



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0035387

(51)⁸ C12N 9/02

(13) B

(21) 1-2017-03762

(22) 27/03/2015

(86) PCT/AT2015/000048 27/03/2015

(87) WO2016/154640 06/10/2016

(45) 25/04/2023 421

(43) 26/03/2018 360A

(73) ERBER AKTIENGESELLSCHAFT (AT)

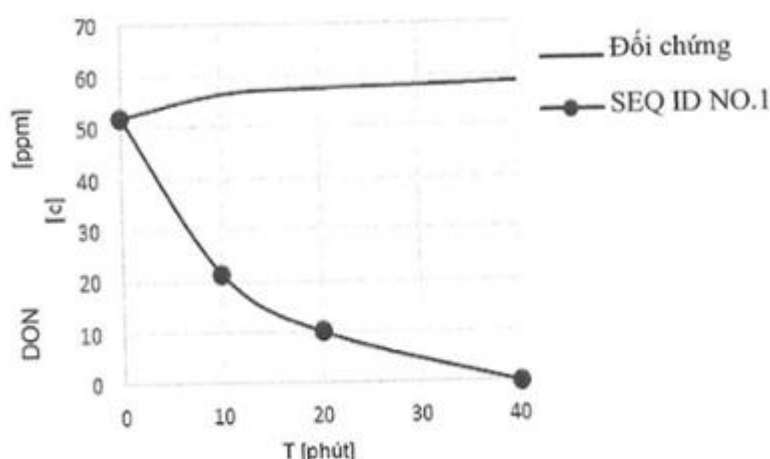
Erber Campus 1, 3131 Getzersdorf bei Traismauer, Austria

(72) BINDER, Eva-Maria (AT); WEBER, Barbara (AT); BERNARD, Claudia (AT).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) QUY TRÌNH CHUYỂN HÓA TRICHOOTHECEN NHỜ ENZYM VÀ CHẤT PHỤ GIA CHUYỂN HÓA TRICHOOTHECEN

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình chuyển hóa trichothecen nhờ enzym, trong đó ít nhất một trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 được cho tiếp xúc với dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, hoặc với biến thể chức năng còn biểu hiện độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80% với ít nhất một đồng nhân tố oxy hóa khử và nước, và nếu cần ít nhất một chất phụ trợ. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chất phụ gia chuyển hóa trichothecen, trong đó chất phụ gia này chứa dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, hoặc biến thể chức năng còn biểu hiện độ tương đồng về trình tự ít nhất 80%, và nếu cần, còn chứa ít nhất một thành phần bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm đồng nhân tố oxy hóa khử và ít nhất một chất phụ trợ.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng dehydrogenaza rượu để chuyển hóa trichothecen, quy trình chuyển hóa trichothecen, và chất phụ gia chuyển hóa trichothecen.

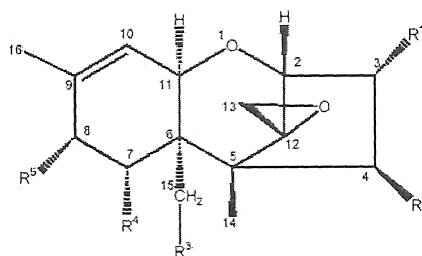
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các trichothecen thể hiện nhóm các độc tố nấm thường gặp bao gồm deoxynivalenol (DON, CAS số 51481-10-8), độc tố T-2 (CAS số 21259-20-1), độc tố HT-2 (CAS số 26934-87-2), nivalenol (CAS số 23282-20-4), fuseranon-X (CAS số 23255-69-8), scripentriol, 15-axetoxyscirpenol (CAS số 2623-22-5), 4,15-diaxetoxyscirpenol (CAS số 2270-40-8), trichodermol (CAS số 2198-93-8), verrucarín A (CAS số 3148-09-2), verrucarín J (CAS số 4643-58-7), isotrichodermin (CAS số 91423-90-4), hydroxyisotrichodermin (CAS số 344781-02-8), calonectrin (CAS số 38818-51-8), T-2 tetraol (CAS số 34114-99-3), deaxetylneosolaniol (CAS số 74833-39-9), neosolaniol (CAS số 36519-25-2), axetylneosolaniol (CAS số 65041-92-1), sporotrichiol (CAS số 101401-89-2), trichotriol (CAS số 109890-37-1), sambucinol (CAS số 90044-33-0), và culmorin (CAS số 18374-83-9), v.v.. Các trichothecen, cụ thể là DON, còn được biết là vomitoxin, có thể được tạo ra bởi một số nấm *Fusarium*, đặc biệt là *F. graminearum* và *F. culmorum*. Các loài nấm này tấn công cây trồng như ngô, các loại hạt khác, như lúa mỳ, yến mạch, hoặc đại mạch, trong khi thông thường sự tấn công bởi nấm diễn ra trước khi thu hoạch và sự sinh trưởng của nấm hoặc sự tạo thành độc tố nấm cũng có thể diễn ra trước đó, hoặc trong trường hợp bảo quản không thích hợp, diễn ra sau thu hoạch.

Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên hợp quốc (FAO) đã ước tính rằng 25% sản phẩm nông nghiệp trên toàn thế giới bị nhiễm độc tố nấm, điều này dẫn đến tổn thất đáng kể về kinh tế. Trong nghiên cứu gần đây hơn được thực hiện trên toàn thế giới bởi I. Rodrigues và K. Naehrer, *Toxins*, 2012, 4, 663-675, trong thời gian từ tháng 01/2009 đến tháng 12/2011, tổng số 23.781 mẫu được phân tích, trong

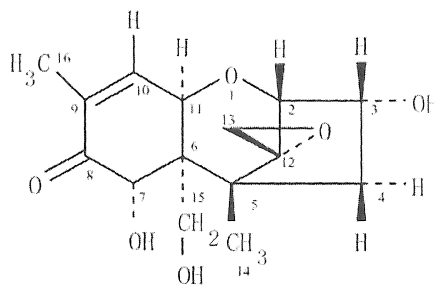
số đó 81% được kiểm tra là dương tính đối với ít nhất một độc tố nấm và 59% được kiểm tra là dương tính đối với các trichothecen, đặc biệt là DON. Các trichothecen, đặc biệt là DON có thể được phát hiện với tần suất lên đến 100% ở tất cả các vùng trên trái đất cũng như ở tất cả các loại hạt và thức ăn chăn nuôi được kiểm tra, như ngô, bột đậu nành, lúa mì, cám lúa mì, DDGS (bã ngũ cốc lên men: distiller's dried grains with solubles), và trong các hỗn hợp thức ăn chăn nuôi chế biến sẵn. Ngoài các thực phẩm cơ bản, không được chế biến, dấu vết của các trichothecen cũng được phát hiện trong các thực phẩm được chế biến, như bột mì, ngũ cốc ăn sáng, các sản phẩm mì ống, bánh mì, bánh nướng, và thực phẩm trên cơ sở lúa mì dùng cho trẻ nhỏ và trẻ em.

Các trichothecen có công thức cấu trúc dưới đây:



trong đó các phần tử thế khác nhau R1 đến R5 khác nhau tùy thuộc vào loại trichothecen. Thực tế đã biết rằng, ngoài nhóm epoxy, nhóm alpha-hydroxy nguyên vẹn trên nguyên tử C-3 của các trichothecen đồng thời chịu trách nhiệm cho tác động gây độc của chúng. Các loại trichothecen với nhóm hydroxy trên nguyên tử C-3 gồm deoxynivalenol, độc tố T-2, độc tố HT-2, nivalenol, fuseranon-X, 15-axetoxyscirpenol, 4,15-diaxetoxyscirpenol, trichodermol, T-2 tetraol, deaxetylneosolaniol, axetylneosolaniol, sporotrichiol, trichotriol, sambucinol, và culmorin.

Deoxynivalenol (DON) có nhóm carbonyl đặc trưng trên nguyên tử C-8 và có công thức cấu trúc dưới đây:



và có tên theo IUPAC là (3 α ,7 α)-3,7,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on. Trong tự nhiên, một số kiểu phụ DON độc tính cũng tồn tại với nhóm hydroxy trên nguyên tử C-3. Các ví dụ về chúng là DON axetyl hóa (ví dụ, 15 axyl DON), DON glycosyl hóa, DON sulfonat (ví dụ, DONS-1, DONS-2), hoặc DON sulfat (DON 15 sulfat). Các kiểu phụ DON này cũng thuộc các loại trichothecen với nhóm hydroxy hoặc nhóm hydroxy được thế trên nguyên tử C-3.

Vì tác động gây độc của DON nên giới hạn hoặc mức tối đa đã được quy định đối với thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bởi các cơ quan có thẩm quyền. Do đó, Liên minh châu Âu đã quy định hàm lượng DON trong thực phẩm (EC số 1881/2006, EC số 1126/2007) và đã khuyến nghị mức tối đa đối với thức ăn chăn nuôi (2006/576/EC). Ở Mỹ, FDA đã công bố mức tối đa.

Các bệnh tật mà gây ra bởi sự tiêu hóa các độc tố nấm ở người hoặc động vật đã được đề cập là các chứng ngộ độc nấm. Trong trường hợp các trichothecen hoặc các loại trichothecen, các bệnh tật này còn được đề cập là các "chứng ngộ độc nấm trichothecen", cụ thể hơn là "các chứng ngộ độc nấm gây ra bởi các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3", hoặc thậm chí cụ thể hơn là "các chứng ngộ độc nấm DON". Thực tế đã biết rằng các tác động gây độc của các trichothecen đối với động vật và người là dựa trên cơ sở một số yếu tố. Các yếu tố này gồm sự ức chế sinh tổng hợp protein, sự tương tác khả dĩ với các thụ thể serotonin và dopamin, và sự điều hòa tăng các xytokin tiền viêm (EFSA Journal 2004, 73, 1-41). Hơn nữa, các chứng ngộ độc nấm DON còn gây ra các thay đổi đối với các chỉ thị sinh học, như được chẩn đoán bằng sự tăng nồng độ IgA trong máu, sự tăng nồng độ SOCS3 trong gan, hoặc sự giảm mức IGFALS trong huyết tương (Pestka et al. 2004, Toxicol. Lett. 153, 61-73) cũng như sự giảm nồng độ claudin trong ruột (Pinton et al. 2009, Tox. Appl. Pharmacol. 237, 41-48).

Ví dụ, các chứng ngộ độc nấm trichothecen được biểu hiện ở lợn bằng sự giảm lượng thức ăn tiêu thụ, giảm tăng trưởng, xuất hiện sự nôn mửa và tiêu chảy, cũng như sự loạn năng miễn dịch và sự hấp thu dinh dưỡng giảm trong ruột. Trong trường hợp gia cầm, các chứng ngộ độc nấm trichothecen gây ra sự suy giảm tiêu thụ thức ăn, ít tăng trọng, bị tiêu chảy, và giảm trọng lượng vỏ trứng, v.v.. Trong trường hợp động vật nhai lại, sự tiêu thụ thức ăn giảm và sự sản xuất sữa kém được mô tả. Trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, các chứng ngộ độc nấm trichothecen gây ra sự giảm tiêu thụ thức ăn và giảm tỷ lệ tăng trưởng ở cá (ví dụ, cá hồi, cá da trơn, hoặc cá hồi chấm) và tôm, v.v. (Binder et. al, Guide to Mykotoxins; ISBN 978-0-9573721-0-8). Các tác động gây độc cũng đã được mô tả ở chó và mèo (EFSA Journal 2004, 73, 1-41). Ở người, các chứng ngộ độc nấm trichothecen có thể gây ra sự buồn nôn, nôn mửa, tiêu chảy, đau bụng, đau đầu, hoặc sốt, v.v. (Sobrova et. al, Interdisc. Toxicol. 2010, 3 (3), 94-99).

Chiến lược chính để giảm nhiễm trichothecen hoặc DON ở thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi là hạn chế sự tấn công của nấm, ví dụ, bằng cách tuân theo “thực hành nông nghiệp tốt”. Tiêu chuẩn này gồm việc sử dụng các hạt giống mà không có ký sinh trùng và nấm, hoặc cày xới phần còn lại sau thu hoạch. Hơn nữa, sự sinh trưởng của nấm trên các cánh đồng cũng có thể được giảm đi bằng cách sử dụng chính xác thuốc diệt nấm. Sau khi thu hoạch, sản phẩm thu hoạch nên được bảo quản ở độ ẩm dư dưới 15% và nhiệt độ thấp để ngăn ngừa sự sinh trưởng của nấm. Tương tự, sản phẩm thu hoạch bị nhiễm nấm phá hoại nên được loại bỏ trước khi chế biến tiếp. Mặc dù có danh sách các giải pháp này, I. Rodrigues và K. Naehrer đã báo cáo (năm 2012) rằng ngay cả trong các vùng có các tiêu chuẩn nông nghiệp cao nhất, như Mỹ và Trung Âu, 79% hoặc 72% tất cả số mẫu ngô được kiểm tra từ năm 2009 đến 2011 vẫn bị nhiễm DON.

Đã biết rằng protein dehydrogenaza rượu/aldehyt nhất định mà có khả năng xúc tác sự oxy hóa của nhóm hydroxymetyl của hợp chất thành nhóm aldehyt và oxy hóa nhóm aldehyt của hợp chất thành nhóm carboxyl, là hữu dụng để sản xuất axit 2-keto-L-gulonic (Database WPI; Week 200377; Thomson Scientific, London, GB; AN 2003-818681, XP002744030 & JP 2003 159079 A (Fujisawa Pharm Co Ltd.) 3 June 2003). Ngoài ra, cũng biết rằng dehydrogenaza rượu làm hạn chế khả

năng hình thành màng sinh học của nấm *Candida albicans* trên bề mặt ống thông thông qua cơ chế dựa trên etanol (Mukherjee Pranab K; Et al: “Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism”, *Infection And Immunity*, American Society for Microbiology, Vol:74, No.: 7, 1 July 2016, page(s):3804 – 3816; US - ISSN 0019-9567).

Công bố đơn quốc tế số WO2014/180939 mô tả phương pháp và biện pháp để duy trì và bảo quản hoạt tính enzym của dehydrogenaza. Công bố đơn quốc tế số WO 2009/133461 mô tả chế phẩm chống bần chứa thành phần hoạt tính là dehydrogenaza rượu (ADH) được chọn từ nhóm bao gồm ADH phụ thuộc đồng nhân tố oxy hóa khử quinon, ADH phụ thuộc đồng nhân tố oxy hóa khử nicotinamit adenin dinucleotit (NAD⁺), ADH phụ thuộc đồng nhân tố oxy hóa khử nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP⁺) và kết hợp bất kỳ của chúng; và phương pháp ức chế sự tạo thành màng sinh học trên vật phẩm sử dụng dehydrogenaza rượu. Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2006/105061 đề cập đến phương pháp phòng ngừa tổn thương oxy hóa tế bào gan do kim loại gây ra, để ức chế sự hình thành ung thư tế bào gan, hoặc để tăng hoạt tính của enzym chuyển hóa chất gây ung thư, bao gồm việc cho đối tượng sử dụng một lượng hiệu quả chiết xuất của chế phẩm bào chế từ thảo dược chứa *Panax pseudoginseng*, *Eucommiae ulmoides* và *Polygonati Rhizoma* là các thành phần thiết yếu.

Lựa chọn khác để giảm sự nhiễm độc tố nấm ở thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi là hấp thụ hoặc chuyển hóa chúng. Để hấp thụ, cần thiết là sự gắn kết giữa độc tố nấm với chất hấp thụ phải mạnh và đặc hiệu trong khoảng pH rộng và nó vẫn ổn định trong vùng dạ dày-ruột trong toàn bộ quá trình tiêu hóa. Mặc dù một số chất hấp thụ phi sinh học như cacbon hoạt tính, silicat hoặc các polyme tổng hợp như cholesteryamin có thể được sử dụng một cách hữu hiệu đối với các aflatoxin, nhưng việc sử dụng các chất này đối với các độc tố nấm khác, đặc biệt là các trichothecen, là không hiệu quả. Các chất hấp thụ sinh học như nấm men hoặc chiết xuất nấm men cũng được mô tả trong lĩnh vực này, nhưng các chất này cũng bị hạn chế tương tự như các chất hấp thụ phi sinh học. Nhược điểm đáng kể của các chất hấp thụ là

sự liên kết không đặc hiệu khả dĩ của chúng đối với các phân tử khác mà có thể là chất dinh dưỡng thiết yếu.

Tương tự, sự chuyển hóa, đặc biệt là sự khử độc tính của trichothecen bằng cách xử lý vật lý và hóa học là hạn chế vì DON rất ổn định và duy trì ổn định ngay cả đối với việc xử lý nhiệt ở nhiệt độ lên tới 350°C.

Sự chuyển hóa vi sinh khả dĩ của DON được mô tả trong patent châu Âu số EP-B 1 042 449, theo đó vi sinh vật BBSH 797 (DSM 11798) được sử dụng để khử độc tính của DON. Ở đây sự khử độc tính được dựa trên việc mở vòng epoxit trên các nguyên tử C-12 và C-13 của DON. US 2012/0263827 A mô tả sự chuyển hóa sinh học của DON thành 3-epi-DON bằng vi sinh vật với số truy cập Canada quốc tế là 040408-1. Tuy nhiên, đối với nhiều quy trình chế biến thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi, hỗn hợp của các vi sinh vật hoặc các chất hấp thụ là không thể chấp nhận, hoặc không được phép về mặt pháp lý, do đó ở các quy trình này sự chuyển hóa hoặc khử độc của các trichothecen như DON hoặc các kiểu phụ của DON là không thể chấp nhận.

Các trichothecen như DON và các kiểu phụ của DON được hấp thụ nhanh chóng vào đường tiêu hóa của cơ thể người hoặc động vật, đó là lý do tại sao sự khử độc nhanh và trúng đích là quan trọng.

Dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đầu tiên được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Nhật số JP-A 2003/159079 để sản xuất axit 2-ketogulonic. Công bố đơn quốc tế số WO 2009/133464 mô tả quy trình oxy hóa các sacarit bằng cách dùng enzym có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi để oxy hóa tinh bột, đặc biệt là trong công nghiệp làm bánh, để làm chậm các quá trình lão hóa trong bánh mỳ. Ở đây, dehydrogenaza rượu được sử dụng để oxy hóa các nhóm hydroxyl của các hydrat cacbon.

Các dehydrogenaza rượu với trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 và 3 được nhận diện trong quá trình giải trình tự hệ gen của các vi sinh vật *Devosia sp.* và được bảo quản trực tuyến trong máy chủ của Trung tâm Thông tin công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information - NCBI) dưới số định danh GI:737041022 và GI:630002266. Sự đặc trưng hóa chính xác hơn của các

dehydrogenaza rượu với SEQ ID NO. 2 và 3 không được nêu trong quá trình giải trình tự này.

Vì tính đa dạng của tác động gây độc của các trichothecen và tần xuất xuất hiện của chúng nên cần có các chất hoặc các nhóm chất như các enzym mà có thể được sử dụng để chuyển hóa đặc biệt là để khử độc tổ một cách đặc hiệu, an toàn, và chấp nhận được đối với các trichothecen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế hướng đến việc sử dụng dehydrogenaza rượu đặc hiệu và các biến thể của chúng mà với chúng, có thể chuyển hóa ít nhất một trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 thành các sản phẩm ít độc.

Để giải quyết nhiệm vụ này, đã bắt ngờ chứng minh được rằng việc sử dụng dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, hoặc ngoài ra, biến thể chức năng biểu hiện độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, tốt hơn là 86%, đặc biệt được ưu tiên ít nhất là 89% và ít nhất một đồng nhân tố oxy hóa khử để chuyển hóa ít nhất một trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 giúp chúng có thể chuyển hóa các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 như DON, độc tố T-2, hoặc nivalenol một cách đặc hiệu và tin cậy.

Sự chuyển hóa được hiểu là xảy ra khi cấu trúc của các độc tố được thay đổi trong đó các độc tố này tốt hơn là được chuyển hóa thành các chất chuyển hóa không độc hoặc ít độc, tức là, được chuyển hóa. Trong trường hợp này của sáng chế, sự thay đổi cấu trúc diễn ra, đặc biệt là trên nguyên tử C-3 của các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 nhờ sự biến đổi có xúc tác nhóm C-3 hydroxyl thành nhóm keto. Ngạc nhiên là, việc sử dụng dehydrogenaza rượu theo sáng chế gây ra sự chuyển hóa các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3, đặc biệt là DON, trong các môi trường hóa học và sinh học đa dạng nhất như trong dung dịch đậm, cám chăn nuôi, thức ăn chăn nuôi chứa nước bọt, hoặc thức ăn chăn nuôi chứa dịch dạ dày, hoặc trong các thức ăn chăn nuôi chứa các thành phần của ruột. Điều này là bất thường vì trong các môi trường tương ứng cho hoạt tính enzym, các thông số quan trọng như độ pH, nồng độ proteaza, cường độ ion, hoặc các nền chất là cực kỳ khác nhau. Kết quả là, hoạt tính của enzym có thể

được đảm bảo khi bổ sung nước vào thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, để tiêu thụ chúng qua đường miệng và cả trong miệng và đường tiêu hóa. Ngạc nhiên là, đối với các môi trường nhất định, việc bổ sung các nhân tố oxy hóa khử từ bên ngoài có thể được bỏ qua; điều này áp dụng đặc biệt cho các hỗn hợp thức ăn chăn nuôi, nước bọt, và dịch dạ dày.

Dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 là dehydrogenaza rượu phụ thuộc đồng nhân tố quinon. Để tạo ra holoenzym hoạt tính hoặc dehydrogenaza rượu hoạt tính, đồng nhân tố quinon, tốt hơn là pyroloquinolin quinon (PCC) với sự có mặt của ion kim loại, tốt hơn là Ca^{2+} , có thể được liên kết với enzym. Do đó, dehydrogenaza rượu được hoạt hóa chứa cả đồng nhân tố quinon và ion kim loại, trong đó tỷ lệ mol giữa enzym và đồng nhân tố quinon là 1:1. Hơn nữa, đồng nhân tố oxy hóa khử là cần thiết đối với hoạt tính xúc tác của dehydrogenaza rượu, trong đó hoặc là nó được sử dụng dưới dạng nhân tố oxy hóa khử được sản xuất bằng cách tổng hợp ngoài dehydrogenaza rượu được hoạt hóa, hoặc là nhân tố oxy hóa khử cũng có mặt trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi và trong sản phẩm bài tiết của động vật hoặc người có thể được sử dụng. Ví dụ, các đồng nhân tố oxy hóa khử tự nhiên này có thể được tạo ra, và nếu cần, được chiết từ thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi trong quá trình cung cấp, chế biến, hoặc tiêu hóa thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi trong miệng và trong đường tiêu hóa của người hoặc động vật. Ví dụ về các sản phẩm bài tiết của người hoặc động vật mà chứa đồng nhân tố oxy hóa khử tự nhiên này là các sản phẩm bài tiết tiêu hóa như nước bọt, dịch dạ dày, dịch ruột, dịch tụy, mật, hoặc dịch dạ cỏ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế được giải thích dưới đây dựa vào các phương án và hình vẽ. Ở đây:

Fig.1 thể hiện sự chuyển hóa theo thời gian của deoxynivalenol đối với dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 cũng như mẫu đối chứng (CTR) để so sánh, và

Fig.2 thể hiện sự chuyển hóa theo thời gian của DON đối với dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4 cũng như mẫu đối chứng (CTR) để so sánh.

Mô tả chi tiết sáng chế

Từ “biến thể polypeptit” hoặc “biến thể” chỉ các polypeptit chức năng mà, so với SEQ ID NO. 1, có ít nhất một sự thể axit amin, trong đó chức năng enzym được giữ nguyên. Sự chuyển hóa, đặc biệt là sự oxy hóa nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 của các trichothecen thành nhóm keto, được hiểu là nhờ chức năng enzym. Hơn nữa, “biến thể polypeptit” có thể còn có các sự chèn hoặc xóa bỏ axit amin, đặc biệt là trình tự được kéo dài hoặc được cắt bỏ về phía đầu C hoặc N so với trình tự polypeptit SEQ ID NO. 1. Chức năng enzym sau đó về cơ bản là được giữ nguyên nếu cơ chế phản ứng enzym duy trì không đổi, tức là trichothecen được oxy hóa trong cùng một vị trí và hoạt tính enzym của biến thể là ít nhất 10%, tốt hơn là ít nhất 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, đặc biệt là >100% so với polypeptit gốc ban đầu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1.

Thuật ngữ “độ tương đồng về trình tự” chỉ độ tương đồng về trình tự tính theo phần trăm. Đối với các trình tự axit amin và các trình tự nucleotit, độ tương đồng về trình tự có thể được xác định bằng mắt, tuy nhiên tốt hơn là được tính bằng chương trình máy tính. Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 1 được quy định làm trình tự tham chiếu. Việc so sánh trình tự cũng được thực hiện trong các đoạn trình tự, trong trường hợp này đoạn được hiểu là phần trình tự liên tục của trình tự tham chiếu. Độ dài của các đoạn trình tự đối với các trình tự peptit thường là 3 đến 200, tốt hơn là 15 đến 65, tốt nhất là 30 đến 50 axit amin. Có nhiều chương trình tin sinh học có bán sẵn hoặc dùng không mất tiền mà có thể được sử dụng để xác định độ đồng nhất và các chương trình này liên tục được cải biến. Ví dụ về chúng là: gói GCG Wisconsin BestFit (Devereux et al. 1984), BLAST (Altschul et al. 1990) hoặc BLAST 2 (Tatusova and Madden 1999). Vì các lựa chọn cài đặt khác nhau đối với các thuật toán này nên có thể có các kết quả khác nhau khi sử dụng chúng với các trình tự đầu vào như nhau. Do đó, thuật toán tra cứu và việc cài đặt kèm theo phải được quy định. Trong trường hợp của sáng chế, chương trình NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), đặc biệt là với BLASTP dùng cho các polypeptit, mà có sẵn trên trang chủ của “National Center for Biotechnology Information” (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) được sử dụng để tính độ tương đồng về trình tự. Bằng cách này có thể so sánh hai hoặc nhiều trình tự với nhau theo thuật toán

của Altschul et al., 1997 (Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). Ở đây, phiên bản chương trình ngày 12/08/2014 được sử dụng. Các thông số cài đặt cơ sở được sử dụng làm thông số cài đặt chương trình, đặc biệt là đối với việc so sánh axit amin: “trình tự đích tối đa” = 100; “ngưỡng kỳ vọng” = 10; “cỡ từ” = 3; “ma trận” = BLOSUM62; “trị số khoảng hở” = “Tồn tại: 11; Kéo dài: 1”; “điều chỉnh tính toán” = “điều chỉnh ma trận điểm thành phần có điều kiện”.

Bằng cách sử dụng dehydrogenaza rượu chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon theo sáng chế hoặc biến thể chức năng của nó, có thể chuyển hóa ít nhất 20%, tốt hơn là ít nhất 50%, đặc biệt là ít nhất 90% của ít nhất một trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3, đặc biệt là DON, trong đó dehydrogenaza rượu chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon hoặc biến thể chức năng của nó được tiếp xúc đủ với ít nhất một trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 trong ít nhất một phút, tốt hơn là ít nhất 5 phút, đặc biệt là ít nhất 60 phút.

Theo phương án khác của sáng chế, trình tự axit amin của biến thể chức năng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 đến SEQ ID NO. 4 được sử dụng. Với các biến thể chức năng này mà có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 86% đối với dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, có thể chuyển hóa các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3, đặc biệt là DON, với kết quả tốt một cách thích hợp.

Theo phương án khác của sáng chế, đồng nhân tố quinon được chọn từ nhóm PCC, TTC, TPC, LTC, và CTC, tốt hơn là PCC, được sử dụng. Bằng cách sử dụng một trong các đồng nhân tố quinon: pyroloquinolin quinon (PCC, CAS số 72909-34-3), tryptophan tryptophylquinon (TTQ, CAS số 134645-25-3), topaquinon (TPC, CAS số 64192-68-3), lysin tyrosylquinon (LTQ, CAS số 178989-72-5) hoặc xystein tryptophylquinon (CTC, CAS số 400616-72-0) trong các dehydrogenaza rượu, có thể chuyển hóa các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3, như DON, thành các dẫn xuất mà hoặc là không độc hoặc là vô hại về mặt độc tố học.

Sự gắn kết đặc biệt nhanh và hoàn toàn của đồng nhân tố quinon với dehydrogenaza rượu đạt được bằng cách được gắn kết bởi ít nhất một trong số các

ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} và Co^{3+} , tốt hơn là Ca^{2+} và Mg^{2+} .

Cũng bằng cách sử dụng ít nhất một đồng nhân tố oxy hóa khử được chọn từ nhóm phenazin methosulphat (PMS), các dẫn xuất PMS, kali hexaxyanoferrat (III), natri hexaxyanoferrat (III), cytochrom C, coenzym Q1, coenzym Q10, xanh metylen và N,N,N',N'-tetrametyl-p-phenylendiamin (TMPD), tốt hơn là phenazin methosulphat (PMS, CAS số 299-11-6), coenzym Q1 và coenzym Q10, sự chuyển hóa nhanh và hoàn toàn các trichothecen là khả dĩ độc nhất với sự có mặt của ăm, nhờ đó đảm bảo rằng các trichothecen có trong các thành phần thức ăn chăn nuôi đã được chuyển hóa thành các dẫn xuất không độc, ví dụ, trong quá trình sản xuất thức ăn chăn nuôi và trong trường hợp bất kỳ trước khi được sử dụng cho động vật. Ví dụ về các dẫn xuất PMS là: 1-hydroxyphenazin, axit 2-(pentaprenyloxy) dihydrophenazin, axit 5,10-dihydro-9-dimetylalylphenazin-1-carboxylic, axit 5,10-dihydrophenazin-1-carboxylic, 5-metylphenazini metyl sulfat, axit 6-axetophenazin-1-carboxylic, benthophoenin, clofazimin, dihydrometanophenazin, axit esmeraldic, esmeraldin B, izumiphenazin A – C, cation Janus Green B, methanophenazin pelagiomicin A, phenazin, axit phenazin-1,6-dicarboxylic phenazin-1-carboxamid, axit phenazin-1-carboxylic, phenosafranin, pyocyanin, saphenamycin, hoặc este metyl của axit saphenic. Vì sự chuyển hóa của các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, đặc biệt là thức ăn cho lợn, gia cầm, gia súc, ngựa, cá, thức ăn cho nuôi trồng thủy sản, và các động vật nuôi và trong các nguyên liệu thô trên cơ sở thực vật được sử dụng để sản xuất hoặc chế biến thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, có thể ngăn chặn sự có hại đối với sức khỏe của động vật và người bằng cách sử dụng theo sáng chế.

Hơn nữa, sáng chế còn hướng đến việc đề xuất quy trình qua đó có thể chuyển hóa các trichothecen, đặc biệt là các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3, một cách an toàn và tin cậy thành các sản phẩm ít độc, bất kể liệu rằng các sản phẩm nông nghiệp mà các trichothecen này có mặt trong đó đã được chế biến hay chưa.

Để giải quyết nhiệm vụ này, quy trình theo sáng chế để chuyển hóa trichothecen nhờ enzym về cơ bản được đặc trưng bằng việc ít nhất một trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 được cho tiếp xúc với dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, hoặc với biến thể chức năng biểu hiện độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, tốt hơn là ít nhất 86%, đặc biệt tốt hơn là ít nhất 89%, với ít nhất một đồng nhân tố oxy hóa khử và nước, và nếu cần ít nhất một chất phụ trợ. Bằng cách cho trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 tiếp xúc với dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, và ngoài ra, ít nhất một đồng nhân tố oxy hóa khử và nước, có thể oxy hóa nhóm hydroxyl có mặt trên nguyên tử C-3 của các trichothecen thành keton, trong trường hợp này trichothecen như vậy được khử độc và được chuyển hóa thành hợp chất không độc hoặc có độc tính thấp.

Bằng cách tiếp tục sử dụng biến thể chức năng của trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO. 2 đến SEQ ID NO. 4 thay cho trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 1, các ưu điểm tương tự như đạt được bằng cách sử dụng dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 có thể đạt được, và sự chuyển hóa các trichothecen có trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi có thể đạt được một cách đặc biệt nhanh và tin cậy, bất kể tình trạng chế biến của chúng, tức là, bất kể liệu chúng là các sản phẩm nông nghiệp đã được chế biến hay không phải.

Sự chuyển hóa đặc biệt nhanh và hoàn toàn của trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 đạt được với quy trình theo sáng chế ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 55°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 28°C đến 45°C. Vì quy trình theo sáng chế có thể được thực hiện trong khoảng nhiệt độ rộng như vậy nên dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc các biến thể chức năng của nó mà biểu hiện trình tự ít nhất 80% tương đồng với SEQ ID NO. 1 có thể được sử dụng trong các ứng dụng đa dạng nhất như lĩnh vực nuôi trồng thủy sản hoặc cả trong các quy trình công nghệ ở nhiệt độ cao. Ví dụ về các quy trình công nghệ trong đó sự chuyển hóa các trichothecen ở nhiệt độ cao là quan trọng như vậy là quy trình để chế biến thức ăn chăn nuôi, sản xuất mỳ ống và các sản phẩm ngô khác như cháo ngô, bỏng ngô,

cốm ngô, bánh mỳ trắng (cornbread) hoặc bánh ngô (tortillas), cũng như các quy trình hóa lỏng tinh bột, các quy trình đường hóa, hoặc các quy trình lên men như quy trình nấu hoặc quy trình lên men, đặc biệt trong sản xuất etanol sinh học. Ở đây, quan trọng là đảm bảo rằng thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi được sản xuất bằng các quy trình này không chứa lượng có hại bất kỳ của các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3.

Theo phương án khác của quy trình theo sáng chế, quy trình này được thực hiện theo cách sao cho ít nhất một trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 được cho tiếp xúc với dehydrogenaza rượu chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, hoặc ít nhất một biến thể chức năng của nó, với nhân tố oxy hóa khử, với nước, và nếu cần, với chất phụ trợ, trong ít nhất là một phút, tốt hơn là ít nhất 5 phút, đặc biệt tốt hơn là trong ít nhất 60 phút. Vì thời gian tiếp xúc từ 1 phút và trên 60 phút là đủ để đạt được sự chuyển hóa thích hợp các trichothecen thành các dẫn xuất không độc hoặc độc tính thấp, quy trình theo sáng chế có thể được sử dụng trong quy trình để xử lý các nguyên liệu nông nghiệp cơ bản, ví dụ, dùng cho thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi. Mặt khác, chủ trại cũng có thể thực hiện quy trình này ngay trước khi cho ăn, ví dụ, bằng cách bổ sung nước vào thức ăn chăn nuôi và để yên từ 1 phút cho đến khoảng 1 giờ ở nhiệt độ từ 5°C đến 55°C, việc này sẽ bắt đầu sự chuyển hóa các trichothecen thành các sản phẩm không độc.

Sự chuyển hóa đặc biệt nhanh và hoàn toàn là khả dĩ nếu đồng nhân tố quinon được chọn từ nhóm PCC, TTC, PTC, LTC và CTC, tốt hơn là PCC, vì nó tương ứng với phương án khác của quy trình theo sáng chế. Đồng nhân tố quinon này cho phép các dehydrogenaza rượu tấn công nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 của các trichothecen một cách nhanh chóng và tin cậy và chuyển hóa nó thành nhóm keto chứa dẫn xuất không độc.

Sự hoàn thành hơn nữa của phản ứng và cụ thể là sự tăng tốc phản ứng là khả dĩ nếu đồng nhân tố trong quy trình theo sáng chế được gắn kết với dehydrogenaza rượu bằng biện pháp dùng ít nhất một ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} và Co^{3+} , tốt hơn là Ca^{2+} và Mg^{2+} . Thực hiện quy trình theo cách này không chỉ tạo ra sự gắn

kết mạnh giữa đồng nhân tố quinon với dehydrogenaza rượu, mà còn cho phép sự chuyển hóa nhanh và đáng tin cậy các trichothecen.

Để cải thiện thêm nữa sự chuyển hóa các trichothecen, đặc biệt là để hoàn thành phản ứng chuyển hóa, quy trình theo sáng chế được tiếp tục sao cho nhân tố oxy hóa khử được chọn từ nhóm PMS, các dẫn xuất của PMS, kali hexaxyanoferrat (III), natri hexaxyanoferrat (III), cytochrom C, coenzym Q1, coenzym Q10, xanh metylen, và TMPD, tốt hơn là PMS, coenzym Q1 và coenzym Q10, được sử dụng. Bằng cách bổ sung đồng nhân tố oxy hóa khử này, có thể thực hiện sự chuyển hóa các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 trong môi trường nước, ví dụ, như trong thức ăn chăn nuôi nhào hoặc thức ăn chăn nuôi mà được dùng cho động vật trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, mà không có nhân tố oxy hóa khử mà phải được bổ sung hoặc phải được có mặt, nhân tố này có thể thu được, ví dụ, từ nước bọt, dịch dạ dày hoặc dịch ruột, hoặc cho động vật phải đã tiêu hóa thức ăn chăn nuôi nhào hoặc thức ăn chăn nuôi, trong trường hợp này, sự tái hấp thu các trichothecen của động vật tiêu hóa thức ăn chăn nuôi có thể được ngăn chặn.

Cuối cùng, sáng chế hướng đến việc tạo ra chất phụ gia chuyển hóa trichothecen mà với nó có thể chuyển hóa các trichothecen trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi một cách an toàn và tin cậy thành các dẫn xuất không độc.

Để giải quyết nhiệm vụ này, chất phụ gia theo sáng chế về cơ bản là được đặc trưng ở chỗ nó chứa dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, hoặc biến thể chức năng còn biểu hiện độ tương đồng về trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 86%, đặc biệt tốt hơn là ít nhất 89%, và nếu cần, còn chứa ít nhất một thành phần bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp và ít nhất một chất phụ trợ. Các chất phụ gia này có thể được trộn với các thức ăn chăn nuôi thông thường với nồng độ thấp, ví dụ, khoảng 10g đến 1kg trên một tấn thức ăn, và với nồng độ thấp như vậy, cho phép các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 được chuyển hóa thành các dẫn xuất không độc nhờ đó cả sức khỏe và khả năng thực hiện của các con vật mà được ăn thức ăn này, ví dụ, sẽ cải thiện và do đó, không chỉ tỷ lệ hư hỏng thức ăn chăn nuôi sẽ có thể được giảm đi mà khả năng sử dụng thức ăn này cũng sẽ được cải thiện.

Các kết quả tốt một cách thích hợp có thể đạt được bằng chất phụ gia theo sáng chế mà, thay vì chứa dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, chất phụ gia này chứa biến thể chức năng của nó, có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO. 2 đến SEQ ID NO. 4.

Để chuyển hóa về cơ bản là hoàn toàn nhóm hydroxyl có mặt trên nguyên tử C-3 của các trichothecen bằng chất phụ gia theo sáng chế, phương án thêm nữa là chứa đồng nhân tố quinon được chọn từ nhóm PCC, TTC, TPC, LTC, và CTC, cũng như ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} và Co^{3+} . Với phương án thêm này, một mặt có thể gắn kết đồng nhân tố quinon một cách an toàn và đáng tin cậy với dehydrogenaza rượu, và mặt khác, với dehydrogenaza rượu mà chứa các thành phần bổ sung này, có thể đạt được sự chuyển hóa hoàn toàn các trichothecen như deoxynivalenol mà biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 của phân tử.

Để phản ứng này cũng được thực hiện mà không có mặt của các đồng nhân tố oxy hóa khử như các chất có tự nhiên trong nước bọt, dịch dạ dày, hoặc dịch ruột hoặc tương tự, chất phụ gia theo sáng chế còn được biểu hiện sao cho ngoài ra, để làm đồng nhân tố oxy hóa khử thêm nữa, đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp được chọn bổ sung từ nhóm PMS, các dẫn xuất PMS, kali hexaxyanoferrat (III), natri hexaxyanoferrat (III), cytochrom C, coenzym Q1, coenzym Q10, xanh metylen, và TMPD, tốt hơn là PMS, coenzym Q1 và coenzym Q10.

Theo phương án khác của sáng chế, chất phụ gia được phát triển sao cho chất phụ trợ được chọn từ nhóm bao gồm các chất mang trợ, các vitamin, các chất khoáng, các chất phát sinh thực vật, các enzym và các thành phần bổ sung để khử độc các độc tố nấm như các enzym phân hủy độc tố nấm, đặc biệt là các aflatoxin-oxidaza, ergotamin hydrolaza, ergotamin amidaza, zearalenon esteraza, zearalenon lactonaza, zearalenon hydrolaza, ochratoxin amidaza, fumonisin aminotransferaza, fumonisin carboxyltransferaza, amino polyol amin oxidaza, deoxynivalenol epoxit hydrolaza, deoxynivalenol dehydrogenaza, deoxynivalenol oxidaza, trichothecen dehydrogenaza, trichothecen oxidaza; và các vi sinh vật chuyển hóa độc tố nấm như DSM 11798; và các chất gắn kết với độc tố nấm như các thành tế bào vi sinh vật hoặc các vật liệu vô cơ như bentonit hoặc smectit. Ví dụ, việc sử dụng chất phụ gia

này có thể đảm bảo rằng lượng bất kỳ của các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 mà có thể có trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi cũng như các độc tố nấm bất kỳ khác như độc tố Fusarium, ergotamin, ochratoxin, được khử độc với sự chắc chắn đến mức độ mà không có tác hại của độc tố nấm đối với cơ thể của đối tượng tiêu hóa thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi này.

Các ứng dụng khác của sáng chế là các chất phụ gia mà, ngoài ít nhất một dehydrogenaza rượu theo sáng chế, còn chứa ít nhất một enzym mà, ví dụ, tham gia vào sự phân giải các protein, ví dụ, các proteaza, hoặc có liên quan trong quá trình chuyển hóa tinh bột hoặc chất xơ hoặc chất béo hoặc glycogen, như amylaza, xenluloza hoặc glucanaza, và ví dụ, các hydrolaza, các enzym phân giải lipid, các manosidaza, oxidaza, oxidoreductaza, phytaza hoặc xylanaza.

Tất nhiên là chất phụ gia này có thể được thể hiện ở dạng được bao hoặc được phủ, trong trường hợp này, các phương pháp chuẩn như các phương pháp được mô tả trong WO 92/12645 có thể được sử dụng. Bằng việc bao hoặc phủ, có thể vận chuyển chất phụ gia đến vị trí nơi nó sẽ được sử dụng mà không có sự biến đổi, đặc biệt là không có sự thoái biến hoặc hư hỏng bất kỳ, nhờ đó polypeptit bắt đầu có tác dụng chỉ sau khi vỏ được hòa tan, ví dụ như trong đường tiêu hóa của động vật, điều này có thể đạt được sự phân giải thậm chí trúng đích hơn, nhanh hơn và hoàn toàn hơn đối với các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3, ngay cả trong môi trường axit, giàu proteaza, và kỵ khí. Hơn nữa, bằng cách bao hoặc phủ, cũng có thể gia tăng độ ổn định nhiệt độ của các dehydrogenaza rượu trong chất phụ gia, trong trường hợp này, việc sử dụng nó, ví dụ, trong quy trình tạo viên đối với thức ăn chăn nuôi được cải thiện.

Chất phụ gia theo sáng chế có thể được sử dụng trong rất nhiều ứng dụng, như trong sản xuất hợp chất, để phòng ngừa và/hoặc điều trị chứng ngộ độc nấm trichothecen, tốt hơn là các chứng ngộ độc nấm do các trichothecen mà biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3, đặc biệt như các chứng ngộ độc nấm deoxynivalenol. Các chứng ngộ độc nấm này có hậu quả nghiêm trọng đối với người và động vật. Bằng cách sử dụng chất phụ gia như vậy, trong trường hợp phòng ngừa, có thể duy trì trạng thái sức khỏe của người và động vật về cơ bản ở mức giống như không hoặc tiêu thụ các độc tố này qua đường miệng ở mức giảm,

mặc dù việc tiêu thụ qua đường miệng các trichothecen, đặc biệt là các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3, đặc biệt là deoxynivalenol. Trong trường hợp điều trị các chứng ngộ độc nấm, có thể giảm nhẹ các triệu chứng của bệnh này, và cụ thể là bình thường hóa nồng độ SOCS3 trong gan hoặc mức IGFALS trong huyết tương cũng như nồng độ claudin trong ruột.

Hơn nữa, bằng việc sử dụng như vậy có thể cải thiện năng suất vật nuôi, đặc biệt là sự tận dụng thức ăn và sự tăng trọng, và làm giảm tỷ lệ tử vong.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tách dòng các gen và tinh chế dehydrogenaza rượu

Các trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon của dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4 đối với tế bào chủ tương ứng được lấy từ DNA2.0 và chứa các vị trí giới hạn ở mức axit nucleic trên đầu 5' và đầu 3' của trình tự, và ngoài ra, ở mức axit amin, đuôi 6xHis đầu C hoặc N. Các trình tự nucleotit này được hòa nhập bằng cách dùng các phương pháp chuẩn vào trong các vectơ biểu hiện để biểu hiện trong *Escherichia coli* hoặc *Komagataella pastoris*, và được biến nạp vào *E. coli* hoặc *K. pastoris*, và được biểu hiện trong *E. coli* hoặc *K. pastoris* (J.M. Cregg, Pichia Protocols, second Edition, ISBN-10: 1588294293, 2007; J. Sambrook et al. 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4th Edition, Cold Spring Harbor).

Các dehydrogenaza rượu với trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4 được củng cố một cách chọn lọc bằng cách sắc ký từ các dịch dung giải tế bào trong trường hợp biểu hiện ở *E. coli* và từ sự biểu hiện gian bào ở *K. pastoris* hoặc từ dịch nổi môi trường nuôi cấy trong trường hợp biểu hiện ngoại bào ở *K. pastoris* bằng cách dùng các phương pháp chuẩn thông qua các cột niken sepharose. Các phần rửa giải được củng cố một cách chọn lọc được ủ và được hoạt hóa với sự có mặt của các ion kim loại và các đồng nhân tố quinon, trong trường hợp này "được hoạt hóa" nghĩa là các dehydrogenaza rượu biểu hiện cả ion kim loại và đồng nhân tố quinon như được gắn kết. Các dehydrogenaza rượu được hoạt hóa này được sử dụng để xác định các tính chất enzym của các dehydrogenaza rượu với các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4 trong các ví dụ 3 đến 7 dưới đây. Tổng nồng độ protein được xác định bằng cách đo quang với thuốc thử Bradford

(Sigma # B6916), trong trường hợp này các mức hấp thụ được đo trong máy đo quang vi đĩa (máy đọc đĩa, Biotek, Synergy HT) ở bước sóng 595 nm. Nồng độ protein được xác định dựa trên đường cong chuẩn định cỡ mà đã được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm Bradford bằng cách đo các dung dịch albumin huyết thanh bò (BSA, Sigma #A4919) với nồng độ lên tới tối đa 1500 µg/ml.

Ví dụ 2: Xác định độ tương đồng về trình tự

Phần trăm tương đồng về trình tự trên toàn bộ chiều dài của trình tự axit amin của các dehydrogenaza rượu với các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4 so sánh với nhau được xác định bằng cách dùng chương trình BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), đặc biệt là BLASTP, mà có sẵn để sử dụng trên trang chủ của Trung tâm Thông tin công nghệ sinh học quốc gia (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), với chương trình này, có thể so sánh hai hoặc nhiều trình tự với nhau theo thuật toán của Altschul et al., 1997 (Nucleic Acids Res. (1997) 25:3389-3402). Các thông số cài đặt cơ sở được sử dụng làm các thông số cài đặt chương trình, đặc biệt là: “trình tự đích tối đa” = 100; “ngưỡng kỳ vọng” = 10; “cỡ từ” = 3; “ma trận” = BLOSUM62; “trị số khoảng hở” = “Tồn tại: 11; Kéo dài: 1”; “điều chỉnh tính toán” = “điều chỉnh ma trận điểm thành phần có điều kiện”. Phần trăm tương đồng của các trình tự axit amin đối với nhau được thể hiện trên bảng 1:

Bảng 1:

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

Ví dụ 3: Sự chuyển hóa trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3

Để xác định tính thích hợp của chúng để chuyển hóa cá trichothecen mà biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3, đặc biệt là DON, nivalenol và độc tố T-2, các dehydrogenaza rượu với các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4 được tạo ra với đuôi 6xHis đầu C trong *E. coli*, như được mô tả trong ví dụ 1.

Sau đó sự chuyển hóa được biểu hiện khi lượng trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 được giảm xuống bằng cách cho nó tiếp xúc với dehydrogenaza rượu được hoạt hóa, tức là, dehydrogenaza rượu mà chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon.

Trong mỗi trường hợp, 100 ml môi trường nuôi cấy *E. coli* với mật độ quang (OD600 nm) từ 2,0 đến 2,5 được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 4°C và được tái tạo huyền phù trong 20ml dung dịch đệm kali phosphat. Các huyền phù tế bào được dung giải bằng các xử lý nén French 3 lần ở áp suất 20.000 psi. Các dịch dung giải tế bào được phân tách thành các phần hòa tan và không hòa tan bằng cách ly tâm. Dịch nổi được lọc vô trùng và dehydrogenaza rượu được củng cố bằng cách dùng các phương pháp chuẩn thông qua cột niken sepharose. Sau quy trình này, sự trao đổi dung dịch đệm được thực hiện bằng cách thẩm tách với các ống đặc hiệu với ngưỡng mười kilodalton. Tổng nồng độ protein thu được được đo bằng thử nghiệm Bradford.

Các đồng nhân tố quinon và các ion kim loại được liên kết với dehydrogenaza rượu bằng cách ủ trong dung dịch nước. Ở đây, đồng nhân tố quinon, như pyroloquinolin quinon (PCC, CAS số 72909-34-3), tryptophan tryptophylquinon (TTC, CAS số 134645-25-3), topaquinon (TPC, CAS số 64192-68-3), lysin tyrosylquinon (LTC, CAS số 178989-72-5) và cystein tryptophylquinon (CTC, CAS số 400616-72-0), được bổ sung vào tổng nồng độ protein đang có dưới dạng dung dịch nước với lượng dư mol gấp khoảng hai mươi lần. Các ion kim loại được chọn từ Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} và Co^{3+} được sử dụng dưới dạng dung dịch nước hoặc muối của chúng. Trừ khi được nêu rõ theo cách khác, các dehydrogenaza rượu thường được sử dụng với PCC (Sigma Aldrich #D7783) và Ca^{2+} , được hoạt hóa dưới dạng dung dịch CaCl_2 5 mM. Các enzym được tinh chế và được hoạt hóa theo cách này được sử dụng cho các thử nghiệm chuyển hóa *in vitro* trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3. Trừ khi được nêu rõ theo cách khác, các thuật ngữ “enzym” hoặc “dehydrogenaza rượu” luôn được hiểu là đề cập đến các dehydrogenaza rượu được hoạt hóa một cách thích hợp chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon.

Các thử nghiệm chuyển hóa được thực hiện trong dung dịch nước với các thành phần sau: 100 mM Tris-HCl độ pH bằng 7,5 hoặc 10% Teorell Stenhagen độ pH bằng 7,5; đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp được chọn từ nhóm bao gồm 1 mM phenazin methosulphat PMS (Sigma Aldrich #P9625), 1 mM xanh metylen (Sigma #M9140), 1 mM coenzym Q10 (Sigma #C9538), 1 mM coenzym Q1 (Sigma #C9538) và 20 mM natri hexaxynoferat (III) PFC (III) (Fluka #60300); 10 ppm đến tối đa 100 ppm trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 bằng cách bổ sung lượng mong muốn của dung dịch gốc cơ chất độc tố; và 10 nM đến 100 nM, tối đa 300 nM của các dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, 2, 3 hoặc 4 chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon. Trừ khi được nêu rõ theo cách khác, dung dịch đệm Tris-HCl, đồng nhân tố oxy hóa khử PMS, DON và dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 thường được sử dụng. Mỗi thử nghiệm chuyển hóa được thực hiện trong bình phản ứng Eppendorf màu nâu dung tích 1,5 ml. Các hỗn hợp phản ứng được ủ ở 30°C trong máy điều nhiệt trong thời gian lên đến 120 phút, ít nhất là 40 phút. Sau 0, 10, 20, 30, và 40 phút, mẫu 0,1ml được lấy trong mỗi trường hợp và được trộn với 0,1ml metanol và được bảo quản ở -20°C, hoặc cách khác là được phân tích ngay bằng phương pháp LC-MS/MS hoặc HPLC.

Dung dịch DON 2000 ppm chứa nước, được lọc vô trùng được sử dụng làm dung dịch gốc cơ chất DON. Để sản xuất dung dịch này, DON dưới dạng tinh thể (Biopure Standard từ Romer Labs, art. no. 001050, độ tinh khiết ít nhất là 98%) được xác định trọng lượng và được hòa tan.

Để định lượng các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 và các chất chuyển hóa của chúng, việc phân tích bằng HPLC được thực hiện, trong đó các chất được tách bằng phương pháp sắc ký bằng cách dùng cột Phenomenex C18 Gemini NX với kích thước 150 mm x 4,6 mm và cỡ hạt là 5 µm. Hỗn hợp metanol/nước với nồng độ amoni axetat là 5mM được sử dụng làm chất rửa giải. Tín hiệu UV được ghi lại và đánh giá ở 220nm. Đối với việc định lượng bằng cách phân tích LC-MS/MS, các chất được tách bằng cách sắc ký bằng cách dùng cột Zorbax eclipse C8 với kích thước 150 mm x 4,6 mm và cỡ hạt là 5 µm. Hỗn hợp metanol/nước với nồng độ amoni axetat là 5mM được sử dụng làm chất rửa giải.

Tín hiệu UV ở 220 nm được ghi lại. Ion hóa phun điện tử (ESI) được sử dụng làm nguồn ion hóa. Các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 được định lượng bằng phương pháp QTrap/LC/MS/MS (hệ sinh học ứng dụng, ba tứ cực) theo “phương thức tăng cường”.

Độ dốc xuống của các đường chuyển hóa (= sự giảm nồng độ độc tố theo thời gian) trong khoảng tuyến tính được sử dụng làm tiêu chuẩn cho hoạt tính của các dehydrogenaza rượu. Để xác định hoạt tính còn lại, các hoạt tính được đo với các thông số khác nhau so với hoạt tính cơ sở, được đo trong các điều kiện chuẩn, đặc biệt là ở 30°C và độ pH bằng 7,5, được áp dụng và thường được biểu hiện dưới dạng phần trăm. Fig.1 thể hiện sự chuyển hóa theo thời gian của DON đối với dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 và Fig.2 thể hiện các dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 đến SEQ ID NO. 4 (Fig.1B). Từ các minh họa này, thấy rõ ràng là sự chuyển hóa DON diễn ra vì nồng độ DON giảm xuống theo thời gian.

Fig.1 thể hiện sự chuyển hóa DON với dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 trong 100 mM Tris HCl độ pH bằng 7,5 với sự có mặt của 50 ppm DON và 1 mM PMS. Các kết quả đo thu được bằng cách phân tích LC-MS/MS (A) và sự chuyển hóa DON bằng các dehydrogenaza rượu có các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4 được thể hiện trên Fig.2. Các kết quả đo thu được bằng cách phân tích HPLC (B). CTR được sử dụng trong các thử nghiệm làm mẫu đối chứng âm mà chứa tất cả các thành phần của thử nghiệm chuyển hóa ngoại trừ các dehydrogenaza rượu có các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4.

Để so sánh hiệu quả của các đồng nhân tố quinon, trong các thử nghiệm chuyển hóa, 10nM dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 được hoạt hóa với các đồng nhân tố quinon PCC, TTC, TPC, LTC, và CTC, 10 ppm DON, và 1 mM nhân tố oxy hóa khử tổng hợp PMS được trộn trong 100 mM Tris-HCl độ pH bằng 7,5 và được ủ ở 30°C. Các nồng độ DON được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS sau 30 phút. Các kết quả được thể hiện trên bảng 2.

Để so sánh hiệu quả của các đồng nhân tố oxy hóa khử, trong các thử nghiệm chuyển hóa, 10 nM enzym được hoạt hóa (dehydrogenaza rượu có trình tự nêu

trong SEQ ID NO. 1), 10 ppm DON, và 1 mM hoặc 20 mM đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp mà cần được thử nghiệm lần lượt được trộn trong 100 mM Tris-HCl độ pH bằng 7,5 và được ủ ở 30°C. Các nồng độ DON được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS sau 30 phút. Kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2:

Đồng nhân tố quinon	DON [ppm]	Đồng nhân tố oxy hóa khử	DON [ppm]
PCC	1,94	1 mM PMS	1,95
TTQ	2,32	20 mM PFC (III)	2,11
TPQ	2,41	1 mM coenzym Q1	8,58
LTQ	2,04	1 mM xanh metylen	6,88

Để thử nghiệm ảnh hưởng của các ion kim loại trong enzym được hoạt hóa đối với sự chuyển hóa, dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 và PCC được hoạt hóa, nhưng với các ion kim loại khác nhau trong mỗi trường hợp, cụ thể là, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} và Cu^{2+} . Các thử nghiệm chuyển hóa lần lượt chứa 10 nM dehydrogenaza rượu được hoạt hóa, 10 ppm DON, và 1 mM PMS trong 100 mM Tris-HCl độ pH bằng 7,5, và được ủ ở 30°C. Các nồng độ DON được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS sau 30 phút. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3:

Ion kim loại	DON [ppm]	Ion kim loại	DON [ppm]
Mg^{2+}	1,90	Mn^{2+}	2,57
Ca^{2+}	1,98	Fe^{2+}	2,17
Zn^{2+}	2,46	Cu^{2+}	2,61

Tương tự như các thử nghiệm chuyển hóa DON nêu trên, các thử nghiệm chuyển hóa cũng được thực hiện với các trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 khác. Trong các thử nghiệm này, thay vì 50 ppm DON, 50 ppm độc tố T-2 hoặc 50 ppm nivalenol được sử dụng. Tất cả bốn dehydrogenaza rượu có các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4 chứa các ion kim loại và đồng

nhân tố quinon cũng có thể chuyển hóa độc tố T-2 và nivalenol, trong trường hợp này, nhiều hơn một nửa lượng độc tố được sử dụng ban đầu đã được chuyển hóa trong vòng 30 phút.

Ví dụ 4: Đo các vùng hoạt tính

Để xác định khả năng của các dehydrogenaza rượu có các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO. 4 trong việc chuyển hóa DON trong các điều kiện khác nhau, dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 được sử dụng làm ví dụ.

Dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 được sản xuất và được hoạt hóa bằng Ca^{2+} và PCC như được mô tả trong ví dụ 3. Để xác định hoạt tính của enzym trên khoảng nhiệt độ từ 10°C đến 50°C và trên khoảng pH từ 3,0 đến 9,0, dung dịch đệm 10% Teorell Stenhagen được sử dụng thay cho dung dịch đệm 100 mM Tris-HCl có độ pH bằng 7,5.

Các thử nghiệm chuyển hóa để xác định hoạt tính ở các nhiệt độ khác nhau được thực hiện trong dung dịch nước với các thành phần sau: 10% Teorell Stenhagen độ pH bằng 7,5, 1 mM đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp PMS, 50 ppm DON, và 10 nM các dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1. Các hỗn hợp thử nghiệm chuyển hóa được ủ lên tới 60 phút trong hệ điều nhiệt tuần hoàn (Eppendorf) với gradient nhiệt độ từ 10°C đến 50°C. Sau 0, 10, 20, 30, 40, và 60 phút, lấy mẫu 0,05ml trong mỗi trường hợp và trộn với 0,05ml metanol để dừng phản ứng, và bảo quản ở -20°C. Các mẫu được chuẩn bị cho LC-MS/MS, như được mô tả trong ví dụ 3, và được phân tích bằng cách dùng LC-MS/MS. Quá trình giảm DON được xác định đối với mỗi nhiệt độ và hoạt tính được tính, như được mô tả trong ví dụ 3. Độ dốc của khoảng tuyến tính của đường chuyển hóa ở 30°C được sử dụng làm trị số tham chiếu để tính hoạt tính còn lại ở các nhiệt độ khác. Bảng 4 thể hiện nhiệt độ theo đơn vị °C và hoạt tính còn lại kết hợp theo phần trăm. Ngạc nhiên là, dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 đã thể hiện là hoạt tính trong khoảng nhiệt độ rộng. Ở 10°C, hoạt tính còn lại là 48% đo được, và ở khoảng 50°C, hoạt tính còn lại là 67%.

Bảng 4:

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

Các thử nghiệm chuyển hóa để xác định hoạt tính trong khoảng pH từ 4,0 đến 9,0 được thực hiện trong dung dịch nước với các thành phần sau: 10% Teorell Stenhagen độ pH bằng 4,0 đến 10,0, 20 mM đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp PFC, 100 ppm DON, và 20 nM các dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1. Các hỗn hợp thử nghiệm chuyển hóa được ủ lên tới 60 phút trong hệ điều nhiệt tuần hoàn ở 30°C. Sau 0, 10, 20, 30, 40, và 60 phút, lấy mẫu 0,05ml trong mỗi trường hợp và trộn với 0,05ml metanol để dừng phản ứng, và bảo quản ở -20°C. Như được mô tả trong ví dụ 3, các mẫu được pha loãng và được phân tích bằng cách dùng LC-MS/MS. Quá trình giảm DON được xác định ở mỗi độ pH và hoạt tính được tính, như được mô tả trong ví dụ 3. Độ dốc của khoảng tuyến tính của đường chuyển hóa ở độ pH bằng 7,5 được sử dụng làm trị số tham chiếu để tính hoạt tính còn lại ở các nhiệt độ khác. Bảng 5 thể hiện các độ pH và các hoạt tính còn lại kết hợp (sự giảm DON trên cơ sở độ pH tham chiếu là 7,5) tính theo phần trăm.

Bảng 5:

Độ pH	Hoạt tính còn lại	Độ pH	Hoạt tính còn lại
4,0	10%	7,0	105%
5,0	18%	7,5	100%
6,0	20%	8,0	69%
6,5	52%	9,0	105%

Ví dụ 5: Xác định độ ổn định nhiệt độ

Độ ổn định nhiệt độ của dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 được xác định trên khoảng từ 30°C đến 55°C. Để thực hiện điều này, dehydrogenaza rượu được hoạt hóa được ủ trong dung dịch đệm 100 mM Tris-HCl, độ pH bằng 7,5 trong thời gian lên tới 60 phút ở nhiệt độ cụ thể trong hệ điều nhiệt tuần hoàn (Eppendorf). Sau 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, và 60 phút, phân ước dehydrogenaza rượu được lấy và hoạt tính được xác định trong thử nghiệm chuyển hóa DON, như được mô tả trong ví dụ 3. Các hỗn hợp thử nghiệm chuyển hóa chứa các thành phần sau: 100 mM Tris-HCl, độ pH bằng 7,5, 1 mM PMS, 50 ppm DON, 10 nM các dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1. Như được mô tả trong ví dụ 3, các phản ứng được ủ và việc lấy mẫu để xác định hoạt tính được thực hiện sau 0, 10, 20, 30, 40 và 60 phút. Quá trình giảm DON được xác định đối với mỗi nhiệt độ đối với mỗi thời gian ủ. Độ dốc của khoảng tuyến tính của đường chuyển hóa DON được tính để xác định độ ổn định nhiệt độ. Độ dốc của khoảng tuyến tính của đường chuyển hóa DON đối với nhiệt độ tương ứng tại thời điểm t = 0 phút được sử dụng làm trị số tham chiếu để tính các hoạt tính còn lại. Bảng 6 thể hiện nhiệt độ tính theo độ °C, thời gian ủ tính theo phút, và hoạt tính còn lại kết hợp tính theo phần trăm. Dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 là ổn định nhất khi được bảo quản trong một giờ ở nhiệt độ 30°C và 37°C. So sánh với mức này, dehydrogenaza rượu vẫn có hoạt tính còn lại 73% ở 40°C sau khi bảo quản trong một giờ. Hoạt tính còn lại 50% được đo sau khi bảo quản ở 45°C trong 30 phút. Ngạc nhiên là, hoạt tính còn lại 84% được thấy sau khi bảo quản 5 phút ở 50°C.

Bảng 6:

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

Ví dụ 6: Xác định độ ổn định pH

Độ ổn định pH của dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 được xác định trên khoảng từ độ pH bằng 4,0 đến độ pH bằng 10,0. Để thực hiện điều này, nồng độ gấp mười lần của dehydrogenaza rượu được hoạt hóa (100 nM) được bảo quản trong dung dịch đệm 10% Teorell Stenhagen độ pH bằng 4,0 đến độ pH bằng 10,0 trong thời gian lên đến 120 phút ở nhiệt độ 30°C. Sau 0, 60, và 120 phút, phần phân ước dehydrogenaza rượu được lấy và hoạt tính trong thử nghiệm chuyển hóa được xác định, như được mô tả trong ví dụ 3, được thực hiện ở 30°C với các thành phần sau: 100 mM Tris-HCl, độ pH bằng 7,5, 1 mM PMS, 50 ppm DON, 10 nM các dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1. Việc lấy mẫu để xác định hoạt tính được thực hiện sau 0, 10, 20, 30, 40 và 60 phút. Quá trình giảm DON được xác định đối với mỗi độ pH đối với mỗi thời gian. Để xác định độ ổn định, độ dốc của khoảng tuyến tính của đường chuyển hóa DON được tính đối với mỗi độ pH ở thời gian tương ứng. Độ dốc của khoảng tuyến tính của đường chuyển hóa DON đối với độ pH tương ứng tại thời điểm $t = 0$ phút được sử dụng làm trị số tham chiếu để tính các hoạt tính đối với các thời gian ủ dưới đây. Bảng 7 thể hiện độ pH, thời gian ủ với độ pH này tính theo phút, và các hoạt tính còn lại kết hợp tính theo phần trăm. Dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 là ổn định ở độ pH bằng 5,0 đến 9,0 sau quá trình ủ 60 phút. Ngạc nhiên là, dehydrogenaza rượu đã biểu hiện độ ổn định đặc biệt tốt trong môi trường axit (không mất hoạt tính ở độ pH bằng 5,0) và trong môi trường kiềm nặng (không mất hoạt tính sau quá trình ủ 120 phút ở độ pH bằng 9,0).

Bảng 7:

	Thời gian ủ	
	60 phút	120 phút
độ pH 4,0	72%	51%
độ pH 5,0	111%	109%
độ pH 6,0	92%	88%
độ pH 7,0	87%	85%
độ pH 8,0	83%	73%
độ pH 9,0	93%	60%
độ pH 10,0	69%	55%

Ví dụ 7: Chuyển hóa DON trong các phức nền

Để xác định khả năng các dehydrogenaza rượu được hoạt hóa để chuyển hóa các trichothecen trong các phức nền mà không có sự bổ sung từ bên ngoài các đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp, dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 3, và các thử nghiệm chuyển hóa DON được thực hiện trong các phức nền. Ở đây, các phức nền được quy định là các dịch dạ cỏ của gia súc, các thành phần của ruột từ hồng tràng của lợn, dịch dạ dày của lợn, nước bọt của người và lợn, thức ăn dạng hạt cho lợn con, và thức ăn dạng hạt cho lợn con được trộn với nước bọt, dịch dạ cỏ, hoặc các thành phần trong ruột, v.v.. Để so sánh với hệ đệm, các thử nghiệm kiểm tra được thực hiện với Tris-HCl, như được mô tả trong ví dụ 3. Đối với thức ăn cho lợn con, thức ăn chuẩn được dựa trên ngô, đậu nành, và lúa mạch được sử dụng.

Để xác định hoạt tính dehydrogenaza rượu trong dịch dạ cỏ (độ pH bằng 5,9), 1 ml dịch lọc dịch dạ cỏ vô trùng được bổ sung vào 100, 200, và 300 nM dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 và 50 ppm DON trong mỗi trường hợp. Các mẻ đối chứng được thử nghiệm trong dung dịch nước, như được mô tả trong ví dụ 3. Các thử nghiệm chuyển hóa được ủ ở 30°C trong thiết bị điều nhiệt trong thời gian lên tới 24 giờ. Các mẫu được lấy sau 0, 0,5, 1,0, 5,0, và 24,0 giờ, trong mỗi trường hợp, 0,1ml mẫu được lấy tại mỗi thời điểm, và phản ứng được dừng lại bằng cách dùng 0,1ml metanol. Các mẫu được bảo quản ở -20°C, làm tan băng, và ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 13000 vòng/phút bằng máy ly tâm để bàn Eppendorf, và được lọc vô trùng bằng máy lọc Spartan 0,2 µM. Để thực hiện LC-MS/MS, các mẫu được pha loãng như được mô tả trong ví dụ 3 và được phân tích bằng LC-MS/MS. Nồng độ của DON tại thời điểm $t = 0$ giờ được sử dụng làm trị số tham chiếu (100%) cho các trị số sau. Bảng 8 thể hiện phần trăm nồng độ DON mà được đo ở thời điểm nhất định so với thời điểm $t = 0$ giờ. Đối với hoạt tính trong dung dịch đệm Tris-HCl, sự có mặt của đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp được bổ sung từ bên ngoài là cần thiết, vì sự chuyển hóa DON diễn ra chậm, và có thể chỉ phát hiện được 24 giờ sau đó với nồng độ dehydrogenaza rượu là 300 nM. Ngạc nhiên là, đã chứng minh được rằng DON được chuyển hóa mà không có sự bổ sung đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bên ngoài trong dịch lọc

dịch dạ cỏ vô trùng ở độ pH bằng 5,9. Điều này rõ ràng thể hiện là có các chất trong dịch dạ cỏ có tác dụng như là các đồng nhân tố oxy hóa khử tự nhiên. Với nồng độ 300 nM, chỉ 42% lượng DON ban đầu còn có trong hỗn hợp sau 5 giờ ủ. Sau 24 giờ ủ, DON có thể phát hiện được chỉ với lượng nhỏ với nồng độ dehydrogenaza rượu lớn hơn 200 nM.

Bảng 8:

	Dịch dạ cỏ với đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp	Dịch dạ cỏ không có đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp			Tris-HCl độ pH bằng 7,5 không có đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp		
	100 nM	100 nM	200 nM	300 nM	100 nM	200 nM	300 nM
0 giờ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
0,5 giờ	0%	100%	100%	87%	100%	99%	95%
1,0 giờ	0%	100%	100%	83%	100%	99%	89%
5,0 giờ	0%	94%	75%	42%	99%	88%	86%
24,0 giờ	0%	53%	3%	0%	97%	84%	67%

Để xác định hoạt tính dehydrogenaza rượu trong dịch dạ dày của lợn không chứa cám với độ pH khoảng bằng 3, trong các thành phần của ruột lợn với độ pH khoảng bằng 6, và trong nước bọt của lợn và người, 300 nM dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, khoảng 20 ppm DON, trong mỗi trường hợp được trộn trong 1ml dịch dạ dày (được lọc vô trùng), 1ml các thành phần mềm xốp của ruột, hoặc 1ml nước bọt. Với đối chứng âm, các hỗn hợp thử nghiệm chỉ chứa các dịch tiêu hóa với 20 ppm DON được ủ, và với đối chứng dương, các hỗn hợp thử nghiệm chuyển hóa chứa tất cả các thành phần, gồm 20 mM đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp PFC (III), được sử dụng. Các mẫu được lấy sau 0, 3,0, 5,0, và 24,0 giờ, trong mỗi trường hợp, 0,1ml mẫu được lấy tại mỗi thời điểm, và phản ứng được dừng lại bằng cách dùng 0,1ml metanol. Các mẫu được bảo quản ở 20°C, làm tan băng, và ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 13000 vòng/phút bằng máy ly tâm để bàn Eppendorf, và được lọc vô (máy lọc Spartan 0,2 µM). Để thực hiện LC-MS/MS, các mẫu được pha loãng tỷ lệ 1:10 trong dung môi

rửa giải (xem ví dụ 3) và được phân tích bằng LC-MS/MS như trong ví dụ 3. Bảng 9 thể hiện các nồng độ DON tương ứng mà được đo tại thời điểm lấy mẫu. Ngạc nhiên là, sự giảm DON trong mẫu nước bọt diễn ra mà không cần đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp được bổ sung từ bên ngoài (bất kể loài). Điều này rõ ràng thể hiện là có các chất trong dịch tiết nước bọt của người và lợn mà thích hợp làm các đồng nhân tố oxy hóa khử tự nhiên để chuyển hóa DON bằng dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1. Không thấy có sự giảm đáng kể nồng độ DON ở mẫu dịch dạ dày tinh khiết không có cám. Sự giảm nồng độ DON diễn ra ở các thành phần của ruột chỉ khi có bổ sung đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp.

Bảng 9:

		DON [ppm]			
Mẫu		0 giờ	3 giờ	5 giờ	24 giờ
Nước bọt (người)	Đối chứng âm	20	19	18	18
	0 mM PFC (III)	20	13	12	8
	Đối chứng dương 20 mM PFC (III)	18	0	0	0
Nước bọt (lợn)	Đối chứng âm	20	20	19	18
	0 mM PFC (III)	21	10	8	5
	Đối chứng dương 20 mM PFC (III)	20	0	0	0
Dịch dạ dày	Đối chứng âm	22	22	21	21
	0 mM PFC (III)	22	21	21	20
	Đối chứng dương 20 mM PFC (III)	24	21	19	18
Các thành phần của ruột	Đối chứng âm	21	20	20	20
	0 mM PFC (III)	24	23	22	22
	Đối chứng dương 20 mM PFC (III)	23	9	8	4

Để xác định hoạt tính của các dehydrogenaza rượu trong thức ăn cho lợn con, 100 mg thức ăn cho lợn con được trộn lẫn lượt với 400µl dung dịch đệm 100mM Tris-HCl, độ pH bằng 7,5, 400µl nước bọt của lợn, 400µl dịch dạ dày vô trùng của lợn hoặc 400µl thành phần của ruột lợn. Các huyền phù thức ăn cho lợn này được bảo quản qua đêm ở 4°C. Sau đó, khoảng 20 ppm DON, và/hoặc 300 nM các

dehydrogenaza rượu được hoạt hóa có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, và/hoặc 20 mM đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp PFC (III) được bổ sung vào tất cả các mẫu. Các hỗn hợp không chứa dehydrogenaza rượu và không chứa đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bên ngoài được sử dụng làm đối chứng âm. Các hỗn hợp chứa dehydrogenaza rượu và đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp được sử dụng làm đối chứng dương. Các mẫu được lấy sau 0, 3,0, 5,0, và 24,0 giờ. Một mẫu đầy đủ được sử dụng cho mỗi lần. Đối với mẫu, 500µl metanol được bổ sung, sau đó là quy trình đồng nhất hóa 30 phút trên máy lắc với tốc độ 300 vòng/phút. Sau quy trình này, các mẫu được ly tâm trong 15 phút (máy ly tâm để bàn Eppendorf, 13000 vòng/phút) và dịch nổi được lọc bằng ống phun qua bộ lọc Spartan 0,2 µM. Các dịch nổi được bảo quản ở -20°C, làm tan băng, và được pha loãng tỷ lệ 1:10 trong dung môi rửa giải để thực hiện LC-MS/MS, và được phân tích bằng LC-MS/MS như được mô tả trong ví dụ 3.

Bảng 10 thể hiện nồng độ DON mà có mặt trong các mẫu ở các thời điểm tương ứng. Trong hỗn hợp thức ăn cho lợn con, có các chất mà có thể cho rằng đóng vai trò làm các đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bổ sung từ bên ngoài, vì nồng độ DON giảm liên tục với sự vắng mặt của đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bên ngoài. Các chất này đến từ thức ăn cho lợn con, vì như được thể hiện trên đây, không thể đo được sự chuyển hóa DON trong dung dịch đệm không có đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bên ngoài. Với sự có mặt của đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bên ngoài, sự chuyển hóa DON trong hỗn hợp thức ăn cho lợn con diễn ra nhanh hơn.

Trong hỗn hợp thức ăn cho lợn con và nước bọt, dehydrogenaza rượu cũng thể hiện hoạt tính một cách độc lập với sự có mặt của đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bên ngoài; trong đó sự giảm DON nhanh hơn diễn ra trong các hỗn hợp thử nghiệm chuyển hóa mà chứa đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bên ngoài.

Ngạc nhiên là, dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 trong hỗn hợp thức ăn cho lợn con vẫn hoạt tính mà không cần bổ sung đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bên ngoài. Một mặt, bằng cách bổ sung thức ăn cho lợn con vào dịch dạ dày, độ pH của dịch dạ dày được tăng lên, và mặt khác, các đồng nhân tố oxy hóa khử có trong tự nhiên mà có thể thay thế đồng nhân tố oxy hóa khử tổng

hợp bên ngoài được giải phóng từ thức ăn cho lợn con. Hoạt tính của dehydrogenaza rượu được xác định trong các thành phần của ruột chỉ khi đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp bên ngoài được bổ sung vào hỗn hợp thử nghiệm chuyển hóa.

Bảng 10:

		DON [ppm]			
Mẫu		0 giờ	3 giờ	5 giờ	24 giờ
Thức ăn cho lợn con trong dung dịch đậm	Đối chứng âm	21	20	20	20
	0 mM PFC (III)	20	10	9	5
	Đối chứng dương 20 mM PFC (III)	21	0	0	0
Thức ăn cho lợn con trong nước bột	Đối chứng âm	20	20	20	20
	0 mM PFC (III)	20	12	9	8
	Đối chứng dương 20 mM PFC (III)	21	1	0,8	0,5
Thức ăn cho lợn con trong dịch dạ dày	Đối chứng âm	21	21	20	20
	0 mM PFC (III)	20	7	5	2
	Đối chứng dương 20 mM PFC (III)	20	5	0,7	0
Thức ăn cho lợn con trong các thành phần của ruột	Đối chứng âm	21	20	20	20
	0 mM PFC (III)	21	20	18	16
	Đối chứng dương 20 mM PFC (III)	20	5	3	0,7

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chuyển hóa trichothecen nhờ enzym, đặc trưng ở chỗ ít nhất một trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 được cho tiếp xúc với dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, hoặc với biến thể chức năng còn biểu hiện độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, tốt hơn là ít nhất 86%, đặc biệt tốt hơn là ít nhất 89%, với ít nhất một đồng nhân tố oxy hóa khử và nước, và nếu cần ít nhất một chất phụ trợ.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin của biến thể chức năng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 đến SEQ ID NO. 4.
3. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, trong đó trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 được chuyển hóa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 55°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 28°C đến 45°C.
4. Quy trình theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó ít nhất một trichothecen biểu hiện nhóm hydroxyl trên nguyên tử C-3 được cho tiếp xúc với dehydrogenaza rượu chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, hoặc ít nhất một biến thể chức năng của nó, với nhân tố oxy hóa khử, với nước, và nếu cần, với chất phụ trợ, trong ít nhất là một phút, tốt hơn là ít nhất 5 phút, đặc biệt là ít nhất 60 phút.
5. Quy trình theo bất kỳ trong số các điểm 1 đến 4, trong đó đồng nhân tố quinon được chọn từ nhóm bao gồm PCC, TTC, TPC, LTC, và CTC, tốt hơn là PCC.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 5, trong đó đồng nhân tố quinon được gắn với dehydrogenaza rượu bởi ít nhất một kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} và Co^{3+} , tốt hơn là Ca^{2+} và Mg^{2+} .
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó ít nhất một đồng nhân tố oxy hóa khử được chọn từ nhóm bao gồm PMS, các dẫn xuất PMS, kali hexaxyanoferrat (III), natri hexaxyanoferrat (III), cytochrom C, coenzym Q1, coenzym Q10, xanh metylen, TMPD, tốt hơn là PMS, coenzym Q1 và coenzym Q10.

8. Chất phụ gia chuyển hóa trichothecen, trong đó chất phụ gia này chứa dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 chứa các ion kim loại và đồng nhân tố quinon, hoặc biến thể chức năng còn biểu hiện độ tương đồng về trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 86%, đặc biệt tốt hơn là ít nhất 89%, và nếu cần, còn chứa ít nhất một thành phần bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm đồng nhân tố oxy hóa khử và ít nhất một chất phụ trợ.

9. Chất phụ gia theo điểm 8, trong đó chất phụ gia này chứa biến thể chức năng của dehydrogenaza rượu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 đến SEQ ID NO. 4.

10. Chất phụ gia theo điểm 8 hoặc 9, trong đó chất phụ gia này chứa đồng nhân tố quinon được chọn từ nhóm bao gồm PCC, TTC, TPC, LTC, và CTC, tốt hơn là PCC.

11. Chất phụ gia theo điểm 8, 9, hoặc 10, trong đó chất phụ gia này chứa đồng nhân tố quinon được gắn kết với dehydrogenaza rượu bởi ít nhất một ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Zn^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Co^{2+} và Co^{3+} , tốt hơn là Ca^{2+} và Mg^{2+} .

12. Chất phụ gia theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11, trong đó đồng nhân tố oxy hóa khử tổng hợp được chọn từ nhóm bao gồm PMS, các dẫn xuất PMS, kali hexaxyanoferrat (III), natri hexaxyanoferrat (III), cytochrom C, coenzym Q1, coenzym Q10, xanh metylen, và TMPD, tốt hơn là PMS, coenzym Q1 và coenzym Q10 làm đồng nhân tố oxy hóa khử.

13. Chất phụ gia theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 12, trong đó chất phụ trợ được chọn từ nhóm bao gồm các chất mang trợ, các vitamin, các chất khoáng, các chất phát sinh thực vật, các enzym và các thành phần bổ sung để khử độc các độc tố nấm như các enzym phân hủy độc tố nấm, đặc biệt là các aflatoxin-oxidaza, ergotamin hydrolaza, ergotamin amidaza, zearalenon esteraza, zearalenon lactonaza, zearalenon hydrolaza, ochratoxin amidaza, fumonisin aminotransferaza, fumonisin carboxyltransferaza, amino polyol amin oxidaza, deoxynivalenol epoxit hydrolaza, deoxynivalenol dehydrogenaza, deoxynivalenol oxidaza, trichothecen dehydrogenaza, trichothecen oxidaza; và các vi sinh vật chuyển hóa độc tố nấm như

DSM 11798; và các chất gắn kết với độc tố nấm như các thành tế bào vi sinh vật hoặc các vật liệu vô cơ như bentonit.

14. Chất phụ gia theo điểm bất kỳ trong số các điểm 8 đến 13, trong đó chất phụ gia này được thể hiện dưới dạng được bao hoặc được phủ.

1/1

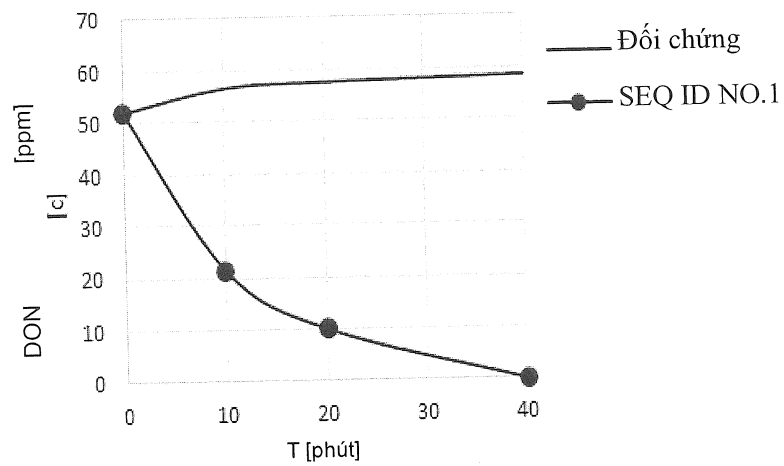


Fig.1

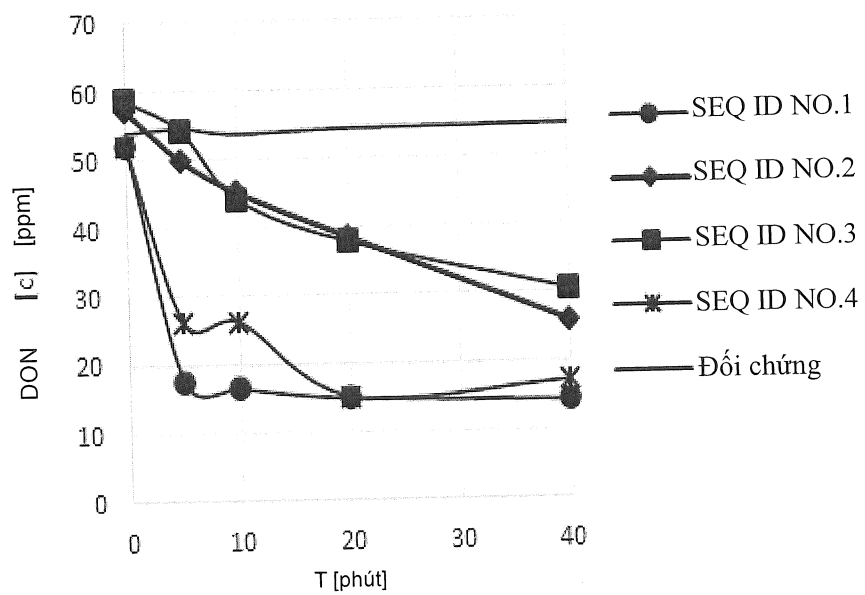


Fig.2

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ERBER Aktiengesellschaft

<120> QUY TRÌNH CHUYỂN HÓA TRICHOTHECEN NHỜ ENZYM VÀ CHẤT PHỤ GIA
CHUYỂN HÓA TRICHOTHECEN

<130> F_Pat_BIO_005/PCT

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 608

<212> PRT

<213> Pseudogluconobacter sp.

<400> 1

Met Arg Phe Glu Tyr Leu Arg Gln Asn Val Val Gly Leu Ala Leu Ser
1 5 10 15

Thr Ala Leu Ile Ala Ser Leu Ser Gly Pro Ala Phe Ala Gln His Asp
20 25 30

Ala Asn Ala Ala Ala Glu Pro Ser Lys Ala Gly Gln Ser Ala Ile Glu
35 40 45

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

Asn Trp Pro Ile Leu Arg Gly Asn Tyr Gln Gly Trp Gly Tyr Ser Pro
65 70 75 80

Leu Asp Gln Ile Asn Lys Asp Asn Val Gly Asp Leu Gln Leu Val Trp
85 90 95

Ser Arg Thr Met Glu Pro Gly Ser Asn Glu Gly Ala Ala Ile Ala Tyr
100 105 110

Asn Gly Val Ile Phe Leu Gly Asn Thr Asn Asp Val Ile Gln Ala Ile
115 120 125

Asp Gly Lys Thr Gly Ser Leu Ile Trp Glu Tyr Arg Arg Lys Leu Pro
 130 135 140

Ser Ala Ser Lys Phe Ile Asn Ser Leu Gly Ala Ala Lys Arg Ser Ile
 145 150 155 160

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

Val Ala Leu Asp Ala Lys Thr Gly Lys Leu Ala Trp Glu Thr Asn Arg
 180 185 190

Gly Gln Gly Val Glu Glu Gly Val Ala Asn Ser Ser Gly Pro Ile Val
 195 200 205

Val Asp Gly Val Val Ile Ala Gly Ser Thr Cys Gln Phe Ser Gly Phe
 210 215 220

Gly Cys Tyr Val Thr Gly Thr Asp Ala Glu Ser Gly Glu Glu Leu Trp
 225 230 235 240

Arg Asn Thr Phe Ile Pro Arg Pro Gly Glu Glu Gly Asp Asp Thr Trp
 245 250 255

Gly Gly Ala Pro Tyr Glu Asn Arg Trp Met Thr Gly Ala Trp Gly Gln
 260 265 270

Ile Thr Tyr Asp Pro Glu Leu Asp Leu Val Tyr Tyr Gly Ser Thr Gly
 275 280 285

Ala Gly Pro Ala Ser Glu Val Gln Arg Gly Thr Glu Gly Gly Thr Leu
 290 295 300

Ala Gly Thr Asn Thr Arg Phe Ala Val Lys Pro Lys Thr Gly Glu Val
 305 310 315 320

Val Trp Lys His Gln Thr Leu Pro Arg Asp Asn Trp Asp Ser Glu Cys
 325 330 335

Thr Phe Glu Met Met Val Val Ser Thr Ser Val Asn Pro Asp Ala Lys
 340 345 350

Ala Asp Gly Met Met Ser Val Gly Ala Asn Val Pro Arg Gly Glu Thr
 355 360 365

Arg Lys Val Leu Thr Gly Val Pro Cys Lys Thr Gly Val Ala Trp Gln
 370 375 380

Phe Asp Ala Lys Thr Gly Asp Tyr Phe Trp Ser Lys Ala Thr Val Glu
 385 390 395 400

Gln Asn Ser Ile Ala Ser Ile Asp Asp Thr Gly Leu Val Thr Val Asn
 405 410 415

Glu Asp Met Ile Leu Lys Glu Pro Gly Lys Thr Tyr Asn Tyr Cys Pro
 420 425 430

Thr Phe Leu Gly Gly Arg Asp Trp Pro Ser Ala Gly Tyr Leu Pro Lys
 435 440 445

Ser Asn Leu Tyr Val Ile Pro Leu Ser Asn Ala Cys Tyr Asp Val Met
 450 455 460

Ala Arg Thr Thr Glu Ala Thr Pro Ala Asp Val Tyr Asn Thr Asp Ala
 465 470 475 480

Thr Leu Val Leu Ala Pro Gly Lys Thr Asn Met Gly Arg Val Asp Ala
 485 490 495

Ile Asp Leu Ala Thr Gly Glu Thr Lys Trp Ser Tyr Glu Thr Arg Ala
 500 505 510

Ala Leu Tyr Asp Pro Val Leu Thr Thr Gly Gly Asp Leu Val Phe Val
 515 520 525

Gly Gly Ile Asp Arg Asp Phe Arg Ala Leu Asp Ala Glu Ser Gly Lys
 530 535 540

Glu Val Trp Ser Thr Arg Leu Pro Gly Ala Val Ser Gly Tyr Thr Thr
 545 550 555 560

Ser Tyr Ser Ile Asp Gly Arg Gln Tyr Val Ala Val Val Ser Gly Gly
 565 570 575

Ser Leu Gly Gly Pro Thr Phe Gly Pro Thr Thr Pro Asp Val Asp Ser
 580 585 590

Ala Ser Gly Ala Asn Gly Ile Tyr Val Phe Ala Leu Pro Glu Lys Lys
 595 600 605

<210> 2
 <211> 586
 <212> PRT
 <213> Devosia sp.

<400> 2

Met Ser Ala Pro Ala Phe Ala Gln His Ala Asp Gly Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Thr Ala Ala Pro Gly Gln Ser Ala Ile Glu Asn Phe Gln Pro Val Thr
 20 25 30

Ala Glu Asp Leu Ala Gly Gly Asn Ala Ala Asn Trp Pro Ile Leu Arg
 35 40 45

Gly Asn Tyr Gln Gly Trp Gly Tyr Thr Gln Leu Asp Gln Ile Asn Lys
 50 55 60

Asp Asn Val Gly Gln Leu Gln Leu Ala Trp Ala Arg Thr Met Glu Pro
 65 70 75 80

Gly Ser Asn Glu Gly Ser Ala Ile Ala Tyr Asn Gly Val Val Phe Leu
 85 90 95

Gly Asn Ala Asn Asp Val Val Gln Ala Ile Asp Gly Lys Thr Gly Asn
 100 105 110

Leu Ile Trp Glu Tyr Arg Arg Lys Leu Pro Pro Ala Ser Lys Phe Ile

115	120	125
Asn Ser Leu Gly Ala Ala Lys Arg Ser Ile Ala Leu Phe Gly Asp Lys		
130	135	140
Val Tyr Phe Val Ser Trp Asp Asn Phe Val Val Ala Leu Asp Ala Lys		
145	150	155 160
Thr Gly Lys Leu Ala Trp Glu Thr Asn Arg Gly Gln Gly Val Glu Glu		
	165	170 175
Gly Val Ser Asn Ser Ser Gly Pro Ile Val Val Asp Gly Val Val Ile		
	180	185 190
Ala Gly Ser Thr Cys Gln Tyr Ser Gly Phe Gly Cys Tyr Val Thr Gly		
	195	200 205
Thr Asp Ala Glu Ser Gly Glu Glu Leu Trp Arg Asn Thr Phe Ile Pro		
	210	215 220
Arg Pro Gly Glu Glu Gly Asp Asp Thr Trp Gly Gly Ala Pro Tyr Glu		
	225	230 235 240
Asn Arg Trp Met Thr Gly Ala Trp Gly Gln Ile Thr Tyr Asp Pro Glu		
	245	250 255
Leu Asp Leu Val Tyr Tyr Gly Ser Thr Gly Ala Gly Pro Ala Ser Glu		
	260	265 270
Val Gln Arg Gly Thr Glu Gly Gly Thr Leu Ala Gly Thr Asn Thr Arg		
	275	280 285
Phe Ala Val Lys Pro Lys Thr Gly Glu Val Val Trp Lys His Gln Thr		
	290	295 300
Leu Pro Arg Asp Asn Trp Asp Ser Glu Cys Thr Phe Glu Met Met Val		
	305	310 315 320
Val Ser Thr Thr Val Asn Pro Asp Ala Gly Ala Asp Gly Met Met Ser		

325 330 335
 Val Gly Ala Asn Val Pro Arg Gly Glu Thr Arg Lys Val Leu Thr Gly
 340 345 350
 Val Pro Cys Lys Thr Gly Val Ala Trp Gln Phe Asp Ala Glu Thr Gly
 355 360 365
 Asp Tyr Phe Trp Ser Lys Ala Thr Val Glu Gln Asn Ser Ile Ala Ser
 370 375 380
 Ile Asp Asp Lys Gly Leu Val Thr Val Asn Glu Asp Met Ile Leu Lys
 385 390 395 400
 Glu Pro Gly Lys Asp Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr Phe Leu Gly Gly Arg
 405 410 415
 Asp Trp Pro Ser Ala Gly Tyr Leu Pro Lys Ser Asn Leu Tyr Val Ile
 420 425 430
 Pro Leu Ser Asn Ala Cys Tyr Asp Leu Lys Ala Arg Thr Thr Glu Ala
 435 440 445
 Thr Pro Ala Asp Val Tyr Asn Thr Asp Ser Thr Val Lys Leu Ala Pro
 450 455 460
 Gly Lys Thr Asn Met Gly Arg Val Asp Ala Ile Asp Val Ala Thr Gly
 465 470 475 480
 Ala Thr Lys Trp Ser Phe Glu Thr Glu Ala Ala Leu Tyr Asp Pro Val
 485 490 495
 Met Thr Thr Ala Gly Asp Leu Val Phe Val Gly Ser Thr Asp Arg Met
 500 505 510
 Phe Arg Ala Leu Asp Ala Glu Thr Gly Lys Glu Val Trp Ser Thr Arg
 515 520 525
 Leu Pro Gly Ala Ile Ser Gly Tyr Thr Thr Ser Tyr Ser Ile Asp Gly

530 535 540
 Arg Gln Tyr Val Ala Val Val Ala Gly Gly Ser Leu Gly Thr Gly Phe
 545 550 555 560
 Phe Lys Ala Ala Val Pro Gly Val Asp Ala Val Gln Gly Gly Asn Gly
 565 570 575
 Ile Tyr Val Phe Ala Leu Pro Glu Ala Lys
 580 585
 <210> 3
 <211> 603
 <212> PRT
 <213> Devosia sp.
 <400> 3
 Met Arg Gln Asn Val Val Gly Leu Ala Leu Ser Thr Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ala Pro Ala Phe Ala Gln His Ala Asp Gly Ala Ala Ala
 20 25 30
 Glu Thr Ala Ala Pro Gly Gln Ser Ala Ile Glu Asn Phe Gln Pro Val
 35 40 45
 Thr Ala Glu Asp Leu Ala Gly Gly Asn Ala Ala Asn Trp Pro Ile Leu
 50 55 60
 Arg Gly Asn Tyr Gln Gly Trp Gly Tyr Thr Gln Leu Asp Gln Ile Asn
 65 70 75 80
 Lys Asp Asn Val Gly Gln Leu Gln Leu Ala Trp Ala Arg Thr Met Glu
 85 90 95
 Pro Gly Ser Asn Glu Gly Ser Ala Ile Ala Tyr Asn Gly Val Val Phe
 100 105 110
 Leu Gly Asn Ala Asn Asp Val Val Gln Ala Ile Asp Gly Lys Thr Gly
 115 120 125

Asn Leu Ile Trp Glu Tyr Arg Arg Lys Leu Pro Pro Ala Ser Lys Phe
 130 135 140

Ile Asn Ser Leu Gly Ala Ala Lys Arg Ser Ile Ala Leu Phe Gly Asp
 145 150 155 160

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

Lys Thr Gly Lys Leu Ala Trp Glu Thr Asn Arg Gly Gln Gly Val Glu
 180 185 190

Glu Gly Val Ser Asn Ser Ser Gly Pro Ile Val Val Asp Gly Val Val
 195 200 205

Ile Ala Gly Ser Thr Cys Gln Tyr Ser Gly Phe Gly Cys Tyr Val Thr
 210 215 220

Gly Thr Asp Ala Glu Ser Gly Glu Glu Leu Trp Arg Asn Thr Phe Ile
 225 230 235 240

Pro Arg Pro Gly Glu Glu Gly Asp Asp Thr Trp Gly Gly Ala Pro Tyr
 245 250 255

Glu Asn Arg Trp Met Thr Gly Ala Trp Gly Gln Ile Thr Tyr Asp Pro
 260 265 270

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

Glu Val Gln Arg Gly Thr Glu Gly Gly Thr Leu Ala Gly Thr Asn Thr
 290 295 300

Arg Phe Ala Val Lys Pro Lys Thr Gly Glu Val Val Trp Lys His Gln
 305 310 315 320

Thr Leu Pro Arg Asp Asn Trp Asp Ser Glu Cys Thr Phe Glu Met Met
 325 330 335

Val Val Ser Thr Thr Val Asn Pro Asp Ala Gly Ala Asp Gly Met Met
 340 345 350

Ser Val Gly Ala Asn Val Pro Arg Gly Glu Thr Arg Lys Val Leu Thr
 355 360 365

Gly Val Pro Cys Lys Thr Gly Val Ala Trp Gln Phe Asp Ala Glu Thr
 370 375 380

Gly Asp Tyr Phe Trp Ser Lys Ala Thr Val Glu Gln Asn Ser Ile Ala
 385 390 395 400

Ser Ile Asp Asp Lys Gly Leu Val Thr Val Asn Glu Asp Met Ile Leu
 405 410 415

Lys Glu Pro Gly Lys Asp Tyr Asn Tyr Cys Pro Thr Phe Leu Gly Gly
 420 425 430

Arg Asp Trp Pro Ser Ala Gly Tyr Leu Pro Lys Ser Asn Leu Tyr Val
 435 440 445

Ile Pro Leu Ser Asn Ala Cys Tyr Asp Leu Lys Ala Arg Thr Thr Glu
 450 455 460

Ala Thr Pro Ala Asp Val Tyr Asn Thr Asp Ser Thr Val Lys Leu Ala
 465 470 475 480

Pro Gly Lys Thr Asn Met Gly Arg Val Asp Ala Ile Asp Val Ala Thr
 485 490 495

Gly Ala Thr Lys Trp Ser Phe Glu Thr Glu Ala Ala Leu Tyr Asp Pro
 500 505 510

Val Met Thr Thr Ala Gly Asp Leu Val Phe Val Gly Ser Thr Asp Arg
 515 520 525

Met Phe Arg Ala Leu Asp Ala Glu Thr Gly Lys Glu Val Trp Ser Thr
 530 535 540

Arg Leu Pro Gly Ala Ile Ser Gly Tyr Thr Thr Ser Tyr Ser Ile Asp
 545 550 555 560

Gly Arg Gln Tyr Val Ala Val Val Ala Gly Gly Ser Leu Gly Thr Gly
 565 570 575

Phe Phe Lys Ala Ala Val Pro Gly Val Asp Ala Val Gln Gly Gly Asn
 580 585 590

Gly Ile Tyr Val Phe Ala Leu Pro Glu Ala Lys
 595 600

<210> 4
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> Devosia sp.

<400> 4

Met Arg Phe Glu Cys Ile Arg Gln Asn Ala Val Gly Leu Ala Leu Ser
 1 5 10 15

Thr Ala Leu Ile Ala Ser Leu Ser Ala Pro Ala Phe Ala Gln His Ala
 20 25 30

Asp Gly Ala Ala Thr Glu Ala Val Ser Ala Gln Ser Ala Ile Glu Asn
 35 40 45

Phe Lys Pro Val Thr Ala Glu Asp Ile Ala Gly Ala Asn Ser Ala Asn
 50 55 60

Trp Pro Ile Leu Arg Gly Asn Tyr Asn Gly Trp Gly Tyr Thr Pro Leu
 65 70 75 80

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

Arg Thr Met Glu Pro Gly Ser Asn Glu Gly Ala Ala Ile Ala Tyr Asn
 100 105 110

Gly Val Val Tyr Leu Gly Asn Ala Asn Asp Val Ile Gln Ala Ile Asp
 115 120 125

Gly Lys Thr Gly Asp Leu Ile Trp Glu Tyr Arg Arg Lys Leu Pro Pro
 130 135 140

Ala Ser Lys Phe Ile Asn Ser Leu Gly Gln Ala Lys Arg Ser Ile Ala
 145 150 155 160

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

Ala Leu Asp Ala Lys Thr Gly Lys Leu Ala Trp Glu Thr Asn Arg Gly
 180 185 190

Gln Gly Val Asp Glu Gly Val Ser Asn Ser Ser Gly Pro Ile Val Val
 195 200 205

Asp Gly Val Val Ile Ala Gly Thr Thr Cys Gln Phe Ser Gly Phe Gly
 210 215 220

Cys Tyr Val Thr Gly Thr Asp Ala Glu Ser Gly Glu Glu Leu Trp Arg
 225 230 235 240

Asn Thr Phe Ile Pro Arg Pro Gly Glu Glu Gly Asp Asp Thr Trp Gly
 245 250 255

Gly Ala Pro Tyr Glu Asn Arg Trp Met Thr Gly Ala Trp Gly Gln Ile
 260 265 270

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

Gly Pro Ala Ser Glu Val Gln Arg Gly Thr Glu Gly Gly Thr Leu Ala
 290 295 300

Gly Thr Asn Thr Arg Phe Ala Val Lys Pro Lys Thr Gly Glu Val Val
 305 310 315 320

Trp Lys His Gln Thr Leu Pro Arg Asp Asn Trp Asp Gln Glu Cys Thr
 325 330 335

Phe Glu Met Met Val Val Ser Thr Thr Val Asn Pro Asn Ala Asp Ala
 340 345 350

Glu Gly Met Phe Ser Val Gly Ala Thr Leu Pro Arg Gly Glu Ser Arg
 355 360 365

Lys Val Leu Thr Gly Val Pro Cys Lys Thr Gly Val Ala Trp Gln Phe
 370 375 380

Asp Ala Glu Thr Gly Asp Tyr Phe Trp Ser Lys Ala Thr Val Ala Gln
 385 390 395 400

Asn Ala Val Ala Ser Ile Asp Asp Lys Gly Leu Val Thr Val Asn Glu
 405 410 415

Asp Met Ile Ile Lys Glu Pro Gly Lys Asn Tyr Glu Phe Cys Pro Thr
 420 425 430

Phe Leu Gly Gly Arg Asp Trp Pro Ser Ala Gly Tyr Leu Pro Ala Ser
 435 440 445

Asn Leu Tyr Val Ile Pro Leu Ser Gln Ala Cys Tyr Asp Leu Thr Ala
 450 455 460

Arg Thr Thr Glu Ala Thr Pro Ala Asp Val Tyr Asn Thr Asp Ala Thr
 465 470 475 480

Val Lys Leu Ala Pro Gly Arg Thr Asn Met Gly Arg Val Asp Ala Ile
 485 490 495

Asp Leu Ala Thr Gly Glu Thr Lys Trp Ser Phe Glu Thr Thr Ala Ala
 500 505 510

Leu Tyr Asp Pro Val Met Thr Thr Gly Gly Asp Leu Val Phe Val Gly
 515 520 525

Ser Thr Asp Arg Val Tyr Arg Ala Leu Asp Ala Ala Thr Gly Lys Glu
 530 535 540

Val Trp Ser Thr Arg Ile Pro Gly Ala Ile Ser Gly Phe Thr Thr Ser
 545 550 555 560

Tyr Ser Leu Asp Gly Arg Gln Tyr Val Ala Val Leu Ala Gly Gly Ser
 565 570 575

Leu Gly Thr Ser Phe Phe Lys Ala Ala Val Pro Asn Val Asp Ala Val
 580 585 590

Gln Gly Gly Asn Gly Ile Tyr Val Phe Ala Leu Pro Asp Ala Lys Ile
 595 600 605

Glu