

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 1092/2012
(22) Anmeldetag: 09.10.2012
(43) Veröffentlicht am: 15.04.2014

(51) Int. Cl.: **C12N 9/14** (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
WO 9822602 A1
WO 2008053232 A2

(71) Patentanmelder:
ERBER AKTIENGESELLSCHAFT
3130 HERZOGENBURG (AT)

(72) Erfinder:
Schatzmayr Gerd
3430 Tulln (AT)

Binder Eva-Maria
3430 Tulln (AT)

Thamhesl Michaela
7563 Königsdorf (AT)

Moll Dieter
2000 Stockerau (AT)

(74) Vertreter:
CUNOW PATENTANWALTS KG
WIEN

(54) **Enzympräparation zur Transformation von Ergopeptinen, Verfahren hierfür und Futtermittel sowie Futtermittel- oder Silagezusatz enthaltend dieselbe**

(57) Bei einer Enzympräparation zur Transformation von Ergopeptinen ist wenigstens eine Ergopeptine aus Cyclolring hydrolytisch spaltende α/β Hydrolase und wenigstens eine Abbauproduktion der hydrolytischen Spaltung transformierende Amidase enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung derselben und ein Futtermittel- und Silagezusatz.

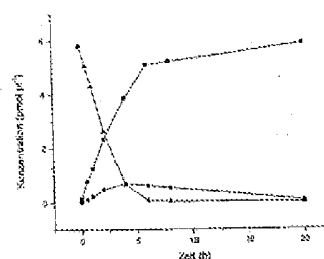


FIG. 1

Umweltung von Ergotamin durch das Enzym der Sequenz ID Nr. 1 (▲) (Ergotamin); (■) Ergin; (●) Zwischenprodukt.

000510

- 26 -

Zusammenfassung:

Bei einer Enzympräparation zur Transformation von Ergopeptinen ist wenigstens eine Ergopeptine aus Cyclolring hydrolytisch spaltende α/β Hydrolase und wenigstens eine Abbau-
produktion der hydrolytischen Spaltung transformierende Amidase enthalten, sowie Verfahren
zur Herstellung derselben und ein Futtermittel- und Silagezusatz.

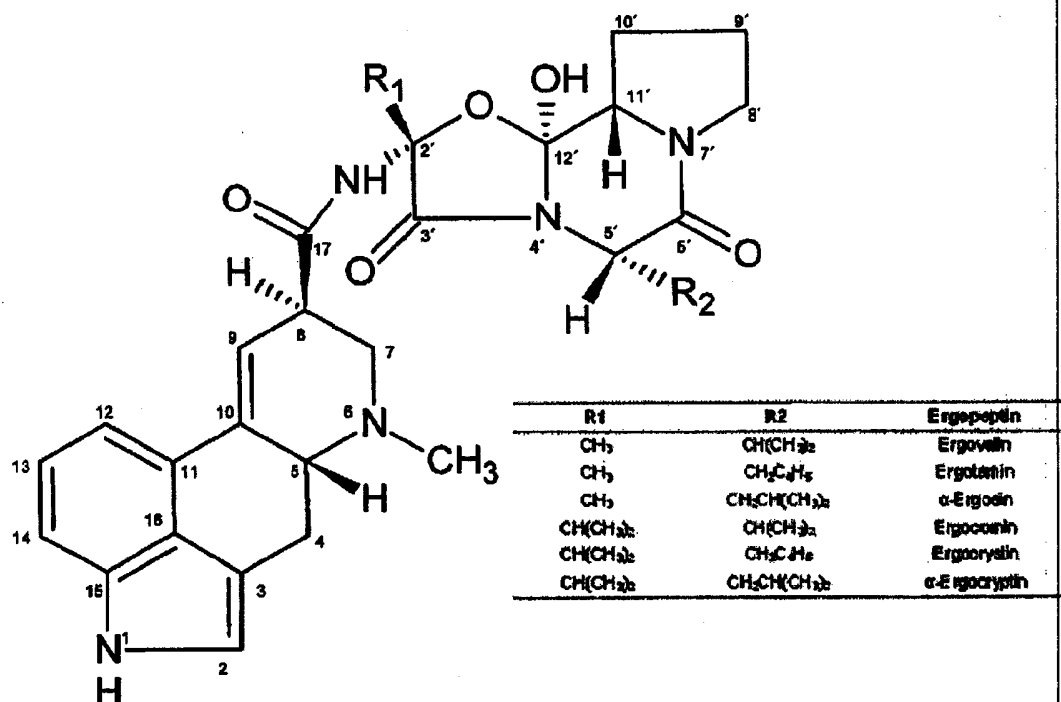
(Fig. 1)

003510

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine Enzympräparation zur Transformation von Ergopeptinen, auf ein Verfahren zur enzymatischen Transformation von Ergopeptinen in einen wenig-vasokonstriktiven Metaboliten, insbesondere in Lysergsäure sowie auf ein Futtermittel sowie Futtermittel- oder Silagezusatz.

Ergopeptine sind eine Gruppe der Ergotalkaloide und sind überdies sekundäre Stoffwechselprodukte, welche von mit Pflanzen assoziierten Pilzen der Gattung *Claviceps*, welche zur Familie der Clavicipitaceae gehören, gebildet werden. Hauptvertreter dieser Gattung ist *Claviceps purpurea*, welches vor allem Getreide, wie Roggen, Weizen, Triticale, Gerste und Mais befällt. Ein anderer Vertreter, nämlich *Claviceps africana* ist weit verbreitet in Hirse zu finden. Weitere Ergotalkaloide produzierende Pilze dieser Familie sind die Grasendophyten der Gattung *Epichloë*, *Neotyphodium* und *Balanisia*, aber auch *Aspergillus fumigatus* und diverse *Penicillium* spp. können Ergotalkaloide produzieren.

Allgemein haben die Ergotalkaloide einen tetrazyklischen Ergolinring als charakteristisches Grundgerüst, welcher an Position 6 einen methylierten Stickstoff hat und an Position C-8 verschiedene Substituenten aufweisen kann. Basierend auf diesen Substituenten werden Ergotalkaloide unterteilt in Clavine, einfache Lysergsäureamide, Ergopeptine und Ergopeptame.



Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Neurotransmittern interagieren Ergotalkaloide mit deren Rezeptoren und verursachen eine Vielzahl an Effekten, wie z.B. Vergiftungen, aber auch positive Wirkungen im pharmazeutischen Bereich. Heute stellen Ergotalkaloide aufgrund

009510

- 2 -

verbesserter Reinigungsmethoden in Mühlen im Humanbereich kein Problem mehr dar. Allerdings stellen sie in der Tierzucht nach wie vor ein Problem dar und verursachen eine Mehrzahl von nachteiligen Symptomen. Insbesondere zählen zu den bei Tieren durch Ergotalkaloide verursachten Symptomen Gängränne, Lahmheit, eine reduzierte Gewichtszunahme, eine erhöhte Atemfrequenz, Reduktion des Gehalts an Serumprolaktin, reduzierte Milchproduktion und ein geringerer Reproduktionserfolg (Strickland et al., 2011). Hierbei stellen vor allem die Endophyten in Weidegräsern in Amerika, Neuseeland und Australien ein Problem für die Viehzucht dar. So verursachte die Infektion von Rohrschwengel durch den Endophyten *Neotyphodium coenophialum* hohe Verluste für die Nutztierproduzenten.

Für einen Großteil der oben beschriebenen Effekte bzw. bewirkten Symptome sind die Ergopeptine, welche die formenreichste Gruppe der Mutterkornalkaloide darstellen, verantwortlich, welche selbst wiederum nach der unmittelbar an D-Lysergsäure gebundenen Aminosäure unterteilt werden. Vertreter sind hierbei die Ergotamin-Gruppe, umfassend unter anderem Ergotamin, Ergovalin und Ergosin, bei welchen die erste Aminosäure L-Alanin ist. Eine weitere Gruppe ist die Ergotoxin-Gruppe, bei welchen die erste an D-Lysergsäure gebundene Aminosäure L-Valin ist. Vertreter hiervon sind Ergocristin, Ergocryptin oder Ergocornin. Schließlich ist ein weiterer Vertreter die Ergoxin-Gruppe, bei welcher die erste an die Lysergsäure gebundene Aminosäure eine α -Aminobuttersäure ist. Vertreter hiervon sind Ergostin und Ergonin.

Von diesen ist Ergovalin eines der Hauptalkaloide der endophytisch in Weidegräsern wachsenden *Neotyphodium*- und *Epichloë*-Arten und ist von veterinär-toxikologischer Bedeutung, wie z.B. bei Fescue toxicosis. 9,10 Dihydroergopeptine kommen in der Natur sehr selten vor und konnten bisher nur in *Sphacelia sorghi* nachgewiesen werden. Teilweise synthetisch gewonnene Dihydroergopeptine, wie z.B. Dihydroergotamin und Dihydroergotoxin besitzen eine therapeutische Bedeutung in der Behandlung von Migräne und von Herz-Kreislauferkrankungen. Neben den beschriebenen positiven Wirkungen, insbesondere der therapeutischen Bedeutung von Ergopeptinen ist jedoch ihre toxische Wirkung von nicht zu vernachlässigender Bedeutung, da insbesondere ihre Toxizität aufgrund von beispielsweise der Konsumation von kontaminierten Körnern oder toxischen Endophyten in der Zerstörung bzw. Beeinträchtigung oder Schädigung von zahlreichen physiologischen Systemen, wie den Fortpflanzungsorganen, den wachstumsorientierten Systemen sowie dem kardiovaskulären Strukturen innerhalb des Körpers eines Tieres oder Menschen resultieren. Weiterhin gibt es gegenwärtig kaum Zweifel, dass durch die Aufnahme von mit Ergotaminen bzw. Ergopeptinen befallenen Körnern auch das Magen-Darm-System direkt nachteilig betroffen ist und somit nicht nur die Gesundheit der Tiere sondern auch ihre Leistungsfähigkeit stark beeinträchtigt ist.

Die vorliegende Erfindung zielt nun darauf ab, Enzympräparationen zur Verfügung zu stellen, welche in der Lage sind, Ergopeptine in wenig toxische Metaboliten, insbesondere in Lysergsäure abzubauen. Weiterhin zielt die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren ab, mit wel-

009510

chem die enzymatische Transformation von Ergopeptinen in einen nicht-vasokonstriktiven Metaboliten, nämlich insbesondere in Lysergsäure gelingt, sowie schließlich auf einen Futtermittelzusatz, mit welchem einerseits der Abbau von Ergopeptinen zu wenig toxischen Metaboliten ermöglicht ist und somit eine Leistungssteigerung von Nutztieren zur Verfügung gestellt wird.

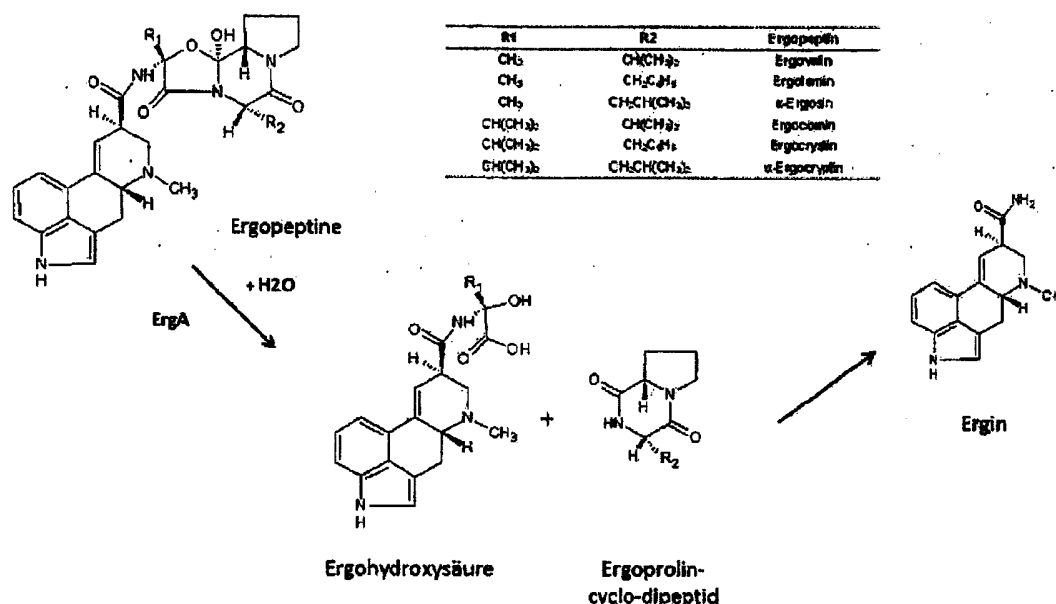
Zur Lösung der Aufgabe ist die Erfindung im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Ergopeptine am Cyclolring hydrolytisch spaltende α/β Hydrolase und wenigstens eine Abbauprodukte der hydrolytischen Spaltung transformierende Amidase enthalten ist. Indem durch die in der Enzympräparation enthaltenen α/β Hydrolasen Ergopeptine am Cyclolring enzymatisch gespalten werden, gelingt es, Ergopeptine in gesundheitlich wenig bedenkliches Ergin abzubauen und in einem weiteren Schritt wird dieses Ergin mit einer Amidase in gesundheitlich wenig bedenkliche Lysergsäure abgebaut.

α/β Hydrolasen sind Mitglieder einer Enzymklasse mit verschiedensten katalytischen Funktionen, welchen unter anderem am Cyclolring native Ergopeptine angreifen können und diese über ein sekundäres Lysergsäureamid (Ergohydroxysäure) zu Ergin abbauen können. Mit den weiterhin in der Enzymzubereitung enthaltenen Amidasen gelingt es, die Amidgruppe von Ergin zu katalysieren bzw. abzuspalten und Ergin vollständig in Lysergsäure und Ammoniak abzubauen.

Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung sind die Enzympräparationen hierbei im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Ergopeptine am Cyclolring spaltende α/β Hydrolase eine katalytische Triade, bestehend aus einer nukleophilen Aminosäure, aus Histidin und aus einer sauren Aminosäure aufweisen. Eine besonders vollständige enzymatische Spaltung des Ergopeptins wird dadurch erreicht, dass die katalytische Triade aus der nukleophilen Aminosäure Serin, aus Histidin und aus einer der sauren Aminosäuren Aspartat oder Glutamat besteht und dass die Triade in einer Peptidkette mit der Faltung einer α/β Hydrolase enthalten ist. Mit einer Enzympräparation enthaltend ein Enzym, welches die oben genannte katalytische Triade aufweist, ist es überraschenderweise gelungen, Ergopeptine enzymatisch vollständig in Ergin abzubauen. Die enzymatische Spaltung findet hierbei an der Stelle 3' des Cyclolrings der Ergopeptine statt, bei welchem hydrolytischen Spalten die Gruppe aus drei Ringen, nämlich dem Cyclolring, Lactamring und Pyrrolidinring in mehreren Schritten abgespalten wird und schließlich Ergin gebildet wird, wie dies dem nachfolgenden Reaktionsschema entnehmbar ist.

003510

- 4 -



Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung ist die Enzympräparation im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass die α/β Hydrolase einen nukleophilen Ellbogen mit einer Sequenz Gly-Gln-Ser-Arg-Asn-Gly aufweist. Wenn die α/β Hydrolase einen nukleophilen Ellbogen mit der Sequenz Gly-Gln-Ser-Arg-Asn-Gly aufweist, gelingt eine besonders rascher enzymatischer Abbau von Ergopeptin zu Ergohydroxysäure, welche spontan in Ergin umgewandelt wird. Der nukleophile Ellbogen ist hierbei ein zentrales Element der α/β Hydrolasen. In diesem befindet sich die katalytisch aktive Aminosäure mit der nukleophilen Seitenkette in einer Struktur mit unüblichen Bindungswinkeln, die in ungünstigen Bereichen des Ramachandran-Plots liegen (Ollis et al., 1992). Die Aminosäuresequenz des nukleophilen Ellenbogens, im vorliegenden Fall Gly-Gln-Ser-Arg-Asn-Gly, ist konserviert und kann z. B. auch zur Klassifizierung von α/β Hydrolasen herangezogen werden (Kourist et al., 2010).

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung gelingt ein vollständiger Abbau dadurch, dass die α/β Hydrolase die Sequenz ID Nr. 1 aufweist. Die α/β Hydrolase mit der Sequenz ID Nr. 1 hat sich als für die katalytische Spaltung von Ergopeptinen in Ergin als besonders wirkungsvoll erwiesen. Die nukleophile Aminosäure Serin nimmt hierbei eine zentrale Rolle in einer konservierten Struktur, den nukleophilen Ellbogen ein. Der nukleophile Ellbogen ist zwischen dem β 5-Strang und der darauffolgenden α -Helix lokalisiert und weist die Consensus-Sequenz Sm-X-Nu-X-Sm auf, wobei Sm eine kleine Aminosäure ist, X eine beliebige Aminosäure ist und Nu eine nukleophile Aminosäure bedeutet. Die Sequenz ID Nr. 1 lautet G-Q-S-R-N. Die α/β Hydrolase der Sequenz ID Nr. 1 gehört hierbei zu den Enzymen, welche für ihre Wirkungsweise keinerlei Cofaktoren benötigen.

009510

- 5 -

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung ist die Enzympräparation dadurch gekennzeichnet, dass die α/β Hydrolase eine von der Sequenz ID Nr. 1 verschiedene N- oder C-terminale Sequenz aufweist, insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 1 ist und dass sie wenigstens 96 % Sequenzidentität mit der Sequenz ID Nr. 1 aufweist, insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 5 oder 7 aufweist. Überraschender Weise konnte gezeigt werden, dass neben der Sequenz ID Nr. 1 auch eine Modifikationsbreite derselben möglich ist, wobei insbesondere der N-Terminus verändert werden kann. Besonders gute Ergebnisse werden hierbei erzielt, wenn das Enzym mit veränderter Startsequenz eine Sequenzidentität von wenigstens 96 % der Sequenz ID Nr. 1 aufweist.

Enzyme mit einem von der Sequenz ID Nr. 1 abweichenden N-Terminus sind in gleicher Weise befähigt, Ergotamin vollständig zu Ergin umzusetzen.

Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung ist die Enzympräparation im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens ein Abbauprodukt der hydrolytischen Spaltung transformierende Amidase ein Enzym der Sequenz ID Nr. 3 ist. Mit einem derartigen Enzym gelingt es, dass Abbauprodukt von Ergotaminen, nämlich Ergin vollständig und schnell in die nicht-vasokonstriktive Lysergsäure und Ammoniak abzubauen. Bei dem Enzym der Sequenz ID Nr. 3 handelt es sich um eine Amidase mit der katalytischen Triade Ser-cisSer-Lys und der Amidase Signatur (AS) GGSS. Im Vergleich zu bis dato bekannten mikrobiellen Umsetzungen von Ergin zu Lysergsäure oder der Spontanreaktion, welche beispielsweise in nativer Pansenflora erfolgt, gilt es mit dem Enzym der Sequenz ID Nr. 3 Ergin besonders schnell, mit einer deutlich höheren Aktivität und insbesondere höherer Verdünnung abzubauen.

Ein vollständiger Abbau, insbesondere ohne jegliche Ergopeptinrückstände kann dadurch erzielt werden, wenn, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, wenigstens eines der Enzyme gewählt aus der α/β Hydrolase oder der Amidase aus einer *Rhodococcus erythropolis*, bevorzugt *Rhodococcus erythropolis* DSMZ 25948 Kultivierung stammt. Überdies hat sich herausgestellt, dass eine nahezu quantitative Umwandlung von Ergopeptinen dann erzielt werden kann, wenn die Enzympräparation so ausgebildet ist, dass wenigstens eines der Enzyme, gewählt aus der α/β Hydrolase oder der Amidase ein rekombinant in einer Wirtszelle, gewählt aus *Pichia pastoris*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, einer Pflanzenzelle und/oder Sporen von *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* oder *Aspergillus* hergestelltes Enzym ist.

Da üblicherweise kontaminierte Nahrungs- oder Futtermittel häufig nicht nur die Kontamination durch ein Mykotoxin aufweisen und um möglichst viele gegebenenfalls in einem Futtermittel oder Nahrungsmittel enthaltene bzw. daran anhaftende Mykotoxine gleichzeitig abbauen zu können und insbesondere, um auf der Oberfläche von Getreide vorliegende Mykotoxine möglichst vollständig enzymatisch abbauen zu können, ist die Enzympräparation bevorzugt so weitergebildet, dass wenigstens ein weiteres Enzym oder wenigstens eine weitere

009510

- 6 -

detoxifizierende Komponente, gewählt aus einem Mykotoxin abbauenden Enzym, einem Mykotoxin abbauenden Mikroorganismus oder einem Adsorptionsmittel zur Detoxifikation von von Ergopeptinen verschiedenen Mykotoxinen enthalten ist. Hierbei hat sich gezeigt, dass, sofern ein weiteres Präparat von Proteinen beteiligtes Enzym enthalten ist, gute Ergebnisse mit Futtermittelenzymen erreicht werden. Sollte ein weiteres Mykotoxine abbauendes Enzym enthalten sein, ist dieses bevorzugt aus Alfatoxin Detoxizymen, Zearalenon Esterasen, Zearalenon Lactonasen, Ochratoxin Amidasen, Fumonisin Carboxylesterasen, Fumonisin Aminotransferasen, Aminopolyol Aminoxydasen, Deoxynivalenol Epoxidhydrolasen gewählt. Besonders gute Ergebnisse werden hierbei dadurch erzielt, dass als Mykotoxin abbauende Mikroorganismus *Bacillus subtilis* eingesetzt wird.

Zur Vervollständigung der Umsetzung und insbesondere zum Binden von gegebenenfalls weiteren in dem Futtermittel bzw. Nahrungsmittel enthaltenen gefährlichen Substanzen ist die Enzympräparation dadurch weitergebildet, dass Adsorptionsmittel gewählt aus mikrobiellen Zellwänden oder anorganischen Materialien, wie Bentoniten enthalten sind.

Die Erfindung zielt weiters darauf ab, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit welchem die Transformation von Ergopeptinen in wenig-vasokonstriktive Metaboliten schnell und vollständig gelingt.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird das Verfahren hierbei so geführt,

- dass der Cyclolring der Ergopeptine mit einer α/β Hydrolase zu einem enzymatisch transformierten Metaboliten gespalten wird,

- dass der enzymatisch transformierte Metabolit spontan in Ergin umgewandelt wird, und

- dass Ergin mit einer Amidase enzymatisch zu Lysergsäure umgesetzt wird.

Gemäß einer weiterhin bevorzugten Weiterbildung wird das Verfahren hierbei so geführt dass der Cyclolring mit dem Enzym der Sequenz ID Nr. 1 oder einem ein Enzym mit einer von der Sequenz ID Nr. 1 verschiedenen N- oder C-terminalen Sequenz, insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 5 oder der Sequenz ID Nr. 7 gespalten wird.

Für eine insbesondere vollständige Umsetzung in wenig-vasokonstriktive Metaboliten wird gemäß einer Weiterbildung das Verfahren so geführt, dass das spontan gebildete Ergin mit dem Enzym der Sequenz ID Nr. 3 weiter zu Lysergsäure umgesetzt wird.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung wird die Enzympräparation gemäß der vorliegenden Erfindung in einem Futtermittel sowie Futtermittel- oder Silagezusatz eingesetzt. Bei einem derartigen Einsatz gelingt es, lediglich durch Beimischung von geringen Mengen der Enzympräparation die auf den Futtermitteln bzw. Silagen vorhandenen Ergopeptine, insbesondere auf den darin enthaltenen Getreiden oder Gräsern quantitativ in wenig-vasokonstriktive Metaboliten, insbesondere in Lysergsäure und Ammoniak abzubauen.

Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung wird der native Ursprungorganismus der Enzyme mit der Sequenz ID Nr. 1 und Nr. 3, der Stamm *Rhodococcus erythropolis* (MTHt3) DSMZ



25948, als Futtermittel, Futtermittel- oder Silagezusatz eingesetzt. Der Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSMZ 25948 mit der Fähigkeit Ergopeptine zu Ergin zu hydrolysieren und Ergin zu Lysergsäure umzusetzen wurde unter Verwendung eines Minimalmediums mit Ergotamin als einzige Stickstoffquelle aus einer Bodenprobe isoliert. Anhand der 16S rRNA wurde der Stamm der Spezies *Rhodococcus erythropolis* zugeordnet. Mitglieder der Gattung *Rhodococcus* sind weitverbreitet in der Natur und werden in verschiedenen Bereichen der Industriellen Biotechnologie und Umweltbiotechnologie eingesetzt. Weiters sind Mitglieder der Gattung bekannt für die Fähigkeit organische Verbindungen abzubauen. Eine Reihe an Stoffwechselwegen wurde bereits beschrieben und eine Vielzahl der Gene, welche die metabolische Aktivität kodieren, ist auf Plasmiden lokalisiert (Warhurst and Fewson, 1994, Larkin et al., 2006, Martinkova et al., 2009). Das Enzym mit der Sequenz ID Nr. 1 wurde mittels Ionenaustauschchromatographie und hydrophober Interaktionschromatographie aufgereinigt und Peptidsequenzen wurden bestimmt. Die Gesamtgenomsequenz von *Rhodococcus erythropolis* MTHt3 wurde mittels 454 *de novo*-Sequenzierung ermittelt. Die Peptidsequenzen passten zu dem Gen mit der Sequenz ID Nr. 2, welches auf dem linearen Plasmid pMTHL1 lokalisiert ist. Das Plasmid pMTHL1 wurde mittels bioinformatischer Analyse der Genomsequenz gefunden und mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese bestätigt. Das Gen mit der Sequenz ID Nr. 4 konnte in der Nachbarschaft des Gens mit der Sequenz ID Nr. 2 lokalisiert werden.

Schließlich zielt die vorliegende Erfindung auf das Bereitstellen eines Futtermittels sowie eines Futtermittel- oder Silagezusatzes ab, welcher entweder eine Enzympräparation gemäß der vorliegenden Erfindung enthält oder einen *Rhodococcus erythropolis* Stamm, insbesondere *Rhodococcus erythropolis* DSMZ 25948 enthält. Derartige Futtermittel oder Futtermittel- oder Silagezusätze haben sich als besonders wirkungsvoll bei der Detoxifikation von Ergopeptinen erwiesen, indem sie die Fähigkeit zeigen, die in Futtermitteln enthaltenen Ergopeptine zu wenig-vasokonstriktiven Metaboliten, insbesondere zu unbedenklichen Metaboliten abzubauen, wie beispielsweise Ergin und Lysergsäure.

Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung ist in dem Futtermittel- bzw. Silagezusatz wenigstens ein physiologisch unbedenkliches Trägermaterial, wie Maltrodextrin, Cyclodextrin, Kalziumcarbonat, Weizen, Weizenkleie, Reis, Reiskleie, Stärke, Dinatriumsulfat, Talkum, Saccharose oder Mischungen davon enthält. Insbesondere durch Zusatz von speziell ausgewählten Trägern, wie Zeolite, Bentonite oder dgl. oder Maltodextrin oder auch Hefezellwänden gelingt es, zusätzlich in bzw. auf dem Futtermittel und insbesondere dem Futtergetreiden oder Gräsern vorhandene Mykotoxine physikalisch zu binden bzw. zu immobilisieren und somit unschädlich zu machen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Figuren und Ausführungsbeispielen näher erläutert. In diesen zeigen:

Fig. 1 die Kinetik der Umsetzung von Ergotamin mit Sequenz ID Nr. 1 zu Ergin,

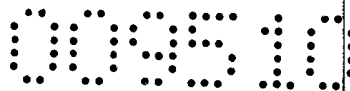


Fig. 2 die Umsetzung von Ergin mit Sequenz ID Nr. 3 zu Lysergsäure,

Fig. 3 die Umsetzung der Ergopeptine Ergocornin, Ergocryptin, Ergosin, Ergovalin und Ergotamin durch das Enzym der Sequenz ID Nr. 1 mit den exemplarischen Negativkontrollen für Ergocryptin und Ergosin,

Fig. 4 die Darstellung des *P. pastoris* Expressionsvektors pGAPZ alphaC mit der Sequenz ID Nr. 2,

Fig. 5 die Darstellung von *B. subtilis* Expressionsvektor pET43 mit der Sequenz ID Nr. 2,

Fig. 6 die Darstellung des *P. pastoris* Expressionsvektors pGAPZ alphaC mit der Sequenz ID Nr. 2,

Fig. 7 die Umsetzung von Ergotamin und Ergin durch den Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSMZ 25948 und

Fig. 8 die Umsetzung von Ergotamin und Ergin durch den Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSMZ 25948 und dem Enzym mit der Sequenz ID Nr. 1 im Pansenmodell

Beispiel 1:

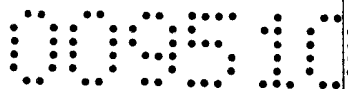
Bestimmung der katalytischen Aktivität von dem Enzym der Sequenz ID Nr. 1

Das Gen mit der Sequenz ID Nr. 2, welches eine katalytische Triade aus S94-D234-H270 aufweisende α/β -Hydrolase codiert, wurde unter Anwendung von Standardverfahren in den Expressionsvektor pET28a(+) kloniert, in *E. coli* transformiert und exprimiert. Nach der Expression in *E. coli* BL21(DE3) wurde das his-getaggte Enzym mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Enzymkonzentration wurde mittels Pierce BSA Protein Assay Kit bestimmt und das Enzym in Aktivitätsversuchen eingesetzt. Die Versuche wurden in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0) bei 25 °C durchgeführt.

Im Rahmen der Detoxifikationsversuche wurden eine Enzymkonzentration von 0,079 µg/ml und eine Ergotaminkonzentration von 5 mg/kg eingesetzt.

Für einen weiteren Versuch zur Umsetzung der 6 Ergopeptine, nämlich Ergotamin, Ergovalin, Ergocornin, Ergocristin, Ergocryptin oder Ergosin sowie deren jeweiligen isomeren Formen, nämlich Ergotaminin, Ergovalinin, Ergocorninin, Ergocristinin, Ergocryptinin sowie Ergosinin wurden 1,58 µg/ml des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 und 10 mg/kg Ergotamin bzw. von den restlichen Ergopeptinen bzw. deren Epimeren die äquimolare (Summen)Konzentration eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 gezeigt.

Die Proben wurden mittels HPLC-FLD bzw. HPLC-MS/MS analysiert, wobei jeweils die Konzentration der Summe der jeweiligen Epimere analytisch bestimmt wurde. Parallel zur Abnahme der Ergopeptinkonzentration im Laufe der enzymatischen Reaktion wurde die Bildung der Ergohydroxysäure (Metabolit 1) und des Ergoprolin-cyclo-dipeptids (Metabolit 2) beobachtet. Im weiteren Reaktionsverlauf wurde die Umsetzung von Metabolit 1 zu Ergin detektiert.



In Fig. 1 ist exemplarisch die Kinetik der Umsetzung von Ergotamin mit Sequenz ID Nr. 1 gezeigt. Im Laufe der Reaktion wurden geringe Mengen eines instabilen Zwischenprodukts detektiert, das Endprodukt der Reaktion war Ergin. Aus Fig. 1 ist ersichtlich, dass innerhalb von 4 Stunden ein nahezu vollständiger Abbau von Ergotamin durch Sequenz ID Nr. 1 zu Ergin erfolgte. Es blieben etwa 5 % Restmenge an Ergotamin. Die restlichen 5 % Ergotamin werden langsam über einen Zeitraum von weiteren 16 Stunden vollständig zu Ergin abgebaut. Der Reaktionsverlauf sämtlicher anderer Ergopeptide, nämlich Ergovalin, Ergocomin, Ergocristin, Ergocryptin oder Ergosin sowie deren jeweiligen isomeren Formen, nämlich, Ergovalinin, Ergocorinin, Ergocristinin, Ergocryptinin sowie Ergosinin ist vergleichbar.

Beispiel 2:

Identifizierung des N-Terminuses des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1

Zur Identifizierung des N-Terminuses des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 wurden die Gene mit der Sequenz ID Nr. 2 und der Sequenz ID Nr. 6 unter Anwendung von Standardverfahren in pET28a(+) kloniert und *E. coli* transformiert.

Nach Expression wurden die Bakterienzellen in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer aufgenommen und mittels French Press (20 000 psi) lysiert. Die Lysate wurden in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 in Abbauansätzen von 5 mg/kg Ergotamin eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 25 °C inkubiert und die Proben mittels HPLC-FLD analysiert.

Die Ergebnisse des Abbaubersuchs zeigten, dass beide Enzyme befähigt sind, Ergotamin umzusetzen. Jenes Enzym mit kürzeren Nukleotidsequenzen zeigte jedoch eine deutlich höhere Aktivität, so konnte diese Variante auch in der 1:1000 Verdünnung Ergotamin vollständig umsetzen, die längere Variante zeigte bereits in der 1:100 Verdünnung nur mehr geringe Aktivität.

Beispiel 3:

Ermittlung des Temperaturbereichs der Aktivität und die Temperaturstabilität des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1.

Zur Ermittlung der optimalen Temperatur für die Aktivität des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 wurden 0.1 µg/ml Enzym in Teorell-Stenhagen-Universalpuffer (pH 9.0) mit 5 mg/kg Ergotamin bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 10°C bis 50°C inkubiert. Dabei zeigte das Enzym in einem Bereich von 10°C bis 35°C Aktivität, mit einem auf die Anfangsgeschwindigkeit bezogenen Optimum von 35°C.

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde das Enzym bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 10°C bis 60°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Enzym Lösungen in einer Konzentration von 0.1 µg/ml in Teorell-Stenhagen-Universalpuffer (pH 7.0) mit 0.1 mg/ml BSA und 5 mg/kg Ergotamin bei 25°C inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das En-

000510

- 10 -

zym bis zu einer Temperatur von 30°C stabil ist, es nach einer Inkubation bei 40°C noch Aktivität zeigte, es allerdings zwischen 35°C und 40°C zu einem Abfall der Aktivität kam. Zusammenfassend zeigte sich, dass das Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 im Wesentlichen bei den im Verdauungstrakt vorherrschenden Temperaturbedingungen das Temperaturoptimum hat.

Beispiel 4:

Ermittlung des pH-Optimums der Aktivität und die pH-Stabilität des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1

Zur Ermittlung des optimalen pH-Bereichs für die Aktivität von ErgA wurden 0.1 µg/ml Enzym mit 5 mg/kg Ergotamin bei unterschiedlichen pH-Werten unter Verwendung des Teorell-Stenhagen-Universalpuffers bei 25°C inkubiert. Dieser Puffer wurde ausgewählt da man durch die Kombination von Citrat, Phosphat und Borat mittels Salzsäure in einem Bereich von pH 2 bis pH 12 die gleiche Pufferkapazität einstellen kann. Dabei zeigte das Enzym in einem Bereich von pH 6 bis pH 11 Aktivität, mit einem kleinen Aktivitätsplateau bei pH 8 bis pH 9.

Zur Bestimmung der pH-Stabilität wurde das Enzym bei unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von pH 2 bis pH 12 für 1 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzymlösungen in einer Konzentration von 0.1 µg/ml in Teorell-Stenhagen-Universalpuffer (pH 7.0) mit 0.1 mg/ml BSA und 5 mg/kg Ergotamin bei 25°C inkubiert. Auch hier zeigte sich ein Aktivitätsplateau, diesmal im Bereich von pH 6 bis pH 9, mit stark abfallender Aktivität außerhalb dieses Bereichs. Durch die Aktivität in diesem Bereich ist eine technologische Anwendung des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 als Futtermittelzusatz gewährleistet.

Beispiel 5:

Expression des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 in *Pichia pastoris*

Das Gen der Sequenz ID Nr. 2 wurde in pGAPZ alphaC kloniert, in *P. pastoris* transformiert und unter Verwendung von Standardmethoden exprimiert. Der Expressionsvektor pGAPZ alphaC mit dem Gen der Sequenz ID Nr. 2 ist in Fig. 3 gezeigt. Ein Abbaubersuch wurde in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7.0) mit 5 mg/kg Ergotamin bei 25°C durchgeführt. Vom Kulturüberstand wurde eine 1:100 Verdünnung eingesetzt. Die Proben wurden mittels HPLC-FLD analysiert. Anhand von Ergebnissen aus SDS-PAGE und Abbaubersuchen konnte eine Expression des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 in den Kulturüberstand bestätigt werden.

Beispiel 6:

Expression des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 in *Bacillus subtilis*

Das Gen der Sequenz ID Nr. 2 wurde in pHT43 kloniert, in *B. subtilis* transformiert und unter Verwendung von Standardmethoden exprimiert. Der Expressionsvektor pHT43 mit dem Gen der Sequenz ID Nr. 2 ist in Fig. 4 gezeigt. Ein Abbaubersuch wurde in 50 mM Natrium-

009510

- 11 -

Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 5 mg/kg Ergotamin bei 25 °C durchgeführt. Vom Kulturüberstand wurde eine 1:10 Verdünnung eingesetzt. Die Proben wurden mittels HPLC-FLD analysiert. Anhand der Ergebnisse aus SDS-PAGE und Abbaubersuchen konnte eine Expression des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 in den Kulturüberstand bestätigt werden.

Beispiel 7:**Katalytische Aktivität des Enzyms der Sequenz ID Nr. 3**

Das Gen der Sequenz ID Nr. 4, welches eine katalytische Triade aus S94-D234-H270 aufweisende Amidase codiert, wurde unter Anwendung von Standardverfahren in pET28a(+) kloniert, in *E. coli* transformiert und exprimiert. Nach der Expression wurden die Bakterienzellen in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen und mittels French Press (20 000 psi) lysiert. Das Lysat wurde mit 5 mg/kg Ergin versetzt und bei 25 °C inkubiert und die Proben anschließend mittels HPLC-FLD analysiert. Abbildung 4 zeigt die Umsetzung von Ergin zu Lysergsäure durch das Enzym der Sequenz ID Nr. 3.

Aus Fig. 2 ist die Umsetzung von Ergin zu Lysergsäure des Enzyms der Sequenz ID Nr. 3 entnehmbar, wobei erkenntlich ist, dass in einem Zeitraum von etwa 5 Stunden 50 % des Ergins zu Lysergsäure umgesetzt sind und die restlichen 50 % über einen weiteren Zeitraum von etwa 15 Stunden vollständig zu Lysergsäure abgebaut werden.

Beispiel 8:**Expression des Enzyms der Sequenz ID Nr. 3 in *P. pastoris***

Das Gen der Sequenz ID Nr. 4 wurde, wie bereits in Beispiel 5 für das Gen der Sequenz ID Nr. 2 beschrieben und in *P. pastoris* transformiert und exprimiert

Beispiel 9:**Anreicherung, Isolierung und Identifizierung des ergotalkaloid-abbauenden Stammes DSM 25948**

Zur Anreicherung von Mikroorganismen in natürlicher Umgebung wurde gemahlenes Mutterkorn auf Felder im Südburgenland vergraben. Nach drei Monaten wurden Bodenproben genommen, welche als Inokulum in Anreicherungskulturen verwendet wurden. 2 g Bodenprobe wurden in 18 ml Minimalmedium, welches 5 mg/kg Ergotamin als einzige Stickstoffquelle enthielt, aufgenommen und für 14 Tage bei 25°C am Schüttler (200 rpm) inkubiert. An jedem dritten Tag wurden weitere 5 mg/kg Ergotamin hinzugegeben. Im Anschluss wurden 100 µl der Anreicherung in eine Verdünnungsreihe eingesetzt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-5} wurden Aliquote auf Minimalmedium-Agarplatten mit 5 mg/kg Ergotamin ausplattiert und bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wurde eine Reinzucht der kultivierten Mikroorganismen durchgeführt.



Die 16S rRNA des ergotalkaloid-abbauenden Stammes DSM 25948 wurde mittels PCR unter Verwendung der Universalprimer 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') und 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3') (Weisburg et al., 1991) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels QIAquick PCR purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die amplifizierte 16S rRNA wurde extern sequenziert.

Die anschließende BLAST Suche zeigte, dass der Stamm DSM 25948 zum Typstamm von *Rhodococcus erythropolis* (DSM 43066^T) eine Sequenzidentität von 99.8% aufweist.

Beispiel 10: Umsetzung von Ergin und Ergotamin durch *Rhodococcus erythropolis* DSM 25948

Sowohl die Kultivierung der Mikroorganismen als auch die Inkubation der Abbauprobe wurde am Schüttler (200 rpm) im Dunkeln bei 25°C durchgeführt. Der Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSM 25948 wurde über Nacht in TSB-Medium angezüchtet und die Zellen nach der Ernte (2 655 x g, 20°C, 5 min) im gleichen Volumen 50 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) aufgenommen und mit 5 mg/kg Ergin bzw. Ergotamin versetzt. Als Negativkontrollen diente der Puffer versetzt mit 5 mg/kg Ergin bzw. Ergotamin. Im Verlauf der Versuche wurden Proben genommen, nach dem Zentrifugieren (2 655 x g, 20°C, 10 min) wurden 320 µl Überstand in ein Braunglasvial überführt und die Proben bei -20°C bis zur Analyse mittels HPLC-FLD gelagert.

In Fig. 7 ist die Umsetzung von Ergin und Ergotamin durch den Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSM 25948 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass in beiden Fällen Lysergsäure das Endprodukt der Reaktion darstellt und Ergin als Zwischenprodukt der Umsetzung von Ergotamin detektiert werden konnte.

Beispiel 11:

Abbauprobe im Pansenmodell

Die Aktivität des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 25948 und des Enzymes mit der Sequenz ID Nr. 1 wurde in einem *in vitro* Pansenmodell getestet. Dafür wurde frischer Pansensaft 1:1 mit einer Lösung bestehend aus künstlichen Pansensaft, Heu und einer Getreidemischung aus Weizen, Mais und Soja verdünnt. Zur Darstellung der Umsetzung der Ergopeptide wurde ein Ansatz mit einer 5fach aufkonzentrierten Übernachtskultur des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 25948 und ein Ansatz mit dem Enzym der Sequenz ID Nr. 1 (10 µg/ml) mit 5 mg/kg Ergotamin versetzt. Zur Darstellung der Umsetzung von Ergin wurde ein Ansatz mit einer 5-fach aufkonzentrierten Übernachtskultur des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 25948 mit 5 mg/kg Ergin versetzt. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit Pansensaft versetzt mit 5 mg/kg Ergotamin bzw. 5 mg/kg Ergin. Gärröhrchen wurden über Septen eingesetzt und die Ansätze im Wasserbad bei 39°C inkubiert. Die Analytik der genommen Proben erfolgte mittels HPLC-FLD.

00510

- 13 -

In Fig. 8 ist die Umsetzung von Ergotamin und Ergin durch den Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSM 25948 und dem Enzym mit der Sequenz ID Nr. 1 im Pansensaftmilieu dargestellt. Es ist ersichtlich, dass der Stamm DSM 25948 sowohl Ergotamin als auch Ergin zu Lysergsäure umsetzen konnte. Im Ansatz mit Ergotamin erfolgte diese Umsetzung so rasch, dass Ergin nicht als Zwischenprodukt detektiert werden konnte. Das Enzym mit der Sequenz ID Nr. 1 konnte Ergotamin im Reaktionsmilieu fast vollständig umsetzen, Ergin wurde als Endprodukt dieser Umsetzung detektiert. In der Negativkontrolle mit Ergotamin wurde nur das eingesetzte Ergotalkaloid detektiert, wobei anscheinend das Ergotalkaloid vom Reaktionsmilieu teilweise gebunden wurde. In der Negativkontrolle mit Ergin wurden geringe Spuren an Lysergsäure detektiert. Dies könnte auf die natürliche Aktivität in den Pansenflora zurückzuführen sein.

Literatur:

FLIEGER, M., WURST, M. & SHELBY, R. 1997. Ergot alkaloids--sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiol.(Praha)*, 42, 3-29.

KOURIST, R., JOCHENS, H., BARTSCH, S., KUIPERS, R., PADHI, S.K., GALL, M., BÖTTCHER, D., JOOSTEN, H.-J. & BORNSCHEUER, U. T., 2010, The α/β Hydrolase Fold 3DM Database (ABHDB) as a Tool for Protein Engineering, *ChremBioChem*, 11, 1635-1643.

LARKIN, M. J., KULAKOV, L. A. & ALLEN, C. C. 2006. Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology, and genetic adaptation. *Adv Appl Microbiol*, 59, 1-29.

MARTINKOVA, L., UHNAKOVA, B., PATEK, M., NESVERA, J. & KREN, V. 2009. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int*, 35, 162-77.

OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S.M., HAREL, M., REMINGTON, S.J., SILMAN, I. & SCHRAG, J. 1992, The alpha/beta hydrolase fold, *Protein Eng.*, 5, 197-211

STRICKLAND, J. R., LOOPER, M. L., MATTHEWS, J. C., ROSENKRANS, C. F., JR., FLYTHE, M. D. & BROWN, K. R. 2011. Board-invited review: St. Anthony's Fire in livestock: causes, mechanisms, and potential solutions. *J Anim Sci*, 89, 1603-26.

WARHURST, A. M. & FEWSON, C. A. 1994. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Crit Rev Biotechnol*, 14, 29-73.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173, 697-703.

009510

- 14 -

SEQUENTPROTOKOLL

<110> Erber Aktiengesellschaft
 Thamhesl, Michaela
 Moll, Wulf-Dieter
 Schatzmayr, Gerd
 Binder, Eva Maria

<120> Enzyme zur Transformation von Ergopeptinen sowie Verfahren
 hierfür

<130> -----

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 309

<212> PRT

<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 1

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

Ser Gly Asn Gly Val Pro Ala Leu Val Pro Cys Val Gly Ser Ser Val
 20 25 30

Pro Phe Glu Arg Thr Phe Gly Glu Glu Leu Lys Thr Asp Ile Gln Tyr
 35 40 45

Asn Phe Val Glu Val Arg Gly Thr Ser Arg Ser Asp Gly Glu Pro Ser
 50 55 60

Glu Val Ala Ser Leu Asp Arg Ile Ser Asp Asp Leu Glu Glu Val Arg
 65 70 75 80

Gln Leu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ile Ala Leu Gly Gln Ser Arg Asn
 85 90 95

Gly Met Met Ala Ala His Tyr Ala Gln Lys Tyr Pro Asn Ser Val Leu
 100 105 110

His Leu Val Thr Ile Gly Thr Pro Ala Ser Leu Ser Met Ile Lys Asn
 115 120 125

Glu Glu Tyr Trp Asn Ala Phe Ala Asp Asp Glu Arg Lys Arg Leu Arg
 130 135 140

Ala Glu Asn Asp Ala Ala Met Glu Arg Glu Gly Leu Leu Asp Leu Asp
 145 150 155 160

Asn Leu Asn Thr Ala Glu Lys Ile Val Arg Leu Phe Asp Leu Glu Gly
 165 170 175

Ala Val Tyr Phe Tyr Asp Pro Thr Thr Leu Met Asn Asp Trp Trp Asp
 180 185 190

009510

- 15 -

Ala Ser Leu Leu Ser Arg Thr Phe Glu Val Val Met Ala Ser Asn Met
 195 200 205

Gly Trp Ala Asp Phe Asp Leu Val Gln Thr Leu Gln Asn Ser Asp Val
 210 215 220

Pro Ala Phe Val Thr Phe Gly Lys Tyr Asp Phe Met Val Ser Pro Leu
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Gly Asn Pro Val Asp Gly Lys Ala Gly Leu Phe Glu Asp
 245 250 255

Ile Pro Gly Val Arg Val Glu Val Phe Glu Lys Ser Gly His Phe Pro
 260 265 270

Tyr Trp Glu Gln Glu Gln Glu Phe Ala Arg Arg Tyr Arg Asp Trp Val
 275 280 285

Ala Thr Leu Pro Glu Ser Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Met Thr Pro
 290 295 300

Asn Gly Ile Arg Gln
 305

<210> 2
 <211> 930
 <212> DNA
 <213> Rhodococcus erythropolis

<400> 2
 atgccattgg tggttctgag cgacggcaca cgcattcacg tcgaaacttc aggcaacggc 60
 gtccctgcgc ttgttccatg cgtgggatcg agcgttccgt tcgagcggac gttcgggtgag 120
 gaattgaaga cggatattca gtacaacttc gtcgaggtcc gcggtacctc caggtccgac 180
 ggcgaaccga gtgaggtcgc ctactcgat cgtatttccg acgacctcga agaggtccgt 240
 cagttgttgg gtttggacaa ggtcatcgca ctcggccagt cgcgtaacgg catgatggcc 300
 gtcactacg cgcagaagta tccgaattcg gtcctacacc tggtaacctat cggcaccctt 360
 gcgtctttga gtatgatcaa gaacgaagaa tactggaacg cgttcgcaga cgacgagcgt 420
 aaacgcctcc gcgctgaaaa cgacgcggcg atggagcgcg aggggtctct cgaccttgac 480
 aacctgaata ctgccgaaaa gatcgttcgc ctcttcgatc ttgaaggcgc agtgtaactt 540
 tacgatccaa cgacactcat gaatgattgg tgggacgctt cacttctcag ccggacattc 600
 gaagtcgtca tggcgtcgaa tatgggttgg gcagacttcg acctcgttca aacctgcag 660
 aattctgatg tccccgcttt cgtaacgttc ggaaagtacg acttcattgg ctccccgctg 720
 ccgaaaccag gaaatccggt tgacggaaaa gccggcctct tcgaagatat tccgggtgtc 780
 cgggtagagg tcttcgagaa gaggggcac ttccgtatt gggagcagga acaggaattt 840
 gctcgccgct atcgcgattg ggtcgcaacc ctccggaat ccgctgtacg cgctgcagaa 900

009510

- 16 -

gctatgacgc ccaatggcat tcggcagtga

930

<210> 3
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus erythropolis

<400> 3

Val Arg Tyr Lys Arg Ala Phe Ala Val Ala Ile Thr Ala Gly Val Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Ser Gly Cys Ser Asp Glu Thr Ser Ala Pro Gln Thr Thr
 20 25 30

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

Asn Gly Glu Ala Pro Leu Glu Leu Thr Ile Lys Gln Val Lys Asp Ala
 50 55 60

Phe Ala His Gly Ala Tyr Thr Ser Glu Gln Leu Thr Lys Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

Asn Arg Ile Asp Arg Tyr Glu Pro Ala Tyr Asn Ala Leu Thr Phe Met
 85 90 95

Asn Glu His Ala Leu Ala Asp Ala Arg Ala Ser Asp Glu Ala Arg Ala
 100 105 110

Ala Gly Lys Pro Gln Gly Ala Leu Ala Gly Val Pro Val Leu Ile Lys
 115 120 125

Glu Ala Met Asn Thr Lys Gly Phe Pro Met Thr Ala Gly Trp Ala Pro
 130 135 140

Leu Ser Pro Glu Leu Gly Gly Leu Ser Leu Met Pro Asp Lys Asp Ala
 145 150 155 160

Pro Met Val Arg Arg Ile Arg Asp Ala Gly Ala Ile Ile Leu Gly Lys
 165 170 175

Thr Asn Ile Pro Val Phe Cys Val Arg Gly Asp Ala Asn Asp Ser Trp
 180 185 190

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

Ser Ser Ala Gly Ser Ala Thr Ala Val Ala Ala Asn Phe Gly Val Ile
 210 215 220

Ala Leu Gly Ala Glu Thr Met Gly Ser Leu Thr Leu Pro Gly Ser Ala
 225 230 235 240

003510

- 17 -

Gln Ser Ile Val Val Met Lys Pro Thr Phe Gly Met Val Ala Asn Leu
245 250 255

Gly Asp Asn Pro Met Ala Val Asp Thr Thr Asp Thr Val Gly Pro Met
260 265 270

Thr Arg Ser Val Glu Asp Ala Ala Thr Val Leu Asp Val Leu Ala Gly
275 280 285

Val Asp Pro Glu Asp Pro Lys Thr Lys Ala Ser Glu Gly His Ile Pro
290 295 300

Pro Gly Gly Phe Thr Ser Ser Leu Asn Asn Glu Ser Leu Asn Gly Ala
305 310 315 320

Arg Ile Gly Ile Leu Ser Pro Gly Tyr Arg Lys Asp Leu Val Arg Ser
325 330 335

Gln Glu Glu Thr Ala Leu Tyr Asp Asn Ala Val Asn Glu Leu Arg Thr
340 345 350

Arg Gly Ala Thr Leu Val Asp Asn Ala Phe Val Gly Ser Gly Leu Asp
355 360 365

Gly Leu Pro Arg Asn Met Leu Pro Thr Ser Met Thr His Asp Trp Asn
370 375 380

Glu Phe Leu Lys Asp Phe Ser Gly Ser Gly Ile Ser Ser Thr Ala Asp
385 390 395 400

Leu Ala Ala Lys Leu Asn Pro Glu Asp Leu Lys Glu Gly Ser Pro Gly
405 410 415

Ala Phe Leu Ala Asp Asp Pro Ala Lys Pro Asp Met Ser Glu Tyr Asn
420 425 430

Asn Leu Ala Asp Gln Tyr Arg Ala Val Phe Ala Ser Ile Val Lys Gln
435 440 445

Tyr Asp Leu Asp Gly Phe Val Leu Pro Thr Met Val Gly Glu Ile Pro
450 455 460

Arg Leu His Pro Asp Trp Glu Lys Trp Asp Asp Met Leu Thr Asn Pro
465 470 475 480

Glu Val Asn Tyr Thr Gly Met Pro Ser Val Val Val Pro Ala Gly Arg
485 490 495

Tyr Glu Asn Gly Ser Pro Phe Ala Val Ala Phe Val Gly Pro Asp Trp
500 505 510

Ser Asp Ser Arg Met Leu Ser Phe Ala Tyr Asp Tyr Glu Gln Ala Thr
515 520 525

009510

- 18 -

His His Arg Ile Val Pro Thr Leu Thr Thr Asp Leu Pro Ser Ser
 530 535 540

<210> 4
 <211> 1632
 <212> DNA
 <213> Rhodococcus erythropolis

<400> 4
 gtgagataca aacgtgcatt tgcggtcgcg attaccgctg gcgtggcact cgcgctgtcc 60
 ggggtgctcgg atgaaactag cgtcctccaa accacaccga tgacggcatt gcagcccgcc 120
 tcggcgatgc aaggagacgt agccaatggg gaagcgcccc ttgagttgac tattaagcag 180
 gtaaaggacg ccttcgcgca tgggtgcttac acctctgaac agctgacgaa ggcgtattttg 240
 aaccgaattg acaggtacga gcctgcctac aacgccttaa cttcatgaa tgagcacgca 300
 ctgcgaggac cgaggggcag cgatgaagcg cgcgcggcag ggaagccgca ggggtgcgctg 360
 gccggcgtag ctgtgctgat caaagaggcg atgaacacga aagggttccc gatgactgcc 420
 ggggtgggac cattatcgcc tgagttaggt ggactcagcc tgatgcccga caaggacgct 480
 ccaatggtgc ggcggattcg cgatgccggg gcaatcatat tgggtaagac aaacattccg 540
 gtgttctgcy tgcgcggaga cgcaaacgac agctgggccc gcccgacgta caacgctgtc 600
 gacaggtcgc tgatacccg cggaagttct gctggttcag caacggcagt agcggcaaac 660
 ttcggtgtaa tcgccctcgg tgcgtgaaacc atgggttcac tgactctgcc cggatcagcg 720
 cagagcatcg ttgtgatgaa gccgacattt ggaatggttg ccaaccttgg tgataacccg 780
 atggccgtgg ataccactga cacggttggg ccaatgactc ggagtgtcga agatgaggct 840
 acagtgcctg acgtcctagc cggcgctcgc ccggaagatc cgaaaacgaa agcgtccgaa 900
 ggacatatc cgcccggcgg attcacttca tcactaaaca atgaatctct caacggggcc 960
 cggatcggga tcctaagtcc ggggtaccga aaagaccttg tgcgttctca agaggaaacc 1020
 gcgctgtacg acaacgccgt taacgaattg cgaaccgag gtgccacgct cgtcgacaac 1080
 gccttcgtcg gcagcggggt ggacgggttg cctcgaaaca tgttgcttac ctccatgacc 1140
 cacgattgga atgagtttct gaaagacttc agcggatccg ggattagtag cacggcagat 1200
 ctggcagcta aattgaaccc cgaggatctg aaggaaggca gtccgggccc gttcttgccc 1260
 gacgatcccc ccaagcctga tatgtccgag tacaacaact tggccgacca gtaccgtgcg 1320
 gtatttgcct ctatcgtaaa gcagtacgat ctgcacggat ttgtgctgcc aacaatggtt 1380
 ggggagatcc cgcgcctgca tcctgattgg gaaaagtggg atgacatgct caccaacccg 1440
 gaagtgaact acacaggtat gccttcgggt gtcgttcccg ccggacgata cgagaatggc 1500
 tcgcccttcg cggttgcggt cgtgggccct gactggctccg attcggaat gctgagcttt 1560
 gcatatgact atgagcaagc cacgcatac cggatagtgc caacccttac caccgacctg 1620
 ccatcgagtt ag 1632

<210> 5

009510

- 19 -

<211> 319
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus erythropolis

<400> 5

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

Ser Asp Gly Thr Arg Ile His Val Glu Thr Ser Gly Asn Gly Val Pro
 20 25 30

Ala Leu Val Pro Cys Val Gly Ser Ser Val Pro Phe Glu Arg Thr Phe
 35 40 45

Gly Glu Glu Leu Lys Thr Asp Ile Gln Tyr Asn Phe Val Glu Val Arg
 50 55 60

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

Arg Ile Ser Asp Asp Leu Glu Glu Val Arg Gln Leu Leu Gly Leu Asp
 85 90 95

Lys Val Ile Ala Leu Gly Gln Ser Arg Asn Gly Met Met Ala Ala His
 100 105 110

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

Thr Pro Ala Ser Leu Ser Met Ile Lys Asn Glu Glu Tyr Trp Asn Ala
 130 135 140

Phe Ala Asp Asp Glu Arg Lys Arg Leu Arg Ala Glu Asn Asp Ala Ala
 145 150 155 160

Met Glu Arg Glu Gly Leu Leu Asp Leu Asp Asn Leu Asn Thr Ala Glu
 165 170 175

Lys Ile Val Arg Leu Phe Asp Leu Glu Gly Ala Val Tyr Phe Tyr Asp
 180 185 190

Pro Thr Thr Leu Met Asn Asp Trp Trp Asp Ala Ser Leu Leu Ser Arg
 195 200 205

Thr Phe Glu Val Val Met Ala Ser Asn Met Gly Trp Ala Asp Phe Asp
 210 215 220

Leu Val Gln Thr Leu Gln Asn Ser Asp Val Pro Ala Phe Val Thr Phe
 225 230 235 240

Gly Lys Tyr Asp Phe Met Val Ser Pro Leu Pro Lys Pro Gly Asn Pro
 245 250 255

009510

- 20 -

Val Asp Gly Lys Ala Gly Leu Phe Glu Asp Ile Pro Gly Val Arg Val
 260 265 270

Glu Val Phe Glu Lys Ser Gly His Phe Pro Tyr Trp Glu Gln Glu Gln
 275 280 285

Glu Phe Ala Arg Arg Tyr Arg Asp Trp Val Ala Thr Leu Pro Glu Ser
 290 295 300

Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Met Thr Pro Asn Gly Ile Arg Gln
 305 310 315

<210> 6
 <211> 960
 <212> DNA
 <213> Rhodococcus erythropolis

<400> 6
 atggctcgcc ccaagagaag gagatctgcc atgccattgg tggttctgag cgacggcaca 60
 cgcattcacg tcgaaacttc aggcaacggc gtccctgcgc ttgttccatg cgtgggatcg 120
 agcgttccgt tcgagcggac gttcgggtgag gaattgaaga cggatattca gtacaacttc 180
 gtcgaggtcc gcggtacctc caggteccgac ggcgaaccga gtgaggtcgc ctactcgtat 240
 cgtatttccg acgacctcga agaggtccgt cagtgtgttg gtttggaaca ggtcatcgca 300
 ctccggccagt cgcgtaacgg catgatggcc gtcactacg cgcagaagta tccgaattcg 360
 gtcctacacc tggtaaccat cggcaccctt gcgtctttga gtatgatcaa gaacgaagaa 420
 tactggaacg cgttcgcaga cgacgagcgt aaacgcctcc gcgctgaaaa cgacgcggcg 480
 atggagcgcg aggggtctct cgaccttgac aacctgaata ctgccgaaaa gatcgttcgc 540
 ctcttcgatc ttgaaggcgc agtgtacttc tacgatccaa cgacactcat gaatgattgg 600
 tgggacgctt cacttctcag ccggacattc gaagtcgtca tggcgtcgaa tatgggttgg 660
 gcagacttcg acctcgttca aacctgcag aattctgatg tccccgcttt cgtaacgttc 720
 ggaaagtacg acttcatggt ctccccgctg ccgaaaccag gaaatccggt tgacggaaaa 780
 gccggcctct tcgaagatat tccgggtgtc cgggtagagg tcttcgagaa gagtgggcac 840
 ttcccgattt gggagcagga acaggaattt gtcgccgct atcgcgattg ggtcgcaacc 900
 cttccggaat ccgctgtacg cgctgcagaa gctatgacgc ccaatggcat tcggcagtga 960

<210> 7
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus erythropolis

<400> 7

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

Thr Ser Gly Asn Gly Val Pro Ala Leu Val Pro Cys Val Gly Ser Ser
 20 25 30

000510

- 21 -

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

Tyr Asn Phe Val Glu Val Arg Gly Thr Ser Arg Ser Asp Gly Glu Pro
 50 55 60

Ser Glu Val Ala Ser Leu Asp Arg Ile Ser Asp Asp Leu Glu Glu Val
 65 70 75 80

Arg Gln Leu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ile Ala Leu Gly Gln Ser Arg
 85 90 95

Asn Gly Met Met Ala Ala His Tyr Ala Gln Lys Tyr Pro Asn Ser Val
 100 105 110

Leu His Leu Val Thr Ile Gly Thr Pro Ala Ser Leu Ser Met Ile Lys
 115 120 125

Asn Glu Glu Tyr Trp Asn Ala Phe Ala Asp Asp Glu Arg Lys Arg Leu
 130 135 140

Arg Ala Glu Asn Asp Ala Ala Met Glu Arg Glu Gly Leu Leu Asp Leu
 145 150 155 160

Asp Asn Leu Asn Thr Ala Glu Lys Ile Val Arg Leu Phe Asp Leu Glu
 165 170 175

Gly Ala Val Tyr Phe Tyr Asp Pro Thr Thr Leu Met Asn Asp Trp Trp
 180 185 190

Asp Ala Ser Leu Leu Ser Arg Thr Phe Glu Val Val Met Ala Ser Asn
 195 200 205

Met Gly Trp Ala Asp Phe Asp Leu Val Gln Thr Leu Gln Asn Ser Asp
 210 215 220

Val Pro Ala Phe Val Thr Phe Gly Lys Tyr Asp Phe Met Val Ser Pro
 225 230 235 240

Leu Pro Lys Pro Gly Asn Pro Val Asp Gly Lys Ala Gly Leu Phe Glu
 245 250 255

Asp Ile Pro Gly Val Arg Val Glu Val Phe Glu Lys Ser Gly His Phe
 260 265 270

Pro Tyr Trp Glu Gln Glu Gln Glu Phe Ala Arg Arg Tyr Arg Asp Trp
 275 280 285

Val Ala Thr Leu Pro Glu Ser Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Met Thr
 290 295 300

Pro Asn Gly Ile Arg Gln His His His His His His
 305 310 315

009510

- 22 -

<210> 8
 <211> 951
 <212> DNA
 <213> Rhodococcus erythropolis

<400> 8
 atgggcccat tgggtggttct gagcgacggc acacgcattc acgtcgaaac ttcaggcaac 60
 ggcgtccctg cgcttggtcc atgcgtggga tgcagcgttc cgttcgagcg gacgttcggt 120
 gaggaattga agacggatat tcagtacaac ttcgtcgagg tccgcggtac ctccagggtcc 180
 gacggcgaac cgagtgaagt cgcctcactc gatcgtattt ccgacgacct cgaagagggtc 240
 cgtcagttgt tgggtttgga caaggtcac gcactcggcc agtcgcgtaa cggcatgatg 300
 gccgctcact acgcgcagaa gtatccgaat tcggtcctac acctggtaac catcggcacc 360
 cctgcgtctt tgagtatgat caagaacgaa gaatactgga acgcgttcgc agacgacgag 420
 cgtaaacgcc tccgcgctga aaacgacgcg gcgatggagc gcgaggggtct cctcgacctt 480
 gacaacctga atactgccga aaagatcggt cgcctcttcg atcttgaagg cgcagtgtac 540
 ttctacgac caacgacact catgaatgat tgggtgggacg cttcacttct cagccggaca 600
 ttcgaagtcg tcatggcgctc gaatatgggt tgggcagact tcgacctcgt tcaaactctg 660
 cagaattctg atgtccccgc tttcgtaacg ttcggaaagt acgacttcat ggtctccccg 720
 ctgccgaaac caggaaatcc ggttgacgga aaagccggcc tcttcgaaga tattccgggt 780
 gtccgggtag aggtcttcga gaagagtggg cacttccgt attgggagca ggaacaggaa 840
 ttgctcgcc gctatcgca ttgggtcgca acccttcgg aatccgctgt acgcgctgca 900
 gaagctatga cgcccaatgg cattcggcag catcaccatc accatcactg a 951

009510

- 23 -

Patentansprüche:

1. Enzympräparation zur Transformation von Ergopeptinen, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Ergopeptine am Cyclolring hydrolytisch spaltende α/β Hydrolase und wenigstens eine Abbauprodukte der hydrolytischen Spaltung transformierende Amidase enthalten ist.

2. Enzympräparation nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Ergopeptine am Cyclolring spaltende α/β Hydrolase eine katalytische Triade, bestehend aus einer nukleophilen Aminosäure, aus Histidin und aus einer sauren Aminosäure aufweisen.

3. Enzympräparation nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Ergopeptine aus Cyclolring spaltende α/β Hydrolase eine katalytische Triade aus der nukleophilen Aminosäure Serin, aus Histidin und aus einer der sauren Aminosäuren Aspartat oder Glutamat besteht.

4. Enzympräparation nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die α/β Hydrolase einen nukleophilen Ellbogen mit einer Sequenz Gly-Gln-Ser-Arg.Asn-Gly aufweist.

5. Enzympräparation nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die α/β Hydrolase insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 1 ist.

6. Enzympräparation nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die α/β Hydrolase eine von der Sequenz ID Nr. 1 verschiedene N- oder C-terminale Sequenz aufweist, insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 5 oder 7 ist.

7. Enzympräparation nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die α/β Hydrolase wenigstens 96 % Sequenzidentität mit der Sequenz ID Nr. 1 aufweist, insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 5 ist.

8. Enzympräparation nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens ein Abbauprodukt der die hydrolytische Spaltung transformierenden Amidase ein Enzym der Sequenz ID Nr. 3 ist.

9. Enzympräparation nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eines der Enzyme gewählt aus der α/β Hydrolase und der Amidase aus einer *Rhodococcus erythropolis*, bevorzugt *Rhodococcus erythropolis* DSMZ 25948 Kultivierung stammt.

10. Enzympräparation nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eines der Enzyme gewählt aus der α/β Hydrolase und der Amidase ein rekombinant in einer Wirtszelle gewählt aus *Pichia pastoris*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Hansen-*

003510

- 24 -

ula, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, einer Pflanzenzelle und/oder Sporen von *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* oder *Aspergillus* hergestelltes Enzym ist.

11. Enzympräparation nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein weiteres Enzym oder wenigstens eine weitere detoxifizierende Komponente, gewählt aus einem Mykotoxin abbauenden Enzym, einem Mykotoxin abbauenden Mikroorganismus oder einem Adsorptionsmittel zur Detoxifikation von von Ergopeptinen verschiedenen Mykotoxinen enthalten ist.

12. Enzympräparation nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine beim Abbau von Proteinen beteiligte weitere Enzym ein Futtermittelenzym ist.

13. Enzympräparation nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Mykotoxin abbauende Enzym aus Alfatoxin Detoxizymen, Zearalenon Esterasen, Zearalenon Lactonasen, Ochratoxin Amidasen, Fumonisin Carboxylesterasen, Fumonisin Aminotransferasen, Aminopolyl Aminoxygenasen, Deoxynivalenol Epoxidhydrolasen gewählt ist.

14. Enzympräparation nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Mykotoxin abbauende Mikroorganismus *Bacillus subtilis* ist.

15. Enzympräparation nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Adsorptionsmittel aus mikrobiellen Zellwänden oder anorganischen Materialien, wie Bentonit gewählt ist.

16. Verfahren zur enzymatischen Transformation von Ergopeptinen in einen wenig-vasokonstriktiven Metaboliten, insbesondere in Lysergsäure, dadurch gekennzeichnet, dass der Cyclorling der Ergopeptide mit einer α/β Hydrolase zu einem enzymatisch transformierten Metaboliten gespalten wird,

- dass der enzymatisch transformierte Metabolit spontan in Ergin umgewandelt wird, und
- dass Ergin mit einer Amidase enzymatisch zu Lysergsäure umgesetzt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Cyclorling mit dem Enzym der Sequenz ID Nr. 1 oder einem ein Enzym mit einer von der Sequenz ID Nr. 1 verschiedenen N- oder C-terminalen Sequenz, insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 5 oder der Sequenz ID Nr. 7 gespalten wird.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass das spontan gebildete Ergin mit dem Enzym der Sequenz ID Nr. 3 weiter zu Lysergsäure umgesetzt wird.

19. Futtermittel sowie Futtermittel- oder Silagezusatz enthaltend eine Enzympräparation nach einem der Ansprüche 1 bis 15.

20. Futtermittel sowie Futtermittel- oder Silagezusatz nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass ein *Rhodococcus erythropolis* Stamm, insbesondere *Rhodococcus erythropolis* DSMZ 25948 enthalten ist.

21. Futtermittel sowie Futtermittel- oder Silagezusatz nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich wenigstens ein physiologisch unbedenkliches Trägerma-

009510

- 25 -

terial, wie Maltrodextrin, Cyclodextrin, Kalziumcarbonat, Weizen, Weizenkleie, Reis, Reiskleie, Stärke, Dinatriumsulfat, Talkum, Saccharose oder Mischungen davon enthalten ist.

Wien, 9. Oktober 2012

Erber Aktiengesellschaft
durch:
Cunow Patentanwalts KG

009510

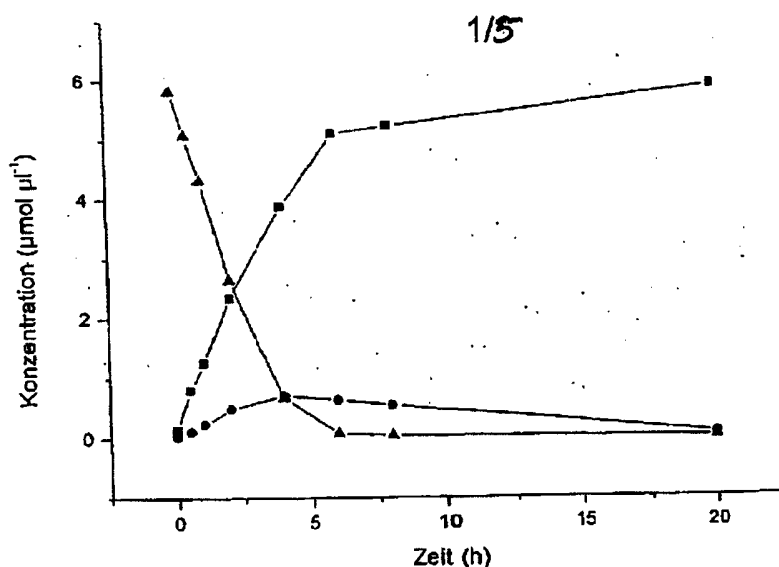


FIG. 1

Umsetzung von Ergotamin durch das Enzym der Sequenz ID Nr. 1 ((▲) Ergotamin); (■) Ergin;
(●) Zwischenprodukt

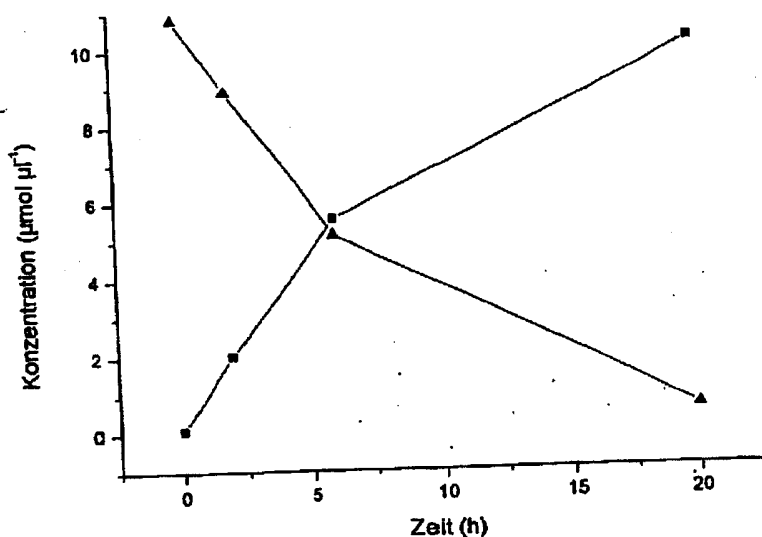
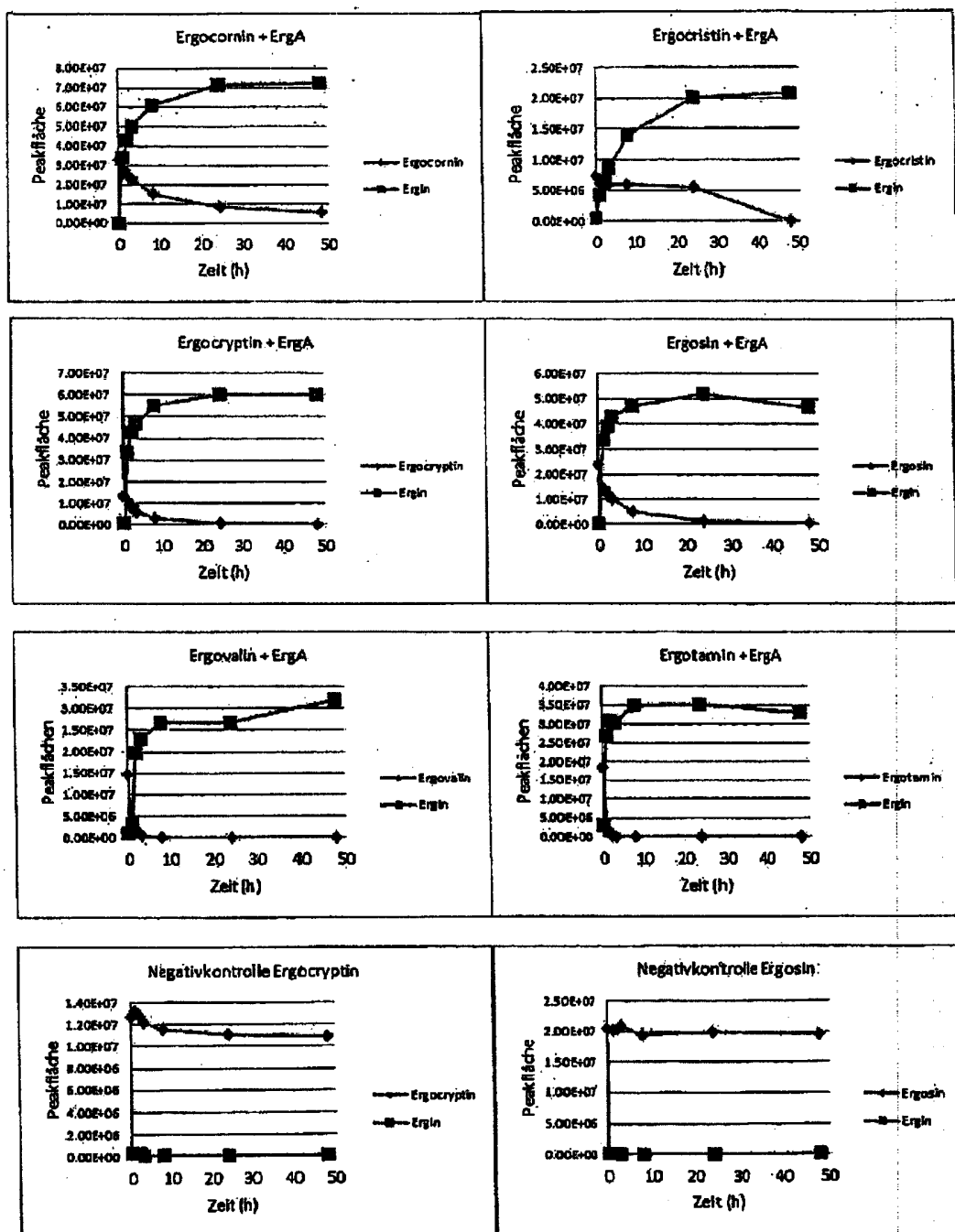


Fig. 2 Umsetzung von Ergin durch das ((▲) Ergin; (■) Lysergsäure)
Enzym der Sequenz ID Nr. 3

000510

2/5

FIG. 3



Peakflächen (Y-Achse) von LC-MS/MS Analytik der Ergopeptide Ergocornin, Ergocristin, Ergocryptin, Ergosin, Ergovalin und Ergotamin, in Summe mit dem jeweiligen Isomeren, aufgetragen gegen die Inkubationszeit mit oder ohne (Negativkontrollen) dem Enzym der Sequenz ID Nr.1 in Stunden

000510

3/5

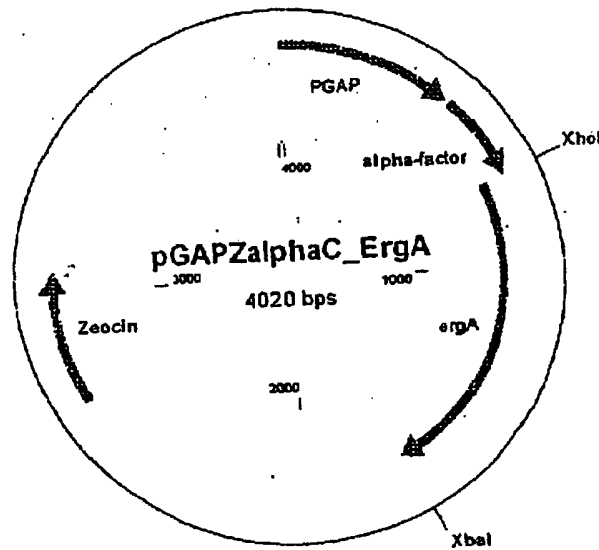


FIG. 4

Darstellung des *P. pastoris* Expressionsvektors pGAPZ alpha C mit dem Gen der Sequenz ID Nr. 2

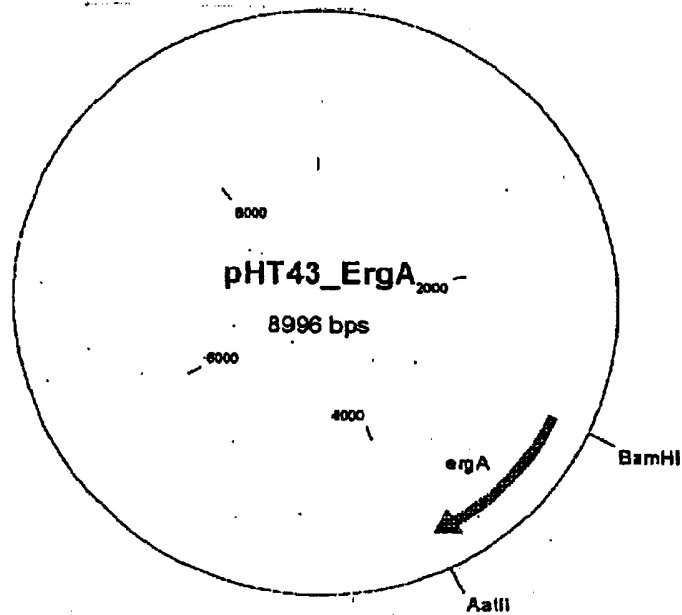


FIG. 5

Darstellung des *B. subtilis* Expressionsvektors pET43 mit dem Gen der Sequenz ID Nr. 2

009510

415

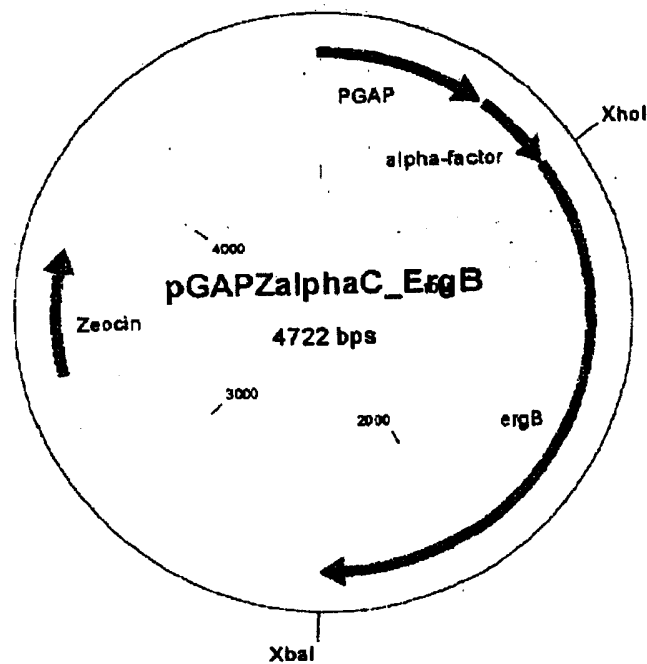


Fig. 6

Darstellung des *P. pastoris* Expressionsvektors pGAPZalpha C mit dem Gen *ergB*
 Sequenz ID Nr. 4

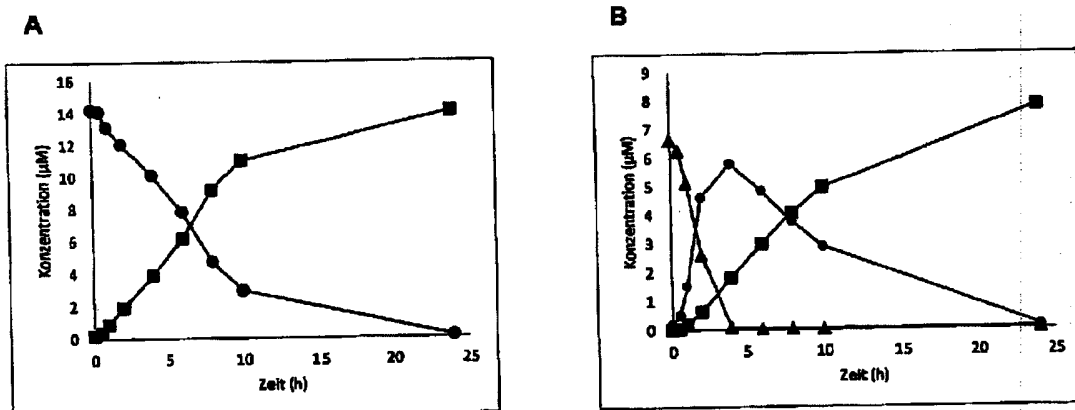


Fig.7 Umsetzung von (A) Ergin und (B) Ergotamine durch den Stamm DSM 25948 ((●) Ergin; (■) Lysergic acid; Ergotamine (▲)).

009510
5/5

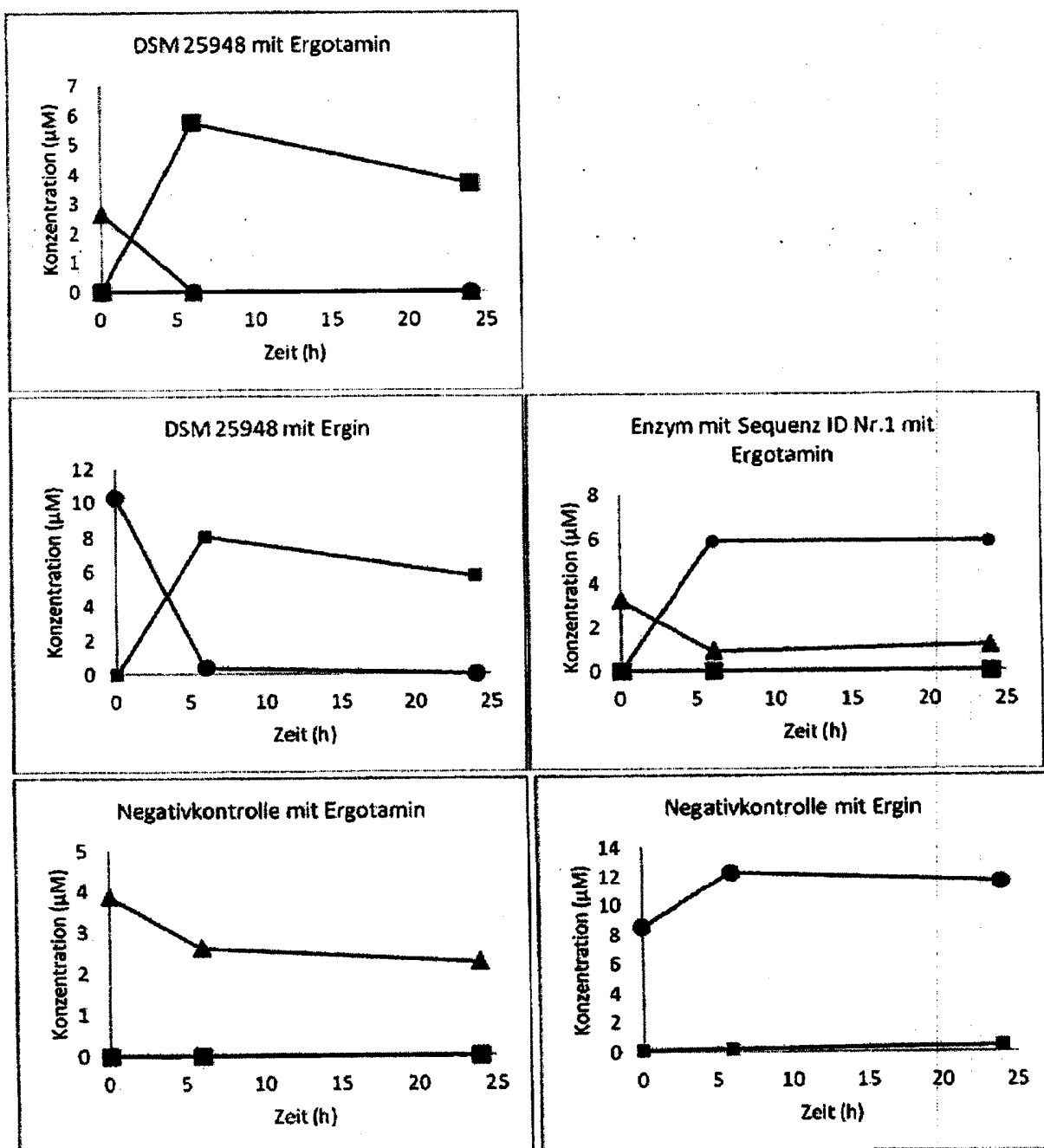


Fig.8 Umsetzung von Ergin und Ergotamine durch den Stamm DSM 25948 und dem Enzym mit der Sequenz ID Nr. 1 im Pansensaftmodell (●) Ergin; (■) Lysergsäure; (▲) Ergotamin).

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC:
C12N 9/14 (2006.01)

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß CPC:
C12N 9/14 (2013.01)

Recherchierte Prüfsubstanz (Klassifikation):
C12N

Konsultierte Online-Datenbank:
WPI, EPODOC, Fulltext, STN-registry

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am **09.10.2012** eingereichten Ansprüchen **1–21** erstellt.

Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	WO 9822602 A1 (PIONEER HI BRED, INC]) 28. Mai 1998 (28.05.1998) Tabelle 1; Ansprüche 2, 6, 31	1–3, 5, 9, 10, 19–21
Y	Zusammenfassung	11–15
Y	WO 2008053232 A2 (MANN STEPHEN PHILIP et al.) 08. Mai 2008 (08.05.2008) Ansprüche	11–15

Datum der Beendigung der Recherche:
02.08.2013

Seite 1 von 1

Prüfer(in):

MOSSER Reinhold

¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente:

- X** Veröffentlichung **von besonderer Bedeutung**: der Anmel-
gegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf
erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y** Veröffentlichung **von Bedeutung**: der Anmel-
gegenstand kann nicht
als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die
Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen
dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese **Verbindung für
einen Fachmann naheliegend** ist.

- A** Veröffentlichung, die den allgemeinen **Stand der Technik** definiert.
- P** Dokument, das von **Bedeutung** ist (Kategorien **X** oder **Y**), jedoch **nach
dem Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E** Dokument, das **von besonderer Bedeutung** ist (Kategorie **X**), aus dem
ein „**älteres Recht**“ hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch
nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage
stellen).
- &** Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.