
 cgtgatggcg ttgatgaagg tctgtttgtc gttgccgccg atggtgagcg tgaccaggtc 540
 cgtgccgggt ccgagcgcgt ccaactgggg tcgcagcccc ggggtactggg cccgcgtgaa 600
 gtcggcggtc tcgcgggcgc cgcagggtgac gtccgtgagg cgggcgcccg tcgtgtccgc 660
 gatgacgtgg gggtagttgg ccgtcgagcg cagacagagc aggttggcgg ggtcgacggg 720

caggacgccc gagccggcgc tgtagctgtc gccgagggcg acgtagtcca gggtcggagt 780
ggcctgggcg ggcgcggcgt gggcgggtggc gtcgggtgagg ccgagggcga gcgtgccgac 840
ggcggcgact gtcgcggtca tgacacggcg aagggcaggc ttcggcat 888

<210> 54
<211> 717
<212> ДНК
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 54
atggattacg agaagtttct gttatttggg gattccatta ctgaatttgc ttttaatact 60
agggccattg aagatggcaa agatcagtat gctcttggag ccgcattagt caacgaatat 120
acgagaaaaa tggatattct tcaaagaggg ttcaaagggt acacttctag atgggcgttg 180
aaaataacttc ctgagatttt aaagcatgaa tccaatattg tcatggccac aatatttttg 240
gggtccaacg atgcatgttc agcaggtccc caaagtgtcc cctccccga atttatcgat 300
aatattcgtc aaatgggtatc tttgatgaag tcttaccata tccgtcctat tataatagga 360
ccggggctag tagatagaga gaagtgggaa aaagaaaaat ctgaagaaat agctctcgga 420
tacttccgta ccaacgagaa ctttgccatt tattccgatg ccttagcaaa actagccaat 480
gaggaaaaag ttcccttcgt ggctttgaat aaggcgtttc aacaggaagg tggatgatgt 540
tggcaacaac tgctaacaga tggactgcac ttttccggaa aagggtacaa aatttttcat 600
gacgaattat tgaagggtcat tgagacatc tcccccaat atcatcccaa aaacatgcag 660
tacaaactga aagattggag agatgtgcta gatgatggat ctaacataat gtcttga 717

<210> 55
<211> 1044
<212> ДНК
<213> *Ralstonia* sp.

<400> 55
atgaacctgc gtcaatggat gggcgccgcc acggctgccc ttgccttggg cttggccgcg 60
tgcgggggcg gtgggaccga ccagagcggc aatcccaatg tcgccaaggt gcagcgcag 120
gtggtgttgc gcgacagcct gagcgatato ggcacctaca ccccgctcgc gcaggcgggtg 180
ggcggcggca agttcaccac caaccgggc ccgatctggg ccgagaccgt ggccgcgcaa 240
ctgggcgtga cgctcacgcc ggcgggtgat ggctacgcca cctccgtgca gaattgcccc 300
aaggccggct gcttcgacta tgcgcagggc ggctcgcgcg tgaccgatcc gaacggcatc 360
ggccacaacg gcggcgcggg ggcgctgacc taccgggttc agcagcagct cgccaacttc 420
tacgcggcca gcaacaacac attcaacggc aataacgatg tcgtcttcgt gctggccggc 480
agcaacgaca ttttcttctg gaccactgcg gcggccacca gcggctccgg cgtgacgccc 540
gccattgcca cggcccagggt gcagcaggcc gcgacggacc tggtcggcta tgtcaaggac 600
atgatcgcca aggggtgcgac gcaggtctac gtgttcaacc tgcccagacag cagcctgacg 660
ccggacggcg tggcaagcgg cacgaccggc caggcgtcgc tgcacgcgct ggtgggcacg 720

ttcaaacacga cgctgcaaag cgggctggcc ggcacctcgg cgcgcacatcat cgacttcaac	780
gcacaactga ccgcggcgat ccagaatggc gcctcgttcg gcttcgccaa caccagcgcc	840
cgggctgctg acgccaccaa gatcaatgcc ctggtgccga gcgcggcgcg cagctcgctg	900
ttctgctcgg ccaacacgct ggtggcttcc ggtgcggacc agagctacct gttcgccgac	960
ggcgtgcacc cgaccacggc cgcccatcgc ctgatcgcca gcaacgtgct ggcgcgcctg	1020
ctggcgggata acgtcgcgca ctga	1044

<210> 56
 <211> 786
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 56 gtgatcgggt cgtacgtggc ggtgggggac agcttcaccg agggcgctcg cgaccccgcc	60
cccgacgggg cgttcgtcgg ctgggcccgc cggctcgccg tactgctcgc ggacccggcg	120
cccgaggggc acttcacgta caccgaacct gccgtgcgcg gcaggctcct cgaccagatc	180
gtggcggaac aggtcccgcg ggtcgtcgga ctcgcgcccg acctcgcttc gttcgcgggc	240
ggcggaacg acatcatccg gcccggcacc gatcccgcg aggtcgccga gcggttcgag	300
ctggcgggtg ccgcgctgac cgcccgggcc ggaaccgtcc tggtgaccac cgggttcgac	360
acccgggggg tgcctgcctt caagcacctg cgcggcaaga tcgccacgta caacggggac	420
gtccgcgcca tcgccgaccg ctacggctgc ccggtgctcg acctgtggtc gctgcggagc	480
gtccaggacc gcagggcgtg ggacgccgac cggctgcacc tgtcgccgga ggggcacacc	540
cgggtggcgc tgcgcgcggg gcaggccctg ggctcgcgcg tcccggccga ccctgaccag	600
ccctggccgc ccctgcgcgc gcgcggcacg ctcgacgtcc ggcgcgacga cgtgcactgg	660
gcgcgcgagt acctgggtgc gtggatcggg cgcgcgctgc ggggcgagtc gtcgggcgac	720
cacgtgacgg ccaaggggac gctgtcgccg gacgccatca agacgcggat cgcgcgggtg	780
gcctga	786

<210> 57
 <211> 783
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 57 atgcagacga accccgcgta caccagtctc gtcgccgctg gcgactcctt caccgagggc	60
atgtcggacc tgcctgccga cggctcctac cgtggctggg ccgacctcct cgccaccggg	120
atggcgggcc gctcccccg cttccggtac gccaacctgg cggctgcgcg gaagctgac	180
ggacagatcg tcgacgagca ggtggacgtg gccgcgcgca tgggagccga cgtgatcacg	240
ctggtcggcg ggctcaacga cagctgcgg cccaagtgcg acatggcccg ggtgcgggac	300
ctgctgaccc aggcctgga acggctcgcc ccgcaactgc agcagctggg gctgatgcgc	360
agtcccggtc gccagggtcc ggtgctggag cgcttcggc cccgcattga ggccctgttc	420

gccgtgacgc acgacctggc cgggaggcac ggcgccgtgg tcgtcgacct gtacggggcc 480
 cagtcgctgg ccgacctctg gatgtgggac gtggaccggc tgcacctgac cggcgagggc 540
 caccgccggg tcgaggaggc ggtgtggcag tcgtcggccc acgagcccgaggacccccag 600
 tggcacgcgc cgatcccggc gacgccggc cgggggtggg tgacgcgcag gaccgcggac 660
 gtccgggttcg cccggcagca cctgctgccc tggataggcc gcaggctgac cgggcgctcg 720
 tccggggacg gcctgccggc caagcgcccg gacctgctgc cctacgagga cccgcacgg 780
 tga 783

<210> 58
 <211> 1365
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces coelicolor*

<400> 58
 atgacccggg gtctgtacgg ggggtgcggg ggcggcccca ccaagcacgg tgccctgctc 60
 ggggcgacgc tcacctgat agtggcgatc tcggcgccca tatacgccgg agcgtccgcg 120
 gacgacggca gcagggacca cgcgctgcag gccggaggcc gtctccacag aggagacgcc 180
 gcccccgct ccaccgggtgc ctgggtgggc gcctgggcca ccgacccggc cgcggccgag 240
 cggggcacgg agacgacgg cctggcgggc cgctccgtgc gcaacgtcgt gcacacctcg 300
 gtccggcgga ccggcgcgcg gatcacctc tcgaacctgt acgggcagtc gccgctgacc 360
 gtcacacacg cctcgatcgc cctggccgcc gggcccgaca ccgcccgcg gatcgccgac 420
 accatcgccc ggctcacctt cggcggcagc gccgggtga tcatccggc gggcgccag 480
 gtgatgagcg acaccgccc cctcgccatc cctacgggg cgaacgtcct ggtcaccacg 540
 tactccccc tcccgctcgg gccggtgacc taccatccgc agggccggca gaccagctac 600
 ctggccgacg gcgaccgcac ggcggacgtc accgcgctcg cgtacaccac cccacgccc 660
 tactggcgct acctgaccgc cctcgacgtg ctgagccacg aggcggacgg cacggctcgtg 720
 gcgttcggcg actccatcac cgacggcgcc cgctcgaga gcgacgcca ccaccgctgg 780
 accgacgtcc tcgccgcacg cctgcacgag gcggcgggcg acggccggga cacgccccgc 840
 tacagcgctg tcaacgaggg catcagcgcc aaccggctcc tgaccagcag gccggggcg 900
 ccggccgaca acccgagcgg actgagccgg ttccagcggg acgtgctgga acgcaccaac 960
 gtcaaggccg tcgtcgtcgt cctcgcgctc aacgacgtcc tgaacagccc ggaactcgcc 1020
 gaccgcgacg ccattctgac cggcctgcgc accctcgctg accggggcga cggccgggga 1080
 ctgggggtcg tcggcgccac gatcacgcg ttccggggct acggcggtta caccgagggc 1140
 cgcgagacga tgcggcagga ggtcaacgag gagatccgct ccggccgggt cttcgacacg 1200
 gtctcgact tcgacaaggc cctgcgcgac ccgtacgacc cgcgcgggat gcgctccgac 1260
 tacgacagcg gcgaccacct gcacccggc gacaaggggt acgcgcgcat gggcgcggtc 1320
 atcgacctgg ccgcgctgaa gggcgcgggc ccgggtcaagg cgtag 1365

<210> 59
 <211> 1023
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces coelicolor*

<400> 59
 atgacgagca tgtcgagggc gaggggtggcg cggcggatcg cggccggcgc ggcgtacggc 60
 ggcggcggca tggcctggc gggagcggcg gcggtcggtc tgggtggggc cgaggtgcag 120
 ctggccagac gcaggggtggg ggtggggcacg ccgacccggg tgcggaacgc gcagggactg 180
 tacggcggca cctgcccac gcccggcgac ccgcccgtgc ggctgatgat gctggggcagc 240
 tccacggccg cggggcaggg cgtgcaccgg gccgggcaga cggcgggcgc gctgctggcg 300
 tccgggctcg cggcgggtggc ggagcggccg gtgcggctgg ggtcggtcgc ccagccgggg 360
 gcgtgctcgg acgacctgga ccggcagggtg gcgctgggtgc tcgccgagcc ggaccgggtg 420
 cccgacatct gcgtgatcat ggtcggcgcc aacgacgtca cccaccggat gccggcgacc 480
 cgctcgggtgc ggcacctgtc ctggcggtgta cggcggctgc gcacggccgg tgcggaggtg 540
 gtggtcggca cctgtccgga cctgggcacg atcgagcggg tgcggcagcc gctgcgctgg 600
 ctggcccgcc gggcctcacg gcagctcgcg gcggcacaga ccatcggcgc cgtcgagcag 660
 ggcggggcga cgggtgtcgt gggcgacctg ctgggtccgg agttcgcgca gaacccgcgg 720
 gagctcttcg gcccgcacaa ctaccacccc tccgccgagg ggtacgccac ggcgcgcatg 780
 gcggtaactgc cctcgggtgtg cgcgcgcgtc ggcctgtggc cggccgacga ggagcaccgg 840
 gacgcgctgc gccgcgaggg ctctcctgcc gtggcgcgcg cggcggcgga ggcggcgctc 900
 gagggcggta cggaggtcgc cgcgcgcatg cctacggggc ctcgggggcc ctggggcgctg 960
 ctgaagcgcc ggagacggcg tcgggtgtcg gaggcggaac cgtccagccc gtccggcggtt 1020
 tga 1023

<210> 60
 <211> 918
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces coelicolor*

<400> 60
 atgggtcgag ggacggacca gcggacgcgg tacggccgtc gccggggcgc tgtcgcgctc 60
 gccgccccta ccgcgcgcgt cctggggcgtg ggcgtggcgg gctgcgactc cgtggggcgc 120
 gactcaccgg ctcccttcgg cagcccgtcg aagcggacga ggacggcgcc cgcctgggac 180
 accagcccg cgtccgtcgc cgcctggggc gactccatca cgcgcggctt cgacgcctgt 240
 gcgggtgctg cggactgccc ggaggtgtcg tgggcgaccg gcagcagcgc gaaggctcgac 300
 tcgctggcgg tacggctgct ggggaaggcg gacgcggccg agcacagctg gaactacgcg 360
 gtcaccgggg cccggatggc ggacctgacc gctcagggtg cgcgggcggc gcagcgcgag 420
 ccggagctgg tggcgggtgat gcccgggcg aacgacgcgt gccggtccac gacctcggcg 480
 atgacgcggc tggcggactt cggggcgacg ttcgaggagg cgatggccac cctgcgcaag 540

aagctcccca aggcgcaggt gtacgtgtcg agcatcccgg acctcaagcg gctctgggtcc 600
 cagggccgca ccaaccgcgt gggcaagcag gtgtggaagc tcggcctgtg cccgtcgatg 660
 ctgggcgacg cggactccct ggactcggcg gcgaccctgc ggcgcaaac ggtgcgcgac 720
 cgggtggcgg actacaacga ggtgctgcgg gaggtctgcg cgaaggaccg gcggtgccgc 780
 agcgacgacg gcgcggtgca cgagttccgg ttcggcacgg accagttgag ccaactgggac 840
 tggttccacc cgagtgtgga cggccaggcc cggctggcgg agatcgcta ccgcgcggtc 900
 accgcgaaga atccctga 918

<210> 61
 <211> 1068
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces rimosus

<400> 61
 ttcatcaca c gatgtcaca acaccggcca tccgggtcat cctgatcgt gggaatgggt 60
 gacaagcctt cccgtgacga aagggtcctg ctacatcaga aatgacagaa atcctgctca 120
 gggaggttcc atgagactgt cccgacgcgc ggccacggcg tccgcgctcc tcctcaccoc 180
 ggcgtcgcg ctcttcggcg cgagcgcgc cgtgtccgcg ccgcgaatcc aggccaccga 240
 ctactgtggc ctccggcact cctactctc gggggtcggc gggggcagct acgacagcag 300
 cagtggctcc tgtaaagcga gcaccaagtc ctaccggcc ctgtgggccc cctcgcacac 360
 cggtagcggg tccaacttca ccgcctgltc ggggcggcgc acaggagacg tgctggccaa 420
 gcagctgacc ccggtcaact ccggcaccca cctgggtcagc attaccatcg gcggcaacga 480
 cgcgggcttc gccgacacca tgaccacctg caacctccag ggcgagagcg cgtgcctggc 540
 gcggatcgcc aaggcgcgcg cctacatcca gcagacgctg cccgccccagc tggaccagggt 600
 ctacgacgcc atcgacagcc gggcccccgc agcccaggtc gtcgtcctgg gctaccgcg 660
 cttctacaag ctgggcggca gctgcgcgct cgggtctctc gagaagtccc gcgcggccat 720
 caacgcgcgc gccgacgaca tcaacgcgct caccgccaa ggcgcgcgcg accacggctt 780
 cgccttcggg gacgtcaaca cgaccttcgc cgggcacgag ctgtgctccg gcgcgccctg 840
 gctgcacagc gtcacccttc ccgtggagaa ctctaccac cccacggcca acggacagtc 900
 caagggttac ctgccgctcc tgaactccgc cacctgatct cgcggctact ccgccctga 960
 cgaagtcccc cccccggcg gggcttcgcc gtaggtgcgc gtaccgccgt cgcgcgtcgc 1020
 gccggtggcc ccgcgtagc tgccgcgcgc cccggacgcg gtcggttc 1068

<210> 62
 <211> 1008
 <212> ДНК
 <213> Aeromonas hydrophila

<400> 62
 atgaaaaaat ggtttgtgtg ttatttggga ttggtcgcgc tgacagttca ggcagccgac 60
 agtcgccccg ccttttcccc gatcgtgatg ttcggcgaca gcctctccga taccggcaaa 120

```

atgtacagca agatgcgcgg ttacctcccc tccagcccg cctactatga gggccgtttc 180
tccaacggac ccgtctggct ggagcagctg accaaacagt tcccgggtct gaccatcgcc 240
aacgaagcgg aaggcgggtgc cactgccgtg gcttacaaca agatctcctg gaatcccaag 300
tatcagggtca tcaacaacct ggactacgag gtcacccagt tcttgacaga agacagcttc 360
aagccggacg atctgggtgat cctctgggtc ggtgccaatg actatctggc ctatggctgg 420
aacacggagc aggatgccaa gcgggttcgc gatgccatca gcgatgcggc caaccgcatg 480
gtactgaacg gtgccaagca gatactgctg ttcaacctgc cggatctggg ccagaacccg 540
tcagctcgca gtcagaaggt ggtcgaggcg gtcagccatg tctccgccta tcacaaccag 600
ctgctgctga acctggcacg ccagctggcc cccaccggca tggtaaagct gttcgagatc 660
gacaagcaat ttgccgagat gctgcgtgat ccgcagaact tcggcctgag cgacgtcgag 720
aaccctgtct acgacggcgg ctatgtgtgg aagccgtttg ccaccgcag cgtcagcacc 780
gaccgccagc tctccgcctt cagtccgcag gaacgcctcg ccacgcggg caaccgcgtg 840
ctggcacagg ccgttgccag tcctatggcc cgcgcagcgc ccagccccct caactgtgag 900
ggcaagatgt tctgggatca ggtacacccg accactgtcg tgcacgcagc cctgagcgag 960
cgcgcgcgca ccttcacgcg gaaccagtac gagttcctcg cccactga 1008

```

```

<210> 63
<211> 1011
<212> ДНК
<213> Aeromonas salmonicida

```

```

<400> 63
atgaaaaaat gggttggtttg ttatttgggg ttgatecgcg tgacagttca ggcagccgac 60
actcgccccg ccttctcccc gatcgtgatg ttccggcgaca gcctctccga taccggcaaa 120
atgtacagca agatgcgcgg ttacctcccc tccagcccg cctactatga gggccgtttc 180
tccaacggac ccgtctggct ggagcagctg accaaacagt tcccgggtct gaccatcgcc 240
aacgaagcgg aaggcgggtgc cactgccgtg gcttacaaca agatctcctg gaatcccaag 300
tatcagggtca tcaacaacct ggactacgag gtcacccagt tcttgacaga agacagcttc 360
aagccggacg atctgggtgat cctctgggtc ggtgccaatg actatctggc atatggctgg 420
aatacggagc aggatgccaa gcgagttcgc gatgccatca gcgatgcggc caaccgcatg 480
gtactgaacg gtgccaagca gatactgctg ttcaacctgc cggatctggg ccagaacccg 540
tcagcccgca gtcagaaggt ggtcgaggcg gtcagccatg tctccgccta tcacaacaag 600
ctgctgctga acctggcacg ccagctggcc cccaccggca tggtaaagct gttcgagatc 660
gacaagcaat ttgccgagat gctgcgtgat ccgcagaact tcggcctgag cgacgtcgag 720
aaccctgtct acgacggcgg ctatgtgtgg aagccgtttg ccaccgcag cgtcagcacc 780
gaccgccagc tctccgcctt cagtccgcag gaacgcctcg ccacgcggg caaccgcgtg 840
ctggcacagg ccgttgccag tcctatggcc cgcgcagcgc ccagccccct caactgtgag 900
ggcaagatgt tctgggatca ggtacacccg accactgtcg tgcacgcagc cctgagcgag 960

```

cgcgcgcgcca ccttcacgga gacccagtac gagttcctcg cccacggatg a 1011

<210> 64
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Терминаторная последовательность

<400> 64
 cgggacttac cgaagaagaac catcaatgat ggtttctttt ttgttcataa a 51

<210> 65
 <211> 59
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Терминаторная последовательность

<400> 65
 caagactaaa gaccgttcgc ccgttttttgc aataagcggg cgaatcttac ataaaaata 59

<210> 66
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Терминаторная последовательность

<400> 66
 acggccgtta gatgtgacag cccgttccaa aaggaagcgg gctgtcttcg tgtattattg 60
 t 61

<210> 67
 <211> 54
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Терминаторная последовательность

<400> 67
 tctttttaaag gaaaggctgg aatgcccggc attccagcca catgatcatc gttt 54

<210> 68
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Aeromonas salmonicida

<400> 68

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

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

020035

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp
 35 40 45
 Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu
 50 55 60
 Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asp
 65 70 75 80
 Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe
 85 90 95
 Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val
 100 105 110
 Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala
 115 120 125
 Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu
 130 135 140
 Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln
 145 150 155 160
 Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val
 165 170 175
 Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala
 180 185 190
 Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu
 195 200 205
 Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro
 210 215 220
 Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Arg Ser Ala Ser Pro
 225 230 235 240
 Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr
 245 250 255
 Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala Ala Thr Phe Ile Glu Thr
 260 265 270
 Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly
 275 280
 <210> 69
 <211> 102
 <212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Олигонуклеотидный праймер

<400> 69

ccccgctcga ggctttttctt ttggaagaaa atatagggaa aatgggtactt gttaaaaatt 60

cggaatatatt atacaatatc atatgtttca cattgaaagg gg 102

<210> 70

<211> 35

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Олигонуклеотидный праймер

<400> 70

tggaatctcg aggtttttatc ctttaccttg tctcc 35

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Консенсусная последовательность

<400> 71

Met Arg Arg Ser Arg Phe Leu Ala
1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Консенсусная последовательность

<400> 72

Ala Leu Ile Leu Leu Thr Leu Ala
1 5

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Консенсусная последовательность

<400> 73

Ala Arg Ala Ala Pro
1 5

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Консенсусная последовательность

<400> 74

Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
1 5 10

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Консенсусная последовательность

<400> 75

Gly Ala Gly Ser Tyr
1 5

<210> 76

<211> 4

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Консенсусная последовательность

<400> 76

Ser Ser Gly Asp
1

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Консенсусная последовательность

<400> 77

Arg Ser Thr Lys Ala Tyr Pro Ala Leu Trp Ala Ala Ala His Ala
1 5 10 15

<210> 78

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Консенсусная последовательность

<400> 78

Ser Ser Phe Ser Phe
1 5

<210> 79

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 79

Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Tyr Asp Val Leu Ala
 1 5 10

<210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 80

Leu Val Ser Ile Thr Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ala Asp
 1 5 10 15

<210> 81
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 81

Met Thr Thr Cys Val Leu
 1 5

<210> 82
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 82

Ser Asp Ser Ala Cys Leu
 1 5

<210> 83
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 83

Thr Leu Pro Ala
 1

020035

<210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 84

Arg Leu Asp Ser Val Tyr Ser Ala Ile
 1 5

<210> 85
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 85

Thr Arg Ala Pro
 1

<210> 86
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 86

Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Ile Tyr
 1 5 10

<210> 87
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 87

Leu Gly Leu Ser
 1

<210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 88

Thr Lys Arg Ala Ala Ile Asn Asp Ala Ala Asp

1	5	10
---	---	----

<210> 89
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 89
 Leu Asn Ser Val Ile Ala Lys Arg Ala Ala Asp His
 1 5 10

<210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 90
 Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val
 1 5

<210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 91
 Gly His Glu Leu Cys Ser Ala
 1 5

<210> 92
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 92
 Pro Trp Leu His Ser Leu Thr Leu Pro
 1 5

<210> 93
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 93

Ser Tyr His Pro Thr Ala
1 5

<210> 94
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Консенсусная последовательность

<400> 94

Gly His Ala Ala Gly Tyr Leu Pro Val Leu Asn Ser Ile
1 5 10

<210> 95
<211> 232
<212> PRT
<213> Aspergillus aculeatus

<400> 95

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

Gly Ser Gly Thr Asn Gly Trp Gly Glu Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ser
20 25 30

Ala Thr Val Val Asn Asp Ala Val Ala Gly Arg Ser Ala Arg Ser Tyr
35 40 45

Thr Arg Glu Gly Arg Phe Glu Asn Ile Ala Asp Val Val Thr Ala Gly
50 55 60

Asp Tyr Val Ile Val Glu Phe Gly His Asn Asp Gly Gly Ser Leu Ser
65 70 75 80

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

Tyr Ser Val Tyr Asp Gly Val Asn Glu Thr Ile Leu Thr Phe Pro Ala
100 105 110

Tyr Leu Glu Asn Ala Ala Lys Leu Phe Thr Ala Lys Gly Ala Lys Val
115 120 125

Ile Leu Ser Ser Gln Thr Pro Asn Asn Pro Trp Glu Thr Gly Thr Phe
130 135 140

Val Asn Ser Pro Thr Arg Phe Val Glu Tyr Ala Glu Leu Ala Ala Glu
145 150 155 160

Val Ala Gly Val Glu Tyr Val Asp His Trp Ser Tyr Val Asp Ser Ile
165 170 175

020035

Tyr Glu Thr Leu Gly Asn Ala Thr Val Asn Ser Tyr Phe Pro Ile Asp
 180 185 190
 His Thr His Thr Ser Pro Ala Gly Ala Glu Val Val Ala Glu Ala Phe
 195 200 205
 Leu Lys Ala Val Val Cys Thr Gly Thr Ser Leu Lys Ser Val Leu Thr
 210 215 220
 Thr Thr Ser Phe Glu Gly Thr Cys
 225 230
 <210> 96
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 96
 Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg
 1 5 10 15
 Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln
 20 25 30
 Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Asp Thr Ser Gln
 35 40 45
 Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg
 50 55 60
 Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln
 65 70 75 80
 Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys
 85 90 95
 Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn
 100 105 110
 Tyr Gly Arg Arg Tyr Asn Glu Ala Phe Ser Ala Ile Tyr Pro Lys Leu
 115 120 125
 Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val
 130 135 140
 Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg
 145 150 155 160
 Asp Ala Gln Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met Ala Lys Gln Leu Gln Pro
 165 170 175

Leu Val Asn His Asp Ser Leu Glu
180

<210> 97
<211> 308
<212> PRT
<213> Aeromonas hydrophila

<400> 97

Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser
1 5 10 15

Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg
20 25 30

Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Asn Glu Phe Pro
35 40 45

Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu Gly Gly Pro Thr Ala Val Ala
50 55 60

Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu
65 70 75 80

Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp
85 90 95

Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly
100 105 110

Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp
115 120 125

Ala Ala Asn Arg Met Val Leu Asn Gly Ala Lys Glu Ile Leu Leu Phe
130 135 140

Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val
145 150 155 160

Val Glu Ala Ala Ser His Val Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu
165 170 175

Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu
180 185 190

Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly
195 200 205

Leu Ser Asp Gln Arg Asn Ala Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Val Trp Lys
210 215 220

020035

```

Pro Phe Ala Ser Arg Ser Ala Ser Thr Asp Ser Gln Leu Ser Ala Phe
225                      230                      235                      240

Asn Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln
                245                      250                      255

Ala Val Ala Ser Pro Met Ala Ala Arg Ser Ala Ser Thr Leu Asn Cys
                260                      265                      270

Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His
                275                      280                      285

Ala Ala Leu Ser Glu Pro Ala Ala Thr Phe Ile Glu Ser Gln Tyr Glu
290                      295                      300

Phe Leu Ala His
305

<210> 98
<211> 167
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 98

Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg Met Ser Ala
1                      5                      10                      15

Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln Ser Lys Thr
                20                      25                      30

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

Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg Trp Val Leu
50                      55                      60

Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln Pro Gln Gln
65                      70                      75                      80

Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys Ala Ala Asn
                85                      90                      95

Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn Tyr Gly Arg
                100                      105                      110

Arg Tyr Asn Glu Ala Phe Ser Ala Ile Tyr Pro Lys Leu Ala Lys Glu
                115                      120                      125

Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val Tyr Leu Lys
130                      135                      140

Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg Asp Ala Gln

```

```

145                      150                      155                      160

Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met
      165

<210> 99
<211> 295
<212> PRT
<213> Aeromonas hydrophila

<400> 99

Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser
1              5              10              15

Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg
      20              25              30

Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Asn Glu Phe Pro
      35              40              45

Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu Gly Gly Pro Thr Ala Val Ala
      50              55              60

Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu
      65              70              75              80

Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp
      85              90              95

Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly
      100             105             110

Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp
      115             120             125

Ala Ala Asn Arg Met Val Leu Asn Gly Ala Lys Glu Ile Leu Leu Phe
      130             135             140

Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val
      145             150             155             160

Val Glu Ala Ala Ser His Val Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu
      165             170             175

Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu
      180             185             190

Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly
      195             200             205

Leu Ser Asp Gln Arg Asn Ala Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Val Trp Lys
      210             215             220

```

020035

Pro Phe Ala Ser Arg Ser Ala Ser Thr Asp Ser Gln Leu Ser Ala Phe
225 230 235 240

Asn Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln
245 250 255

Ala Val Ala Ser Pro Met Ala Ala Arg Ser Ala Ser Thr Leu Asn Cys
260 265 270

Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His
275 280 285

Ala Ala Leu Ser Glu Pro Ala
290 295

<210> 100
<211> 335
<212> PRT
<213> Aeromonas hydrophila

<400> 100

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

020035

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 101

<211> 318

<212> PRT

<213> Aeromonas salmonicida

<400> 101

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

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

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp
 35 40 45

Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu
 50 55 60

020035

Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn
 65 70 75 80
 Pro Lys Tyr Gln Val Tyr Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe
 85 90 95
 Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val
 100 105 110
 Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala
 115 120 125
 Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu
 130 135 140
 Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln
 145 150 155 160
 Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val
 165 170 175
 Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala
 180 185 190
 Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu
 195 200 205
 Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro
 210 215 220
 Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala
 245 250 255
 Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala
 260 265 270
 Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp
 275 280 285
 Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala
 290 295 300
 Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly
 305 310 315
 <210> 102
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Искусственная

020035

```

<220>
<223>  Консенсусная последовательность

<400>  102

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

Thr  Gly  Lys  Met  Tyr  Ser  Lys  Met  Arg  Gly  Tyr  Leu  Pro  Ser  Ser  Pro
                20              25              30

Pro  Tyr  Tyr  Glu  Gly  Arg  Phe  Ser  Asn  Gly  Pro  Val  Trp  Leu  Glu  Gln
          35              40              45

Leu  Thr
    50

<210>  103
<211>  13
<212>  PRT
<213>  Искусственная

<220>
<223>  Консенсусная последовательность

<400>  103

Phe  Pro  Gly  Leu  Thr  Ile  Ala  Asn  Glu  Ala  Glu  Gly  Gly
1              5              10

<210>  104
<211>  79
<212>  PRT
<213>  Искусственная

<220>
<223>  Консенсусная последовательность

<400>  104

Thr  Ala  Val  Ala  Tyr  Asn  Lys  Ile  Ser  Trp  Asn  Pro  Lys  Tyr  Gln  Val
1              5              10              15

Ile  Asn  Asn  Leu  Asp  Tyr  Glu  Val  Thr  Gln  Phe  Leu  Gln  Lys  Asp  Ser
          20              25              30

Phe  Lys  Pro  Asp  Asp  Leu  Val  Ile  Leu  Trp  Val  Gly  Ala  Asn  Asp  Tyr
          35              40              45

Leu  Ala  Tyr  Gly  Trp  Asn  Thr  Glu  Gln  Asp  Ala  Lys  Arg  Val  Arg  Asp
          50              55              60

Ala  Ile  Ser  Asp  Ala  Ala  Asn  Arg  Met  Val  Leu  Asn  Gly  Ala  Lys
65              70              75

<210>  105
<211>  23

```

<212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 105

Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Lys Val Val Glu Ala
 20

<210> 106
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 106

Ser His Val Ser Ala Tyr His Asn
 1 5

<210> 107
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 107

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

Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln
 20 25 30

Asn Phe Gly Leu Ser Asp
 35

<210> 108
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 108

Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala
 1 5

<210> 109
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 109

Gln Leu Ser Ala Phe
 1 5

<210> 110
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 110

Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala
 1 5 10 15

Val Ala Ser Pro Met Ala
 20

<210> 111
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 111

Arg Ser Ala Ser
 1

<210> 112
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Консенсусная последовательность

<400> 112

Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr
 1 5 10 15

Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu
 20

<210> 113
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>

```

<223> Консенсусная последовательность

<400> 113

Ala Ala Thr Phe Ile
1 5

<210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Консенсусная последовательность

<400> 114

Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His
1 5

<210> 115
<211> 1225
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> XhoI инсерт, содержащий ген прекурсор LAT-KLM3 '

<220>
<221> CDS
<222> (101)..(1144)

<400> 115
gcttttcttt tggaagaaaa tatagggaaa atggtacttg ttaaaaattc ggaatattta 60

tacaatatca tatgtttcac attgaaaggg gagggagaatc atg aaa caa caa aaa 115
Met Lys Gln Gln Lys
1 5

cgg ctt tac gcc cga ttg ctg acg ctg tta ttt gcg ctc atc ttc ttg 163
Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ala Leu Ile Phe Leu
10 15 20

ctg cct cat tct gca gct tca gca gca gat aca aga ccg gcg ttt agc 211
Leu Pro His Ser Ala Ala Ser Ala Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser
25 30 35

cgg atc gtc atg ttt gga gat agc ctg agc gat acg ggc aaa atg tat 259
Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr
40 45 50

agc aaa atg aga ggc tat ctt ccg tca agc ccg ccg tat tat gaa ggc 307
Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly
55 60 65

cgc ttt agc aat gga ccg gtc tgg ctg gaa caa ctg acg aaa caa ttt 355
Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe
70 75 80 85

ccg gga ctg acg atc gct aat gaa gca gaa gga gga gca aca gcg gtc 403
Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val
90 95 100

gcc tat aac aaa atc agc tgg gac ccg aaa tat cag gtc atc aac aac 451
Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asp Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn

```

020035

105	110	115	
ctg gac tat gaa gtc aca cag ttt ctt cag aaa gac agc ttt aaa ccg Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro 120 125 130			499
gat gat ctg gtc atc ctt tgg gtc ggc gcc aat gat tat ctg gcg tat Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr 135 140 145			547
ggc tgg aac aca gaa caa gat gcc aaa aga gtc aga gat gcc atc agc Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser 150 155 160 165			595
gat gcc gct aat aga atg gtc ctg aac ggc gcc aaa caa atc ctg ctg Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu 170 175 180			643
ttt aac ctg ccg gat ctg gga caa aat ccg agc gcc aga agc caa aaa Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys 185 190 195			691
gtc gtc gaa gca gtc agc cat gtc agc gcc tat cat aac aaa ctg ctg Val Val Glu Ala Val Ser His Val Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu 200 205 210			739
ctg aac ctg gca aga caa ttg gca ccg acg gga atg gtt aaa ttg ttt Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe 215 220 225			787
gaa att gac aaa cag ttt gcc gaa atg ctg aga gat ccg caa aat ttt Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe 230 235 240 245			835
ggc ctg agc gat gtc gaa aac ccg tgc tat gat ggc gga tat gtc tgg Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp 250 255 260			883
aaa ccg ttt gcc aca aga agc gtc agc acg gat aga caa ctg tca gcg Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala 265 270 275			931
ttt agc ccg caa gaa aga ctg gca atc gcc gga aat ccg ctt ttg gca Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala 280 285 290			979
caa gca gtt gct tca ccg atg gca aga aga tca gca agc ccg ctg aat Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn 295 300 305			1027
tgc gaa ggc aaa atg ttt tgg gat cag gtc cat ccg aca aca gtt gtc Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val 310 315 320 325			1075
cat gct gcc ctt tca gaa aga gcg gcg acg ttt atc gaa aca cag tat His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr 330 335 340			1123
gaa ttt ctg gcc cat ggc tga gttaacagag gacggatttc ctgaaggaaa Glu Phe Leu Ala His Gly 345			1174
tccgtttttt tattttaagc ttggagacaa ggtaaaggat aaaacctcga g			1225
<210> 116			
<211> 347			
<212> PRT			

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 116

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ser Ala Ala Asp Thr
 20 25 30

Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp
 35 40 45

Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Pro
 50 55 60

Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu Gly
 85 90 95

Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asp Pro Lys Tyr
 100 105 110

Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln Lys
 115 120 125

Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala Asn
 130 135 140

Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg Val
 145 150 155 160

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

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

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

His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr Gly
 210 215 220

Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg
 225 230 235 240

Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro Cys Tyr Asp

020035

```

                245                250                255

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

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

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

Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His
305                310                315                320

Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala Ala Thr Phe
                325                330                335

Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly
                340                345

<210> 117
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Последовательность мотива

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (4)..(4)
<223> Хаа может быть одним и несколькими из следующих аминокислотных
остатков may Leu,
        Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, His, Gln, Thr, Asn, Met или Ser.

<400> 117

Gly Asp Ser Хаа
1

<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Последовательность мотива

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (2)..(2)
<223> может быть Gly

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (5)..(5)
<223> может быть Ala или Leu

```

<400> 118

Gly Ala Asn Asp Tyr
1 5

<210> 119

<211> 56

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Терминаторная последовательность

<400> 119

gctgacaaat aaaaagaagc aggtatggag gaacctgctt ctttttacta ttattg

56

```

1 ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LFSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQKQFPGLT
61 IANAEGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFPKDDLVIL WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLFNLPLDGO NPSARSQKV VAVSHVSAYH
181 NKLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPFATRSV
241 STDRLSAFS PQERLAIAGN PLLAQAVASP MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL
301 SERAATFIET QYEFLAHG

```

Фиг. 1 (SEQ ID No. 16)

```

1 MKKWFCVLLG LVALTVQAAD SRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51 SSPPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNP
101 YQVINNLDYE VTQFLQKDSF KPDDLVILWV GANDYLAYGW NTEQDAKVR
151 DAISDAANRM VLNGAKQILL FNLPDLGQNP SRSQKVVEA VSHVSAYHNQ
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPM RRSASPLNCE
301 GKMFWQVHP TTVVHAALSE RAATFIANQY EFLAH*

```

Фиг. 2 (SEQ ID No. 1)

```

1 ivafGD5ltd geayygsdsg ggwgagladr ltallrlrar prgvdvfnrg isGrtsdGrl
61 ivDalvallf laqslglpnL pPYLsgdflr GANFAsagAt Ilptsgpfli QvqFkdfksq
121 vlelrqalg1 lqellrllpv ldakspdlvt imiGtN5lit saffgpkste sdznvsyepf
181 kdnrlqlikr Lrsnngarii vlitlvilnl gplGClPikl alalassknv dasgclerln
241 eavadvneal relaiskled qlrkdgldpv kgadvpyvDl ysifqldldgi qnpsayvyGF
301 ettkaCCGyG gryNynrvCG naglcnvtaK aCnpssylls flfwDgf5ps ekGykavAea
361 l

```

Фиг. 3 (SEQ ID No.2)

```

1 mkkwfcvllg lvaltvqaad srpafsrivm fgdslsdgtk myskmrlylp ssppyyegrf
61 sngpvwleql tnefpgltia neaeggptav aynkiswnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakeill fnlpldgqnp
181 sarsqkvvea ashvsayhnq lllnlarqla ptgmvkifei dkqfaemlr pgnfglsdqr
241 nacyggsyvw kpfasrsast dsqlsafnpq erlaiagnpl laqavaspma arsastlnce
301 gkmfwdqvhv ttvvhhaalse paatfiesqy eflah

```

Фиг. 4 (SEQ ID No. 3)

```

1 mkkwfcvllg lialtvqaad trpafsrivm fgdslsdgtk myskmrlylp ssppyyegrf
61 sngpvwleql tkqfpgltia neaeggatav aynkiswnpk ygvynnlde vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakqill fnlpldgqnp
181 sarsqkvvea vshvsayhnk lllnlarqla ptgmvkifei dkqfaemlr pgnfglsdve
241 npcydgggyvw kpfatrsvst drqlsafspq erlaiagnpl laqavaspma rrsasplnce
301 gkmfwdqvhv ttvvhhaalse raatfietqy eflahg

```

Фиг. 5 (SEQ ID No. 4)

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadtt garltdvtcg aaqtadfta qypgvapqld algtgtdlvt
121 ltiggnndst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgywitpat adpscflklp laagdvpplr aiqahlnlav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgtw wiepllfghs lvpvhpnaig errmaehtmd vlglD

```

Фиг. 6 (SEQ ID No. 5)

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadtt garltdvtcg aaqtadfta qypgvapqld algtgtdlvt
121 ltiggnndst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgywitpat adpscflklp laagdvpplr aiqahlnlav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgtw wiepllfghs lvpvhpnaig errmaehtmd vlglD

```

Фиг. 7 (SEQ ID No. 6)

```

1 mdyekfllfg dsitefafnt rpiedgkdqy algaalvney trkmdilqrg fkgysrwal
61 kilpeilkhe snivmatifl gandacsagp qsvplpefid nirgmvsmlk syhirpiig
121 pglvdrekwe kekseeialg yfrtnenfai ysdalaklan eekvpfvaln kafqgegga
181 wqqlitdglh fsgkgykifh dellkvietf ypqyhpknmq yklkdwravl ddgsnims

```

Фиг. 8 (SEQ ID No. 7)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
MNLQWGMGAA TAALALGLAA CGGGGTDQSG NPNVAKVQRM VVFGDSLSDI GTYTPVAQAV

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
GGGKFTTNPG PIWAETVAAQ LGVTLPVAVM GYATSVQNC P KAGCFDYAQG GSRVTDPNGI

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
GHNGGAGALT YPVQQQLANF YAASNNTFNG NNDVVFVLAG SNDIFFWTTA AATSGSGVTP

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
AIATAQVQQA ATDLVGYVKD MIAKGATQVY VFNLPDSSLT PDGVASGTTG QALLHALVGT

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
FNTTLQSGLA GTSARIIDFN AQLTAAIQNG ASFGFANTSA RACDATKINA LVPSAGSSSL

      310     320     330     340
      |      |      |      |
FCSANTLVAS GADQSYLFAD GVHPTTAGHR LIASNVLARL LADNVAH

```

Фиг. 9 (SEQ ID No. 8)

```

1 migsyvavgd sftegvgdpg pdgafvgwad rlavlladrr pegdftytnl avrgrlldqi
61 vaeqvprvvg lapdlvsfaa ggndiirpgt dpdevaerfe lavaaltaaa gtlvtttgfd
121 trgvpvklhl rgkiatyngh vraiadrygc pvldlwslls vqdrrawdada rhlhspeght
181 rvalraggal glrvpadpdq pwpplpprgt ldvrrddvhw areylvpwig rrlrgessgd
241 hvtakgtisp daiktriaav a

```

Фиг. 10 (SEQ ID No. 9)

```

1 mqtinpaytsl vavgdsftg msdillpdgsy rgwadllatr maarspgfry anlavrgkli
61 gqivdeqvvd aaamgadvit lvgglnhdlr pkcdmarvrd lltqaverla phceqlvlmr
121 spgrqgpvle rfrprmealf aviddlagr h gavvvdlyga qsladprmwv vdrhlhtaeg
181 hrrvaeavwq slghepedpe whapipatpp pgwvtrrtad vrfarqhlip wigrrltgrs
241 sgdgllpakrp dllypedpar

```

Фиг. 11 (SEQ ID No. 10)

```

1 mtrgrdggag apptkhrall aaivtlivai saaiyagasa ddgsrdhalq aggrlprgda
61 apastgawvg awatapaaae pytettglag rsvrnvvhts vggtagarilt snlyggsplt
121 vthasialaa gpdtaaaiaid tmrrltfggs arviipaggq vmsdtaar lai pyganvlvtt
181 yspipsgpvt yhpqarqtsy ladgdrtadv tavayttptp ywryltaldv lsheadgtvv
241 afgdsitdga rsqsdanhrw tdvlaarlhe aagdgdrtdpr ysvvnegisg nrltsrpgy
301 padnpsqlsr fgrdvlerntn kvavvvvlgv ndvlnspela drdailltgrl tlvdrharg
361 lrvvgatitp fggygygytea retmrqevne eirsgrvfdt vvdldkald pydprmrds
421 ydsgdhlhpg dkgymarmgav idlaalkgaa pvka

```

Фиг. 12 (SEQ ID No. 11)

```

1 mtsmsrarva rriaagaayg gggiglagaa avglvvaevq larrvvgvgt ptrvpnaqgl
61 yggtlptagd pplrlmmlgd staaggvhr agqtpgalla sglaavaerp vrlgsvaqpg
121 acsddldrvq alvlaepdrv pdicvimvga ndvthrmptat rsvrhlssav rrlrtagaev
181 vvgtcpdlgt iervrqplr w larrasrqla aaqtigaveq ggtrvslgdl lgpefaqnpr
241 elfgpdnyhp saegyataam avlpsvcaal glwpadeehp dalrregflp varaaaaaas
301 eagtevaam ptgprgwal lkrtrrrrrvs eaepsspsgv

```

Фиг. 13 (SEQ ID No. 12)

```

1 mgrgtldqrtr ygrrrarval aaltaavlgv gvagcdsvgg dspapsgsps krtrtapawd
61 tspasvaavg dsitrgfdac avlsdcpevs watgssakvd slavrllgka daaehswnya
121 vtgarmadlt aqvtraaqre pelvavmaga ndacrsttsa mtpvadfrac feeamatlrk
181 klpkavqyvs sipdlkrlws qgrtnplgkq vwkglgcpm lgdadsldsa atlrntvrd
241 rvadynevlr evcakdrxr sddgavhefr fgtdqlshwd wfhpssvdgqa rlaeiayrav
301 taknp

```

Фиг. 14 (SEQ ID No. 13)

1 mrlsraraata sallltipala lfgasaavsa priqatdyva lgdsyssvgv agsydsssgs
 61 ckrstksypa lwaashtgtr fnftacsgar tgdvlakqlt pvnsgtdlvs itiggnadagf
 121 adtmittcnlq gesaclaria karayiqgtl paqldqvyda idsrapaaqv vvlgyprfyk
 181 lggscavgls eksraaanaa addinavtak raadhgfafg dvnttfaghe lcsgapwlhs
 241 vtlpvensyh ptangqsky lpvlnsat

Фиг. 15 (SEQ ID No. 14)

1 MKKWFVCLLG LIALTVQAAD TRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
 51 SSPPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNP
 101 YQVINNDYE VTQFLQKDSF KPDDLVLVW GANDYLAYGW NTEQDAKVR
 151 DAISDAANRM VLNGAKQILL FNLPLDQNP SARSQVVEA VSHVSAYHNK
 201 LLLNLARQLA PTGMVKLF EI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
 251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPM RRSASPLNCE
 301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAATFIETQY EFLAHG*

Фиг. 16 (SEQ ID No. 15)

1 migsyvavgd sfttegvdpd pdgafvgwad rlavlladrr pegdftytnl avrgrlldqi
 61 vaeqvprvvg lapdlvsfaa ggndiirpdt dpdevaerfe lavaaltaaa gtvltvtgfd
 121 trgvvpvlkhl rgkiatyngv vraiadrygc pvlldwslrs vqdrrawdad rhlspgght
 181 rvalraggal glrvpadpdt pwpplpprgt ldvrddvhw areylvpwig rrlrgessgd
 241 hvtakgtlsp daiktriaav a

Фиг. 17 (SEQ ID No. 19)

1 MFKFKKNFLV GLSAAALMSIS LFSATASAAS ADSRPAFSRI VMFGDSLSDT
 51 GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTKQFPGLT IANEAEGGAT
 101 AVAYNKISWN PKYQVINND YEVTQFLQKD SFPKDDLVLW WVGANDYLAY
 151 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLFNLPLDQ NP SARSQKV
 201 EAVSHVSAYH NQLLLNLARQ LAPTGMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD
 251 VENPCYDGGY VWKPFATRSV STDRQLSAFS PQERLAIAGN PLLAQAVASP
 301 MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL SERAATFIAN QYEFLAH**

Фиг. 18 (SEQ ID No. 25)

MRLTRSLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
 NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSIITIGGNDAGFADAMTT
 CVTSSDSTCLNRLATATNYINTTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNEWYC
 LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFNGNDWLHSLTLPVWE
 SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

Фиг. 19 (SEQ ID No. 26)

ZP 00058717

1 mlphpagerg evgaiffallv gtpqdrirl echetrplrg rcgcgerrvp pltlpgdgvl
 61 cttsttrdae tvwrkhlqpr pdggfrphlg vgccllagqgs pgvlwcgreg crfevcrrdt
 121 pglstrtngd ssppfragws lppkcgeisg sarktpavpr ysllrtdrpd gprgrfvqsg
 181 praatrrrlf lgipalvlvt altlvlavpt gretlwrwmc eatqdwclgv pvdsggqpa
 241 dgeffllspv qaatwgnyya lgdsyssgdg ardyypgtav kggcwsana ypelvaeayd
 301 faghlsflac sggrgyamld aidevgsgld wnsphstlvt igiggnldgf stvlktcmvr
 361 vplldskact dgedairkrm akfettfeel isevrtrapd arilvvgypr ifpeeptgay
 421 yltasngwrw lnetiqefng qlaeavavhd eeiaasggvg svefvdvyha ldgheigsde
 481 pwvngvqlrd latgvtvdrs tfhpnaaghr avgervieqi etgpgprplya tfavvagatv
 541 dtlagevg

Фиг. 20 (SEQ ID No. 27)

1 mgsgpraatr rrlflgipal vlvtaltlvt avptgretlw xmwceatqdw clgvpvdsrg
 61 qpaedgefll lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gtavkkgcwr sanaypelva
 121 eaydfaghl flacsggrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlqfstvlkt
 181 cmvrvpllds kactdgedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilvv gyprifpeep
 241 tgayytltas nqrwlnetiq efnqqlaeav avhdeeaas ggvgsvfvd vyhaldghei
 301 gsdepwvngv qlrdlatgtv vdrstfhpna aghravgerv ieqietgpgpr plyatfavva
 361 gatvdtlagev

Фиг. 21 (SEQ ID No. 28)

1 mrttviaasa llllagcadg areetagapp gessggiree gaeastsitd vyialgdsya
 61 amggrdqplr gepfclrssg nypellhaev tdltcqgavt gdllprrtlg ertlpaqvda
 121 ltetdtlvtl siggnldgfg evagciseri agenaddcnd llgetigeql dqlppqldrv
 181 heairdragd aqvvttygylp lvsagdcpep gdvseadrw aveltgqine tvreaaerhd
 241 alflvpddad ehtscappqg rwadiqqgt dayplhptsa gheamaaavr dalglepvqp

Фиг. 22 (SEQ ID No. 29)

ZP 00094165

```

1 mgqvklfarr capvllalag lapaatvare aplaegaryv algssfaagp.gvgpnagpssp
61 ercgrgtltny phllaealkl dlvdacsga tthhvlgpwn evppqidsvn gdtrlvltlti
121 ggndvsfvgn ifaaacekma spdprcgkwr eiteewqad eermrsivrq iharaplarv
181 vvvdyitvlp psgtcaamai spdrlaqsr aakrlarita rvareegasl lkfshisrrh
241 hpcsakpwsn glsapaddgi pvhpnrlgha eaaaaavklv klnk //
```

Фиг. 23 (SEQ ID No. 30)

NP 625998.

```

1 mrrfrlvqfl sslvlaagaa ltgaataqaa qpaaadgyva lgdsyssgvg agsyisssgd
61 ckrstkahpy lwaaahspst fdftacsgar tgdvlsqqlg plssgtglvs isiggnadagf
121 adtmttcvlq sessclsria taeayvdstl pgkldgvysa isdkapnahv vvigypfryk
181 lgttciglse tkrtainkas dhltvlaqr aaahgftfgd vrttftghel csgspwlhsv
241 nwlmgiesyh ptaagqsggy lplvngaa
```

//

Фиг. 24 (SEQ ID No. 31)

NP 827753.

```

1 mrrsritayv tslllavgca ltgaataqas paaaatgyva lgdsyssgvg agsyisssgd
61 ckrsskaypy lwqaahspss fsfmacsgar tgdvlanqlg tlnsstglvs ltiggnadagf
121 sdvmttcvlq sdsacslrin takayvdstl pgqldsvyta istkapsahv avlgyprfyk
181 lggsclagls etkrsainda adylnsaiak raadhgftfg dvkstftghe icsstwlhs
241 ldllnigqsy hptaagqsgg ylpvmnsva
```

//

Фиг. 25 (SEQ ID No. 32)

```

MRLTRSLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSIITIGGNDAGFADAMTT
CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNPWYC
LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE
SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST
```

Фиг. 26 (SEQ ID No. 33)

```

ADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYEGFRSNGPVWLEQLTNEFPGLTIANEAEGGPT
AVAYNKISWNPKYQVINNLDEYVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYGWNTQDAKRVRDAISDAAN
RMVLNGAKEILLFNLPDLGQNPASRSQKVVEAASHVSAYHNQLLLNLARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEML
RDPQNFGLSDQRNACYGGSYVWKPFAFSRSASTDSQLSAFNPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARSASTLN
CE
GKMFWDQVHPTTVVHAALSEPAAFTFIESQYEFLAH
```

Фиг. 27 (SEQ ID No. 34)

```

1 ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTKQFPGLT
61 IANEAEGGAT AVAYNKISWN PKYQVINNLDEYVTQFLQKD SFKPDDLVLW VVGANDYLAY
121 GWNTQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLFNLPDLGQ NPSARSQKV EAVSHVSAYH
181 NKLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPFATRSV
241 STDRQLSAFS QERLAIAGN PLLAQAVASP MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL
301 SERAATFIET QYEFLAHG
```

Фиг. 28 (SEQ ID No. 35)

ACAGGCCGATGCACGGAACCGTACCTTTCCGCAGTGAAGCGCTCTCCCCCATCGTTCGC
 CGGGACTTCATCCGCGATTTTGGCATGAACACTTCCTTCAACGCGCGTAGCTTGCTACAA
 GTGCGGCAGCAGACCCGCTCGTTGGAGGCTCAGTGAGATTGACCCGATCCCTGTCGGCCG
 CATCCGTCATCGTCTTCGCCCTGCTGCTCGCGCTGCTGGGCATCAGCCCGGCCAGGCAG
 CCGGCCCGCCCTATGTGGCCCTGGGGGATTCTATTCTCGGGCAACGCGCGCGGAAGTT
 ACATCGATTGAGCGGTGACTGTCACCGCAGCAACAACGCGTACCCCGCCCGCTGGGCGG
 CGGCCAACGCACCGTCTCTCTTACCTTCGCGCGCTGCTCGGGAGCGGTGACCACGGATG
 TGATCAACAATCAGCTGGGCGCCCTCAACGCGTCCACCGGCTGGTGAGCATCACCATCG
 GCGGCAATGACGCGGGCTTCGCGGACGCGATGACCACCTGCGTCACCAGCTCGGACAGCA
 CCTGCCTCAACCGGTGGCCACCGCCACCACTACATCAACACCACCCTGCTCGCCCGGC
 TCGACGCGGTCTACAGCCAGATCAAGGCCCCGTGCCCCAACGCCCCGCTGGTTCCTCG
 GCTACCCGCGCATGTACCTGGCTCGAACCCCTGGTACTGCCTGGGCTGAGCAACACCA
 AGCGCGCGCCATCAACACCACCGCCGACACCTCAACTCGGTGATCTCTCCCGGGCCA
 CCGCCACGGATTCCGATTGCGCGATGTCCGCCCGACCTTCAACAACCACGAACTGTCT
 TCGGCAACGACTGGCTGCACTCACTACCCCTGCCGCTGTGGGAGTCGTACCACCCACCA
 GCACGGGCCATCAGAGCGGCTATCTGCCGCTCTCAACGCCAACAGCTCGACCTGATCAA
 CGCACGGCCGTGCCCGCCCCGCGCTCAGCTCGGCGCGGGCGCCGAGCGCGTTGATCA
 GCCCACAGTGCCGGTGACGGTCCCACCGTCACGGTCGAGGGTGACGTACGGTGGCGCC
 GCTCCAGAAGTGGAACGTCAGCAGGACCGTGAGCCGTCCCTGACCTCGTGAAGAATC
 CGGGGTCAGCGTGATCACCCCTCCCCGTAGCCGGGGCGAAGGCGGCGCGAACTCCTT
 GTAGGACGTCCAGTCGTGCGGCCCGCGCTTGCCACCGTCCGCGTAGACCGCTTCCATGGT
 CGCCAGCCGGTCCCCGCGAACTCGGTGGGGATGTCCGTGCCCAAGGTGGTCCCGGTGGT
 GTCCGAGAGCACCGGGGCTCGTACCGGATGATGTGCAGATCCAAAGAATT

Фиг. 29 (SEQ ID No. 36)

MRLTRSLAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
 NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSIITIGGNDAGFADAMTT
 CVTSSDSTCLNRLATATNYINTTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNFWYC
 LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLFVWE
 SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

Фиг. 30 (SEQ ID No. 37)

1 mlphpagery evgaiffallv gtpqdrllrl echetrplrg rcgcgerrvp pltlpgdgvl
 61 cttsstrdae tvwrkhlqpr pdggfrphlg vgcilagggs pgvlwcgreg crfevrrdt
 121 pglstrtrngd ssppfragws lppkceisq sarktpavpr yslrtdrpd gprgrfvsg
 181 praatrllrf lgipalvlvt altlvavpt gretlwrwc eatqdwclgv pvdsrcgpa
 241 dgefillspv qaatwgnyya lgdsyssgdg ardyypgtav kggcwsana ypelvaeayd
 301 faghlslflac sgqrgyamld aidevgsqld wnsphslvt igiggnldgf stvlktcmvr
 361 vpllskact dqedairkrm akfettfeel isevrtrapd arilvvgypr ifpeeptgay
 421 yltasnrw lnetiqefnq glaeavavhd eeiaasggvg svefvdvyha ldgheigsde
 481 pwvngvqlrd latgvtvdrs tfhpnaaghr avgervieqi etgpgrplya tfavvagatv
 541 dtlagevg

Фиг. 31 (SEQ ID No. 38)

```

1 ggtggtgaac cagaacaccc ggtcgtcgcc gtggcgctcc aggtgcaggt gcaggttctt
61 caactgctcc agcaggatgc cgccgtggcc gtgcacgatg gccttgggca ggcctgtggt
121 ccccgacgag tacagcacc atagcggatg gtgcgaacgg agcgggggtga actccagttc
181 cgcgccttcg cccgcggctt cgaactccgc ccaggacagg gtgtcggcga caggggccgca
241 gcccaaggta ggcaggacga cgggtgtgtg caggctgggc atgccgtcgc gcagggcttt
301 gagcacgtca cggcggtcga agtccttacc gccgtagcgg tagccgtcca cggccagcag
361 cactttcggg tcatctcgcg cgaaccggtc gaggacgctg cgcaccccca agtcggggga
421 acaggacgac caggctcgac cgtatcgggc gcaggcgagg aatgcggccg tcgcctcggc
481 gatgttcggc aggtaggcca cgaccggtc gccggggccc accccgaggc tgcggagggc
541 cgcagcgatc gcggcgggtg gggcccgag ttctcccag gtccactcgg tcaacggccg
601 gagttcggac gctgtccgga tcgccacggc tgatgggtca cggtcgcgga agatgtgtc
661 ggcgtagttg aggggtggcg cggggaacca gacggcgccg ggcatggcgt cggaggcgag
721 cactgtggtg tacggggtgg cggcgccgac ccggtagtag tcccagatcg cggaccagaa
781 tccttcgagg tcggttaccc accagcgcca cagtgcctcg tagtcgggtg cgtccacacc
841 gcggtgctcc cgcaccacgc gggggaacgc ggtgaggttg gcgcttctt tgcgtcctc
901 gtcgggactc cacaggatcg gcggctgcgg cttagtgtc atgaaacgcg accccttcgt
961 ggcgggtgcg gatgcgggtg gcgtcgggtg cctcccttaa cgtcccccgg tgacggagtg
1021 ttgtgacca catctagcac gcgggacgcg gaaaccgtag ggagaaaaca cctacaaccc
1081 cggccggacg gtgggtttcg gccacactta ggggtcgggt gcctgcttgc cgggcagggc
1141 agtcccgggg tgctgtggtg cgggcgggag ggtgtcgtc tcgaggtgtg ccggcgggac
1201 actccggggc tcagccgtac ccgcaacggg gacagttctc ctcccttcgg ggtggatgg
1261 tcccttcccc cgaatgctcg cgagatctcc cagttagccc ggaaaaacac cgtgtgccc
1321 aggtactctt tgcttcgaac agacaggccg gacggtccac gggggaggtt tggggcagc
1381 ggaccacgtg cggcgaccag acgacgggtt ttctcggta tcccgcctc tgtacttgt
1441 acagcgctca cgtgtgctt ggctgtccc acggggcgcg agacgctgtg gcgcatgtg
1501 tgtgagggca cccaggactg gtgcctgggg gtgcccgtcg actcccgcg acagcctcg
1561 gaggacggcg agtttctgct gctttctcc gtccaggcag cgacctgggg gaactattc
1621 gcgctcgggg attcgtactc ttccggggac ggggcccgcg actactatcc cggcaccgcg
1681 gtgaagggcg gttgtggtg gtccgctaac gcctatcccg agctgggtcg cgaagcctac
1741 gacttcgccc gacactgtgc gttcctggcc tgacggggc agcgcggcta cgccatgctt
1801 gacgctatcg acgaggtcgg ctgcgagctg gactggaaat cccctcacac gtcgtgtgtg
1861 acgatcggga tcggcggcaa cgtatcgggg ttctccacgg ttttgaagac ctgcatggtg
1921 cgggtgcccg tgctggacag caaggcgtgc acggaccag aggacgctat ccgcaagcgg
1981 atggcgaaat tcgagacgac gtttgaagag ctcatcagcg aagtgcgcac ccgcccgcg
2041 gacggccgga tccttgcgtt gggctacccc cggattttc cggaggaaac gaccggcgcc
2101 tactacagc tgaccgcgag caaccagcgg tggctcaacg aaaccattca ggagttcaac
2161 cagcagctcg ccgaggctgt cgcggtccac gacgaggaga ttgcccgctc gggcggggtg
2221 ggcagcgtgg agttcgtgga cgtctaccac gcgttgagc gccacgagat cggctcggac
2281 gagccgtggg tgaacggggt gcagttgcgg gacctcgcca ccgggggtgac tgtggaccgc
2341 agtaccttcc accccaacgc cgttgggac cgggcgggtc gtgagcgggt catcgagcag
2401 atcgaaaccg gcccgggccg tccgctctat gccacttcc cgggtgtggc gggggcgacc
2461 gtggacactc tcgcccggca ggtggggtga cccggcttac cgtccggccc gcaggtctgc
2521 gagcactcgc gcgatctggt ccactgcca gtgcagttcg tcttcggta tgaccagcg
2581 cggggagagc cggatcggtg agccgtgcgt gcttttgac agcacacccc gctcgaggag
2641 ccgttcgac agttctctc cggtgccag agtcgggtcg acgtcgatcc cagcccacag
2701 gccgatgctg cgggcggcga ccacgcggtt gccgaccagt tggtcgaggc gggcgcgagc
2761 cacggggggc agggcgcgga catggtccag gtaaggggcg tcgcgagca ggtcaccac
2821 ggcagtgccg accgcgcagg cgaggcggtt gccgcgaag gtgctgccgt gctggccggg
2881 gcggatcacg tcgaagactt ccgcgtcgcc taccgcccgc gccacgggca ggatgcggc
2941 gcccgcgct ttgccgaaca ggtagatata ggcgtcgact ccgctgtggt cgcaggcccg

```

Фиг. 32 (SEQ ID No. 39)

```

1 vsggpraatr rrlflgipal vlvtaltlvt avptgretlw rmwceatqdw clgvvpdsrg
61 qpaedgell lspvqaatwg nyvalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva
121 eaydfaghl flacsggrgy amldaidevg sqldwnspt slvtigiggn dlglfstvlkt
181 cmvrppllds kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilvv gypriifpeep
241 tgayytltas nqrwlnetiq efnqqlaeav avhdeeiias gvgvsvefvd vyhaldghei
301 gsdepwvngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravgerv ieqietgppr plyatfavva
361 gatvdtlage vg

```

Фиг. 33 (SEQ ID No. 40)

```

1 mrttviaasa llllagcadg areetagapp gessggiree gaeastsitd vyialgdsya
61 amggrdqplr gepfclrssg nypellhaev tdltcggavt gdllleprtlg ertlpaqvda
121 ltedttlvtl siggndlgfg evagcireri agenaddcvd llgetigeql dqlppqldrv
181 heairdragd aqvvtgylp lvsagdcpe l gdvseadrw aveltgqine tvreaaerhd
241 alfvlpddad ehtscappqg rwadiqgggt dayplhptsa gheamaaavr dalglepvqp

```

Фиг. 34 (SEQ ID No. 41)

```

1  ttctggggtg ttatggggtt gttatcggtt cgtcctgggt ggatcccgcc aggtggggtg
61  ttacacgggg acttttgtgt ccaacagccg agaatgagtg ccttgagcgg tgggaatgag
121 gtgggcgggg ctgtgtcgcc atgagggggg ggggggctct gtggtgcccc ggcacccccg
181 gccccgggtga gcggtgaatg aaatccggct gtaatcagca tcccgtgccc accccgtcgg
241 ggaggtcagc gcccgagtg tctacgcagt cggatcctct cggactcggc catgctgtcg
301 gcagcatcgc gctcccggtt cttggcgctc ctcggctgtt ctcgctgtcg tccctggaag
361 gcgaaatgat caccggggag tgatacaccg gtggtctcat cccggatgcc cacttcggcg
421 ccatccggca attcgggcag ctccgggttg aagtaggttg catccgatgc gtcggtgacg
481 ccatagtggg cgaagatctc atcctgctcg aggggtgctc gccactctc cggatcgata
541 tcgggggctg cttgatggc gtccttgctg aaaccgaggt gcagcttggt ggcttccaat
601 ttcgcaccac ggagcgggac gaggctgga tgcggccga agagcccggt gtggacctca
661 acgaaggtgg gtagtcccgt gtcacattg aggaacacgc cctccaccgc acccagcttg
721 tggccggagt tgctgtaggc gctggcatcc agaaggaaa cgatctcata tttgtcgggtg
781 tgctcagaca tgatcttctt ttgctgtcgg ttctgtgtac taccacggtg gggctggaatg
841 caactgttat ttttctgtta ttttaggaat tggtcacat cccacaggct ggctgtggtc
901 aaatcgatcat caagtaatcc ctgtcacaca aaatgggtgg tgggagccct ggtcgcggtt
961 ccgtggggagg cgcctgccc cgcaggatcg tcggcatcgg cggatctggc cggtaacccg
1021 cgggtgaataa aatcattctg taaccttcat caccgttggg tttagggtatc cgcctcttc
1081 gtcctgaccc cgtcccgggc gcgcgggagc ccgcggggtg cggtagacag gggagacgtg
1141 gacaccatga ggacaacggt catcgacgca agcgattac tccttctcgc cggatgcggc
1201 gatggggccc gggaggagac cgcgggtgca ccgccccggg agtctcccg gggcatccgg
1261 gaggaggggg cggaggcgct gacaagcatc accgacgtct acatcgccct cggggattcc
1321 tatgcggcga tgggcgggcg ggatcagccg ttacgggggt agccgttctg cctgcctcg
1381 tccggttaatt acccggaact cctccacgca gaggtcaccg atctcacctg ccagggggcg
1441 gtgaccgggg atctgtctga acccaggacg ctgggggagc gcacgctgcc ggcgaggtg
1501 gatgcgctga cggaggacac caccctggtc accctctcca tcgggggcaa tgactcggg
1561 ttcggggagg tggcgggatg catccgggaa cggatcgccg gggagaacgc tgatgattgc
1621 gtggacctgc tgggggaaac catcggggag cagctcgatc agcttcccc gcagctggac
1681 cgcgtgcacg aggtatccg ggaccgcgcc ggggacgcgc aggttgtggt caccggttac
1741 ctgcccgtcg tgtctgccg gactgcccc gaactggggg atgtctccga ggcggatcgt
1801 cggtggggcg ttgagctgac cgggcagatc aacgagaccg tgcgcgaggc ggcggaacga
1861 cacgatgccc tctttgtcct gcccgacgat gccgatgagc acaccagttg tgcaccccca
1921 cagcagcgct gggcgatat ccagggccaa cagaccgatg cctatccgct gcacccgacc
1981 tccgccggcc atgaggcgat ggcggccgcc gtccgggagc cgctgggctt ggaaccggtc
2041 cagccgtagc gccgggcgcg cgttctcga cgaccaaccc atgccaggct gcagtcacat
2101 ccgcacatag cgcgcggcg cgatggagta cgcaccatag aggatgagcc cgatgccgac
2161 gatgatgagc agcacactgc cgaagggttg tccccgagg gtgcgcagag ccgagtcag
2221 acctgcggcc tgctccggat catgggcca accggcgatg acgatcaaca cccccaggat
2281 ccggaaggcg ataccacggg gcacataacc ggtgttccg gtgatgatga tcgcggtccc
2341 gacctgccct gaccccgcac ccgctccag atcctcccg aaatccccgg tggccccctt
2401 ccagaggttg tagacacccg cccccagtac caccagcccg gcgaccacaa ccagcaccac
2461 accccagggt tgggatagga cggtgccggt gacatcggtg gcggtctccc catcgagggt
2521 gctgccgccc cgggcgaagg tggaggtggt caccgccagg gagaagtaga ccatggccat
2581 gaccgcccc ttggcccttt ccttgaggtc ctgcgccgc agcagctggc tcaattgcca
2641 gagtcccagg gccgccagg cgatgacggc aaccacagc aggaactgcc caccggagc
2701 ctccgcgatg gtggccagg cacctgaatt cgaggcctca tcaccggaac gcgccgatcc
2761 agtgccgatg cgcaccgca tccaccgat gaggatgtgc agtatgcca ggacaatgaa
2821 accacctctg gccagggtg tcagcgcggt gtggtcctcg gcctggtcgg cagcccggtc
2881 gatcgctcgt ttcgcggatc tgggtgcgcc cttatccata gctccattg aaccgcttg
2941 aggggtgggc ggccactgtc agggcggtt gtgatctgaa ctgtgatgtt ccatcaacc

```

Фиг. 35 (SEQ ID No. 42)

```

1  mrrfrlvglf sslvlaagaa ltgaataqaa qpaaadgyva lgdsyssvgv agsyissgd
61  ckrstkahpy lwaahspst fdftacsgar tgdvlsgqlg plssgtglvs isiggnadgf
121 admttctvlq sessclsria taeayvdstl pgkldgvysa isdkapnavh vvigprfyk
181 lgttciglse tkrtainkas dhlntvlaqr aaahgftfgd wrttftghel csqspwlhsv
241 nwlningesyh ptaagsggy lpvlnгаа

```

Фиг. 36 (SEQ ID No. 43)

```

1 cccggcgggc cgtgcaggag cagcagccgg cccgcgatgt cctcggggcgt cgtcttcato
61 aggcgcgtcca tcgcgtcggc gaccggcgcc gtgtagttgg cccggacctc gtcccagggtg
121 cccggcgcca tctggcgggg ggtgcgggtg gggccgcgcc gaggggagac gtaccagaag
181 cccatcgtea cgttctccgg ctgcggttcg ggctcgtccg ccgctccgtc cgtcgcctcg
241 ccgagcacct tctcggcgag gtcggcgctg gtcgcccgtc cctgacgtc ggcgccccgg
301 ctccagcgcg agatcagcag cgtccagccg tcccccctcg ccagcgtcgc gctgcggtcg
361 tcgtcgcggg cgatccgcag cagcgcgcg cggggcgcca gcagcgtggc gccggaccgt
421 acgcggtcga tgttcgccc gtcgagtagc ggctgctcac cctggcgaa acggccgagg
481 aacagcgctg cgacgacgtc ggacggggag tcgctgtcgt ccacgttgag ccggatccggc
541 agggcttcgt gcgggttcac ggacatgtcg ccatgatcgg gcacccggcc gcccggtgca
601 cccgctttcc cgggcacgca cgacaggggc tttctcggcg tcttccgtcc gaacttgaa
661 gagtgtcagc catttcttgg catggacact tccagtcaac gcgcgtagct gctaccacgg
721 ttgtggcagc aatcctgcta agggaggttc catgagacgt ttccgacttg tcggcttcc
781 gagtctcgct gtcctcggcg cggcgccgc cctcaccggg gcagcgaccg ccaggcgggc
841 ccaaccggcc gccgcgacg gctatgtggc cctcggcgac tctactcct cgggggtcgg
901 agcgggcagc tacatcagct cgagcgcgca ctgcaagcgc agcacgaagg cccatcccta
961 cctgtggcg gccgcccact cgccctccac gttcgacttc accgctggt ccggcgcccg
1021 tacgggtgat gttctctccg gacagctcgg cccgctcagc tccggcaccg gctcgtctc
1081 gtcagcgtc ggctaccgca acgcccgttt cgccgacacc atgacgacct ggtgctgcca
1141 gtccgagagc tctcgcctgt cgcggatcgc caccgcccag gcgtacgtcg actcgacgt
1201 gcccggaag ctcgacggcg tctactcggc aatcagcgac aaggcgcca acgcccacgt
1261 cgtcgtcatc ggctaccgca gcttctacaa gctcggcacc acctgcatcg gctgctcga
1321 gaccaagcgg acgcgatca acaaggcctc cgaccacctc aacaccgtcc tcgcccagcg
1381 cgccgcccgc cagggcttca ccttcggcga cgtacgcacc accttcaccg gccacgagct
1441 gtcgtccggc agcccctcgt tgcacagcgt caactggctg aacatcgcg agtcgtacca
1501 cccaccgccc gccgcccagt ccggtggcta cctgcggctc ctcaacggcg ccgctgacc
1561 tcaggcgga ggagaagaag aaggagcgga gggagacgag gaggggagg ccccgccga
1621 cgggggtccc gtcaccgtct ccgtctccgt cccggtcccg caagtcaccg agaacgccac
1681 cgcgtcggac gtggcccga ccggaactcg cactccacg cgcacggcac tctcgaacgc
1741 gccggtgtcg tcgtgcgtcg tcaccaccac gccgtcctgg cgcgagcgt cgccgcccga
1801 cgggaaggac agcgtccgcc acccggatc ggagaccgac ccgtccggcg tcaccaccgg
1861 gtagccgacc tccgcgggc gccgcccga cgtgaacgtc gccgtgaacg cgggtgccg
1921 gtcgtcggc ggcgagagg ccccgagta gtgggtgcgc gagccacca cggtcacctc
1981 caccgactgc gtcgggggc

```

Фиг. 37 (SEQ ID No. 44)

```

1 mrrsritayv tslllavgca ltgaataqas paaatgyva lgdsyssvgv agsylsssgd
61 ckrsskaypy lwqaahspss fsfmacsgar tgdvlnqlg tlnsstglvs ltiggndagf
121 sdvmttcvlq sdsaclsrin takayvdstl pgqldsvyta istkapsahv avlgyprrfyk
181 lggsclagls etkrasinda adylnsaiak raadhgftfg dvkstftghe icssstwlhs
241 ldllnlqgsy hptaagqsgg ylpvmsva

```

Фиг. 38 (SEQ ID No. 45)

```

1 ccaccgccc gtcggcggg agtctcctgg cctcggctgc ggagagggtg gccgtgtagc
61 cgttcacgcg gccgcgaac gtcttcttca ccgtgccgcc gtactcgttg atcaggccct
121 tgcccttgct cgacgcgggc ttgaagccgg tgcccttctt gagcgtgacg atgtagctgc
181 ccttgatcgc ggtgggggag ccggcgcgca gcacggtgcc ctcggccggg gttggcctgg
241 cgggcagtg ggtgaatccg cccacgaggg cgcgggtcgc cagcgcggtt atcgcgcgca
301 tccggatctt cttgtacgc agctgtgcca tacgagggag tccctctctg ggcagcgggc
361 cgccgtgggt gggcgacagg ctgtgggggg tgcgcgcgtc atcacgcaca cggccctgga
421 gcgtcgtggt ccgcccgtgg ttgagtaaag cctcggccat ctacgggggt ggctcaaggg
481 agttgagacc ctgtcatgag tctgacatga gcacgcaatc aacggggccc tgagcaccoc
541 gggggcgacc cggaagtgc cgagaagtct tggcatggac acttcctgtc aacacgcgta
601 gctgggtacg cggttacggc agagatcctg ctgaagggag gttccatgag acgttcccga
661 attacggcat acgtgacctc actcctcctc gccgtcggct gcgccctcac cggggcagcg
721 acggcgccag cgtcccagc cgccgcccgc acgggctatg tggccctcgg cgactcgtac
781 tcgtccgggt tcggcgccgg cagctacctc agctccagcg gcgactgcaa gcgcagttcg
841 aaggccatc cgtacctctg gcaggcccg cattcacctc cgtcgttcag ttcatggct
901 tgctcggggc ctcgtacggg tgatgtcctg gccaatcagc tcggcaccct gaactcgtcc
961 accggcctgg tctccctcac catcgaggc aacgacgcgg gcttctccga cgtcatgacg
1021 acctgtgtgc tccagtccga cagcgccctg ctctcccga tcaacacggc gaaggcgta
1081 gtcgactcca cctgcccgg ccaactcgac agcgtgtaca cggcgatcag caggaaggcc
1141 ccgtcggccc atgtggcggt gctgggctac ccccgcttct acaactggg cggctcctg
1201 ctcgcccggc tctcgagac caagcggtcc gccatcaacg acgcccggca ctatctgaac
1261 agcggccatg ccaagcgcg cgccgaccac ggcttcacct tcggcgacgt caagagcacc
1321 ttcaccggcc atgagatctg ctccagcagc acctggctgc acagtctcga cctgctgaac
1381 atcggccagt cctaccaccc gaccgcccgc ggccagtcgg gcggctatct gccggtcatg
1441 aacagcgtgg cctgagctcc cagggcctga atttttaagg cctgaatttt taaggcgaag
1501 gtgaaccgga agcggaggcc ccgtccgtcg gggctcctgt cgcacaggtc accgagaacg
1561 gcacggagtt ggacgtcgtg cgcaccgggt cgcgcacctc gacggcgatc tcttcgaga
1621 tcgttccgct cgtgtcgtac gtggtgacga acactcgtt ctgctgggtc tttccgccc
1681 tcgcccggaa ggacagcgtc ttccagcccg gatccgggac ctcgcccctc ttggtcacc
1741 agcgggtact cactcgacc gcacccggc ccacgtgaa ggtcggcggt aacgtggcg
1801 cctggcggtg gggcggggg caggcaccgg agtagtcgtg gtcgacggcg gtagccgta
1861 ccttcacgga ctggggcggc ggggtcgtcg taccgcccgc gccaccggcg cctccggag
1921 tggagcccga gctgtggtcg ccccgcgtg cggcggtgtc gtcctcgggg gttttcgaa

```

Фиг. 39 (SEQ ID No. 46)

```

1 mgsqpraatr rrlflgipal vlvtaItlvI avptgretlw rmwceatqdw clgvvpdsrg
61 qpaedgefll lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyg gtavkkgcwr sanaypelva
121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlqfstvlkt
181 cmvrvpllds kactdgedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilvv gyprifpeep
241 tgayytltas ngrwlnetiq efnqqlaeav avhdeeiias ggvgsvfevd vyhaldghei
301 gsdepwvngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravgerv ieqietgpgr plyatfavva
361 gatvdtlage vg

```

Фиг. 40 (SEQ ID No. 47)

```

1      ctgcagacac cgcggccgccc ttctcccga tcgtcatgtt cggcgactcc ctcagcgaca
61      cgggcaagat gtactccaag atgcgcggct acctgccgtc cccccgcgg tactacgagg
121     gccgcttctc gaacggcccc gtctggctgg agcagctgac gaagcagttc cccggcctga
181     cgatcgccaa cgaggccgag gggggcgcca ccgcagtcgc ctacaacaag atctcctgga
241     acccgaagta ccaggtcatt aacaacctcg actacgaggt caccagttc ttgcagaagg
301     actcgttcaa gcccgacgac ctggtcattc tgggtgtggg cgccaacgac tacctggcct
361     acggttgaa caccgagcag gacgccaagc ggggtgcgga cgccatctcg gacgcggcaa
421     accgcatggt cctgaacggc gcgaagcaga tcctgctgtt caacctgccc gacctgggccc
481     agaaccgctc cgcccgctcc cagaaggctg tcgaggcgtt ctgcgacgtg tccgcctacc
541     acaacaagct gctcctcaac ctgcggcgcc agctcgcccc gacgggcatg gtcaagctgt
601     tcgagatcga caagcagttc gcgagatgac tgcgcgaccc ccagaacttc ggcctgagcg
661     acgtggagaa cccgtgctac gacggcggtt acgtgtggaa gccgttcgcc acccggtccg
721     tctcgaccga ccggcagctg tcggccttct cgccccagga gcgcctggcg atcgctggca
781     acccgctcct ggcacaggcg gtagcttcgc cgatggcccg ccgctcggcc tcgcccctca
841     actgcgaggg caagatgttc tgggaccagg tccaccccac caccgtggtc caccgcgccc
901     tctcgagcgc cgccgccacc ttcacgcaga ccagtagcga gttcctcgcc cactagtcta
961     gaggatcc

```

Фиг. 41 (SEQ ID No. 48)

1. L131
2. S. avermitilis
3. T. fusca
4. Общий типичный элемент структуры

```

1
1 (1) -----MRLTRSLAASVIVFALLLALLGISPAQAAG----- 50
2 (1) -----MRRSRITAYVTSLLLAVGCALTGAATAQASPA-----
3 (1) VSGSPRAATRRLFLGIPALVLVLTALTLLVAVPTGRETLWRMWCEATQDW
4 (1) MRRSRFLA ALILLTLA AL GAA ARAAP

51
1 (32) -----P-AYVALGDSYSSGNGAGSYID 100
2 (33) -----AAATGYVALGDSYSSGVGAGSYLS
3 (51) CLGVPVDSRGQPAEDGEFLLSPVQAATWGNYYALGDSYSSGDGARDYYP
4 (51) A A YVALGDSYSSG GAGSY

101
1 (53) SSGD---CHRSNNAYPARWAAANAP---SSFTFAACSGAVTTDVIN--- 150
2 (57) SSGD---CKRSSKAYPYLWQAAHSP---SSFSFMACSGARTGDVLA---
3 (101) GTAVKGGCWRSANAYPELVAEAYDFA--GHLSFLACSGQRGYAMLDAIDE
4 (101) SSGD C RSTKAYPALWAAAAH SSFSF ACSGARTYDVLA

151
1 (93) --NQLGALNAST--GLVSIITGGNDAGFADAMTTCVTS-----SDSTCL 200
2 (97) --NQLGTLNSST--GLVSLTIGGNDAGFSDVMTTCVLQ-----SDSACL
3 (149) VGSQLDWNSPHT--SLVTIIGGNDLGFSTVLKTCMVR-----VPLLDS
4 (151) QL LNS T LVSITIGGNDAGFAD MTTCVL SDSACL

201
1 (133) NRLATATNYINTTLA-----RLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMY 250
2 (137) SRINTAKAYVDSTLPG-----QLDSVYTAISTKAPSAHVAVLGYPRFY
3 (191) KACTDQEDAIRKMAKF---ETTFEELISEVRTRAPDARILVVGYPRI
4 (201) RIA AK YI TLPA RLDSVYSI TRAP ARVVVLGYPRIY

251
1 (176) LASNPWYCLGLSNTKRAINTTADTLNSVISSRATAH-----GF 300
2 (180) KLGG-SCLAGLSETKRSAINDAADYLSAIAKRAADH-----GF
3 (237) PEEPTGAYYTLTASNQRWLNETIQEFNQQLAEAVAVHDEEIAASGGVGSV
4 (251) SG LGLS TKRAINDAAD LNSVIKRAADH GF

301
1 (215) RFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLP-----VWESYH 350
2 (218) TFGDVKSTFTGHEICSSSTWLHSLDLN-----IGQSYH
3 (287) EFVDVYHALDGHEIGSDEFWVNGVQLRDLATG-----VTVDRSTFH
4 (301) TFGDV TF GHELCSA PWLHSLTLP V SYH

351
1 (248) PTSTGHQSGYLPVLNANSST----- 395
2 (252) PTAAGQSGGYLPVMNSVA-----
3 (328) PNAAGHRAVGERVIEQIETGPGRPLYATFAVVAGATVDTLAGEVG
4 (351) PTA CHAACVLPVINST T

```

Фиг. 42

SEQ ID No 17, представляющая собой аминокислотную последовательность липидацилтрансферазы из *Candida parapsilosis*;

```

MRYFAIAFLL INTISAFVLA PKKPSQDDFY TPPQGYEAQP LGSILKTRNV PNPLTNVFTP VKVQNAWQLL
VRSEDTFGNP NAIVTTIIQF FNAKKDKLVS YQTFEDSGKL DCAPSYAIQY GSDISTLTQ GEMYIISALL
DQGYVVVTPD YEGPKSTFTV GLQSGRATLN SLRATLKSGN LTGVSSDAET LLWGYSGGSL ASGWAAAIQK
EYAFELSKNL LGAALGGFVT NITATAEAVD SGFFAGIISN ALAGIGNEYF DFKNYLLKKV SPLLSITYRL
GNTHCLLDGG IAYFGKSFFS
RIIRYFPDGW DLVNQEPKPT ILQDNLVYQ PKDLTPQIFL FIYHGTLDAL VPIVNSRKTQ QQWCDWGLKS
GEYNEDLTNG HITESIVGAP AALTWIINRF NGQPPVDGQQ HNVRSANLEY PGTPQSIKYN FEAALHAILG
FDLGPDPVKRD KVTLGGLLKL ERFAP

```

Фиг. 43

SEQ ID No 18, представляющая собой аминокислотную последовательность липидацилтрансферазы из *Candida parapsilosis*;

```

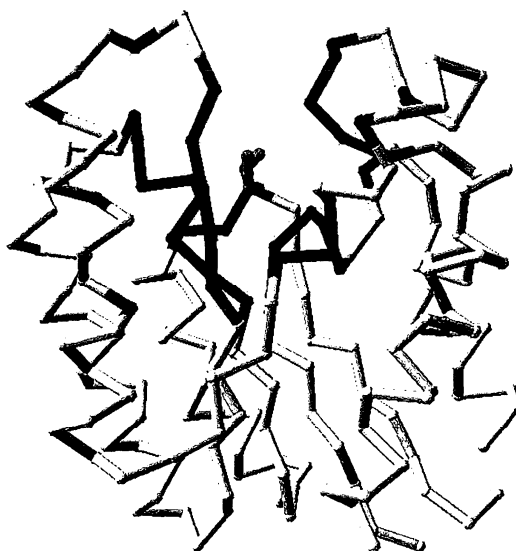
MRYFAIAFLL INTISAFVLA PKKPSQDDFY TTPQGYEAQP LGSILKTRNV PNPLTNVFTP VKVQNAWQLL
VRSEDTFGNP NAIVTTIIQP FNAKKDKLVS YQTFEDSGKL DCAPSYAIQY GSDISTLTQ GEMYYISALL
DQGYVVVTPD YEGPKSTFTV GLQSGRATLN SLRATLKSGN LTGVSSDAET LLWGYSGGSL ASGWAAAIQK
EYAPELSKNL LGAALGGFVT NITATAEAVD SGPFAGIISN ALAGIGNEYF DFKNYLLKKV SPLLSITYRL
GNTHCLLDGG IAYFGKSFFS RIIRYFPDGW DLVNQEPKPT ILQDNGLVYQ PKDLTPQIPL FIYHGTLDAL
VPIVNSRKTF QQWCDWGLKS GEYNEDLTNG HITESIVGAP AALTWIIINRF NGQFPVDGCQ HNVRASNLEY
PGTPQSIKNY FEAAALHAILG FDLGPDVKRD KVTLGGLLKL ERFATHHHHH H

```

Фиг. 44



Фиг. 45



Фиг. 46

[illegible]

- 178 -

[illegible]

ФИГ. 49

[illegible]

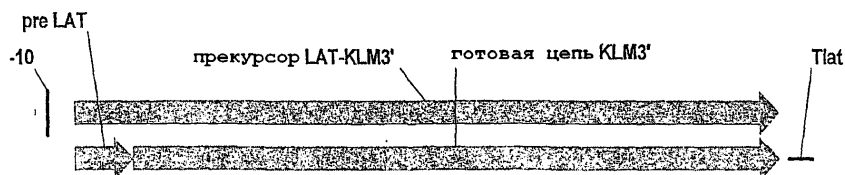
```

30      40      50
50
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
1IVN_A      4 LLILGDSLSAG-----YRMSASAAWPA LLNDKWqsk-----
----- 34      28
IVMFGDSLSDTgkmyskmrgylpsspppyeGRFSNGFPVWLEQLTNEFPGLTianeaeaggp 87
              70      80      90      100      110
120
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
1IVN_A      35 -tsvVNASISGDT-----SQOGLARLPALLKQHQP RW 65
P10480      88 tavaYNKISWNPKYq-----vINNLDEYVTQFLQKDSFKPDDL 125
              130      140      150      160      170
180
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
1IVN_A      66 VLVELGGNDG-----LRGTFPQQTEQT 87
P10480      126 VILWVGANDY-----LA--YGWNETQDAKRVRDA 152
              190      200      210      220      230
240
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
1IVN_A      88 LRQIQDQVKAAAEPlmqiRLPANyGr-----
----- 115
P10480      153 ISDAANRMV-LNGAK-----EILLFNLPdlg-----
----gnP 180
              250      260      270      280      290
300
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
1IVN_A      116 -----RYNEAFSAIYPKLake-----
fDVPLLPFFME 142
P10480      181 SARSQKVVEAAASHVSAYHNQLLNLNArqlaptg-----
mvlkfeIDQFAEMLRD 230
              310      320      330      340      350
360
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
1IVN_A      143 EYVLKPQW-----
----- 150
P10480      231
PQNFGLSQQRNacyggsyvwkpfasrsastdsqlsafnpqerlaiagnpllaqavaspma 290
              370      380      390      400
.....*.....*.....*.....*.....*.....
1IVN_A      151 -----MQDDGI-----HPNRDAQPFPIADWM 170
P10480      291 areastlnceqkMFWDQV-----HPTTVVHAALSEPA 322

```

		1	50
P10480	(1)	MKKWFCVLLGLVLTQQAADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP	
A. sal	(1)	-----ADTRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP	
A. hyd	(1)	-----ADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP	
Консенсус	(1)	AD*RPAPFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP	
		51	100
P10480	(51)	SSPPYYEGRFSNGPFWLEQLTNEFFGLTIANEAEGGPTAVAYNKISWNP	
A. sal	(33)	SSPPYYEGRFSNGPFWLEQLTKQFFGLTIANEAEGGATAVAYNKISWNP	
A. hyd	(33)	SSPPYYEGRFSNGPFWLEQLTKQFFGLTIANEAEGGATAVAYNKISWNP	
Консенсус	(51)	SSPPYYEGRFSNGPFWLEQLT*FFGLTIANEAEGG*TAVAYNKISWNP	
		101	150
P10480	(101)	YQVINNLDYEVTFQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYGWNTQDAKRV	
A. sal	(83)	YQVINNLDYEVTFQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYGWNTQDAKRV	
A. hyd	(83)	YQVINNLDYEVTFQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYGWNTQDAKRV	
Консенсус	(101)	YQVINNLDYEVTFQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYGWNTQDAKRV	
		151	200
P10480	(151)	DAISDAANRMVLNGAKEILLFNLPDLGQNPSARSQKVVEAASHVSAYHNQ	
A. sal	(133)	DAISDAANRMVLNGAKQILLFNLPDLGQNPSARSQKVVEAVSHVSAYHNQ	
A. hyd	(133)	DAISDAANRMVLNGAKQILLFNLPDLGQNPSARSQKVVEAVSHVSAYHNQ	
Консенсус	(151)	DAISDAANRMVLNGAK*ILLFNLPDLGQNPSARSQKVVEA*SHVSAYHN*	
		201	250
P10480	(201)	LLNLNARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDQRNACYGGSYVW	
A. sal	(183)	LLNLNARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDVENPCYDGGYVW	
A. hyd	(183)	LLNLNARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDVENPCYDGGYVW	
Консенсус	(201)	LLNLNARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSD* ²⁵¹ N*CY*G*YVW	
		251	300
P10480	(251)	KPFASRSASTDSQLSAFNPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARSASTLNCE	
A. sal	(233)	KPFATRSVSTDRLSAFSPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARRSASPLNCE	
A. hyd	(233)	KPFATRSVSTDRLSAFSPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARRSASPLNCE	
Консенсус	(251)	KPFA*RS*STD*QLSAF*PQERLAIAGNPLLAQAVASPMA*RSAS*LNCE	
		301	336
P10480	(301)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSEPAATFIESQYEFIAH-	
A. sal	(283)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSERAAATFIETQYEFIAHG	
A. hyd	(283)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSERAAATFIANQYEFIAH-	
Консенсус	(301)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSE* ³³⁶ AATFI**QYEFIAH*	

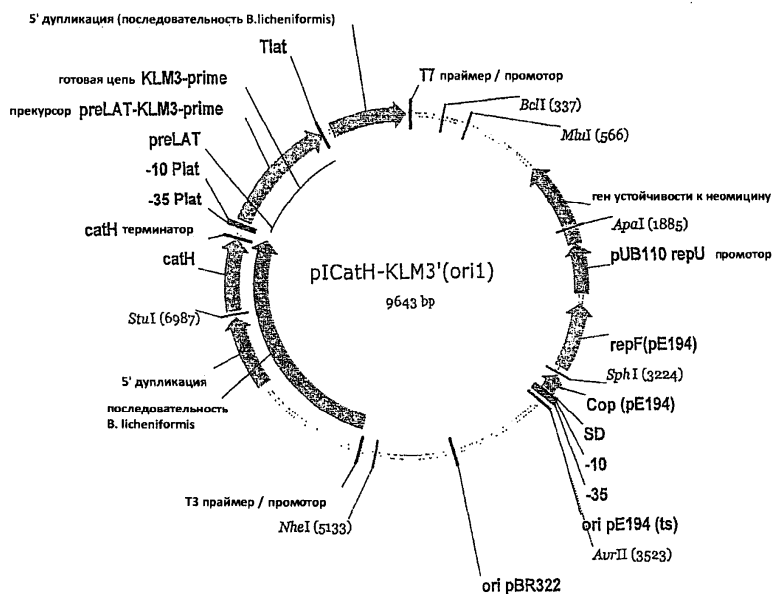
Фиг. 52



Генная конструкция для экспрессии KLM3'

1182 bp

Фиг. 53



Фиг. 54

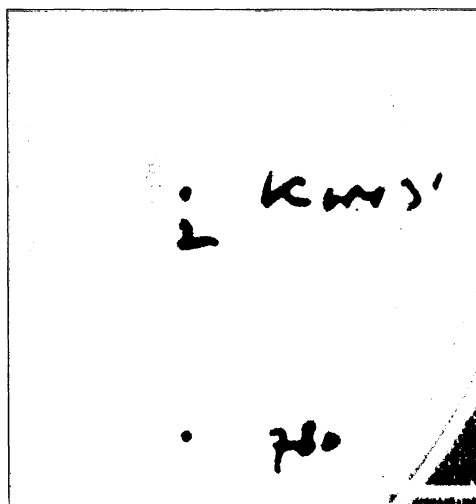
-35

```

1  GCTTTTCTTT TGGAAGAAAA TATAGGGAAA ATGGTACTTG TTAAAAATTC GGAATATTTA
   CGAAAAAGAAA ACCTTCTTTT ATATCCCTTT TACCATGAAC AATTTTAAAG CCTTATAAAT
   -10
61  TACAAATATCA TATGTTTCAC ATTGAAAGGG GAGGAGAATC ATGAAACAAC AAAAACGGCT
   ATGTTATAGT ATACAAAGTG TAACTTTCCC CTCTCTTAG TACTTTGTTG TTTTGGCCGA
   • Y A R L L T L L F A L I F L L P H S A A •
121  TTACGCCCGA TTGCTGACGC TGTATTTTGC GCTCATCTTC TTGCTGCCTC ATTCTGCAGC
   AATGCCGGCT AACGACTGCG ACAATAAACG CGAGTAGAAG AACGACGGAG TAAGACGTCG
   • S A A D T R P A F S R I V M F G D S L S •
181  TTCAGCAGCA GATACAAGAC CGGCGTTTAG CCGGATCGTC ATGTTTGAG ATAGCCTGAG
   AAGTCGTCGT CTATGTTCTG GCCGCAATC GGCCTAGCAG TACAAACCTC TATCGGACTC
   • D T G K M Y S K M R G Y L P S S P P Y Y •
241  CGATACGGGC AAAATGTATA GCAAAATGAG AGGCTATCTT CCGTCAAGCC CGCCGTATTA
   GCTATGCCCG TTTTACATAT CGTTTACTC TCCGATAGAA GGCAGTTCGG GCGGCATAAT
   • E G R F S N G P V W L E Q L T K Q F P G •
301  TGAAGGCCCG TTTAGCAATG GACCGGTCTG GCTGGAACAA CTGACGAAC AATTTCCGGG
   ACTTCCGGCG AAATCGTTAC CTGGCCAGAC CGACCTTGT TACTGCTTGG TTAAGGGCCC
   • L T I A N E A E G G A T A V A Y N K I S •
361  ACTGACGATC GCTAATGAAG CAGAAGGAGG AGCAACAGCG GTCCGCTATA ACAAAATCAG
   TGACTGCTAG CGATTACTTC GTCTTCTCTC TCGTTGTCGC CAGCGGATAT TGTTTTAGTC
   • W D P K Y Q V I N N L D Y E V T Q F L Q •
421  CTGGGACCCG AAATATCAGG TCATCAACAA CTGGACTAT GAAGTCACAC AGTTTCTTCA
   GACCTGGGCG TTTATAGTCC AGTAGTTGTT GGACCTGATA CTTCACTGTG TCAAGGAAGT
   • K D S F K P D D L V I L W V G A N D Y L •
481  GAAAGACAGC TTTAAACCGG ATGATCTGGT CATCTTTGG GTCCGCGCCA ATGATTATCT
   CTTTCTGTGC AAATTTGGCC TACTAGACCA GTAGGAAACC CAGCCGCGGT TACTAATAGA
   • A Y G W N T E Q D A K R V R D A I S D A •
541  GGCGTATGGC TGGAACACAG AACAAAGATG CAAAGAGTGC AGAGATGCCA TCAGCGATGC
   CCGCATACCG ACCTTGTGTC TTGTTCTACG GTTTTCTCAG TCTCTACGGT AGTCGTACG
   • A N R M V L N G A K Q I L L F N L P D L •
601  CGCTAATAGA ATGGTCTGA ACGGCGCCAA ACAATCCTG CTGTTTAACC TGCCGGATCT
   GCGATTATCT TACCAGGACT TGCCGCGGTT TGTTTAGGAC GACAAATTGG ACGGCTTAGA
   • G Q N P S A R S Q K V V E A V S H V S A •
661  GGGACAAAT CCGAGCGCCA GAAGCCAAA AGTCGTGCGA GCAGTCAGCC ATGTGAGCGC
   CCCTGTTTA GGCTCGCGGT CTTCGGTTT TCAGCAGCTT CGTCAGTCGG TACAGTCGG
   • Y H N K L L L N L A R Q L A P T G M V K •
721  CTATCATAAC AAATGCTGC TGAACCTGGC AAGACAATTG GCACCGACGG GAATGGTTAA
   GATAGTATTG TTTGACGACG ACTTGGACCG TTCTGTAAAC CGTGGCTGCC CTTACCAATT
   • L F E I D K Q F A E M L R D P Q N F G L •
781  ATTGTTTGAA ATTGACAAAC AGTTTGCCGA AATGCTGAGA GATCCGCAA ATTTTGGCCT
   TAACAACTT TAACTGTTTG TCAACGGCT TTACGACTCT CTAGGCGTTT TAAACCCGGA
   • S D V E N P C Y D G G Y V W K P F A T R •
841  GAGCGATGTC GAAAACCCGT GCTATGATGG CGGATATGTC TGGAACCCGT TTGCCACAAG
   CTCGCTACAG CTTTGGGCA CGATACTACC GCCTATACAG ACCTTTGGCA AACGGTGTTC
   • S V S T D R Q L S A F S P Q E R L A I A •
901  AAGCGTCAGC ACGGATAGAC AACTGTCAGC GTTTAGCCCG CAAGAAAGAC TGGCAATCGC
   TTCCGAGTCG TGCCATCTG TTGACAGTCG CAAATCGGGC GTTCTTCTG ACCGTTAGCG
   • G N P L L A Q A V A S P M A R R S A S P •
961  CGGAAATCCG CTTTGGGCA AAGCAGTTGC TTCACCGATG GCAAGAAGAT CAGCAAGCCC
   GCCTTTAGGC GAAAACCCGT TCGTCAACG AAGTGGCTAG CGTTCTTCTA GTCCGTCGGG
   • L N C E G K M F W D Q V H P T T V V H A •
1021  GCTGAATTGC GAAGGCAAAA TGTTTTGGGA TCAGGTCCAT CCGACAACAG TTGTCCATGC
   CGACTTAACG CTTCCGTTT ACAAAACCT AGTCCAGGTA GGCTGTTGTC AACAGGTACG
   • A L S E R A A T F I E T Q Y E F L A H G •
1081  TGCCCTTCA GAAAGAGCGG CGACGTTTAT CGAAACACAG TATGAATTC TGGCCCATGG
   ACGGGAAGT CTTTCTCGCC GCTGCAATA GCTTTGTGTC ATACTTAAAG ACCGGGTACC
   •stop
1141  CTGAGTTAAC AGAGGACGGA TTTCTGAAG GAAATCCGTT TTTTATTTT AAGCTTGGAG
   GACTCAATTG TCTCCTGCCT AAAGGACTTC CTTTAGGCAA AAAATAAAA TTCGACCTC
1201  ACAAGGTAAA GGATAAACC TCAG
   TGTCCATT CCTATTTGG AGTC

```

Фиг. 55



Фиг. 56

1 ATGAAACAAC AAAACGGCT TTACGCCGA TTGCTGACGC TGTATTGTC
TACTTTGTG TTTTGGCCGA AATGCGGGCT AACGACTGCG ACAATAAACG

51 GCTCATCTTC TTGCTGCTC ATTCTGCAGC TTCAGCAGCA GATACAAGAC
CGAGTAGAAG AACGACGGAG TAAGACGTCG AAGTCGTCGT CTATGTTCTG

101 CGGCGTTTAG CCGGATCGTC ATGTTTGGAG ATAGCCTGAG CGATACGGGC
GCCGCAATC GGCTTAGCAG TACAAACCTC TATCGGACTC GCTATGCCCG

151 AAAATGTATA GCAAAATGAG AGGCTATCTT CCGTCAAGCC CGCCGTATTA
TTTACATAT CGTTTACTC TCCGATAGAA GGCAGTTCGG GCGGCATAAT

201 TGAAGGCCGC TTTAGCAATG GACCGGTCTG GCTGGAACAA CTGACGAAAC
ACTTCCGGCG AAATCGTTAC CTGGCCAGAC CGACCTTGTT GACTGCTTTG

251 AATTCCGGG ACTGACGATC GCTAATGAAG CAGAAGGAGG AGCAACAGCG
TTAAAGGCCG TGACTGCTAG CGATTACTTC GTCTTCTCC TCGTTGTGCG

301 GTCGCCTATA ACAAATCAG CTGGGACCGG AAATATCAGG TCATCAACAA
CAGCGGATAT TGTTTAGTC GACCTGGGC TTTATAGTCC AGTAGTTGTT

351 CCTGGACTAT GAAGTCACAC AGTTTCTTCA GAAAGACAGC TTTAAACCGG
GGACCTGATA CTTCACTGTG TCAAAGAAGT CTTCTGTGCG AAATTTGGCC

401 ATGATCTGGT CATCCTTTGG GTCGGCGCCA ATGATTATCT GCGTATGGC
TACTAGACCA GTAGGAACCC CAGCCGCGGT TACTAATAGA CCGCATACCG

451 TGGAACACAG AACAAAGATC CAAAAGAGTC AGAGATGCCA TCAGCGATGC
ACCTTGTTGC TTGTTCTACG GTTTTCTCAG TCTCTACGGT AGTCGCTACG

501 CGCTAATAGA ATGCTCCTGA ACGGCGCCAA ACAATCCTG CTGTTTAACC
GCGATTATCT TACCAGGACT TGCCGCGGTT TGTTTAGGAC GACAAATTGG

551 TGCCGGATCT GGGACAAAAT CCGAGCGCCA GAAGCCAAA AGTCGTCGAA
ACGGCCTAGA CCCTGTTTGA GGCTCGCGGT CTTGCGTTT TCAGCAGCTT

601 GCAGTCAGCC ATGTCAGCGC CTATCATAAC AAATGCTGCG TGAACCTGGC
CGTCAGTCGG TACAGTCGCG GATAGTATTG TTTGACGAGC ACTTGGACCG

651 AAGACAATTG GCACCGACCG GAATGGTTAA ATTGTTTGA ATTGACAAAC
TTCTGTTAAC CGTGGCTGCC CTTACCAATT TAACAAACTT TAAGTGTGTTG

701 AGTTTGCCGA AATGCTGAGA GATCCGCAA ATTTTGCCCT GAGCGATGTC
TCAAACGGCT TTACGACTCT CTAGGCGTTT TAAACCCGGA CTCGCTACAG

751 GAAACCCCGT GCTATGATGG CGGATATGTC TGGAACCCGT TGCCACAAG
CTTTTGGGCA CGATACTACC GCCTATACAG ACCTTTGGCA AACGGTGTTC

801 AAGCGTCAGC ACGGATAGAC AACTGTCAGC GTTAGCCCG CAAGAAAGAC
TTCGAGTCG TGCCATCTG TTGACAGTCG CAAATCGGGC GTTCTTCTG

851 TGGCAATCGC CGGAAATCCG CTTTGGCAC AAGCAGTTGC TTCACCGATG
ACCGTTAGCG GCCTTAGGC GAAACCCGTG TTCGTCAACG AAGTGGCTAC

901 GCAAGAAGAT CAGCAAGCCC GCTGAATTGC GAAGGCAAAA TGTTTGGGA
CGTTCTTCTA GTCGTTCCGG CGACTTAACG CTTCCGTTTT ACAAAACCCCT

951 TCAGGTCCAT CCGACAACAG TTGTCCATGC TGCCCTTTCA GAAAGAGCGG
AGTCCAGGTA GGCTGTTGTC AACAGGTACG ACGGGAAAGT CTTTCTCGCC

1001 CGACGTTTAT CGAAACACAG TATGAATTC TGGCCCATGG CTGA
GCTGCAATA GCTTTGTGTC ATACTTAAAG ACCGGGTACC GACT

Фиг. 57 (SEQ ID No. 49)

1 ATGAAAAAAT GGTGTGTG TTTATTGGGA TTGTCGCGC TGACAGTTCA GGCAGCCGAC

61 AGCCGTCCTG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTTGGCGACA GCCTCTCCGA TACCGGCAGG

121 ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC TCCAGCCCCC CTTACTATGA GGGCCGCTTC

181 TCCAACGGGC CCGTCTGGCT GGAGCAGCTG ACCAACGAGT TCCCGGGCCT GACCATAGCC

241 AACGAGGCGG AAGGCGGACC GACCGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCTTG GAATCCCAAG

301 TATCAGGTCA TCAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCCTGCAAAA AGACAGCTTC

361 AAGCCGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGCGCCAAGC ACTATCTGGC CTATGGCTGG

421 AACACAGAGC AGGATGCCAA CGGGGTGCGC GACGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG

481 GTGCTGAACG GCGCCAAGGA GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCC

541 TCGGCCCGCA GCCAGAAGGT GGTGAGGCGC GCCAGCCATG TCTCCGCCTA CCACAACCCG

601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCT CCCACCGGCA TGGTGAAGCT GTTCGAGATC

661 GACAAGCAGT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT TCGGCTGAG CGACAGAGG

721 AACGCCCTGT ACGGTGGCAG CTATGTATGG AAGCCGTTTG CCTCCGCGAG CGCCAGCACC

781 GACAGCCAGC TCTCCGCCCT CAACCCGCGG GAGCGGCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG

841 CTGGCCAGG CCGTCGCCAG CCCCATGGCT GCCCGCAGCG CCAGCACCCCT CAACTGTGAG

901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTCCACCCC ACCACTGTG TGCACGCCG CCTGAGCGAG

961 CCCGCCGCA CCTTCATCGA GAGCCAGTAC GAGTTCCTCG CCCAC

Фиг. 58 (SEQ ID No. 50)

```

1 ATGAAAAAAT GGTGTTGTTG TTTATTGGGG TTGATCGCGC TGACAGTTCA GGCAGCCGAC
61 ACTCGCCCCG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA GCCTCTCCGA TACCGGCAAA
121 ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC TCCAGCCCGC CTTACTATGA GGGCCGTTTC
181 TCCAACGGAC CCGTCTGGCT GGAGCAGCTG ACCAAGCAGT TCCCGGGTCT GACCATCGCC
241 AACGAAGCGG AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GARTCCCAAG
301 TATCAGGTCT ACAACAACCT GGACTACGAG GTCAACCCAGT TCTTGCAGAA AGACAGCTTC
361 AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG ACTATCTGGC ATATGGCTGG
421 AATACGGAGC AGGATGCCAA GCGAGTTGCG GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCCGATG
481 GTACTGAACG GTGCCAAGCA GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCAG
541 TCAGCCCGCA GTCAGAAGGT GGTGAGGCGG GTCAGCCATG TCTCCGCTTA TCACAACAG
601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCC CCCACCCGCA TGGTAAAGCT GTTCGAGATC
661 GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT TCGGCTGAG CGAGCTCGAG
721 AACCCCTGCT ACGACGCGCG CTATGTGTGG AAGCCGTTTG CCACCCGAGC CGTCAGCACC
781 GACCCGCGAG TCTCCGCTTC CAGTCCGCGG GAACGCCCTG CCATCGCCGG CAACCCGCTG
841 CTGGCACAGG CCGTTGCCAG TCCTATGGCC CGCCGCAGCG CCAGCCCCCT CAATCTGTAG
901 GGCAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTGC TGACAGCAGC CCTGAGCGAG
961 CGCGCCGCCA CCTTCATCGA GACCCAGTAC GAGTTCCTCG CCACCGGATG A

```

Фиг. 59 (SEQ ID No. 51)

```

1 ATGCCGAAGC CTGCCCTTCG CCGTGTCATG ACCGCGACAG TCGCCGCCGT CGGCAGCTC
61 GCCCTCGGCC TCACCGACGC CACCGCCAC GCGCGCCCCG CCCAGGCCAC TCCGACCTTG
121 GACTACGTCG CCTCGGCGA CAGCTACAGC GCGGGCTCCG GCGTCTTGCC CGTCGACCCC
181 GCCAACCTGC TCTGTCTGCG CTCGACGGCC AACTACCCCG ACCTCATCGC GGACACGACG
241 GCGCGCCGCG TCACGGACGT CACCTGCGGC GCGCGCAGAG CGCGCGACTT CACGCGGGCC
301 CAGTACCCGG GCGTCGCACC CCAGTTGGAC GCGCTCGGCA CCGGCACGGA CCTGGTCACG
361 CTCACCATCG GCGGCAACGA CAACAGCACC TTCAATCAACG CCATCAGCGC CTGCGGCACG
421 GCGGGTGTCT TCAGCGCGCG CAAGGGCAGC CCTTCAAGG ACAGGCACGG CACTCTCTTC
481 GACGACGAGA TCGAGGCCAA CACGTACCCC GCGCTCAAGG AGGCGCTGCT CGGCGTCCGC
541 GCCAGGGCTC CCCACGCCAG GGTGGCGGGT CTCGGCTACC CGTGGATCAC CCCGGCCACC
601 GCGGACCCGT CCTGCTTCTT GAAGCTCCCC CTCGCGCCCG GTGACGTGCC CTACCTGCGG
661 GCCATCCAGG CACACCTCAA CGACGCGGTC CGCGGGGCGC CCGAGGAGAC CGGAGCCACC
721 TACGTGGACT TCTCCGGGGT GTCCGACGGC CACGACCGCT GCGAGGCCCC CGGCACCCCG
781 TGGATCGAAC CGCTGCTCTT CGGCGACAGC CTCGTTCGCG TCCACCCCAA CGCCCTGGGG
841 GAGCGCGCGA TGGCCGAGCA CACGATGGAC GTCCTCGGCC TGGACTGA

```

Фиг. 60 (SEQ ID No. 52)

```

1 TCAGTCCAGG CCGAGGACGT CCATCGTGTG CTCGGCCATG CGCCGCTCGC CCAGGGCGTT
61 GGGGTGGACG GGAACGAGGC TGTGCCGAA GAGCAGCGGT TCGATCCAGC GGGTGCCGGG
121 GGCCCTCGAG GCGTCGTGGC CGTCGGACAC CCCGGAGAAG TCCACGTAGG TGGCTCCGGT
181 CTCCCTCGGG GCGCGCCGGA CCGCGTCTGT GAGGTGTGCC TGGATGGCCC GCAGGTAGGG
241 CACGTACCCG GCGGCGAGGG GGAGCTTCAG GAAGCAGGAC GGGTCCGGCG TGGCCTGGGT
301 GATCCACGGG TAGCCGAGAG CCGCCACCCCT GGCCTGGGGA GCGCTGGCGC GGACGCCGAG
361 CAGCGCCTCC TTGAGCGCGG GGTACGTGTT GGCCTCGATC TCGTCTGCGA AGGAGGTGCC
421 GTGCTGTCTC TTGCAGGGGC TGCCCTTGCC GCGCTGAGG ACACCCGCGC TGCCTGAGGC
481 CGTGTGGCG TTGATGAAGG TGCTGTGTG GTTGCCGCGC ATGGTGAGCG TGACAGGTC
541 CGTGCCGGTG CCGAGCGCGT CCAACTGGGG TCGCAGCGCC GGGTACTGGG CCGCGCTGAA
601 GTCGGCGGTC TGCGCGGGCG CGCAGGTGAC GTCCGTGAGG CGGGCGCCCG TCGTGTCCGC
661 GATGACGTGG GGGTAGTTGG CCGTCGAGCG CAGACAGAGC AGGTTGGCGG GGTGACGGG
721 CAGGACGCCG GAGCGGGCGC TGTAGCTGTC GCCGAGGGCG ACGTAGTCCA GGGTCGGAGT
781 GGCCTGGGCG GCGCGCGGCT GCGCGGTGGC GTCCGTGAGG CCGAGGGCGA GCGTGCAGC
841 GCGCGCGACT GTCGCGGTCA TGACACGGCG AAGGGCAGGC TTCGGCAT

```

Фиг. 61 (SEQ ID No. 53)

```

1 ATGGATTACG AGAAGTTTCT GTTATTGGG GATTCCATTA CTGAATTGCG TTTTAATACT
61 AGGCCCATTG AAGATGGCAA AGATCAGTAT GCTCTTGAG CCGCATTAGT CAACGAATAT
121 ACGAGAAAAA TGGATATTCT TCAAAGAGGG TTCAAAGGGT ACCTTCTAG ATGGGCGTTG
181 AAAATACTTC CTGAGATTTT AAAGCATGAA TCCAATATTG TCATGGCCAC AATATTTTTC
241 GGTGCCAAGC ATGCATGCTC AGCAGGTCCC CAAAGTGTC CCCTCCCCGA ATTTATCGAT
301 AATATTCTGC AAATGGTATC TTTGATGAAG TCTTACCATA TCCGTCTAT TATAATAGGA
361 CCGGGGCTAG TAGATAGAGA GAAGTGGGAA AAAGAAAAAT CTGAAGAAAT AGCTCTCGGA
421 TACTTCCGTA CCAACGAGAA CTTTGCCATT TATTCCGATG CCTTAGCAAA ACTAGCAAT
481 GAGGAAAAAG TTCCCTTCTG GGCCTTGAAT AAGGCGTTTC AACAGGAAGG TGGTGTGCT
541 TGGAACAAC TGCTAACAGA TGGACTGCAC TTTTCCGGAA AAGGGTACAA AATTTTTCAT
601 GACGAATTAT TGAAGGTGAT TGAGACATTC TACCCCAAT ATCATCCCAA AAACATGCAG
661 TACAACTGA AAGATTGGAG AGATGTGCTA GATGATGGAT CTAACATAAT GTCTTGA

```

Фиг. 62 (SEQ ID No. 54)

```

atgaacctgc gtcaatggat gggcgccgcc acggctgccc ttgccttggg cttggcccg 60
tgcggggcg gtgggacga ccagagcggc aatcccaatg tcgccaagggt gcagcgcatg 120
gtgggttctg gcgacagcct gagcgatgc ggcacctaca ccccgctgc gcaggcggtg 180
ggcgccggca agttcacca caaccgggc ccgatctggg ccgagaccgt ggcgcgcaa 240
ctggcggtga cgtcacgcc ggcgggtgat ggtacgcca cctccgtgca gaattgcccc 300
aaggccggct gcttcgacta tgcgagggc ggctcgcgcg tgaccgatcc gaacggcatc 360
ggccacaacg gcggcgcggg ggcgctgacc taccgggttc agcagcagct cgccaacttc 420
tacggggcca gcaacaacac attcaacggc aataacgatg tcgtcttcgt gctggccggc 480
agcaacgaca ttttctctg gacctctgc gcggccacca gcggctccgg cgtgacggcc 540
gccattgcca cggccagggt gcagcaggcc gcgacggacc tggctcgcta tgtcaaggac 600
atgatcgcca aggggtcgac gcagggtctac gtgttcaacc tgcccagacg cagcctgacg 660
ccggacggcg tggcaagcgg cagcagcgcc caggcgctgc tgcacgcgct ggtgggacg 720
ttcaacacga cgtgcaaa ggggctggcc ggcacctcgg cgcgcatcat cgacttcaac 780
gcacaactga ccggcgcgat ccagaatggc gcctcgctcg gcttcgcca caccagcgcc 840
cgggcctcgg acgccacaa gatcaatgcc ctggtgccga gcgcggcgcg cagctcgctg 900
ttctgctcgg ccaaacagct ggtggcttcc ggtcgggacc agagctacct gttcgccgac 960
ggcgtagacc cgaccagcg cggccatcgc ctgatcgcca gcaacgtgct ggcgcgcctg 1020
ctggcggata acgtcgcgca ctga 1044

```

Фиг. 63 (SEQ ID No. 55)

```

1 gtgacgggt cgtacgtggc ggtgggggac agcttaccg agggcgctcg cgaccccgcc
61 cccgacgggg cgttcgtcgg ctggggcgac cggctcgccg tactgctcgc ggaccggcgc
121 cccgagggcg acttcacgta cacgaacctc gccgtgcgcg gcaggctcct cgaccagatc
181 ttggcggaac aggtcccgcg ggtcgtcggg ctccgcccgc acctcgtctc gttcggcgcg
241 ggcgccaacg acatcatcgc gcccggcacc gatcccgacg aggtcgccga gcggttcgag
301 ctggcggttg ccgcgctgac cgcgcgggcc ggaaccttcc tggtgaccac cgggttcgac
361 acccgggggg tgcccgtcct caagcacctg cgcggcaaga tcgccacgta caacgggac
421 gtcccgcgca tcgcgagcgc ctacggctgc ccggtgctcg acctgtggtc gctgcggagc
481 gtccaggacc gcagggcggt ggacggcgac cggctgcacc tgtcgccgga ggggcacacc
541 cgggtggcgc tgcgcggcg gcaggccctg ggctcgcgcg tcccgccga cctgaccag
601 ccttgccgc ccctgcccgc gcgcggcacg ctgacgttcc ggccgacga cgtgactgg
661 gcgcgcgagt acctggtgcc gtggatcggg cgcggcgctc ggggcgagtc gtcggcgac
721 caggtgacg ccaaggggac gctgtcgccg gacgccatca agacgcggat cgcgcggtg
781 gcctga

```

Фиг. 64 (SEQ ID No. 56)

```

1 atgcagacga acccccgcta caccagtctc gtgcgcgtcg gcgactcctt caccgagggc
61 atgtcggaac tgctgcccga cggctcctac cgtggctggg ccgaacctcct cgccacccg
121 atggcgggcc gtcctcccgc cttccggtac gccaaacctg cggtgccggg gaagtgtac
181 ggacagatcg tcgacgagca ggtggacgtg gccgcggcca tgggagccga cgtgatcacg
241 ctggtcgcgg ggtcacaaga cagcgtgcgg cccaagtgcg acatggcccg ggtcgggac
301 ctgctgaccc aggcctgga acggtcgcgc ccgactgcg agcagctggt gctgatgcgc
361 agtcccggtc gccagggtcc ggtgctggag cgttcccgcc cccgcatgga ggcctgttc
421 gccgtgatcg acgacctggc cggcgggcac ggcccggtg tcttcgacct gtacggggcc
481 cagtcgctgg ccgacctcgc gatgtgggac gtggaccggc tgcaacctgac cgcgagggc
541 caccgcccgg tcgcggaggc ggtgtggcag tcgctcgccc acgagccgga ggaccccgag
601 tggcacgcgc cgtaccgggc gacgcgcgc cgggggtggg tgacgcgcag gaccgaggac
661 gtccggttcg cccggcagca cctgctgccc tggataggcc gacggctgac cggcgctcg
721 tccgggggac gcctgcccgc caagcgcccg gacctgctgc cctacgagga ccccgacggc
781 tga

```

Фиг. 65 (SEQ ID No. 57)

```

1 atgacccggg gtctgacgg ggtgcccggg gcgccccca ccaagcaccg tgccctgctc
61 gcggcgatcg tcacctgat agtggcgatc tcgcgggcca tatacgcccg agcgtccgcg
121 gacgacggca gcagggacca cgcgctgcag gccggaggcc gtctcccacg aggagacgcc
181 gcccccgcgt ccaccgggtc ctgggtgggc gcctggggca ccgacccggc cgcggccgag
241 cccggcaccg agacgaccgg cctggcgggc cgtcccgctg gcaacgtcgt gcacacctcg
301 gtccggcgga ccggcgcgcg gatcacctc tcgaacctgt acgggcagtc gccgtgacc
361 gtacacacag cctcgatcgc cctggcccgc gggcccgaca ccgcccgcgc gatcgccgac
421 acctgcccgc ggctcacctt cggcgggcag gcccggtgta tcatcccggc gggcgccag
481 gtgatgagcg acaccgcccg cctcgccatc cctacgggg cgaacgtcct ggtcacacg
541 tactccccca tcccgtccgc gccggtgacc tactatccgc aggcccgga gaccagctac
601 ctggccgacg gcgacggcac ggcggcagtc accgcccgtc cgtacaccac cccacgccc
661 tactggcgct acctgaccgc cctcgacgtg ctgagccacg aggcgcagcg cacggctgtg
721 cgttccgctg actccatcac cgacggcgcc cgttcgcaga gcgacgcaa ccaccgctgg
781 accgacgtcc tcgcccgcag cctgcacgag gcggcgggcg acggccggga cagccccgc
841 tacagcgtcg tcaacgaggc catcagcggc aaccggctcc tgaccagcag gccggggcg
901 ccggccgaca acccgagcgg actgagccgg ttccagcggg cgtgctgga acgaccaa
961 gtcaaggccg tcgtcgtcgt cctcgcgctc aacgacgtcc tgaacagccc ggaactcgcc
1021 gaccgcgacg ccatcctgac cggcctgcgc accctcgtcg accggcgcca cgcggggcg
1081 ctgcgggtcg tcggcgccac gatcacgcgc ttccggcggt acggcggtc caccgaggcc
1141 cgcgagacga tgcggcagga ggtcaacgag gagatccgct ccggccgggt cttcgacacg
1201 gtctgctgact tcgacaaggc cctgcgcgac cgtacgacc cgcgccgat gcgctccgac
1261 tacgacagcg gcgaccacct gaccccggc gacaagggtt acgcgcgat gggcgcggtc
1321 atcgacctgg ccgcgctgaa gggcgcgcg ccggtcaagg cgtag

```

Фиг. 66 (SEQ ID No. 58)

```

1 atgacgagca tgtcgagggc gaggtggcg cggcggatcg cggcggcgcg ggcgtacggc
61 ggcggcgcca tggcctggc gggagcggcg gcggtcggtc tgggtggggc caggggtgacg
121 ctggccagac gcagggtggg ggtgggacg ccgaccggg tgccgaacgc gcagggactg
181 tacggcgcca ccctgccac ggccggcgac ccgcccgtgc ggtgatgat gctggggcgac
241 tccacggccg ccgggcaagg cgtgcaccgg gccgggcaga cggcgggcg gctgctggcg
301 tccgggctcg cggcggtggc ggagcggccg gtgcggtcg ggtcggtcgc ccagccgggg
361 gcgtgctcg acgacctgga ccggcagggtg gcgctgggtc tcgccgagcc ggaccgggtg
421 cccgacatct gcgtgatcat ggtcggcgcc aacgacgtca cccaccggat gccggcgacc
481 cgctcggtgc ggcacctgct ctcggcggtc cggcggtcgc gcacggcgcg tgcggagggtg
541 gtggtcggca cctgtccgga cctgggacg atcgagcggg tgcggcagcc gctgcgctgg
601 ctggcccgcc gggcctcacg gcagctcgcg gcggcacaga ccatcgcgcc cgtcgagcag
661 ggccggcgca cggtgctgct gggcgacctg ctgggtcccg agttcgcgca gaaccggcg
721 gagctcttcg gcccgcgaca ctaccacccc tccgcgcagg ggtacggcac ggcggcgatg
781 gcggtactgc cctcggtgtg cggcgcgctc ggcctgtggc cggccgacga ggagcacccg
841 gacgcgctgc gccgcgaggg ctctctgccc gtggcgcgcg cggcgcgga ggcggcgctc
901 gagggcggtg cggaggctcg cggcgccatg cctacggggc ctggggggcc ctggggcgctg
961 ctgaagcgcc ggagacggcg tcgggtgtcg gaggcggaac cgtccagccc gtcggcgctt
1021 tga

```

Фиг. 67 (SEQ ID No. 59)

```

1 atgggtcgag ggacggacca gcggacggcg tacggccgto gccggggcgcg tgtcgcgctc
61 gccgccccta ccgcccgcgt cctggggcgtg ggcgtggcg gctcgactc cgtggggcg
121 gactcacccc ctcttccgg cagcccgtcg aagcggacga ggacggcgcc cgcctgggac
181 accagcccgg cgtccgtcgc cgcgtggcg gactccatca cgcgcggtt cagcgctgt
241 gcggtgctgt cggactgccc ggagggtgtg tggcgacccg gcagcagcgc gaaggctgac
301 tcgctggccg tacggctgct ggggaaggcg gacggcgccg agcacagctg gaactacgcg
361 gtcaccgggg cccggatggc ggacctgacc gctcagggtg cggcgggcg gcagcgcgag
421 ccggagctgg tggcggtgat ggcggggcg aacgacgcgt gccggtccac gacctcgcg
481 atgacgcccg tggcgactt cggggcgca gttcgaggag cgtggccac cctgcgcaag
541 aagctcccca aggcgcagg gtactgtcg agcatcccgg acctcaagcg gctctgttcc
601 caggggcgca ccaaccgct gggaagcag gtgtggaagc tcggcctgtg cccgtcgatg
661 ctggggcgac cggactccct ggactcggcg gcgaccctgc ggcgcaacac ggtgcgcgac
721 cgggtggcg actacaacga ggtgtgctg gaggtctcg cgaaggaccg gcggtgccc
781 agcgagacg gcgcggtgca cgagttccg ttcggcacg accagttgag ccactgggac
841 tggttccacc cgagtggtga cggccaggcc cggctggcg agatcgcta ccgcgcggtc
901 accgcgaaga atccctga

```

Фиг. 68 (SEQ ID No. 60)

```

1 ttcatacaaa cgatgtcaca acaccggcca tccgggtcat ccctgatcgt gggaaatgggt
61 gacaagcctt cccgtgacga aagggtcctg ctacatcaga aatgacagaa atcctgtcta
121 gggaggttcc atgagactgt cccgacgcgc ggccacggcg tccgcgctcc tcctcacccc
181 ggcgctcgcg ctcttcggcg cgagcgccgc cgtgtccgc cgcgaatcc aggccaccga
241 ctacgtggcc ctccggcact cctactcctc ggggttcggc gcgggcagct acgacagcag
301 cagtggctcc tgtaagcgca gcaccaagtc ctaccggcc ctgtggggcg cctcgcaac
361 cggtagcgcg ttcaacttca ccgctgttc gggcgcccgc acaggagacg tgcgtggcaa
421 gcagctgacc ccggtcaact ccggcacga cctggtcagc attaccatcg gcggcaacga
481 cgcgggcttc gccgacacca tgaccacctg caacctccag ggcgagagcg cgtgcctggc
541 gcggtatgcc aaggcgcgcg cctacatcca gcagacgctg cccgcccagc tggaccagg
601 ctacgacgcc atcgacagcc gggccccgc agcccaggtc gtcgtcctgg gctacccgcg
661 ctcttacaag ctggggcgca gctgcgcgt cggctctctg gagaagtccc gcgcggccat
721 caacgccgcc gccgacgaca tcaacgccgt caccgccaa cgcgcggcg accacggctt
781 cgccttcggg gacgtcaaca cgaccttcgc cgggcacgag ctgtgctccg gcgcccttg
841 gctgcacagc gtcacccttc ccgtggagaa ctctaccac cccacggcca acggacagtc
901 caagggttac ctgcccgtcc tgaactccgc cacctgatct cgcggctact ccgccctga
961 cgaagtccc ccccgggcg gggcttcgct gtagggtgcg gtaccgccgt cgcggctcg
1021 gccggtggcc ccgcccgcg tgcgcgcgc cccggacgc gtcggttc

```

Фиг. 69 (SEQ ID No. 61)

```

1  ATGAAAAAAT GGTTCGTGTG TTTATTGGGA TTGGTCGGCG TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA CCAACACAC AAATAACCCT AACCAGCGCG ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC AGTCGCCCGC CCTTTTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG TCAGCGGGGC GGAAAAGGBC CTAGCACTAC AAGCCGCTGT

101 GCCTCTCCGA TACCGGCAAA ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT ATGGCCGTTT TACATGTCGT TCTACGCGCC AATGGAGGGG

151 TCCAGCCCGC CCTACTATGA GGGCCGTTTC TCCAACGGAC CCGTCTGGCT
   AGGTGCGGCG GGATGATACT CCCGGCAAAG AGGTTGCCTG GGCAGACCGA

201 GGAGCAGCTG ACCAAACAGT TCCCGGGTCT GACCATCGCC AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC TGGTTTGTC AAGGCCCAGA CTGGTAGCGG TTGCTTCGCC

251 AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
   TTCCGCCACG GTGACGGCAC CGAATGTTGT TCTAGAGGAC CTTAGGGTTC

301 TATCAGGTCA TCAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCTTGAGAAA
   ATAGTCCAGT AGTTGTTGGA CCTGATGCTC CAGTGGGTCA AGAAGCTCTT

351 AGACAGCTTC AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG
   TCTGTCGAAG TTCGGCCTGC TAGACCACTA GGAGACCCAG CCACGGTTAC

401 ACTATCTGGC CTATGGCTGG AACACGGAGC AGGATGCCAA GCGGGTTTCG
   TGATAGACCG GATACCGACC TTGTGCCTCG TCCTACGGTT CCCCCAAGCG

451 GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG GTACTGAACG GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT CGCTACGCGG GTTGGCGTAC CATGACTTGC CACGGTTCGT

501 GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCG TCAGCTCGCA
   CTATGACGAC AAGTTGGACG GCCTAGACCC GGTCTTGGGC AGTCGAGCGT

551 GTCAGAAGGT GGTGAGGCG GTCAGCCATG TCTCCGCCTA TCACAACCAG
   CAGTCTTCCA CCAGCTCCGC CAGTCGGTAC AGAGGCGGAT AGTGTTCGTC

601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT
   GACGACGACT TGGACCGTGC GGTGACCGCG GGGTGGCCGT ACCATTTCGA

651 GTTCGAGATC GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG CTGTTCTGTTA AACGGCTCTA CGACGCACTA GCGCTCTTGA

701 TCGGCCTGAG CGACGTCGAG AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC GCTGCAGCTC TTGGGGACGA TGCTGCCGCC GATACACACC

751 AAGCCGTTTG CCACCCGAGC CGTCAGCACC GACCGCCAGC TCTCCGCCTT
   TTCGGCAAC GGTGGGCGTC GCAGTCGTGG CTGGCGGTCT AGAGGCGGAA

801 CAGTCCGAGC GAACGCCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC CTTGCGGAGC GGTAGCGGCC GTTGGGCGAC GACCGTGTCC

851 CCGTTGCCAG TCCTATGGCC CGCCGCAGCG CCAGCCCCCT CAACTGTGAG
   GGCAACGGTC AGGATACCGG GCGGCGTCGC GGTGCGGGGA GTTGACACTC

901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTCTG TGCACGCAGC
   CCGTCTTACA AGACCTTAGT CCATGTGGGC TGGTGACAGC ACGTGCGCTCG

951 CCTGAGCGAG CGCGCCGCCA CCTTCATCGC GAACCAGTAC GAGTTCCTCG
   GGAATCGCTC GCGCGGCGGT GGAAGTAGCG CTTGGTCATG CTCAGGAGAG

1001 CCCAC TGA
     GGGTG ACT

```

Фиг. 70 (SEQ ID No. 62)

```

1  ATGAAAAAAT GGTTCGTTG TTTATTGGGG TTGATCGCGC TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA CCAAACAAC AAATAACCCC AACTAGCGCG ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC ACTCGCCCCG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG TGAGCGGGGC GGAAGAGGGC CTAGCACTAC AAGCCGCTGT

101 GCCTCTCCGA TACCGGCAA ATGTACAGCA AGATCGCGCG TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT ATGGCCGTTT TACATGTCGT TCTAGCGGCC AATGGAGGGG

151 TCCAGCCGCG CCTACTATGA GGGCCGTTTC TCCAACGGAC CCGTCTGGCT
   AGGTCGGGCG GGATGATACT CCCGGCAAAG AGGTGCGCTG GGCAGACCGA

201 GGAGCAGCTG ACCAAGCAGT TCCCGGGTCT GACCATCGCC AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC TGGTTCGTCA AGGGCCCAAG CTGGTAGCGG TTGCTTCGCC

251 AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
   TTCCGCCACG GTGACGGCAC CGAATGTTGT TCTAGAGGAC CTAGGGTTTC

301 TATCAGGTCA TCAACAACCT GGAATACGAG GTCACCCAGT TCTTGCAGAA
   ATAGTCCAGT AGTTGTTGGA CTGTATGCTC CAGTGGGTCA AGAACGTCTT

351 AGACAGCTTC AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG
   TCTGTGCAAG TTCGGCCTGC TAGACCACTA GGAGACCCAG CCACGGTTAC

401 ACTATCTGGC ATATGGCTGG AATACGGAGC AGGATGCCAA GCGAGTTGCG
   TGATAGACCG TATACCGACC TTATGCCCTG TCCTACGGTT CGCTCAAGCG

451 GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG GTCATGAACG GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT CGCTACGCCG GTTGGCGTAC CATGACTTGC CACGGTTCTG

501 GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCG TCAGCCCGCA
   CTATGACGAC AAGTTGGACG GCCTAGACCC GGTCTTGGGC AGTCGGCGGT

551 GTCAGAAGGT GGTGAGGCGC GTCAGCCATG TCTCCGCTA TCAACAACG
   CAGTCTTCCA CCAGCTCCGC CAGTCGGTAC AGAGGCGGAT AGTGTGTTTC

601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT
   GACGACGACT TGGACCGTGC GGTGACCGG GGTGCGCGT ACCATTTCGA

651 GTTCGAGATC GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG CTGTTGCTTA AACGGCTCTA CGACGCACTA GCGCTCTTGA

701 TCGGCCTGAG CGACGTCGAG AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGA
   AGCCGGACTC GCTGCAGCTC TTGGGGACGA TGCTGCCGCC GATACACACC

751 AAGCCGTTTG CCACCCGCGC CGTCAGCACC GACCGCCAGC TCTCCGCCTT
   TTCCGGCAAAC GGTGGGCGTC GCAGTCGTGG CTGGCGGTGC AGAGGCGGAA

801 CAGTCCGCGC GAACGCCCTC CCATCGCCGG CAACCCGCTG CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC CTTGCGGAGC GGTAGCGGCC GTTGGGCGAC GACCGTGTCC

851 CCGTTGCCAG TCCTATGGCC CGCCGCGAGC CCAGCCCCCT CAACTGTGAG
   GGCAACGGTC AGGATACCGG GCGGCGTCGC GGTGCGGGGA GTTGACACTC

901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTGC TGCACGCAGC
   CCGTTCTACA AGACCCTAGT CCATGTGGGC TGGTGACAGC ACGTGCCTCG

951 CCTGAGCGAG CGCGCCGCCA CCTTCATCGA GACCCAGTAC GAGTTCCTCG
   GGACTCGCTC GCGCGGCGGT GGAAGTAGCT CTGGGTCATG CTCAGGAGC

1001 CCCACGGATG A
      GGGTGCCTAC T

```

Фиг. 71 (SEQ ID No. 63)

1 ATGTTTAAAGT TAAAAAAGAA TTTCTTAGTT GGATTATCGG CAGCTTTAAT
 TACAAATTC AATTTTCTT AAAGAATCAA CCTAATAGCC GTCGAAATTA
 51 GAGTATTAGC TTGTTTTCGG CAACCGCCTC TGCAGCTAGC GCCGACAGCC
 CTCATAATCG AACAAAAGCC GTTGGCGGAG ACGTCGATCG CGGCTGTCGG
 101 GTCCCGCCTT TTCCCGGATC GTGATGTTCG GCGACAGCCT CTCCGATACC
 CAGGGCGGAA AAGGGCCTAG CACTACAAGC CGCTGTCGGA GAGGCTATGG
 151 GGCAAAATGT ACAGCAAGAT GCGCGGTAC CTCCCCTCCA GCCCGCCCTA
 CCGTTTTACA TGTCGTTCTA CGCGCCAATG GAGGGGAGGT CGGGCGGGAT
 201 CTATGAGGGC CGTTTCTCCA ACGGACCCGT CTGGCTGGAG CAGCTGACCA
 GATACTCCCG GCAAAGAGGT TGCTGGGCA GACCGACCTC GTCGACTGGT
 251 AACAGTTCCC GGGTCTGACC ATCGCCAACG AAGCGGAAGG CGGTGCCACT
 TTGTCAAGGG CCCAGACTGG TAGCGGTTGC TTCGCTTCC GCCACGGTGA
 301 GCGGTGGCTT ACAACAAGAT CTCCTGGAAT CCCAAGTATC AGGTCATCAA
 CGGCACCGAA TGTGTTCTA GAGGACCTTA GGGTTCATAG TCCAGTAGTT
 351 CAACCTGGAC TACGAGGTCA CCCAGTTCTT GCAGAAAGAC AGCTTCAAGC
 GTTGACCTG ATGCTCCAGT GGGTCAAGAA CGTCTTCTG TCGAAGTTGG
 401 CGGACGATCT GGTGATCCTC TGGGTGCGTG CCAATGACTA TCTGGCCTAT
 GCCTGCTAGA CCACTAGGAG ACCCAGCCAC GGTACTGAT AGACCGGATA
 451 GGCTGGAACA CGGAGCAGGA TGCCAAGCGG GTTCGCGATG CCATCAGCGA
 CCGACCTTGT GCCTCGTCCT ACGGTTCGCC CAAGCGCTAC GGTAGTCGCT
 501 TGCGGCCAAC CGCATGGTAC TGAACGGTGC CAAGCAGATA CTGCTGTTCA
 ACGCCGGTTG GCGTACCATG ACTTGCCACG GTTCGCTTAT GACGACAAGT
 551 ACCTGCCGGA TCTGGGCCAG AACCCGTCAG CTCGCAGTCA GAAGGTGGTC
 TGGACGGCCT AGACCCGGTC TTGGGCAGTC GAGCGTCAGT CTTCACCAG
 601 GAGGCGGTCA GCCATGTCTC CGCCTATCAC AACCAAGCTG TGCTGAACCT
 CTCCGCCAGT CGGTACAGAG GCGGATAGTG TTGGTCGACG ACGACTTGA
 651 GGCACGCCAG CTGGCCCCCA CCGGCATGGT AAAGCTGTTT GAGATCGACA
 CCGTGCGGTG GACCGGGGGT GGGCGTACCA TTTCGACAAG CTCTAGCTGT
 701 AGCAATTGTC CGAGATGCTG CGTGATCCGC AGAACTTCGG CCTGAGCGAC
 TCGTTAAACG GCTCTACGAC GCACTAGGCG TCTTGAAGCC GGAATCGCTG
 751 GTCGAGAACC CCTGCTACGA CGGCGGCTAT GTGTGGAAGC CGTTTGGCAC
 CAGCTCTTGG GGACGATGCT GCCGCCGATA CACACCTTCG GCAAACGGTG
 801 CCGCAGCGTC AGCACCAGCC GCCAGCTCTC CGCCTTCAGT CCGCAGGAAC
 GCGCTCGCAG TCGTGGCTGG CGGTGAGAG GCGGAAGTCA GCGCTCCTTG
 851 GCCTCGCCAT CGCCGGCAAC CGCTGCTGG CACAGGCCGT TGCCAGTCTT
 CCGAGCGGTA GCGGCCGTTG GCGACGACC GTGTCCGGCA ACGGTCAGGA
 901 ATGGCCCGCC GCAGCGCCAG CCCCCAAC TGTGAGGGCA AGATGTTCTG
 TACCGGGCGG CGTCGCGGTC GGGGGAGTTG ACACCTCCGT TCTACAAGAC
 951 GGATCAGGTA CACCCGACCA CTGTCGTGCA CGCAGCCCTG AGCGAGCGCG
 CCTAGTCCAT GTGGGCTGGT GACAGCAGT GCGTCGGGAC TCGCTCGCGC
 1001 CCGCCACCTT CATCGCGAAC CAGTACGAGT TCCTCGCCCA CTGATGA
 GCGGGTGGA GTAGCGCTTG GTCATGCTCA AGGAGCGGGT GACTACT

Фиг. 72 (SEQ ID No. 24)

1 ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPPLT
 61 IANEAEAGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFPDDLVL VVGANDYLAY
 121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LFLNLPDLGQ NPSARSQKVV EAVSHVSAYH
 181 NKLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPF
 236 RSASPLNCEG KMFWDQVHPT TVVHAALSER AATFIETQYE FLAAG

Фиг. 73 (SEQ ID No. 68)

ОБЩЕПРИНЯТЫЙ СПОСОБ (только для сравнения)

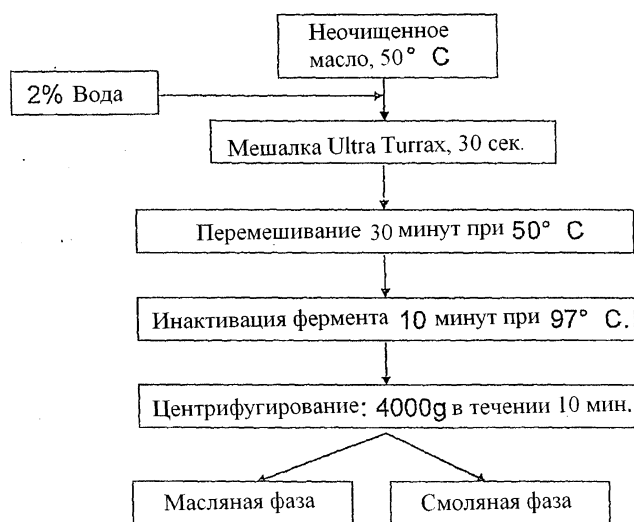


Фиг. 74а

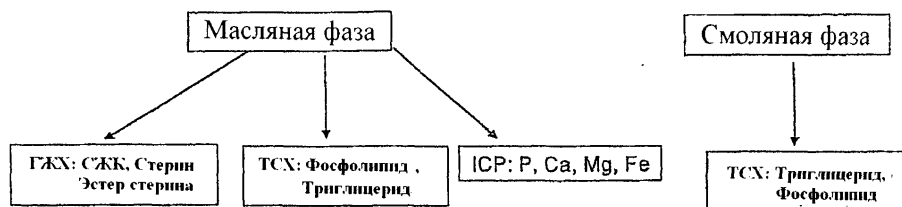
СПОСОБ В СООТВЕТСТВИИ С ИЗОБРЕТЕНИЕМ



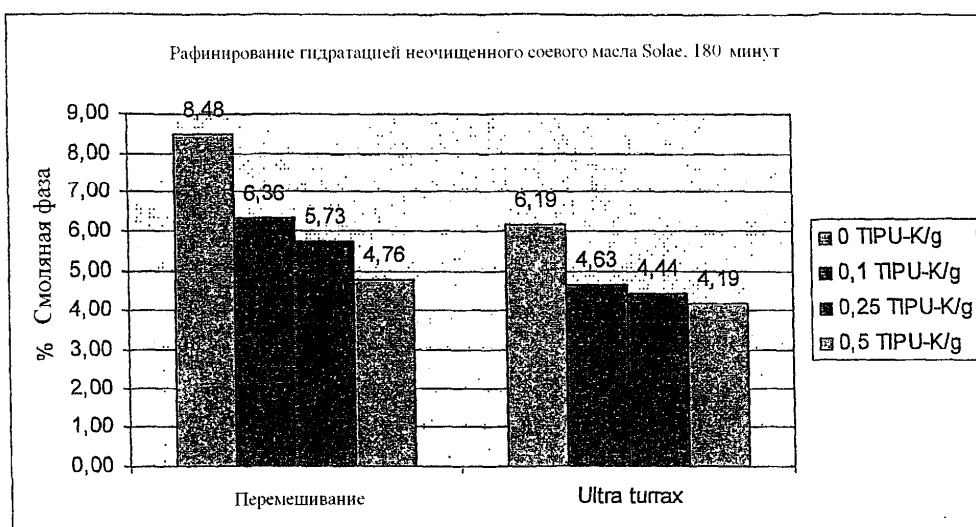
Фиг. 74b



Фиг. 75

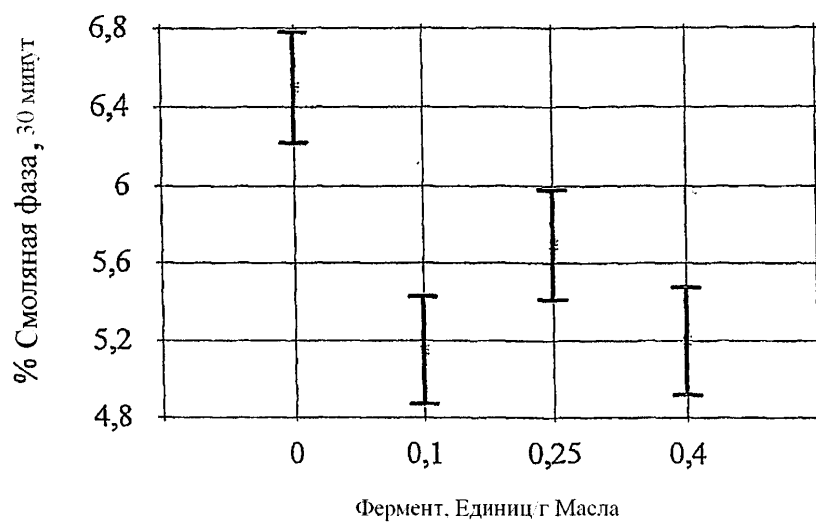


Фиг. 76



Фиг. 77

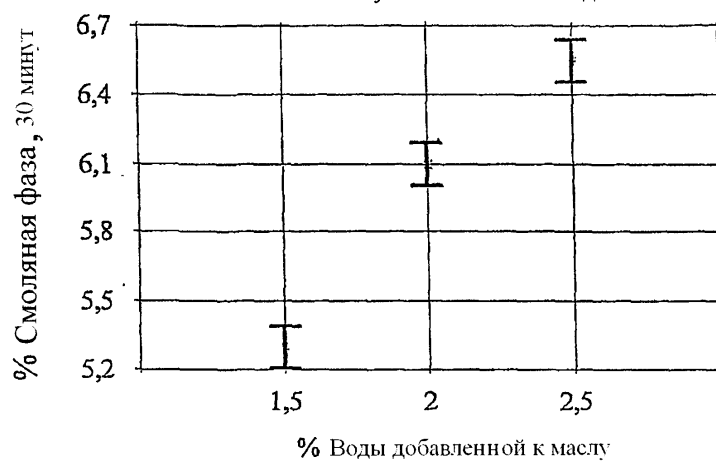
Рафинирование гидратацией неочищенного соевого масла, SBO2



Фиг. 78

Рафинирование гидратацией неочищенного соевого масла

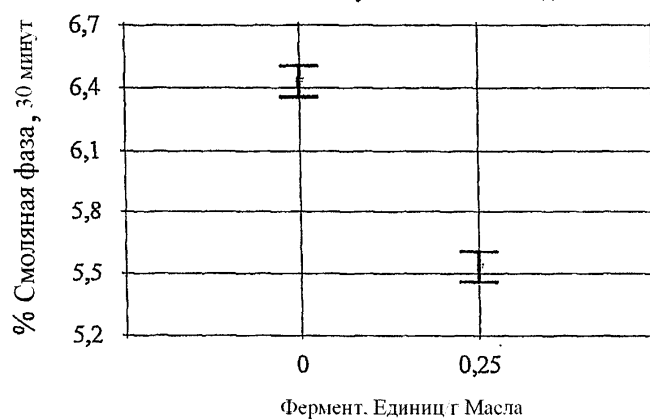
SBO2 с 1.5, 2.0 или 2.5% воды



Фиг. 79

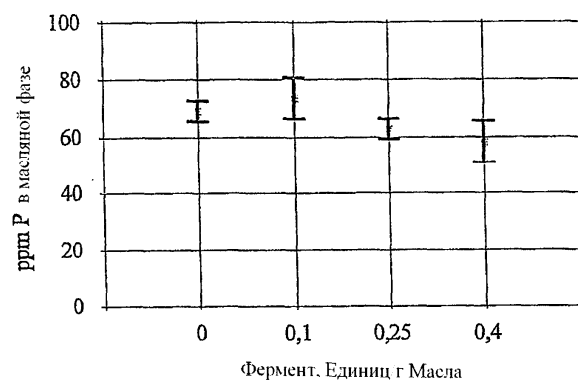
Рафинирование гидратацией неочищенного соевого масла

SBO2 с 1.5, 2.0 или 2.5% воды



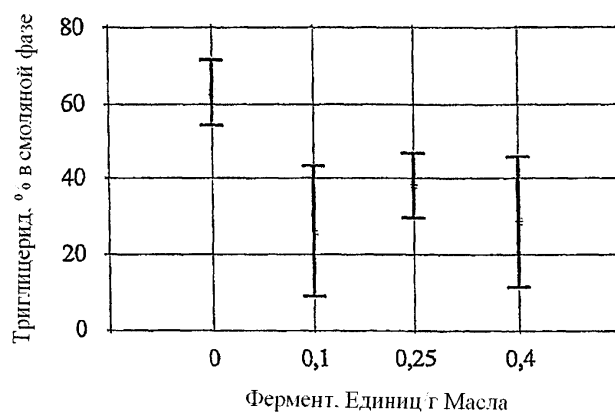
Фиг. 80

Рафинирование гидратацией неочищенного соевого масла, SBO 2



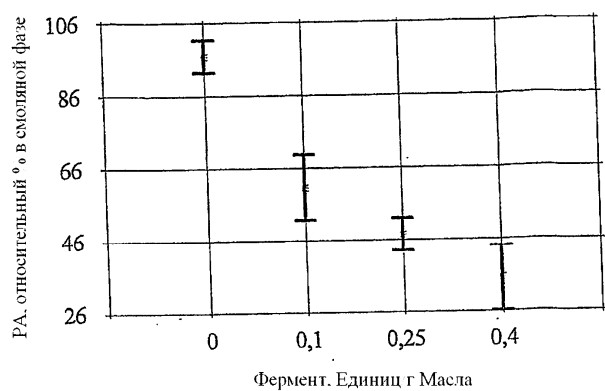
Фиг. 81

Рафинирование гидратацией
неочищенного соевого масла, SBO 2



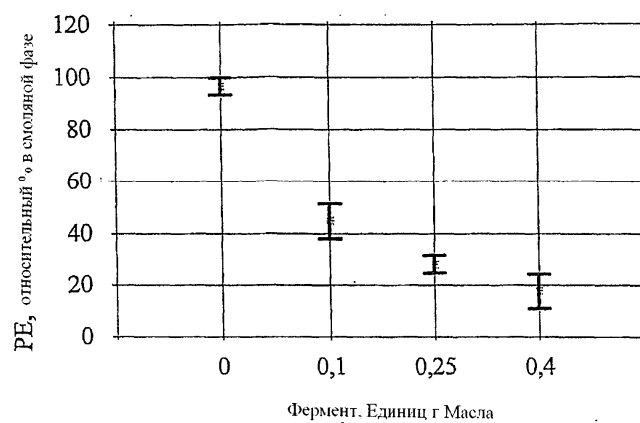
Фиг. 82

Рафинирование гидратацией
неочищенного соевого масла, SBO 2

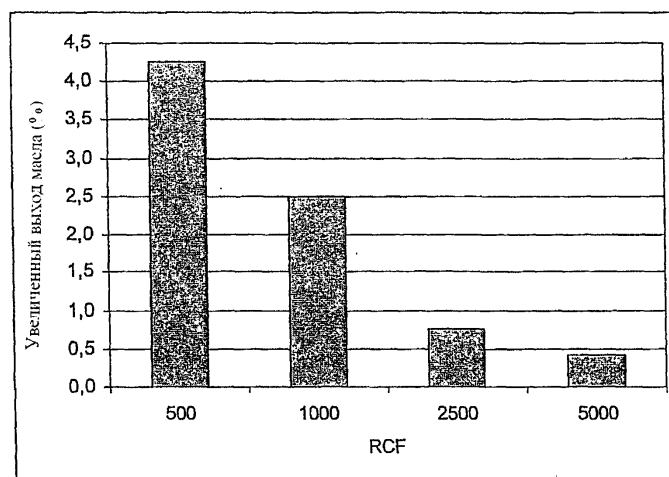


Фиг. 83

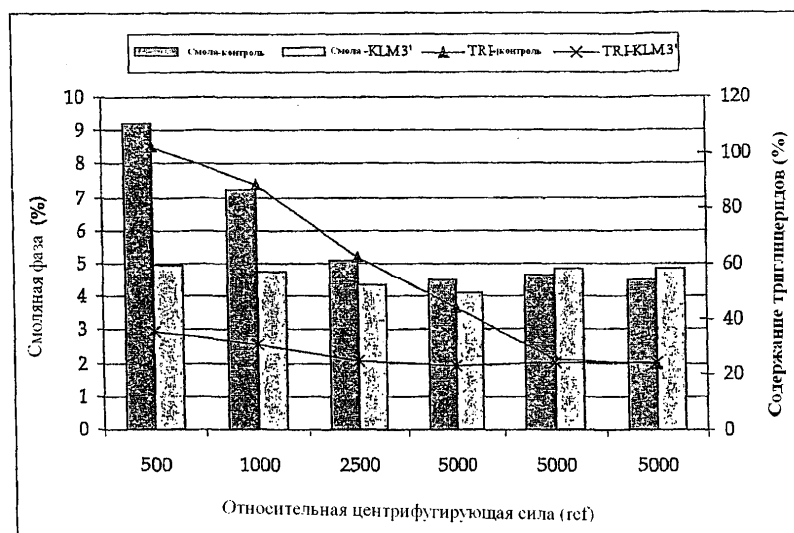
Рафинирование гидратацией
неочищенного соевого масла, SBO 2



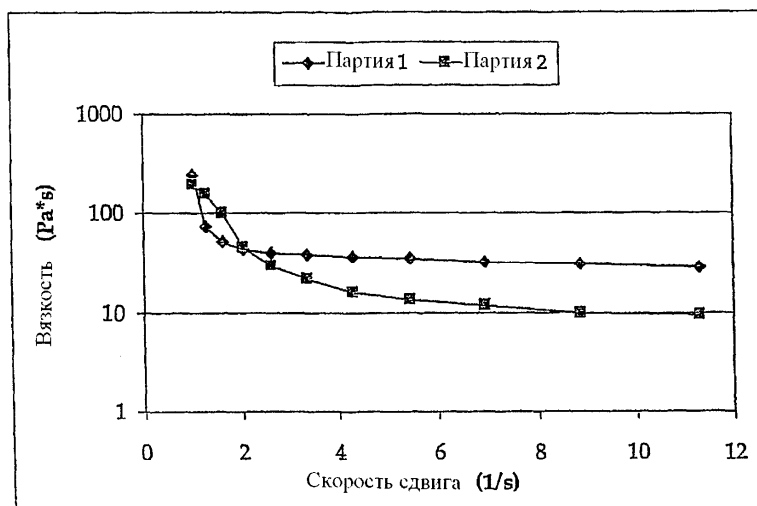
Фиг. 84



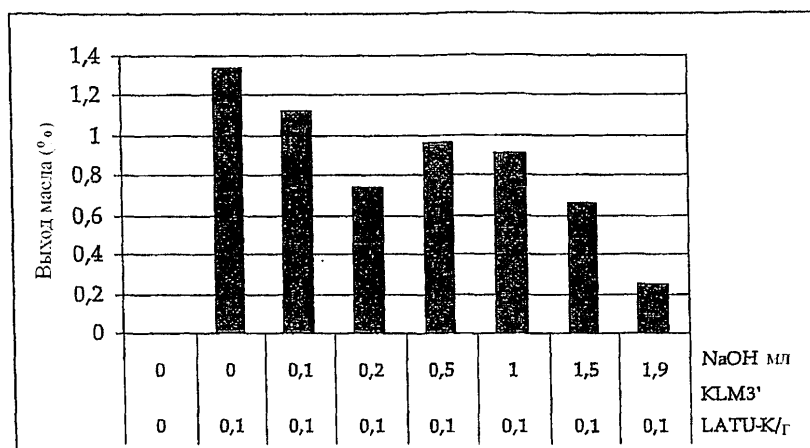
Фиг. 85



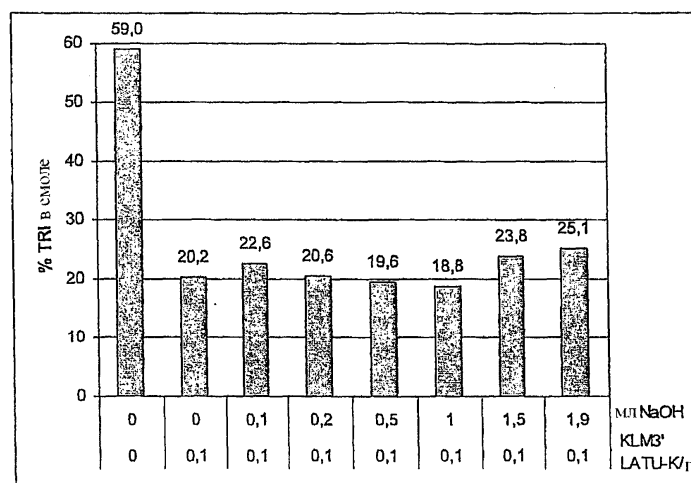
Фиг. 86



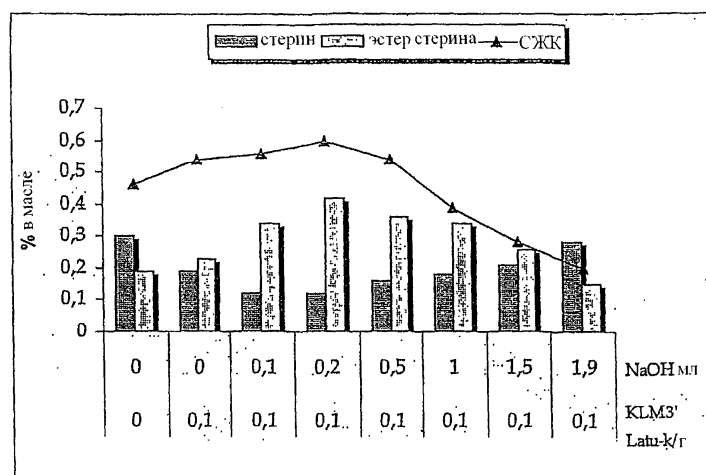
Фиг. 87



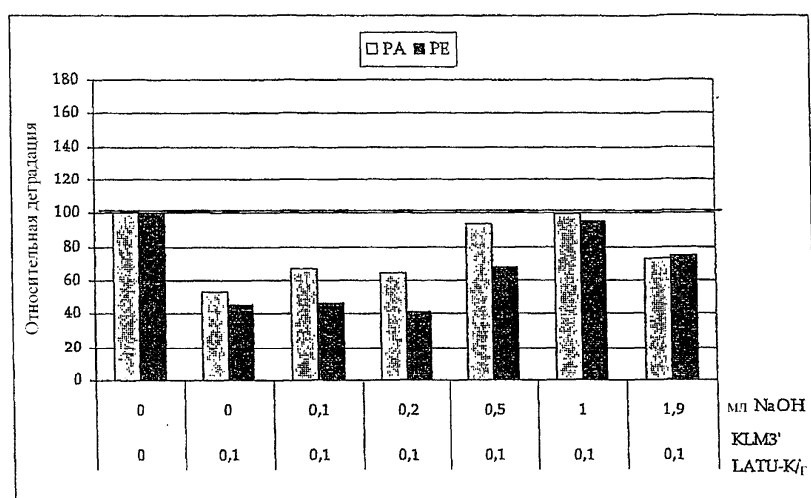
Фиг. 88



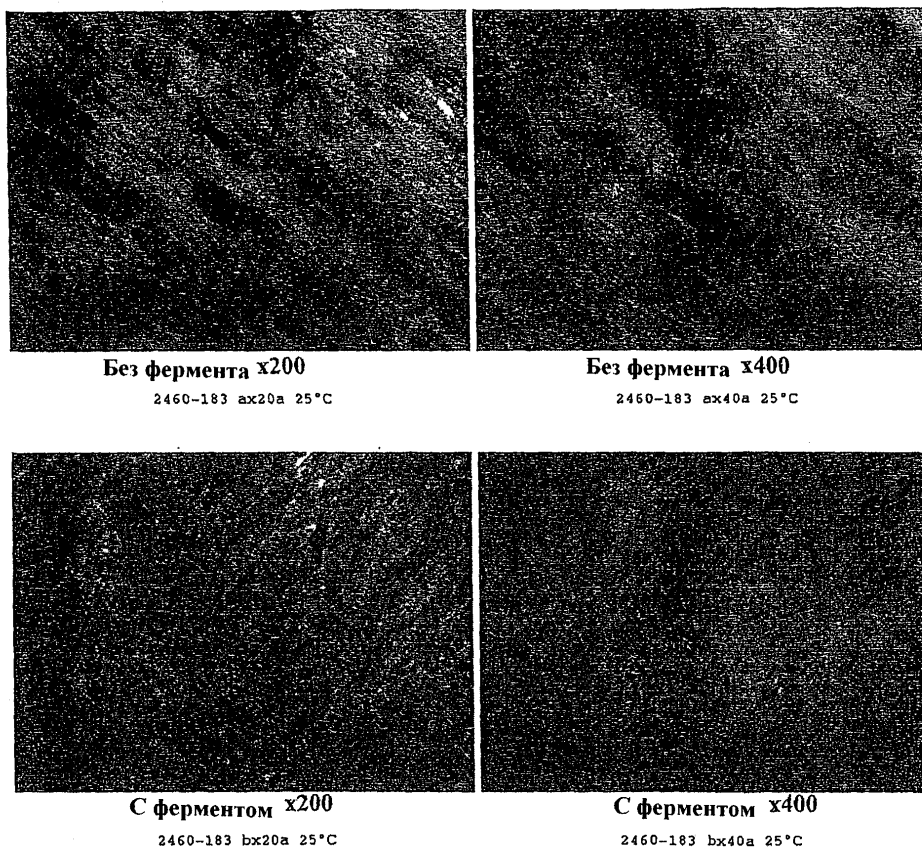
Фиг. 89



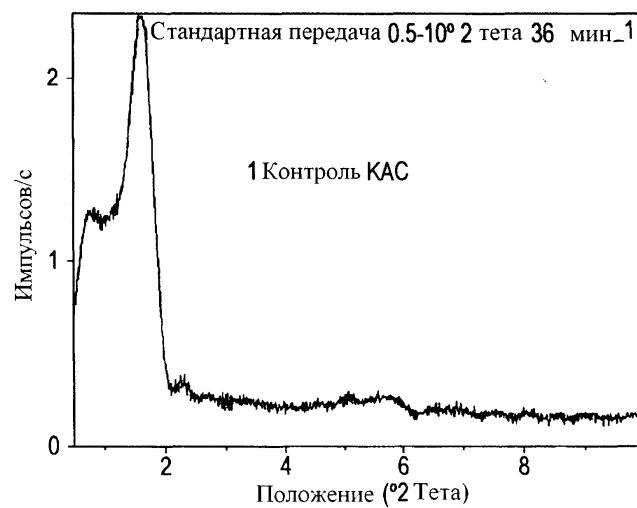
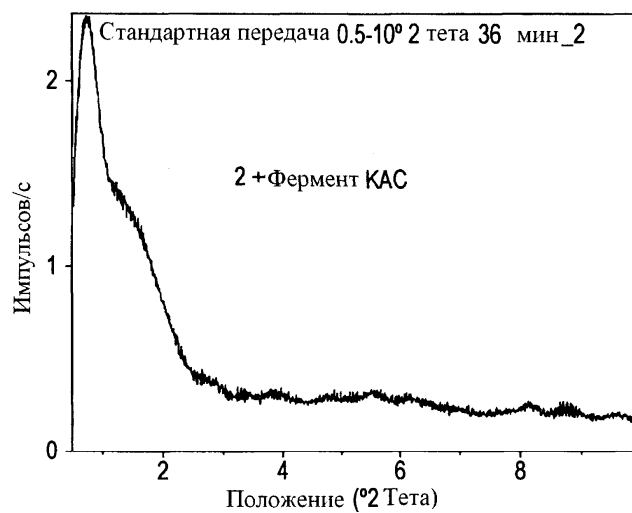
Фиг. 90



Фиг. 91



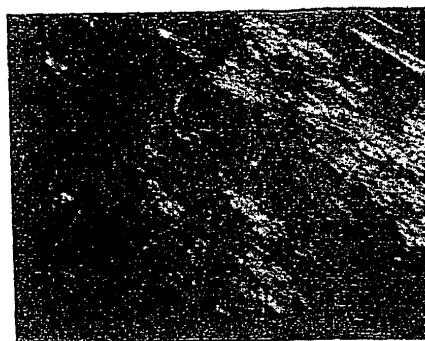
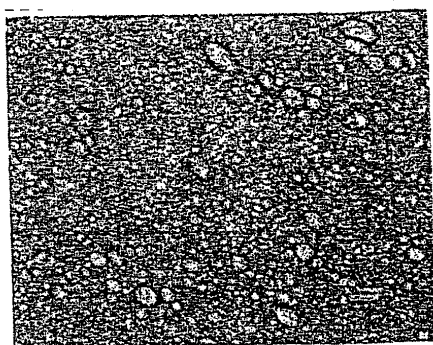
Фиг. 92



Фиг. 93



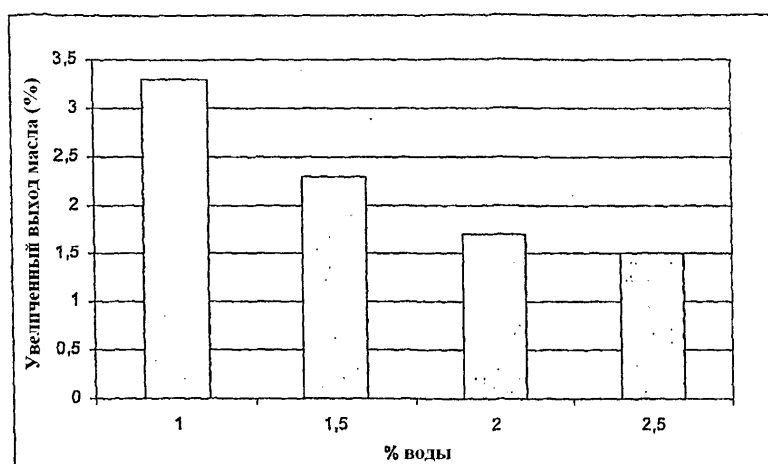
Фиг. 94



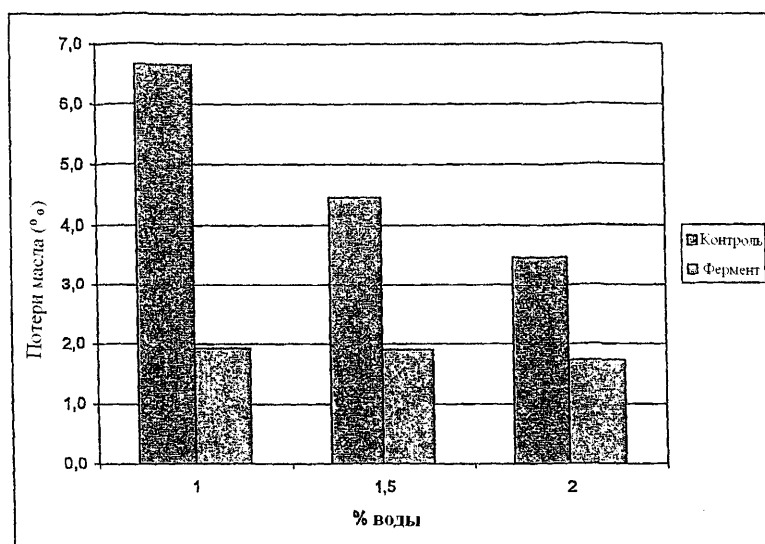
С ферментом

Без фермента

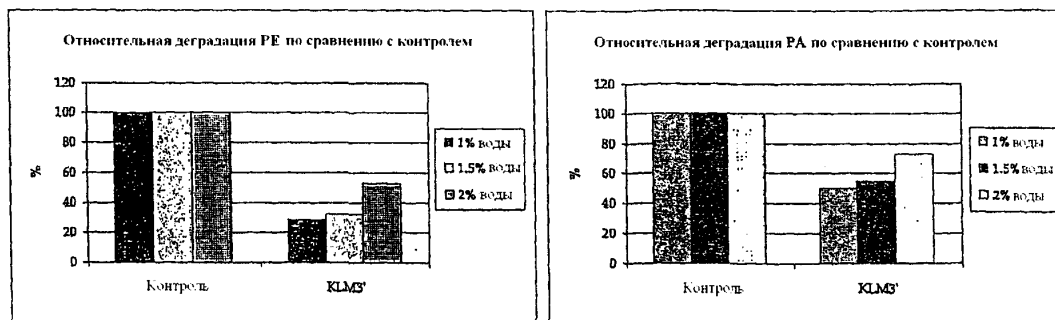
Фиг. 95



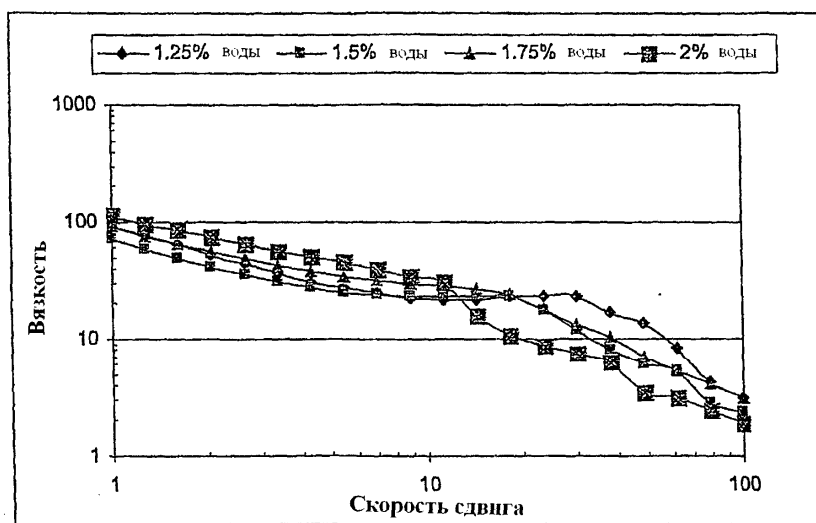
Фиг. 96



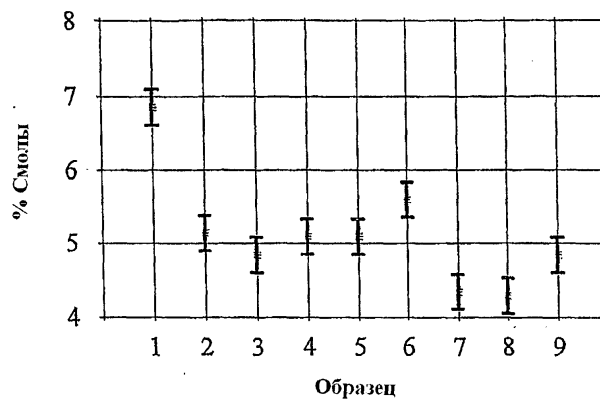
Фиг. 97



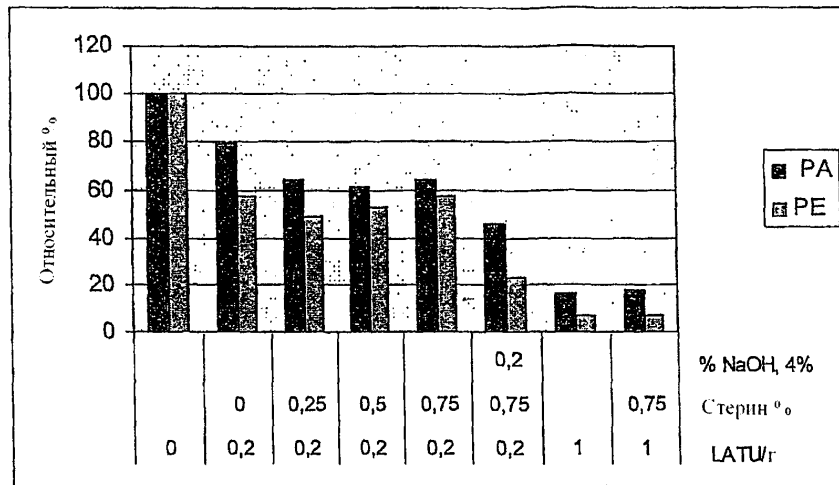
Фиг. 98



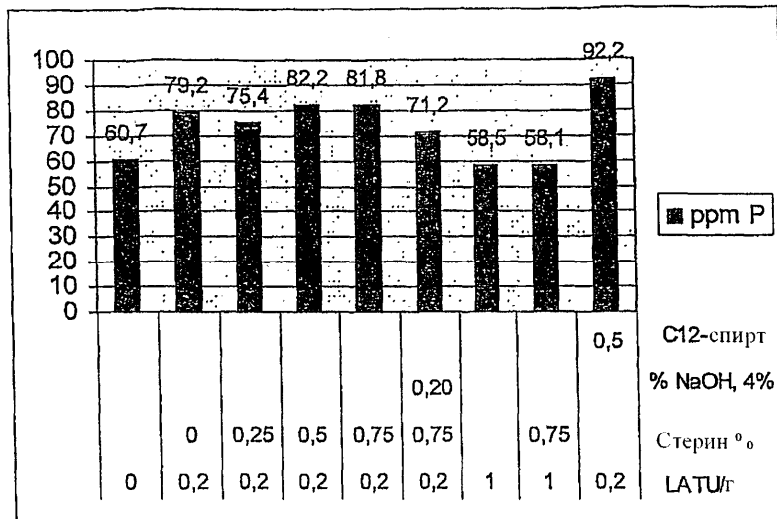
Фиг. 99



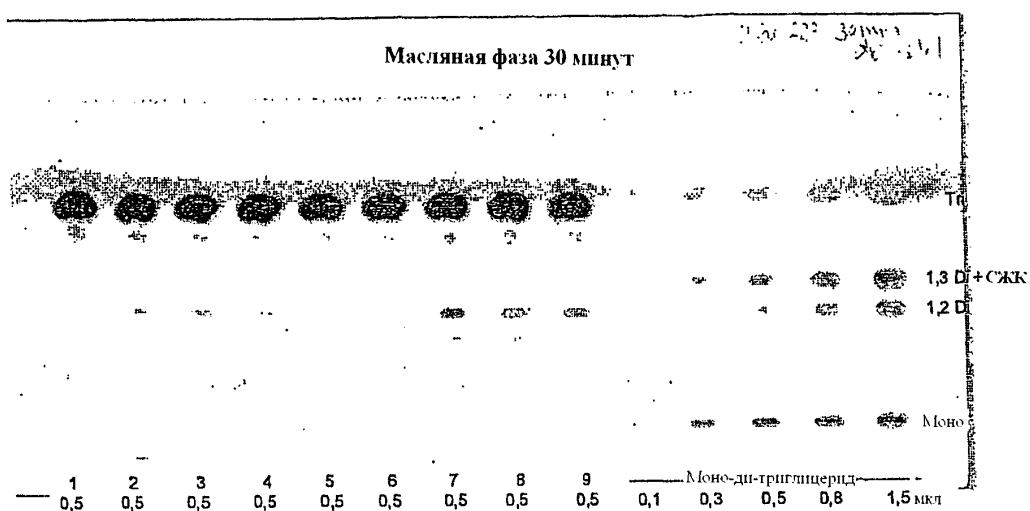
Фиг. 100



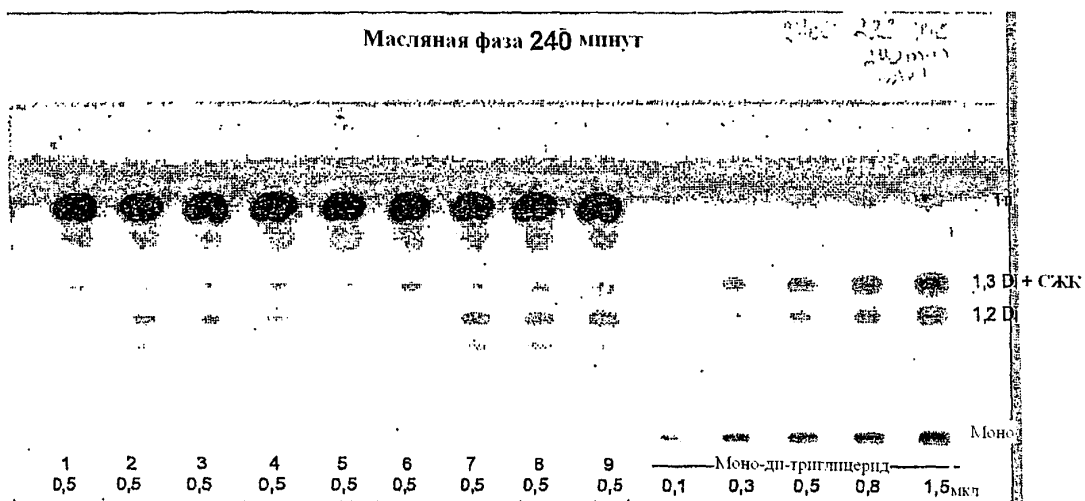
Фиг. 101



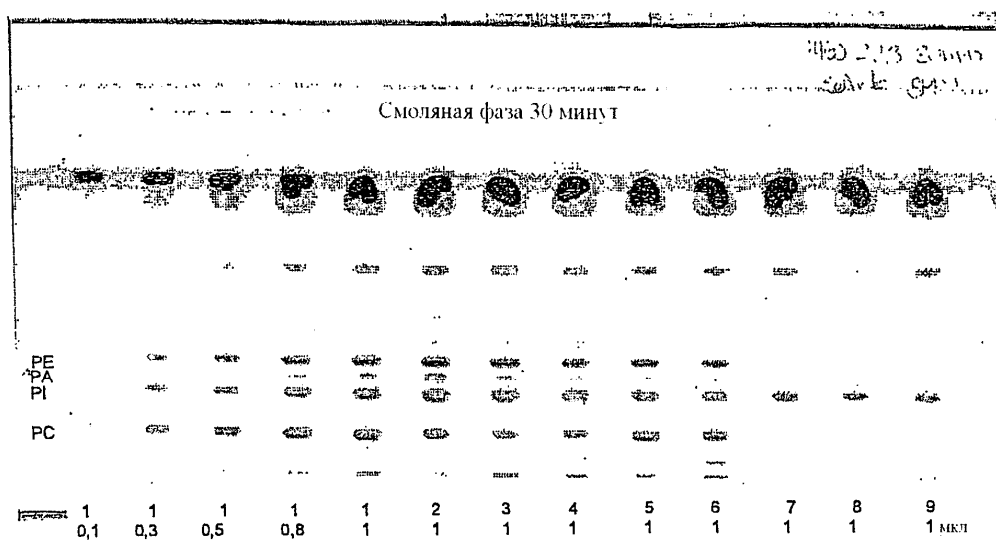
Фиг. 102



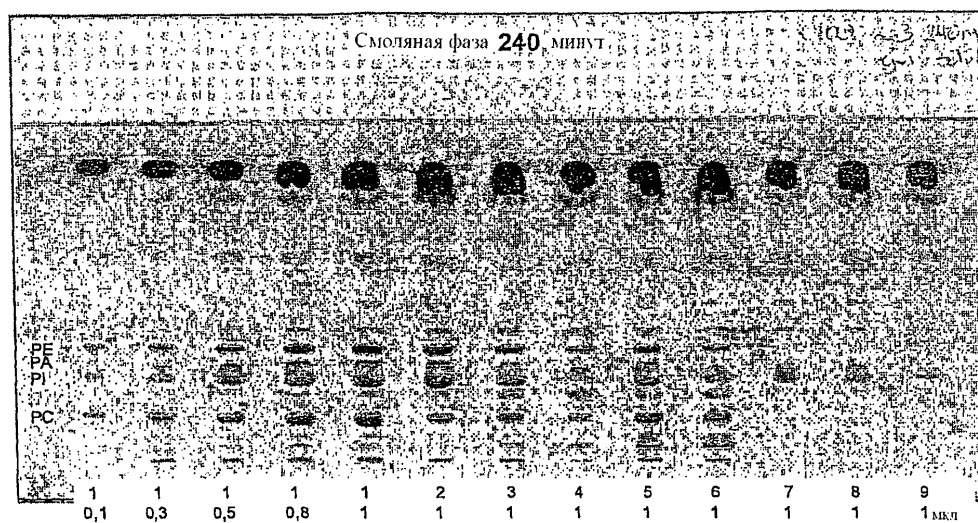
Фиг. 103



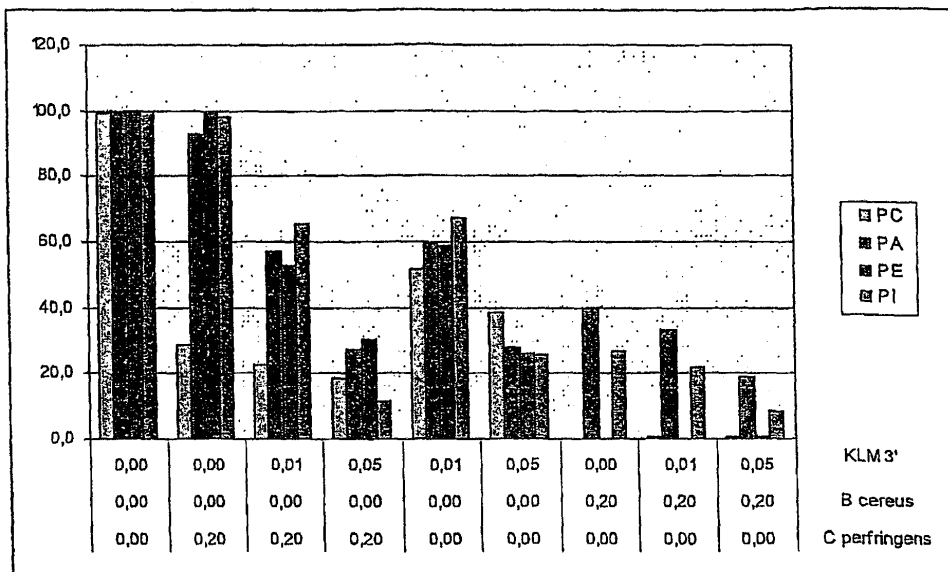
Фиг. 104



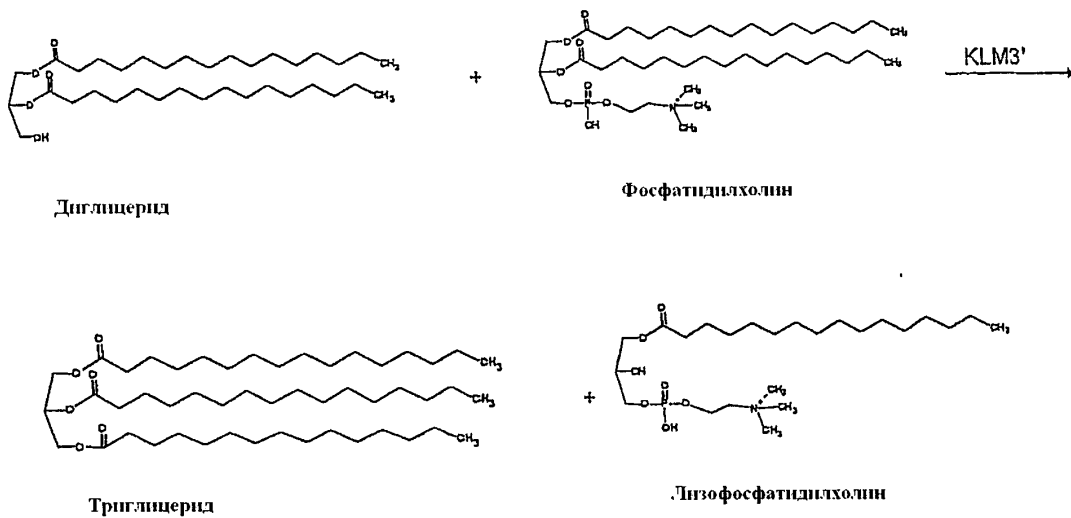
Фиг. 105



Фиг. 106

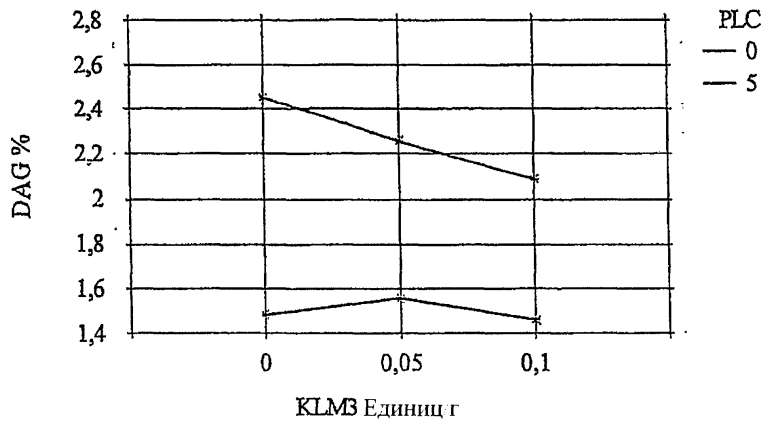


Фиг. 107

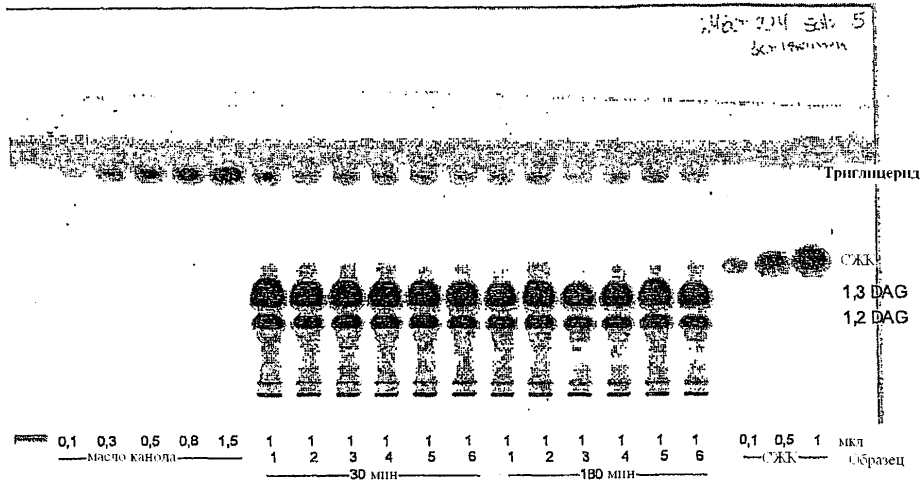


ФИГ. 108

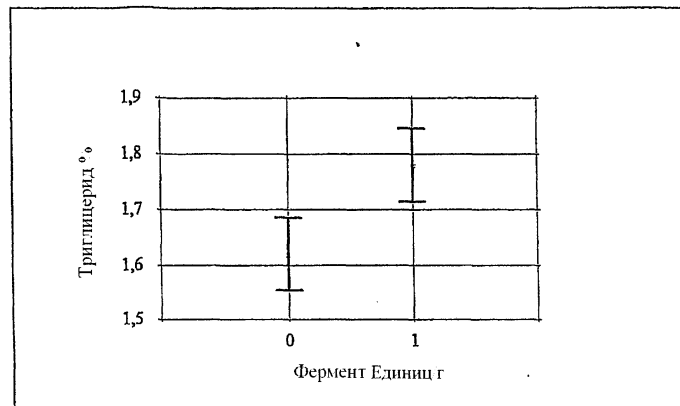
Діаграма взаємодії



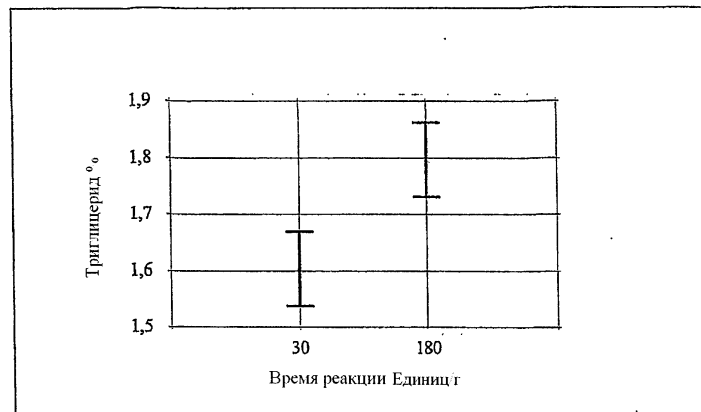
ФИГ. 109



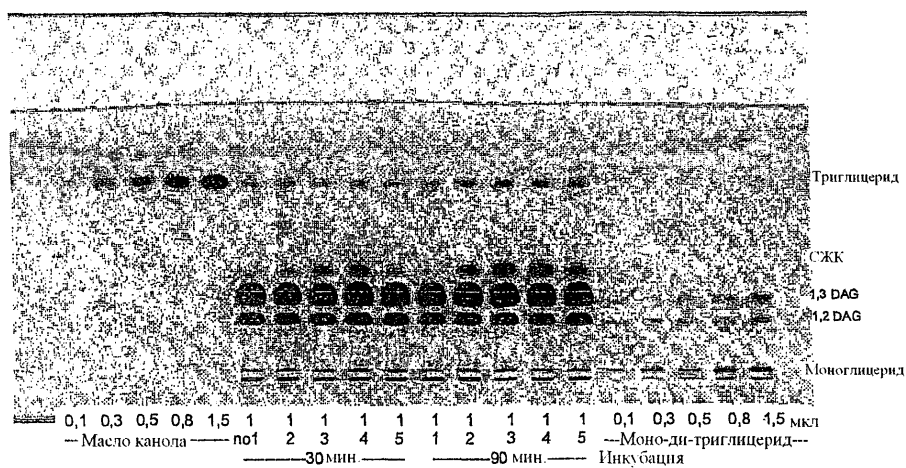
Фиг. 110



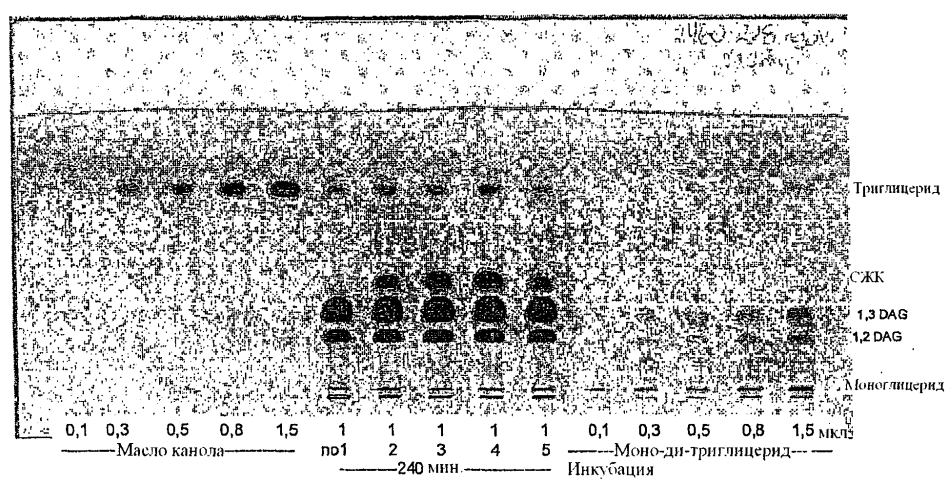
Фиг. 111



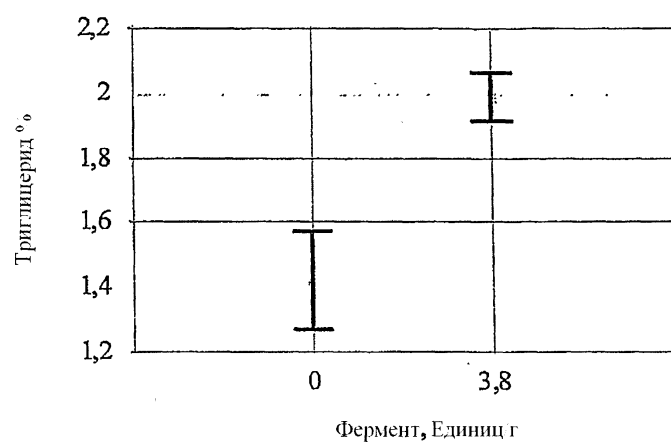
Фиг. 112



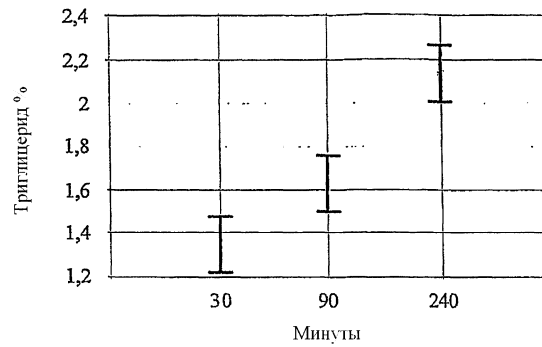
Фиг. 113



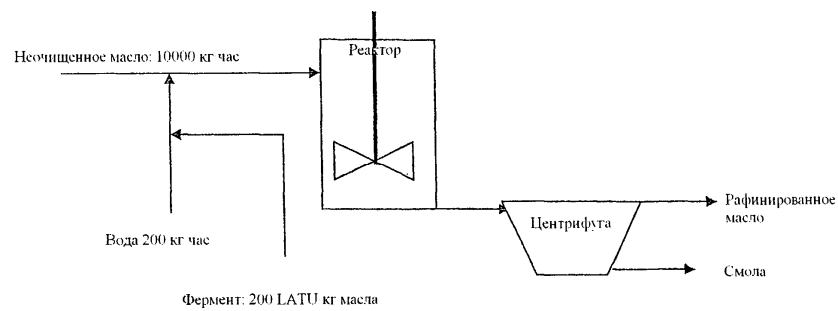
Фиг. 114



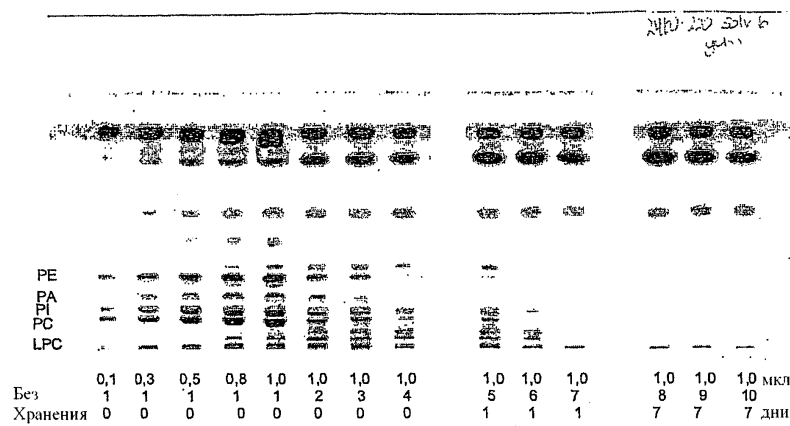
Фиг. 115



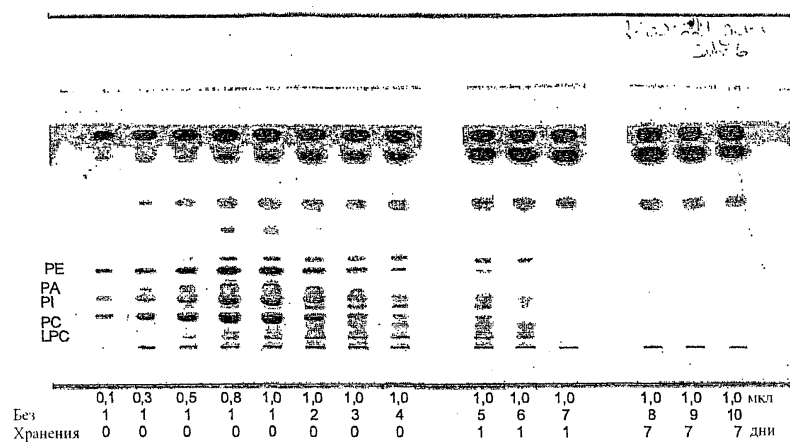
Фиг. 116



ФИГ. 117



ФИГ. 118



Фиг. 119