



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101214** (13) **C2**
(51) МПК
C12N 9/20 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2011 03761	(72) Винахідник(и): Дейтон Крістофер Л.Г. (US), Бартон Нельсон (US), Буено Аналіа (US), Куенка Джослін Г. (US), Хітчмен Тім (US), Клайн Кеті А. (US), Лайон Джонатан (US), Міллер Марк Л. (US), Уолл Марк А. (US)
(22) Дата подання заявки: 28.08.2009	(73) Власник(и): БАНДЖ ОЙЛЗ, ІНК., 11720 Borman Drive, St. Louis, MO 63146, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.03.2013	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 12/202,204	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2006096834 A2, 14.09.2006. SVENDSEN A: "Lipase protein engineering" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM; NL, vol. 1543, no. 2, 29 December 2000 (2000-12-29), pages 223-238. SHU Z Y ET AL: "Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases" JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS. B, ENZYMATIC, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 62, no. 1, 2 January 2010 (2010-01-02), pages 1-8.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 29.08.2008	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.07.2011, Бюл.№ 14	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.03.2013, Бюл.№ 5	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2009/004904, 28.08.2009	

(54) ГІДРОЛАЗИ, КОДУЮЧІ ЇХ НУКЛЕІНОВІ КИСЛОТИ І СПОСОБИ ЇХ ОДЕРЖАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід належить до гідролаз, включаючи ліпази, і кодує їх полінуклеотидів, а також способів одержання і застосування цих полінуклеотидів і поліпептидів, способів одержання олій з низьким вмістом насичених жирних кислот або з низьким вмістом транс-ізомерів жирних кислот, таких як тваринні жири або рослинні олії з низьким вмістом насичених жирних кислот або низьким вмістом транс-ізомерів жирних кислот.

UA 101214 C2

За даною заявкою вимагається пріоритет по патентній заявці США № 12/202204, поданій 29 серпня 2008 року, яка, таким чином, включена в повному обсязі в даний опис як посилання.

Список послідовностей

Дана заявка подана зі списком послідовностей, представленим у вигляді файлу з ім'ям 011631-0045-228_SeqListing.txt розміром 46086 байтів, що створений 25 серпня 2009 року. Список послідовностей включений у дану заявку як посилання в повному обсязі.

Галузь техніки

Винахід стосується поліпептидів, що мають гідролазну активність, включаючи ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, кодує яких їх полінуклеотидів і способів одержання і застосування цих полінуклеотидів і поліпептидів. Також винахід стосується пептидів і поліпептидів, наприклад, ферментів, що мають гідролазну активність, наприклад, ліпаз, сатураз, пальмітаз і/або стеаратаз, і способів обробки жирів і олій з використанням таких пептидів і поліпептидів для одержання продуктів гідролізу олій, таких як тваринні жири або рослинні олії з низьким вмістом насичених жирних кислот, наприклад, соєва олія або олія канולי, продуктів такої обробки олій і продуктів, що містять такі оброблені олії.

Передумови винаходу

В основному гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, використовують у промисловості, включаючи виробництво напоїв і продуктів харчування, як інгібітори черствіння для хлібобулочних виробів, а також у виробництві маргарину й інших пастоподібних сумішей з натуральними ароматизаторами олій; у системах видалення відходів; і у фармацевтичній промисловості, де їх використовують як засоби, що сприяють травленню.

Перероблені олії і жири являють собою основні компоненти продуктів харчування, харчові добавки і харчові технологічні добавки, а також важливу відновлювану сировину для хімічної промисловості. Вони доступні у великих кількостях у результаті переробки насіння олійних культур, наприклад, рисового борошнця, кукурудзи, рапсу, канולי, соняшника, оливи, пальми або сої. Інші джерела цінних олій і жирів включають рибу, відходи ресторанів і топлені тваринні жири. Ці жири й олії являють собою суміші триацилгліцеридів або ліпідів, тобто, жирні кислоти (ЖК), етерифіковані на гліцериновому кістяку. Будь-які олія або жир містять широкий спектр ліпідів з різною структурою, що характеризується вмістом ЖК і їх регіохімічним розподілом на гліцериновому кістяку. Ці властивості окремих ліпідів визначають фізичні властивості чистого триацилгліцериду. Таким чином, вміст триацилгліцериду в жирі або олії у великій мірі визначає фізичні, хімічні і біологічні властивості олії. Цінність ліпідів значно зростає залежно від їх чистоти. Високої чистоти можна домогтися фракційною або хроматографією дистиляцією, відділивши бажаний триацилгліцерид від фонові суміші джерела жиру або олії. Однак це має високу вартість, а вихід часто обмежений тим, що в природі триацилгліцерид зустрічається в низькій концентрації. Крім того, очищення продукту часто ускладнюється присутністю множини структурно і фізично або хімічно схожих триацилгліцеридів в олії.

Альтернативно очищення триацилгліцеридів або інших ліпідів із природного джерела є синтез ліпідів. Продукти таких процесів називають структурованими ліпідами, оскільки вони містять визначений набір жирних кислот, розташованих певним чином на гліцериновому кістяку. Також цінність ліпідів значно зростає за рахунок керування вмістом і розподілом жирних кислот у ліпіді. Усунення з тригліцеридів жирів або олій небажаних ЖК або заміна ЖК із небажаними властивостями на жирні кислоти з більш гарними або більш бажаними хімічними, фізичними або біологічними властивостями збільшує цінність ліпідів. Зокрема, існує потреба в ліпазах, які можуть відщеплювати за допомогою гідролізу, наприклад, вибірково відщеплювати за допомогою гідролізу, насичену жирну кислоту ("сатураза"), або в ліпазах, які, зокрема, можуть відщеплювати за допомогою гідролізу, наприклад, вибірково відщеплювати за допомогою гідролізу, пальмітинову кислоту ("пальмітаза") або стеаринову кислоту ("стеаратаза") від гліцеринового кістяка. Ліпази, такі як сатурази, наприклад, пальмітази і/або стеаратази, можна використовувати для здійснення такого контролю, де ЖК, що видаляються, додаються або заміщуються, являють собою насичені жирні кислоти, наприклад, пальмітинову кислоту або стеаринову кислоту.

Суть винаходу

Винахід стосується поліпептидів, які мають гідролазну активність, включаючи ліпазну активність. В одному з аспектів винахід стосується нових класів ліпаз, названих "сатурази", "пальмітази" і "стеаратази". Також винахід стосується полінуклеотидів, які кодують поліпептиди, що мають сатуразну, наприклад, пальмітазну і/або стеаратазну, активність, і способів одержання і застосування цих полінуклеотидів і поліпептидів. В одному з аспектів винахід стосується поліпептидів, наприклад, ферментів, які мають гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, і термостабільну і/або

термостабільну ферментативну (каталітичну) активність. Ферментативні активності поліпептидів і пептидів за винаходом включають (містять або складаються з) сатуразну активність або ліпазну активність, включаючи гідроліз ліпідів, реакції ацидолізу (наприклад, для заміщення етерифікованої жирної кислоти вільною жирною кислотою), реакції трансетерифікації (наприклад, обмін жирними кислотами між триацилгліцеридами), синтез складних ефірів, реакції переетерифікації й активність ацилгідролаз ліпідів (АГЛ). В іншому аспекті поліпептиди за винаходом використовують для синтезу енантімерно чистих хіральних продуктів.

Поліпептиди за винаходом можна використовувати в різних фармацевтичних, сільськогосподарських і промислових застосуваннях, включаючи виробництво косметичних засобів і нутрицевтиків. Додатково поліпептиди за винаходом можна використовувати в обробці харчових продуктів, пивоварінні, добавках для ванн, виробництві спирту, синтезі пептидів, енантіоселективності, виготовленні шкур у шкіряній промисловості, обробці відходів і розщепленні тваринних відходів, відновленні срібла у фотопромисловості, медичній допомозі, дегумуванні шовку, розкладанні біоплівки, перетворенні біомаси в етанол, біозахисті, протимікробних засобах і дезінфікуючих засобах, особистій гігієні і косметичних засобах, біотехнологічних реактивах, у підвищенні виходу крохмалю з зерна вологого помелу і як фармацевтичні препарати, такі як засоби, що сприяють травленню, і протизапальні засоби.

У деяких варіантах здійснення винахід стосується композицій (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) і способів одержання олій з низьким вмістом насичених жирних кислот, наприклад, олій з низьким вмістом насичених жирних кислот, що містять олії з низьким вмістом пальмітинової, стеаринової, міристинової, лауринової або масляної жирної кислоти і/або каприлової кислоти (октанової кислоти). Будь-яку рослинну олію, наприклад, олію канолі, соєву олію або тваринний жир, наприклад, сало, можна обробити з використанням композиції або за допомогою способу за винаходом. Будь-які харчові продукти, їстівні продукти або печені, смажені або термічно оброблені продукти (наприклад, соуси, маринади, приправи, олії для змазування розбризкуванням, маргарини, пекарні олії, майонез, кулінарні олії, олії для салату, заправки, які можна черпати ложкою і наливати, і т. п., і продукти, одержані з їх використанням) можуть містити рослинну олію або тваринний жир, які оброблені з використанням композиції або способу за винаходом. Модифіковані рослинні олії зі зниженим вмістом насичених жирних кислот можна використовувати в будь-яких продуктах харчування, їстівних продуктах, печених або термічних оброблених продуктах, наприклад, у соусах, маринадах, приправах, оліях для змазування розбризкуванням, маргаринах, пекарних оліях, майонезі, кулінарних оліях, оліях для салату, заправках, які можна черпати ложкою і наливати і т. п. В одному з варіантів здійснення винахід стосується олій, таких як рослинні олії, наприклад, олія канолі або соєва олія, і продуктів харчування або печених або термічно оброблених продуктів, включаючи соуси, маринади, приправи, олії для змазування розбризкуванням, маргарини, майонез, пекарні олії, кулінарні олії, олії для смаження, олії для салату, заправки, які можна черпати ложкою і наливати, і т. п., де олія або продукт харчування, печений або термічно оброблений продукт модифікований з використанням ферменту за винаходом. В одному з аспектів ці рослинні олії, наприклад, олія канолі, рицинова олія, кокосова олія, коріандрова олія, кукурудзяна олія, бавовняна олія, олія лісового горіха, конопельна олія, лляна олія, олія пінника лугового, маслинова олія, пальмова олія, кісточкова пальмова олія, арахісова олія, рапсова олія, рисова олія, сафлорова олія, олія сасанкви, соєва олія, олія соняшника, талова олія, олія цубаки, різні "натуральні" олії, що мають змінений склад жирних кислот, за рахунок генетично модифікованих організмів (ГМО) або традиційної "селекції", такі як олії з високим вмістом олеїнової кислоти, з низьким вмістом ліноленової кислоти або з низьким вмістом насичених жирних кислот (олія канолі з високим вмістом олеїнової кислоти, соєва олія з низьким вмістом ліноленової кислоти або олія соняшника з високим вмістом стеаринової кислоти), тваринні жири (сало, ляд, жир коров'ячого масла і курячий жир), риб'ячий жир (жир тихоокеанського талеїхти, жир печінки тріски, жир хоплостета, жир сардини, жир оселедця і жир менхадена) або суміші будь-яких зазначених вище компонентів і продукти харчування або печені, смажені або термічно оброблені продукти містять олії зі зниженим вмістом насичених жирних кислот, включаючи олії з низьким вмістом пальмітинової кислоти, міристинової кислоти, лауринової кислоти, стеаринової кислоти, каприлової кислоти (октанової кислоти) і т. д., оброблені за допомогою використання композиції або способу за винаходом.

В одному з аспектів винахід стосується поліпептидів, наприклад, ферментів і каталітичних антитіл, які мають гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, включаючи термостабільні і термостабільні ферментативні активності, і активності зі специфічністю до жирних кислот або вибірковістю до жирних кислот, і ферментативні активності з високою або низькою стійкістю до рН, і полінуклеотидів, кодуючих ці

поліпептиди, включаючи вектори, клітини-хазяїни, трансгенні рослини і тварини, що не належать до людини, і способів одержання і застосування цих полінуклеотидів і поліпептидів.

В іншому аспекті винахід стосується виділених, синтетичних або рекомбінантних нуклеїнових кислот, які містять:

5 (а) нуклеїнову кислоту (полінуклеотид), яка кодує щонайменше один поліпептид, де нуклеїнова кислота містить послідовність, що має щонайменше приблизно 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більше, або повну (100%) ідентичність послідовностей з:

(i) SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22 або SEQ ID NO:23, або

(ii) нуклеїновою кислотою SEQ ID NO:1, яка містить одну або декілька нуклеотидних заміни (або їх еквівалентів), що кодують одну, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять, п'ятнадцять, шістнадцять, сімнадцять, вісімнадцять, дев'ятнадцять, двадцять, двадцять одну, двадцять дві, двадцять три, двадцять чотири, двадцять п'ять або більше, або всі амінокислотні заміни (або їх еквіваленти), як зазначено в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23,

де нуклеїнова кислота за п. (i) або (ii) кодує щонайменше один поліпептид, який має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, або кодує поліпептид або пептид, що дозволяє створити специфічне антитіло до гідролази (наприклад, до ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) (поліпептид або пептид, який виконує функцію епітопа або імуногена),

(b) нуклеїнову кислоту (полінуклеотид) за п. (а), де ідентичність послідовностей визначають:

25 (а) за допомогою аналізу з використанням алгоритму порівняння послідовностей або за допомогою візуального дослідження, або (b) на ділянці довжиною щонайменше приблизно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550 або більше залишків або по всій довжині кДНК, транскрипту (мРНК) або гена,

(c) нуклеїнову кислоту (поліпептид) за п. (а) або (b), де алгоритмом порівняння послідовностей є алгоритм BLAST версії 2.2.2, де встановлені наступні настроювання фільтрації blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F, а всі інші опції мають значення за замовчуванням,

35 (d) нуклеїнову кислоту (полінуклеотид), яка кодує щонайменше один поліпептид або пептид, що має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, де нуклеїнова кислота містить послідовність, що гібридується в суворих умовах з комплементарною послідовністю нуклеїнової кислоти за п. (а), (b) або (c), де суворі умови включають стадію відмивання, що включає відмивання в 0,2×SSC при температурі приблизно 65 °C протягом приблизно 15 хвилин,

40 (е) нуклеїнову кислоту (полінуклеотид), яка кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, де поліпептид містить послідовність SEQ ID NO:2 або її ферментативно активні фрагменти, яка містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять, п'ятнадцять, шістнадцять, сімнадцять, вісімнадцять, дев'ятнадцять, двадцять, двадцять одну, двадцять дві, двадцять три, двадцять чотири або більше, або всі амінокислотні заміни (або їх еквіваленти), як зазначено в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23,

(f) нуклеїнову кислоту (полінуклеотид), яка кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, де поліпептид містить послідовність SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:20, або її ферментативно активні фрагменти,

50 (g) (а) нуклеїнову кислоту (полінуклеотид) за будь-яким з пп. з (а) до (f), яка кодує поліпептид, що містить щонайменше одну консервативну амінокислотну заміну і зберігає свою гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, або (b) нуклеїнову кислоту за п. (g) (а), де щонайменше одна консервативна амінокислотна заміна включає заміну амінокислоти на іншу амінокислоту зі схожими характеристиками; або консервативна заміна включає: заміну аліфатичної амінокислоти на іншу аліфатичну амінокислоту; заміну серину на треонін або навпаки; заміну кислотного залишку на інший кислотний залишок; заміну залишку, що несе аміногрупу, на інший залишок, що несе

аміногрупу; заміну основного залишку іншим основним залишком; або заміну ароматичного залишку іншим ароматичним залишком,

(h) нуклеїнову кислоту (полінуклеотид) за будь-яким з пп. з (a) до (g), яка кодує поліпептид, що має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, але не містить сигнальну послідовність,

(i) нуклеїнову кислоту (полінуклеотид) за будь-яким з пп. з (a) до (h), яка кодує поліпептид, що має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, що додатково містить гетерологічну послідовність,

(j) нуклеїнову кислоту (полінуклеотид) за п. (i), де гетерологічна послідовність складається з або містить послідовність, яка кодує: (a) гетерологічну сигнальну послідовність, (b) послідовність за п. (a), де гетерологічну сигнальну послідовність одержують з гетерологічного ферменту, або (c) мітку, епітоп, таргетинг-пептид, розщеплювану послідовність, фрагмент або ділянку, що піддається виявленню, або

(k) послідовність нуклеїнової кислоти (полінуклеотид), повністю (абсолютно) комплементарну послідовності за будь-яким з пп. з (a) до (j).

В одному з аспектів виділена, синтетична або рекомбінантна нуклеїнова кислота кодує поліпептид або пептид, що має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, що є термостабільною. Поліпептиди і пептиди, кодовані нуклеїновими кислотами за винаходом, або будь-який поліпептид або пептид за винаходом можуть зберігати ферментативну або зв'язувальну активність (наприклад, зв'язування із субстратом) в умовах, що включають температурний діапазон приблизно від -100 °C приблизно до -80 °C, приблизно від -80 °C приблизно до -40 °C, приблизно від -40 °C приблизно до -20 °C, приблизно від -20 °C приблизно до 0 °C, приблизно від 0 °C приблизно до 5 °C, приблизно від 5 °C приблизно до 15 °C, приблизно від 15 °C приблизно до 25 °C, приблизно від 25 °C приблизно до 37 °C, приблизно від 37 °C приблизно до 45 °C, приблизно від 45 °C приблизно до 55 °C, приблизно від 55 °C приблизно до 70 °C, приблизно від 70 °C приблизно до 75 °C, приблизно від 75 °C приблизно до 85 °C, приблизно від 85 °C приблизно до 90 °C, приблизно від 90 °C приблизно до 95 °C, приблизно від 95 °C приблизно до 100 °C, приблизно від 100 °C приблизно до 105 °C, 5 приблизно 105 °C приблизно до 110 °C, приблизно від 110 °C приблизно до 120 °C або 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 104 °C, 105 °C, 106 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C, 110 °C, 111 °C, 112 °C, 113 °C, 114 °C, 115 °C або більше. Винахід стосується термостабільних поліпептидів, які зберігають гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, при температурі в описаних вище діапазонах, приблизно при pH 3,0, приблизно при pH 3,5, приблизно при pH 4,0, приблизно при pH 4,5, приблизно при pH 5,0, приблизно при pH 5,5, приблизно при pH 6,0, приблизно при pH 6,5, приблизно при pH 7,0, приблизно при pH 7,5, приблизно при pH 8,0, приблизно при pH 8,5, приблизно при pH 9,0, приблизно при pH 9,5, приблизно при pH 10,0, приблизно при pH 10,5, приблизно при pH 11,0, приблизно при pH 11,5, приблизно при pH 12,0 або більше.

В одному з аспектів поліпептиди за винаходом можуть бути термостабільними і можуть зберігати гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, після впливу температури в діапазоні приблизно від -100 °C приблизно до -80 °C, приблизно від -80 °C приблизно до -40 °C, приблизно від -40 °C приблизно до -20 °C, приблизно від -20 °C приблизно до 0 °C, приблизно від 0 °C приблизно до 5 °C, приблизно від 5 °C приблизно до 15 °C, приблизно від 15 °C приблизно до 25 °C, приблизно від 25 °C приблизно до 37 °C, приблизно від 37 °C приблизно до 45 °C, приблизно від 45 °C приблизно до 55 °C, приблизно від 55 °C приблизно до 70 °C, приблизно від 70 °C приблизно до 75 °C, приблизно від 75 °C приблизно до 85 °C, приблизно від 85 °C приблизно до 90 °C, приблизно від 90 °C приблизно до 95 °C, приблизно від 95 °C приблизно до 100 °C, приблизно від 100 °C приблизно до 105 °C, приблизно від 105 °C приблизно до 110 °C, приблизно від 110 °C приблизно до 120 °C або 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 104 °C, 105 °C, 106 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C, 110 °C, 111 °C, 112 °C, 113 °C, 114 °C, 115 °C або більше.

У деяких варіантах здійснення термостабільні поліпептиди зберігають гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, після впливу температури в описаних вище діапазонах, приблизно при pH 3,0, приблизно при pH 3,5, приблизно при pH 4,0, приблизно при pH 4,5, приблизно при pH 5,0, приблизно при pH 5,5, приблизно при pH 6,0, приблизно при pH 6,5, приблизно при pH 7,0, приблизно при pH 7,5, приблизно при pH 8,0, приблизно при pH 8,5, приблизно при pH 9,0, приблизно при pH 9,5, приблизно при pH 10,0, приблизно при pH 10,5, приблизно при pH 11,0, приблизно при pH 11,5, приблизно при pH 12,0 або більше.

В одному з варіантів здійснення виділені, синтетичні або рекомбінантні нуклеїнові кислоти містять послідовність, яка гібридизується в суворих умовах з нуклеїновою кислотою за винаходом, наприклад, зі зразковою нуклеїновою кислотою за винаходом, що містить послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22 або SEQ ID NO:23, або послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:1, що включає заміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше або всіх залишків (модифікації послідовності SEQ ID NO:1), зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або їх фрагменти або підпослідовності і послідовності, (повністю) комплементарні ним. В одному з аспектів нуклеїнова кислота кодує поліпептид, який має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність. Довжина нуклеїнової кислоти може складати щонайменше приблизно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 або більше залишків або відповідати повній довжині гена або транскрипту, що містить SEQ ID NO:1, і містити послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:1, що містить заміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків (модифікації амінокислотної послідовності) SEQ ID NO:1, що зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23; і послідовності, (повністю) комплементарні ним. В одному з аспектів строги умови включають стадію відмивання, що включає відмивання в 0,2×SSC при температурі приблизно 65 °C протягом приблизно 15 хвилин.

В одному з варіантів здійснення зонд із нуклеїнової кислоти, наприклад, зонд для ідентифікації нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, включає зонд, що містить або складається щонайменше приблизно з 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 або більше послідовних основ послідовності за винаходом або її фрагментів або підпослідовностей, де зонд дозволяє ідентифікувати нуклеїнову кислоту за допомогою зв'язування або гібридизації. Зонд може містити олігонуклеотид, який містить щонайменше приблизно від 10 до 50, приблизно від 20 до 60, приблизно від 30 до 70, приблизно від 40 до 80 або приблизно від 60 до 100 послідовних основ послідовності, що містить послідовність за винаходом або її фрагменти або підпослідовності. Зонд може містити олігонуклеотид, який містить щонайменше приблизно від 10 до 50, приблизно від 20 до 60, приблизно від 30 до 70, приблизно від 40 до 80 або приблизно від 60 до 100 послідовних основ послідовності нуклеїнової кислоти за винаходом або її підпослідовність.

В одному з варіантів здійснення пари послідовностей праймерів для ампліфікації нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, містить пару праймерів, що містить або складається з пари праймерів, які дозволяють ампліфікувати нуклеїнову кислоту, що містить послідовність за винаходом або її фрагменти або підпослідовності. Один або обидва члени пари послідовностей праймерів для ампліфікації можуть містити олігонуклеотид, який містить щонайменше приблизно від 10 до 50 послідовних основ з послідовності.

В одному з варіантів здійснення способи ампліфікації нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, включають ампліфікацію матричної нуклеїнової кислоти з використанням пари послідовностей праймерів для ампліфікації, що дозволяють ампліфікувати послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом або її фрагменти або підпослідовності.

В одному з варіантів здійснення експресуючі касети містять нуклеїнову кислоту за винаходом або її підпослідовність. В одному з аспектів експресуюча касета може містити нуклеїнову кислоту, яка функціонально зв'язана з промоторами. Промотори можуть являти собою промотори вірусів, бактерій, ссавців або рослин. В одному з аспектів промотори рослин можуть являти собою промотори картоплі, рису, кукурудзи, пшениці, тютюну або ячменю. Промотори можуть являти собою конститутивний промотор. Конститутивний промотор може містити CaMV35S. В іншому аспекті промотори можуть являти собою індуковані промотори. В одному з аспектів промотори можуть являти собою тканиноспецифічні промотори або промотори, регульовані навколишнім середовищем або регульовані розвитком. Таким чином, промотори можуть являти собою специфічні промотори, наприклад, насіння, листів, коренів, стебла, або промотори, індуковані скиданням. В одному з аспектів експресуюча касета може додатково містити експресуючий вектор рослини або вірусу рослини.

В одному з варіантів здійснення переносники для клонування містять експресуючу касету (наприклад, вектор) за винаходом або нуклеїнову кислоту за винаходом. Переносник для клонування може являти собою вірусний вектор, плазмиду, фаг, фагеміду, косміду, фосміду, бактеріофаг або штучну хромосому. Вірусний вектор може містити аденовірусний вектор, ретровірусний вектор або аденоасоційований вірусний вектор. Переносник для клонування може містити бактеріальну штучну хромосому (BAC), плазмиду, вектор, одержаний з бактеріофага P1 (PAC), штучну хромосому дріжджів (YAC) або штучну хромосому ссавця (MAC).

В одному з варіантів здійснення трансформовані клітини містять нуклеїнову кислоту за винаходом або експресуючу касету (наприклад, вектор) за винаходом, або переносник для клонування за винаходом. В одному з аспектів трансформована клітина може являти собою бактеріальну клітину, клітину ссавця, клітину гриба, клітину дріжджів, клітину комахи або клітину рослини. В одному з аспектів клітина рослини може являти собою клітину картоплі, пшениці, рису, кукурудзи, тютюну або ячменю. Трансформована клітина може являти собою будь-яку клітину-хазяїна, відому фахівцям у даній галузі, включаючи прокаріотичні клітини, еукаріотичні клітини, такі як бактеріальні клітини, клітини грибів, клітини дріжджів, клітини ссавців, клітини комах або клітини рослин. Зразкові бактеріальні клітини включають будь-які види в межах родів *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* і *Staphylococcus*, включаючи, наприклад, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Зразкові клітини грибів включають будь-які види *Aspergillus*. Зразкові клітини дріжджів включають будь-які види *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* або *Schwanniomyces*, включаючи *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* або *Schizosaccharomyces pombe*. Зразкові клітини комах включають будь-які види *Spodoptera* або *Drosophila*, включаючи *Drosophila S2* і *Spodoptera Sf9*. Зразкові клітини тварин включають лінії клітин CHO, COS або меланоми Боуеса або будь-які лінії клітин миші або людини.

В одному з варіантів здійснення трансгенні рослини містять нуклеїнову кислоту за винаходом або експресуючу касету (наприклад, вектор) за винаходом. Трансгенною рослиною може бути рослина кукурудзи, рослина картоплі, рослина помідора, рослина пшениці, рослина олійної культури, рослина рапсу, рослина сої, рослина рису, рослина ячменю або рослина тютюну.

В одному з варіантів здійснення трансгенне насіння містить нуклеїнову кислоту за винаходом або експресуючу касету (наприклад, вектор) за винаходом. Трансгенне насіння може являти собою рис, насіння кукурудзи, зерна пшениці, насіння олійних культур, насіння рапсу, насіння сої, ядра кокосових горіхів, насіння соняшника, насіння кунжуту, насіння рослин арахісу або тютюну.

В одному з варіантів здійснення виділені, синтетичні або рекомбінантні поліпептиди, що мають гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, або поліпептиди, що дозволяють одержати специфічну імунну відповідь до гідролази, наприклад, до ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази (наприклад, епітоп); і в альтернативних аспектах пептиди і поліпептиди за винаходом містять послідовність:

(а) яка має щонайменше приблизно 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більше або має 100% (повну) ідентичність послідовностей з:

(i) амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:2 або її ферментативно активними фрагментами і містить заміни щонайменше одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти, дванадцяти, тринадцяти, чотирнадцяти, п'ятнадцяти, шістнадцяти, сімнадцяти, вісімнадцяти, дев'ятнадцяти, двадцяти, двадцяти одного, двадцяти двох, двадцяти трьох, двадцяти чотирьох або більше, або всіх амінокислотних залишків (або їх еквіваленти), як зазначено в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або

(ii) амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:20,

де поліпептид або пептид за п. (i) або (ii) має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, або поліпептид або пептид дозволяє одержати специфічне антитіло до гідролази (наприклад, до ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) (поліпептид або пептид, який виконує функцію епітопа або імуногена),

(b) поліпептиду або пептиду за п. (а), де ідентичність послідовностей визначають: (а) за допомогою аналізу з використанням алгоритму порівняння послідовностей або за допомогою візуального дослідження, або (b) на ділянці довжиною щонайменше приблизно 20, 25, 30, 35,

40, 45, 50, 55, 60, 75, 100, 150, 200, 250, 300 або більше амінокислотних залишків або по всій довжині поліпептиду або пептиду, або ферменту і/або їх ферментативно активних підпоследовностей (фрагментів),

5 (c) поліпептиду або пептиду за п. (b), де алгоритмом порівняння последовностей є алгоритм BLAST версії 2.2.2, де встановлені наступні настроювання фільтрації blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F, а всі інші опції мають значення за замовчуванням;

10 (d) амінокислотну последовність, кодовану нуклеїною кислотою, наданою в даному документі, де поліпептид має (i) гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, або (ii) має таку імуногенну активність, що вона дозволяє одержати антитіло, яке специфічно зв'язується з поліпептидом, що містить последовність за п. (a), і/або з його ферментативно активними підпоследовностями (фрагментами);

15 (e) амінокислотну последовність за будь-яким з пп. з (a) до (d), що включає щонайменше одну заміну консервативного амінокислотного залишку, але поліпептид або пептид зберігає гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність;

20 (f) амінокислотну последовність за п. (e), де консервативна заміна включає заміну аліфатичної амінокислоти на іншу аліфатичну амінокислоту; заміну серину на треонін або навпаки; заміну кислотного залишку на інший кислотний залишок; заміну залишку, що несе аміногрупу, на інший залишок, що несе аміногрупу; заміну основного залишку іншим основним залишком; або заміну ароматичного залишку іншим ароматичним залишком або їх сполучення,

25 (g) амінокислотну последовність за п. (f), де аліфатичний залишок включає аланін, валін, лейцин, ізолейцин або їх синтетичний еквівалент; кислий залишок включає аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту або їх синтетичний еквівалент; залишок, що містить амідну групу, включає аспаргін, глутамін або їх синтетичний еквівалент; основний залишок містить лізин, аргінін, гістидин або їх синтетичний еквівалент; або ароматичний залишок містить фенілаланін, тирозин, триптофан або їх синтетичний еквівалент;

30 (h) поліпептиду за будь-яким з пп. з (a) до (f), який має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, але не містить сигнальну последовність,

(i) поліпептиду за будь-яким з пп. з (a) до (h), який має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, який додатково містить гетерологічну последовність;

35 (j) поліпептиду за п. (i), де гетерологічна последовність містить або складається з: (a) гетерологічної сигнальної последовності, (b) последовності за п. (a), де гетерологічну сигнальну последовність одержують з гетерологічного ферменту, і/або (c) мітки, епітопа, таргетинг-пептиду, розщеплюваної последовності, фрагмента або ділянки, що піддається виявленню; або

(m) містять амінокислотну последовність, кодовану будь-якою последовністю нуклеїнової кислоти за винаходом.

40 Зразкові поліпептидні або пептидні последовності за винаходом включають SEQ ID NO:2 і її підпоследовності і варіанти, наприклад, довжиною щонайменше приблизно 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 або більше залишків або повнорозмірний фермент, усі містять заміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків (модифікації амінокислотної последовності SEQ ID NO:2), що зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, 45 таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23. Зразкові поліпептидні або пептидні последовності за винаходом містять последовність, кодовану нуклеїною кислотою за винаходом. Зразкові поліпептидні або пептидні последовності за винаходом включають поліпептиди або пептиди, з якими специфічно зв'язується антитіло за винаходом. В одному з аспектів, поліпептид за винаходом має щонайменше один вид гідролазної активності, наприклад, ліпазної, сатуразної, пальмітазної і/або стеаратазної активності. В одному з аспектів 50 активність являє собою регіоселективну і/або хемоселективну активність.

В одному з аспектів виділених, синтетичний або рекомбінантний поліпептид може містити поліпептид за винаходом, що не містить сигнальну (пептидну) последовність, наприклад, не містить гомологічну сигнальну последовність, і в одному з аспектів містить гетерологічну 55 сигнальну (пептидну) последовність. В одному з аспектів виділених, синтетичний або рекомбінантний поліпептид може містити поліпептид за винаходом, що містить гетерологічну сигнальну последовність, таку як гетерологічна сигнальна последовність гідролази або негідролази (наприклад, неліпази, несатурази або непальмітази). В одному з аспектів химерні білки містять перший домен, що містить сигнальну последовність за винаходом, і щонайменше 60 другий домен. Білок може являти собою злитий білок. Другий домен може містити фермент.

Фермент може являти собою гідролазу (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) за винаходом або іншу гідролазу.

В одному з аспектів гідролазна (наприклад, ліпазна, сатуразна, пальмітазна і/або стеаратазна) активність включає конкретну активність приблизно при 37 °C у діапазоні приблизно від 100 приблизно до 1000 одиниць на міліграм білка. В іншому аспекті гідролазна (наприклад, ліпазна, сатуразна, пальмітазна і/або стеаратазна) активність включає конкретну активність приблизно від 500 приблизно до 750 одиниць на міліграм білка. Альтернативно, гідролазна активність включає конкретну активність при 37 °C у діапазоні приблизно від 500 приблизно до 1200 одиниць на міліграм білка. В одному з аспектів гідролазна активність включає конкретну активність при 37 °C у діапазоні приблизно від 750 приблизно до 1000 одиниць на міліграм білка. В іншому аспекті термостабільність включає зберігання щонайменше половини конкретної активності гідролази при 37 °C після нагрівання до підвищеної температури. Альтернативно, термостабільність може включати зберігання конкретної активності при 37 °C у діапазоні приблизно від 500 приблизно до 1200 одиниць на міліграм білка після нагрівання до підвищеної температури.

В одному з варіантів здійснення виділені, синтетичні або рекомбінантні поліпептиди за винаходом містять щонайменше один сайт глікозилювання. В одному з аспектів глікозилювання може являти собою N-глікозилювання. В одному з аспектів поліпептид можна глікозилювати після експресії в *P. pastoris* або *S. pombe* або в рослинах, таких як олійні рослини, наприклад, соя, канола, рис, соняшник або генетично модифіковані (ГМО) варіанти цих рослин.

В одному з аспектів поліпептид може зберігати гідролазну (наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну) активність в умовах, що включають приблизно pH 6,5, pH 6, pH 5,5, pH 5, pH 4,5 або pH 4,0, або нижче. В іншому аспекті поліпептид може зберігати гідролазну (наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну) активність в умовах, що включають приблизно pH 7, pH 7,5, pH 8,0, pH 8,5, pH 9, pH 9,5, pH 10, pH 10,5, pH 11, pH 11,5, pH 12,0 або більше.

В одному з варіантів здійснення препарати білка містять поліпептид за винаходом, де препарат білка містить рідину, тверду речовину або гель.

В одному з аспектів гетеродимери за винаходом містять поліпептид і другий домен. В одному з аспектів другий домен може являти собою поліпептид і гетеродимер може являти собою злитий білок. В одному з аспектів другий домен може являти собою епітоп або мітку. В одному з аспектів гомодимери за винаходом містять поліпептид за винаходом.

В одному з варіантів здійснення іммобілізовані поліпептиди за винаходом мають гідролазну (наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну) активність, де поліпептид містить поліпептид за винаходом, поліпептид, кодований нуклеїновою кислотою за винаходом, або поліпептид, що містить поліпептид за винаходом, і другий домен. В одному з аспектів поліпептид за винаходом можна іммобілізувати на клітині, везикулі, ліпосомі, плівці, мембрані, металі, смолі, полімері, кераміці, склі, мікроелектроді, графітовій частинці, бусині, гелі, планшеті, кристалі, таблетці, драже, капсулі, порошку, агломераті, поверхні, пористій структурі, блоці або капілярній трубі або на матеріалах, таких як зерна, шкірка, кора, шкіра, волосся, емаль, кістка, і матеріалах, одержуваних з них. Полінуклеотиди, поліпептиди і ферменти за винаходом можна ввести до складу у твердій формі, такий як порошок, ліофілізований препарат, гранули, таблетка, пластинка, кристал, капсула, драже, пелет, або в рідкій формі, такий як водний розчин, аерозоль, гель, паста, суспензія, водно-масляна емульсія, крем, капсула або суспензія везикул або міцел.

В одному з варіантів здійснення харчові добавки для тварин містять поліпептид за винаходом, наприклад, поліпептид, кодований нуклеїновою кислотою за винаходом. В одному з аспектів поліпептид у харчовій добавці може бути глікозилованим. В одному з варіантів здійснення істівні матриці для доставки ферменту містять поліпептид за винаходом, наприклад, поліпептид, кодований нуклеїновою кислотою за винаходом. В одному з аспектів матриця для доставки містить пелет. В одному з аспектів поліпептид може бути глікозилований. В одному з аспектів гідролазна активність є термостійкою. В іншому аспекті гідролазна активність є термостабільною.

В одному з варіантів здійснення способи виділення або ідентифікації поліпептиду, що має гідролазну (наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну) активність, включають стадії: (а) одержання антитіла за винаходом; (b) одержання зразка, що містить поліпептиди; і (с) контакт зразка зі стадії (b) з антитілом зі стадії (а) в умовах, у яких антитіло може специфічно зв'язуватися з поліпептидом, за допомогою чого здійснюють виділення або ідентифікацію поліпептиду, що має гідролазну (наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну) активність.

В одному з варіантів здійснення способи одержання антитіла проти гідролази включають введення тварині, що не належить до людини, нуклеїнової кислоти за винаходом або поліпептиду за винаходом, або їх підпоследовності в кількості, достатній для створення гуморальної імунної відповіді, за допомогою чого одержують антитіло проти гідролази. Винахід стосується способів одержання антитіла до гідролази, які включають введення тварині, що не є людиною, нуклеїнової кислоти за винаходом або поліпептиду за винаходом, або їх підпоследовності в кількості, достатній для одержання імунної відповіді.

В одному з варіантів здійснення способи одержання рекомбінантного поліпептиду включають стадії: (а) одержання нуклеїнової кислоти за винаходом, функціонально зв'язаної з промоторами; і (b) експресія нуклеїнової кислоти зі стадії (а) в умовах, що допускають експресію поліпептиду, за допомогою чого одержують рекомбінантний поліпептид. В одному з аспектів спосіб може додатково включати трансформацію клітини-хазяїна нуклеїновою кислотою зі стадії (а) з наступною експресією нуклеїнової кислоти зі стадії (а), за допомогою чого одержують рекомбінантний поліпептид у трансформованій клітині.

В одному з варіантів здійснення способи ідентифікації поліпептиду, який має гідролазну (наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну) активність, включають наступні стадії: (а) одержання поліпептиду за винаходом або поліпептиду, кодованого нуклеїновою кислотою за винаходом; (b) одержання субстрату гідролази; і (c) контакт поліпептиду або його фрагмента або варіанта зі стадії (а) із субстратом зі стадії (b) і виявлення зниження кількості субстрату або збільшення кількості продукту реакції, де зниження кількості субстрату або збільшення кількості продукту реакції виявляє поліпептид, який має гідролазну (наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну) активність.

В одному з варіантів здійснення способи ідентифікації субстрату гідролази включають наступні стадії: (а) одержання поліпептиду за винаходом або поліпептиду, кодованого нуклеїновою кислотою за винаходом; (b) одержання тестованого субстрату; і (c) контакт поліпептиду зі стадії (а) з тестованим субстратом зі стадії (b) і виявлення зниження кількості субстрату або збільшення кількості продукту реакції, де зниження кількості субстрату або збільшення кількості продукту реакції ідентифікує тестований субстрат як субстрат гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази).

В одному з варіантів здійснення способи визначення специфічного зв'язування тестованої сполуки з поліпептидом включають наступні стадії: (а) експресія нуклеїнової кислоти або вектора, що містить нуклеїнову кислоту, в умовах, які допускають трансляцію нуклеїнової кислоти в поліпептид, де нуклеїнова кислота містить нуклеїнову кислоту за винаходом, або надання поліпептиду за винаходом; (b) одержання тестованої сполуки; (c) контакт поліпептиду з тестованою сполукою; і (d) визначення специфічного зв'язування тестованої сполуки зі стадії (b) з поліпептидом.

В одному з варіантів здійснення способи ідентифікації модулятора гідролазної (наприклад, ліпазної, сатуразної, пальмітазної і/або стеаратазної) активності включають наступні стадії: (а) одержання поліпептиду за винаходом або поліпептиду, кодованого нуклеїновою кислотою за винаходом; (b) одержання тестованої сполуки; (c) контакт поліпептиду зі стадії (а) з тестованою сполукою зі стадії (b) і вимірювання активності гідролази, де зміну гідролазної активності вимірюють у присутності тестованої сполуки в порівнянні з активністю за відсутності тестованої сполуки, що дозволяє визначити, що тестована сполука модулює гідролазну активність. В одному з аспектів гідролазну (наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну) активність можна виміряти шляхом одержання субстрату гідролази і виявлення зниження кількості субстрату або збільшення кількості продукту реакції або виявлення збільшення кількості субстрату або зниження кількості продукту реакції. Зниження кількості субстрату або збільшення кількості продукту реакції при використанні тестованої сполуки в порівнянні з кількістю субстрату або продукту реакції без використання тестованої сполуки ідентифікує тестовану сполуку як активатор гідролазної активності. Збільшення кількості субстрату або зниження кількості продукту реакції при використанні тестованої сполуки в порівнянні з кількістю субстрату або продукту реакції без використання тестованої сполуки ідентифікує тестовану сполуку як інгібітор гідролазної активності.

В одному з варіантів здійснення комп'ютерні системи містять процесор і пристрої зберігання даних, де на зазначеному пристрої зберігання даних зберігають послідовність поліпептиду або послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом (наприклад, поліпептид, кодований нуклеїновою кислотою за винаходом). В одному з аспектів комп'ютерна система додатково може включати алгоритм порівняння послідовностей і пристрій зберігання даних, що містить збережувану на ньому щонайменше одну еталонну послідовність. В іншому аспекті алгоритм порівняння послідовностей включає комп'ютерну програму, яка визначає поліморфізм. В

одному з аспектів комп'ютерна система додатково може включати ідентифікатор, що ідентифікує одну або декілька ознак у зазначеній послідовності. В одному з варіантів здійснення машиночитаний носій містить збережену на ньому послідовність поліпептиду або послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом.

5 В одному з варіантів здійснення способи ідентифікації ознаки в послідовності включають стадії: (а) зчитування послідовності, використовуючи комп'ютерну програму, що ідентифікує одну або декілька ознак у послідовності, де послідовність містить послідовність поліпептиду або послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом; і (b) ідентифікація однієї або декількох ознак у послідовності з використанням комп'ютерної програми.

10 В іншому варіанті здійснення винахід стосується способів порівняння першої послідовності з другою послідовністю, які включають стадії: (а) зчитування першої послідовності і другої послідовності за допомогою комп'ютерної програми, що порівнює послідовності, де перша послідовність містить послідовність поліпептиду або послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом; і (b) визначення відмінностей між першою послідовністю і другою послідовністю з використанням комп'ютерної програми. Стадія визначення відмінностей між першою послідовністю і другою послідовністю додатково може включати стадію ідентифікації поліморфізму. В одному з аспектів спосіб додатково може включати ідентифікатор, що ідентифікує одну або декілька ознак у послідовності. В іншому аспекті спосіб може включати зчитування першої послідовності з використанням комп'ютерної програми й ідентифікацію однієї або декількох ознак у послідовності.

20 В одному з варіантів здійснення способи виділення або збирання нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який має гідролазну (наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну) активність, зі зразка включають стадії: (а) одержання пари послідовностей праймерів для ампліфікації нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який має гідролазну активність, де пара праймерів дозволяє ампліфікувати нуклеїнову кислоту за винаходом; (b) виділення нуклеїнової кислоти зі зразка або обробка зразка таким чином, що нуклеїнову кислоту в зразку роблять доступною для гібридизації з парою праймерів для ампліфікації; і (c) об'єднання нуклеїнової кислоти зі стадії (b) з парою праймерів для ампліфікації зі стадії (a) і ампліфікація нуклеїнової кислоти зі зразка, за допомогою чого зі зразка виділяють або збирають нуклеїнову кислоту, що кодує поліпептид, який має гідролазну активність. В одному з варіантів здійснення зразок являє собою зразок навколишнього середовища, наприклад, зразок води, зразок рідини, зразок ґрунту, зразок повітря або біологічний зразок, наприклад, клітину бактерії, клітину найпростішого, клітину комахи, клітину дріжджів, клітину рослини, клітину гриба або клітину ссавця. Один або обидва члени пари послідовностей праймерів для ампліфікації можуть містити олігонуклеотид, що містить щонайменше приблизно від 10 до 50 або більше послідовних основ з послідовності за винаходом.

30 В одному з варіантів здійснення способи збільшення термостійкості або термостабільності поліпептиду гідролази включають глікозилювання поліпептиду гідролази, де поліпептид містить щонайменше тридцять суміжних амінокислот з поліпептиду за винаходом або з поліпептиду, кодованого послідовністю нуклеїнової кислоти за винаходом, за допомогою чого збільшують термостійкість або термостабільність поліпептиду гідролази. В одному з аспектів конкретна активність гідролази може бути термостабільною або термостійкою при температурі в діапазоні приблизно від більше ніж 37 °C приблизно до 95 °C.

45 В одному з варіантів здійснення способи підвищеної експресії поліпептиду рекомбінантної гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) у клітині включають експресію вектора, що містить нуклеїнову кислоту за винаходом або послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом, де ідентичність послідовностей визначають за допомогою аналізу з використанням алгоритму порівняння послідовностей або за допомогою візуального дослідження, де підвищену експресію забезпечують за допомогою використання промоторів з високою активністю, дицистронного вектора або за допомогою ампліфікації гена вектора.

50 В одному з варіантів здійснення мийні склади, що містять поліпептид за винаходом або поліпептид, кодований нуклеїновою кислотою за винаходом, мають гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність. В одному з аспектів гідролаза може являти собою не поверхнево-активну гідролазу. В іншому аспекті гідролаза може являти собою поверхнево-активну гідролазу.

55 В одному з варіантів здійснення способи миття об'єкта включають наступні стадії: (а) одержання композиції, що містить поліпептид, який має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, де поліпептид містить: поліпептид за винаходом або поліпептид, кодований нуклеїновою кислотою за винаходом; (b) одержання

об'єкта; і (с) контакт поліпептиду зі стадії (а) з об'єктом зі стадії (b) в умовах, у яких композиція може мити об'єкт.

В одному з варіантів здійснення способи одержання трансгенної рослини включають наступні стадії: (а) введення гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти в клітину рослини, де гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом, за допомогою чого одержують трансформовану клітину рослини; і (b) одержання трансгенної рослини з трансформованої клітини. В одному з аспектів стадія (а) додатково може включати введення гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти за допомогою електропорації або мікроін'єкції протопластів клітин рослини. В іншому аспекті стадія (а) додатково може включати введення гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти безпосередньо в тканину рослини за допомогою бомбардування частинками ДНК. Альтернативно, стадія (а) додатково може включати введення гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти в клітину рослини ДНК, використовуючи хазяїна *Agrobacterium tumefaciens*. В одному з аспектів клітиною рослини може бути клітина картоплі, кукурудзи, рису, пшениці, тютюну або ячменю.

В одному з варіантів здійснення способи експресії гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти в клітині рослини включають наступні стадії: (а) трансформація клітини рослини гетерологічною послідовністю нуклеїнової кислоти, функціонально зв'язаною з промоторами, де гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти містить нуклеїнову кислоту за винаходом; (b) вирощування рослини в умовах, у яких відбувається експресія гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти в клітинах рослини.

В одному з варіантів здійснення перший спосіб біокаталітичного синтезу структурованого ліпиду включає наступні стадії: (а) одержання поліпептиду (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом; (b) одержання композиції, що містить триацилгліцерид (ТАГ); (с) контакт поліпептиду зі стадії (а) з композицією зі стадії (b) в умовах, у яких поліпептид здійснює гідролітичне відщеплення залишку карбонової кислоти в положенні Sn2 триацилгліцериду (ТАГ), за допомогою чого одержують 1,3-діацилгліцерид (ДАГ); (d) надання R1-складного ефіру; (е) одержання R1-специфічної гідролази, і (f) контакт 1,3-ДАГ зі стадії (с) зі R1-складним ефіром зі стадії (d) і R1-специфічною гідролазою зі стадії (е) в умовах, у яких R1-специфічна гідролаза каталізує етерифікацію в положенні Sn2, за допомогою чого одержують структурований ліпід. Гідролаза за винаходом може являти собою Sn2-специфічну ліпазу. Структурований ліпід може містити альтернативу масла какао (CBA), синтетичне масло какао, натуральне масло какао, 1,3-дипальмітоїл-2-олеоїлгліцерин (POP), 1,3-дистеароїл-2-олеоїлгліцерин (SOS), 1-пальмітоїл-2-олеоїл-3-стеароїлгліцерин (POS) або 1-олеоїл-2,3-диміристоїлгліцерин (OMM).

В одному з варіантів здійснення другий спосіб біокаталітичного синтезу структурованого ліпиду включає наступні стадії: (а) одержання гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом; (b) одержання композиції, що містить триацилгліцерид (ТАГ); (с) контакт поліпептиду зі стадії (а) з композицією зі стадії (b) в умовах, у яких поліпептид здійснює гідроліз залишку карбонової кислоти в положенні Sn1 або Sn3 триацилгліцериду (ТАГ), за допомогою чого одержують 1,2-ДАГ або 2,3-ДАГ; і (d) сприяння перегрупуванню залишку карбонової кислоти в 1,2-ДАГ або 2,3-ДАГ зі стадії (с) у кінетично контрольованих умовах, за допомогою чого одержують композицію, що містить 1,3-ДАГ.

Цей другий спосіб додатково може включати надання R1-складного ефіру і R1-специфічної ліпази і контакт 1,3-ДАГ зі стадії (d) зі R1-складним ефіром і R1-специфічною ліпазою в умовах, у яких R1-специфічна ліпаза каталізує етерифікацію в положенні Sn2, за допомогою чого одержують структурований ліпід. Гідролаза, наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза за винаходом, може являти собою Sn1- або Sn3-специфічний фермент. Структурований ліпід може містити будь-яку рослинну олію, наприклад, соєву олію, олію каноли, альтернативу масла какао (CBA), синтетичне масло какао, натуральне масло какао, 1,3-дипальмітоїл-2-олеоїлгліцерин (POP), 1,3-дистеароїл-2-олеоїлгліцерин (SOS), 1-пальмітоїл-2-олеоїл-3-стеароїлгліцерин (POS) або 1-олеоїл-2,3-диміристоїлгліцерин (OMM).

R1-складний ефір може містити менш насичений фрагмент, ніж гідролізований залишок карбонової кислоти, і в цьому випадку одержаний таким чином структурований ліпід являє собою менш насичений жир або олію, ніж вихідний ТАГ. R1-складний ефір може містити одну або декілька речовин з омега-3 жирної кислоти, омега-6 жирної кислоти, мононенасиченої жирної кислоти, поліненасиченої жирної кислоти, фосфогрупи, складного ефіру фітостерину й оризанолу. Більш конкретно R1-складний ефір може містити фрагмент, вибраний із групи, що складається з α -ліноленової кислоти, ейкозапентаєнової кислоти, докозагексаєнової кислоти, γ -ліноленової кислоти, дигомо- γ -ліноленової кислоти, арахідонової кислоти, олеїнової кислоти,

пальмолейнової кислоти, холіну, серину, β -ситостерину, куместролу, діетилстильбестролу й оризанолу.

В одному з аспектів цього другого способу стадія (d) додатково включає використання іонообмінних смол. Кінетично контрольовані умови можуть включати нерівноважні умови, що ведуть до одержання кінцевого продукту, що має відношення 1,3-ДАГ до 2,3-ДАГ більше 2:1. Композиція зі стадії (b) може містити флуорогенну жирну кислоту (ЖК). Композиція зі стадії (b) може містити умбеліферилловий ефір ЖК. Кінцевий продукт може бути енантімерно чистим.

В одному з варіантів здійснення способів одержання менш насиченого жиру або олії включає наступні стадії: (a) одержання поліпептиду (гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом; (b) одержання олії або жиру, і (c) контакт поліпептиду зі стадії (a) з олією або жиром зі стадії (b) в умовах, у яких гідролаза може модифікувати олію або жир, наприклад, видалити щонайменше одну насичену жирну кислоту, наприклад, пальмітинову, стеаринову, лауринову, каприлову кислоту (октанову кислоту) і т. п. Модифікація може включати каталізований гідролазою гідроліз жиру або олії. Гідроліз може являти собою повний або частковий гідроліз жиру або олії. Гідролізована олія може містити гліцериновий ефір поліненасиченої жирної кислоти, який може замінити видалену насичену жирну кислоту, або риб'ячий жир, тваринний жир або рослинну олію. Рослинна олія може містити маслинову, пальмову, соєву олію, олію каноли, соняшника або лауринову олію, або рисову олію, або їх сполучення.

В одному з варіантів здійснення способів одержання менш насиченого жиру або олії, що може містити незамінні жирні кислоти, включає наступні стадії: (a) одержання поліпептиду (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом; (b) одержання композиції, що містить триацилгліцерид (ТАГ); (c) контакт поліпептиду зі стадії (a) з композицією зі стадії (b) в умовах, у яких поліпептид гідролізує залишок карбонової кислоти в положенні Sn1 або Sn3 триацилгліцериду (ТАГ), за допомогою чого одержують 1,2-ДАГ або 2,3-ДАГ; і (d) сприяння перегрупованню залишку карбонової кислоти в 1,2-ДАГ або 2,3-ДАГ зі стадії (c) при кінетично контрольованих умовах, за допомогою чого одержують 1,3-ДАГ.

Спосіб додатково може включати надання R1-складного ефіру і R1-специфічної ліпази і контакт 1,3-ДАГ зі стадії (d) з R1-складним ефіром і R1-специфічною ліпазою в умовах, у яких R1-специфічна ліпаза каталізує етерифікацію в положенні Sn2, за допомогою чого одержують структурований ліпід. R1-складний ефір може містити менш насичений фрагмент, ніж гідролізований залишок карбонової кислоти, і в цьому випадку одержаний таким чином структурований ліпід являє собою менш насичений жир або олію, ніж вихідний ТАГ. R1-складний ефір може містити омега-3 жирну кислоту (α -ліноленову, ейкозапентаєнову (ЕПК), докозагексаєнову (ДГК)), омега-6 жирну кислоту (γ -ліноленову, дигомо- γ -ліноленову (ДГЛК) або арахідонову), мононенасичену жирну кислоту (олеїнову, пальмолейнову і т. п.), фосфогрупи (холін і серин), складні ефіри фітостерину (β -ситостерин, куместрол і діетилстильбестрол) і оризанол. Гідролаза, наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза за винаходом, може бути Sn1- або Sn3-специфічним ферментом. Жир або олію зі зниженим вмістом насичених жирних кислот можна одержати за допомогою описаного вище гідролізу будь-якої олії водоростей, рослинної олії або тваринного жиру, наприклад, олії *Neochloris oleoabundans*, олії *Scenedesmus dimorphus*, олії *Euglena gracilis*, олії *Phaeodactylum tricornutum*, олії *Pleurochrysis carterae*, олії *Prymnesium parvum*, олії *Tetraselmis chui*, олії *Tetraselmis suecica*, олії *Isochrysis galbana*, олії *Nannochloropsis salina*, олії *Botryococcus braunii*, олії *Dunaliella tertiolecta*, олії видів *Nannochloris*, олії видів *Spirulina*, олії *Chlorophyceae* (зелені водорості) і олії *Bacilliarophy*, олії каноли, рицинової олії, кокосової олії, коріандрової олії, кукурудзяної олії, бавовняної олії, олії лісового горіха, конопельної олії, лляної олії, олії пінника лугового, маслинової олії, пальмової олії, кісточкової пальмової олії, арахісової олії, рапсової олії, рисової олії, сафлорової олії, олії сасанкви, соєвої олії, олії соняшника, талової олії, олії цубаки, різноманітних "натуральних" олій, що мають змінений склад жирних кислот за рахунок генетично модифікованих організмів (ГМО) або традиційної "селекції", таких як олії з високим вмістом олеїнової кислоти, з низьким вмістом ліноленової кислоти або з низьким вмістом насичених жирних кислот (олія каноли з високим вмістом олеїнової кислоти, соєва олія з низьким вмістом ліноленової кислоти або олія соняшника з високим вмістом стеаринової кислоти); тваринних жирів (сала, лярду, жиру коров'ячої олії і курячого жиру), риб'ячого жиру (жиру тихоокеанського талеїхта, жиру печінки тріски, жиру хоплостета, жиру сардини, жиру оселедця і жиру менхадена) або сумішей будь-яких зазначених вище компонентів. Одержані таким чином жир або олія зі зниженим вмістом насичених жирних кислот можна використовувати в продуктах харчування або в печених, смажених або термічно оброблених продуктах, що містять олії або жири з низьким вмістом деяких жирних кислот, включаючи олії з низьким вмістом пальмітинової кислоти, олеїнової

кислоти, лауринової кислоти, стеаринової кислоти, каприлової кислоти (октанової кислоти) і т. д., що оброблені з використанням композиції або способу за винаходом.

В одному з варіантів здійснення спосіб очищення лубриканту включає наступні стадії: (а) одержання композиції, що містить гідролазу (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) за винаходом; (b) одержання лубриканту; і (с) обробка лубриканту гідролазою в умовах, у яких гідролаза (наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза) за винаходом може здійснювати вибіркового гідролізу олій у мастильному засобі, таким чином очищуючи його. Лубрикант може являти собою гідравлічну олію.

В одному з варіантів здійснення спосіб обробки матерії включає наступні стадії: (а) одержання композиції, що містить гідролазу (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) за винаходом, де гідролаза може вибірково гідролізувати складні ефіри карбонових кислот; (b) одержання матерії; і (с) обробка матерії гідролазою при умовах, у яких гідролаза може здійснювати вибіркового гідролізу складних ефірів карбонових кислот, таким чином обробляючи матерію. Обробка матерії може включати поліпшення тактильних і драпірувальних властивостей кінцевої матерії, фарбування, одержання уповільнення горіння, одержання водовідштовхувальних властивостей, одержання оптичного відбілювання або одержання обробки смолою. Матерія може містити бавовну, віскозу, віскозне волокно, ліоцел, льон, полотно, рами, будь-які їх суміші або їх суміші з поліестерами, вовною, поліаміди, акрили або поліакрили. В одному з варіантів здійснення матерія, нитка або пряжа містить гідролазу за винаходом, яку можна адсорбувати, абсорбувати або іммобілізувати на поверхні матерії, пряжі або волокна.

В одному з варіантів здійснення спосіб видалення або зниження кількості плям від харчових продуктів або олії включає контакт гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом із плямою від продукту харчування або олії в умовах, у яких гідролаза може здійснювати гідроліз олії або жиру в плямі. Гідролаза (наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза) за винаходом може мати збільшену стійкість до денатурації поверхнево-активними речовинами і до теплової деактивації. Гідролаза (наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза) за винаходом може мати детергент або розчин для прання.

В одному з варіантів здійснення дієтична композиція містить гідролазу (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) за винаходом. Дієтична композиція додатково може містити поживну основу, що містить жир. Гідролазу можна активувати сіллю жовчної кислоти. Дієтична композиція додатково може містити склад для немовлят на основі коров'ячого молока. Гідролаза може здійснювати гідроліз жирних кислот з довгим ланцюгом.

В одному з варіантів здійснення спосіб зниження вмісту жиру в молоці або дієтичних композиціях на основі овочів включає наступні стадії: (а) одержання композиції, що містить гідролазу (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) за винаходом; (b) одержання композиції, що містить молоко або рослинну олію, і (с) обробка композиції зі стадії (b) гідролазою в умовах, у яких гідролаза може здійснювати гідроліз олії або жиру в композиції. В одному з варіантів здійснення дієтична композиція для людини або тварин з однокамерним шлунком містить поживну основу, де основа містить жир і не містить гідролазу або містить невелику кількість гідролази, і ефективну кількість гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом для збільшення усмоктування жиру і росту людини або тварини з однокамерним шлунком.

В одному з варіантів здійснення спосіб каталізу реакції переетерифікації для одержання нових триацилгліцеридів включає наступні стадії: (а) одержання композиції, що містить поліпептид (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) за винаходом, де поліпептид може каталізувати реакцію переетерифікації; (b) одержання суміші триацилгліцеридів і вільних жирних кислот; (с) обробка суміші зі стадії (b) поліпептидом в умовах, у яких поліпептид може каталізувати обмін вільної жирної кислоти й ацильних груп триацилгліцеридів, за допомогою чого одержують нові триацилгліцериди, збагачені приєднаними жирними кислотами. Поліпептид може являти собою Sn1,3-специфічну ліпазу.

В одному з варіантів здійснення спосіб переетерифікації для одержання олії з низьким вмістом транс-ізомерів жирних кислот і низьким вмістом жирних кислот із середньою довжиною ланцюга включає наступні стадії: (а) одержання реакційної суміші для переетерифікації, яка містить речовину джерела стеаринової кислоти, вибрану з групи, що складається зі стеаринової кислоти, складних моноефірів стеаринової кислоти й одноатомних спиртів з низькою молекулярною масою і їх сумішей, (b) одержання рідкої рослинної олії; (с) одержання поліпептиду (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом, де поліпептид має 1,3-специфічну ліпазну активність; (d) переетерифікація речовини джерела

стеаринової кислоти і триацилгліцериду рослинної олії, (е) відділення компонентів переетерифікованих вільних жирних кислот від гліцеридних компонентів суміші переетерифікації, щоб надати продукт переетерифікації жиру маргарину і суміш жирних кислот, що містить жирні кислоти, складні моноєфіри жирних кислот або їх суміші, звільнені від рослинної олії, і (f) гідрогенізація суміші жирних кислот. В одному з варіантів здійснення способу переетерифікації реакцію переетерифікації продовжують доти, поки в реакційній суміші присутнє значне співвідношення складноефірних груп у положеннях 1, 3 гліцеридного компонента і компонентів негліцеридних жирних кислот.

В одному з варіантів здійснення способу одержання композиції, що містить 1-пальмітоїл-3-стеароїл-2-монолеїн (POSt) і 1,3-дистеароїл-2-монолеїн (StOSt), включає одержання поліпептиду (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом, де поліпептид дозволяє здійснювати каталізовану 1,3-специфічною ліпазою переетерифікацію 1,3-дипальмітоїл-2-монолеїну (POP) і стеаринової кислоти або тристеарину, і контакт зазначеного поліпептиду з композицією, що містить зазначений POP, у присутності джерела стеарину, такого як стеаринова кислота або тристеарин, для одержання продукту, збагаченого 1-пальмітоїл-3-стеароїл-2-монолеїном (POSt) або 1,3-дистеароїл-2-монолеїном (StOSt).

В одному з варіантів здійснення способу поліпшення або запобігання опосередкованій ліпополісахаридами (ЛПС) токсичності включає введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить гідролазу (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) за винаходом. В одному з варіантів здійснення способу детоксифікації ендотоксину включає контакт ендотоксину з гідролазою (наприклад, ліпазою, сатуразою, пальмітазою і/або стеаратазою) за винаходом. В одному з варіантів здійснення способу відщеплення 2'- або 3'-ланцюга жирної кислоти деацилюванням від ліпиду А включає контакт ліпиду А з поліпептидом за винаходом.

В одному з варіантів здійснення способи зміни субстратної специфічності або субстратної переваги вихідного ферменту ліпази (гідролази жирної кислоти), що містить амінокислотну послідовність, яка відповідає амінокислотній послідовності в SEQ ID NO:2, включають стадію створення (введення) щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12, або більше мутацій амінокислотних залишків у SEQ ID NO:2, як показано в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, за допомогою чого створюють новий фермент гідролазу, що має модифіковану амінокислотну послідовність і змінену субстратну специфічність або субстратні переваги в порівнянні з вихідною SEQ ID NO:2 ферменту ліпази (гідролази жирної кислоти). В одному з аспектів субстратна специфічність або субстратні переваги нового ферменту ліпази (гідролази жирної кислоти) включають переважне або підвищене гідролітичне відщеплення пальмітинової кислоти від олії, або субстратна специфічність або субстратні переваги нового ферменту ліпази (гідролази жирної кислоти) включають переважне або підвищене гідролітичне відщеплення стеаринової кислоти від олії.

В одному з аспектів модифікована амінокислотна послідовність (у порівнянні з "вихідною" SEQ ID NO:2) містить щонайменше одну модифікацію амінокислоти A48C; D49R; D61A; D61E; R72E; R72K; V83M; R85Y; E95K; E116A; E116I; E116L; E116N; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; A144I; E149H; A150I; I151G; I151A; P162G; P162K; V163R; D164R; R172H; R172L або A225S, або їх еквіваленти, або їх сполучення і/або щонайменше одну модифікацію кодону (GCG)35(GCT); (GGC)45(GGA); (GCG)92(GCT); (GTG)102(GTT); (AGC)108(AGT); (CTG)117(CTT); (CTG)124(TTG); (CGG)126(AGG); (GTC)128(GTG); (AGT)133(TCT); (TTC)135(TTT); (GTG)183(GTT); (ACC)188(ACG) або їх еквіваленти, або їх сполучення, а субстратна специфічність або субстратні переваги нового ферменту ліпази (гідролази жирної кислоти) включають переважне або підвищене гідролітичне відщеплення пальмітинової кислоти від олії. В одному з аспектів модифікована амінокислотна послідовність (у порівнянні з "вихідною" SEQ ID NO:2) містить I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх сполучення, а субстратна специфічність або субстратні переваги нового ферменту ліпази (гідролази жирної кислоти) включають переважне або підвищене гідролітичне відщеплення стеаринової кислоти від олії.

В одному з варіантів здійснення способи одержання ферменту, що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважне або підвищене гідролітичне відщеплення пальмітинової кислоти від олії, включають стадії: (а) одержання вихідного ферменту гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази), що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включає переважне гідролітичне відщеплення пальмітинової кислоти від олії, де вихідний фермент гідролаза (наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза) містить послідовність за винаходом; і (b) створення щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12, або більше модифікацій амінокислотних

залишків у вихідному ферменті гідролазі (наприклад, ліпазі, сатуразі, пальмітазі і/або стеаратазі), де модифікації амінокислотних залишків відповідають мутаціям амінокислотної послідовності в SEQ ID NO:2, як показано в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, за допомогою чого створюють фермент, що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважне або підвищене гідролітичне відщеплення пальмітинової кислоти від олії.

В одному з варіантів здійснення способи одержання ферменту, що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважне або підвищене гідролітичне відщеплення стеаринової кислоти від олії, включають стадії: (а) одержання вихідного ферменту гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази), що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважне гідролітичне відщеплення стеаринової кислоти від олії, де вихідний фермент гідролаза (наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза) містить послідовність за винаходом; і (b) створення щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12, або більше модифікацій амінокислотних залишків у вихідному ферменті гідролазі (наприклад, ліпазі, сатуразі, пальмітазі і/або стеаратазі), де модифікації амінокислотних залишків відповідають мутаціям амінокислотної послідовності в SEQ ID NO:2, як показано у таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, за допомогою чого створюють фермент, що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважне або підвищене гідролітичне відщеплення стеаринової кислоти від олії.

В одному з варіантів здійснення способи одержання ферменту гідролази жирної кислоти (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази), що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважний гідроліз конкретної жирної кислоти, включають стадії (а) одержання послідовності ферменту гідролази жирної кислоти (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом; (b) створення (введення) щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12, або більше мутацій залишків основ в нуклеїновій кислоті, де мутації відповідають тим змінам послідовності, що зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23; і (c) тестування активності знову створеного ферменту на субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважне гідролітичне відщеплення конкретної жирної кислоти, за допомогою чого одержують новий фермент гідролазу жирної кислоти (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу), що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважний гідроліз конкретної жирної кислоти. В одному з аспектів фермент гідролаза жирної кислоти (наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза) містить послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2. В одному з аспектів жирна кислота являє собою ліноленову кислоту, лінолеву кислоту, олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту або стеаринову кислоту.

В одному з варіантів здійснення способи одержання ферменту гідролази жирної кислоти (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази), що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважний гідроліз конкретної жирної кислоти, включають стадії (а) одержання послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує фермент гідролазу жирної кислоти (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) за винаходом; (b) створення (введення) щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12, або більше мутацій залишків основ у нуклеїнову кислоту, де мутації відповідають тим змінам послідовності, що зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23; і, (c) експресія створеної нуклеїнової кислоти для одержання нового ферменту гідролази жирної кислоти (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази), за допомогою чого створюють фермент гідролазу жирної кислоти (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу), що має субстратну специфічність або субстратні переваги, включаючи переважний гідроліз конкретної жирної кислоти.

В одному з аспектів послідовність, кодуюча фермент гідролазу жирної кислоти (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу), містить послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:1. В одному з аспектів жирною кислотою є ліноленова кислота, лінолева кислота, олеїнова кислота, пальмітинова кислота або стеаринова кислота. В одному з аспектів новий фермент гідролаза жирної кислоти (наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза) має субстратну специфічність або субстратні переваги до пальмітинової кислоти в порівнянні із субстратною специфічністю або субстратними перевагами вихідного ферменту гідролази жирної кислоти (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) до стеаринової кислоти, або новий фермент гідролаза жирної кислоти (наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза) має субстратну специфічність або субстратні переваги до стеаринової кислоти в порівнянні із субстратною специфічністю або субстратними перевагами вихідного ферменту

гідролази жирної кислоти (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) до пальмітинової кислоти.

В одному з варіантів здійснення ліпази містять амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також містять щонайменше модифікацію амінокислотного залишку A48C; D49R; D61A; D61E; R72E; R72K; V83M; R85Y; E95K; E116A; E116I; E116L; E116N; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; A144I; E149H; A150I; I151G; I151A; P162G; P162K; V163R; D164R; R172H; R172L або A225S, або їх еквіваленти, або їх сполучення, і/або щонайменше одну модифікацію кодону (GCG)35(GCT); (GGC)45(GGA); (GCG)92(GCT), (GTG)102(GTT); (AGC)108(AGT); (CTG)117(CTT); (CTG)124(TTG); (CGG)126(AGG); (GTC)128(GTG); (AGT)133(TCT); (TTC)135(TTT); (GTG)183(GTT); (ACC)188(ACG) або їх еквіваленти, або їх сполучення.

В одному з аспектів субстратна специфічність або субстратні переваги нової ліпази включають переважне або підвищене гідролітичне відщеплення жирної кислоти від олії в порівнянні з "вихідною" SEQ ID NO:2. В одному з аспектів жирною кислотою є ліноленова кислота, лінолева кислота, олеїнова кислота, пальмітинова кислота або стеаринова кислота.

Деталі одного або декількох варіантів здійснення винаходу зазначені на прикладених кресленнях і в нижченаведеному описі. Інші ознаки, цілі і переваги винаходу стануть ясні з опису і креслень, а також з формули винаходу.

Усі публікації, патенти, патентні заявки, послідовності GenBank і депозити ATCC, цитовані в даному документі, таким чином, у явній формі включені посиланням для всіх цілей.

Опис креслень

Наступні фігури тільки ілюструють варіанти здійснення винаходу, але не обмежують обсяг формули винаходу.

Файл патенту або заявки містить щонайменше одну фігуру, виконану в кольорі. Копії публікації цього патенту або патентної заявки з кольоровою фігурою(ами) надасть Бюро по запиту і після сплати необхідного мита.

На фіг. 1 представлена блокова діаграма комп'ютерної системи.

На фіг. 2 представлена блок-схема, що ілюструє один з аспектів процесу порівняння нової нуклеотидної або білкової послідовності з базою даних послідовностей для того, щоб визначити рівні гомології між новою послідовністю і послідовностями в базі даних.

На фіг. 3 представлена блок-схема, що ілюструє один з аспектів процесу в комп'ютері для визначення гомології двох послідовностей.

На фіг. 4 представлена блок-схема, що ілюструє один з аспектів процесу ідентифікації 300 для визначення присутності ознаки в послідовності.

На фіг. 5 представлений зразковий спосіб за винаходом, що включає використання ліпаз за винаходом, для обробки ліпиду, наприклад, ліпиду із соєвої олії, для вибіркового гідролітичного відщеплення пальмітинової кислоти для одержання "соєвої олії зі зниженим вмістом пальмітинової кислоти".

На фіг. 6а показаний вплив зразкових мутацій GSSMSM пальмітази на гідроліз пальмітату і стеарату стосовно вихідної SEQ ID NO:2, що докладно розглянуті далі в прикладі 4. На фіг. 6b показаний вплив зразкових мутацій GSSMSM стеаратази на гідроліз пальмітату і стеарату стосовно вихідної SEQ ID NO:2, що докладно розглянуті далі в прикладі 4.

На фіг. 7 показана SEQ ID NO:2 з конкретними положеннями мутацій, що впливають на гідроліз пальмітату і стеарату, які позначені жирним накресленням збільшеного шрифту. Підкреслені мутації (наприклад, 61A, E) являють собою положення альтернативних амінокислотних залишків (альтернативні послідовності для альтернативних варіантів здійснення) для поліпшення гідролізу пальмітату. Мутації, позначені курсивом (наприклад, 20L), являють собою положення альтернативних амінокислотних залишків (альтернативні послідовності для альтернативних варіантів здійснення) для поліпшення гідролізу стеарату. Положення 116 являє собою положення мутації альтернативного амінокислотного залишку (альтернативна послідовність для альтернативного варіанта здійснення) для поліпшення гідролізу пальмітату і стеарату.

На фіг. 8 показані дані підтверджувального аналізу соєвої олії для відібраних клонів з бібліотеки пальмітаз.

Однакові позначення на різних кресленнях позначають однакові елементи.

Докладний опис

Альтернативні варіанти здійснення включають поліпептиди, включаючи ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, кодуєчі їх полінуклеотиди і способи одержання і використання цих полінуклеотидів і поліпептидів. Альтернативні варіанти здійснення включають поліпептиди, наприклад, ферменти, що мають гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну,

пальмітазну і/або стеаратазну активність, включаючи термостабільну і термостабільну гідролазну активність, і полінуклеотиди, що кодують ці ферменти, а також одержання і використання цих полінуклеотидів і поліпептидів. Гідролазні активності поліпептидів і пептидів за винаходом включають ліпазну активність (гідроліз ліпідів), реакції переетерифікації, синтез складних ефірів, активність ацилгідролаз ліпідів (АГЛ) і пов'язану ферментативну активність. Для цілей цієї патентної заявки реакції переетерифікації можуть включати реакції ацидолізу (включаючи реакцію жирної кислоти і триацилгліцериду), алкоголіз (включаючи реакцію спирту і триацилгліцериду), алкоголіз (включаючи реакцію гліцерину і триацилгліцериду) і реакції трансетерифікації (включаючи реакцію складного ефіру і триацилгліцериду). Поліпептиди за винаходом можна використовувати в різних фармацевтичних, сільськогосподарських і промислових застосуваннях, включаючи виробництво косметичних засобів і нутрицевтиків. В іншому аспекті поліпептиди за винаходом використовують для синтезу енантімерно чистих хіральних продуктів.

У визначених варіантах здійснення ферменти за винаходом можуть являти собою високоселективні каталізатори. Вони можуть мати здатність до каталізу реакцій зі стерео-, регіо- і хемоселективністю, яка неможлива в стандартному хімічному синтезі. В одному з варіантів здійснення ферменти за винаходом можуть бути універсальними. У різних аспектах вони можуть функціонувати в органічних розчинниках, діяти при граничних рН (наприклад, при високих рН і низьких рН), граничних температурах (наприклад, високих температурах або низьких температурах), граничних мірах засоленості (наприклад, при високій засоленості або низькій засоленості) і каталізувати реакції зі сполуками, що структурно не зв'язані з їх природними, фізіологічними субстратами.

В одному з аспектів поліпептиди за винаходом включають гідролази, які мають ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, і їх можна використовувати, наприклад, у біокаталітичному синтезі структурованих ліпідів (ліпідів, що містять визначений набір жирних кислот, розподілених певним чином на гліцериновому кістяку), включаючи будь-яку рослинну олію, наприклад, олію канолі, соєву олію, альтернативи соєвої олії, альтернативи масла какао, 1,3-діацилгліцериди (ДАГ), 2-моноацилгліцериди (МАГ) і триацилгліцериди (ТАГ), такі як 1,3-дипальмітоїл-2-олеоїлгліцерин (POP), 1,3-дистеароїл-2-олеоїлгліцерин (StOSt), 1-пальмітоїл-2-олеоїл-3-стеароїлгліцерин (POSt) або 1-олеоїл-2,3-диміристоїлгліцерин (OMM), поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), поліненасичені жирні кислоти з довгим ланцюгом, такі як арахідонова кислота, докозагексаєнова кислота (ДГК) і ейкозапентаєнова кислота (ЕПК).

У визначеному варіанті здійснення ферменти і способи за винаходом можна використовувати для видалення, додавання або заміни будь-якої жирної кислоти в композиції, наприклад, для одержання олії зі зниженим вмістом насичених жирних кислот (наприклад, олії "з низьким вмістом насичених жирних кислот") або вмістом різних жирних кислот (наприклад, перетворення олії, що містить "насичені" жирні кислоти, в олію, що містить альтернативні "ненасичені" жирні кислоти).

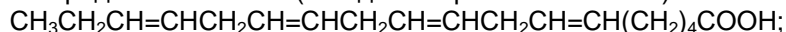
Приклади насичених жирних кислот, які можна видаляти, додавати або "перегрупувати" у ліпіді, наприклад, в олії, використовуючи фермент або здійснюючи на практиці спосіб за винаходом, включають:

оцтова кислота: CH_3COOH ;
 масляна кислота: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$;
 капронова кислота: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$;
 каприлова кислота: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$;
 капринова кислота: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$;
 ундеканова кислота: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$;
 лауринова кислота (додеканова кислота): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$;
 міристинова кислота (тетрадеканова кислота): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$;
 пентадеканова кислота: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$;
 пальмітинова кислота (гексадеканова кислота): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$;
 маргарінова кислота: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$;
 стеаринова кислота (октадеканова кислота): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$;
 арахінова кислота (ейкозанова кислота): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$;
 бегенова кислота: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$.

Приклади омега-3 ненасичених жирних кислот, які можна видаляти, додавати або "перегрупувати" у ліпіді, наприклад, в олії, використовуючи фермент або здійснюючи на практиці спосіб за винаходом, включають:

α -ліноленова кислота (ALA):
 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$;

стеаридонова кислота (октадекатетраєнова кислота):



ейкозапентаєнова кислота (ЕПК):

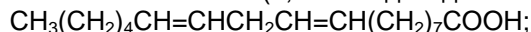


5 докозагексаєнова кислота (ДГК):

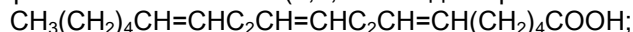


Приклади омега-6 ненасичених жирних кислот, які можна видаляти, додавати або "перегрупувати" у ліпіді, наприклад, в олії, використовуючи фермент або здійснюючи на практиці спосіб за винаходом, включають:

10 ліноленова кислота (9,12-октадекадієнова кислота):



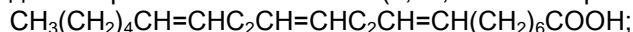
γ-ліноленова кислота (6,9,12-октадекатриєнова кислота):



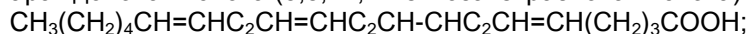
ейкозандієнова кислота (11,14-ейкозадієнова кислота):

15 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH};$

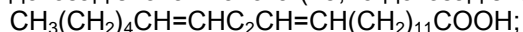
дигомо-γ-ліноленова кислота (8,11,14-ейкозатриєнова кислота):



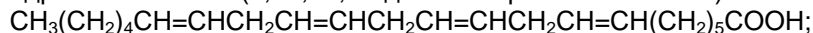
арахідонова кислота (5,8,11,14-ейкозатетраєнова кислота):



20 докозадієнова кислота (13,16-докозадієнова кислота):



адренова кислота (7,10,13,16-докозатетраєнова кислота):



докозапентаєнова (4,7,10,13,16-докозапентаєнова кислота):

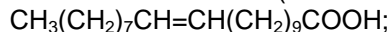
25 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHC}_2\text{H}_4\text{CH}=\text{CHC}_2\text{H}_4\text{CH}=\text{CHC}_2\text{H}_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}.$

Приклади омега-9 жирних кислот, які можна видаляти, додавати або "перегрупувати" у ліпіді, наприклад, в олії, використовуючи фермент або здійснюючи на практиці спосіб за винаходом, включають:

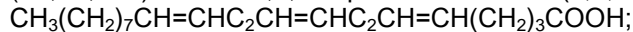
олеїнова кислота (9-октадеценаєнова кислота):

30 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH};$

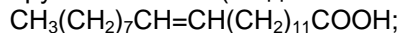
ейкозеноєва кислота (11-ейкозеноєва кислота):



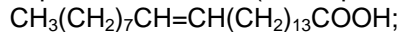
(5Z,8Z,11Z)-ейкоза-5,8,11-триєнова кислота (5,8,11-ейкозатриєнова кислота):



35 ерукова кислота (13-докозенова кислота):



нервонова кислота (15-тетракозенова кислота):



пальмітолеїнова кислота:

40 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}.$

В одному з аспектів у даному документі надані нові класи ліпаз, названі "сатуразами", наприклад, "пальмітази" і "стеаратази". Раніше в літературі термін "сатураза" використовували для позначення ферменту, що здійснює насичення конкретних зв'язків у метаболічному шляху, наприклад, гідрогенізацію подвійного зв'язку (Moise et. al., J Biol Chem, 2005, 280(30):27815-27825). Однак у даному документі надані нові і раніше не описані "сатурази", де сатурази, описувані в даному документі, гідролізують складні ефіри насичених жирних кислот, де гідролізовані складні ефіри можуть являти собою складні ефіри насичених жирних кислот і гліцерину, умбеліферолу або інших спиртів.

Також у даному документі надані раніше не описані "пальмітази" і "стеаратази", де пальмітази і стеаратази гідролітично відщеплюють пальмітинову кислоту і стеаринову кислоту, відповідно, наприклад, від гліцеринового кістяка. "Сатурази", описані в даному документі, також можна позначити як "гідролази насичених жирних кислот". Подібним чином, "пальмітази", описані в даному документі, також можна позначити як "гідролази пальмітату", а "стеаратази", описані в даному документі, також можна позначити як "гідролази стеарату".

55 В іншому аспекті сатурази, описані в даному документі, вибірково гідролізують щонайменше 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100% насичених жирних кислот. В іншому аспекті пальмітази, описані в даному документі, вибірково гідролізують жирні кислоти так, що
60 щонайменше 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%,

75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100% гідролітично відщеплених жирних кислот являють собою пальмітинову кислоту. В іншому аспекті стеаратази, описані в даному документі, вибірково гідролізують жирні кислоти так, що щонайменше 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100% гідролітично відщеплених жирних кислот являють собою стеаринову кислоту.

В одному з аспектів, як показано на фіг. 5, способи використання ферменту за винаходом дозволяють обробляти ліпід, наприклад, ліпід із соєвої або іншої рослинної олії, для вибіркового гідролітичного відщеплення насиченої жирної кислоти, наприклад, пальмітинової або стеаринової кислоти (наприклад, від олії, що містить ці насичені жирні кислоти), для одержання "олії з низьким (або зниженим) вмістом насичених жирних кислот", наприклад, "олії зі зниженим вмістом пальмітинової кислоти", такої як "рослинна олія зі зниженим вмістом пальмітинової кислоти", наприклад, "соєва олія зі зниженим вмістом пальмітинової кислоти". Ферменти за винаходом також можна використовувати для вибіркового гідролітичного відщеплення будь-якої жирної кислоти, конкретно насичених жирних кислот, від гліцеринового кістяка для одержання "олії з низьким (або зниженим) вмістом насичених жирних кислот", включаючи вибіркоче гідролітичне відщеплення насиченої жирної кислоти, наприклад, пальмітинової кислоти або стеаринової кислоти, від гліцеринового кістяка в положенні Sn1 або Sn2, на доповнення до гідролітичного відщеплення в положенні Sn3 (наприклад, гідролітичного відщеплення пальмітинової кислоти в положенні Sn3, зображеному на фіг. 5).

В одному з аспектів наданий зразковий синтез тригліцеридів, олій або жирів з низьким вмістом насичених жирних кислот. У цьому зразковому синтезі можна використовувати вільні жирні кислоти або складні ефіри жирних кислот, залежно від використовуваного ферменту. В одному з аспектів гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази за винаходом, використовують для видалення або гідролітичного відщеплення насичених жирних кислот, таких як оцтова кислота, масляна кислота, капронова кислота, каприлова кислота, капринова кислота, ундеканова кислота, лауринова кислота, міристинова кислота, пентадеканова кислота, пальмітинова кислота, маргарінова кислота, стеаринова кислота, арахінова кислота або бегенова кислота, від тригліцериду, олії або жиру. В одному з аспектів видалені або гідролізовані жирні кислоти заміщають жирними кислотами з удосконаленою користю для здоров'я (наприклад, зі зниженою кореляцією із серцево-судинними захворюваннями) або з удосконаленими хімічними властивостями (такими як окисна стабільність або реакційна здатність), або удосконаленими фізичними властивостями (такими як температура плавлення або тактильні відчуття в ротовій порожнині). В одному з аспектів приєднані жирні кислоти являють собою омега-3 ненасичені жирні кислоти, такі як α -ліноленова кислота, стеаринонова кислота, ейкозапентаєнова кислота (ЕПК) або докозагексаєнова кислота (ДГК), або ПНЖК, або жирні кислоти риб'ячого жиру. В одному з аспектів приєднані жирні кислоти являють собою омега-6 ненасичені жирні кислоти, такі як лінолева кислота, γ -лінолева кислота, ейкозадієнова кислота, дигомо- γ -лінолева кислота, арахідонова кислота, докозадієнова кислота, адренова кислота або докозапентаєнова кислота. В одному з аспектів приєднані жирні кислоти являють собою омега-9 ненасичені жирні кислоти, такі як олеїнова кислота, ейкозаєнова кислота, (5Z,8Z,11Z)-ейкоза-5,8,11-триєнова кислота, ерукова кислота, неврунова кислота або пальмітолеїнова кислота. В одному з аспектів приєднані жирні кислоти (наприклад, омега-3, омега-6 або омега-9) приєднані за допомогою реакції жирних кислот із тригліцеридами, оліями або жиром після видалення або гідролітичного відщеплення насичених жирних кислот за допомогою гідролаз, наприклад, ліпаз, сатураз, пальмітаз і/або стеаратаз за винаходом. В одному з аспектів приєднані жирні кислоти (наприклад, омега-3, омега-6 або омега-9) приєднані за допомогою реакції складних ефірів жирних кислот, включаючи гліцеринові ефіри, або складних етилових або метилових ефірів із тригліцеридами, олією або жиром після видалення або гідролітичного відщеплення насичених жирних кислот за допомогою гідролаз, наприклад, ліпаз, сатураз, пальмітаз і/або стеаратаз за винаходом. В одному з аспектів реакцію приєднання жирних кислот (наприклад, омега-3, омега-6 або омега-9) каталізують гідролази або ліпази, такі як неспецифічна ліпаза (включаючи ліпазу, яка неперіоспецифічна і не має специфічності до жирної кислоти) або Sn1,3-специфічна ліпаза, або Sn1-специфічна ліпаза, або Sn3-специфічна ліпаза, або Sn2-специфічна ліпаза, або ліпаза зі специфічністю до жирної кислоти.

Способи і композиції (гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом, можна використовувати для одержання нутрицевтиків (наприклад, поліненасичених жирних кислот і олій), різних продуктів харчування і харчових добавок

(наприклад, емульгаторів, замінників жиру, маргаринів і пастоподібних сумішей), косметичних засобів (наприклад, емульгаторів, кремів), засобів доставки фармацевтичних і лікарських засобів (наприклад, ліпосом, таблеток, складів) і добавок до тваринних кормів (наприклад, поліненасичених жирних кислот, таких як лінолева кислота).

В одному з аспектів, ліпази за винаходом можуть впливати на флуорогенні складні ефіри жирних кислот (ЖК), наприклад, на умбеліферилові ефіри ЖК. В одному з аспектів можна одержати профілі специфічностей до жирних кислот ліпаз, одержаних або модифікованих способами за винаходом, вимірюючи їх відносні активності на ряді умбеліферилових ефірів ЖК, таких як складний пальмітиновий, стеариновий, олеїновий, лауриновий, ПНЖК або масляний ефір.

В одному з аспектів поліпептид (наприклад, антитіло або фермент, наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза) за винаходом для цих реакцій іммобілізують, наприклад, як описано нижче. В альтернативних аспектах способи за винаходом, для здійснення яких не потрібний органічний розчинник, можна здійснювати при відносно високих швидкостях реакцій. Див., наприклад, патенти США №№ 5552317; 5834259.

У визначених варіантах здійснення способи і композиції (ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом можна використовувати для гідролізу (включаючи вибіркового гідролізу) олій і жирів, таких як риба́чий жир, тваринні жири і рослинні олії, і ліпідів, таких як поліненасичені жирні кислоти. В одному з аспектів поліпептиди за винаходом використовують для одержання олій з низьким вмістом насичених жирних кислот, наприклад, шляхом видалення (гідролітичного відщеплення) щонайменше однієї жирної кислоти від олії; і гідроліз може являти собою вибіркового гідролізу, наприклад, видалення тільки конкретної жирної кислоти, такої як пальмітинова, стеаринова або інші насичені жирні кислоти, або видалення жирної кислоти тільки з одного положення, наприклад, з Sn1, Sn2 або Sn3. В одному з аспектів поліпептиди за винаходом використовують для обробки жирних кислот (таких як поліненасичені жирні кислоти), наприклад, жирних кислот риба́чого жиру, наприклад, для використання в продуктах харчування або як харчової або кормової добавки, або кулінарної олії, олії для смаження або випічки або харчової олії. В іншому варіанті здійснення способи і композиції (ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом можна використовувати для вибіркового гідролізу насичених складних ефірів стосовно ненасичених складних ефірів з одержанням кислот або спиртів. В іншому варіанті здійснення способи і композиції (ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом можна використовувати для обробки латексів для множини різних цілей, наприклад, для обробки лактексів, використовуваних у композиціях фіксаторів для волосся для видалення неприємних запахів. В іншому варіанті здійснення способи і композиції (ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом можна використовувати для лікування дефіциту ліпази у тварини, наприклад, у ссавця, такого як людина. В іншому варіанті здійснення способи і композиції (ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом можна використовувати для одержання мастильних засобів, таких як гідралічна олія. В іншому варіанті здійснення способи і композиції (ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом можна використовувати в одержанні і використанні детергентів. В іншому варіанті здійснення способи і композиції (ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом можна використовувати в процесі хімічної обробки матерії, волокон або пряжі. В одному з аспектів способи і композиції (ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом можна використовувати для одержання уповільнення горіння матерії, використовуючи, наприклад, галогенозаміщені карбонові кислоти або їх складні ефіри, тобто, фторовмісні, хлоровмісні або бромовмісні карбонові кислоти або їх складний ефір. В одному з аспектів надані способи створення ліпаз із природних бібліотек.

В одному з варіантів здійснення "гідролази" за винаходом включають поліпептиди (наприклад, антитіла, ферменти) і пептиди (наприклад, "активні центри"), що мають будь-яку гідролазну активність, тобто, поліпептиди за винаходом можуть мати будь-яку гідролазну активність, включаючи, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність. В іншому варіанті здійснення "гідролази" за винаходом включають усі поліпептиди, що мають будь-яку ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, включаючи ліпосинтетичну або ліпогідролітичну активність, тобто, поліпептиди за винаходом можуть мати будь-який ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність. В іншому варіанті здійснення ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази за винаходом включають ферменти, що беруть участь у біоконверсії ліпідів через каталіз реакцій гідролізу, алкоголізу, ацидолізу, етерифікації й амінолізу. В одному з аспектів гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом можуть гідролізувати емульсії ліпідів. В одному з аспектів ферменти за винаходом можуть діяти переважно на зв'язку Sn1, Sn2 і/або Sn3

триацилгліцеридів для вивільнення однієї або декількох жирних кислот із гліцеринового кістяка. Наприклад, гідролазна, ліпазна, сатуразна, пальмітазна і/або стеаратазна активність наданих у даному документі поліпептидів включає синтез масла какао, поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), 1,3-діацилгліцеридів (ДАГ), 2-моноацилгліцеридів (МАГ) і триацилгліцеридів (ТАГ). В іншому варіанті здійснення ліпазна, сатуразна, пальмітазна і/або стеаратазна активність наданих у даному документі поліпептидів також включає одержання олій з низьким вмістом насичених жирних кислот, наприклад, соєвої олії або олії каноли, за допомогою видалення жирної кислоти, наприклад, пальмітинової, олеїнової, лауринової або стеаринової кислоти. В альтернативних аспектах ферменти за винаходом також можуть гідролізувати і/або ізомеризувати зв'язки при високих температурах, низьких температурах, лужних рН і кислих рН. В одному з аспектів гідролази, наприклад, ліпази за винаходом, являють собою сатурази, що каталізують реакції гідролізу, алкоголізу, ацидолізу, етерифікації й амінолізу, де карбонова або жирна кислота в молекулі, що утворилася або вступила в реакцію, являє собою насичену жирну кислоту, таку як оцтова кислота, масляна кислота, лауринова кислота, міристинова кислота, пальмітинова кислота, стеаринова кислота або арахідова кислота. В одному з аспектів гідролази, наприклад, ліпаза або сатураза за винаходом, являє собою пальмітазу, що каталізує реакції гідролізу, алкоголізу, ацидолізу, етерифікації й амінолізу, де карбонова або жирна кислота в молекулі, що утворилася або вступила в реакцію, являє собою пальмітинову кислоту. В одному з аспектів гідролази, наприклад, ліпаза або сатураза за винаходом, являє собою стеаратазу, що каталізує реакції гідролізу, алкоголізу, ацидолізу, етерифікації й амінолізу, де карбонова або жирна кислота в молекулі, що утворилася або вступила в реакцію, являє собою стеаринову кислоту.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані ферменти, включаючи варіанти ферментів гідролаз (наприклад, "варіант ліпази", "варіант сатурази", "варіант пальмітази" або "варіант стеаратази") за винаходом; ці ферменти можуть містити амінокислотну послідовність, що одержана з амінокислотної послідовності "попередника". Попередник може містити гідролазу, що зустрічається в природі, і/або рекомбінантну гідролазу. Амінокислотна послідовність варіанта гідролази "одержана" з амінокислотної послідовності попередника гідролази за допомогою заміни, делеції або вставки, або інсерції однієї або декількох амінокислот в амінокислотній послідовності попередника. Таку модифікацію виконують у "послідовності ДНК попередника", яка кодує амінокислотну послідовність попередника ліпази, а не маніпулюють попередником ферменту гідролази *per se*. Придатні способи для таких маніпуляцій послідовністю ДНК попередника включають способи, описані в даному документі, а також способи, відомі фахівцям у даній галузі.

Створення і маніпуляції з нуклеїновими кислотами

В одному з аспектів у даному документі надані нуклеїнові кислоти, включаючи експресуючі касети, такі як експресуючі вектори, що кодує поліпептиди (наприклад, гідролази, такі як ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, і антитіла). В іншому аспекті в даному документі надані нуклеїнові кислоти, що мають послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:1, і містять заміни щонайменше одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23 (або їх еквіваленти). В одному з варіантів здійснення в даному документі надані нуклеїнові кислоти, що кодує поліпептиди, які мають послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, і містять зміни щонайменше одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23 (або їх еквіваленти).

SEQ ID NO:1:

```
ATGCTGAAACCGCCTCCCTACGGACGCCTGCTGCGCGAACTGGCCGATATC,
CCGGCCATCGTGACGGCACCGTTCCGGGGCGCTGCGAAAATGGGCAAACCTG,
GCGGATGGCGAGCCGGTACTGGTGCTGCCCGGCTTCCTGGCCGACGACAAC,
GCCACCTCGGTGCTGCGCAAGACCTTCGATGTCGCGGGCTTTGCCTGTTCTG,
GGCTGGGAACGCGGGCTTCAACCTCGGCATTCTGCGGACCTCGTGGACCGG,
CTGGTGCACCGGCTGCGGGCGGTGTCGGAGGCGGCGGCTGGTCAAGAGGT,
GATCGTGGTTCGGCTGGAGCCTCGGCGGCCTCTATGCGCGCGAGCTGGGCCA,
CAAGGCGCCCGAACTGATCCGGATGGTTCGTCACGCTCGGCAGTCCGTTCTGC,
GGGCGACCTCCACGCCAACCATGCGTGGAAGATCTACGAGGCGATCAACAG,
CCACACGGTCGACAACCTGCCGATCCCGGTCTGATTTCCAGATTAAGCCGCC,
GGTGGCGACCATCGCGGTGTGGTCTGCGGCGTGGTGGCGGCGGCTAGAGCTGGCG,
AGACCTCGGAAGGCTCGCCCGAGCAGTGGACGAGCGGCTAGAGCTGGCG,
```

GTGACCCACATGGGCTTTGCCGCATCGAAGACCGGGGCCGAGGCTGTGGTC,
CGGCTGGTCGCGGCGCGGCTCTAG;

SEQ ID NO:2 (кодується за допомогою SEQ ID NO:1):

1-буквений код:

5 MLKPPPYGRLLRELADIPAIVTAPFRGA AKMGKLADGEPVLVLPGLADDNATSVLR,
KTFDVAGFACSGWGERGFNLGIRGDLVDRLRAVSEAAGGQKVIVVGWSLGGGL,
YARELGHKAPELIRMVVTLGSPFAGDLHANHAWKIYEAINSHTVDNLPIPVDFQIKPP,
VRTIAVWSPLDGVVAPETSEGSPEQSDERLELAVTHMGFAASKTGAEAVVRLVAAR,
L-

10 3-буквений код:

Met Leu Lys Pro Pro Tyr Gly Arg Leu Leu Arg Glu Leu Ala Asp,
Ile Pro Ala Ile Val Thr Ala Pro Phe Arg Gly Ala Ala Lys Met Gly,
Lys Leu Ala Asp Gly Glu Pro Val Leu Val Leu Pro Gly Phe Leu Ala,
Asp Asp Asn Ala Thr Ser Val Leu Arg Lys Thr Phe Asp Val Ala Gly,
15 Phe Ala Cys Ser Gly Trp Glu Arg Gly Phe Asn Leu Gly Ile Arg Gly,
Asp Leu Val Asp Arg Leu Val Asp Arg Leu Arg Ala Val Ser Glu Ala,
Ala Gly Gly Gln Lys Val Ile Val Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu,
Tyr Ala Arg Glu Leu Gly His Lys Ala Pro Glu Leu Ile Arg Met Val,
Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ala Gly Asp Leu His Ala Asn His Ala,
20 Trp Lys Ile Tyr Glu Ala Ile Asn Ser His Thr Val Asp Asn Leu Pro,
Ile Pro Val Asp Phe Gln Ile Lys Pro Pro Val Arg Thr Ile Ala Val,
Trp Ser Pro Leu Asp Gly Val Val Ala Pro Glu Thr Ser Glu Gly Ser,
Pro Glu Gln Ser Asp Glu Arg Leu Glu Leu Ala Val Thr His Met Gly,
Phe Ala Ala Ser Lys Thr Gly Ala Glu Ala Val Val Arg Leu Val Ala,
25 Ala Arg Leu;

SEQ ID NO:3:

ATGGCCGGCCACCAGGGCGCGCGGGGCCCCAAAGACGGTCCGCCGGCGATGGTG,
ATCCCGGGCTTCCTCGCCACGACAGGCACACGACGATTGCGCCGGGAAGTC,
GCCGAGGCGGGGTTCAAGGTTACCCCTGGCGGCAGGGCTGGAACATGGGAGCG,
30 CGTGCCGACACGCTCGAGAAATTGAAGCGGGCAGTGGACCACTGCGGTCATGAC,
GAGCCGATCCTGCTGGTCTGGTCTGGGCGGGCTCTACGCGAGGGAGGTC,
GCGCGCGCCGAGCCGGATCAGGTGCGGGCGGTGGTCACTCTTGTTCCCGGTGT,
CGGGCGACCGGCGCCGCTACACCAACGTGTGGAAGCTGTACGAATGGGTGGCGG,
GTCACCCGGTGAGCAGCCCGCCGATCCCCGACAAGGAGGAAAAGCCCGCGGTGC,
35 CGACCTGGCTTTGTGGTCTGGCGGATCAGCGGATCGTCTGGCGCCCCGTGGCGCG,
CGGACTCAGTTATCTCACGACAAGGCGGTCTGAGATGCGAACGAGCCACATGGG,
CTTTGCCATGTCGGCGAAGAGCGCACGCTTTGTTGTCGCCGAGATCGTGAAGTTC,
CTGAAGAAAACCGAAGGTTCCGAGTCGCACGATTGA;

SEQ ID NO:4 (кодується за допомогою SEQ ID NO:3):

40 MAGHQGARGPKDGPAMVIPGFLAHDRLRLRLAEAGFRVHPWRQGWNMGA,
RADTLEKLKRAVDQCGHDEPILLVGWSLGGLYAREVARAEPDQVRVVTLGSPVSG,
DRRRYTNVWKLYEWVAGHPVDDPPIPDKEEKPPVPTLALWSADDGIVGAPSARGTQ,
LSHDKAVEMRTSHMGFAMSAKSARFVVAEIVKFLKTEGSESHD;

SEQ ID NO:5:

45 GTGAGCGAGAAAGGCGCACCCAAGGGAAGGCAGCGGCTGAAGGAGATCGGCGC,
GCTTCTGTTCCACGCGCCTCGCAGCTTGGGCCATCTGGGCGCGCGCGGCCCAAG,
GACGGTCCTCCGGTGATGGTCATCCCGGGATTCTCGCGCACGACTTGCATACGA,
CGCAGTTGCGCCGGGCGCTCGCGAAGGCAGGCTTCCGAGTGCATCCGTGGCGGC,
AGGGGATGAACCTTGAGCGCGCGCCGATACGCTCGAAATTCTGAAGCGCGCGG,
50 TGGATTCTGCGGCTCGAGCGAGCCGATGCTGCTCGTCTGGCTGGAGCCTGGGCGG,
TCTCTATGCCCGGGAGATCGCGCGTGCGGAGCCGGACCGGGTGCGGGCGGTGGT,
GACGATGGGATCGCCGGTGTTGGGGCGACCGCAGGCGCTACACCAACGTGTGGAA,
GCTGTACGAACGATTGCCGGCCATCCGGTCTGACAAGCCGCGGATCCCGGACAA,
GAGCCAGAAGCCGCGCGGTGCCGACTCTGGCTTTGTGGTCTGCAGCATGATGGCATC,
55 GTCGGCGCGCCCTCGGCGAGAGGGACGAAGAAGACCCGCGACAAGGCGGTCTGC,
CATCGACACGACTCACATGGGGTTTGCCATGTGCCCCAAGACGACGCGCGCGGC,
AGTGCCTGAGATCGTGGGCTTTTGAATGAAGTCGAAGGCGGTTCTGCACCCCGG,
GCGTGA;

SEQ ID NO:6 (кодується за допомогою SEQ ID NO:5):

60 MSEKGAPKGRQRLKEIGALLFHAPRSLGHLGARGPKDGPVMVIPGFLAHDRLHTTQL,

RRALAKAGFRVHPWRQGMNLGARADTLEILKRAVDSCGSSEPMLLVGWSLGGLYA,
REIARAEPDRVRVVTMGSPVWGDRRRYTNVWKLYERIAGHPVDKPPIDKSQKPP,
VPTLALWSQHDGIVGAPSARGTKKTRDKAVIDTTHMGFAMSPKTTAAVREIVGF,
LNEVEGGSSPRA;

5 SEQ ID NO:7:

ATGAGGCTGCGCGAGGGGGGCGCGCTCGTATCGCGGGCCTATCGCGCCTTCGGG,
CGCCTCGGCGAGCGCGGCCCGGCGGACGGGCGCCGCTGATGGTGATCCCGGGC,
TTCCTCGCCACCGATCGCACCACTTTGGGGCTGCAGCGGGCGCTGGCCAAGGGCG,
GCTACAAGGTGACCGGATGGGGCATGGGCCTCAACAGCGGCGTCACCGAAGACA,
10 TAGTCGACCGCATCGCCGCTCGGGTCGAAAGGTTTGGAGCCGGCCGCAAAGTGA,
TCCTCGTCGGCTGGAGCCTCGGCGGACTCTACGCGCGCGTGGTGCGCGAGGAGC,
GGCCGGATCTCGTCGACAAGGTGGTCACGCTCGGCTCGCCCTTTTCGGGCGACAG,
GCGCCGCAACAACAATGTCTGGCGGCTCTACGAGTTCGTC,
GCCGGCCATCCGGTCAACAGCCCGCCGATCGACAAGGACCCCGAGGTGAAGCCG,
15 CCGGTGCCGACGCTCGCTATCTGGTCGCGGCGGACGGCATCGTCTCTCCGGCGG,
GCGCGCGCGGGCGGGAGGGAGAGCGCGACGCCGAGCTCGAGCTCGACTGCAGC,
CACATGGGCTTTGCGGTCAGCGCCAGGGCTTATCCCAAGATCGTGGAGGCGGTG,
CGGGCGTTTCCGGAACATCCGTTGCGGCTGA;

SEQ ID NO:8 (кодується за допомогою SEQ ID NO:7):

20 MRLREGGALVSRAVYAFGRGRLGERGPADGPPLMVIPGFLATDRTTLGLQRALAKGGY,
KVTGWGMGLNSGVTEIDVRIAARVERFGAGRKVILVGWSLGGLYARVVAQERPD,
LVDKVVTLGSPFSGDRRRNNNVWRLYEFVAGHPVNSPPIDKDPEVKPPVPTLAIWSR,
RDGIVSPAGARGREGERDAELELDCSHMGFAVSARAYPKIVEAVRAFPENIRSR;

SEQ ID NO:9:

25 ATGAAGCCCGCCGCCCGGATGGATGAAGATCCGGGAGGCGGGCTCGCTCCTCGCG,
CGCTTCTACCGCGCGTTTCGGCAAGCTCGAGCCGCGCGGGCCGGCGGACGGGCCG,
AAGCTGATGGTGATCCCGGGTTTCTCGCGGGCGACAGGACGACGCTCGGGCTG,
CAGCGAGCGCTGGCCGGCGGGCGGCTACCGGGTTCGCCGGCTGGGGGCTGGGGGTG,
AACCGCGGCGTTTTCGGAGGACGTGGTTCGACCGGATCGGCCAGCAAGTCGCGCGG,
30 TTCGGGGCGGGCGAGAAGGTGATCCTGGTCGGCTGGAGCCTTGGCGGGCTTTAT,
GCGCGCGTGTTGGCGCAGGAGCGGCCCGACCTCGTCGAGAAGGTGGTGACCTTG,
GGCTCGCCGTTTTTCGGGCGACCGGCGGCGCAACAACAATGTGTGGCGGCTCTATG,
AGTGGGTGGCTGGGCATCCGGTGAACGATCCGCCGATCGACAAGGACCCGGCGA,
AGAAGCCCCCGGTGCCGACGCTCGCGATCTGGTCGCGGCGTGATGGGATCGTGG,
35 CGGTCGAAGGCGCGCGGGGCGGCCGAGGAGCGGGATGCCGAGCTGGAGATC,
GATTGCAGCCACATGGGGTTTGGGTCAGCGGCAAGGCGTTTCCCCGAATCGTA,
GAGGCGGTGAAGGGGTTCTAA;

SEQ ID NO:10 (кодується за допомогою SEQ ID NO:9):

40 MKPPPGWMKIREAGSLLARFYAFGKLEPRGPADGPKLMVIPGFLAGDRTTLGLQR,
ALAGGGYRVAGWGLGVNRGVSEDVVDRIQQVARFGAGEKVILVGWSLGGLYAR,
VVAQERPDLEKVVTLGSPFSGDRRRNNNVWRLYEWVAGHPVNDPPIDKDPKPP,
VPTLAIWSRRDGIVAVEGARGRPEERDAELEIDCSHMGFGVSGKAFPRIVEAVKGF;

SEQ ID NO:11:

45 GTGTTGGTGCTGCCGGCGTTTCTCGCCAACGACCTTCCCACTTCGCTTCTCCGCAG,
GACGCTGAAGGCGAACGGGTTTTCGCCGTTTCGGCTGGGCGAACGGTTTCACTTA,
GGTGACGCGCCGGACACGCTCCAGCGCCTGAGCGCACGGCTCGATGCGGTGGTT,
CAGGAAGCGGGCAGGCCGTTTGCATTGATCGGCTGGAGCCTTGGCGGGCTTTAT,
GCCCCGAGAGCTGGCGAAACGCAGGTCGGCTGAGGTGTGCGGCAGTGATCACGCTC,
GGCACGCCCTTCTCGGTTGACCTCAGACGCAACAACGCCTGGAAGCTGTACGAG,
50 CTCATCAACGATCATCCTGTGCGATGCCCTCCCTTGGATGTTTCAGGTGCGACGCGA,
AGCCACCCGTCGGAACCTTCGCTTTGTGGTCGCGTCGCGACGGGATCGTAGCGCC,
CGCGAGCGCGCACGGCATGGAGGGCGAGTTCGACCAGGCGATCGAGCTGCAGTG,
CACGCACAACGAGATGGTCAGTGATCCGGAGGCCCTCTCCACGATCGTTACCTTG,
CTGCGGGGAAAATGTTGGCTCCTGA;

55 SEQ ID NO:12 (кодується за допомогою SEQ ID NO:11):

MLVLP AFLANDLPTSLRRTLKANGFRPFGWANGFNLGARPDTLQRLSARLDAVVQ,
EAGRPVALIGWSLGGLYARELAKRRSAEVS AVITLGPFSVDLRRNNAWKLYELIND,
HPVDAPPLDVQVDAKPPVRTFALWSRRDGIVAPASAHGMEGEFDQAIELQCTHNEM,
VSDPEALSTIVTLLRENVGS;

60 SEQ ID NO:13:

GTGAATACAGCCGACCTATTGAAGCCACCACCCGCAAGCATGACAGTTCTCGAG,
 GCGAGAGCGCTGCTGGACATATGCAAGATGAGCGCCCCATTGGCGCGCTTGCTA,
 TTCAAAAAGAACTCGCCCTGGCGCAAACAACGGGTTCTCGTAATACCTGGCTTTG,
 GCGCTGATGATCGCTACACCTGGCCGTTGCGCAATTTCTGCCAGGCACAGGGCTA,
 5 TGCCACGACTGGCTGGGGCCTGGGCACCAACAAGGCAGGTCTCAATATGCCGCA,
 TCAACTATCCGACGTCCACCCCAGATGGAAGCTAAAACCCAAGACGCCGTACCG,
 TGGTGAGGCGGGCGTACCTTACGTGATTGACCGCTTGATCGAACGGTTTGACGAA,
 TTGGCATCGACGGATCCGCAACCCATCGCACTTATAGGTTGGAGTCTGGGTGGTT,
 10 TCATGGCCCGTGAAGTTGCCCGAGAGCGCCCAAACCAGGTGAGTCAGGTTATTA,
 CCCTCGGTTCTCCTGTCATCGGAGGCCCCAAAATACACCCTCGCTGCATCGGCTTT,
 CATCCGGCGCAAATACGATTTGGAAGTGGGTGGAGCAAGTGATCGCGGAGCGGGA,
 AGATCGCCCCATTACTGTTCTATTACAGCAATAGTCAGCCAGTCTGATGGCATC,
 GTCGGATTCGAGCGGCAATCGATCACACAGTCCCGCTGTGCAGCATTTACATA,
 TGGATGTTGCCCATTTGGGCTTTCTTACAACACGAGGGTTTGGTCAGAAATCGC,
 15 CAATGCGCTCAACTCTTTAGAGGTGGAGAAGGAGCGTGTTTAG;
 SEQ ID NO:14 (кодується за допомогою SEQ ID NO:13):
 MNTADLLKPPPASMTVLEARALLDICKMSAPLARLLFKKNSPWRKQRVLVIPGFGA,
 DDRTWPLRNFVQAQGYATTGWGLGTNKAGLNMPHQLSDVHPRWKLKPKTPYRG,
 EAGVPYVIDRLIERFDELSTDPQPIALIGWSLGGFMAREVARERPNQVSQVITLGSVP,
 20 IGGPKYTLAASAFIRKYLDDWVEQVIAEREDRPITVPITAIVSQSDGIVGYSAIDHH,
 SPAVQHLHMDVAHLGFPYNTRVWSEIANALNSLEVEKERV;
 SEQ ID NO:15:
 ATGGAGCTCGCCAAGGTCACCGCCCTGATGAAGGCCACCGCCCTCGAGATCGCG,
 ATCCTCACCGGCCACCTCGTCCTTACCCCTCCGGGATCGTGGCCGAGCGCCTCG,
 25 CGGCCGCCCCCTCTTACCGTCCTCCCGTCCGCGGGGCCGACGGGGCCGACGTCC,
 GGTGCTCCTGCTGCACGGTTTCGTGGACAACCGCTCGGTCTTCGTCTGCTGCGC,
 CGTGCCCTCACCCGGAGCGGCCGTGACTGCGTCGAGTCGCTCAACTACTCGCCGC,
 TCACCTGCGACCTGCGGGCCGCGCCGAAGTCTGGGGCGCCGGGTGGACGAGA,
 TCCGCGCCCGGACCGGACACGCGGAGGTCGACATCGTCGGCCACAGCCTGGGCG,
 30 GGCTCATCGCCGTTATTACGTACAGCGTCTCGGCGGTGACAGCCGGGTGCGCAC,
 CCTGGTCATGCTCGGCACCCCGCACTCCGGCACCAACCGTGGCCCGGCTCGCCGAC,
 GCGCATCCGCTGGTGCGGCAGATGCGGCCGGGTTCCGAGGTGCTGCGGGAGCTC,
 GCCGCGCCCTCGCCGGCTGCCGTACCCGGTTCGTGAGCTTCTGGAGCGACCTC,
 GACCAGGTGATGGTGCCGGTGGACACGGCCTGCCTGGACCACCCCGACCTGCTG,
 35 GTGCACAACGTCCGGGTGAGCGGGATCGGTGATCTCGCGCTGCCGGTCCATCCCA,
 CGGTGGCGCGCGGGTCCGGGAGGCCCTCGACGCGAGCGGGCGGGGGTCCCGG,
 GGGTGCGGGAGGAGGGGGCCCGCGCCGGCGCGCGTGGCGTGA;
 SEQ ID NO:16 (кодується за допомогою SEQ ID NO:15):
 MELAKVTALMKATALEIAILTGHLLVLYPSGIVAERLAAAPSSPSSPSAGPTGRRPVVL,
 40 LHGFVDNRSVFLLRRALTRSGRDCVESLNYSPLTCDLRAAAELLGRRVDEIRARTG,
 HAEVDIVGHSLGGLIARYYVQRLGGDSRVRTLVM LGTPHSGTTVARLADAHPLVRQ,
 MRPGSEVLRELAAPSPGCRTRFVSFWSDLQVMVPVDTACLDHPDLLVHNVRVSGI,
 GHLALPVHPTVAAGVREALDASGAGVPGVREEGPGAGAVA;
 SEQ ID NO:17:
 45 GTGGCCGCCGCGGACAGCGGGACGGCGGAAGGGCAAAGGCTTCGGCCGCCGAG,
 CCTGTTCTGATGCTGGCCGAGGCGAGGGGCTTGCTCGAACTGAAGTTCGAGCCTG,
 TTGTTGTCGCCGCTGTTGTTGCGGGCGCCGAAGGGCGACGGACATCCGGTGCTGG,
 CGCTGCCGGGCTTTCTCGCCAGCGATCTGTGATGGCGCCGATGCGGCGCTATCT,
 GAAAGAACTCGGCTACGATGCCCATGCGTGGAACATGGGCCGCAATCTCGGCGG,
 50 CGTCGCGTCCAAGCGCGAAGCCTTGCGCGACCTGTTGCGGCGCATTTACAGCCAG,
 ACGGGCCGCAAGGTCAGCCTGGTGGGCTGGAGTCTCGGCGGCGTCTATGCGCGC,
 GATCTCGCTTTGCAGGCGCCCGACATGGTGCGTTCCGTGATCACGCTCGGCAGTC,
 CGTTTGCCAGCGACATCAGGGCGACCAACGCCACGCGGCTCTACGAGGCGCTGT,
 CGGGAGAAAGGTCGACGACAATCCGGAGTTAACAGCGGCGATCGCCGGCGACC,
 55 TGCCGGTGCCGGCGACCTCGATCTATTCCCGTACCGACGGTATCGTGAAGTGGCA,
 CACCAGCCTGCTGCGTCCTTCCGCAACGGCTGAAAACATCGAGGTTTACTTCGCC,
 AGCCATATCGGGCTCGGCGTCAACCCGGCAGCGCTGTGGGCGGTGGCCGACCGC,
 CTGGCGCAGCCCCGAGGGGGAATTTAAGCATTTTGACCGGTGGGTCCCTTTGCCA,
 TTGCCTATGGCCCCCCTGAAAATGCACAATCCTGA;
 60 SEQ ID NO:18 (кодується за допомогою SEQ ID NO:17):

MAAADSGTAEGQRLRPPSLFLMLAEARGLLELNSSLLLSPLLLRAPKGDGHPVLALP,
 GFLASDLSMAPMRRYLKELGYDAHAWNMGRNLGGVASKREALRDLLRRIYSQTGR,
 KVSLVGWSLGGVYARDLALQAPDMVRSVITLGSPFASDIRATNATRLYEALSGERV,
 DDNPETAIAIGDLPVPATSIYSRTDGINVWHTSLLRPSATAENIEVYFASHIGLVNP,
 AALWAVADRLAQPEGEFKHFDRSGPFIAIAYGPPENAQS;

SEQ ID NO:19:

ATGCCGGAGCGAAACGAAGCGCAGGCCCGCCGCGTCTTCGTCCGCCGGGGCTC,
 GGGCTGTTCTCCTCGCCGAAGCGCGGGGCATTTTCGAGCTCAACGCGAGCCTGTTGC,
 TGTCGCCGCTTCTGTTGCGCGCGCCGCGCGGCGACGGCCATCCGGTGCTGGCGTT,
 GCCGGGCTTTCTTGCCAGTGATCTATCGATGGCGCCGTTGCGCCGCTACCTCACC,
 GAGCTCGGCTACGACACCCACGCCTGGCGCATGGGCCGCAATGTCGGCGGCATC,
 GCGAAGATCGGGATCGCGCTGCTCGAGCGGCTCACGCAGATCCATGCCGAGTGC,
 GCGCGCAAGGTCTCGATTGTCGGCTGGAGTCTCGGCGGCGTCTATGCGCGCGACC,
 TCGCGTTGACAGGCGCCCGAGATGGTGCGCTACGTCGTACCCCTCGGCAGCCCTT,
 CGCCAGCGACGTCCGCGCCACCAATGCGACGCGGCTCTATGAGGCGATGTCGGG,
 CGAAACGGTCGGCGACAATGTCGACCTCGTGACGGCGATTGCCGGCGACCTGCC,
 GGTTCCTCGTGACCTCGATCTATTCGAAGAGCGACGGCATCGTGAAGTGGCGGACC,
 TGCCTGCTGCGCCCGTCCGCGACCGCCGAGAATATCGAGGTCTATTTGCGGAGCC,
 ATGTCGGCATCGGCGTCAATCCGGCCGCGCTGTGGGCGATCGCGGACCGGCTGG,
 CCCAGCGGGAAGGCGAATTCCGCCCTTCGACCGGTCCGGTCTTTGCCATTGC,
 CTACGCGCCCCCGGAACAGGCACAATCGATCTGA;

SEQ ID NO:20 (кодується за допомогою SEQ ID NO:19):

MPERNEAQAPPRLRPPGLGLFLAEARGIFELNASLLLSPLLLRAPRGDGHPLALPGF,
 LASDLSMAPLRRYLTELGYDTHAWRMGRNVGGIAKMRIALLERLTQIHAECGRKVS,
 IVGWSLGGVYARDLALQAPDMVRYVVTLGSPFASDVRATNATRLYEAMSGETVGD,
 NVDLVQAIAGDLPVPVTSIYSKSDGINVWRTCLLRPSATAENIEVYFASHVIGVNPA,
 ALWAIADRLAQREGFRRPFDRSGPFIAIAYAPPEQAQSI.

У даному документі надані способи виявлення нових послідовностей гідролаз, використовуючи нуклеїнові кислоти за винаходом. Також надані способи модифікації нуклеїнових кислот за винаходом, наприклад, за допомогою технологій GSSMSM і GeneReassemblySM. Нуклеїнові кислоти за винаходом можна одержати, виділити і/або маніпулювати ними за допомогою, наприклад, клонування й експресії бібліотек кДНК, ампліфікації транскрипту або геномної ДНК за допомогою ПЛР і т. п.

Вихідне джерело вибраних зразкових поліпептидів і нуклеїнових кислот:

SEQ ID NO:	Джерело
1, 2	Одержана зі зразка навколишнього середовища
3, 4	Одержана зі зразка навколишнього середовища
5, 6	Одержана зі зразка навколишнього середовища
7, 8	Одержана зі зразка навколишнього середовища
9, 10	Одержана зі зразка навколишнього середовища
11, 12	Одержана зі зразка навколишнього середовища
13, 14	Одержана зі зразка навколишнього середовища
15, 16	Бактерії
17, 18	Одержана зі зразка навколишнього середовища
19, 20	Одержана зі зразка навколишнього середовища

При практичному здійсненні способів за винаходом гомологічні гени можна модифікувати за допомогою маніпуляції матричної нуклеїнової кислоти, як описано в даному документі. Заявлений об'єкт винаходу можна здійснювати на практиці в сполученні з будь-яким способом або протоколом, або пристроєм, відомими в даній галузі, що добре описані в науковій і патентній літературі.

Основні способи

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані нуклеїнові кислоти, включаючи РНК, інтерферуючу РНК (наприклад, міРНК, мкРНК), антисмислову нуклеїнову кислоту, кДНК, геномну ДНК, вектори, віруси або їх гібриди, нуклеїнові кислоти, виділені з різних джерел, створені способами генної інженерії, ампліфіковані і/або експресовані/створені рекомбінантними способами. Рекомбінантні поліпептиди, створені з цих нуклеїнових кислот, можна індивідуально виділяти або клонувати і тестувати на бажану активність (наприклад, гідролазну, таку як, наприклад, ліпазна, сатуразна, пальмітазна і/або стеаратазна активність).

Можна використовувати будь-яку систему експресії рекомбінантних генів, включаючи системи експресії в клітинах бактерій, ссавців, дріжджів, грибів, комах або рослин.

Альтернативно, ці нуклеїнові кислоти можна синтезувати *in vitro* за допомогою добре відомих способів хімічного синтезу, наприклад, як описано в Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; патенти США № 4458066.

Способи маніпулювання нуклеїновими кислотами, такі як, наприклад, субклонування, мічення зондами (наприклад, мічення з випадковими праймерами з використанням полімерази Кленова, нік-трансляція, ампліфікація), секвенування, гібридизація і т. п., докладно описані в науковій і патентній літературі, див., наприклад, Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Іншими ефективними засобами одержання і маніпулювання нуклеїновими кислотами, використовуваними при практичному здійсненні способів за винаходом, є клонування з геномних зразків і, при бажанні, скринінг і повторне клонування вставлених фрагментів, виділених або ампліфікованих, наприклад, з геномних клонів або клонів кДНК. Джерела нуклеїнових кислот, використовувані в способах за винаходом, включають геномні бібліотеки або бібліотеки кДНК, що містяться, наприклад, у штучних хромосомах ссавців (MAC), див., наприклад, патенти США №№ 5721118; 6025155; штучних хромосомах людини, див., наприклад, Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15:333-335; штучних хромосомах дріжджів (YAC); штучних хромосомах бактерій (BAC); штучних хромосомах P1, див., наприклад, Woon (1998) Genomics 50:306-316; векторах, одержаних з P1 (PAC), див., наприклад, Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; космідах, рекомбінантних вірусів, фагах або плазмідах.

Фрази "нуклеїнова кислота" або "послідовність нуклеїнової кислоти" можуть включати олігонуклеотид, нуклеотид, полінуклеотид або будь-який їх фрагмент, ДНК або РНК (наприклад, мРНК, рРНК, тРНК, інтерферуючу РНК) геномного або синтетичного походження, що можуть бути одноланцюжковими або дволанцюжковими і можуть представляти смисловий або антисмисловий ланцюг, пептидну нуклеїнову кислоту (ПНК), або будь-яку ДНК-подібну або РНК-подібну речовину, природного або синтетичного походження, включаючи, наприклад, інтерферуючу РНК (дволанцюжкову "інтерферуючу" РНК), рибонуклеопротейди (наприклад, iRNP). Термін охоплює нуклеїнові кислоти, тобто, олігонуклеотиди, що містять відомі аналоги природних нуклеотидів. Термін також охоплює структури із синтетичними кістками, схожі на нуклеїнові кислоти, див., наприклад, Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36:8692-8698; Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156.

Як застосовують у даному документі, термін "промотори" включає всі послідовності, здатні керувати транскрипцією кодуючої послідовності у клітині, наприклад, клітині рослини. Таким чином, промотори, використовувані в конструкціях за винаходом, включають транскрипційні керуючі елементи, що діють у цис-положенні, і регуляторні послідовності, що беруть участь у регуляції або модуляції регулювання за часом і/або швидкості транскрипції гена. Наприклад, промотори можуть являти собою транскрипційний керуючий елемент, що діє в цис-положенні, включаючи енхансер, промотори, термінатор транскрипції, ділянку початку реплікації, послідовність інтеграції в хромосому, 5'- і 3'-нетрансльовані області або інтронні послідовності, що беруть участь у регуляції транскрипції. Ці послідовності, що діють у цис-положенні, як правило, взаємодіють з білками або іншими біологічними молекулами для здійснення (включення/виключення, регуляції, модуляції і т. д.) транскрипції. "Конститутивні" промотори являють собою промотори, що безупинно керують експресією в більшості станів навколишнього середовища і станів розвитку або диференціації клітин. "Індуцибельні" або "регульовані" промотори керують експресією нуклеїнової кислоти за винаходом, під впливом умов навколишнього середовища або умов розвитку. Приклади умов навколишнього середовища, що можуть впливати на транскрипцію за допомогою індукованих промоторів, включають анаеробні умови, підвищену температуру, низький вміст вологи або присутність світла.

"Тканиноспецифічні" промотори являють собою транскрипційні керуючі елементи, які активні тільки в частині клітин або тканин, або органів, наприклад, у рослинах або тваринах. Тканиноспецифічну регуляцію можна здійснювати за допомогою визначених внутрішніх

факторів, що забезпечують експресію генів, кодуючих білки, специфічні для даної тканини. Відомо, що, для того, щоб конкретній тканини надати можливість розвитку, у ссавців і рослин існують такі фактори.

Термін "рослина" включає цілі рослини, частини рослин (наприклад, листи, стебла, квітки, корені і т. д.), протопласти рослин, насіння і клітини рослин і їх потомство. Клас рослин, які можна використовувати в способі за винаходом, як правило, відповідає класу вищих рослин, сприйнятливих до способів трансформації, включаючи покритонасінні рослини (односім'ядольні і двосім'ядольні рослини), а також голонасінні рослини. Він включає рослини різної міри плоідності, включаючи поліплоїдні, диплоїдні, гаплоїдні і гемізиготні стани. Як застосовують у даному документі, термін "трансгенна рослина" включає рослини або клітини рослини, у які введена гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти, наприклад, нуклеїнові кислоти і різні рекомбінантні конструкції (наприклад, експресуючі касети) за винаходом.

В одному з аспектів збирають нуклеїнову кислоту, що кодує поліпептид за винаходом, у відповідній фазі і лідерну послідовність, що може керувати секрецією трансльованого поліпептиду або його фрагмента.

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані злиті білки і кодуючі їх нуклеїнові кислоти. Поліпептид за винаходом можна злити з гетерологічним пептидом або поліпептидом, таким як N-кінцеві сигнальні пептиди, які надають бажані характеристики, такі як збільшена стабільність або спрощене очищення. Пептиди і поліпептиди за винаходом також можна синтезувати і експресувати у вигляді злитих білків із приєднаним до них одним або декількома додатковими доменами, наприклад, для одержання більш імуногенного пептиду, для більш легкого виділення пептиду, синтезованого рекомбінантними способами, для ідентифікації і виділення антитіла і В-клітин, експресуючих антитіла, і т. п. Домени, що сприяють визначенню й очищенню, включають, наприклад, пептиди, хелатуючі метали, такі як полігістидинові тракти і гістидин-триптофанові модулі, що надають можливість очищення на іммобілізованих металах, домени білка А, що надають можливість очищення на іммобілізованому імуноглобуліні, і домени, що використовують у системі експресії/афінного очищення з FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). Включення послідовностей розщеплюваного лінкера, таких як розщеплювані послідовності фактора Ха або ентерокинази (Invitrogen, San Diego CA), між доменом очищення і мотив-вмісним пептидом або поліпептидом, може сприяти очищенню. Наприклад, експресуючий вектор може містити послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує епітоп, яка з'єднана із шістьма залишками гістидину, за яких іде тіоредоксин і сайт розщеплення ентерокинази (див., наприклад, Williams (1995) Biochemistry 34:1787-1797; Dobeli (1998) Protein Expr. Purif. 12:404-414). Залишки гістидину полегшують визначення й очищення, тоді як сайт розщеплення ентерокинази забезпечує засіб очищення епітопа від іншої частини злитого білка. Способи, що стосуються векторів, які кодують злиті білки, і застосування злитих білків добре описані в науковій і патентній літературі, див., наприклад, Kroll (1993) DNA Cell. Biol., 12:441-53.

Послідовності, що керують транскрипцією і трансляцією

В іншому варіанті здійснення в даному документі надані послідовності нуклеїнових кислот (наприклад, ДНК, іРНК), функціонально зв'язані послідовністю(ями), що керує експресією (наприклад, транскрипцією або трансляцією), наприклад, промотори або енхансери, для керування або модуляції синтезу РНК/експресії. Послідовність, що керує експресією, може являти собою експресуючий вектор. Зразкові бактеріальні промотори включають lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, PL і trp. Зразкові еукаріотичні промотори включають передранній промотор CMV, тимідинкіназу HSV, ранній і пізній SV40, LTR з ретровірусів і металотіонеїн миші.

Промотори, придатні для експресії поліпептиду в бактеріях, включають промотори E. coli lac або trp, lac промотор, промотор lacZ, промотор T3, промотор T7, промотор gpt, промотор lambda PR, промотор lambda PL, промотори з оперонів, кодуючі гліколітичні ферменти, такі як 3-фосфогліцераткіназа (PGK) і промотор кислої фосфатази. Еукаріотичні промотори включають передранній промотор CMV, промотор тимідинкінази HSV, промотори білків теплового шоку, ранні і пізні промотори SV40, LTR з ретровірусів і промотор металотіонеїну-I миші. Також можна використовувати інші промотори, про які відомо, що вони керують експресією генів у прокаріотичних або еукаріотичних клітинах або їх вірусах.

Тканиноспецифічні промотори рослин

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані експресуючі касети, які можна експресувати тканиноспецифічним чином, наприклад, які дозволяють експресувати гідролазу за винаходом, тканиноспецифічним чином. В іншому варіанті здійснення в даному документі надані рослини або насіння, що експресують гідролазу за винаходом, тканиноспецифічним чином. Тканиноспецифічність може являти собою специфічну дію в насінні, стеблах, листах, коренях, фруктах і т. п.

В одному з аспектів можна використовувати конститутивний промотор, такий як промотор CaMV 35S, для експресії в конкретних частинах або насінні або у всій рослині. Наприклад, для підвищеної експресії гідролази за винаходом можна використовувати фрагмент промотору рослини, який буде керувати експресією нуклеїнової кислоти в деяких або у всіх тканинах рослини, наприклад, регенеруючої рослини. Такі "конститутивні" промотори активні в більшості умов навколишнього середовища і станах розвитку або диференціації клітин. Приклади конститутивних промоторів включають ділянку ініціації транскрипції вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) 35S, 1'- або 2'-промотори, одержані з Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*, і інші відомі фахівцям ділянки ініціації транскрипції з різних генів рослин. Такі гени включають, наприклад, ACT11 з *Arabidopsis* (Huang (1996) *Plant Mol. Biol.* 33:125-139); Cat3 з *Arabidopsis* (GenBankNo. U43147, Zhong (1996) *Mol. Gen. Genet.* 251:196-203); ген, що кодує десатуразу білка-переносника стеароїл-ацилу з *Brassica napus* (Genbank No. X74782, Solocombe (1994) *Plant Physiol* 104:1167-1176); Gpc1 з маїсу (GenBank No. X15596; Martinez (1989) *J. Mol. Biol.* 208:551-565); Gpc2 з маїсу (GenBank No. U45855, Manjunath (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:97-112); промотори рослин, описані в у патентах США №№ 4962028; 5633440.

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані тканиноспецифічні або конститутивні промотори, одержані з вірусів, що можуть включати, наприклад, субгеномні промотори тобамовірусів (Kumagai (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1679-1683); паличкоподібний вірус рису тунгро (RTBV), що реплікується тільки в клітинах флоєми інфікованих рослин рису, промотори якого керують вираженою специфічною для флоєми експресією репортерного гена; промотор вірусу мозаїки жилок маніоки (CVMV), з найвищою активністю в елементах жилкування, у мезофільних клітинах листів і в кінчиках коренів (Verdaguer (1996) *Plant Mol. Biol.* 31:1129-1139).

Альтернативно, промотор рослини може керувати експресією експресуючої гідролазу нуклеїнової кислоти в конкретній тканині, органі або типі клітин (тобто, тканиноспецифічні промотори) або може іншим способом знаходитися під більш точним керуванням з боку навколишнього середовища або стану розвитку або знаходитися під керуванням індукованого промотору. Приклади умов навколишнього середовища, що можуть впливати на транскрипцію, включають анаеробні умови, підвищену температуру, присутність світла або обприскування хімічними речовинами/гормонами. В одному з варіантів здійснення в даному документі надані індуковані низьким вмістом води промотори маїсу (Busk (1997), вище); індуковані холодом, низьким вмістом води і високою солоністю промотори картоплі (Kirch (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:897 909).

Тканиноспецифічні промотори можуть сприяти транскрипції тільки в рамках визначеного часового інтервалу стадії розвитку в межах цієї тканини. Див., наприклад, Blazquez (1998) *Plant Cells* 10:791-800, характеристики промотору гена LEAFY з *Arabidopsis*. Також див. Cardon (1997) *Plant J* 12:367-77, опис фактора транскрипції SPL3, що розпізнає послідовність консервативного мотиву в ділянці промотору ідентифікуючого гена AP1 меристеми квіток *A. thaliana*; і Mandel (1995) *Plant Molecular Biology*, том 29, стор. 995-1004, опис промотору меристеми eIF4. Можна використовувати тканиноспецифічні промотори, які активні протягом всього життєвого циклу конкретної тканини. В одному з аспектів нуклеїнової кислоти за винаходом функціонально зв'язані з промотором, який активний, головним чином, тільки в клітинах бавовняного волокна. В одному з аспектів нуклеїнової кислоти за винаходом функціонально зв'язані з промотором, який активний, головним чином, у ході стадій подовження клітин бавовняного волокна, наприклад, як описано автором Rinehart (1996) вище. Нуклеїнові кислоти можуть бути функціонально зв'язані з промотором гена Fb12A, щоб експресувати переважно в клітинах бавовняного волокна (ibid). Також див. John (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5769-5773; John, et al., патенти США №№ 5608148 і 5602321, опис специфічних промоторів бавовняного волокна і способів конструювання трансгенних рослин бавовни. Для експресії нуклеїнових кислот за винаходом також можна використовувати специфічні промотори коренів. Приклади специфічних промоторів коренів включають промотор з гена алкогольдегідрогенази (DeLisle (1990) *Int. Rev. Cytol.* 123:39-60). Інші промотори, які можна використовувати для експресії нуклеїнових кислот за винаходом, включають, наприклад, специфічні промотори насінного зачатка, зародка, ендосперму, інтегументу, насінної оболонки або будь-яке їх сполучення; специфічний промотор листів (див., наприклад, Busk (1997) *Plant J.* 11:1285 1295, опис специфічного промотору листів у маїсі); промотор ORF13 з *Agrobacterium rhizogenes* (який виявляє високу активність у коренях, див., наприклад, Hansen (1997) вище); специфічний промотор пилка маїсу (див., наприклад, Guerrero (1990) *Mol. Gen. Genet.* 224:161 168); промотор томата, активний у процесі дозрівання плодів, зів'янення й опадання листів і, у меншій мірі, квіток, можна використовувати (див., наприклад, Blume (1997) *Plant J.* 12:731 746); специфічний промотор маточки з гена SK2

картоплі (див., наприклад, Ficker (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:425-431); ген *Blec4* гороху, який активний у епідермальній тканині верхівок вегетативних пагонів і квітконосних пагонів трансгенної люцерни, що робить його ефективним інструментом для націленої експресії чужорідних генів у епідермальному шарі активно зростаючих пагонів або волокон; специфічний ген *BEL1* насінного зачатка (див., наприклад, Reiser (1995) *Cell* 83:735-742, GenBankNo. U39944); і/або промотор у *Klee*, патент США № 5589583, опис промоторної ділянки рослини, що здатна забезпечити високі рівні транскрипції в меристематичній тканині і/або швидкий поділ клітин.

Альтернативно, промотори рослин, які можна індукувати під впливом гормонів рослин, таких як ауксини, використовують для експресії нуклеїнових кислот за винаходом. В одному з варіантів здійснення в даному документі надані промотори, що містять чутливі до ауксину елементи фрагмента промотору *E1* (*AuxREs*) у соєвих бобах (*Glycine max* L.) (Liu (1997) *Plant Physiol.* 115:397-407); чутливий до ауксину промотор *GST6* з *Arabidopsis* (також чутливий до саліцилової кислоти і пероксиду водню) (Chen (1996) *Plant J.* 10: 955-966); індукований ауксином промотор *parC* з тютюну (Sakai (1996) 37:906-913); чутливий до біотину елемент рослин (Streit (1997) *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:933-937); і промотор, чутливий до гормону стресу абсцизинової кислоти (Sheen (1996) *Science* 274:1900-1902).

Нуклеїнові кислоти за винаходом також можуть бути функціонально зв'язані з промоторами рослин, які можна індукувати впливом хімічних речовин, які можна наносити на рослину, таких як гербіциди або антибіотики. Наприклад, можна використовувати промотор маїсу *In2-2*, активований антидотами бензолсульфонамідних гербіцидів (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38:568-577); застосування різних антидотів гербіцидів індукує чітко виражені профілі генної експресії, включаючи експресію в коренях, гідратодах і апікальній меристемі пагонів. Кодуючі послідовності можуть знаходитися під керуванням, наприклад, індукованого тетрацикліном промотору, наприклад, як описано для трансгенних рослин тютюну, що містять ген аргініндекарбоксилази *Avena sativa* L. (овес) (Masgrau (1997) *Plant J.* 11:465-473); або елемента, чутливого до саліцилової кислоти (Stange (1997) *Plant J.* 11:1315-1324). Використовуючи індуковані хімічними речовинами (наприклад, гормонами або пестицидами) промотори, тобто, промотори, чутливі до хімічних речовин, які можна наносити на трансгенну рослину на полі, на конкретній стадії розвитку рослини можна індукувати експресію поліпептиду за винаходом. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані трансгенні рослини, що містять індукцибельний ген, який кодує поліпептиди за винаходом, коло організмів-хазяїнів для якого обмежений цільовими видами рослин, такими як кукурудза, рис, ячмінь, пшениця, картопля й інші сільськогосподарські культури, які можна індукувати на будь-якій стадії їх розвитку.

Тканиноспецифічні промотори рослин можуть керувати експресією функціонально зв'язаних послідовностей у тканинах, що відрізняються від цільової тканини. Таким чином, тканиноспецифічний промотор являє собою промотор, який керує експресією переважно в цільовій тканині або типі клітин, а також може вести до деякої експресії в інших тканинах.

Нуклеїнові кислоти за винаходом також можуть бути функціонально зв'язані з промоторами рослин, які можна індукувати впливом хімічних речовин. Ці речовини включають, наприклад, гербіциди, синтетичні ауксини або антибіотики, які можна наносити, наприклад, розпиляти, на трансгенні рослини. Індукована експресія нуклеїнових кислот для одержання гідролаз за винаходом дозволяє рослиннику відбирати рослини з оптимальним співвідношенням крохмаль:цукор. Таким чином, можна контролювати розвиток частин рослини.

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані засоби для полегшення збирання рослин або частин рослин. Наприклад, у різних варіантах здійснення використовують промотор маїсу *In2-2*, активований антидотами бензолсульфонамідних гербіцидів (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38:568-577); нанесення різних антидотів гербіцидів індукує чітко виражені профілі генної експресії, включаючи експресію в коренях, гідратодах і апікальній меристемі пагонів. Кодуючі послідовності за винаходом також знаходяться під керуванням індукованого тетрацикліном промотору, наприклад, як описано для трансгенних рослин тютюну, що містять ген аргініндекарбоксилази *Avena sativa* L. (овес) (Masgrau (1997) *Plant J.* 11:465-473); або елемента, чутливого до саліцилової кислоти (Stange (1997) *Plant J.* 11:1315-1324).

При бажанні домогтися правильної експресії поліпептиду в 3'-кінець кодуючої ділянки варто включати ділянку поліаденілювання. Ділянку поліаденілювання можна одержати з природного гена, з множини інших генів рослин або з генів у Т-ДНК із *Agrobacterium*.

Експресуючі вектори і переносники для клонування

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані експресуючі вектори, експресуючі касети і переносники для клонування, що містять нуклеїнові кислоти, наприклад, послідовності, що кодують гідролази й антитіла. Експресуючі вектори і переносники для

клонування за винаходом можуть включати вірусні частинки, бакуловіруси, фаги, плазмідні, фагемідні, косміди, фосміди, штучні хромосоми бактерій, вірусну ДНК (наприклад, коров'ячої віспи, аденовірусу, вірусу віспи курей, вірусу псевдосказу і похідних SV40), штучні хромосоми на основі Р1, плазмідні дріжджів, штучні хромосоми дріжджів і будь-які інші вектори, що мають специфічність до конкретних хазяїнів, що представляють інтерес (такі як бакуловіруси, *Aspergillus* і дріжджі). Вектори за винаходом, можуть включати хромосомні, нехромосомні і синтетичні послідовності ДНК. Фахівцям у даній галузі відома велика кількість придатних і комерційно доступних векторів. Зразкові вектори включають: бактеріальні: вектори pQE (Qiagen), плазмідні pBLUESCRIPT™, вектори pNH, (вектори lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); еукаріотичні: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Однак будь-яку іншу плазмідну або інший вектор можна використовувати, за умови, що вони піддаються реплікації і зберігають життєздатність в організмі-хазяїні. Можна використовувати низькокопійні або висококопійні вектори.

В одному з варіантів здійснення "експресуюча касета" за винаходом містить нуклеотидну послідовність, яка дозволяє здійснювати експресію структурного гена (тобто, послідовності, що кодує білок, такий як гідролаза за винаходом) в організмі-хазяїні, сумісному з такими послідовностями. Експресуючі касети включають щонайменше промотори, функціонально зв'язані з послідовністю, що кодує поліпептид; і, необов'язково, з іншими послідовностями, наприклад, сигналами термінації транскрипції. Також можна використовувати додаткові фактори, необхідні або корисні для здійснення експресії, наприклад, енхансери. "Функціонально зв'язаний", як застосовують у даному документі, стосується приєднання промотору, розташованого в напрямку зчитування вище послідовності ДНК так, що промотор опосередковує транскрипцію послідовності ДНК. Таким чином, експресуючі касети також включають плазмідні, експресуючі вектори, рекомбінантні віруси, будь-які форми рекомбінантних векторів з "оголеної ДНК" і т. п. "Вектор" включає нуклеїнову кислоту, за допомогою якої можна здійснювати інфекцію, трансфекцію, транзиторну або постійну трансдукцію клітини. Потрібно визнати, що вектор може являти собою оголену нуклеїнову кислоту або нуклеїнову кислоту в комплексі з білком або ліпідом. Вектор необов'язково містить вірусні або бактеріальні нуклеїнові кислоти і/або білки, і/або мембрани (наприклад, клітинну мембрану, ліпідну оболонку вірусу і т. д.). Як необмежувальні приклади вектори включають реплікони (наприклад, реплікони РНК, бактеріофаги), до яких можна приєднати фрагменти ДНК і реплікувати їх. Таким чином, вектори включають як необмежувальні приклади РНК, автономну саморепліковну кільцеву або лінійну ДНК або РНК (наприклад, плазмідні, віруси і т. п., див., наприклад, патент США № 5217879) і включають як експресуючі, так і неекспресуючі плазмідні. Коли як організм-хазяїн для "експресуючого вектора" описують рекомбінантний мікроорганізм або клітинну культуру, це включає позахромосомну кільцеву і лінійну ДНК і ДНК, вбудовану в хромосому(и) організму-хазяїна. Коли вектор взаємодіє з клітиною-хазяїном, може відбуватися або стабільна реплікація вектора клітинами в процесі мітозу як автономна структура, або вбудовування в геном організму-хазяїна.

Експресуючий вектор може містити промотори, ділянку зв'язування рибосоми для ініціації трансляції і термінатор транскрипції. Вектор також може включати відповідні послідовності для посилення експресії. Експресуючі вектори ссавців можуть містити ділянку початку реплікації, будь-які необхідні ділянки зв'язування рибосом, ділянку поліаденілювання, донорні й акцепторні ділянки сплайсованих фрагментів, послідовності термінації транскрипції і 5'-фланкуючі нетранскрибовані послідовності. У деяких аспектах для надання необхідних нетранскрибованих генетичних елементів можна використовувати послідовності ДНК, одержані зі сплайсованого фрагмента SV40, і ділянки поліаденілювання.

В одному з аспектів експресуючі вектори містять один або декілька генів селективних маркерів, щоб надати можливість відбору клітин-хазяїнів, що містять вектор. Такі селективні маркери включають гени, що кодує дигідрофолатредуктазу, або гени, що забезпечують стійкість культури еукаріотичних клітин до неомицину, гени, що забезпечують стійкість *E. coli* до тетрацикліну або ампіциліну, і ген TRP1 *S. cerevisiae*. Промоторні ділянки можна вибрати з будь-якого бажаного гена, використовуючи вектори, що містять ген хлорамфеніколтрансферази (ХАТ), або інші вектори, що містять селективні маркери.

Вектори для експресії поліпептиду або його фрагмента в еукаріотичних клітинах також можуть містити енхансери для підвищення рівнів експресії. Енхансери являють собою елементи ДНК, що діють у цис-положенні, довжиною звичайно приблизно від 10 до 300 п. о., які діють на промотор для збільшення його транскрипції. Приклади включають енхансер SV40, розташований від 100 до 270 п. о. на пізньому краї точки початку реплікації, енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер вірусу поліоми на пізньому краї точки початку реплікації

і енхансери аденовірусу.

Послідовність ДНК можна вбудувати у вектор за допомогою різних процедур. В основному, послідовність ДНК лігують у бажаному положенні у векторі після розщеплення вставки і вектора відповідними рестрикційними ендонуклеазами. Альтернативно, можна лігувати тупі кінці, як у вставці, так і у векторі. У даній галузі відома множина способів клонування, наприклад, як описано в Ausubel and Sambrook. Передбачається, що такі й інші процедури входять у можливості фахівців у даній галузі.

Вектор може бути представлений у формі плазміди, вірусної частинки або фага. Інші вектори включають хромосомні, нехромосомні і синтетичні послідовності ДНК, похідні SV40; бактеріальні плазміди, ДНК фагів, бакуловірус, плазміди дріжджів, вектори, одержані сполученням ДНК плазмід і фагів, ДНК вірусів, таких як вірус коров'ячої віспи, аденовірус, вірус віспи курей і вірус псевдосказу. Різні клонуючі і експресуючі вектори для використання в прокаріотичних і еукаріотичних організмах-хазяїнах описані, наприклад, автором Sambrook.

Конкретні бактеріальні вектори, які можна використовувати, включають комерційно доступні плазміди, що містять генетичні елементи добре відомих клонуючих векторів pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), GEM1™ (Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pDIO, psiX174 Pbluescript II KS™, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, DR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 і pCM7. Конкретні еукаріотичні вектори включають pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG і pSVL (Pharmacia). Однак можна використовувати будь-який інший вектор, за умови, що він піддається реплікації і залишається життєздатним у клітині-хазяїні.

Нуклеїнові кислоти за винаходом можна експресувати у експресуючих касетах, векторах або вірусах і можна експресувати транзиторно або постійно в клітинах рослин і насінні. У зразковій системі транзиторної експресії використовують системи епісомальної експресії, наприклад, вірусну РНК вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), створену в ядрі шляхом транскрипції епісомальної міні-хромосоми, що містить суперскручену ДНК, див., наприклад, Covey (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1633-1637. Альтернативно, в геном рослинної клітини-хазяїна можна вводити кодуєчі послідовності, тобто, цілі послідовності або їх підфрагменти за винаходом, що стають складовим елементом хромосомної ДНК організму-хазяїна. Таким чином можна експресувати смислові або антисмислові транскрипти. Вектор, що містить послідовності (наприклад, промоторні або кодуєчі ділянки) з нуклеїнових кислот за винаходом, може містити маркерний ген, який обумовлює фенотип клітини рослини або насіння, що піддається відбору. Наприклад, маркер може кодувати стійкість до біоциду, конкретно стійкість до антибіотика, таку як стійкість до канаміцину, G418, блеоміцину, гігromіцину, або стійкість до гербіциду, таку як стійкість до хлорсульфурону або до Basta.

Експресуючі вектори, що дозволяють експресувати нуклеїнові кислоти і білки в рослинах, добре відомі в даній галузі і можуть включати, наприклад, вектори з *Agrobacterium* spp., вірусу картоплі (див., наприклад, Angell (1997) EMBO J. 16:3675-3684), вірусу тютюнової мозаїки (див., наприклад, Casper (1996) Gene 173:69-73), вірусу кущистої карликовості томатів (див., наприклад, Hillman (1989) Virology 169:42-50), вірусу гравірування тютюну (див., наприклад, Dolja (1997) Virology 234:243-252), вірусу золотавої мозаїки бобів (див., наприклад, Morinaga (1993) Microbiol Immunol. 37:471-476), вірусу мозаїки цвітної капусти (див., наприклад, Cecchini (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:1094-1101), мобільного генетичного елемента Ac/Ds маїсу (див., наприклад, Rubin (1997) Mol. Cell. Biol. 17:6294-6302; Kunze (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204:161-194), і мобільного генетичного елемента супресора-мутатора маїсу (Spm) (див., наприклад, Schlappi (1996) Plant Mol. Biol. 32:717-725); і їх похідних.

В одному з аспектів експресуючий вектор може містити дві системи реплікації, щоб надати можливість його взаємодії з двома організмами, наприклад, для експресії в клітинах ссавця, дріжджів, грибів, комах, і для клонування й ампліфікації в прокаріотичному організмі-хазяїні. Крім того, для інтеграції експресуючих векторів, експресуючий вектор може містити щонайменше одну послідовність, гомологічну геному клітини-хазяїна. Він може містити дві гомологічні послідовності, які фланкують експресовану конструкцію. Інтегруючий вектор може бути націлений на конкретний локус у клітині-хазяїні шляхом вибору відповідної гомологічної послідовності для включення у вектор. Конструкції інтегруючих векторів добре відомі в даній галузі.

Експресуючі вектори за винаходом також можуть включати ген селективного маркера, щоб надати можливість відбору бактеріальних штамів, які пройшли трансформацію, наприклад, гени, що роблять бактерії стійкими до лікарських засобів, таких як ампіцилін, хлорамфенікол, еритроміцин, канаміцин, неоміцин і тетрациклін. Селективні маркери також можуть включати

гени, що відповідають за біосинтез, такі як гени шляхів біосинтезу гістидину, триптофану і лейцину.

Клітини-хазяїни і трансформовані клітини

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані трансформовані клітини, що містять послідовність нуклеїнової кислоти, наприклад, послідовність, що кодує гідролазу або антитіло, або вектор за винаходом. Клітка-хазяїн може являти собою будь-яку клітину-хазяїна, відому фахівцям у даній галузі, включаючи прокаріотичні клітини, еукаріотичні клітини, такі як бактеріальні клітини, клітини грибів, клітини дріжджів, клітини ссавців, клітини комах або клітини рослин.

Ферменти за винаходом можна експресувати у будь-якій клітині-хазяїні, наприклад, будь-якій бактеріальній клітині, будь-якій клітині дріжджів, будь-яких *Saccharomyces* або *Schizosaccharomyces* spp., будь-яких *Pichia* spp., наприклад, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* або *Schizosaccharomyces pombe*. Зразкові бактеріальні клітини включають будь-які *Streptomyces* або *Bacillus* spp., наприклад, *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* або будь-які види в межах родів *Bacillus*, *Streptomyces* і *Staphylococcus*. Зразкові клітини комах включають *Drosophila* S2 і *Spodoptera* Sf9. Зразкові клітини тварин включають лінії клітин CHO, COS або меланоми Боуеса, або будь-які лінії клітин миші або людини. Фахівці в даній галузі здатні вибрати придатний організм-хазяїн. Способи трансформації широкого спектра видів вищих рослин добре відомі й описані в технічній і науковій літературі. Див., наприклад, Weising (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477, патент США № 5750870.

Вектор можна ввести в клітини-хазяїни, використовуючи будь-який з множини способів, включаючи трансформацію, трансфекцію, трансдукцію, вірусну інфекцію, генну гармату або Ті-опосередковане перенесення генів. Конкретні способи включають трансфекцію з фосфатом кальцію, опосередковану ДЕАЕ-декстраном трансфекцію, ліпофекцію або електропорацію (Davis L., Dibner M., Battey I., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)).

Коли це доцільно, сконструйовані клітини-хазяїни можна культивувати в стандартних живильних середовищах, модифікованих відповідним чином для активації промоторів, відбору трансформованих клітин або ампліфікації генів за винаходом. Після трансформації придатного штаму-хазяїна і росту штаму-хазяїна до придатної густини клітин, вибраний промотор можна індукувати відповідним засобом (наприклад, зсувом температури або хімічною індукцією) і клітини можна культивувати протягом додаткового періоду, щоб дозволити їм синтезувати бажаний поліпептид або його фрагмент.

В одному з аспектів нуклеїнові кислоти або вектори за винаходом вводять у клітини для скринінгу, тим самим нуклеїнові кислоти потрапляють у клітини таким способом, який придатний для наступної експресії нуклеїнової кислоти. Спосіб введення у великій мірі обумовлений цільовим типом клітин. Зразкові способи включають преципітацію з CaPO_4 , злиття ліпосом, ліпофекцію (наприклад, LIPOFECTIN™), електропорацію, вірусну інфекцію і т. д. Придатні нуклеїнові кислоти можна стабільно інтегрувати в геном клітини-хазяїна (наприклад, використовуючи ретровірусне введення) або вони можуть знаходитися, або тимчасово, або постійно, в цитоплазмі (тобто, шляхом використання традиційних плазмід, використовуючи стандартні регуляторні послідовності, маркери селекції і т. д.). Альтернативні варіанти здійснення містять ретровірусні вектори, що дозволяють здійснювати трансфекцію таких мішеней (наприклад, клітин ссавців, людини) оскільки, наприклад, для багатьох фармацевтично важливих тестів необхідні мішені людини або модельні клітинні мішені ссавців.

Клітини можна збирати за допомогою центрифугування, руйнувати фізичними або хімічними засобами й одержаний неочищений екстракт зберігати для подальшого очищення. Клітини мікробів, використовуваних для експресії білків, можна руйнувати будь-яким придатним способом, включаючи цикл замерзання-відтавання, руйнування ультразвуком, механічне руйнування або використання засобів для лізису клітин. Такі способи добре відомі фахівцям у даній галузі. Експресований поліпептид або його фрагмент можна збирати й очищати від культури рекомбінантних клітин способами, які включають преципітацію сульфатом амонію або еанолом, екстрагування кислотою, аніоно- або катіонообмінну хроматографію, хроматографію на фосфоцелюлозі, хроматографію гідрофобної взаємодії, афінну хроматографію, хроматографію на гідроксіпатиті і хроматографію на лектині. У завершенні конфігурації поліпептиду в міру необхідності можна використовувати стадії повторного укладання білка. При бажанні, можна використовувати високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) на кінцевих стадіях очищення.

Для експресії рекомбінантного білка також можна використовувати різні системи культивування клітин ссавців. Приклади систем експресії клітин ссавців включають лінії COS-7

фібробластів нирки мавпи й інших клітинних ліній, що дозволяють експресувати білки із сумісного вектора, такі як клітинні лінії C127, 3T3, CHO, HeLa і ВНК.

Конструкції в клітинах-хазяїнах можна використовувати стандартним чином для одержання продукту гена, кодованого рекомбінантною послідовністю. Залежно від організму-хазяїна, використовуюваного в процедурі одержання рекомбінанту, поліпептиди, одержані за допомогою клітин-хазяїнів, що містять вектор, можуть бути глікозилованими або неглікозилованими. Поліпептиди за винаходом також можуть містити або не містити початковий амінокислотний залишок метіоніну.

Для одержання поліпептиду за винаходом також можна використовувати безклітинні системи трансляції. Безклітинні системи трансляції можуть використовувати мРНК, транскрибовану з ДНК-конструкції, що містить промотори, функціонально зв'язані з нуклеїною кислотою, яка кодує поліпептид або його фрагмент. У деяких аспектах, ДНК-конструкцію можна перевести в лінійну форму перед проведенням реакції транскрипції *in vitro*. Потім транскрибовану мРНК інкубують із придатним безклітинним екстрактом для трансляції, таким як екстракт ретикулоцитів кролика, для одержання бажаного поліпептиду або його фрагмента.

Експресуючі вектори можуть містити один або декілька генів селективних маркерів для надання фенотипічної ознаки для відбору трансформованих клітин-хазяїнів, таких як дигідрофолатредуктаза або стійкість до неоміцину для культури еукаріотичних клітин або такі як стійкість до тетрацикліну або ампіциліну в *E. coli*.

Ампліфікація нуклеїнових кислот

В іншому варіанті здійснення нуклеїнові кислоти за винаходом, кодуєчі поліпептиди, або модифіковані нуклеїнові кислоти можна відтворювати, наприклад, за допомогою ампліфікації. В одному з варіантів здійснення в даному документі надані пари праймерів для ампліфікації нуклеїнових кислот, кодуєчих гідролазу, наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу, де пари праймерів дозволяють ампліфікувати послідовності нуклеїнових кислот за винаходом. Професіонал у даній галузі може сконструювати пари послідовностей праймерів для ампліфікації для повнорозмірних послідовностей або будь-яких їх частин.

Т також можна використовувати реакції ампліфікації для визначення кількості нуклеїнової кислоти в зразку (наприклад, кількість транскрипту в зразку клітин), мічення нуклеїнової кислоти (наприклад, для використання їх у чіпах або блотингу), визначення нуклеїнової кислоти або визначення кількості конкретної нуклеїнової кислоти в зразку. В одному з аспектів за винаходом, ампліфікують транскрипт, виділений з клітини або бібліотеки кДНК. Фахівець у даній галузі може вибрати і сконструювати придатні олігонуклеотидні праймери для ампліфікації. Способи ампліфікації також добре відомі в даній галузі і включають, наприклад, полімеразну ланцюгову реакцію, ПЛР (див., наприклад, PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) і PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y.), лігазну ланцюгову реакцію (ЛЛР) (див., наприклад, Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117); ампліфікацію транскрипцією (див., наприклад, Kwok (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173); і самопідтримувану реплікацію послідовностей (див., наприклад, Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874); ампліфікацію репліказою Q-β (див., наприклад, Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491), автоматизований аналіз ампліфікації репліказою Q-β (див., наприклад, Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271) і інші способи, опосередковані РНК-полімеразою (наприклад, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); також див. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; патенти США №№ 4683195 і 4683202; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564.

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані пари праймерів для ампліфікації, що містять послідовності за винаходом, наприклад, де пара праймерів містить перший член, що містить послідовність, як зазначено, приблизно з перших (5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 або 40, або більше залишків нуклеїнової кислоти за винаходом, і другий член, що містить послідовність, як зазначено, приблизно з перших (5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 або 40, або більше залишків комплементарної нитки першого члена.

Визначення міри ідентичності послідовностей

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані нуклеїнові кислоти, що містять щонайменше нуклеїнову кислоту або послідовність, повністю (100%) ідентичну нуклеїновій кислоті за винаходом, наприклад, зразковій нуклеїновій кислоті за винаходом (наприклад, що містить послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22 або SEQ ID NO:23, або SEQ ID NO:1, модифіковану для того, щоб кодувати заміни

одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми або більше (декількох), або всіх основ, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або їх еквіваленти); і поліпептиди, що мають щонайменше 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69 %, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більше, або повну (100%) ідентичність послідовностей з поліпептидом за винаходом, наприклад, зі зразковим поліпептидом, що містить послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:20, або SEQ ID NO:2, що містить заміни однієї, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми або більше (декількох), або всіх амінокислот, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або їх еквіваленти. В альтернативних аспектах послідовностей можуть бути ідентичні на ділянці довжиною щонайменше приблизно 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 або більше послідовних залишків або з повнорозмірну нуклеїнову кислоту, або поліпептид. Міру ідентичності (гомології) послідовностей можна визначити, використовуючи будь-яку комп'ютерну програму і пов'язані параметри, включаючи ті, що описано в даному документі, таку як BLAST 2.2.2. або FASTA версії 3.0t78, з параметрами за замовчуванням. Як застосовують у даному документі, терміни "комп'ютер", "комп'ютерна програма" і "процесор" використовують у їх найбільш широкому загальному розумінні і вони включають усі такі пристрої, як докладно описано нижче.

Нижче в таблиці описані вибрані характеристики зразкових нуклеїнових кислот і поліпептидів за винаходом, включаючи порівняння ідентичності послідовностей для зразкових послідовностей із загальнодоступними базами даних для встановлення активності ферментів за винаходом, за допомогою аналізу гомології (ідентичності послідовностей). Усі послідовності, описані в таблиці (усі зразкові послідовності за винаходом), піддавали пошуку за допомогою BLAST (докладно описаний нижче) у двох наборах баз даних. Перший набір баз даних доступний через NCBI (National Center for Biotechnology Information). Усі результати пошуку в цих базах даних у колонках, названих "НН опис", "НН код доступу", "НН очікуване значення" або "НН організм". "НН" стосується ненадміроної бази даних про нуклеотиди, що підтримується NCBI. Ця база даних являє собою комбінацію GenBank, оновлень GenBank і оновлень EMBL. Записи в колонці "НН опис" стосуються рядка з визначенням у будь-якому заданому записі NCBI, що містить опис послідовності, наприклад, організм-джерело, назву гена/назву білка або деякий опис функції послідовності - таким чином встановлюють активність перерахованих зразкових ферментів за винаходом, за допомогою аналізу гомології (ідентичності послідовностей). Записи в колонці "НН код доступу" стосуються унікального ідентифікатора, наданого запису послідовності. Записи в колонці "НН очікуване значення" стосуються очікуваного значення, яке представляє імовірність того, що оцінка вирівнювання дорівнює оцінці вирівнювання послідовності запиту (послідовності за винаходом) і послідовності з бази даних, що буде обчислена при тій же кількості порівнянь між випадковими послідовностями, яка виконана в даному пошуку за допомогою BLAST. Записи в колонці "НН організм" стосуються організму-джерела послідовності, ідентифікованої як найближчий збіг BLAST (гомологія послідовностей). Другий набір баз даних у сукупності відомий як база даних GENESEQ™, що доступна через Thomson Derwent (Philadelphia, PA). Усі результати пошуку в цій базі даних у колонках, названих "GENESEQ™ опис білка", "GENESEQ™ код доступу білка", "GENESEQ™ очікуване значення білка", "GENESEQ™ опис ДНК", "GENESEQ™ код доступу ДНК" або "GENESEQ™ очікуване значення ДНК". Відомості в цих колонках порівнянні з інформацією, знайденою в колонках НН, описаних вище, за винятком того, що одержали з пошуку за допомогою BLAST у базі даних GENESEQ™ замість баз даних NCBI. Колонки "Довжина ДНК-запиту" і "Довжина білкового запиту" стосуються числа нуклеотидів або числа амінокислот, відповідно, у послідовності за винаходом, яку шукали або за допомогою якої виконували запит у базі даних NCBI або GENESEQ™. Колонки "Довжина ДНК GENESEQ™ або НН" і "Довжина білка GENESEQ™ або НН" стосуються числа нуклеотидів або числа амінокислот, відповідно, у послідовності найкращого збігу в пошуку за допомогою BLAST. Результати, надані в цих колонках, з пошуку, що повернув найменше очікуване значення, у базах даних NCBI або базі даних GENESEQ. Колонки "GENESEQ™/НН %ID білка" і "GENESEQ™/НН %ID ДНК" стосуються процента ідентичності послідовностей між послідовністю за винаходом і послідовністю найкращого збігу BLAST. Результати, представлені в цих колонках, з пошуку, що повернув найменше очікуване значення, у базах даних NCBI або базі даних GENESEQ™.

SEQ ID NO:	НН опис	НН код доступу	НН очікуване значення	НН організм	Geneseq опис білка	Geneseq код доступу білка	Geneseq очікуване значення білка	Geneseq опис ДНК	Geneseq код доступу ДНК	Geneseq очікуване значення ДНК
1, 2	гіпотетичний білок Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	7,00E-40	Sphingopyxis alaskensis RB2256	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64879	1,00E-127	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64878	0
3, 4	гіпотетичний білок Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	2,00E-40	Sphingopyxis alaskensis RB2256	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64879	3,00E-39	Білок, кодований важливим геном прокариот № 30232	ACA26233	1,8
5, 6	гіпотетичний білок Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	8,00E-42	Sphingopyxis alaskensis RB2256	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64879	3,00E-39	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64878	0,53
7, 8	гіпотетичний білок Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	1,00E-46	Sphingopyxis alaskensis RB2256	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64879	7,00E-44	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64878	1,00E-04

9, 10	гіпотетичний білок Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	3,00E-51	Sphingopyxis alaskensis RB2256	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64879	2,00E-42	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64878	1,00E-07
11, 12	гіпотетичний білок SKA58_17128 [Sphingomonas sp. SKA58] gi 94422701 gb EAT07736.1 гіпотетичний білок SKA58_17128 [Sphingomonas sp. SKA58]	94497812	4,00E-46	Sphingomonas sp. SKA58	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64879	3,00E-42	діагностичний і терапевтичний білок людини SEQ ID NO:2739	ACN41328	1,6
13, 14	гіпотетичний білок PPSIR1_24779 [Plesiocystis pacifica SIR-1] gi 149817999 gb EDM77458.1 гіпотетичний білок PPSIR1_24779 [Plesiocystis pacifica SIR-1]	149921112	3,00E-32	Plesiocystis pacifica SIR-1	білок, що має гідролазну активність, SEQ ID NO:2	AOG53993	1,00E-155	білок, що має гідролазну активність, SEQ ID NO:2	AOG53992	0
15, 16	ліпаза [Streptomyces avermitilis MA-4680] gi 29607114 dbj BAC71173.1 передбачувана ліпаза [Streptomyces avermitilis MA-4680]	29830004	1,00E-100	Streptomyces avermitilis MA-4680	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64645	5,00E-21	послідовність білка M. xanthus, SEQ ID NO:9726	ACL64205	0,003
17, 18	гіпотетичний білок blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA110] gi 27351136 dbj BAC48144.1 blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA110]	27377990	1,00E-115	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	білок мікобактеріального антигену Mycobacterium tuberculosis SEQ ID NO:5	ABM15916	8,00E-48	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64878	1,00E-05
19, 20	гіпотетичний білок blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA110] gi 27351136 dbj BAC48144.1 blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA110]	27377990	1,00E-118	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	білок мікобактеріального антигену Mycobacterium tuberculosis SEQ ID NO:5	ABM15916	1,00E-44	пептид SEQ ID NO:2, що виявляє гідролазну активність	AQZ64878	2,00E-04

SEQ ID NO:	HH опис	Довжина ДНК-запиту	Довжина білкового запиту	Довжина ДНК GENESEQ/HH	Довжина білка GENESEQ/HH	GENESEQ/HH %ID білка	GENESEQ/HH %ID ДНК
1, 2	гіпотетичний білок Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	684	227	684	227		
3, 4	гіпотетичний білок Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	633	210	0	249	47	
5, 6	гіпотетичний білок Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	711	236	0	249	42	
7, 8	гіпотетичний білок Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	669	222	0	249	46	
9, 10	гіпотетичний білок Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 консервативний гіпотетичний білок [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	669	222	0	249	48	
11, 12	гіпотетичний білок SKA58_17128 [Sphingomonas sp. SKA58] gi 94422701 gb EAT07736.1 гіпотетичний білок SKA58 17128 [Sphingomonas sp. SKA58]	570	189	0	298	46	

13, 14	гіпотетичний білок PPSIR1_24779 [Plesiocystis pacifica SIR-1] gi 149817999 gb EDM77458.1 гіпотетичний білок PPSIR1_24779 [Plesiocystis pacifica SIR-1]	807	268	807	268		
15, 16	ліпаза [Streptomyces avermitilis MA-4680] gi 29607114 dbj BAC71173.1 передбачувана ліпаза [Streptomyces avermitilis MA-4680]	804	267	0	286	69	
17, 18	гіпотетичний білок blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110] gi 27351136 dbj BAC48144.1 blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	798	265	0	266	79	
19, 20	гіпотетичний білок blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110] gi 27351136 dbj BAC48144.1 blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	798	265	0	266	79	

Гомологічні послідовності також містять послідовності РНК, у яких уридин заміщає тимін у послідовностях нуклеїнових кислот. Гомологічні послідовності можна одержати, використовуючи будь-які процедури, описані в даному документі, або вони можуть бути результатом виправлення помилки секвенування. Потрібно брати до уваги, що послідовності нуклеїнових кислот, як зазначено в даному документі, можна представляти в традиційному однобуквену форматі (див., наприклад, Stryer, Lubert. Biochemistry, 3rd Ed., W. H Freeman & Co., New York) або в будь-якому іншому форматі, який дозволяє записувати ідентичність нуклеотидів у послідовності.

Для порівняння послідовностей можна використовувати різні програми порівняння послідовностей, зазначені в даному документі і відомі фахівцю в даній галузі. Ідентичність (гомологію) послідовності білка і/або нуклеїнової кислоти можна оцінити, використовуючи будь-які з множини алгоритмів і програм порівняння послідовностей, відомих у даній галузі. Такі алгоритми і програми включають як необмежувальні приклади TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA і CLUSTALW (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3:266-272, 1993).

Гомологію або ідентичність можна виміряти, використовуючи програмне забезпечення для аналізу послідовностей (наприклад, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Комп'ютер Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Таке програмне забезпечення знаходить схожі послідовності шляхом визначення

ступенів гомології різних делецій, замін і інших модифікацій. Терміни "гомологія" і "ідентичність" у відношенні двох або більше послідовностей нуклеїнових кислот або поліпептидів стосуються двох або більше послідовностей або підпослідовностей, що є однаковими або мають встановлений процентний вміст амінокислотних залишків або нуклеотидів, що збігаються, при порівнянні і вирівнюванні для досягнення максимальної відповідності протягом вікна порівняння або визначеної ділянки, які вимірюють, використовуючи будь-яке число алгоритмів порівняння послідовностей або вирівнювання вручну і візуальне дослідження. Для порівняння послідовностей одна послідовність може виконувати функцію еталонної послідовності (наприклад, зразкової послідовності нуклеїнової кислоти або поліпептиду за винаходом), з якою порівнюють тестові послідовності. При використанні алгоритму порівняння послідовностей, тестову й еталонну послідовності вводять у комп'ютер, при необхідності, вказують координати підпослідовностей і вказують параметри програми порівняння послідовностей. Можна використовувати параметри програми за замовчуванням або можна вказати альтернативні параметри. Потім алгоритм порівняння послідовностей обчислює процент ідентичності послідовностей для тестових послідовностей стосовно еталонної послідовності на основі параметрів програми.

"Вікно порівняння", як застосовують у даному документі, стосується сегмента будь-якого числа суміжних залишків. Наприклад, в альтернативних аспектах за винаходом, після оптимального вирівнювання двох послідовностей суміжні залишки, що охоплюють діапазон від 20 залишків до повнорозмірної зразкової послідовності поліпептиду або нуклеїнової кислоти, порівнюють з еталонною послідовністю з тим же числом суміжних положень. Якщо еталонна послідовність має необхідну ідентичність послідовностей зі зразковою послідовністю поліпептиду або нуклеїнової кислоти, наприклад, в альтернативних аспектах, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% або більше, або повну (100%) ідентичність послідовностей зі зразковою послідовністю поліпептиду або нуклеїнової кислоти за винаходом, то послідовність входить в обсяг винаходу за винаходом. В альтернативних варіантах здійснення, підпослідовності в діапазоні приблизно від 20 до 600, приблизно від 50 до 200 і приблизно від 100 до 150 порівнюють з еталонною послідовністю з тим же числом суміжних положень після оптимального вирівнювання двох послідовностей. У даній галузі добре відомі способи вирівнювання послідовностей для порівняння. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння можна проводити, наприклад, за допомогою алгоритму локальної подібності Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, за допомогою алгоритму гомологічного вирівнювання Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, за допомогою способу пошуку подібності Person & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, за допомогою комп'ютерної реалізації цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA у Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) або за допомогою вирівнювання вручну і візуального дослідження. Інші алгоритми для визначення гомології або ідентичності включають, наприклад, на доповнення до програми BLAST (Basic Local Alignment Search Tool у National Center for Biological Information), ALIGN, AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment), ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biological Sequences Comparative Analysis Node), BLIMPS (BLOCKS IMPROVED Searcher), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, алгоритм Smith-Waterman, DARWIN, алгоритм Las Vegas, FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package), GAP (Global ALIGNMENT PROGRAM), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison), LALIGN (Local Sequence Alignment), LCP (Local Content Program), MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench), MAP (Multiple ALIGNMENT PROGRAM), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment), SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) і WHAT-IF. Такі програми для вирівнювання також можна використовувати для скринінгу геномних баз даних для ідентифікації послідовностей полінуклеотидів, що містять послідовності зі значною подібністю. Доступна множина геномних баз даних, наприклад, значна частина геному людини доступна як частина проекту секвенування геному людини (Gibbs, 1995). Секвеновано декілька геномів, наприклад, *M. genitalium* (Fraser et al., 1995), *M. jannaschii* (Bult et al., 1996), *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995), *E. coli* (Blattner et al., 1997) і дріжджів (*S. cerevisiae*) (Mewes et al., 1997), і *D. melanogaster* (Adams et al., 2000). Також значний прогрес досягнутий у секвенуванні геномів модельних організмів, таких як миша, *C. elegans* і *Arabidopsis* sp. Пізні організації підтримують бази даних, що містять геномну інформацію,

анотовану деякими функціональними відомостями, і доступ до них можна одержати через Інтернет.

Також використовують алгоритми BLAST, BLAST 2.0 і BLAST 2.2.2. Вони описані, наприклад, у Altschul (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; Altschul (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Програмне забезпечення для здійснення аналізу BLAST загальнодоступне через National Center for Biotechnology Information. Цей алгоритм включає спочатку ідентифікацію пар послідовностей з високими оцінками (HSP) за допомогою ідентифікації коротких слів довжини W у послідовності запиту, які або збігаються, або відповідають деякому позитивному значенню граничної оцінки T при вирівнюванні зі словом такої ж довжини в послідовності їх бази даних. T позначають як поріг оцінки сусіднього слова (Altschul (1990), вище). Ці вихідні збіги сусідніх слів виконують функцію затравки для ініціації пошуку більш довгих HSP, що їх містять. Збіги слів розширюються в обох напрямках уздовж кожної послідовності доти, поки сукупну оцінку вирівнювання можна збільшувати. Сукупні оцінки обчислюють, використовуючи для нуклеотидних послідовностей параметри M (нагорода за пару залишків, що збігаються; завжди >0). Для амінокислотних послідовностей використовують матрицю замінів для обчислення сукупної оцінки. Розширення збігів слів у кожному напрямку зупиняють, коли: сукупна оцінка вирівнювання знижується на величину X від максимального досягнутого значення; сукупна оцінка доходить до нуля або нижче внаслідок накопичення одного або декількох вирівнювань залишків з негативними оцінками; або досягають кінця кожної з послідовностей. Параметри W , T і X алгоритму BLAST визначають чутливість і швидкість вирівнювання. За замовчуванням у програмі BLASTN (для нуклеотидних послідовностей) використовують довжину слова (W), що дорівнює 11, очікування (E), що дорівнює 10, $M=5$, $N=-4$, і порівняння обох ниток. Для амінокислотних послідовностей у програмі BLASTP за замовчуванням використовують довжину слова, що дорівнює 3, і очікування (E), що дорівнює 10, і вирівнювання (b) з матрицею замінів BLOSUM62 (див. Henikoff & Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), що дорівнюють 50, очікування (E), що дорівнює 10, $M=5$, $N=-4$, і порівняння обох ниток. Також алгоритм BLAST здійснює статистичний аналіз подібності між двома послідовностями (див., наприклад, Karlin & Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873). Однією з мір подібності, передбаченою алгоритмом BLAST, є найменша сумарна імовірність ($P(N)$), що вказує на імовірність випадкового збігу між двома нуклеотидними або амінокислотними послідовностями. Наприклад, нуклеїнову кислоту вважають схожою на еталонну послідовність, якщо найменша сумарна імовірність при порівнянні тестової нуклеїнової кислоти з еталонною нуклеїновою кислотою складає менше ніж приблизно 0,2 або альтернативно менше ніж приблизно 0,01, або альтернативно менше ніж приблизно 0,001.

В одному з аспектів гомологію послідовностей білків і нуклеїнових кислот оцінюють, використовуючи Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Наприклад, можна використовувати п'ять спеціальних програм BLAST для вирішення наступної задачі: (1) BLASTP і BLAST3 порівнюють амінокислотну послідовність запиту з послідовністю білка з бази даних; (2) BLASTN порівнює нуклеотидну послідовність запиту з нуклеотидною послідовністю з бази даних; (3) BLASTX порівнює продукти трансляції в шести можливих рамках зчитування нуклеотидної послідовності запиту (обидві нитки) з послідовністю білка з бази даних; (4) TBLASTN порівнює білкову послідовність запиту з нуклеотидною послідовністю з бази даних, трансльованої у всіх шести рамках зчитування (обидві нитки); і (5) TBLASTX порівнює продукти трансляції у всіх шести рамках зчитування нуклеотидної послідовності запиту з продуктами трансляції у всіх шести рамках зчитування нуклеотидної послідовності з бази даних.

В одному з аспектів програми BLAST ідентифікують гомологічні послідовності шляхом ідентифікації схожих сегментів, які позначають у даному документі як "пари сегментів з високою оцінкою", між амінокислотною або нуклеотидною послідовністю запиту і тестовою послідовністю, яку альтернативно одержують з послідовності нуклеїнової кислоти або білка з бази даних. Пари сегментів з високою оцінкою альтернативно можна ідентифікувати (тобто, вирівняти) за допомогою матриці замінів, багато які з яких відомі в даній галузі. В одному з аспектів використовують матрицю замінів BLOSUM62 (Gonnet et al., *Science* 256:1443-1445, 1992; Henikoff and Henikoff, *Proteins* 17:49-61, 1993). В одному з аспектів також можна використовувати матриці PAM або PAM250 (див., наприклад, Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, *Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation).

В одному з аспектів для визначення того, чи має нуклеїнова кислота необхідну ідентичність послідовностей, щоб входити в обсяг винаходу за винаходом, використовують програми NCBI BLAST 2.2.2, опції за замовчуванням для blastp. У програмі BLAST 2.2.2 доступно приблизно 38 налаштованих опцій. У цьому зразковому аспекті за винаходом використовують усі значення за

замовчуванням, за винятком настроювання фільтрації за замовчуванням (тобто, усі параметри встановлені за замовчуванням, за винятком фільтрації, що має значення OFF); у цьому місці використовують настроювання "-F F", що відключає фільтрацію. Використання фільтрації за замовчуванням частини приводить до порушень Карліна-Альтшуля внаслідок малої довжини

послідовності.
Значення за замовчуванням, використані в цьому зразковому аспекті за винаходом, включають:

"Фільтр для низької складності: ON

Розмір слова: 3

Матриця: Blosum62

Ціни пропусків: Присутність: 11

Подовження: 1"

Інші настроювання за замовчуванням: фільтр для низької складності "OFF", розмір слова для білка "3", матриця "BLOSUM62", штраф за присутність пропуску "11" і штраф за подовження пропуску "1". В одному з аспектів опція "-W" за замовчуванням дорівнює "0". Це позначає, що без додаткового настроювання розмір слова за замовчуванням дорівнює "3" для білків і "11" для нуклеотидів.

Комп'ютерні системи і комп'ютерні програмні продукти

Для визначення й ідентифікації ідентичності послідовностей, структурної гомології, мотивів і т. п. *in silico*, послідовність за винаходом можна зберігати, записувати і маніпулювати нею в середовищі, що передбачає зчитування і доступ за допомогою комп'ютера. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані комп'ютери, комп'ютерні системи, машиночитаний носій, комп'ютерні програмні продукти і т. п., які включають (містять) послідовності нуклеїнових кислот і поліпептидів за винаходом, записані або збережені на них. Як застосовують у даному документі, слова "записаний" і "збережений" стосуються процесу зберігання інформації в комп'ютерному середовищі. Фахівець у даній галузі може швидко приймати будь-які відомі способи для запису інформації на машиночитаний носій для створення продуктів, що містять одну або декілька послідовностей нуклеїнової кислоти і/або поліпептиду за винаходом.

Інший аспект за винаходом стосується машиночитаного носія, на якому записана щонайменше одна послідовність нуклеїнової кислоти і/або поліпептиду за винаходом. Машиночитаний носій включає магнітні носії, оптичні носії, електронні носії і магнітооптичні носії. Наприклад, машиночитаний носій може являти собою твердий диск, гнучкий диск, магнітну стрічку, ПЗП на компакт-диску, цифровий універсальний диск (DVD), оперативний запам'ятовуючий пристрій (ОЗП) або постійний запам'ятовуючий пристрій (ПЗП), а також інші типи інших носіїв, відомі фахівцям у даній галузі.

Аспекти за винаходом включають системи (наприклад, системи, основані на Інтернеті), конкретно комп'ютерні системи, що зберігають і маніпулюють послідовностями й інформацією про послідовності, що описані в даному документі. Один приклад комп'ютерної системи 100 зображений у вигляді блокової діаграми на фіг. 1. Як застосовують у даному документі, "комп'ютерна система" стосується апаратних компонентів, програмних компонентів і компонентів накопичення даних, які використовують для аналізу нуклеотидної або поліпептидної послідовності за винаходом. Комп'ютерна система 100 може містити процесор для обробки, здійснення доступу і маніпуляцій даними про послідовності. Процесор 105 може стосуватися будь-якого добре відомого типу центрального процесора, такого як, наприклад, Pentium III корпорації Intel або аналогічний процесор компаній Sun, Motorola, Compaq, AMD або International Business Machines. Комп'ютерна система 100 являє собою систему загального призначення, що містить процесор 105 і один або декілька внутрішніх компонентів накопичення даних 110 для зберігання даних і один або декілька пристроїв витягання даних для витягання даних, що зберігаються на компонентах накопичення даних. Фахівець у даній галузі може з легкістю брати до уваги, що придатна будь-яка доступна на даний момент комп'ютерна система.

В одному з аспектів комп'ютерна система 100 включає процесор 105, з'єднаний із шиною, що з'єднана з основною пам'яттю 115 (альтернативно втіленою у вигляді ОЗП) і одним або декількома внутрішніми пристроями зберігання даних 110, такими як твердий диск і/або інший машиночитаний носій, що містить записані на ньому дані. Додатково комп'ютерна система 100 може містити один або декілька пристроїв витягання даних 118 для зчитування даних, що зберігаються на внутрішніх пристроях зберігання даних 110. Пристрій витягання даних 118 може представляти, наприклад, привід гнучких дисків, привід компактних дисків, привід магнітної стрічки або модем, здатний установлювати з'єднання з віддаленою системою зберігання даних

(наприклад, через Інтернет) і т. д. У деяких варіантах здійснення внутрішній пристрій зберігання даних 110 являє собою знімний машиночитаний носій, такий як гнучкий диск, компактний диск, магнітна стрічка і т. д., що містить керуючу логіку і/або дані, що зберігаються на ньому. Переважно комп'ютерна система 100 може містити або бути запрограмована за допомогою придатного програмного забезпечення на зчитування керуючої логіки і/або даних з компонента накопичення даних після підключення до пристрою витягання даних. Комп'ютерна система 100 містить пристрій відображення 120, який використовують для відображення вихідних даних користувачу комп'ютера. Також слід зазначити, що комп'ютерну систему 100 можна з'єднати з іншими комп'ютерними системами 125а-с у мережу або глобальну обчислювальну мережу, щоб надати централізований доступ до комп'ютерної системи 100. Під час виконання програмне забезпечення для доступу й обробки нуклеотидних або амінокислотних послідовностей за винаходом може знаходитися в основній пам'яті 115. У деяких аспектах комп'ютерна система 100 додатково може містити алгоритм порівняння послідовностей для порівняння послідовностей нуклеїнових кислот за винаходом. Алгоритм і послідовність(ості) можна зберігати на машиночитаному носії. "Алгоритм порівняння послідовностей" стосується однієї або декількох програм, що реалізовані (локально або віддалено) у комп'ютерній системі 100, для порівняння нуклеотидної послідовності з іншими нуклеотидними послідовностями і/або сполуками, що зберігаються в засобах накопичення даних. Наприклад, алгоритм порівняння послідовностей може порівнювати нуклеотидні послідовності за винаходом, що зберігаються на машиночитаному носії, з еталонними послідовностями, що зберігаються на машиночитаному носії, для ідентифікації гомології або структурних мотивів.

Параметри, використовувані з зазначеними вище алгоритмами, можна адаптувати залежно від довжини послідовності і досліджуваної міри гомології. У деяких аспектах параметри можуть являти собою параметри за замовчуванням, використовувані алгоритмами за відсутності інструкцій користувача. На фіг. 2 представлена блок-схема, що ілюструє один аспект процесу 200 для порівняння нової нуклеотидної або білкової послідовності з базою даних послідовностей для того, щоб визначити рівні гомології між новою послідовністю і послідовностями в базі даних. База даних послідовностей може являти собою приватну базу даних, що зберігається в комп'ютерній системі 100, або публічну базу даних, таку як GENBANK, що доступна через Інтернет. Процес 200 починається в початковому стані 201 і потім переходить до стану 202, де нова послідовність, що підлягає порівнянню, зберігається в пам'яті в комп'ютерній системі 100. Як зазначено вище, пам'ять може являти собою пам'ять будь-якого типу, включаючи ОЗП або внутрішній запам'ятовуючий пристрій. Потім процес 200 переходить до стану 204, у якому відкривають базу даних послідовностей для аналізу і порівняння. Потім процес 200 переходить до стану 206, де першу послідовність, що зберігається в базі даних, зчитують у пам'ять на комп'ютері. Потім у стані 210 здійснюють порівняння, щоб визначити, чи є перша послідовність і друга послідовність однаковими. Важливо відзначити, що ця стадія не обмежена виконанням строгого порівняння між новою послідовністю і першою послідовністю в базі даних. Фахівцям у даній галузі добре відомі способи порівняння двох нуклеотидних або білкових послідовностей, навіть якщо вони не ідентичні. Наприклад, в одну послідовність можна вводити пропуски для того, щоб підвищити рівень гомології між двома протестованими послідовностями. Звичайно користувач комп'ютерної системи вводить параметри, які визначають введення пропусків або інших особливостей у послідовність у ході порівняння. Після виконання порівняння двох послідовностей у стані 210, у стані прийняття рішення 212 визначають, чи є дві послідовності однаковими. Звичайно, термін "однаковий" не обмежений послідовностями, які абсолютно ідентичні. Послідовності, що входять у рамки параметрів гомології, введених користувачем, будуть позначені як "однакові" у процесі 200. Якщо встановлено, що дві послідовності є однаковими, то процес 200 переходить до стану 214, де назву послідовності з бази даних відображають користувачу. Цей стан повідомляє користувача про те, що послідовність, назва якої відображена, відповідає введеним обмежувачим умовам гомології. Після відображення назви збереженої послідовності користувачу, процес 200 переходить до стану прийняття рішення 218, де визначають, чи є в базі даних додаткові послідовності. Якщо в базі даних більше немає послідовностей, то процес 200 закінчується в стані 220. Однак, якщо в базі даних присутні додаткові послідовності, то процес 200 переходить до стану 224, де покажчик переміщують до наступної послідовності в базі даних для того, щоб її можна було порівнювати з новою послідовністю. Таким чином, нову послідовність вирівнюють і порівнюють з кожною послідовністю в базі даних. Слід зазначити, що, якщо в стані прийняття рішення 212 встановлено, що послідовності негомологічні, то процес 200 переходить безпосередньо до стану прийняття рішення 218 для того, щоб визначити, чи доступні для порівняння інші послідовності в базі даних. Таким чином, один аспект за винаходом являє

собою комп'ютерну систему, що містить процесор, пристрій зберігання даних, на якому зберігається послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом, і блок порівняння послідовностей для здійснення порівняння. Блок порівняння послідовностей може показувати рівень гомології між порівняними послідовностями або ідентифікувати структурні мотиви, або він може ідентифікувати структурні мотиви в послідовностях, що порівнюються з цими кодами нуклеїнових кислот і кодами поліпептидів. На фіг. 3 представлена блок-схема, що ілюструє один з варіантів здійснення процесу 250 у комп'ютері для визначення гомології двох послідовностей. Процес 250 починається у вихідному стані 252 і потім переходить у стан 254, де першу послідовність, що підлягає порівнянню, зберігають у пам'яті. Потім у стані 256 другу послідовність, що підлягає порівнянню, записують у пам'яті. Потім процес 250 переходить у стан 260, де зчитують перший символ першої послідовності, а потім у стан 262, де зчитують перший символ другої послідовності. Варто розуміти, що, якщо послідовність являє собою нуклеотидну послідовність, то звичайно символ буде являти собою А, Т, С, G або U. Якщо послідовність являє собою послідовність білка, то вона може являти собою однобуквений амінокислотний код для того, щоб можна було легко порівняти першу і другу послідовності. Потім у стані прийняття рішення 264 визначають, чи є два символи однаковими. Якщо вони однакові, то процес 250 переходить до стану 268, де зчитують наступні символи в першій і другій послідовностях. Потім визначають, чи є наступні символи однаковими. Якщо це так, то потім процес 250 продовжує цей цикл доти, поки два символи не виявляться неоднаковими. Якщо встановлено, що наступні два символи неоднакові, то процес 250 переходить у стан прийняття рішення 274 для того, щоб визначити, чи є в послідовності додаткові символи для зчитування. Якщо більше немає символів для зчитування, то потім процес 250 переходить у стан 276, де користувачу відображають рівень гомології між першою і другою послідовностями. Рівень гомології визначають шляхом обчислення частки однакових символів між послідовностями з загального числа послідовностей у першій послідовності. Таким чином, якщо кожен символ у першій 100 нуклеотидній послідовності вирівняний з кожним символом у другій послідовності, то рівень гомології складе 100%.

Альтернативно, комп'ютерна програма може порівнювати еталонну послідовність з послідовністю за винаходом, щоб установити, чи відрізняються послідовності одним або декількома положеннями. Програма може записувати довжину й ідентичність вставлених, видалених або заміненіх нуклеотидів або амінокислотних залишків стосовно еталонної послідовності або послідовності за винаходом. Комп'ютерна програма може являти собою програму, яка визначає, чи містить еталонна послідовність одонуклеотидний поліморфізм (SNP) стосовно послідовності за винаходом або чи містить послідовність за винаходом SNP відомої послідовності. Таким чином, у деяких аспектах комп'ютерна програма являє собою програму, яка ідентифікує SNP. Спосіб можна виконувати за допомогою комп'ютерних систем, описаних вище, і способу, зображеного на фіг. 3. Спосіб можна виконувати за допомогою зчитування послідовності за винаходом і еталонних послідовностей шляхом застосування комп'ютерної програми й ідентифікації відмінностей з використанням комп'ютерної програми.

В інших аспектах система на основі комп'ютера містить ідентифікатор для ідентифікації ознак в нуклеїновій кислоті або поліпептиді за винаходом. "Ідентифікатор" стосується однієї або декількох програм, які ідентифікують конкретні ознаки в послідовності нуклеїнової кислоти. Наприклад, ідентифікатор може містити програму, яка ідентифікує відкриту рамку зчитування (ORF) у послідовності нуклеїнової кислоти. На фіг. 4 представлена блок-схема, що ілюструє один аспект процесу ідентифікації 300 для визначення присутності ознаки в послідовності. Процес 300 починається у вихідному стані 302 і потім переходить у стан 304, де першу послідовність, що підлягає перевірці на ознаки, зберігають у пам'яті 115 у комп'ютерній системі 100. Потім процес 300 переходить у стан 306, де відкривають базу даних ознак послідовностей. Така база даних містить список атрибутів кожної ознаки разом з назвою ознаки. Наприклад, назвою ознаки може бути "Ініціюючий кодон" і атрибутом може бути "ATG". Іншим прикладом буде назва ознаки "ТААТАА-бокс" і атрибутом ознаки буде "ТААТАА". Приклад такої бази даних створений генетичною комп'ютерною групою університету Вісконсину. Альтернативно, ознаками можуть бути структурні мотиви поліпептидів, такі як α -спіралі, β -листи, або функціональні мотиви поліпептидів, такі як ферментативні активні центри, мотиви спіраль-поворот-спіраль або інші мотиви, відомі фахівцям у даній галузі. Після відкривання бази даних ознак у стані 306, процес 300 переходить у стан 308, де з бази даних зчитують першу ознаку. Потім у стані 310 виконують порівняння атрибута першої ознаки з першою послідовністю. Потім визначають у стані прийняття рішення 316, чи знайдений атрибут ознаки в першій послідовності. Якщо атрибут знайдений, то процес 300 переходить у стан 318, де назву знайденої ознаки відображають користувачу. Потім процес 300 переходить до стану прийняття рішення 320, де

визначають, чи є в базі даних додаткові ознаки. Якщо в базі даних більше немає ознак, то потім процес 300 переривається в кінцевому стані 324. Однак, якщо в базі даних ще є ознаки, то процес 300 зчитує наступну ознаку послідовності в стані 326 і повертається до стану 310, де атрибут наступної ознаки порівнюють з першою послідовністю. Якщо атрибут ознаки не знайдений у першій послідовності в стані прийняття рішення 316, то процес 300 переходить безпосередньо до стану прийняття рішення 320 для того, щоб визначити, чи є ще ознаки в базі даних. Таким чином, в одному з аспектів передбачена комп'ютерна програма, яка ідентифікує відкриті рамки зчитування (ORF).

Послідовність поліпептиду або нуклеїнової кислоти за винаходом можна зберігати або маніпулювати ними в різних програмах обробки даних у різних форматах. Наприклад, послідовність можна зберігати у вигляді тексту у файлі текстового процесора, такому як MICROSOFTWORD™ або WORDPERFECT™, або у вигляді файла ASCII у різних програмах баз даних, добре знайомих фахівцям у даній галузі, таких як DB2, SYBASE або ORACLE™. Крім того, багато які комп'ютерні програми і бази даних можна використовувати як алгоритми порівняння послідовностей, ідентифікаторів або джерел еталонних нуклеотидних послідовностей або поліпептидних послідовностей, що підлягають порівнянню з послідовністю нуклеїнової кислоти за винаходом. Програми і бази даних можуть включати: MACPATTERN™ (EMBL), DISCOVERYBASE™ (Molecular Applications Group), GENEMINE™ (Molecular Applications Group), LOOK™ (Molecular Applications Group), MACLOOK™ (Molecular Applications Group), BLAST і BLAST2 (NCBI), BLASTN і BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403, 1990), FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444, 1988), FASTDB™ (Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990), CATALYST™ (Molecular Simulations Inc.), CATALYST™/SHAPE™ (Molecular Simulations Inc.), CERIU2.DBACCESS™ (Molecular Simulations Inc.), HYPOGEN™ (Molecular Simulations Inc.), Insight II (Molecular Simulations Inc.), DISCOVER™ (Molecular Simulations Inc.), CHARMM™ (Molecular Simulations Inc.), FELIX™ (Molecular Simulations Inc.), DELPHI™ (Molecular Simulations Inc.), QUANTEM™ (Molecular Simulations Inc.), HOMOLOG™ (Molecular Simulations Inc.), MODELER™ (Molecular Simulations Inc.), ISIS™ (Molecular Simulations Inc.), Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.), WEBLAB™ (Molecular Simulations Inc.), WEBLAB™ Diversity Explorer (Molecular Simulations Inc.), GENE EXPLORER™ (Molecular Simulations Inc.), SEQFOLD™ (Molecular Simulations Inc.), базу даних MDL Available Chemicals Directory, базу даних MDL Drug Data Report, базу даних Comprehensive Medicinal Chemistry, базу даних Derwent's World Drug Index, базу даних BioByteMasterFile, базу даних Genbank і базу даних Genseqn. Фахівцю в даній галузі відомі багато які інші програми і бази даних, зазначені в даному розкритті.

Мотиви, які можна виявити, використовуючи зазначені вище програми, включають послідовності, що кодують лейцинові блискавки, мотиви спіраль-поворот-спіраль, сайти глікозилювання, сайти убіквітинілювання, α -спіралі і β -листи, сигнальні послідовності, кодуючі сигнальні пептиди, що направляють секрецію кодованих білків, послідовності, залучені в регуляцію транскрипції, такі як гомеобокси, кислі фрагменти секвенування, активні центри ферментів, сайти зв'язування субстрату і сайти розщеплення ферментів.

Гібридизація нуклеїнових кислот

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані виділені, синтетичні або рекомбінантні нуклеїнові кислоти, що гібридизуються при суворих умовах з нуклеїновою кислотою, наданою в даному документі, наприклад, зі зразковою послідовністю, наданою в даному документі, наприклад, послідовністю, як зазначено в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22 або SEQ ID NO:23, або в SEQ ID NO:1, модифікованою для того, щоб кодувати зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми або більше (декількох), або всіх основ, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або їх еквіваленти, і їх підпослідовності і комплементарні послідовності або нуклеїнова кислота, що кодує поліпептид за винаходом. Строгі умови можуть являти собою крайні умови, умови середньої строгості, умови низької строгості, включаючи умови високої і зниженої строгості, описані в даному документі.

"Гібридизація" стосується процесу, за допомогою якого нитка нуклеїнової кислоти з'єднується з комплементарною ниткою через спарювання основ. Реакції гібридизації можуть бути чутливими і вибірковими для того, щоб можна було ідентифікувати конкретну послідовність, що представляє інтерес, навіть у зразках, у яких вона присутня в низьких концентраціях. Строгі умови можуть визначатися, наприклад, концентраціями солі або формаміду в розчинах для попередньої гібридизації і гібридизації або температурою гібридизації і добре відомі в даній галузі. Наприклад, строгість можна збільшити за допомогою

зниження концентрації солі, підвищення концентрації формаміду або підвищення температури гібридизації, зміни часу гібридизації, як описано в подробицях нижче. В альтернативних аспектах нуклеїнові кислоти за винаходом визначають по їх здатності до гібридизації при умовах різної строгості (наприклад, високої, середньої, низької), як зазначено в даному документі.

В альтернативних варіантах здійснення довжина нуклеїнових кислот за винаходом, які визначені по їх здатності до гібридизації при суворих умовах, може складати приблизно від п'яти залишків до повнорозмірної нуклеїнової кислоти за винаходом; наприклад, їх довжина може складати щонайменше 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 або більше залишків у довжину. Також включені нуклеїнові кислоти, коротше повнорозмірних. Ці нуклеїнові кислоти можна використовувати, наприклад, як зонди для гібридизації, зонди для мічення, олігонуклеотидні зонди для ПЛР, іРНК, антисмислові послідовності або послідовності, кодуєчі пептиди, що зв'язуються антитілами (епітопи), мотиви, активні центри і т. п.

В одному з аспектів, нуклеїнові кислоти за винаходом визначають по їх здатності до гібридизації при умовах високої строгості, включаючи приблизно 50% формамід при температурі приблизно від 37 °C до 42 °C. В одному з аспектів, нуклеїнові кислоти за винаходом визначають по їх здатності до гібридизації при умовах низької строгості, включаючи приблизно від 35% до 25% формамід при температурі приблизно від 30 °C до 35 °C.

Альтернативно, нуклеїнові кислоти за винаходом визначають по їх здатності до гібридизації при умовах високої строгості при 42 °C у 50% формаміді, 5×SSPE, 0,3% SDS і блокуючій нуклеїновій кислоті з повторюваною послідовністю, такою як cot-1 або ДНК сперми лосося (наприклад, 200 мкг/мл різаної і денатурований ДНК сперми лосося). В одному з аспектів нуклеїнові кислоти за винаходом визначають по їх здатності до гібридизації при умовах зниженої строгості, включаючи 35% формамід при зниженій температурі 35 °C.

Після гібридизації фільтр можна промити в 6×SSC, 0,5% SDS при 50 °C. Ці умови розглядають як "помірні" умови при концентрації формаміду більше 25% і як "низькі" умови при концентрації формаміду нижче 25%. Конкретними прикладом "помірних" умов гібридизації є зазначена вище гібридизація, коли її проводять у 30% формаміді. Конкретним прикладом "низької строгості" умов гібридизації є зазначена вище гібридизація, коли її проводять у 10% формаміді.

Температурний діапазон, що відповідає конкретному рівню строгості, можна додатково звузити, обчисливши відношення пурину до піримідину в нуклеїновій кислоті, що представляє інтерес, і, таким чином, скорегувавши температуру. Нуклеїнові кислоти за винаходом також визначають по їх здатності до гібридизації при високій, середній і низькій строгості умов, як зазначено в Ausubel and Sambrook. Зміни зазначених вище діапазонів і умов добре відомі в даній галузі. Нижче додатково обговорюються умови гібридизації.

Зазначену вище процедуру можна модифікувати для ідентифікації нуклеїнових кислот, що мають рівні гомології, що знижуються, з послідовністю зонда. Наприклад, щоб одержати нуклеїнові кислоти з гомологією, що знижується, із зондом, що піддається виявленню, можна використовувати менш строгі умови. Наприклад, температуру гібридизації можна знижувати з кроком у 5 °C з 68 °C до 42 °C у гібридизаційному буфері, що містить Na⁺ у концентрації приблизно 1 M. Після гібридизації фільтр можна промивати в 2×SSC, 0,5% SDS при температурі гібридизації. Ці умови вважаються "помірними" умовами при температурі 50 °C і "низькими" умовами при температурі нижче 50 °C. Конкретним прикладом "помірних" умов гібридизації є зазначена вище гібридизація, коли її проводять при температурі 55 °C. Конкретним прикладом умов гібридизації "низької строгості" є зазначена вище гібридизація, коли її проводять при температурі 45 °C.

Альтернативно, гібридизацію можна здійснювати в буферах, таких як 6×SSC, що містять формамід, при температурі 42 °C. У цьому випадку концентрацію формаміду в гібридизаційному буфері можна знижувати з кроком 5% з 50% до 0%, щоб ідентифікувати клони, які мають рівні гомології, що знижуються, із зондом. Після гібридизації фільтр можна промивати в 6×SSC, 0,5% SDS при температурі 50 °C. Ці умови вважаються "помірними" умовами при концентрації формаміду вище 25% і "низькими" умовами при концентрації формаміду нижче 25%. Конкретним прикладом "помірних" умов гібридизації є зазначена вище гібридизація, коли її проводять при концентрації формаміду 30%. Конкретним прикладом умов гібридизації "низької строгості" є зазначена вище гібридизація, коли її проводять при концентрації формаміду 10%.

Однак вибір виду гібридизації не критичний - строгість умов відмивання описує умови, що визначають, чи входить нуклеїнова кислота в обсяг винаходу за винаходом. Умови відмивання, які використовують для ідентифікації нуклеїнових кислот, що входять в обсяг винаходу,

включають, наприклад: концентрацію солі приблизно 0,02 М при рН 7 і температурі щонайменше приблизно 50 °С або приблизно від 55 °С приблизно до 60 °С; або концентрацію солі приблизно 0,15 М NaCl при 72 °С протягом приблизно 15 хвилин; або концентрацію солі приблизно 0,2×SSC при температурі щонайменше приблизно 50 °С або приблизно від 55 °С

приблизно до 60 °С протягом приблизно від 15 приблизно до 20 хвилин; або промивання гібридизаційного комплексу два рази в розчині з концентрацією солі приблизно 2×SSC, що містить 0,1% SDS, при кімнатній температурі протягом 15 хвилин і потім промивання двічі в 0,1×SSC, що містить 0,1% SDS, при температурі 68 °С протягом 15 хвилин; або еквівалентні умови. Див. опис буфера SSC і еквівалентних умов у Sambrook, Tijssen and Ausubel.

Ці способи можна використовувати для виділення нуклеїнових кислот за винаходом.

Олігонуклеотидні зонди і способи їх використання

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані зонди з нуклеїнових кислот для ідентифікації нуклеїнових кислот, що кодуєть поліпептид з гідролазною активністю, наприклад, ліпазною, сатуразною, пальмітазною і/або стеаратазною активністю. В одному з аспектів зонд містить щонайменше 10 послідовних основ нуклеїнової кислоти за винаходом. Альтернативно, зонд за винаходом може містити щонайменше приблизно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 150, 160, 170, 180, 190, 200 або більше або приблизно від 10 до 50, приблизно від 20 до 60, приблизно від 30 до 70 послідовних основ з послідовності, як зазначено в нуклеїновій кислоті за винаходом. Зонди дозволяють ідентифікувати нуклеїнову кислоту за допомогою зв'язування і/або гібридизації. Зонди можна використовувати в чіпах за винаходом, див. обговорення нижче, включаючи, наприклад, капілярні блоки. Зонди за винаходом також можна використовувати для виділення інших нуклеїнових кислот або поліпептидів.

Зонди за винаходом можна використовувати для визначення вмісту в біологічному зразку, такому як зразок ґрунту, організму, що містить послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом (наприклад, нуклеїнової кислоти, що кодує гідролазу), або організму, з якого одержали нуклеїнову кислоту. У таких процедурах одержують біологічний зразок, що потенційно приховує організм, з якого виділена нуклеїнова кислота, і зі зразка одержують нуклеїнові кислоти. Нуклеїнові кислоти приводять у контакт із зондом в умовах, що дозволяють зонду специфічно гібридизуватися з будь-якими комплементарними послідовностями, представленими в зразку. У разі потреби, умови, що дозволяють зонду специфічно гібридизуватися з комплементарними послідовностями, можна визначити, привівши зонд у контакт із комплементарними послідовностями зі зразків, що точно містять комплементарну послідовність, а також з контрольними послідовностями, що не містять комплементарну послідовність. Щоб ідентифікувати умови, які дозволяють зонду гібридизуватися специфічно з комплементарними нуклеїновими кислотами, можна змінювати умови гібридизації, такі як концентрація солі в гібридизаційному буфері, концентрація формаміду в гібридизаційному буфері або температура гібридизації (див. обговорення конкретних умов гібридизації).

Якщо зразок містить організм, з якого виділили нуклеїнову кислоту, то визначають специфічну гібридизацію зонда. Гібридизацію можна визначити шляхом мічення зонда засобом, що піддається виявленню, таким як радіоактивний ізотоп, флуоресцентний барвник або фермент, здатний каталізувати утворення продукту, що піддається виявленню. Фахівцям у даній галузі відомо багато способів використання мічених зондів для визначення присутності комплементарних нуклеїнових кислот у зразку. Сюди входять саузерн-блотинг, нозерн-блотинг, процедури гібридизації колоній і дот-блотинг. Протоколи для всіх цих процедур надані в Ausubel and Sambrook.

Альтернативно, в реакції ампліфікації можна використовувати більше ніж один зонд (щонайменше один із яких здатний специфічно гібридизуватися з будь-якими комплементарними послідовностями, що присутні в зразку нуклеїнової кислоти), щоб визначити, чи міститься в зразку організм, що містить послідовність нуклеїнової кислоти за винаходом (наприклад, організм, з якого виділена нуклеїнова кислота). В одному з аспектів зонди містять олігонуклеотиди. В одному з аспектів реакція ампліфікації може включати ПЛР. Протоколи ПЛР описані в Ausubel and Sambrook (див. обговорення реакцій ампліфікації). У таких процедурах нуклеїнові кислоти в зразку приводять у контакт із зондами, проводять реакцію ампліфікації і визначають будь-який одержаний продукт ампліфікації. Продукт ампліфікації можна визначити за допомогою електрофорезу продуктів реакції в гелі і забарвлення гелю інтеркалятором, таким як бромистий етидій. Альтернативно, один або декілька зондів можна мітити радіоактивним ізотопом, а присутність радіоактивного продукту ампліфікації можна визначити авторадіографією після електрофорезу в гелі.

Зонди, одержані з послідовностей поруч з 3'- або 5'-кінцями послідовності нуклеїнової

кислоти за винаходом, також можна використовувати в процедурах прогулянки по хромосомі для ідентифікації клонів, що містять додаткові, наприклад, геномні, послідовності. Такі способи дозволяють виділити з організму-хазяїна гени, які кодують додаткові білки, що представляють інтерес.

В одному з аспектів послідовності нуклеїнових кислот за винаходом використовують як зонди для ідентифікації і виділення споріднених нуклеїнових кислот. У деяких аспектах ідентифіковані таким чином споріднені нуклеїнові кислоти можуть являти собою кДНК або геномну ДНК з організмів, відмінних від тих, з яких початково виділили нуклеїнову кислоту за винаходом. У таких процедурах зразок нуклеїнової кислоти приводять у контакт із зондом в умовах, що дозволяють зонду специфічно гібридизуватися зі спорідненими послідовностями. Потім гібридизацію зонда з нуклеїновими кислотами зі спорідненого організму визначають, використовуючи будь-який описаний вище спосіб.

У реакціях гібридизації нуклеїнових кислот умови, використовувані для досягнення конкретного рівня строгості, змінюють залежно від природи гібридизованих нуклеїнових кислот. Наприклад, при виборі умов гібридизації можна враховувати довжину, міру комплементарності, склад нуклеотидної послідовності (наприклад, вміст GC або AT) і вид нуклеїнової кислоти (наприклад, РНК або ДНК) ділянок, що гібридизуються, нуклеїнових кислот. Додатково враховують, чи іммобілізована одна з нуклеїнових кислот, наприклад, на фільтрі. Гібридизацію можна проводити в умовах низької строгості, помірної строгості або високої строгості. Як приклад гібридизації нуклеїнових кислот, полімерну мембрану, що містить іммобілізовані денатуровані нуклеїнові кислоти, спочатку попередньо гібридизують протягом 30 хвилин при 45 °C у розчині, що складається з 0,9 M NaCl, 50 mM Na₂PO₄, pH 7,0, 5,0 mM Na₂EDTA, 0,5% SDS, 10× розчин Денхардта і 0,5 мг/мл полірибоаденілової кислоти. Потім у розчин додають приблизно 2×10⁷ імп./хв. (точна активність 4-9×10⁸ імп.×мкг/хв.) олігонуклеотидного зонда, міченого P³² на кінці. Після 12-16 годин інкубації, мембрану промивають протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (КТ) у 1×SET (150 mM NaCl, 20 mM Tris гідрохлорид, pH 7,8, 1 mM Na₂EDTA), що містить 0,5% SDS, після чого протягом 30 хвилин відмивають у свіжому 1×SET при T_m - 10 °C для олігонуклеотидного зонда. Потім мембраною впливають на плівку для авторадіографії для визначення сигналів гібридизації.

Змінюючи строгість умов гібридизації, використовуваних для ідентифікації нуклеїнових кислот, таких як кДНК або геномна ДНК, які гібридизуються з зондом, що піддається виявленню, можна ідентифікувати і виділити нуклеїнові кислоти, що мають різні рівні гомології з зондом. Строгість можна змінювати, проводячи гібридизацію при різних температурах нижче температур плавлення зондів. Температура плавлення, T_m, являє собою температуру (при визначеній іонній силі і pH), при якій 50% цільової послідовності гібридизується з абсолютно комплементарним зондом. Дуже строгі умови вибирають рівними або приблизно на 5 °C нижче T_m для конкретного зонда. Температуру плавлення зонда можна обчислити, використовуючи наступні зразкові формули. Для зондів довжиною від 14 до 70 нуклеотидів температуру плавлення (T_m) обчислюють, використовуючи формулу: T_m=81,5+16,6(log[Na⁺])+0,41 (фракція G+C)-(600/N), де N являє собою довжину зонда. Якщо гібридизацію здійснюють у розчині, що містить формамід, то температуру плавлення можна обчислити, використовуючи рівняння: T_m=81,5+16,6(log[Na⁺])+0,41 (фракція G+C)-(0,63% формамід)-(600/N), де N являє собою довжину зонда. Попередню гібридизацію можна проводити в 6×SSC, 5× розчині Денхардта, 0,5% SDS, 100 мкг денатурованої фрагментованої ДНК сперми лосося або в 6×SSC, 5× розчині Денхардта, 0,5% SDS, 100 мкг денатурованої фрагментованої ДНК сперми лосося, 50% формаміді. Склади для SSC, розчину Денхардта й інших розчинів перераховані, наприклад, у Sambrook.

В одному з аспектів, гібридизацію проводять за допомогою додавання зонда, що піддається виявленню, в перераховані вище розчини для попередньої гібридизації. Коли зонд містить дволанцюжкову ДНК, перед додаванням у розчин для гібридизації її денатурують. Фільтр приводять у контакт із розчином для гібридизації протягом достатнього періоду часу, щоб дозволити зонду гібридизуватися з кДНК або геномною ДНК, що містить послідовності, комплементарні йому або гомологічні йому. Для зондів довжиною більше 200 нуклеотидів гібридизацію можна здійснювати при температурі на 15-25 °C нижче T_m. Для більш коротких зондів, таких як олігонуклеотидні зонди, гібридизацію можна проводити при температурі на 5-10 °C нижче T_m. В одному з аспектів гібридизацію в 6×SSC проводять приблизно при 68 °C. В одному з аспектів гібридизацію в розчинах, що містять 50% формамід, проводять приблизно при 42 °C. Варто враховувати, що всі згадані вище гібридизації проводять в умовах високої строгості.

В одному з аспектів після гібридизації фільтр промивають для видалення будь-яких неспецифічно зв'язаних зондів, що піддаються виявленню. Строгість, використовувану для відмивання фільтрів, також можна змінювати залежно від природи нуклеїнових кислот, що підлягають гібридизації, довжини нуклеїнових кислот, що підлягають гібридизації, міри комплементарності, складу нуклеотидної послідовності (наприклад, вміст GC і AT) і виду нуклеїнової кислоти (наприклад, РНК або ДНК). Приклади умов відмивання постійної зростаючої строгості: 2×SSC, 0,1% SDS при кімнатній температурі протягом 15 хвилин (низька строгість); 0,1×SSC, 0,5% SDS при кімнатній температурі протягом від 30 хвилин до 1 години (помірна строгість); 0,1×SSC, 0,5% SDS протягом від 15 до 30 хвилин при температурі від температури гібридизації до 68 °C (висока строгість); і 0,15 M NaCl протягом 15 хвилин при 72 °C (дуже висока строгість). Фінальне відмивання при низькій строгості можна проводити в 0,1×SSC при кімнатній температурі. Наведені вище приклади лише ілюструють один набір умов, які можна використовувати для відмивання фільтрів. Професіонал у даній галузі знає, що існує множина прописів для відмивання різної строгості.

Нуклеїнові кислоти, гібридизовані з зондом, можна ідентифікувати за допомогою радіоавтографії або інших загальноприйнятих способів. Зазначену вище процедуру можна модифікувати для ідентифікації нуклеїнових кислот, які мають рівні гомології, що знижуються, з послідовністю зонда. Наприклад, для одержання нуклеїнових кислот з гомологією, що знижується, до зонда, що піддається виявленню, можна використовувати менш строгі умови. Наприклад, температуру гібридизації можна знижувати з кроком 5 °C з 68 °C до 42 °C у гібридизаційному буфері, що містить Na⁺ у концентрації приблизно 1 M. Після гібридизації фільтр можна відмивати в 2×SSC, 0,5% SDS при температурі гібридизації. Ці умови вважаються "помірними" умовами при температурі вище 50 °C і "низькими" умовами при температурі нижче 50 °C. Прикладом "помірних" умов гібридизації є зазначена вище гібридизація, коли її проводять при 55 °C. Прикладом умов гібридизації "низької строгості" є зазначена вище гібридизація, коли її проводять при 45 °C.

Альтернативно, гібридизацію можна проводити в буферах, таких як 6×SSC, що містять формамід, при температурі 42 °C. У цьому випадку, концентрацію формаміду в гібридизаційному буфері можна знижувати з кроком 5% з 50% до 0% для ідентифікації клонів, які мають рівні гомології, що знижуються, до зонда. Після гібридизації фільтр можна відмивати в 6×SSC, 0,5% SDS при температурі 50 °C. Ці умови вважаються "помірними" умовами при концентрації формаміду більше 25% і "низькими" умовами при концентрації формаміду нижче 25%. Конкретним прикладом "помірних" умов гібридизації є зазначена вище гібридизація, коли її проводять при концентрації формаміду 30%. Конкретним прикладом умов гібридизації "низької строгості" є зазначена вище гібридизація, коли її проводять при концентрації формаміду 10%.

Ці зонди і способи за винаходом можна використовувати для виділення або ідентифікації (наприклад, використовуючи чіп) нуклеїнових кислот, що мають послідовність щонайменше приблизно з 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більшою ідентичністю послідовностей з послідовністю нуклеїнової кислоти за винаходом, що містять щонайменше приблизно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 або більше її послідовних основ, і послідовностей, комплементарних їй. Гомологію можна виміряти, використовуючи алгоритм вирівнювання, як обговорюється в даному документі. Наприклад, гомологічні полінуклеотиди можуть містити кодуєчу послідовність, яка являє собою алельний варіант, що зустрічається в природі, однієї з кодуєчих послідовностей, описаних у даному документі. Такі алельні варіанти можуть містити заміну, делецію або вставку одного або декількох нуклеотидів у порівнянні з нуклеїновою кислотою за винаходом.

Додатково зонди і способи за винаходом можна використовувати для виділення або ідентифікації (наприклад, використовуючи чіп) нуклеїнових кислот, що кодують поліпептиди, які мають щонайменше приблизно 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більшу ідентичність послідовностей (гомологію) з поліпептидом за винаходом, що містять щонайменше 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 або 150, або більше його послідовних амінокислот, що визначають, використовуючи алгоритм вирівнювання послідовностей, наприклад, такий як алгоритм FASTA версії 3.0t78 з параметрами за замовчуванням, або програму BLAST 2.2.2 зі зразковими налаштуваннями, як зазначено в даному документі.

Інгібування експресії гідролаз

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані нуклеїнові кислоти, комплементарні (наприклад, антисмислові послідовності) послідовностям нуклеїнових кислот за винаходом, наприклад, послідовностям, що кодують гідролази. Антисмислові послідовності здатні інгібувати транспорт, сплайсинг або транскрипцію генів, що кодують гідролази. Інгібування можна здійснювати за допомогою націлювання геномної ДНК або матричної РНК. Інгібування можна здійснювати, використовуючи ДНК, наприклад, інгібуючий рибозим, або РНК, наприклад, дволанцюжкову іРНК, що містить послідовність за винаходом. Транскрипцію або функцію цільовий нуклеїнової кислоти можна інгібувати, наприклад, за допомогою гібридизації і/або розщеплення. У даному документі надані набори інгібіторів, що містять олігонуклеотиди, здатні зв'язуватися з геном і/або транскриптом гідролази, у будь-якому випадку запобігаючи або інгібуючи утворення або функцію гідролази. Зв'язування може відбуватися за допомогою специфічної гібридизації послідовностей. Інший ефективний клас інгібіторів включає олігонуклеотиди, що викликають інактивацію або розщеплення транскрипту гідролази. Олігонуклеотид, такий як рибозим, може мати ферментативну активність, яка є причиною такого розщеплення. Олігонуклеотид можна хімічно модифікувати або кон'югувати з ферментом або композицією, здатною розщеплювати комплементарну нуклеїнову кислоту. Можна провести скринінг пулу багатьох таких різних олігонуклеотидів для виявлення олігонуклеотидів з бажаною активністю.

Антисмислові олігонуклеотиди

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані антисмислові олігонуклеотиди, здатні зв'язуватися з транскриптом гідролази, які можуть інгібувати гідролазну активність за допомогою націлювання на мРНК або геномну ДНК. Стратегії конструювання антисмислових олігонуклеотидів добре описані в науковій і патентній літературі, і фахівець у даній галузі може сконструювати такі олігонуклеотиди гідролаз, використовуючи нові реактиви за винаходом. Наприклад, протоколи прогулянки по гені/ картування РНК для скринінгу ефективних антисмислових олігонуклеотидів добре відомі в даній галузі, див., наприклад, Но (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183, опис аналізу картування РНК, що оснований на стандартних молекулярних способах для забезпечення легкого і надійного способу відбору активної антисмислової послідовності. Також див. Smith (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.* 11:191-198.

В одному з аспектів як антисмислові олігонуклеотиди використовують одержані рекомбінантним способом або виділені нуклеїнові кислоти, що зустрічаються в природі. Антисмислові олігонуклеотиди можуть мати будь-яку довжину; наприклад, в альтернативних аспектах антисмислові олігонуклеотиди мають довжину приблизно від 5 до 100, приблизно від 10 до 80, приблизно від 15 до 60, приблизно від 18 до 40. Антисмислові олігонуклеотиди можуть являти собою одноланцюжкову або дволанцюжкову РНК або ДНК. Оптимальну довжину можна визначити стандартним скринінгом. Антисмислові олігонуклеотиди можуть бути присутніми у будь-якій концентрації. Оптимальну концентрацію можна визначити стандартним скринінгом. Відомий широкий спектр синтетичних аналогів нуклеотидів і нуклеїнових кислот, що не зустрічаються в природі, які можуть сприяти вирішенню цієї можливої проблеми. Наприклад, можна використовувати пептидні нуклеїнові кислоти (ПНК), що містять неіонні кістяки, такі як N-(2-аміноетил)гліцинові одиниці. Також можна використовувати антисмислові олігонуклеотиди, що містять фосфотіоатні зв'язки, як описано в WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 144:189-197; *Antisense Therapeutics*, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996). У даному документі надані антисмислові олігонуклеотиди, які містять синтетичні аналоги кістяка ДНК, що також можуть включати фосфодітіоатні, метилфосфонатні, фосфорамідатні, алкілфосфотіоефірні, сульфаматні, 3'-тіоацеталеві, метилен(метиліміно), 3'-N-карбаматні і морфолінокарбаматні нуклеїнові кислоти, як описано вище.

Можна використовувати способи комбінаторної хімії для створення великого числа олігонуклеотидів, серед яких можна швидко проводити скринінг на конкретні олігонуклеотиди, що мають придатну афінність і специфічність зв'язування з будь-якою мішенню, такою як смислові й антисмислові послідовності гідролаз за винаходом (див., наприклад, Gold (1995) *J. of Biol. Chem.* 270:13581-13584).

Інгібуючі рибозими

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані рибозими, здатні зв'язувати транскрипт гідролази, які можуть інгібувати гідролазну активність за допомогою націлювання на мРНК. Стратегії конструювання рибозимів і відбору специфічної до гідролази антисмислової послідовності для націлювання докладно описані в науковій і патентній літературі, і фахівець у даній галузі може сконструювати такі рибозими, використовуючи нові реактиви за винаходом. Рибозими діють за допомогою зв'язування з цільовою РНК через ділянку рибозиму для

зв'язування з цільовою РНК, яка розташована у безпосередній близькості до ферментативної ділянки РНК, яка розщеплює цільову РНК. Таким чином, рибозим розпізнає і зв'язує цільову РНК через спарювання комплементарних основ, і після зв'язування з правильною ділянкою виконує функцію ферменту для розщеплення й інактивації цільової РНК. Таким чином, розщеплення цільової РНК знищує її здатність керувати синтезом кодованого білка, якщо розщеплення відбувається в кодуючій послідовності. Після зв'язування і розщеплення цільової РНК рибозимом, він, як правило, звільняється від цієї РНК і, отже, може повторно зв'язувати і розщеплювати нові мішені.

У деяких випадках ферментативна природа рибозиму може бути переважніше інших способів, таких як антисмислова технологія (де молекула нуклеїнової кислоти просто зв'язує цільову нуклеїнову кислоту для блокування її транскрипції, трансляції або зв'язування з іншою молекулою), оскільки ефективна концентрація рибозиму, необхідна для здійснення терапевтичного впливу, може бути нижче концентрації антисмислового олігонуклеотиду. Ця можлива перевага відображує здатність рибозиму виконувати функцію ферменту. Таким чином, одна молекула рибозиму здатна розщепити декілька молекул цільової РНК. Крім того, як правило, рибозим являє собою високоспецифічний інгібітор, специфічність інгібування якого залежить не тільки від механізму зв'язування на основі спарювання основ, але також від механізму, за допомогою якого молекула інгібує експресію РНК, з якою вона зв'язується. Тобто, інгібування обумовлене розщепленням цільової РНК і, отже, специфічність визначають як відношення швидкості розщеплення цільової РНК до швидкості розщеплення нецільової РНК. Цей механізм розщеплення залежить від факторів, які доповнюють фактори, залучені в спарювання основ. Таким чином, специфічність дії рибозиму може бути вище, ніж у антисмислового олігонуклеотиду, що зв'язує ту ж ділянку РНК.

РНК молекулу ферментативного рибозиму можна сформувати у вигляді мотиву молота, але також можна сформувати у вигляді мотиву шпильки, вірусу гепатиту D, інтрона I або групи РНК, схожої на РНКазу Р (зв'язану з направляючою послідовністю РНК). Приклади таких мотивів молота описані в публікації Rossi (1992) *Aids Research and Human Retroviruses* 8:183; мотиви шпильки описані в публікаціях Hampel (1989) *Biochemistry* 28:4929, і Hampel (1990) *Nuc. Acids Res.* 18:299; мотив вірусу гепатиту D описаний у публікації Perrotta (1992) *Biochemistry* 31:16; мотив РНКазу Р описаний у публікації Guerrier-Takada (1983) *Cell* 35:849; і інтрон I групи описаний в публікації Sesh (патент США № 4987071). Перерахування цих конкретних мотивів не служить для обмеження; фахівцям у даній галузі зрозуміло, що ферментативна молекула РНК за винаходом може мати конкретний сайт зв'язування субстрату, комплементарний одній або декільком ділянкам РНК цільового гена, і містить нуклеотидну послідовність усередині цього сайту зв'язування або субстрату навколо нього, що наділяє молекулу активністю, що розщеплює РНК.

РНК-інтерференція (інтерферуєча РНК)

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані інгібуючі молекули РНК, так називані молекули "інтерферуєчої РНК", що містять послідовність гідролази за винаходом. Молекула інтерферуєчої РНК може містити молекулу дволанцюжкової РНК (длРНК), наприклад, міРНК і/або мкРНК. Інтерферуєча РНК може інгібувати експресію гена або транскрипту гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази). В одному з аспектів молекула інтерферуєчої РНК, наприклад, міРНК і/або мкРНК, має довжину приблизно в 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 або 30, або більше спарених нуклеотидів. Незважаючи на те, що винахід не обмежений яким-небудь конкретним механізмом дії, інтерферуєча РНК може входити в клітину і викликати руйнування одноланцюжкової РНК (олРНК) зі схожою або ідентичною послідовністю, включаючи ендегенну мРНК. Коли клітину піддають впливу дволанцюжкової РНК (длРНК), мРНК від гомологічного гена вибірково руйнується за допомогою процесу, який називають РНК-інтерференція. Можливий основний механізм дії інтерферуєчої РНК полягає в руйнуванні дволанцюжкової РНК (длРНК), що збігається з конкретною послідовністю гена, на короткі шматки, що називають малою інтерферуєчою РНК, які запускають руйнування мРНК, що збігається з їх послідовністю.

В одному з аспектів інтерферуєчу РНК за винаходом використовують у лікарських засобах для пригнічення експресії генів, див., наприклад, Shuey (2002) *Drug Discov. Today* 7:1040-1046. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи вибіркового руйнування РНК, використовуючи інтерферуєчу РНК. Цей процес можна здійснювати *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo*. В одному з аспектів молекули інтерферуєчої РНК за винаходом можна використовувати для створення мутації з втратою функції в клітині, органі або тварині. Способи одержання і використання молекул інтерферуєчої РНК для вибіркового руйнування РНК добре відомі в даній галузі, див., наприклад, патенти США №№ 6506559; 6511824; 6515109; 6489127.

Модифікація нуклеїнових кислот

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи створення варіантів нуклеїнових кислот, наприклад, які кодуєть гідролазу або антитіло за винаходом. Ці способи можна повторювати або використовувати в різних сполученнях для створення гідролаз або антитіл, що мають змінену або відмінну активність або змінену або відмінну стабільність стосовно тієї гідролази або антитіла, що кодує матрична нуклеїнова кислота. Ці способи також можна повторювати або використовувати в різних сполученнях, наприклад, для створення змін в експресії гена/транскрипту, трансляції транскрипту або стабільності транскрипту. В іншому аспекті змінюють генетичну склад клітини, наприклад, за допомогою модифікації гомологічного гена *ex vivo*, після чого його повторно вводять у клітину.

Термін "варіант" може включати полінуклеотиди або поліпептиди за винаходом, модифіковані в одній або декількох парах основ, кодонах, інтронах, екзонах або амінокислотних залишках (відповідно), при цьому зберігаючи біологічну активність гідролази за винаходом. Варіанти можна одержати за допомогою будь-якого числа засобів, включаючи такі способи як, наприклад, ПЛР, що допускає помилки, шафлінг, олігонуклеотид-специфічний мутагенез, складальна ПЛР, статевий ПЛР-мутагенез, мутагенез *in vivo*, касетний мутагенез, рекурсивний множинний мутагенез, експоненціальний множинний мутагенез, сайт-специфічний мутагенез, GeneReassembly, GSSMSM і будь-яке їх сполучення. Способи одержання варіантів гідролаз, що мають активність при рН або температурі, наприклад, які відрізняються від таких для гідролази дикого типу, включені в даний документ.

Нуклеїнову кислоту за винаходом можна змінювати будь-якими засобами. Наприклад, випадкові або стохастичні способи, або нестохастичні способи, або способи "спрямованої еволюції", див., наприклад, патент США № 6361974. Способи внесення випадкових мутацій у гени добре відомі в даній галузі, див., наприклад, патент США № 5830696. Наприклад, можна використовувати мутагени для внесення випадкових мутацій у ген. Мутагени включають, наприклад, ультрафіолетове світло або γ -випромінювання або хімічний мутаген, наприклад, мітоміцин, азотисту кислоту, фотоактивовані псоралени, окремо або в сполученні, щоб індукувати дефекти ДНК, що піддаються репарації за допомогою рекомбінації. Інші хімічні мутагени включають, наприклад, бісульфіт натрію, азотисту кислоту, гідроксиламін, гідразин або мурашину кислоту. Інші мутагени являють собою аналоги попередників нуклеотидів, наприклад, нітрозогуанідин, 5-бромурацил, 2-амінопурин або акридин. Ці засоби можна додавати в ПЛР замість попередника нуклеотиду, за допомогою чого вносити мутації в послідовність. Також можна використовувати інтеркалюючі засоби, такі як профлавін, акрифлавін, хінакрин і т. п.

Можна використовувати будь-який спосіб з молекулярної біології, наприклад, випадковий ПЛР-мутагенез, див., наприклад, Rice (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5467-5471; або множинний комбінаторний касетний мутагенез, див., наприклад, Cramer (1995) *Biotechniques* 18:194-196. Альтернативно, нуклеїнові кислоти, наприклад, гени, можна повторно збирати після випадкового, або "стохастичного", фрагментування, див., наприклад, патенти США №№ 6291242; 6287862; 6287861; 5955358; 5830721; 5824514; 5811238; 5605793. В альтернативних аспектах модифікації, вставки або делеції вводять за допомогою ПЛР, що допускає помилки, шафлінгу, олігонуклеотид-специфічного мутагенезу, складальної ПЛР, статевого ПЛР-мутагенезу, мутагенезу *in vivo*, касетного мутагенезу, рекурсивного множинного мутагенезу, експоненціального множинного мутагенезу, сайт-специфічного мутагенезу, Gene Site Saturation MutagenesisSM (GSSMSM), синтетичного перегрупування лігуванням (SLR або GeneReassembly), рекомбінації, рекурсивної рекомбінації послідовностей, мутагенезу модифікованої фосфотіоатом ДНК, мутагенезу матриці, що містить урацил, мутагенезу подвійної спіралі з розривами, точкового мутагенезу при репарації помилково спарених основ, мутагенезу в штамі-хазяїні з недостатністю репарації, хімічного мутагенезу, радіогенного мутагенезу, мутагенезу делецією, мутагенезу рестрикцією-відбором, мутагенезу рестрикцією-очищенням, синтезу штучних генів, множинного мутагенезу, створення мультимера химерної нуклеїнової кислоти і/або сполучення цих і інших способів.

У наступних публікаціях описані різні процедури і/або способи рекурсивної рекомбінації, які можна вводити в способи за винаходом: Stemmer (1999) "Molecular selection of viruses for targeting and other clinical properties" *Tumor Targeting* 4:1-4; Ness (1999) *Nature Biotechnology* 17:893-896; Chang (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:793-797; Minshull (1999) "Protein evolution by molecular selection" *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290; Christians (1999) "Directed Evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:259-264; Cramer (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution" *Nature* 391:288-291; Cramer (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling" *Nature*

Biotechnology 15:436-438; Zhang (1997) "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Patten et al. (1997) "Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines" *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733; Cramer et al. (1996) "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling" *Nature Medicine* 2:100-103; Gates et al. (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer'" *Journal of Molecular Biology* 255:373-386; Stemmer (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" In: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, New York, pp.447-457; Cramer and Stemmer (1995) "Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes" *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer et al. (1995) "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides" *Gene*, 164:49-53; Stemmer (1995) "The Evolution of Molecular Computation" *Science* 270: 1510; Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" *Nature* 370:389-391; i Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

Мутаційні способи створення різноманіття включають, наприклад, сайт-специфічний мутагенез (Ling et al. (1997) "Approaches to DNA mutagenesis: an overview" *Anal Biochem.* 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using phosphorothioate method" *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith (1985) "In vitro mutagenesis" *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" *Science* 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" *Biochem. J.* 237:1-7; i Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin)); мутагенез з використанням матриць, що містять урацил (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Methods in Enzymol.* 154, 367-382; i Bass et al. (1988) "Mutant Tip repressors with new DNA-binding specificities" *Science* 242:240-245); олігонуклеотид-специфічний мутагенез (*Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 100:468-500; i Zoller & Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" *Methods in Enzymol.* 154:329-350); мутагенез модифікованої фосфотіоатом ДНК (Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; i Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814); мутагенез з використанням двониткової ДНК із пропускками (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456; Kramer & Fritz (1987) *Methods in Enzymol.* "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer et al. (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" *Nucl. Acids Res.* 16: 7207; and Fritz et al. (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999).

Додаткові протоколи, використовувані в способах за винаходом, включають точкову репарацію помилково спарених основ (Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" *Cell* 38:879-887), мутагенез з використанням штамів-хазяїнів з недостатністю репарації (Carter et al. (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443; i Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 154: 382-403), мутагенез делеціями (Eghtedarzadeh (1986) "Use of oligonucleotides to generate large deletions" *Nucl. Acids Res.* 14: 5115), рестрикцію-відбір і рестрикцію-очищення (Wells et al. (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423), мутагенез шляхом синтезу цілого гена

(Nambiar et al. (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" Science 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana (1988) "Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)" Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372; Wells et al. (1985) "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites" Gene 34:315-323; i Grundstrom et al. (1985) "Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis" Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316), репарацію дволанцюжкових розривів (Mandecki (1986); Arnold (1993) "Protein engineering for unusual environments" Current Opinion in Biotechnology 4:450-455. "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181). Додаткові подробиці стосовно багатьох зазначених вище способів можна знайти в Methods in Enzymology Volume 154, у якому також описані ефективні способи контролю для пошуку й усунення проблем, пов'язаних з різними способами одержання мутацій.

Додаткові протоколи, використовувані в способах за винаходом включають ті, які розглянуті в патенті США № 5605793 Stemmer (Feb. 25, 1997) "Methods for In vitro Recombination"; патенті США № 5811238 Stemmer et al. (Sep. 22, 1998) "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; патенті США № 5830721 Stemmer et al. (Nov. 3, 1998), "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; патенті США № 5834252 Stemmer, et al. (Nov. 10, 1998) "End-Complementary Polymerase Reaction"; патенті США № 5837458 Minshull, et al. (Nov. 17, 1998) "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; WO 95/22625, Stemmer and Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; WO 96/33207 Stemmer and Lipschutz "End Complementary Polymerase Chain Reaction"; WO 97/20078 Stemmer and Cramer "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; WO 97/35966 Minshull and Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; WO 99/41402 Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors"; WO 99/41383 Punnonen et al. "Antigen Library Immunization"; WO 99/41369 Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering"; WO 99/41368 Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines"; EP 752008 Stemmer and Cramer, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; EP 0932670 Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination"; WO 99/23107 Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling"; WO 99/21979 Apt et al., "Human Papillomavirus Vectors"; WO 98/31837 del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination"; WO 98/27230 Patten and Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering"; WO 98/27230 Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection", WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries", WO 00/09679, "Methods for Obtaining in vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences", WO 98/42832 Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers", WO 99/29902 Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences", WO 98/41653 Vind, "An in vitro Method for Construction of a DNA Library", WO 98/41622 Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling" i WO 98/42727 Pati and Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination".

Протоколи, які можна використовувати (надані подробиці, що стосуються різних способів створення різноманітності), описані, наприклад, у патентній заявці США № (USN) 09/407800, "SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES" Patten et al., що подана 28 вересня 1999 року; "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" del Cardayre et al., патенті США № 6379964; "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" Cramer et al., патентах США №№ 6319714; 6368861; 6376246; 6423542; 6426224 i PCT/US00/01203; "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" Welch et al., патенті США № 6436675; "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" Selifonov et al., що поданий 18 січня 2000 року, (PCT/US00/01202) i, наприклад, "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" Selifonov et al., що поданий 18 липня 2000 року (США № 09/618579); "METHODS OF POPULATING DATA STRECTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" Selifonov and Stemmer, що поданий 18 січня 2000 року (PCT/US00/01138); i "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" Affholter, що поданий 6 вересня 2000 року (США № 09/656549); i в патентах США №№ 6177263; 6153410.

Нестохастичні способи, або способи "спрямованої еволюції", включають, наприклад, Gene Site Saturation MutagenesisSM (GSSMSM), синтетичне перегрупування лігуванням (SLR або GeneReassembly) або їх сполучення використовують для модифікації нуклеїнових кислот за винаходом, для створення гідролаз з новими або зміненими властивостями (наприклад, активність при крайніх кислих або лужних умовах, високих температурах і т. п.). Скринінг поліпептидів, кодованих модифікованими нуклеїновими кислотами, на активність можна проводити перед тестуванням на протеолітичну або іншу активність. Можна використовувати будь-який спосіб або протокол тестування, наприклад, використовувати платформу капілярного блока. Див., наприклад, патенти США №№ 6361974; 6280926; 5939250.

Насичувальний мутагенез або технологія GSSMSM

В одному з аспектів за винаходом, нестохастичну модифікацію генів, "спрямований еволюційний процес", використовують для створення гідролаз і антитіл з новими або зміненими властивостями. Різновиди цього способу названі "Gene Site Saturation Mutagenesis", "сайт-насичувальний мутагенез", "насичувальний мутагенез" або просто "GSSMSM". Їх можна використовувати в сполученні з іншими процесами створення мутацій. В одному з аспектів у даному документі надані способи одержання ферментів і антитіл, використовуючи технологію GSSMSM, наприклад, як описано в даному документі, а також у патентах США №№ 6171820; 6579258; 6238884.

В одному з аспектів технологія GSSMSM включає надання матричного полінуклеотиду і декількох олігонуклеотидів, де кожен олігонуклеотид містить послідовність, гомологічну матричному полінуклеотиду, за допомогою чого здійснюють націлювання на конкретну послідовність матричного полінуклеотиду, і послідовність, що є варіантом гомологічного гена; створення дочірніх полінуклеотидів, що містять нестохастичні зміни послідовності за допомогою реплікації матричного полінуклеотиду з олігонуклеотидами, за допомогою чого створюють полінуклеотиди, що містять зміни послідовності гомологічного гена.

В одному з аспектів праймери, що містять кодони з виродженою послідовністю N,N,G/T, використовують для введення точкових мутацій у полінуклеотид для того, щоб створити набір дочірніх поліпептидів, у яких представлений повний спектр заміни однієї амінокислоти в кожному положенні амінокислоти, наприклад, амінокислотного залишку в активному центрі ферменту або сайті зв'язування ліганду, на який націлена модифікація. Ці олігонуклеотиди можуть містити суміжно першу гомологічну послідовність, вироджену послідовність N,N,G/T і необов'язково другу гомологічну послідовність. Дочірні продукти трансляції в 5'-3' напрямку від використання таких олігонуклеотидів містять усі можливі амінокислотні заміни в кожному амінокислотному положенні уздовж поліпептиду, оскільки виродженість послідовності N,N,G/T включає кодони для всіх 20 амінокислот. В одному з аспектів один такий вироджений олігонуклеотид (що містить, наприклад, одну вироджену касету N,N,G/T) використовують для введення в кожен вихідний кодон у вихідній полінуклеотидній матриці повного спектра заміни кодонів. В іншому аспекті використовують щонайменше дві вироджені касети, або в тому самому олігонуклеотиді, або в різних, щоб ввести щонайменше у вихідних кодонах у вихідній полінуклеотидній матриці повний спектр заміни кодонів. Наприклад, один олігонуклеотид може містити більше однієї послідовності N,N,G/T для введення амінокислотних мутацій більше ніж в один сайт. Ці декілька послідовностей N,N,G/T можуть бути розташовані безпосередньо або суміжно розділені однією або декількома додатковими нуклеотидними послідовностями. В іншому аспекті олігонуклеотиди, придатні для введення вставок і делецій, можна використовувати або окремо, або в сполученні з кодонами, що містять послідовність N,N,G/T, щоб вводити в будь-якому сполученні або комбінації амінокислотні вставки, делеції і/або заміни.

В одному з аспектів виконують одночасний мутагенез у двох або більше суміжних амінокислотних положеннях з використанням олігонуклеотиду, що містить суміжні триплети N,N,G/T, тобто, вироджену послідовність (N,N,G/T)_n. В іншому аспекті використовують вироджені касети, що мають меншу виродженість, ніж послідовність N,N,G/T. Наприклад, у деяких випадках може бути бажаним використовувати (наприклад, в олігонуклеотиді) вироджену послідовність триплету, що включає тільки один N, де зазначений N може знаходитися в першому, другому або третьому положенні триплету. В інших двох положеннях триплету можна використовувати будь-які інші основи, включаючи будь-які їх сполучення і комбінації. Альтернативно, у деяких випадках може бути бажаним використовувати (наприклад, в олігонуклеотиді) вироджену послідовність триплету N,N,N.

В одному з аспектів використання вироджених триплетів (наприклад, триплетів N,N,G/T) надає можливість системного і легкого створення повного спектра можливих природних амінокислот (всього 20 амінокислот) у кожному і будь-якому амінокислотному положенні в поліпептиді (в альтернативних аспектах способи також включають створення менше ніж усіх

можливих заміні у положенні амінокислотного залишку або кодону). Наприклад, для поліпептиду довжиною 100 амінокислот можна створити 2000 різних видів (тобто, 20 можливих амінокислот в одному положенні \times 100 амінокислотних положень). Шляхом використання олігонуклеотиду або набору олігонуклеотидів, що містять вироджений триплет N,N,G/T, 32 окремі послідовності можуть кодувати всі 20 можливих природних амінокислот. Таким чином, у реакційній посудині, у якій вихідну поліпептидну послідовність піддають насичувальному мутагенезу з використанням щонайменше одного такого олігонуклеотиду, створюють 32 різних дочірніх поліпептидів, що кодують 20 чітко виражених поліпептидів. На відміну від цього, використання невиродженого олігонуклеотиду в сайт-специфічному мутагенезі веде тільки до одного дочірнього поліпептидного продукту в одній реакційній посудині. Невироджені олігонуклеотиди необов'язково можна використовувати в сполученні з описаними виродженими праймерами; наприклад, невироджені олігонуклеотиди можна використовувати для створення конкретних точкових мутацій у працюючому поліпептиді. Це надає засіб для створення конкретних точкових мовчазних мутацій, точкових мутацій, що ведуть до відповідних амінокислотних заміні, і точкових мутацій, що є причиною утворення стоп-кодонів і відповідної експресії поліпептидних фрагментів.

В одному з аспектів кожна реакційна посудина для насичувального мутагенезу містить поліпептиди, що кодують щонайменше 20 таких дочірніх поліпептидних молекул (наприклад, гідролаз, наприклад, ліпаз, сатураз, пальмітаз і/або стеаратаз) так, що всі 20 природних амінокислот представлені в одному конкретному амінокислотному положенні, яке відповідає положенню кодону, що мутував у вихідному поліпептиді (в інших аспектах використовують менше ніж усі 20 природних сполучень). Можна провести клональну ампліфікацію 32-кратних вироджених дочірніх поліпептидів, створених у кожній реакційній посудині для насичувального мутагенезу (наприклад, клонувати у придатний організм-хазяїн, наприклад, в організм-хазяїн *E. coli*, використовуючи, наприклад, експресуючий вектор), і провести скринінг експресії. Коли за допомогою скринінгу встановлюють, що окремий дочірній поліпептид виявляє сприятливу зміну властивості (у порівнянні з вихідним поліпептидом, таке як підвищена вибірковість гідролітичного розщеплення складних ефірів пальмітинової кислоти в порівнянні зі складними ефірами олеїнової кислоти), його можна секвенувати для ідентифікації відповідної сприятливої амінокислотної заміни, що міститься в ньому.

В одному з аспектів, при введенні мутацій у будь-яке і кожне амінокислотне положення у вихідному поліпептиді з використанням насичувального мутагенезу, як описано в даному документі, сприятливі амінокислотні заміни можна ідентифікувати більше ніж в одному амінокислотному положенні. Можна створити одну або декілька нових дочірніх молекул, що містять сполучення з усіх або частини цих сприятливих амінокислотних заміні. Наприклад, якщо ідентифікують 2 конкретні сприятливі амінокислотні заміни в кожному з 3 амінокислотних положень у поліпептиді, то комбінації включають 3 можливості в кожному положенні (зміна вихідної амінокислоти відсутня і кожна з двох сприятливих заміні) і 3 положення. Таким чином, можливі всього $3 \times 3 \times 3$ або 27 можливостей, включаючи 7 раніше досліджених - 6 одиночних точкових мутацій (тобто, по 2 у кожному із трьох положень) і відсутність змін у якому-небудь положенні.

В іншому аспекті сайт-насичувальний мутагенез можна використовувати разом з іншими стохастичними або нестохастичними засобами для зміни послідовності, наприклад, із синтетичним перегрупуванням лігуванням (див. нижче), шафлінгом, химеризацією, рекомбінацією й іншими процесами і засобами для створення мутацій. У даному документі наданий процес(и) для створення мутацій, включаючи насичувальний мутагенез, які використовують повторно.

Синтетичне перегрупування лігуванням (SLR)

В одному з аспектів у даному документі надані системи нестохастичної модифікації генів, названі "синтетичним перегрупуванням лігуванням" або просто "SLR", також відомі як технологія "GeneReassembly", "спрямований еволюційний процес", для створення поліпептидів, наприклад, ферментів (таких як гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) або антитіл за винаходом, з новими або зміненими властивостями. SLR представляє спосіб нестохастичного лігування олігонуклеотидних фрагментів разом. Цей спосіб відрізняється від стохастичного шафлінгу олігонуклеотидів тим, що будівельні блоки нуклеїнової кислоти не перетасовують, зчіплюють або химеризують випадковим чином, а збирають нестохастично. Див., наприклад, патенти США №№ 6773900; 6740506; 6713282; 6635449; 6605449; 6537776.

В одному з аспектів SLR включає наступні стадії: (а) надання матричного поліпептиду, де матричний поліпептид містить послідовність, що кодує гомологічний ген; (б) надання декількох поліпептидних будівельних блоків, де поліпептидні будівельні блоки

сконструйовані для перехресного перегруповування з матричним полінуклеотидом у попередньо визначеній послідовності, і полінуклеотидний будівельний блок містить послідовність, що являє собою варіант гомологічного гена, і послідовність, гомологічну матричному полінуклеотиду, що фланкує послідовність варіанта; (с) об'єднання полінуклеотидного будівельного блока з матричним полінуклеотидом так, що полінуклеотидний будівельний блок перехресно перегруповується з матричним полінуклеотидом для створення полінуклеотидів, що містять зміни послідовності гомологічного гена.

SLR не залежить від наявності високих рівнів гомології між полінуклеотидами, що підлягають перегруповуванню. Таким чином, цей спосіб можна використовувати для нестохастичного створення бібліотек (або наборів) дочірніх молекул, що містять більше 10^{100} різних химер. SLR можна використовувати для створення бібліотек, що містять більш 10^{1000} різних дочірніх химер. В одному з аспектів у даному документі надані нестохастичні способи одержання набору закінчених химерних молекул нуклеїнових кислот, які мають загальний порядок збирання, що вибраний за допомогою конкретних будівельних блоків з нуклеїнових кислот, що мають придатні взаємно сумісні ліговані кінці, і збирання цих будівельних блоків з нуклеїнових кислот так, що досягається задуманий загальний порядок збирання.

Взаємно сумісні ліговані кінці будівельних блоків з нуклеїнових кислот, що підлягають збиранню, вважаються "придатними" для цього типу упорядкованого збирання, якщо вони дозволяють з'єднувати будівельні блоки в попередньо визначеному порядку. Таким чином, загальний порядок збирання, у якому можна з'єднати будівельні блоки з нуклеїнових кислот, точно визначається конструкцією лігованих кінців. Якщо використовують більше ніж одну стадію збирання, то загальний порядок збирання, у якому можна з'єднати будівельні блоки з нуклеїнових кислот, також визначається послідовністю стадій збирання. В одному з аспектів ренатуровані будівельні елементи обробляють ферментом, таким як лігаза (наприклад, ДНК-лігаза Т4), щоб домогтися ковалентного зв'язування будівельних елементів.

В одному з аспектів конструкцію олігонуклеотидних будівельних блоків одержують за допомогою аналізу набору батьківських матричних послідовностей нуклеїнових кислот, що виконують функцію основи для одержання дочірнього набору закінчених химерних полінуклеотидів. Таким чином, ці вихідні олігонуклеотидні матриці виконують функцію джерела інформації про послідовність, що допомагає в конструюванні будівельних блоків з нуклеїнових кислот, які підлягають введенню мутацій, наприклад, підлягають химеризації або шафлінгу. В одному з аспектів цього способу послідовності декількох вихідних матриць нуклеїнових кислот вирівнюють для того, щоб вибрати одну або декілька точок розмежування. Точки розмежування можуть розміщатися в галузі гомології і складатися з одного або декількох нуклеотидів. Альтернативно, ці точки розмежування є загальними щонайменше для двох батьківських матриць. За допомогою цього точки розмежування можна використовувати для визначення границь олігонуклеотидних будівельних блоків, що повинні бути створені для того, щоб перегрупувати вихідні полінуклеотиди. Точки розмежування, ідентифіковані й вибрані в батьківських молекулах, виконують функцію можливих точок химеризації при збиранні кінцевих химерних дочірніх молекул. Точка розмежування може являти собою галузь гомології (що складається щонайменше з однієї гомологічної нуклеотидної основи), яка є загальною щонайменше для двох вихідних полінуклеотидних послідовностей. Альтернативно, точка розмежування може являти собою галузь гомології, яка є загальною щонайменше для половини вихідних полінуклеотидних послідовностей, або вона може являти собою галузь гомології, яка є загальною щонайменше для двох третин вихідних полінуклеотидних послідовностей. В альтернативних варіантах здійснення придатна точка розмежування являє собою галузь гомології, яка є загальною щонайменше для трьох чвертей вихідних полінуклеотидних послідовностей, або вона може бути загальною майже для усіх вихідних полінуклеотидних послідовностей. В одному з аспектів точка розмежування являє собою галузь гомології, яка є загальною для усіх вихідних полінуклеотидних послідовностей.

В одному з аспектів, процес перегруповування лігуванням виконують повною мірою для того, щоб створити вичерпну бібліотеку дочірніх химерних полінуклеотидів. Іншими словами, усі можливі упорядковані сполучення будівельних блоків з нуклеїнових кислот представлені в наборі закінчених химерних молекул нуклеїнових кислот. У той же час в іншому аспекті порядок збирання (тобто, порядок збирання всіх будівельних блоків у 5'-3' напрямку в кожній закінченій химерній нуклеїновій кислоті) у кожному сполученні є навмисним (або нестохастичним), як описано вище. У даному документі надані нестохастичні способи, що знижують імовірність одержання небажаних побічних продуктів.

В іншому аспекті спосіб перегрупування лігуванням виконують систематично. Наприклад, спосіб виконують для того, щоб створити систематично розділену бібліотеку дочірніх молекул, з компартментами, скринінг яких можна проводити систематично, наприклад, по черзі. У даному документі надані способи, які включають вибіркове і доцільне використання конкретних будівельних блоків з нуклеїнових кислот у сполученні з вибіркочним і доцільним використанням реакцій збирання, що ідуть послідовно, і можна створити конструкцію, причому в кожній з декількох реакційних посудин одержують конкретні набори дочірніх продуктів. Це дозволяє проводити систематичне дослідження і процедуру скринінгу. Таким чином, ці способи дозволяють систематично досліджувати теоретично дуже велике число дочірніх молекул невеликими групами. Через їх здатність виконувати химеризацію дуже гнучким, а також вичерпним і систематичним чином, конкретно при низькому рівні гомології з батьківськими молекулами, ці способи передбачають створення бібліотеки (або набору), що складається з великого числа дочірніх молекул. У силу нестохастичної природи поточних способів перегрупування лігуванням, створені дочірні молекули можуть містити бібліотеку закінчених химерних молекул нуклеїнової кислоти, що мають загальний порядок збирання, який вибраний навмисно.

Насичувальний мутагенез і способи оптимізованої спрямованої еволюції також можна використовувати для створення різних категорій дочірніх молекул.

В одному з аспектів у даному документі способи передбачають свободу вибору і контроль стосовно вибору точок розмежування, розміру і числа будівельних блоків з нуклеїнових кислот і розміру і конфігурації сполуки. Вимоги до міжмолекулярної гомології можна значно знизити. Фактично, точки розмежування можна вибрати навіть в галузях невеликої міжмолекулярної гомології або в галузях, де гомологія відсутня. Наприклад, у силу неоднозначності кодону, тобто, виродженості кодонів, нуклеотидні заміни можна вводити в будівельні блоки з нуклеїнових кислот без зміни амінокислоти, початково закодованої у відповідній батьківській матриці. Альтернативно, кодон можна змінити так, що зміниться кодування вихідної амінокислоти. В одному з аспектів заміни можна вводити в будівельний блок з нуклеїнової кислоти для того, щоб збільшити вміст міжмолекулярних гомологічних точок розмежування і, таким чином, збільшити число з'єднань, які можна виконати між будівельними блоками, що у свою чергу дозволяє створити більше число дочірніх химерних молекул.

В іншому аспекті синтетична природа стадії, на якій створюють будівельні блоки, дозволяє проектувати і вводити нуклеотиди (наприклад, один або декілька нуклеотидів, що можуть являти собою, наприклад, кодони або інтрони, або регуляторні послідовності), які пізніше можна необов'язково видалити в процесі *in vitro* (наприклад, за допомогою мутагенезу) або в процесі *in vivo* (наприклад, використовуючи здатність організму-хазяїна до сплайсингу генів). Важливо, що в багатьох випадках введення цих нуклеотидів також може бути бажаним з багатьох інших причин на доповнення до потенційної вигоди створення придатної точки розмежування.

В одному з аспектів будівельний блок з нуклеїнової кислоти використовують для введення інтрона. Таким чином, функціональні інтрони вводять у синтетичний ген, одержаний відповідно до способів, описаних у даному документі. Штучно введений інтрон(и) може брати участь у сплайсингу генів у клітинах-хазяїнах приблизно таким же чином, як інтрони, що зустрічаються в природі, беруть участь у сплайсингу генів.

Система оптимізованої спрямованої еволюції

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані системи нестохастичної модифікації генів, названі "системи оптимізованої спрямованої еволюції", для створення гідролази й антитіл з новими або зміненими властивостями. Оптимізована спрямована еволюція спрямована на використання повторюваних циклів редутивного пересортування, рекомбінації і відбору, що дозволяють здійснювати спрямовану молекулярну еволюцію нуклеїнових кислот за допомогою рекомбінації. Оптимізована спрямована еволюція дозволяє створювати велику популяцію химерних послідовностей, що еволюціонували, де створена популяція в значній мірі збагачена послідовностями, що мають попередньо визначене число подій перехреста.

Подія перехреста являє собою точку в химерній послідовності, де в послідовності відбувається переключення з одного вихідного варіанта на інший вихідний варіант. Звичайно така точка розташована в місці з'єднання, де олігонуклеотиди від двох батьків лігують разом, щоб одержати одну послідовність. Цей спосіб дозволяє обчислити правильні концентрації олігонуклеотидних послідовностей для того, щоб збагатити кінцеву химерну популяцію послідовностей вибраним числом подій перехреста. Це забезпечує більший контроль у виборі химерних варіантів, що мають попередньо визначене число подій перехреста.

Крім того, цей спосіб надає придатні засоби для дослідження простору можливих варіантів білків дуже великих розмірів у порівнянні з іншими системами. Раніше, створивши в ході реакції, наприклад, 10^{13} химерних молекул, було надзвичайно важко тестувати таке велике число химерних варіантів на конкретну активність. Крім того, значна частина дочірньої популяції буде мати дуже велике число подій перехреста, що приведе до білків, що з меншою імовірністю будуть мати підвищені рівні конкретної активності. Використовуючи ці способи, популяцію химерних молекул можна збагатити тими варіантами, які мають конкретне число подій перехреста. Таким чином, незважаючи на те, що в ході реакції все ж таки можна створити 10^{13} химерних молекул, кожна молекула, вибрана для подальшого аналізу, з більшою імовірністю має, наприклад, тільки три події перехреста. Оскільки одержану дочірню популяцію можна змінити убік попередньо визначеного числа подій перехреста, границі функціональної різноманітності між химерними молекулами звужені. Це дозволяє краще контролювати число змінних при обчисленні того, який олігонуклеотид з вихідних полінуклеотидів може відповідати за зміну конкретної ознаки.

Один спосіб створення послідовності химерного дочірнього полінуклеотиду полягає в створенні олігонуклеотидів, що відповідають фрагментам або частинам кожної вихідної послідовності. В альтернативних варіантах здійснення кожен олігонуклеотид включає унікальну ділянку перекриття з тим, щоб змішування олігонуклеотидів разом приводило до нового варіанта, що містить кожен олігонуклеотидний фрагмент, розташований у правильному порядку. Альтернативно, протоколи для здійснення цих способів за винаходом можна знайти в патентах США №№ 6773900; 6740506; 6713282; 6635449; 6605449; 6537776; 6361974.

Число олігонуклеотидів, створених для кожного вихідного варіанта, дає зв'язок із загальним числом одержаних перехрестів у химерній молекулі, створеній в кінцевому рахунку. Наприклад, можна надати три варіанти вихідної нуклеотидної послідовності для проведення реакції лігування для того, щоб знайти химерний варіант, що має, наприклад, більш високу активність при високій температурі. Як один з прикладів можна створити набір з 50 олігонуклеотидних послідовностей, що відповідають кожній частині кожного вихідного варіанта. Таким чином, у ході процесу перегрупування лігуванням у кожній з химерних послідовностей можуть мати місце аж до 50 подій перехреста. Дуже низка імовірність того, що кожен зі створених химерних полінуклеотидів буде містити олігонуклеотиди з кожного вихідного варіанта в альтернативному порядку. Якщо кожен олігонуклеотидний фрагмент присутній у реакції лігування в рівній молярній кількості, існує імовірність того, що в деяких положеннях олігонуклеотиди з того самого вихідного полінуклеотиду будуть ліговані один за одним і, таким чином, це не приведе до події перехреста. Якщо в цьому прикладі концентрацію кожного олігонуклеотиду з кожного батьківського полінуклеотиду зберігають постійною в ході стадії лігування, існує імовірність, що дорівнює $1/3$ (передбачаючи 3 батьківських полінуклеотиди), що олігонуклеотид з того самого вихідного варіанта буде лігований у химерній послідовності і не приведе до утворення перехреста.

Таким чином, можна визначити функцію густини імовірності (ФГІ) для передбачення популяції подій перехреста, що ймовірно відбудуться в ході кожної стадії в реакції лігування при заданому числі вихідних варіантів, числі олігонуклеотидів, що відповідає кожному варіанту, і концентраціях кожного варіанта в ході кожної стадії в реакції лігування. Статистичний і математичний аспекти визначення ФГІ описані нижче. Використовуючи ці способи, можна обчислити таку функцію густини імовірності і, таким чином, збагатити химерну дочірню популяцію попередньо визначеним числом подій перехреста в результаті конкретної реакції лігування. Крім того, попередньо можна визначити цільове число подій перехреста, і потім запрограмувати систему на обчислення стартових кількостей кожного вихідного олігонуклеотиду в ході кожної стадії в реакції лігування, щоб одержати функцію густини імовірності, що зосереджена на попередньо визначеному числі подій перехреста. Ці способи спрямовані на використання повторюваних циклів редуکتивного пересортування, рекомбінації і відбору, які дозволяють здійснювати спрямовану молекулярну еволюцію нуклеїнових кислот, що кодуєть поліпептиди, за допомогою рекомбінації. Ця систем дозволяє створювати велику популяцію химерних послідовностей, що еволюціонували, де створена популяція в значній мірі збагачена послідовностями, що мають попередньо визначене число подій перехреста. Подія перехреста являє собою точку в химерній послідовності, де в послідовності відбувається переключення з одного вихідного варіанта на інший вихідний варіант. Звичайно така точка розташована в місці з'єднання, де олігонуклеотиди від двох батьків лігують разом, щоб одержати одну послідовність. Спосіб дозволяє обчислити правильні концентрації олігонуклеотидних послідовностей для того, щоб збагатити кінцеву химерну популяцію послідовностей вибраним числом подій перехреста. Це забезпечує більший контроль у виборі химерних варіантів, що мають попередньо визначене

число подій перехреста.

Визначення подій перехреста

Аспекти за винаходом включають систему і програмне забезпечення, які як вхідні дані одержують бажану функцію густини імовірності (ФГІ) перехрестів, число батьківських генів, що підлягають перегрупованню, і число фрагментів у перегрупованні. Вихідними даними цієї програми є "ФГІ фрагментів", яку можна використовувати для визначення складу для одержання перегрупованих генів, і ФГІ передбачуваних перехрестів цих генів. Описану в даному документі обробку альтернативно виконують, використовуючи MATLAB™ (The Mathworks, Natick, Massachusetts), мову програмування і середовище розробки для промислових обчислень.

Ітеративні процеси

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані процеси, які можна повторювати ітеративно. Наприклад, ідентифікують нуклеїнову кислоту (або конкретну нуклеїнову кислоту), що відповідає за змінений фенотип гідролази або антитіла, повторно виділяють, знову модифікують, повторно тестують на активність. Цей процес можна повторювати ітеративно доти, поки не буде сконструйований бажаний фенотип. Наприклад, у клітині можна сконструювати цілий біохімічний анаболічний або катаболічний шлях, що включає протеолітичну активність.

Подібним чином, якщо встановлено, що конкретний олігонуклеотид зовсім не здійснює впливу на бажану ознаку (наприклад, новий фенотип гідролази), його можна усунути як змінну за допомогою синтезу більш довгих вихідних олігонуклеотидів, які включають послідовність, що підлягає усуненню. Оскільки вбудовування послідовності усередині більш довгої послідовності запобігає будь-яким подіям перехреста, у дочірніх поліонуклеотидах будуть відсутні будь-які зміни, пов'язані з цією послідовністю. Цей ітеративний спосіб визначення тих олігонуклеотидів, які найбільшою мірою пов'язані з бажаною ознакою і які не пов'язані, дозволяє більш ефективно досліджувати всі можливі варіанти білків, що можуть забезпечувати конкретну ознаку або активність.

Шафлінг in vivo

Шафлінг in vivo молекул використовують у способах за винаходом, які надають варіанти представлених у даному документі поліпептидів, наприклад, антитіл, гідролаз і т. п. Шафлінг in vivo можна здійснювати, використовуючи природну властивість клітин здійснювати рекомбінацію мультимерів. Тоді як рекомбінація in vivo забезпечує основний природний шлях до молекулярної різноманітності, генетична рекомбінація залишається відносно складним процесом, який включає 1) розпізнавання гомології; 2) розщеплення ниток, впровадження ниток і метаболічні стадії, що ведуть до одержання рекомбінантної хіазми; і, нарешті, 3) дозвіл хіазми на окремі рекомбіновані молекули. Формування хіазми вимагає розпізнавання гомологічних послідовностей.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи одержання гібридного поліонуклеотиду щонайменше з першого поліонуклеотиду і другого поліонуклеотиду. В інших варіантах здійснення в даному документі надані способи, використовувані для одержання гібридного поліонуклеотиду за допомогою введення щонайменше першого поліонуклеотиду і другого поліонуклеотиду, які мають щонайменше одну загальну ділянку часткової гомології послідовностей, у придатну клітину-хазіяна. Ділянки часткової гомології послідовностей сприяють процесам, які ведуть до реорганізації послідовностей з одержанням гібридного поліонуклеотиду. В одному з аспектів термін "гібридний поліонуклеотид" охоплює будь-які нуклеотидні послідовності, одержані в результаті способу за винаходом, і в одному з варіантів здійснення включає послідовності щонайменше з двох вихідних поліонуклеотидних послідовностей. Такі гібридні поліонуклеотиди можна одержати в результаті подій міжмолекулярної рекомбінації, що сприяють інтеграції послідовностей між молекулами ДНК. Крім того, такі гібридні поліонуклеотиди можна одержати в результаті процесу внутрішньомолекулярного редуکتивного пересортювання, у якому використовують повторювані послідовності для зміни нуклеотидної послідовності в молекулі ДНК.

Одержання варіантів послідовностей

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи одержання варіантів послідовностей нуклеїнових кислот і послідовностей гідролаз і антитіл за винаходом або виділення гідролаз з використанням нуклеїнових кислот і наданих у даному документі поліпептидів. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані варіанти гена гідролази за винаходом, який можна змінювати будь-якими засобами, включаючи, наприклад, випадкові або стохастичні способи або нестохастичні способи, або "спрямовану еволюцію", як описано вище.

У даному документі надані способи створення варіанта нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який має гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, які включають стадії: (a) надання матричної нуклеїнової кислоти, що містить нуклеїнову кислоту за винаходом; і (b) модифікація, видалення або додавання одного або декількох нуклеотидів у матричній послідовності або їх сполучення для створення варіанта матричної нуклеїнової кислоти. В одному з аспектів спосіб додатково може включати експресію варіанта нуклеїнова кислота для створення варіанта поліпептиду гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази. Модифікації, вставки або делеції можна вводити способом, який включає ПЛР, що допускає помилки, шафлінг, олігонуклеотид-специфічний мутагенез, складальну ПЛР, статевий ПЛР-мутагенез, мутагенез *in vivo*, касетний мутагенез, рекурсивний множинний мутагенез, експоненціальний множинний мутагенез, сайт-специфічний мутагенез, Gene Site Saturation MutagenesisSM (GSSMSM), синтетичне перегрупування лігуванням (SLR або GeneReassembly) або їх сполучення. В іншому аспекті модифікації, вставки або делеції вводять способом, який включає рекомбінацію, рекурсивну рекомбінацію послідовностей, мутагенез модифікованої фосфотіоатом ДНК, мутагенез матриці, що містить урацил, мутагенез подвійної спіралі з розривами, точковий мутагенез при репарації помилково спарених основ, мутагенез у штамі-хазяїні з недостатністю репарації, хімічний мутагенез, радіогенний мутагенез, мутагенез делецією, мутагенез рестрикцією-відбором, мутагенез рестрикцією-очищенням, синтез штучних генів, множинний мутагенез, створення мультимера химерної нуклеїнової кислоти і їх сполучення.

В одному з аспектів, спосіб можна повторювати ітеративно доти, поки не буде одержана гідролаза, наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза, що має змінену або відмінну активність або змінену або відмінну стабільність стосовно того поліпептиду, який кодує матрична нуклеїнова кислота. В одному з аспектів варіант поліпептиду гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, є термостабільним і частково зберігає активність після впливу підвищеної температури. В іншому аспекті варіант поліпептиду гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, має підвищене глікозилювання у порівнянні з гідролазою, наприклад, ліпазою, сатуразою, пальмітазою і/або стеаратазою, кодованою матричною нуклеїновою кислотою. Альтернативно, варіант поліпептиду гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, має гідролазну, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну, активність при високій температурі, де гідролаза, наприклад, ліпаза, сатураза, пальмітаза і/або стеаратаза, кодована матричною нуклеїновою кислотою, не активна при високій температурі. В одному з аспектів спосіб можна повторювати ітеративно доти, поки не буде одержана кодуєча послідовність гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, яка має змінені частоти використання кодонів стосовно матричної нуклеїнової кислоти. В іншому аспекті спосіб ітеративно можна повторювати доти, поки не буде одержаний ген гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, який має більш високі або більш низькі рівні експресії транскрипту або стабільність стосовно матричної нуклеїнової кислоти. В іншому аспекті склад кінцевого гідролазного продукту, наприклад, ліпазного, сатуразного, пальмітазного і/або стеаратазного продукту, дає можливість збільшення або модуляції характеристик гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, у продукті.

Виділені варіанти можуть зустрічатися в природі. Також варіанти можна створити *in vitro*. Варіанти можна створити з використанням способів генетичної інженерії, таких як сайт-специфічний мутагенез, випадковий хімічний мутагенез, процедури делеції екзонуклеазою III і стандартні способи клонування. Альтернативно, такі варіанти, фрагменти, аналоги або похідні можна створити з використанням хімічного синтезу або процедур модифікації. Інші способи одержання варіантів також відомі фахівцям у даній галузі. Вони включають процедури, у яких послідовності нуклеїнових кислот, одержані з природних ізолятів, модифікують для створення нуклеїнових кислот, що кодують поліпептиди, які мають характеристики, що збільшують їх цінність для промислових і лабораторних застосувань. У таких процедурах створюють і характеризують велике число варіантів послідовностей, що мають відмінності в одному або декількох нуклеотидах стосовно послідовності, одержаної з природного ізоляту. Ці відмінності нуклеотидів можуть вести до амінокислотних замінів стосовно поліпептидів, кодованих нуклеїновими кислотами з природних ізолятів.

Наприклад, можна створити варіанти з використанням ПЛР, що допускає помилки. У ПЛР, що допускає помилки, ПЛР проводять в умовах, де ДНК полімераза має низьку точність копіювання, так що уздовж усієї довжини продукту ПЛР одержують велику частку точкових мутацій. ПЛР, що допускає помилки, описана, наприклад, у Leung D.W., et al., Technique, 1:11-15, 1989 і Caldwell R.C. & Joyce G.F., PCR Methods Applic, 2:28-33, 1992. У короткому викладі, у

таких процедурах нуклеїнові кислоти, що підлягають мутагенезу, змішують із праймерами для ПЛР, реакційним буфером, $MgCl_2$, $MnCl_2$, полімеразаю Taq і dNTP у придатних концентраціях для досягнення великої частки точкових мутацій уздовж усієї довжини продукту ПЛР. Наприклад, реакцію можна проводити з використанням 20 пмоль нуклеїнової кислоти, що

5 підлягає мутагенезу, 30 пмоль кожного праймера для ПЛР, реакційного буфера, що містить 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8,3) і 0,01% желатину, 7 mM $MgCl_2$, 0,5 mM $MnCl_2$, 5 одиниць полімерази Taq, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM dATP, 1 mM dCTP і 1 mM dTTP. ПЛР можна виконувати протягом 30 циклів при температурі 94 °C протягом 1 хв., 45 °C протягом 1 хв. і 72 °C протягом 1 хв. Однак варто розуміти, що ці параметри можна змінювати в разі потреби. Нуклеїнові кислоти,

10 що мутували, клонують у придатний вектор і оцінюють активності поліпептидів, кодованих нуклеїновими кислотами, що мутували.

Також варіанти можна створити з використанням олігонуклеотид-специфічного мутагенезу для створення сайт-специфічних мутацій у будь-якій клонованій ДНК, що представляє інтерес. Мутагенез олігонуклеотидів описаний, наприклад, у Reidhaar-Olson (1988) Science 241:53-57. У

15 короткому викладі, у таких процедурах синтезують і вбудовують у клоновану ДНК, що підлягає мутагенезу, декілька дволанцюжкових олігонуклеотидів, що несуть одну або декілька мутацій для введення в клоновану ДНК. Збирають клони, що містять ДНК, що мутувала, і оцінюють активності кодованих нею поліпептидів.

Іншим способом створення варіантів є складальна ПЛР. Складальна ПЛР включає збирання

20 продукту ПЛР із суміші маленьких фрагментів ДНК. В одній посудині паралельно відбувається велике число різних ПЛР, при цьому продукти однієї реакції є праймерами для продуктів іншої реакції. Складальна ПЛР описана, наприклад, у патенті США № 5965408.

Ще одним способом створення варіантів є статевий ПЛР-мутагенез. У статевому ПЛР-мутагенезі між молекулами ДНК із різними, але близькоспорідненими послідовностями ДНК

25 відбувається примусова гомологічна рекомбінація *in vitro* у результаті випадкового фрагментування молекули ДНК на основі гомології послідовностей, з наступною фіксацією і перехрестом за допомогою подовження праймерів у реакції ПЛР. Статевий ПЛР-мутагенез описаний, наприклад, у Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751. У короткому викладі, у таких процедурах декілька нуклеїнових кислот, що підлягають рекомбінації,

30 розщеплюють ДНКазою для створення фрагментів із середньою довжиною 50-200 нуклеотидів. Фрагменти з бажаною середньою довжиною очищають і ресуспендують у суміші для ПЛР. ПЛР проводять в умовах, що сприяють рекомбінації між фрагментами нуклеїнових кислот. Наприклад, ПЛР можна проводити, ресуспендувавши очищені фрагменти в концентрації 10-30 нг/л у розчині, що містить по 0,2 mM кожного dNTP, 2,2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 9,0 і 0,1% Triton X-100. Додають 2,5 одиниці полімерази Taq на 100:1 реакційної суміші і

35 проводять ПЛР із використанням наступного режиму: 94 °C протягом 60 секунд, 94 °C протягом 30 секунд, 50-55 °C протягом 30 секунд, 72 °C протягом 30 секунд (30-45 циклів) і 72 °C протягом 5 хвилин. Однак варто розуміти, що в разі потреби ці параметри можна змінювати. У деяких аспектах у ПЛР можна включити олігонуклеотиди. В інших аспектах фрагмент Кленова

40 ДНК полімерази I можна використовувати в першому наборі ПЛР, а полімеразу Taq можна використовувати в наступному наборі ПЛР. Виділяють рекомбінантні послідовності й оцінюють активності кодованих ними поліпептидів.

Також варіанти можна створити за допомогою мутагенезу *in vivo*. У деяких аспектах створюють випадкові мутації в послідовності, що представляє інтерес, за допомогою

45 клонування послідовності, що представляє інтерес, у бактеріальному штамі, такому як штам E. coli, який несе мутації в одному або декількох шляхах репарації ДНК. Такі "мутаторні" штами мають більш високий рівень випадкових мутацій у порівнянні з батьківським штамом дикого типу. Клонування ДНК в одному з цих штамів у кінцевому рахунку веде до створення випадкових мутацій у ДНК. Мутаторні штами, придатні для використання в мутагенезі *in vivo*,

50 описані, наприклад, у публікації PCT № WO 91/16427.

Також варіанти можна створити, використовуючи касетний мутагенез. У касетному мутагенезі невелику ділянку дволанцюжкової молекули ДНК заміщають синтетичною олігонуклеотидною "касетою", яка відрізняється від нативної послідовності. Часто олігонуклеотид містить повністю і/або частково рандомізовану нативну послідовність.

55 Рекурсивний множинний мутагенез також можна використовувати для створення варіантів. Рекурсивний множинний мутагенез являє собою алгоритм для конструювання білків (білковий мутагенез), розроблений для одержання різноманітних популяцій фенотипічно споріднених мутантів, члени яких відрізняються амінокислотними послідовностями. У цьому способі використовують механізм зворотного зв'язку для контролю наступних раундів комбінаторного

60 касетного мутагенезу. Рекурсивний множинний мутагенез описаний, наприклад, у Arkin (1992)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815.

У деяких аспектах варіанти створюють з використанням експоненціального множинного мутагенезу. Експоненціальний множинний мутагенез являє собою процес для створення комбінаторних бібліотек з високим процентним вмістом унікальних і функціональних мутантів, де паралельно рандомізують невеликі групи залишків для ідентифікації в кожному зміненому положенні амінокислот, що ведуть до функціональних білків. Експоненціальний множинний мутагенез описаний, наприклад, у Delegrave (1993) *Biotechnology Res.* 11:1548-1552. Випадковий і сайт-специфічний мутагенез описані, наприклад, у Arnold (1993) *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455.

У деяких аспектах варіанти створюють з використанням процедур шафлінгу, де частини декількох нуклеїнових кислот, що кодують визначені поліпептиди, зливають разом для створення химерних послідовностей нуклеїнових кислот, які кодують химерні поліпептиди, як описано, наприклад, у патентах США №№ 5965408; 5939250.

У даному документі надані варіанти поліпептидів, що містять послідовності, у яких один або декілька амінокислотних залишків (наприклад, зразкового поліпептиду, наприклад, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:20, або SEQ ID NO:2, що містить зміни однієї, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми або більше (декількох), або всіх амінокислот, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або їх еквіваленти) замінені на консервативні або неконсервативні амінокислотні залишки (наприклад, консервативні амінокислотні залишки) і такі замінені амінокислотні залишки можуть кодуватися або можуть не кодуватися генетичним кодом. Консервативні заміни являють собою заміни, що замінюють дану амінокислоту в поліпептиді на іншу амінокислоту зі схожими характеристиками. Таким чином, поліпептиди в даному документі включають поліпептиди з консервативними замінами в послідовностях, наприклад, у зразкових послідовностях за винаходом (наприклад, у SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:20, або SEQ ID NO:2, що містить зміни однієї, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми або більше (декількох), або всіх амінокислот, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або їх еквіваленти), включаючи як необмежувальні приклади наступні заміни: заміна аліфатичної амінокислоти, такої як аланін, валін, лейцин і ізолейцин, на іншу аліфатичну амінокислоту; заміна серину на треонін або навпаки; заміна кислого залишку, такого як аспарагінова кислота і глютамінова кислота, на інший кислий залишок; заміна залишку, що несе аміногрупу, таку як аспарагін і глютамін, на інший залишок, що несе аміногрупу; заміна основного залишку, такого як лізин і аргінін, на інший основний залишок; і заміна ароматичного залишку, такого як фенілаланін, тирозин або триптофан, на інший ароматичний залишок. В інших варіантах один або декілька амінокислотних залишків наданих у даному документі поліпептидів містять заміщувальну групу.

Інші варіанти, що входять у обсяг винаходу, являють собою ті, у яких поліпептид зв'язаний з іншою сполукою, такою як сполука для збільшення часу напівжиття поліпептиду, наприклад, з поліетиленгліколем. Додаткові варіанти, що входять в обсяг винаходу, являють собою ті, у яких додаткові амінокислоти злиті з поліпептидом, такі як лідерна послідовність, секреторна послідовність, пропослідовність білка або послідовність, що полегшує очищення, збагачення або стабілізацію поліпептиду. У деяких аспектах варіанти, фрагменти, похідні й аналоги наданих у даному документі поліпептидів зберігають ту ж біологічну функцію або активність, що і зразкові поліпептиди, наприклад, протеолітичну активність, як описано в даному документі. В інших аспектах варіант, фрагмент, похідне або аналог включає такий пропротеїн, що варіант, фрагмент, похідне або аналог можна активувати відщепленням частини пропротеїну для одержання активного поліпептиду.

Оптимізація кодонів для досягнення високих рівнів експресії білка в клітинах-хазяїнах

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи для модифікації нуклеїнових кислот, що кодують гідролази, щоб модифікувати частоту використання кодонів. В одному з варіантів здійснення в даному документі надані способи модифікації кодонів у нуклеїновій кислоті, що кодує гідролазу, для підвищення або зниження її експресії в клітині-хазяїні, наприклад, клітині бактерії, комахи, ссавця, дріжджів або рослини. Крім того, у даному документі надані нуклеїнові кислоти, що кодують гідролазу, модифіковану для підвищення її експресії в клітині-хазяїні, модифікована таким чином гідролаза і способи одержання модифікованих гідролаз. Спосіб включає ідентифікацію "непереважного" або "менш переважного" кодону в нуклеїновій кислоті, що кодує гідролазу, і заміну одного або декількох цих непереважних або менш переважних кодонів на "переважний кодон", що кодує ту ж

амінокислоту, що і замінений кодон, і в нуклеїновій кислоті щонайменше один непереважний або менш переважний кодон заміщений на переважний кодон, що кодує ту ж амінокислоту. Переважний кодон являє собою кодон, більш часто представлений у кодуючих послідовностях у генах у клітині-хазяїні, а непереважний або менш переважний кодон являє собою кодон, менш часто представлений у кодуючих послідовностях у генах у клітині-хазяїні.

Клітини-хазяїни для експресії нуклеїнових кислот, експресуючих касети і вектори за винаходом, включають клітини бактерій, дріжджів, грибів, рослин, комах і ссавців. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи оптимізації частоти використання кодонів у всіх цих клітинах, нуклеїнові кислоти зі зміненими кодонами і поліпептиди, одержані за допомогою нуклеїнових кислот зі зміненими кодонами. Зразкові клітини-хазяїни включають грамнегативні бактерії, такі як *Escherichia coli* і *Pseudomonas fluorescens*; грампозитивні бактерії, такі як *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus subtilis*. Зразкові клітини-хазяїни також включають еукаріотичні організми, наприклад, різні дріжджі, такі як *Saccharomyces* sp., включаючи *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* і *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus niger*, і клітини і клітинні лінії ссавців, і клітини і клітинні лінії комах. Інші зразкові клітини-хазяїни включають бактеріальні клітини, такі як *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* і різні види родів *Pseudomonas*, *Streptomyces* і *Staphylococcus*, клітини грибів, таких як *Aspergillus*, дріжджів, таких як будь-які види *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, включаючи *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* або *Schizosaccharomyces pombe*, клітини комах, такі як *Drosophila* S2 і *Spodoptera* Sf9, клітини тварин, такі як CHO, COS або меланома Боуеса, і аденовіруси. Вибір придатного організму-хазяїна знаходиться в межах можливостей фахівців у даній галузі. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані нуклеїнові кислоти і поліпептиди, оптимізовані для експресії в цих організмах і видах.

Наприклад, кодони нуклеїнової кислоти, що кодує гідролазу, виділену з бактеріальної клітини, модифікують так, що нуклеїнова кислота оптимально експресується в клітині бактерії, відмінної від бактерії, з яких одержана гідролаза, дріжджів, грибів, рослини, комахи або ссавця. Способи оптимізації кодонів добре відомі в даній галузі, див., наприклад, патент США № 5795737; Vaca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30:113-118; Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:185-188; Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253. Також див. Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253, опис оптимізації кодонів у мишачих системах; Outchkourov (2002) *Protein Expr. Purif.* 24:18-24, опис оптимізації кодонів у дріжджах; Feng (2000) *Biochemistry* 39:15399-15409, опис оптимізації кодонів у *E. coli*; Humphreys (2000) *Protein Expr. Purif.* 20:252-264, опис оптимізації частоти використання кодонів, що впливає на секрецію в *E. coli*.

Трансгенні тварини, що не належать до людини

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані трансгенні тварини, що не належать до людини, які містять нуклеїнову кислоту, поліпептид (наприклад, гідролазу або антитіло за винаходом), експресуючу касету, вектор, трансфіковану або трансформовану клітину за винаходом. Трансгенні тварини, що не належать до людини, можуть бути, наприклад, козами, кроликами, вівцями, свинями, коровами, щурами і мишами, що містять нуклеїнові кислоти за винаходом. Цих тварин можна використовувати, наприклад, як *in vivo* для дослідження гідролазної активності або як моделі для скринінгу засобів, що змінюють гідролазну активність *in vivo*. Кодуючі послідовності поліпептидів, які підлягають експресії в трансгенних тварин, що не належать до людини, можна сконструювати так, щоб вони були конститутивними або знаходилися під керуванням тканиноспецифічних, залежних від стадії розвитку або індукцйбельних транскрипційних регуляторних факторів. Трансгенні тварини, що не належать до людини, можна сконструювати і створити з використанням будь-якого відомого у даній галузі способу; див., наприклад, патенти США №№ 6211428; 6187992; 6156952; 6118044; 6111166; 6107541; 5959171; 5922854; 5892070; 5880327; 5891698; 5639940; 5573933; 5387742; 5087571, опис одержання і використання трансформованих клітин і яйцеклітин і трансгенних мишей, щурів, кроликів, овець, свиней і корів. Також див., наприклад, Pollock (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157, опис одержання рекомбінантних білків у молоці трансгенних молочних тварин; Baguisi (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:456-461, демонстрація одержання трансгенних кіз. У патент США № 6211428 описано одержання і використання трансгенних ссавців, що не належать до людини, у мозку яких експресується конструкція з нуклеїнової кислоти, що містить послідовність ДНК. У патенті США № 5387742 описана ін'єкція клонованої рекомбінантної або синтетичної послідовності ДНК у запліднені яйцеклітини мишей, імплантація яйцеклітин після ін'єкції псевдовагітним самкам і вирощування трансгенних мишей, клітини яких експресують білки, пов'язані з патогенезом хвороби Альцгеймера. У патенті США № 6187992 описано одержання і використання трансгенних мишей, геном яких містить порушення в гені, що кодує

попередник білка амілоїду (APP).

"Тварин з нокаутом" також можна використовувати для здійснення способів за винаходом. Наприклад, в одному з аспектів, трансгенні або модифіковані тварини за винаходом включають "тварину з нокаутом", наприклад, "мишу з нокаутом", створену не для експресії ендегенного гена, що заміщають геном, експресуючим гідролазу або злитий білок, що містить гідролазу за винаходом. Як зазначено вище, функціональний нокаут також можна створити, використовуючи антисмислові послідовності за винаходом, наприклад, дволанцюжкові молекули інтерферуючої РНК.

Трансгенні рослини і насіння

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані трансгенні рослини і насіння, що містять нуклеїнову кислоту, поліпептид (наприклад, гідролазу або антитіло за винаходом), експресуючу касету або вектор, або трансфіковану або трансформовану клітину за винаходом. Трансгенна рослина може являти собою дводольну або однодольну рослину. В одному з варіантів здійснення в даному документі надані способи одержання і використання цих трансгенних рослин і насіння. Трансгенну рослину або клітину рослини, експресуючі поліпептид за винаходом, можна сконструювати відповідно до будь-якого відомого у даній галузі способу. Див., наприклад, патент США № 6309872.

Нуклеїнові кислоти і експресуючі конструкції за винаходом можна ввести в клітину рослини будь-якими способами. Наприклад, нуклеїнові кислоти або експресуючі конструкції можна ввести в геном бажаної рослини-хазяїна або нуклеїнові кислоти або експресуючі конструкції можуть являти собою епісоми. Введення в геном бажаної рослини можна здійснити таким чином, що синтез гідролази організмом-хазяїном буде керуватися ендегенними транскрипційними або трансляційними керуючими елементами. В одному з аспектів у даному документі надані "рослини з нокаутом", де вбудовування послідовності гена за допомогою, наприклад, гомологічної рекомбінації порушує експресію ендегенного гена. Засоби для створення рослин "з нокаутом" добре відомі в даній галузі, див., наприклад, Strepp (1998) Proc Natl. Acad. Sci. USA 95:4368-4373; Miao (1995) Plant J 7:359-365. Див. обговорення трансгенних рослин нижче.

Нуклеїнові кислоти за винаходом можна використовувати, щоб надати бажані ознаки по суті будь-якій рослині, наприклад, олійним рослинам, включаючи рисове борошенце, рапс (канолу), соняшник, оливу, пальму або сою і т. п., або рослинам, що утворюють глюкозу або крохмаль, таким як кукурудза, картопля, пшениця, рис, ячмінь і т. п. Нуклеїнові кислоти за винаходом можна використовувати для маніпуляції метаболічними шляхами рослини для того, щоб оптимізувати або змінити експресію гідролази організмом-хазяїном або субстрат або продукт гідролази, наприклад, олію, ліпід, такий як моно-, ди- або триацилгліцерид і т. п. Це дозволяє змінити співвідношення ліпідів, перетворення ліпідів і обмін у рослині. Це може сприяти промисловій обробці рослини. Альтернативно, гідролази за винаходом можна використовувати у виробництві трансгенної рослини для одержання сполуки, яку рослина звичайно не утворює. Це дозволяє знизити вартість виробництва або створити новий продукт.

В одному з аспектів перша стадія одержання трансгенної рослини включає створення експресуючої конструкції для експресії в клітині рослини. Ці способи добре відомі в даній галузі. Вони можуть включати вибір і клонування промотору, кодуєної послідовності для полегшення ефективного зв'язування рибосом із мРНК і вибір придатних послідовностей термінаторів генів. Одним із прикладів конститутивного промотору є CaMV35S з вірусу мозаїки цвітної капусти, що, як правило, дає високий рівень експресії в рослинах. Інші промотори більш специфічні і реагують на стимули з внутрішнього або зовнішнього середовища рослини. Зразковий індукований світлом промотор являє собою промотор з гена *cab*, що кодує основний білок, який зв'язує хлорофіл *a/b*.

В одному з аспектів нуклеїнову кислоту модифікують для досягнення більш високого рівня експресії в клітині рослини. Наприклад, послідовність за винаходом ймовірно містить більш високу процентну частку пар нуклеотидів А-Т у порівнянні з тим, що спостерігають у рослин, деякі з яких віддають перевагу парам нуклеотидів G-C. Отже, нуклеотиди А-Т у кодуєній послідовності можна замінити на нуклеотиди G-C без значної зміни амінокислотної послідовності для посилення синтезу продукту гена в клітинах рослини.

Ген селективного маркера можна приєднати до генної конструкції для того, щоб ідентифікувати клітини або тканини рослини, у яких успішно пройшло вбудовування трансгена. Це може бути необхідно, оскільки вбудовування й експресія генів у клітини рослини є рідкою подією, що відбувається лише в декількох процентах цільових тканин або клітин. Гени селективних маркерів кодують білки, що забезпечують стійкість до засобів, які звичайно токсичні для рослин, таких як антибіотики або гербіциди. Тільки клітини рослини з вбудованим

геном селективного маркера виживуть при вирощуванні в середовищі, яке містить відповідний антибіотик або гербіцид. Що стосується інших введених генів, маркерним генам для правильного функціонування також потрібні промоторні і термінуючі послідовності.

В одному з аспектів створення трансгенних рослин або насіння включає вбудовування послідовності за винаходом і, необов'язково, маркерних генів у цільову експресуючу конструкцію (наприклад, у плазмиду, фаг), поряд з розміщенням промоторних і термінуючих послідовностей. Це може включати перенесення модифікованого гена в рослину придатним способом. Наприклад, конструкцію можна ввести безпосередньо в геномну ДНК клітини рослини, використовуючи такі способи, як електропорація і мікроін'єкція в протопласти клітин рослин, або конструкції можна ввести безпосередньо в тканину рослини, використовуючи балістичні способи, такі як бомбардування частинками ДНК. Див., наприклад, Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6:17-30; Klein (1987) *Nature* 327:70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:63-69, обговорення використання бомбардування частинками для введення трансгенів у пшеницю; і Adam (1997) вище, використання бомбардування частинками для введення YAC у клітини рослин. Наприклад, Rinehart (1997) вище, використання бомбардування частинками для створення трансгенних рослин бавовни. Пристрій для прискорення частинок описаний в патенті США № 5015580; і комерційно доступний прилад для прискорення частинок BioRad (Biolistics) PDS-2000; також див. John, патент США № 5608148; і Ellis, патент США № 5681730, опис трансформації голонасінних, опосередкованої частинками.

В одному з аспектів можна іммобілізувати протопласти і ін'єктувати у них нуклеїнові кислоти, наприклад, експресуючу конструкцію. Незважаючи на те, що у випадку зернових регенерація рослин із протопластів не є простою задачею, регенерація рослини можлива у випадку бобових, використовуючи соматичний ембріогенез з калюсу, одержаного з протопласта. Організовані тканини можна трансформувати з використанням оголеної ДНК і способу генної гармати, у якому ДНК наносять на вольфрамові мікроснаряди, частинки розміром у 1/100 від розміру клітин, що переносять ДНК глибоко усередину клітин і органел. Потім індукують регенерацію трансформованої тканини, звичайно за допомогою соматичного ембріогенезу. Цей спосіб ефективний у випадку з деякими видами зернових, включаючи маїс і рис.

Нуклеїнові кислоти, наприклад, експресуючі конструкції, також можна вводити в клітини рослин, використовуючи рекомбінантні віруси. Клітини рослин можна трансформувати, використовуючи вірусні вектори, такі як, наприклад, вектори, одержані з вірусу тютюнової мозаїки (Rouwendaal (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:989-999), див. Porta (1996) "Use of viral replicons for the expression of genes in plants", *Mol. Biotechnol.* 5:209-221.

Альтернативно, нуклеїнові кислоти, наприклад, експресуючу конструкцію, можна комбінувати з придатними фланкуючими ділянками Т-ДНК і ввести в стандартний вектор організму-хазяїна *Agrobacterium tumefaciens*. Хвороботворні функції організму-хазяїна *Agrobacterium tumefaciens* будуть керувати вбудовуванням конструкції і прилеглому маркера в ДНК клітини рослини, коли цю клітину інфікують цими бактеріями. Способи трансформації, опосередковані *Agrobacterium tumefaciens*, що включають знешкодження і використання бінарних векторів, докладно описані в науковій літературі. Див., наприклад, Horsch (1984) *Science* 233:496-498; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803 (1983); *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlin 1995). ДНК у клітині *A. tumefaciens* міститься в бактеріальній хромосомі, а також в іншій структурі, відомій як Ті-плазміда (пухлиноіндукуюча). Ті-плазміда містить фрагмент секвенування ДНК, названий Т-ДНК (~20 т.п.н. у довжину), який переносять у клітину рослини в процесі інфікування, і ряд генів *vir* (вірулентність), що керують процесом інфікування. *A. tumefaciens* може інфікувати рослину тільки через ушкодження: ушкодження кореня або стебла рослини є причиною визначених хімічних сигналів, у відповідь на які відбувається активація генів *vir* у *A. tumefaciens* і керування рядом подій, необхідних для перенесення Т-ДНК із Ті-плазмиди в хромосому рослини. Потім Т-ДНК потрапляє в клітину рослини через ушкодження. Відповідно до одного з припущень, Т-ДНК очікує доти, поки не почнеться реплікація або транскрипція ДНК рослини, а потім вбудовується в незахищену ДНК рослини. Для того, щоб використовувати *A. tumefaciens* як трансгенний вектор, потрібно видалити пухлиноіндукуючий сегмент Т-ДНК, але зберегти граничні ділянки Т-ДНК і гени *vir*. Потім трансген вбудовують між граничними ділянками Т-ДНК, де він переноситься в клітину рослини і вбудовується в хромосоми рослини.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи трансформації однієї/кількох рослин з використанням нуклеїнових кислот за винаходом, включаючи важливі зернові культури, див. Hiei (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:205-218. Також див., наприклад, Horsch, *Science* (1984) 233:496; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803; Thykjaer (1997)

вище; Park (1996) Plant Mol. Biol. 32:1135-1148, обговорення вбудовування Т-ДНК у геномну ДНК. Також див. D'Halluin, патент США № 5712135, опис процесу стабільного вбудовування ДНК, що містить ген, який працює в клітині зернової або іншої односім'ядольної рослини.

В одному з аспектів третя стадія може включати відбір і регенерацію цілих рослин, здатних передавати вбудований цільовий ген наступному поколінню. Такі способи регенерації 5 основані на маніпуляції визначеними фітогормонами в середовищі для вирощування тканинної культури, як правило, на основі біоцидного і/або гербіцидного маркера, що введений разом з бажаними нуклеотидними послідовностями. Регенерація рослини з культивованих протопластів описана в Evans et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, стор. 124-176, 10 MacMillan Publishing Company, New York, 1983; і Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, стор. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. Також можна домогтися регенерації з калюсу, експлантатів, органів рослини або їх частин. У цілому такі способи регенерації описані в Klee (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486. Для одержання цілих рослин із трансгенних тканин, таких як незрілі зародки, їх можна вирощувати в контрольованих умовах навколишнього 15 середовища в ряді середовищ, що містять живильні речовини і гормони, процес відомий як тканинна культура. Після створення цілих рослин і одержання насіння починають оцінку потомства.

Після стабільного вбудовування експресуючої касети в трансгенні рослини, її можна ввести в інші рослини за допомогою схрещування. Можна використовувати будь-яке число стандартних 20 способів селекції, залежно від видів, що підлягають схрещуванню. Оскільки трансгенна експресія нуклеїнових кислот за винаходом веде до фенотипічних змін, рослини, що містять рекомбінантні нуклеїнові кислоти за винаходом, можна схрестити з другою рослиною для одержання кінцевого продукту. Таким чином, насіння за винаходом можна одержати зі схрещування двох трансгенних рослин за винаходом, або схрещування рослини за винаходом, і 25 іншої рослини. Бажані ефекти (наприклад, експресія наданих у даному документі поліпептидів для одержання рослини зі зміненим, підвищеним і/або зниженим вмістом ліпідів або олій) можна підсилити, коли обидві вихідні рослини експресують поліпептиди за винаходом. Бажані ефекти можна передавати наступним поколіннями рослин стандартними засобами розмноження.

Нуклеїнові кислоти і поліпептиди за винаходом вводять або експресують у будь-якій рослині 30 або насінні. Трансгенні рослини за винаходом можуть бути двосім'ядольними або односім'ядольними. Прикладами односім'ядольних трансгенних рослин за винаходом є трав'янисті рослини, такі як мятлик луговий (блакитна трава, стручок), кормова трава, така як вівсяниця, плевели, трави помірної кліматичної зони, такі як *Agrostis*, і зернові, наприклад, пшениця, овес, жито, ячмінь, рис, сорго і маїс (кукурудза). Прикладами двосім'ядольних 35 трансгенних рослин за винаходом є тютюн, бобові, такі як люпини, картопля, цукровий буряк, горох, боби і соєві боби, і хрестоцвіті рослини (сімейство *Brassicaceae*), такі як цвітна капуста, рапсове насіння, і близькоспоріднений модельний організм *Arabidopsis thaliana*. Таким чином, трансгенні рослини і насіння за винаходом включають широкий діапазон рослин, як 40 необмежувальні приклади включаючи види з родів *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycin*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachio*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solarium*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, 45 *Vigna* і *Zea*.

В альтернативних варіантах здійснення нуклеїнові кислоти за винаходом експресують у 50 рослинах, що містять клітини волокон, включаючи, наприклад, бавовну, капок справжній п'ятитичинковий (капок, Сейба п'ятитичинкова), губовник лінійний, креозотовий куш, *Krascheninnikovia*, бальзу, рами, кенаф, коноплі, розелу, джут, сизаль, абаку і льон. В альтернативних варіантах здійснення трансгенні рослини за винаходом можуть бути членами роду *Gossypium*, включаючи члени будь-яких видів *Gossypium*, таких як *G. arboreum*; *G. herbaceum*, *G. Barbadosense* і *G. hirsutum*.

У даному документі у визначених варіантах здійснення трансгенні рослини можна 55 використовувати для одержання великих кількостей поліпептидів (наприклад, антитіл, гідролаз) за винаходом. Наприклад, див. Palmgren (1997) Trends Genet. 13:348; Chong (1997) Transgenic Res. 6:289-296 (одержання білка β -казеїну молока людини в трансгенних рослинах картоплі з використанням ауксин-індуцибельного двоспрямованого промотору манопінсинтази (*mas1',2'*) з використанням способів трансформації листової пластинки, опосередкованих *Agrobacterium tumefaciens*.

Використовуючи відомі процедури, професіонал може провести скринінг рослин за винаходом за допомогою визначення підвищення або зниження трансгенної мРНК або білка в трансгенних рослинах. Засоби для виявлення і кількісного визначення мРНК або білків добре відомі в даній галузі.

У даному документі надані жирні кислоти або похідні жирних кислот із трансгенних рослин за винаходом, наприклад, трансгенних олійних рослин. В одному з аспектів одержують трансгенні олійні рослини, що містять щонайменше одному гідролазу за винаходом. В одному з аспектів трансгенна рослина містить ген гідролази, функціонально зв'язаний із промотором, який забезпечує експресію гена в клітинних, позаклітинних або тканинних компартментах, що відрізняються від тих, у яких накопичуються ліпіди рослини, або забезпечує екзогенну індукцію гідролази. В одному з аспектів збирають насіння і/або плоди, що містять ліпіди рослини, насіння і/або плоди подрібнюють (у разі потреби після обробки, індукуючої ген гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази)) для того, щоб привести в контакт ліпіди і гідролазу за винаходом, що містяться в насінні і/або плодах. Суміш можна інкубувати, щоб надати можливість протікання ферментативного гідролізу ліпідів подрібненого матеріалу за допомогою каталітичної дії ліпази за винаходом, що міститься в подрібненому матеріалі. В одному з аспектів жирні кислоти, створені за допомогою гідролізу, екстрагують і/або піддають перетворенню для того, щоб одержати бажані похідні жирних кислот.

У цьому процесі ферментативного гідролізу за винаходом використовують м'які робочі умови і його можна проводити в малому масштабі з використанням недорогих установок. У цьому аспекті рослину за винаходом індукують для одержання гідролази для трансформації ліпідів рослини. Використовуючи цю стратегію, запобігають контакт ферменту з накопиченими ліпідами рослини для того, щоб уникнути будь-якого ризику передчасного гідролізу ("саморозщеплення рослини") до збирання. Блоки для подрібнення й інкубації можуть бути легкими і дрібномасштабними; багато які з них відомі в сільськогосподарській промисловості і можуть використовуватися в місцях збирання рослин.

В одному з аспектів трансгенні рослини за винаходом одержані трансформацією природних олійних рослин. Потім генетично трансформовані рослини за винаходом відтворюють статевим розмноженням для того, щоб одержати трансгенне насіння за винаходом. Це насіння можна використовувати для одержання потомства трансгенних рослин.

У одному з аспектів ген гідролази функціонально зв'язаний з індукованим промотором для запобігання якому-небудь передчасному контакту гідролази і ліпиду рослин. Цей промотор може керувати експресією гена в компартментах, що відрізняються від тих, у яких накопичуються ліпіди, або промотор може ініціювати експресію гідролази в бажаний момент часу за допомогою екзогенної індукції.

Поліпептиди і пептиди

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані виділені, синтетичні або рекомбінантні поліпептиди, що мають ідентичність послідовностей (наприклад, щонайменше 50% ідентичність послідовностей) з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:20, або SEQ ID NO:2, що містить зміни однієї, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми або більше (декількох), або всіх амінокислот, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або їх еквіваленти. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані нуклеїнові кислоти, що кодують поліпептиди, які містять послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:20, або SEQ ID NO:2, що містить зміни однієї, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми або більше (декількох), або всіх амінокислот, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або їх еквіваленти.

Ідентичність послідовностей може мати місце в повнорозмірному поліпептиді або ідентичність може мати місце на ділянці довжиною щонайменше приблизно 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 або більше залишків. Поліпептиди за винаходом також можуть бути коротше повнорозмірних зразкових поліпептидів. В одному з аспектів у даному документі надані поліпептиди, що містять тільки підпослідовність послідовності за винаходом, зразкові підпослідовності можуть складатися приблизно з 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 або більше залишків. В альтернативних аспектах розміри поліпептидів (пептидів, фрагментів) можуть знаходитися в діапазоні приблизно від 5 залишків до повнорозмірного поліпептиду, наприклад, ферменту за винаходом; зразкові розміри складають приблизно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125,

150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 або більше залишків, наприклад, суміжних залишків зразкової гідролази за винаходом. Пептиди за винаходом можна використовувати, наприклад, як зонди для мічення, антигени, толерогени, мотиви, активні центри гідролаз.

5 Поліпептиди за винаходом також включають антитіла, здатні зв'язуватися з гідролазою за винаходом.

Поліпептиди за винаходом також включають амінокислотні послідовності, які "по суті ідентичні" послідовностям за винаходом, включаючи послідовності, що відрізняються від еталонної послідовності однією або декількома консервативними або неконсервативними амінокислотними замінами, делеціями або вставками, конкретно, коли така заміна відбувається в сайті, що не є активним центром молекули, і за умови, що поліпептид по суті зберігає свої функціональні властивості. Консервативна амінокислотна заміна, наприклад, заміняє одну амінокислоту на іншу амінокислоту того ж класу (наприклад, заміна гідрофобної амінокислоти, такої як ізолейцин, валін, лейцин або метіонін, на іншу, або заміна однієї полярної амінокислоти на іншу, така як заміна аргініну на лізин, глутамінової кислоти на аспарагінову кислоту або глутаміну на аспарагін). Одну або декілька амінокислот можна видалити, наприклад, з гідролази, що веде до модифікації структури поліпептиду, без зміни його біологічної активності в значній мірі. Наприклад, можна видалити аміно- або С-кінцеві амінокислоти, що не необхідні для гідролазної активності.

20 "Амінокислоту" або "амінокислотну послідовність" може містити олігопептид, пептид, поліпептид або послідовність білка, або фрагмент, частина або субодинаця будь-якої з перерахованих молекул, молекул, що зустрічаються в природі або синтетичних молекул.

Терміни "поліпептид" і "білок" можуть включати амінокислоти, з'єднані одна з одною за допомогою пептидних зв'язків або модифікованих пептидних зв'язків, тобто, пептидні ізостери, і можуть містити модифіковані амінокислоти, відмінні від 20 амінокислот, кодованих геном. Термін "поліпептид" також включає пептиди і поліпептидні фрагменти, мотиви і т. п. Термін також включає глікозиловані поліпептиди. Пептиди і поліпептиди за винаходом також включають усі "міметичні" і "пептидоміметичні" форми, що більш докладно описані нижче.

Поліпептиди за винаходом включають гідролази в активній або неактивній формі. Наприклад, поліпептиди за винаходом включають пропротеїни перед "дозріванням" або процесингом препо-послідовностей, наприклад, за допомогою ферменту, що здійснює процесинг пропротеїну, такого як пропротеїн конвертаза, для створення "активного" зрілого білка. Поліпептиди за винаходом включають гідролази, неактивні з інших причин, наприклад, перед "активацією" за допомогою події посттрансляційного процесингу, наприклад, під дією ендо- або екзопептидази або протеїнази, фосфорилування, амідування, глікозилювання або сульфатування, димеризації і т. п. Способи ідентифікації "препо" послідовностей доменів і сигнальних послідовностей добре відомі в даній галузі, див., наприклад, Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115-136. Наприклад, для ідентифікації препо-послідовностей білок виділяють з позаклітинного простору і визначають N-кінцеву послідовність білка і порівнюють з формою до процесингу.

Поліпептиди за винаходом включають всі активні форми, включаючи активні підпослідовності, наприклад, каталітичні домени або активні центри ферменту за винаходом. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані каталітичні домени або активні центри, як зазначено нижче. В інших варіантах здійснення в даному документі надані пептиди або поліпептиди, що містять або складаються з домену активного центра, який передбачають за допомогою бази даних, такий як Pfam (яка являє собою велику колекцію множинних вирівнювань послідовностей і схованих марківських моделей, що покриває багато які звичайні сімейства білків, The Pfam protein families data base, A. Bateman, E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Eweller, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall, and E.L.L. Sonnhammer, Nucleic Acids Research, 30(1):276-280, 2002), або еквівалента.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані поліпептиди, що містять або не містять сигнальну послідовність і/або препо-послідовність. В одному з варіантів здійснення в даному документі надані поліпептиди, що містять гетерологічні сигнальні послідовності і/або препо-послідовності. Препо-послідовність (включає послідовність за винаходом, використовувану як гетерологічний препо-домен) можна розташувати на N- або С-кінці білка. В іншому варіанті здійснення в даному документі надані виділені, синтетичні або рекомбінантні сигнальні послідовності, препо-послідовності і каталітичні домени (наприклад, "активні центри"), що містять або складаються з послідовностей за винаходом. Сигнальна послідовність, препо-домени і/або каталітичний домен за винаходом можуть бути частиною злитого білка, наприклад, як гетерологічний домен в химерному білку. У визначених варіантах здійснення в

даному документі надані нуклеїнові кислоти, що кодують ці каталітичні домени (КД), препро- домени і сигнальні послідовності (СП, наприклад, пептид, що містить послідовність, яка містить/складається з N-кінцевих залишків поліпептиду за винаходом). У визначених варіантах здійснення в даному документі надані сигнальні послідовності, що містять пептид, який

містить/складається з послідовності, як зазначено в залишках з 1 до 12, з 1 до 13, з 1 до 14, з 1 до 15, з 1 до 16, з 1 до 17, з 1 до 18, з 1 до 19, з 1 до 20, з 1 до 21, з 1 до 22, з 1 до 23, з 1 до 24, з 1 до 25, з 1 до 26, з 1 до 27, з 1 до 28, з 1 до 28, з 1 до 30, з 1 до 31, з 1 до 32, з 1 до 33, з 1 до 34, з 1 до 35, з 1 до 36, з 1 до 37, з 1 до 38, з 1 до 39, з 1 до 40, з 1 до 41, з 1 до 42, з 1 до 43, з 1 до 44, з 1 до 45, з 1 до 46, з 1 до 47, з 1 до 48, з 1 до 49 або з 1 до 50 поліпептиду за винаходом.

Поліпептиди і пептиди за винаходом можна виділити з природних джерел, синтезувати або створити рекомбінантними способами. Пептиди і білки можна експресувати рекомбінантними способами *in vitro* або *in vivo*. Пептиди і поліпептиди за винаходом можна одержати і виділити, використовуючи будь-який відомий у даній галузі спосіб. Поліпептид і пептиди за винаходом також можна синтезувати, повністю або частково, використовуючи хімічні способи, які добре відомі в даній галузі. Див., наприклад, Caruthers (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215-223; Horn (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 225-232; Banga A.K., *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. Наприклад, пептидний синтез можна здійснювати, використовуючи різні твердофазні способи (див., наприклад, Roberge (1995) *Science* 269:202; Merrifield (1997) *Methods Enzymol.* 289:3-13), а автоматичний синтез можна здійснювати, наприклад, з використанням ABI431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) відповідно до інструкцій, наданих виробником.

Пептиди і поліпептиди за винаходом також можна глікозилувати. Глікозилювання можна додавати після трансляції або хімічно, або за допомогою клітинних механізмів біосинтезу, де останні включають використання відомих мотивів глікозилювання, що можуть бути присутніми у послідовності в природному вигляді або можуть бути приєднані у вигляді пептиду або приєднані в кодуючій послідовності нуклеїнової кислоти. Глікозилювання може являти собою О-глікозилювання або N-глікозилювання.

"Рекомбінантні" поліпептиди або білки стосуються поліпептидів або білків, одержаних за допомогою технології рекомбінантної ДНК; тобто, одержаних із клітин, трансформованих екзогенною ДНК-конструкцією, що кодує бажаний поліпептид або білок. "Синтетичні" нуклеїнові кислоти (включаючи олігонуклеотиди), поліпептиди або білки за винаходом включають ті, котрі одержані будь-яким хімічним синтезом, наприклад, як описано нижче.

"Фрагменти", як застосовують у даному документі, являють собою частини білків, що зустрічаються в природі, які можуть існувати щонайменше в двох різних конформаціях. Фрагменти можуть мати однакову або по суті однакову амінокислотну послідовність, яка збігається з білком, що зустрічається в природі. "Ферментативно активні фрагменти", як застосовують у даному документі, являють собою частини амінокислотної послідовності (кодуючої білок), які зберігають щонайменше один вид функціональної активності того білка, до якого вони належать. "По суті однакова" означає, що амінокислотна послідовність є однаковою в значній мірі, але не повністю, але зберігає щонайменше один вид функціональної активності послідовності, до якої вони належать. У цілому, дві амінокислотні послідовності є "по суті однаковими" або "по суті гомологічними", якщо вони ідентичні щонайменше приблизно на 85%. Також включені фрагменти, що мають тривимірні структури, які відрізняються від білка, що зустрічається в природі. Прикладом цього є "проформа" молекули, наприклад, пропротеїн з низькою активністю, що можна модифікувати розщепленням для одержання зрілого ферменту, який має значно більш високу активність.

Пептиди і поліпептиди за винаходом, як визначено вище, включають усі "міметичні" і "пептидоміметичні" форми. Терміни "міметичний" і "пептидоміметичний" стосуються синтетичної хімічної сполуки, що має по суті однакові структурні і/або функціональні характеристики наданих у даному документі поліпептидів. Міметик може або повністю складатися із синтетичних, неприродних аналогів амінокислот, або являти собою химерну молекулу, що частково складається з природних пептидних амінокислот і частково з неприродних аналогів амінокислот. Міметик також може включати будь-яку кількість консервативних заміни природних амінокислот, за умови, що такі заміни також по суті не змінюють структуру і/або активність міметика. У випадку наданих у даному документі поліпептидів, що являють собою консервативні варіанти, стандартні експерименти дозволять визначити, чи входить міметик в обсяг винаходу, тобто, що його структура і/або функція по суті не змінені. Таким чином, в одному з аспектів композиція міметиків входить в обсяг винаходу, якщо вона має гідролазну активність.

Композиції поліпептидних міметиків за винаходом можуть містити будь-які сполучення неприродних структурних компонентів. В альтернативному аспекті, композиції міметиків за

винаходом можуть містити одну або всі наступні три структурні групи: а) сполучні групи залишків, що відрізняються від сполуки природним амідним зв'язком ("пептидним зв'язком"); b) неприродні залишки замість амінокислотних залишків, що зустрічаються в природі; або c) залишки, що індують вторинну структурну мімікрію, тобто, індують або стабілізують вторинну структуру, наприклад, конформацію β -повороту, γ -повороту, β -листа, α -спіралі і т. п. Наприклад, поліпептид за винаходом можна охарактеризувати як міметичний, коли всі або деякі його залишків з'єднані хімічними зв'язками, що відрізняються від природних пептидних зв'язків. Окремі залишки пептидоміметика можна з'єднувати пептидними зв'язками, іншими хімічними зв'язками або сполучними засобами, такими як, наприклад, глутаральдегід, складні ефіри N-гідроксисукциніміду, біфункціональні малеїміди, N,N'-дициклогексилкарбодіїмід (DCC) або N,N'-діізопропілкарбодіїмід (DIC). З'єднувальні групи, що можуть бути альтернативою звичайному з'єднанню амідним зв'язком ("пептидним зв'язком"), включають, наприклад, кетометилен (наприклад, $-C(=O)-CH_2-$ для $-C(=O)-NH-$), амінометилен (CH_2-NH-), етилен, олефін ($CH=CH$), ефір (CH_2-O), тіоефір (CH_2-S), тетразол (CN_4-), тіазол, ретроамід, тіоамід або складний ефір (див., наприклад, Spatola (1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, том 7, стор. 267-357, "Peptide Backbone Modifications", Marcell Dekker, NY).

Поліпептид за винаходом також можна охарактеризувати як міметик за рахунок вмісту всіх або декількох неприродних залишків замість амінокислотних залишків, що зустрічаються в природі. Неприродні залишки докладно описані в науковій і патентній літературі; нижче описані деякі зразкові неприродні композиції, які можна використовувати як міметики природних амінокислотних залишків, і указання. Міметики ароматичних амінокислот можна створити заміщенням, наприклад, D- або L-нафтилаланіном; D- або L-фенілгліцином; D- або L-2-тієнілаланіном; D- або L-1-, -2-, -3- або -4-піренілаланіном; D- або L-3-тієнілаланіном; D- або L-(2-піридиніл)-аланіном; D- або L-(3-піридиніл)-аланіном; D- або L-(2-піразиніл)-аланіном; D- або L-(4-ізопропіл)-фенілгліцином; D-(трифторметил)-фенілгліцином; D-(трифторметил)-фенілаланіном; D-п-фторфенілаланіном; D- або L-п-дифенілфенілаланіном; D- або L-п-метоксидифенілфенілаланіном; D- або L-2-індол(алкіл)аланінами; і D- або L-алкілаланінами, де алкіл може являти собою заміщений або незаміщений метил, етил, пропіл, гексил, бутил, пентил, ізопропіл, ізобутил, втор-бутил, ізопентил, або некіслі амінокислоти. Ароматичні кільця неприродних амінокислот включають, наприклад, ароматичні кільця тіазолу, тіофенілу, піразолу, бензімідазолу, нафталіну, фурану, піролу і піридину.

Міметики кислих амінокислот можна створити заміщенням, наприклад, некарбоксильними амінокислотами, зберігши негативний заряд; (фосфоно)аланіном; сульфатованим треоніном. Карбоксильні бічні групи (наприклад, аспартил або глутаміл) також можна вибірково модифікувати за допомогою реакції з карбодіїмідами ($R'-N-C-N-R'$), такими як, наприклад, 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил)карбодіїмід або 1-етил-3-(4-азоніа-4,4-диметолпентил)карбодіїмід. Аспартил або глутаміл також можна перетворити в залишки аспарагіну і глутаміну за допомогою реакції з іонами амонію. Міметики основних амінокислот можна створити за допомогою заміни, наприклад, (на доповнення до лізину й аргініну) амінокислотами орнітин, цитрулін або (гуанідино)оцтовою кислотою або (гуанідино)алкілоцтовою кислотою, де алкіл визначений вище. Похідним нітрилу (наприклад, що містить фрагмент CN замість COOH) можна замінити аспарагін або глутамін. Залишки аспарагіну і глутаміну можна дезамінувати до відповідних залишків аспартилу або глутамілу. Міметики залишку аргініну можна створити за допомогою реакції аргінілу, наприклад, з одним або декількома стандартними реагентами, включаючи, наприклад, фенілглюксаль, 2,3-бутандіон, 1,2-циклогександіон або нінгідрин, альтернативно в лужних умовах. Міметики залишку тирозину можна створити за допомогою реакції тирозилу, наприклад, з ароматичними сполуками діазонію або тетранітрометаном. N-ацетилімідазол і тетранітрометан можна використовувати для створення сполук O-ацетилтирозили і 3-нітропохідних, відповідно. Міметики залишку цистеїну можна створити за допомогою реакції залишків цистеїну, наприклад, з α -галоацетатами, такими як 2-хлороцтова кислота або хлорацетамід, і відповідними амінами; для одержання похідних карбоксиметилу або карбоксіамідометилу. Міметики залишків цистеїну також можна створити за допомогою реакції залишків цистеїну, наприклад, із бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-імідозоліл)пропіоноювою кислотою; хлорацетилфосфатом, N-алкілмалеїмідами, 3-нітро-2-піридилдисульфідом; метил-2-піридилдисульфідом; п-хлорртутьбензоатом; 2-хлорртуть-4-нітрофенолом або хлор-7-нітробензоокса-1,3-діазолом. Міметики лізину можна створити (а також можна змінити N-кінцеві залишки) за допомогою реакції лізинілу, наприклад, з ангідридом бурштинової або іншої карбонової кислоти. Міметики залишку лізину й інших залишків, що містять α -амін, також можна створити за допомогою реакцій з імідоефірами, такими як метилпіколінімідат, піридоксальфосфат, піридоксаль,

хлорборогідрид, тринітробензолсульфонова кислота, О-метилізоєсечовина, 2,4-пентандіон, і за допомогою реакцій із гліюксилатом, каталізованих трансамідазою. Міметики метіоніну можна створити за допомогою реакції, наприклад, з метіонінсульфоксидом. Міметики проліну включають, наприклад, піпеколінову кислоту, тіазолідинкарбонову кислоту, 3- або 4-гідроксипролін, дегідропролін, 3- або 4-метилпролін, або 3,3,-диметилпролін. Міметики залишку гістидину можна створити за допомогою реакції гістидилу, наприклад, з діетилпрокарбонатом або п-бромфенацилбромідом. Інші міметики включають, наприклад, створені гідроксильованням проліну і лізіну; фосфорилюванням гідроксильних груп залишків серину або треоніну; метилюванням α -аміногруп лізіну, аргініну і гістидину; ацетилюванням N-кінцевого аміну; метилюванням основного ланцюга амідних залишків або заміною на N-метиламінокислоти або амідуюванням C-кінцевих карбоксильних груп.

Залишок, наприклад, амінокислоти, у поліпептиді за винаходом, також можна замінити амінокислотою (або пептидоміметичним залишком) протилежної хіральності. Таким чином, будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі в L-конфігурації (яку також можна позначати як R або S, залежно від структури хімічної сполуки), можна замінити на амінокислоту того ж хімічного структурного типу або пептидоміметик, але з протилежною хіральністю, що позначається як D-амінокислота, яку також можна позначати як R- або S-форма.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи модифікації наданих у даному документі поліпептидів або за допомогою природних процесів, таких як посттрансляційна обробка (наприклад, фосфорилювання, ацилювання і т. п.), або за допомогою способів хімічної модифікації, і одержання модифікованих поліпептидів. Модифікації можна виконувати в будь-якій частині поліпептиду, включаючи пептидний кістяк, бічні ланцюги амінокислот і N- або C-кінець. Варто розуміти, що один і той самий тип модифікації може бути представлений в однаковій або різній мірі в декількох сайтах у даному поліпептиді. Також даний поліпептид може містити багато видів модифікацій. Модифікації включають ацетилювання, ацилювання, ADP-рибозилування, амідуювання, ковалентне приєднання флавіну, ковалентне приєднання фрагмента гему, ковалентне приєднання нуклеотиду або похідного нуклеотиду, ковалентне приєднання ліпиду або похідного ліпиду, ковалентне приєднання фосфатидилінозиту, замикання кільця з утворенням поперечних зв'язків, утворення дисульфідного зв'язку, деметилювання, утворення ковалентних поперечних зв'язків, утворення цистеїну, утворення піроглутамату, формілювання, γ -карбоксилування, глікозилування, утворення глікозилфосфатидилінозиту, гідроксильовання, йодування, метилювання, міристилювання, окислювання, пегілювання, протеолітичну обробку, фосфорилювання, пренілювання, рацемізацію, селеноїлювання, сульфатування й опосередковане т-РНК приєднання амінокислоти до білка, таке як аргінілювання. Див., наприклад, Creighton T.E., *Proteins - Structure and Molecular Properties* 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, стор. 1-12 (1983).

Також можна використовувати способи твердофазного хімічного синтезу пептидів, щоб синтезувати поліпептиди за винаходом або їх фрагменти. Такий спосіб відомий у даній галузі з початку 1960-х (Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963) (також див. Stewart J. M. and Young J. D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, 111., стор. 11-12) і останнім часом використовується в комерційно доступних наборах для конструювання і синтезу пептидів у лабораторних умовах (Cambridge Research Biochemicals). Такі комерційно доступні лабораторні набори, як правило, використовують ідеї Geysen H.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:3998 (1984) і надають можливість синтезу пептидів на кінчиках декількох "стрижнів" або "шпильок", що з'єднані з однією пластиною. Коли використовують таку систему, пластину зі стрижнями або шпильками перевертають і вводять у другу пластину з відповідними ямками або ємностями, що містять розчини для приєднання або фіксації придатної амінокислоти на кінчиках шпильок або стрижнів. Повторюючи цю стадію процесу, тобто, перевертаючи і вводячи кінчики стрижнів і шпильок у придатні розчини, з амінокислот збирають бажані пептиди. Крім того, доступна множина систем FMOC синтезу пептидів. Наприклад, збирання поліпептиду або фрагмента можна здійснювати на твердофазній основі, використовуючи автоматизований пептидний синтезатор Applied Biosystems, Inc. Model 431 A™. Таке обладнання надає швидкий доступ до пептидів за винаходом або за допомогою прямого синтезу, або за допомогою синтезу ряду фрагментів, які можна з'єднати, використовуючи інші відомі способи.

Ферменти

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, наприклад, білки, що мають щонайменше приблизно 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66 %, 60

67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більше або повну (100%) ідентичність послідовностей зі зразковим поліпептидом за винаходом, наприклад, з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:20, або SEQ ID NO:2, що містить зміни однієї, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми або більше (декількох), або всіх амінокислот, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або їх еквіваленти, антитіла, що зв'язуються з ними, і способи їх одержання і використання. Поліпептиди за винаходом можуть мати будь-яку гідролізну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність. В альтернативних аспектах активність ферменту за винаходом включає гідроліз або синтез ліпідів або олій. Гідролази за винаходом можуть модифікувати олії за допомогою гідролізу, ацидолізу, алкоголізу, етерифікації, трансетерифікації і/або переетерифікації, включаючи реакції "посиленої міграції".

В альтернативних аспектах гідролази за винаходом можуть мати модифіковані або нові активності в порівнянні зі зразковими гідролазами або активностями, описаними в даному документі. У даному документі надані гідролази, які містять або не містять сигнальні послідовності, і самі сигнальні послідовності. У даному документі надані іммобілізовані гідролази, антитіла до гідролаз і їх фрагменти. У даному документі надані білки для інгібування гідролазної активності, наприклад, антитіла, що зв'язуються з активним центром гідролази. У даному документі надані гомодимери і гетерокомплекси, наприклад, злиті білки, гетеродимери і т. д., що містять гідролази за винаходом. У даному документі надані гідролази, що мають активність в широкому діапазоні високих і низьких температур і pH (наприклад, у кислому і лужному водних середовищах).

В одному з аспектів одну або декілька гідролаз (наприклад, ліпаз, сатураз, пальмітаз і/або стеаратаз) за винаходом використовують для біокаталітичного синтезу структурованих ліпідів, тобто, ліпідів, що містять визначений набір жирних кислот, розподілених певним чином на гліцериновому кістяку, включаючи альтернативи масла какао, поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), 1,3-діацилгліцериди (ДАГ), 2-моноацилгліцериди (МАГ) і триацилгліцериди (ТАГ).

У даному документі надані способи створення ферментів, що мають змінений (підвищений або понижений) K_{cat}/K_m . В одному з аспектів сайт-специфічний мутагенез використовують для створення додаткових ферментів гідролаз з альтернативними субстратними специфічностями. Це можна здійснити, наприклад, шляхом повторної розробки ділянки зв'язування субстрату або активного центра ферменту. В одному з аспектів гідролази за винаходом більш стабільні при високих температурах, таких як від 80-85 °C до 90-95 °C, у порівнянні з гідролазами з організмів, що живуть у стандартних або помірних умовах.

Різні білки за винаходом, мають гідролазну активність, наприклад, ліпазну, сатуразну, пальмітазну і/або стеаратазну активність, при різних умовах. У даному документі надані способи одержання гідролаз з різною каталітичною ефективністю і стабільністю стосовно температури, окиснювачів і значень pH. Ці способи можна використовувати, наприклад, способи сайт-специфічного мутагенезу і/або випадкового мутагенезу. В одному з аспектів спрямовану еволюцію можна використовувати для одержання гідролаз з альтернативними специфічностями і стабільностями.

Білки за винаходом, використовують у способах, які дозволяють ідентифікувати модулятори гідролаз, наприклад, активатори або інгібітори. У короткому викладі, тестові зразки (наприклад, сполуки, такі як члени пептидних або комбінаторних бібліотек, бульйони, екстракти і т. п.) додають в аналізи гідролаз для визначення їх здатності до модуляції, наприклад, інгібування або активації, розщеплення субстрату. Ці інгібітори можна використовувати у виробництві і дослідженнях для зниження або запобігання небажаних ізомеризації. Модулятори, виявлені при використанні способів за винаходом, можна використовувати для зміни (наприклад, для звуження або розширення) спектра активності гідролази.

В одному з аспектів у даному документі надані способи виявлення гідролаз з використанням нуклеїнових кислот, поліпептидів і антитіл за винаходом. В одному з аспектів проводять скринінг бібліотек фага лямбда для виявлення гідролаз на основі експресії. У даному документі надані бібліотеки фага лямбда для використання в скринінгу, щоб дозволити визначити токсичні клони; удосконалений доступ до субстрату; знижені потреби до конструювання організму-хазіяна, уникаючи будь-якої можливості відхилення в результаті виключення маси з бібліотеки; і більш швидкий ріст при низьких густинах клонів.

Скринінг бібліотек фага лямбда можна проводити в рідкій фазі або у твердій фазі. У даному документі надані способи скринінгу в рідкій фазі. Це забезпечує підвищену гнучкість умов

аналізу; додаткову субстратну гнучкість; підвищену чутливість для слабких клонів; і простоту автоматизації відносно твердофазного скринінгу.

В інших варіантах здійснення в даному документі надані способи скринінгу з використанням білків і нуклеїнових кислот за винаходом, у яких задіяна роботизація. Це дозволяє проводити багато тисяч біокаталітичних реакцій і скринінг-аналізів за короткий період часу, наприклад, за день, а також гарантує високий рівень точності і відтворюваності (див. обговорення чіпів нижче). У результаті приблизно за тиждень можна одержати бібліотеку похідних сполук.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані ферменти гідролази, що являють собою гідролази, що не зустрічаються в природі, які мають відмінні гідролазні активності, стабільності, субстратні специфічності, профілі рН і/або експлуатаційні характеристики в порівнянні з гідролазою, що не зустрічається в природі. Ці гідролази містять амінокислотну послідовність, не знайдену в природі. Їх можна одержати за допомогою заміни декількох амінокислотних залишків попередника гідролаз на інші амінокислоти. Попередник гідролази може являти собою гідролазу, що зустрічається в природі, або рекомбінантну гідролазу. В одному з аспектів варіанти гідролаз охоплюють заміни будь-яких L-амінокислот, що зустрічаються в природі, у позначених положеннях амінокислотних залишків.

Сигнальні послідовності, препо- і каталітичні домени гідролаз

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані сигнальні послідовності (наприклад, сигнальні пептиди (СП)), препо-домени і каталітичні домени (КД). СП, препо-домени і/або КД за винаходом, можуть являти собою виділені, синтетичні або рекомбінантні пептиди або можуть являти собою частину злитого білка, наприклад, у вигляді гетерологічного домену в химерному білку. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані нуклеїнові кислоти, що кодують ці каталітичні домени (КД), препо-домени і сигнальні послідовності (СП, наприклад, пептид, що містить послідовність, яка містить/складається з N-кінцевих залишків поліпептиду за винаходом). У визначених варіантах здійснення в даному документі надані сигнальні послідовності, що містять пептид, який містить/складається з послідовності, як зазначено в залишках з 1 до 12, з 1 до 13, з 1 до 14, з 1 до 15, з 1 до 16, з 1 до 17, з 1 до 18, з 1 до 19, з 1 до 20, з 1 до 21, з 1 до 22, з 1 до 23, з 1 до 24, з 1 до 25, з 1 до 26, з 1 до 27, з 1 до 28, з 1 до 28, з 1 до 30, з 1 до 31, з 1 до 32, з 1 до 33, з 1 до 34, з 1 до 35, з 1 до 36, з 1 до 37, з 1 до 38, з 1 до 39, з 1 до 40, з 1 до 41, з 1 до 42, з 1 до 43, з 1 до 44 (або більш довгий пептид) поліпептиду за винаходом. В одному з варіантів здійснення в даному документі надані виділені, синтетичні або рекомбінантні сигнальні послідовності, які містять/складаються із сигнальної послідовності за винаходом, одержаної з іншого ферменту за винаходом, або іншого виду ферменту або поліпептиду.

Сигнальні послідовності (СП), КД і/або препо-послідовності гідролаз за винаходом можуть являти собою виділені пептиди або послідовності, з'єднані з іншою гідролазою або поліпептидом негідролази, наприклад, у вигляді злитого (химерного) білка. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані поліпептиди, що містять сигнальні послідовності гідролаз за винаходом. В одному з аспектів поліпептиди, що містять сигнальні послідовності СП, КД і/або препо гідролаз за винаходом, містять послідовності, гетерологічні гідролазам за винаходом (наприклад, злитий білок, що містить СП, КД і/або препо за винаходом, і послідовності з іншої гідролази або білка негідролази). У даному документі надані гідролази за винаходом з гетерологічними СП, КД і/або препо-послідовностями, наприклад, послідовностями із сигнальною послідовністю дріжджів. Гідролаза за винаходом може містити гетерологічну СП і/або препо у векторі, наприклад, у векторі серії pPIC (Invitrogen, Carlsbad, CA).

В одному з аспектів СП, КД і/або препо-послідовності за винаходом ідентифікують після ідентифікації нових поліпептидів гідролаз. Шляхи, за допомогою яких відбувається сортування і транспортування білків у їх правильне місце розташування в клітині, часто позначають як шляхи спрямування білків. Одним з найбільш важливих елементів у всіх цих системах спрямування є коротка амінокислотна послідовність на N-кінці знову синтезованого поліпептиду, яку називають сигнальною послідовністю. Ця сигнальна послідовність спрямовує білок у відповідне для нього місце розташування в клітині і видаляється в процесі транспортування або коли білок досягає свого пункту призначення. Більшість лізосомальних, мембранних або секретованих білків містить N-кінцеву сигнальну послідовність, яка позначає, що їх потрібно перенести в просвіт ендоплазматичного ретикула. Довжина сигнальних послідовностей може мінятися від 13 до 45 або більше амінокислотних залишків. Різні способи розпізнавання сигнальних послідовностей відомі фахівцям у даній галузі. Наприклад, в одному з аспектів сигнальні пептиди нових гідролаз ідентифікують способом, який позначається як Signal. У Signal використана комбінована нейронна мережа, що розпізнає як сигнальні пептиди, так і їх сайти

розщеплення (Nielsen et al., "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". Protein Engineering, том 10, № 1, стор. 1-6 (1997)).

Варто розуміти, що в деяких аспектах гідролази за винаходом можуть не містити СП і/або препо-послідовності, і/або каталітичні домени (КД). В одному з аспектів у даному документі надані поліпептиди (наприклад, гідролази), у яких частково або повністю відсутні СП, КД і/або препо-домени. В іншому аспекті в даному документі надані нуклеїнові кислоти, що кодують сигнальну послідовність (СП), КД і/або препо з однієї гідролази, функціонально зв'язані з послідовністю нуклеїнової кислоти іншої гідролази, або необов'язково бажаними можуть бути сигнальна послідовність (СП) і/або препо-домени з білка негідролази.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані виділені, синтетичні або рекомбінантні поліпептиди, що містять сигнальні послідовності (СП), препо-домени і/або каталітичні домени (КД) за винаходом, і гетерологічні послідовності. Гетерологічні послідовності являють собою послідовності, які у природі не зв'язані (наприклад, з гідролазою) з СП, препо-доменом і/або КД. Послідовність, з якою СП, препо-домени і/або КД у природі не зв'язані, може бути розташована на N-кінці, C-кінці СП, препо-домени і/або КД і/або на обох кінцях СП і/або КД. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані виділені, синтетичні або рекомбінантні поліпептиди, які містять (або складаються з) поліпептид, що містить сигнальну послідовність (СП), препо-домени і/або каталітичний домен (КД) за винаходом, із застереженням, що вони не зв'язані з якою-небудь послідовністю, з якою вони зв'язані в природі (наприклад, з послідовністю гідролази). У даному документі надані виділені або рекомбінантні нуклеїнові кислоти, що кодують ці поліпептиди. Таким чином, в одному з аспектів виділена, синтетична або рекомбінантна нуклеїнова кислота за винаходом містить кодуючу послідовність для сигнальної послідовності (СП), препо-домени і/або каталітичного домену (КД) за винаходом і гетерологічної послідовності (тобто, послідовності, що у природі не зв'язана із сигнальною послідовністю (СП), препо-доменом і/або каталітичним доменом (КД) за винаходом). Гетерологічна послідовність може знаходитися на 3'-кінці, 5'-кінці і/або на обох кінцях СП, препо-домени і/або КД кодуючої послідовності.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані злиті N-кінцем або C-кінцем підпослідовності ферментів за винаходом (наприклад, сигнальні послідовності, препо-послідовності) з іншими поліпептидами, активними білками або фрагментами білків. Фермент за винаходом (наприклад, гідролазу, наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) також можна одержати за допомогою експресії ферменту у вигляді неактивного злитого білка, який надалі активують за допомогою акту протеолітичного розщеплення (з використанням ендогенної або екзогенної протеазної активності, наприклад, трипсину), що веде до відділення злитого білка-партнера і зрілого ферменту, наприклад, гідролази за винаходом. В одному з аспектів злитий білок за винаходом експресують з гібридної нуклеотидної конструкції, що кодує одну відкриту рамку зчитування, яка містить наступні елементи: нуклеотидна послідовність для злитого білка, послідовність лінкера (визначається як нуклеотидна послідовність, що кодує гнучку амінокислотну послідовність, яка з'єднує два менш гнучких домени білка), сайт упізнання для розщеплення протеазою і послідовність зрілого ферменту (наприклад, будь-якого ферменту за винаходом, наприклад, гідролази). В альтернативних аспектах злитий білок може містити послідовність пектатліази, послідовність ксиланази, послідовність фосфатидної кислої фосфатази або іншу послідовність, наприклад, послідовність, яка, як було показано раніше, допускає надекспресію в системі-хазяїні, що представляє інтерес. Можна використовувати будь-яку системи-хазяїна (див. обговорення вище), наприклад, *E. coli* або *Pichia pastoris*. Розташування нуклеотидних послідовностей у химерній нуклеотидній конструкції можна визначити на основі рівнів експресії білка, що досягаються при використанні кожної зливої конструкції. В одному з аспектів у напрямку від 5'-кінця нуклеотидної конструкції до 3'-кінця конструкції нуклеотидні послідовності розташовують у наступному порядку: сигнальна послідовність/злитий білок/послідовність лінкера/сайт упізнання для розщеплення протеазою/зрілий фермент (наприклад, будь-який фермент за винаходом, наприклад, гідролаза) або сигнальна послідовність/пропослідовність/зрілий фермент/послідовність лінкера/злитий білок. Експресія ферменту (наприклад, будь-якого ферменту за винаходом, наприклад, гідролази) у вигляді неактивного злитого білка може загалом удосконалити експресію послідовності ферменту, може знизити будь-яку можливу токсичність, пов'язану зі надсинтезом активного ферменту, і/або може збільшити термін зберігання ферменту перед використанням, оскільки фермент неактивний доти, поки злитий білок, наприклад, пектатліазу, не відділять від ферменту, наприклад, гідролази за винаходом.

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані конкретні скади для активації гідролази за винаходом, експресованої у вигляді злитого білка. В одному з аспектів активацію

активності гідролази, початково експресованої у вигляді неактивного злитого білка, виконують з використанням протеолітичної активності або потенційно протеолітичної активності в сполученні з N-кінцевою або C-кінцевою пептидазою (пептидаза може являти собою фермент за винаходом або інший фермент). Цю подію активації можна виконати різними шляхами й у різних моментах в процесі виробництва/зберігання перед застосуванням у рафінуванні олії. Зразкові процеси за винаходом включають: розщеплення за допомогою ендогенної активності, що виявляється виробляючим організмом-хазяїном при секреції зливої конструкції в середовища для бродіння; розщеплення за допомогою активності ендогенної протеази, що активується або вступає у контакт із внутрішньоклітинно експресованою зливою конструкцією при руйнуванні клітин-хазяїнів; пропускання неочищеної або очищеної зливої конструкції через колонку з активністю іммобілізованої протеази для виконання розщеплення й активації ферменту (наприклад, гідролази за винаходом, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) перед введенням ферменту до складу; обробка неочищеної або очищеної зливої конструкції з розчинним джерелом протеолітичної активності; активація гідролази (наприклад, гідролази за винаходом) при переробці нафти з використанням розчинного або нерозчинного джерела протеолітичної активності безпосередньо перед використанням у процесі; і/або активація активності гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази за винаходом) за допомогою безупинної циркуляції складу зливої конструкції через колонку з активністю іммобілізованої протеази при зниженій температурі (наприклад, при будь-якій температурі між приблизно 4 °C і 20 °C). Цю подію активації можна виконати перед доставкою в місце використання або вона може відбуватися на місці при переробці нафти.

Глікозилювання

Пептиди і поліпептиди за винаходом (наприклад, гідролази, антитіла) також можуть бути глікозилювані, наприклад, в одному з аспектів можуть містити щонайменше один сайт глікозилювання, наприклад, N-глікозилювання або O-глікозилювання. В одному з аспектів поліпептид може бути глікозилюваний після експресії в *P. pastoris* або *S. pombe*. Глікозилювання можна приєднувати після трансляції або хімічно, або за допомогою клітинних біосинтетичних механізмів, де останні включають використання відомих мотивів глікозилювання, що можуть бути нативними для послідовності або можуть бути приєднані у вигляді пептиду або додані в кодуючу послідовність нуклеїнової кислоти.

Гібридні гідролази і бібліотеки пептидів

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані гібридні гідролази (наприклад, синтетичні білки) і злиті білки, включаючи бібліотеки пептидів, що містять послідовності за винаходом. Бібліотеки пептидів за винаходом можна використовувати для виділення пептидних модулаторів (наприклад, активаторів або інгібіторів) мішеней. Бібліотеки пептидів за винаходом можна використовувати для ідентифікації правильних партнерів зв'язування для мішеней, таких як ліганди, наприклад, цитокіни, гормони і т. п.

В одному з аспектів злиті білки за винаходом (наприклад, пептидний фрагмент) конформаційно стабільні (стосовно лінійних пептидів) для забезпечення більш високої афінності зв'язування для мішеней. В іншому аспекті в даному документі надані злиті білки з гідролаз за винаходом і інших пептидів, включаючи відомі і випадкові пептиди. Їх можна злити таким чином, щоб не порушувати структуру ферменту або антитіла (наприклад, гідролази) у значній мірі і метаболічно або структурно конформаційно стабілізувати пептид. Це дозволяє створити бібліотеку пептидів, у якій легко проводити моніторинг як їх присутності в клітинах, так і їх кількості.

Варіанти амінокислотних послідовностей за винаходом можуть відрізнятися попередньо визначеним характером зміни, ознакою, яка відділяє форму, що зустрічається в природі, наприклад, алельну або міжвидову мінливість послідовності гідролази. В одному з аспектів варіанти за винаходом виявляють якісно однакову біологічну активність разом з аналогом, що зустрічається в природі. Альтернативно, можна відбирати варіанти, що мають модифіковані характеристики. В одному з аспектів, незважаючи на те, що сайт або ділянку для введення зміни амінокислотної послідовності визначено попередньо, мутацію *per se* не потрібно визначати попередньо. Наприклад, для того, щоб оптимізувати характеристики мутації в даному сайті, можна проводити випадковий мутагенез у цільовому кодоні або ділянці і скринінг експресованих варіантів гідролаз на предмет оптимального сполучення бажаної активності. Як обговорюється в даному документі, добре відомі способи створення мутацій із замінами в попередньо визначених сайтах у ДНК, що має відому послідовність, наприклад, мутагенез праймером M13 і ПЛР-мутагенез. Скринінг мутантів можна здійснювати, використовуючи аналіз протеолітичної активності. В альтернативних аспектах заміни амінокислот можуть являти собою окремі залишки; вставки можуть мати довжину порядку приблизно від 1 до 20 амінокислот, хоча

можна виконувати значно більш довгі вставки. Делеції можуть знаходитися в діапазоні приблизно від 1 приблизно до 20, 30, 40, 50, 60, 70 залишків або більше. Для одержання кінцевого похідного з оптимальними властивостями можна використовувати заміни, делеції, вставки або будь-яке їх сполучення. Як правило, ці зміни виконують на декількох амінокислотах, щоб звести зміни молекули до мінімуму. Однак у деяких випадках допустимі більш значні зміни.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані гідролази, де структура поліпептидного кістяка, вторинна або третинна структура, наприклад, структура α -спіралі або β -листа, модифікована. В одному з аспектів модифікований заряд або гідрофобність. В одному з аспектів модифікований об'єм бічного ланцюга. Значні зміни функції або імунологічної ідентичності здійснюють за допомогою вибору заміни, які є менш консервативними. Наприклад, можна виконувати заміни, які у більш значній мірі впливають на: структуру поліпептидного кістяка в області зміни, наприклад, на структуру α -спіралі або β -листа; заряд або гідрофобну ділянку молекули, що може знаходитися в активному центрі; або на бічний ланцюг. В інших варіантах здійснення в даному документі надані білки, що містять заміни послідовності за винаходом, наприклад, де (a) гідрофільні залишки, наприклад, серил або треонін, замінюють на (або з використанням) гідрофобний залишок, наприклад, лейцил, ізолейцил, фенілаланін, валіл або аланін; (b) цистеїн або пролін замінюють на (або з використанням) будь-який інший залишок; (c) залишок, що містить бічний ланцюг з позитивним зарядом, наприклад, лізил, аргініл або гістидил, замінюють на (або з використанням) залишок з негативним зарядом, наприклад, глутаміл або аспартил; або (d) залишок, що має об'ємний бічний ланцюг, наприклад, фенілаланін, замінюють на (або з використанням) залишок, що не має бічного ланцюга, наприклад, на гліцин. Варіанти можуть виявляти якісно однакову біологічну активність (тобто, гідролазну активність), хоча в міру необхідності можна відбирати варіанти для модифікації характеристик гідролаз.

В одному з аспектів гідролази за винаходом містять епітопи або мітки для очищення, сигнальні послідовності або інші злиті послідовності і т. д. В одному з аспектів гідролази за винаходом можна злити з випадковим пептидом для створення злитого поліпептиду. Під "злитим" або "функціонально зв'язаним" у даному документі розуміють те, що випадковий пептид і гідролазу з'єднують разом таким чином, щоб мінімізувати порушення стабільності структури гідролази, наприклад, щоб зберегти гідролазну активність. Злитий поліпептид (або злитий полінуклеотид, що кодує злитий поліпептид) також може містити додаткові компоненти, включаючи декілька пептидів у декількох петлях.

В одному з аспектів рандомізують пептиди (наприклад, підпослідовності гідролаз) і кодуєчі їх нуклеїнові кислоти, або рандомізують повністю, або впливають на їх рандомізацію, наприклад, на частоту нуклеотидів/залишків загалом або у визначеному положенні. "Рандомізований" означає, що кожна нуклеїнова кислота і пептид складаються по суті з випадкових нуклеотидів і амінокислот, відповідно. В одному з аспектів нуклеїнові кислоти, що дають початок пептидам, можна синтезувати хімічним шляхом і, таким чином, можна вбудувати будь-який нуклеотид у будь-яке положення. Таким чином, коли для створення пептидів експресують нуклеїнові кислоти, у будь-яке положення можна вбудувати будь-який амінокислотний залишок. Можна розробити процес синтезу для створення рандомізованих нуклеїнових кислот, щоб надати можливість створення всіх або майже всіх можливих сполучень по всій довжині нуклеїнової кислоти, таким чином, створюючи бібліотеку рандомізованих нуклеїнових кислот. Бібліотека може надати популяцію рандомізованих продуктів експресії з достатньою структурною різноманітністю, щоб охопити імовірно достатній діапазон клітинних відповідей, щоб надати одну або декілька клітин, що виявляють бажану відповідь. У даному документі надані бібліотеки взаємодії, досить великі для того, щоб щонайменше один з їх членів мав структуру, що надає йому афінність до визначеної молекули, білка або іншого фактора.

Способи скринінгу і пристрої оперативного моніторингу

При здійсненні способів за винаходом можна використовувати різні пристрої і способи в сполученні з поліпептидами і нуклеїновими кислотами за винаходом, наприклад, для скринінгу гідролазної активності поліпептидів, для скринінгу сполук як потенційних активаторів або інгібіторів гідролазної активності (наприклад, для потенційного скринінгу лікарських засобів), антитіл, що зв'язуються з поліпептидом за винаходом, нуклеїнових кислот, що гібридизуються з нуклеїноювою кислотою за винаходом, для скринінгу клітин, експресуючих поліпептид за винаходом, і т. п. Див., наприклад, патент США № 6337187.

Капілярні блоки

Капілярні блоки, такі як GIGAMATRIX™, Diversa Corporation, San Diego, CA, можна використовувати в способах за винаходом. Нуклеїнові кислоти або поліпептиди за винаходом можна іммобілізувати або нанести на чіп, включаючи капілярні блоки. Чіпи можна

використовувати для скринінгу або моніторингу здатності бібліотек композицій (наприклад, низькомолекулярних сполук, антитіл, нуклеїнових кислот і т. д.) зв'язуватися з нуклеїною кислотою або поліпептидом за винаходом або модулювати їх активність. Капілярні блоки надають іншу систему для утримання і скринінгу зразків. Наприклад, пристрій для скринінгу зразків може включати декілька капілярів, сформованих у вигляді блока капілярів, розташованих поруч, де кожен капіляр містить щонайменше одну стінку, яка визначає просвіт для утримання зразка. Додатково пристрій може включати проміжний матеріал, розташований між сусідніми капілярами в блоці, і один або декілька еталонних показників, сформованих у проміжному матеріалі. Капіляр для скринінгу зразка, де капіляр пристосований для кріплення в блоці капілярів, може містити першу стінку, яка визначає просвіт для утримання зразка, і другу стінку, створену з фільтруючого матеріалу, для фільтрації енергії збудження, яку подають у просвіт для збудження зразка.

Поліпептид або нуклеїнова кислота, наприклад, ліганд або субстрат, можна ввести в перший компонент щонайменше в частину капіляра капілярного блока. Кожен капіляр капілярного блока може містити щонайменше одну стінку, яка визначає просвіт для утримання першого компонента. За першим компонентом у капіляр можна ввести пухирчик повітря. У капіляр можна ввести другий компонент, де другий компонент відділяють від першого компонента за допомогою пухирчика повітря. У капіляр капілярного блока можна ввести зразок, що представляє інтерес, у вигляді першої рідини, міченої частинкою, що піддається виявленню, де кожен капіляр капілярного блока містить щонайменше одну стінку, яка визначає просвіт для утримання першої рідини і частинки, що піддається виявленню, і де щонайменше одну стінку покривають зв'язувальною речовиною для зв'язування частинки, що піддається виявленню, щонайменше з однією стінкою. Спосіб може додатково включати видалення першої рідини з капілярної трубки, де зв'язану частинку, що піддається виявленню, утримують усередині капіляра, і введення другої рідини в капілярну трубку.

Капілярний блок може містити декілька окремих капілярів, що містять щонайменше одну зовнішню стінку, яка визначає просвіт. Зовнішня стінка капіляра може являти собою одну або декілька стінок, з'єднаних разом. Подібним чином, стінка може визначати просвіт циліндричної, прямокутної, гексагональної або будь-якої іншої геометричної форми, за умови, що стінки формують просвіт для утримання рідини або зразка. Капіляри капілярного блока можна розташувати разом у безпосередній близькості для створення плоскої структури. Капіляри можна з'єднати разом, сплавивши їх (наприклад, коли капіляри виконані зі скла), склеївши, зв'язавши або притуливши бік-у-бік. Капілярний блок можна створити з будь-якого числа окремих капілярів, наприклад, у діапазоні від 100 до 4000000 капілярів. Капілярний блок може формувати мікротитрувальний планшет, що містить приблизно 100000 або більше окремих капілярів, з'єднаних разом.

Чіпи або "біочіпи"

Нуклеїнові кислоти або поліпептиди за винаходом можна іммобілізувати або нанести на чіп. Чіпи можна використовувати для скринінгу або моніторингу бібліотек композицій (наприклад, низькомолекулярних сполук, антитіл, нуклеїнових кислот і т. д.) по їх здатності зв'язуватися або модулювати активність нуклеїнової кислоти або поліпептиду за винаходом. Наприклад, в одному з аспектів за винаходом параметром моніторингу є експресія транскрипту гена гідролази. Один або декілька, або всі транскрипти клітини можна виміряти за допомогою гібридизації зразка, що містить транскрипти клітини або нуклеїнові кислоти, які представляють або комплементарні транскриптам клітини, за допомогою гібридизації з нуклеїновими кислотами, іммобілізованими на чіпі або "біочіпі". Використовуючи "набір" нуклеїнових кислот на мікрочіпі можна одночасно визначити кількість деяких або всіх транскриптів клітини. Альтернативно, чіпи, які містять геномну нуклеїнову кислоту, також можна використовувати для визначення генотипу знову сконструйованого штаму, одержаного способами за винаходом. Поліпептидні чіпи також можна використовувати для одночасного кількісного визначення декількох білків. Даний винахід можна здійснювати на практиці, використовуючи будь-який відомий "чіп", також позначуваний як "мікрочіп" або "чіп з нуклеїновими кислотами", або "поліпептидний чіп", або "чіп з антитілами", або "біочіп", або їх варіант. У цілому чіпи являють собою декілька "плям" або "елементів мішені", кожен елемент мішені містить визначену кількість однієї або декількох біологічних молекул, наприклад, олігонуклеотидів, іммобілізованих на визначеній області поверхні основи для специфічного зв'язування з молекулами зразка, наприклад, із мРНК-транскриптами.

"Чіпи" або "мікрочіпи", або "біочіпи" за винаходом можуть містити декілька елементів мішені, кожен елемент мішені містить визначену кількість одного або декількох поліпептидів (включаючи антитіла) або нуклеїнових кислот, іммобілізованих на визначеній області поверхні

основи.

В одному з аспектів гідролази використовують у вигляді іммобілізованих форм. Можна використовувати будь-який спосіб іммобілізації, наприклад, іммобілізацію на інертній основі, такий як діетиламіноетилцелюлоза, пористе скло, хітин або клітини. Клітини, що експресують гідролази за винаходом, можна іммобілізувати за допомогою утворення поперечних зв'язків з поверхнею основи, наприклад, використовуючи глутаральдегід.

При здійсненні способів за винаходом, повністю або частково можна включити будь-який відомий чіп і/або спосіб одержання і використання чіпів або їх варіанти, як описано, наприклад, у патентах США №№ 6277628; 6277489; 6261776; 6258606; 6054270; 6048695; 6045996; 6022963; 6013440; 5965452; 5959098; 5856174; 5830645; 5770456; 5632957; 5556752; 5143854; 5807522; 5800992; 5744305; 5700637; 5556752; 5434049; також див., наприклад, WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; також див., наприклад, Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171-R174; Schummer (1997) Biotechniques 23:1087-1092; Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407; Bowtell (1999) Nature Genetics Suppl. 21:25-32. Також див. Опубліковані патентні заявки США №№ 20010018642; 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537; 20010008765.

Антитіла і способи скринінгу на основі антитіл

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані виділені, синтетичні або рекомбінантні антитіла, які специфічно зв'язуються з гідролазою за винаходом. Ці антитіла можна використовувати для виділення, ідентифікації або кількісного визначення гідролази за винаходом або споріднених поліпептидів. Ці антитіла можна використовувати для виділення інших наданих у даному документі поліпептидів або інших споріднених гідролаз.

"Антитіла" за винаходом можуть містити пептид(и) або поліпептид(и), одержані з, змодельовані після або по суті кодовані геном імуноглобуліну або генами імуноглобулінів, або їх фрагменти, здатні специфічно зв'язувати антиген або епітоп, див., наприклад, Fundamental Immunology, Third Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97. Термін "антитіло" включає антигензв'язувальні частини, тобто, "антигензв'язувальні області" (наприклад, фрагменти, підпоследовності, області, що визначають комплементарність (CDR)), які зберігають здатність зв'язуватися з антигеном, включаючи (i) Fab-фрагмент, одновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL і CH1; (ii) F(ab')₂ фрагмент, двовалентний фрагмент, що містить два Fab-фрагменти, з'єднані дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) Fd-фрагмент, що складається з доменів VH і CH1; (iv) Fv-фрагмент, що складається з доменів VL і VH одного плеча антитіла, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), що складається з домену VH; і (vi) виділену область, що визначає комплементарність (CDR). Одноланцюжкові антитіла також включені по посиланню в термін "антитіло". У даному документі надані антитіла, включаючи антигензв'язувальні області й одноланцюжкові антитіла, що специфічно зв'язуються з гідролазою за винаходом. При здійсненні способів за винаходом також можна використовувати поліпептиди, які мають гідролазну активність.

Антитіла можна використовувати в імунопреципітації, забарвленні, імуноафінних колонках і т. п. При бажанні, последовності нуклеїнової кислоти, що кодують конкретні антигени, можна створити за допомогою імунізації з наступним виділенням поліпептиду або нуклеїнової кислоти, ампліфікації або клонування й іммобілізації поліпептиду на чіпі за винаходом. Альтернативно, способи за винаходом можна використовувати для модифікації структури антитіла, одержаного за допомогою клітини, що підлягає модифікації, наприклад, афінність антитіла можна підвищити або знизити. Крім того, здатність створювати або модифікувати антитіла може являти собою фенотип, сконструйований у клітині за допомогою способів за винаходом.

Способи імунізації, одержання і виділення антитіл (поліклональних і моноклональних) відомі фахівцям у даній галузі й описані в науковій і патентній літературі, див., наприклад, Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (7th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos C.A. ("Stites"); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) Nature 256:495; Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York. Антитіла також можна створювати in vitro, наприклад, використовуючи бібліотеки фагового дисплея, експресуючі сайт зв'язування рекомбінантного антитіла, на доповнення до традиційних способів з використанням тварин in vivo. Див., наприклад, Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70; Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45.

Поліпептиди або пептиди можна використовувати для створення антитіла, яке специфічно зв'язується з наданими в даному документі поліпептидами. Одержані антитіла можна

використовувати в процедурах імуноафінної хроматографії для виділення або очищення поліпептиду або для визначення присутності поліпептиду в біологічному зразку. У таких процедурах препарат білка, такий як екстракт або біологічний зразок, приводять у контакт з антитілом, здатним специфічно зв'язуватися з одним з наданих у даному документі поліпептидів.

У імуноафінних процедурах антитіло прикріплюють до твердої основи, такої як намисто або інша матриця для колонки. Препарат білка приводять у контакт з антитілом в умовах, у яких антитіло специфічно зв'язується з одним з наданих у даному документі поліпептидів. Після відмивання неспецифічно зв'язаних білків елюють специфічно зв'язані поліпептиди.

Здатність білків у біологічному зразку зв'язуватися з антитілом можна визначити, використовуючи будь-які з множини процедур, відомих фахівцям у даній галузі. Наприклад, зв'язування можна визначити за допомогою мічення антитіла міткою, що піддається виявленню, такою як флуоресцентний засіб, ферментативна мітка або радіоізотоп. Альтернативно, зв'язування антитіла зі зразком можна визначити, використовуючи вторинне антитіло, яке містить на собі таку мітку, що піддається виявленню. Конкретні аналізи включають аналіз ELISA, сендвіч-аналіз, радіоімунологічний аналіз і Вестерн-блотинг.

Поліклональні антитіла до наданих в даному документі поліпептидів можна одержати за допомогою прямої ін'єкції поліпептидів тварині або за допомогою введення поліпептидів тварині, що не належить до людини. Потім одержане таким чином антитіло буде зв'язувати сам поліпептид. Таким чином, для створення антитіла, яке може зв'язуватися з цілим нативним поліпептидом, можна використовувати навіть послідовність, що кодує тільки фрагмент поліпептиду. Потім такі антитіла можна використовувати для виділення поліпептиду з клітин, експресуючих цей поліпептид.

Для одержання моноклональних антитіл можна використовувати будь-який спосіб, що надає антитіла, одержані за допомогою безупинних культур ліній клітин. Приклади включають гібридомний спосіб, триомний спосіб, спосіб з В-клітинною гібридомою людини і спосіб з EBV-гібридомою (див., наприклад, Cole (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., стор. 77-96).

Описані способи одержання одноланцюжкових антитіл (див., наприклад, патент США № 4946778) можна пристосувати для одержання одноланцюжкових антитіл до наданих в даному документі поліпептидів. Альтернативно, трансгенних мишей можна використовувати для експресії гуманізованих антитіл до цих поліпептидів або їх фрагментів.

Створені антитіла до наданих в даному документі поліпептидів (включаючи антиідіотипічні антитіла) можна використовувати в скринінгу схожих поліпептидів з інших організмів і зразків. У таких способах поліпептиди з організму приводять у контакт з антитілом і визначають ті поліпептиди, що специфічно зв'язалися з антитілом. Будь-які описані вище процедури можна використовувати для визначення зв'язування з антитілом.

Імобілізовані гідролази

В одному з аспектів гідролази за винаходом, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, використовують у вигляді іммобілізованих форм, наприклад, для обробки ліпідів, у структурованому синтезі ліпідів, для розщеплення білків і т. п. Імобілізовані ліпази за винаходом можна використовувати, наприклад, для гідролізу триацилгліцеридів, діацилгліцеридів або складних ефірів або для етерифікації або трансетерифікації жирних кислот, діацилгліцеридів або триацилгліцеридів, або в переетерифікації жирів. В одному з аспектів ліпаза має специфічність для етерифікації жирних кислот зі спиртом, 1,3-специфічністю або специфічністю для гідролізу неповних гліцеридів, складних ефірів або триацилгліцеридів. Імобілізовані ліпази за винаходом можна використовувати в ущільненому шарі для безупинної трансетерифікації жирів за відсутності розчинника. Див., наприклад, патенти США №№ 4818695; 5569594.

Можна використовувати будь-який спосіб іммобілізації або форму основи, наприклад, чіпи, бусини, основи капілярів і т. п., як описано вище. В одному з аспектів можна виконувати іммобілізацію гідролази на інертній основі, такий як діетиламіноетилцелюлоза, пористе скло, хітин або клітини. Клітини, які експресують гідролази за винаходом, можна іммобілізувати за допомогою утворення поперечних зв'язків з поверхнею основи, наприклад, з використанням глутаральдегіду. Можна одержати іммобілізовані гідролази за винаходом, що містять гідролазу, зв'язану із сухою, пористою гідрофобною основою у формі частинок, з поверхнево-активною речовиною, такою як складний поліоксетиленсорбітановий ефір жирної кислоти або полігліцериновий ефір жирної кислоти. Основа може являти собою аліфатичний олефіновий полімер, такий як поліетилен або поліпропілен, гомо- або співполімер стиролу або їх суміш або попередньо оброблену неорганічну основу. Ці основи можна вибрати з аліфатичних олефінових

полімерів, окиснених полімерів, суміші цих полімерів або попередньо оброблених неорганічних основ для того, щоб надати цим основам гідрофобні властивості. Ця попередня обробка може включати силанування органічною сполукою кремнію. Неорганічна речовина може являти собою діоксид кремнію, оксид алюмінію, скло або кераміку. Основи можна виконати з

5 полістиролу, співполімерів стиролу, поліетилену, поліпропілену або із співполімерів, одержаних з (мет)акрилатів. Див., наприклад, патент США № 5773266.

Ферменти гідролази, їх фрагменти і нуклеїнові кислоти, що кодують ферменти і фрагменти, можна прикріпити до твердої основи. Найчастіше це підвищує економічність і ефективність використання гідролаз у промислових процесах. Наприклад, суміш або коктейль ферментів

10 гідролаз (або їх активних фрагментів), які використовують у конкретній хімічній реакції, можна прикріпити до твердої основи і занурювати у виробничу ємність. Може відбуватися ферментативна реакція. Потім для повторного використання твердої основи можна виїняти з ємності разом із прикріпленими до неї ферментами. В одному з варіантів здійснення за винаходом, виділену нуклеїнову кислоту за винаходом прикріплюють до твердої основи. В

15 іншому варіанті здійснення за винаходом твердої основи вибирають із групи, що включає гель, смолу, полімер, кераміку, скло, мікроелектрод і будь-яке їх сполучення.

Наприклад, тверді основи, надані в даному документі, включають гелі. Деякі приклади гелів включають Сефарозу™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ), желатин, глутаральдегід, оброблений хітозаном глутаральдегід, альбумін-глутаральдегід, хітозан-ксантан, гель TOYOPEARL

20 (полімерний гель), альгінат, альгінат-полілізін, карагенан, агарозу, гліоксил-агарозу, магнітну агарозу, декстран-агарозу, гідрогель з полі(карбамоїлсульфонату), БСА-ПЕГ гідрогель, фосфорильований полівініловий спирт (ПВС), моноаміноетил-N-аміноетил (MANA), аміно або будь-яке їх сполучення.

Інші тверді основи, передбачені в даному документі, включають смоли або полімери. Деякі

25 приклади смол або полімерів включають целюлозу, акриламід, нейлон, віскозу, поліефір, аніонообмінну смолу, AMBERLITE™ XAD-7, AMBERLITE™ XAD-8, AMBERLITE™ IRA-94, AMBERLITE™ IRC-50 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA), полівініл, поліакрилові сполуки, поліметакрилат або будь-яке їх сполучення.

Інший тип твердої основи, передбачений у даному документі, включає кераміку. Деякі

30 приклади включають непористу кераміку, пористу кераміку, SiO₂, Al₂O₃. Іншим типом твердої основи, що можна застосовувати в даному винаході, є скло. Деякі приклади включають непористе скло, пористе скло, амінопропілове скло будь-яке або їх сполучення. Іншим типом твердої основи, що можна використовувати, є мікроелектрод. Прикладом є магнетит, покритий поліетиленіміном. Як твердої основу можна використовувати частинки графіту.

Інший тип твердої основи, передбачений у даному документі, містить продукти діатомової землі і силікати. Деякі приклади включають діатоміти CELITE®, KENITE®, DIACTIV®, PRIMISIL®, DIAFIL® і синтетичні силікати кальцію і магнію MICRO-CEL®, CALFLO®, SILASORB™ і CELKATE® (World Minerals Inc., Santa Barbara, CA).

35

Інший приклад твердої основи являє собою або містить клітину, таку як еритроцит.

Набори

40

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані набори, які містять композиції, наприклад, нуклеїнові кислоти, експресуючі касети, вектори, клітини, трансгенне насіння або рослини, або частини рослин, поліпептиди (наприклад, гідролази) і/або антитіла за винаходом. Також набори можуть містити інструкцію, у якій описані способи і промислові застосування за

45 винаходом, які описані в даному документі.

Промислові і медичні застосування

Гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази), надані в даному документі, мають багато промислових застосувань і медичних застосувань, і нижче описані декілька зразкових застосувань і композицій. Лише деякі приклади застосування включають

50 процеси за винаходом, до яких входять перетворення негідратованого фосфоліпіду в гідратовану форму, рафінування олії, обробка продуктів харчування, обробка олій і жирів (наприклад, одержання олії з низьким вмістом насичених жирних кислот) з рослин, риби, водоростей і т. п.

Обробка продуктів харчування і кормів

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані процеси сироваріння з використанням гідролаз (наприклад, ліпаз, сатураз, пальмітаз і/або стеаратаз) за винаходом. В інших варіантах здійснення в даному документі надані сири, що містять гідролази. В одному з аспектів ферменти за винаходом (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази або їх сполучення) використовують для обробки сирів для збагачення запаху, для збільшення

60 виходу і/або для "стабілізації" сирів, наприклад, за допомогою зниження схильності до

"знежирення", або в одному з аспектів ферменти за винаходом використовують для одержання сиру з молока для сироваріння. Ці процеси за винаходом, можуть включати будь-який спосіб або протокол, наприклад, як описано, наприклад, у патентах США №№ 6551635 і 6399121, WO 03/070013, WO 00/054601. Наприклад, в одному з аспектів гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом використовують для стабілізації жирової емульсії в молоці або композиціях, що містять молоко, наприклад, у вершках, і використовують для стабілізації молочних композицій, наприклад, для виробництва вершків або вершкових напоїв. В одному з варіантів здійснення в даному документі надані процеси для збагачення аромату сиру з використанням щонайменше одного ферменту за винаходом, процес включає інкубацію білка, жиру, протеази і ліпази (наприклад, за винаходом) у водному середовищі в умовах, у яких відбувається збагачення запаху сиру (наприклад, зниження гіркоти), наприклад, як описано в WO 99/66805. В одному з аспектів ліпази за винаходом використовують для збагачення запаху сиру шляхом змішування з водою, протеазою і фосфоліпазою при підвищеній температурі, наприклад, між приблизно 75 °C і 95 °C, як описано, наприклад, у патенті США № 4752483. В одному з аспектів ліпази за винаходом використовують для прискорення дозрівання сиру за допомогою додавання ферменту за винаходом у сир (наприклад, у молоко для сироваріння) перед додаванням коагулянту в молоко або за допомогою додавання ферменту (наприклад, ліпази) за винаходом у сир із сіллю перед пресуванням, наприклад, як описано, наприклад, у патенті США № 4707364. В одному з аспектів ліпазу за винаходом використовують для розщеплення триацилгліцериду в молочному жирі для вивільнення вільних жирних кислот, що веде до збагачення запаху. Фермент за винаходом також можна використовувати в будь-якому з цих процесів за винаходом, див., наприклад, Brindisi (2001) J. of Food Sci. 66:1100-1107.

Структурований синтез і обробка олій

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи структурованого синтезу олій, ліпідів і т. п. з використанням гідролаз (наприклад, ліпаз, сатураз, пальмітаз і/або стеаратаз) за винаходом. Способи за винаходом, включають біокаталітичний синтез структурованих ліпідів, тобто, ліпідів, що містять визначений набір жирних кислот, які певним чином розподілені на кістяку, наприклад, на гліцериновому кістяку. Продукти, створені з використанням гідролаз і з застосуванням способів за винаходом, включають олії з низьким вмістом насичених жирних кислот, наприклад, олії або жирів з овочів (наприклад, сої, канолі), тварин, рослин, риби, водоростей, де ці олії оброблені або перероблені з використанням поліпептиду за винаходом; і продукти харчування, корми, добавки, фармацевтичні препарати і т. п., що містять олії з низьким вмістом насичених жирних кислот, одержані шляхом застосування способів і/або композицій (наприклад, ферментів) за винаходом. Продукти, створені з використанням гідролаз і з застосуванням способів за винаходом, також містять альтернативи масла какао, ліпіди, що містять поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), ліпіди, що містять незамінні жирні кислоти, ліпіди, що містять мононенасичені жирні кислоти, ліпіди, що містять фосфохолін і фосфосерин, ліпіди, що містять фітостероли, 1,3-діацилгліцериди (ДАГ), 2-моноацилгліцериди (МАГ) і триацилгліцериди (ТАГ).

Способи за винаходом, дозволяють синтезувати ліпіди або жирні кислоти з визначеними регіоселективностями і стереоселективностями. У даному документі надані олії, ліпіди і т. п. і олії, які можна використовувати в продуктах харчування, кормах і кулінарних продуктах (наприклад, у кулінарних оліях, оліях для смаження, пекарних оліях, соусах, маринадах, приправах, оліях для змазування розбризкуванням, маргаринах, майонезі, заправках, які можна черпати ложкою і наливати, альтернативах масла какао і т. п.), які оброблені або перероблені з використанням поліпептидів або пептидів (наприклад, гідролаз, таких як ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані фармацевтичні препарати, нутрицевтики і косметичні засоби, що містять поліпептиди (наприклад, гідролази, такі як ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази; або пептиди, або антитіла) за винаходом.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи обробки (модифікації) олій, ліпідів і т. п. з використанням гідролаз за винаходом. Способи можна використовувати для обробки олій і жирів з рослин, тварин, мікроорганізмів. Способи за винаходом можна використовувати в структурованому синтезі олій і жирів, схожих з тими, котрі знайдені в рослинах, тваринах і мікроорганізмах. Ліпіди й олії можна обробити для надання бажаної характеристики. Ліпіди й олії, які можна обробити способами за винаходом (з використанням гідролаз за винаходом), включають альтернативи масла какао, ліпіди, що містять поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), ліпіди, що містять незамінні жирні кислоти, ліпіди, що містять мононенасичені жирні кислоти, ліпіди, що містять фосфохолін і фосфосерин, ліпіди,

що містять фітостероли, 1,3-діацилгліцериди (ДАГ), 2-моноацилгліцериди (МАГ) і триацилгліцериди (ТАГ). В одному з аспектів оброблені і синтетичні олії і жири за винаходом (наприклад, альтернативи масла какао і рослинні олії) можна використовувати в різних застосуваннях, наприклад, у виробництві продуктів харчування (наприклад, кондитерських виробів, борошнених кондитерських виробів) і в складі фармацевтичних препаратів, нутрицевтиків і косметичних засобів. У даному документі надані способи обробки жирів і олій з рослин, наприклад, з насіння олійних культур, включаючи, наприклад, канолу, рицину, кокос, коріандр, кукурудзу, насіння бавовнику, фундук, конопельне насіння, лляне насіння, пінник луговий, оливу, пальмову олію, ядро кокосового горіха, арахіс, насіння рапсу, рисове борошенце, сафлор, сасанкву, соєві боби, соняшник, талову олію, цубаки, різних "натуральних" олій, що мають змінений склад жирних кислот за допомогою генетично модифікованих організмів (ГМО) або традиційної селекції, таких як олії з високим вмістом олеїнової кислоти, з низьким вмістом ліноленої кислоти або з низьким вмістом насичених жирних кислот (канола з високим вмістом олеїнової кислоти, соєві боби з низьким вмістом ліноленої кислоти або соняшник з високим вмістом стеаринової кислоти) або сумішей будь-яких з зазначених вище з використанням гідролази за винаходом.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи обробки жирів із тварин, наприклад, з риби (тихоокеанського талеїхта, печінки тріски, хоплостета, сардин, оселедця, менхадена і т. п.), ссавців (свинини, яловичини і т. п.) і свійської птиці (курей і т. п.), з використанням гідролаз за винаходом. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи структурованого синтезу олій, схожих з виявленими у тваринах, наприклад, у рибі, свійській птиці і ссавцях, і в мікроорганізмах з використанням гідролаз за винаходом. В одному з аспектів ці синтетичні або перероблені олії використовують як кормові добавки, продукти харчування, як компоненти фармацевтичних складів, нутрицевтиків або в косметичних засобах. Наприклад, в одному з аспектів гідролази за винаходом використовують для гідролітичного відщеплення жирних кислот від риб'ячого жиру для того, щоб можна було одержати жирні кислоти і використовувати як кормову добавку. В одному з аспектів гідролази за винаходом можна використовувати для обробки олії з відходів ресторанів і топлені тваринні жири.

В інших варіантах здійснення в даному документі надані способи обробки жирів і олій, наприклад, олій з водоростей, включаючи, наприклад, олію *Neochloris oleoabundans*, олію *Scenedesmus dimorphus*, олію *Euglena gracilis*, олію *Phaeodactylum tricornutum*, олію *Pleurochrysis carterae*, олію *Prymnesium parvum*, олію *Tetraselmis chui*, олію *Tetraselmis suecica*, олію *Isochrysis galbana*, олію *Nannochloropsis salina*, олію *Botryococcus braunii*, олію *Dunaliella tertiolecta*, олію видів *Nannochloris*, олію *Spirulina species*, олію *Chlorophyceae* (зелені водорості) і олію *Bacilliarophy* або суміші будь-яких зазначених жирів і олій.

В одному з аспектів гідролази за винаходом являють собою універсальні біокаталізатори в органічному синтезі, наприклад, у структурованому синтезі олій, ліпідів і т. п. Ферменти за винаходом (включаючи гідролази, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) можуть взаємодіяти із широким діапазоном субстратів, включаючи вторинні і третинні спирти, наприклад, з натуральних продуктів, такі як α -терпінеол, ліналоол і т. п. У деяких аспектах гідролази за винаходом мають енантіоспецифічність (наприклад, стереоспецифічність) від гарної до чудової.

У даному документі у визначених варіантах здійснення наданий процес перетворення олії (наприклад, рослинних олій, масел какао і т. п.), що містить щонайменше один фермент (наприклад, ліпазу, сатуразу, пальмітазу і/або стеаратазу) за винаходом. В одному з аспектів, процес перетворення олії включає контрольований гідроліз і ацилювання, наприклад, ацилювання гліцерину, у результаті чого можна одержати широкий спектр продуктів високої чистоти. В одному з аспектів гідролази (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом використовують для одержання діацилгліцеринових олій і структурованих харчових олій. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані процеси для етерифікації пропіленгліколю з використанням ферменту за винаходом, наприклад, регіо- і/або хемоселективної ліпази, для монозаміщеної етерифікації в положенні Sn1. У даному документі надані процеси для структурованого синтезу олій із запланованими профілями насичених або ненасичених жирних кислот з використанням ферменту за винаходом, наприклад, регіо- і/або хемоселективної ліпази, для видалення насиченої жирної кислоти або для націленого приєднання жирної кислоти до гліцеринового кістяка.

В одному з аспектів способи за винаходом додатково включають процеси для вибіркового видалення жирних кислот (наприклад, небажаних жирних кислот) з олій, наприклад, для відділення насичених і/або ненасичених жирних кислот від олій, з використанням гідролази

(наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом. Процес за винаходом дозволяє відділяти насичені і/або ненасичені жирні кислоти від будь-якої олії, наприклад, від соєвої олії. Фермент може бути хемоселективним і/або енантіоселективним. В одному з аспектів ці процеси дозволяють створювати жири й олії з високою стабільністю, наприклад, "корисні" олії для смаження. Цей зразковий процес за винаходом можна використовувати для створення олій з меншим вмістом сірки, наприклад, з використанням процесу, що включає видалення сірки з нерафінованої олії. Ферменти за винаходом також можна використовувати в процесах переетерифікації для цих і інших цілей.

В одному з аспектів фермент за винаходом використовують для створення олії, що не містить транс-ізомери жирних кислот. В одному з аспектів олію, що не містить транс-ізомери жирних кислот, одержують з частково гідрогенізованої олії для одержання олії, що містить тільки цис-ізомери жирних кислот. Фермент може бути хемоселективним і/або енантіоселективним.

В інших варіантах здійснення в даному документі надані процеси для модифікації масла какао з використанням ферменту за винаходом. Приблизно 80% масел какао містять триацилгліцериди POP, SOS і POS (P означає пальмітинову жирну кислоту, O означає олеїнову жирну кислоту, S означає стеаринову жирну кислоту). Насичена-ненасичена-насичена структура жирної кислоти з масел какао надає їй характерні профілі плавлення, наприклад, у шоколадах. В одному з аспектів процеси структурованого і прямого синтезу за винаходом застосовують до масел какао для зменшення неоднорідності масла какао або для одержання синтетичних масел какао ("альтернативи масла какао"). В одному з аспектів хемоселективну і/або енантіоселективну (наприклад, регіоселективну) гідролазу (наприклад, ліпазу або естеразу) за винаходом використовують для одержання альтернативи масла какао, наприклад, замітника масла какао, замісника масла какао і/або еквівалента масла какао. У даному документі надані альтернативи масла какао, включаючи замітники масла какао, замісники масла какао й еквіваленти масла какао і їх виробничі проміжні сполуки, що містять фермент за винаходом. Процес за винаходом (з використанням ферменту за винаходом) для одержання альтернатив масла какао може включати змішування рослинної олії, наприклад, пальмової олії, з олією ши або еквівалентом, олією горіха басії або еквівалентом і стеринами Sal або еквівалентом і обробку змішаних олій наданими в даному документі поліпептидами. В одному з аспектів процес за винаходом включає використання переетерифікації. Процес за винаходом дозволяє створювати композиційні або кристалічні форми, що імітують "натуральне" масло какао.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані процеси (з використанням ферменту за винаходом) для одержання діацилгліцерину (ДАГ), наприклад, 1,3-діацилгліцерину, з використанням рослинної олії, наприклад, дешевої олії. Фермент може бути хемоселективним і/або енантіоселективним. Процес за винаходом дозволяє одержати ДАГ-вмісну композицію, яка має гарну стабільність, довгий термін зберігання й ефективність при високій температурі.

Ферменти (гідролази, наприклад, ліпази, сатурази пальмітази і /або стеаратази) за винаходом і способи за винаходом також можна використовувати у ферментативній обробці їстівних олій, як описано, наприклад, у патенті США № 6025171. У цьому зразковому способі ферменти за винаходом іммобілізують за допомогою одержання емульсії, що містить безупинну гідрофобну фазу, таку як триацилгліцеридна олія, і дисперговану водну фазу, що містить аліфатичний фермент, такий як ліпаза за винаходом, і речовину-носію, що частково розчинена і частково не розчинена у водній фазі, і видалення води з водної фази доти, поки фаза не перетвориться у твердий фермент, нанесений на частинки носія. Нерозчинена частина речовини-носія може являти собою речовину, що нерозчинна у воді й олії, або водорозчинну речовину в нерозчинній формі, оскільки водна фаза вже насичена водорозчинною речовиною. Можна сформувати водну фазу з використанням неочищеної ліпазної збродженої рідини, що містить залишки бродіння і біомасу, які можуть виконувати функції речовин-носіїв. Іммобілізовану ліпазу можна використовувати для перегрупування складних ефірів і нейтралізації кислотності в оліях. Після реакції іммобілізований фермент можна регенерувати для наступної реакції шляхом додавання води, щоб домогтися часткового розчинення носія, і випарювання води з одержаного ферменту і водної фази, що містить носій, яка диспергована в гідрофобній фазі, щоб знову нанести фермент на частинки носія.

Ферменти (наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом і способи за винаходом також можна використовувати для одержання трансетерифікованих олій, як описано, наприклад, у патенті США № 5288619. У даному документі надані способи ферментативної трансетерифікації для одержання маргаринового жиру, що містить жирні кислоти з низьким вмістом транс-ізомерів і з низьким вмістом жирних кислот із середньою

довжиною ланцюга. Способи включають стадії надання реакційної суміші для трансетерифікації, що містить речовину джерела стеаринової кислоти і їстівну рідку рослинну олію, трансетерифікації речовини джерела стеаринової кислоти і рослинної олії з використанням ліпази зі специфічністю по положеннях 1,3 і потім, у підсумку, гідрогенізації суміші жирних кислот, щоб надати повторно використовувану речовину джерела стеаринової кислоти для повторної реакції з рослинною олією. У даному документі наданий протитечійний спосіб одержання трансетерифікованої олії. Спосіб включає стадії надання зони реакції трансетерифікації, що містить ліпазу зі специфічністю по положеннях 1,3, введення рослинної олії в зону трансетерифікації, введення речовини джерела стеаринової кислоти, пропускання протитечії текучого середовища надкритичного газу або субкритичного зрідженого газу, здійснення реакції трансетерифікації потоку триацилгліцериду з потоком стеаринової кислоти або складного моноефіру стеаринової кислоти в зоні реакції, відведення потоку трансетерифікованого триацилгліцеридного маргаринового жиру, відведення протитечійної текучої фази, гідрогенізації трансетерифікованої стеаринової кислоти або складного моноефіру стеаринової кислоти, щоб надати гідрогенізовану повторно використовувану речовину джерела стеаринової кислоти, і введення гідрогенізованої повторно використовуваної речовини джерела стеаринової кислоти в зону реакції.

В одному з аспектів, щоб надати ферменту за винаходом можливість діяти, обидві фази, масляну фазу і водну фазу, що містить фермент, потрібно ретельно перемішувати. Простого їх перемішування може виявитися недостатньо. Одержанню гарної дисперсії ферменту в олії сприяє його розчинення в невеликій кількості води, наприклад, 0,5-5% по масі (стосовно олії), і емульсифікація в олії в цій формі для формування крапельок діаметром менше 10 мкм (середньозважений). Крапельки можуть бути менше 1 мкм. Турбулентне перемішування можна виконувати при радіальних швидкостях більше 100 см/с. Також можна здійснювати циркуляцію олії в реакторі з використанням зовнішнього ротаційного насоса. Тонку дисперсію водної фази, що містить фермент, також можна одержати під дією ультразвуку. Можна використовувати пристрій для одержання дисперсій.

В одному з аспектів ферментативна реакція за винаходом протікає на поверхні розподілу між масляною фазою і водною фазою. Метою всіх цих заходів стосовно змішування є створення найбільшої можливої поверхні водної фази, що містить фермент. Додавання поверхнево-активних речовин збільшує мікродисперсію водної фази. Отже, у деяких випадках у розчин ферменту додають поверхнево-активні речовини зі значеннями ГЛБ вище 9, такі як додецилсульфат натрію, як описано, наприклад, у EP-A 0513709. Аналогічний ефективний спосіб для поліпшення утворення емульсії полягає в додаванні лізолецитину. Кількості, що додаються, можуть знаходитися в діапазоні від 0,001 до 1% стосовно олії. Температура в ході ферментативної обробки не грає критичної ролі. Можна використовувати температури між 20 °C і 80 °C, але останні можна застосовувати лише протягом короткого часу. У цьому аспекті використовують ліпазу за винаходом, що має гарну температурну стійкість і/або стійкість до низького рН. Оптимальним є застосування при температурі між 30 °C і 50 °C. Період обробки залежить від температури і може займати менше часу при підвищенні температури. Як правило, достатньо періоду часу тривалістю від 0,1 до 10 годин або від 1 до 5 годин. У реакторі протікає реакція, яку можна розділити на етапи. Отже, можлива безупинна робота поряд з періодичною роботою. Реакцію можна здійснювати на різних температурних етапах. Наприклад, інкубація може протікати протягом 3 годин при 40 °C, потім протягом 1 години при 60 °C. Якщо реакція протікає етапами, це також відкриває можливість підбирати різні значення рН на окремих етапах. Наприклад, на першому етапі рН розчину можна скорегувати до 7, наприклад, і на другому етапі - до 2,5 шляхом додавання лимонної кислоти або інших придатних кислот. Однак щонайменше на одному етапі рН розчину ферменту має бути нижче 4 або нижче 3. Якщо рН надалі коректували нижче цього рівня, то могли знайти погіршення ефекту. Отже, можна додати лимонну кислоту в розчин ферменту перед змішуванням останнього з олією.

Ферменти (гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази) за винаходом і способи за винаходом також можна використовувати для одержання олій, як описано, наприклад, у патентній заявці США № 11/567318, включений в даний документ як посилання в повному обсязі. У даному документі надані безупинні процеси для ферментативної обробки ліпідів. Спосіб стосується процесу і пристрою для безупинної ферментативної переетерифікації композицій, що містять ліпіди, з використанням декількох реакторів з нерухомим шаром, де струмінь композиції, що містить ліпід, через пристрій може залишатися по суті постійним навіть при зниженні ферментативної активності нерухомого шару з перебігом часу, і навіть коли нерухомий шар витягають, наприклад, для ремонту, заміни або заповнення.

У даному документі в одному з варіантів здійснення наданий спосіб гідролізу олії або жиру за допомогою реакції олії або жиру з ферментом пальмітазою. В одному з варіантів здійснення гідроліз проводять у присутності емульгатора, що має ГЛБ вище 12. В одному з варіантів здійснення фермент пальмітазу кодує послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, 99,5 або 100% ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і містить i) нуклеотидну заміну (або її еквіваленти), що кодує амінокислотний залишок у положенні 95 (або у його еквіваленті), як зазначено в таблиці 9, ii) нуклеотидні заміни (або їх еквіваленти), що кодують амінокислотні залишки в положеннях 85 і 172 (або в їх еквівалентах), як зазначено в таблиці 15, iii) нуклеотидну заміну (або її еквівалент), що кодує амінокислотний залишок у положенні 83 (або в його еквіваленті), як зазначено в таблиці 16, i iv) наступні мовчазні мутації 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT і 188ACG. В одному з варіантів здійснення послідовність нуклеїнової кислоти являє собою послідовність SEQ ID NO:1 і містить i) нуклеотидну заміну (або її еквівалент), що кодує амінокислотний залишок у положенні 95 (або в його еквіваленті), як зазначено в таблиці 9, ii) нуклеотидні заміни (або їх еквіваленти), що кодують амінокислотні залишки в положеннях 85 і 172 (або в їх еквівалентах), як зазначено в таблиці 15, iii) нуклеотидну заміну (або її еквівалент), що кодує амінокислотний залишок у положенні 83 (або в його еквіваленті), як зазначено в таблиці 16, i iv) наступні мовчазні мутації 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT і 188ACG. В одному з варіантів здійснення фермент пальмітаза являє собою хіт теплової стійкості 29, як описано в таблиці 9, i містить i) нуклеотидну заміну (або її еквівалент), що кодує амінокислотний залишок у положенні 95 (або в його еквіваленті), як зазначено в таблиці 9, ii) нуклеотидні заміни (або їх еквіваленти), що кодують амінокислотні залишки в положеннях 85 і 172 (або в їх еквівалентах), як зазначено в таблиці 15, iii) нуклеотидну заміну (або її еквівалент), що кодує амінокислотний залишок у положенні 83 (або в його еквіваленті), як зазначено в таблиці 16, i iv) наступні мовчазні мутації 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT і 188ACG. В одному з варіантів здійснення фермент пальмітаза, використовуваний у способах, наданих у даному документі, являє собою фермент 29 SM з наступними мовчазними мутаціями 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT і 188ACG, як описано в прикладі 12.

У визначених варіантах здійснення ГЛБ емульгатора перевищує 12, 14, 16 або 18. У визначених варіантах здійснення емульгатор вибраний з олеату натрію, олеату калію, лінолеату натрію, лінолеату калію, ліноленату натрію, ліноленату калію, лауреату натрію, лауреату калію, стеарату натрію, стеарату калію, пальмітату натрію, пальмітату калію, натрієвої солі жирної кислоти пальмової олії, калієвої солі жирної кислоти пальмової олії або їх сполучення. У визначених варіантах здійснення реакційна суміш містить приблизно від 1% до 20% води від загальної маси реагентів. В одному з варіантів здійснення реакційна суміш містить приблизно 1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 17% або 20% води від загальної маси реагентів.

У визначених варіантах здійснення олію або жир змішують з емульгатором перед додаванням ферменту пальмітази. У визначених варіантах здійснення суміш олії/жиру і емульгатора гомогенізують до і/або після додавання ферменту пальмітази, щоб забезпечити однорідну емульсію.

У визначених варіантах здійснення реакцію проводять при температурі приблизно від 20 °C до 70 °C. У визначених варіантах здійснення реакцію проводять при температурі приблизно 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C або 70 °C. У визначених варіантах здійснення фермент пальмітаза, наданий у даному документі, знижує вміст пальмітату в олії/жирі приблизно до 5% або менше. У визначених варіантах здійснення фермент пальмітаза, наданий у даному документі, знижує вміст пальмітату в олії/жирі приблизно до 5%, 4%, 3%, 2%, 1% або менше. У визначених варіантах здійснення бажане зниження вмісту пальмітату настає приблизно за або приблизно менше ніж за 48 год., 24 год., 20 год., 16 год., 12 год., 10 год., 5 год. або 3 год. У визначених варіантах здійснення спосіб додатково включає попередню обробку олії/жиру для видалення смоли і водної фази і для зниження вмісту вільних жирних кислот. Можна використовувати будь-які способи попередньої обробки, які професіонал у даній галузі вважає придатними. У визначених варіантах здійснення спосіб додатково включає додавання основи (додавання каустику) для одержання мила.

У визначених варіантах здійснення олія, використовувана в реакції, являє собою рафіновану олію або нерафіновану олію. В одному з варіантів здійснення реакція додатково включає приєднання фосфоліпіду. У реакціях можна використовувати будь-який фосфоліпід, який професіонал у даній галузі вважає придатним. В одному з варіантів здійснення фосфоліпідом є лецитин. В одному з варіантів здійснення олія, використовувана в реакціях, передбачених у даному документі, являє собою рафіновану олію, а реакція включає приєднання фосфоліпіду.

Нутрицевтики

В одному з аспектів композиції і способи за винаходом можна використовувати для одержання нутрицевтиків за допомогою обробки або синтезу ліпідів і олій з використанням ферментів за винаходом, наприклад, гідролази, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази за винаходом. В одному з аспектів оброблені або синтезовані ліпіди або олії містять поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), діацилгліцериди, наприклад, 1,3-діацилгліцериди (ДАГ), моноацилгліцериди, наприклад, 2-моноацилгліцериди (МАГ), і триацилгліцериди (ТАГ). В одному з аспектів нутрицевтики одержують за допомогою обробки діацилгліцеридів, наприклад, 1,3-діацилгліцеридів (ДАГ), моноацилгліцеридів, наприклад, 2-моноацилгліцеридів (МАГ), і/або триацилгліцеридів (ТАГ) з рослинних джерел (наприклад, з насіння олійних культур) або з тваринних джерел (наприклад, риб'ячий жир). У визначених варіантах здійснення в даному документі надані нутрицевтики (наприклад, дієтичні композиції), що містять поліпептиди (наприклад, ферменти, пептиди, антитіла) за винаходом.

В одному з аспектів композиції і способи за винаходом можна використовувати для збагачення дієтичних композицій, особливо продуктів на основі коров'ячого молока, наприклад, складів для немовлят на основі коров'ячого молока, з використанням гідролаз, активованих солями жовчних кислот. Композиції, одержані конкретними способами, і композиції за винаходом можна використовувати для годування новонароджених і недоношених немовлят, включаючи введення гідролази, активованої солями жовчних кислот за винаходом, для посилення засвоєння жирів і, отже, швидкості росту. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані композиції і способи для лікування суб'єктів з порушенням утворенням ферментів підшлункової залози за допомогою введення гідролази, активованої солями жовчних кислот, у сполученні з вживанням жирів; також див. обговорення нижче.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані дієтичні композиції, що містять гідролазу, наприклад, гідролазу, активовану солями жовчних кислот за винаходом. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані дієтичні композиції, що містять поживну основу, що містить жир і ефективну кількість гідролази, активованої солями жовчних кислот за винаходом. В одному з варіантів здійснення в даному документі надані складі для немовлят на основі коров'ячого молока, що містять гідролазу, наприклад, гідролазу, активовану солями жовчних кислот за винаходом. В одному з аспектів гідролаза за винаходом виявляє активність по розщепленню довголанцюжкових жирних кислот, наприклад, з C_{12} до C_{22} , що складають дуже велику процентну частку в більшості видів молока, наприклад, 99% у грудному молоці людини. Див., наприклад, патент США № 5000975.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані дієтичні композиції, які містять рослинну олію, жир і гідролазу за винаходом. В інших варіантах здійснення в даному документі надані способи обробки продуктів на основі молока і/або композиції, які містять рослинну олію, для одержання дієтичних композицій. В одному з аспектів оброблені композиції містять олію, що містить лауринову кислоту, олію, що містить олеїнову кислоту, олію, що містить пальмітинову кислоту, і/або олію, що містить ліноленову кислоту. В одному з аспектів рисову олію, олеїнову олію соняшника і/або олію канולי можна використовувати як олії, що містять олеїнову кислоту. В одному з аспектів для використання в нутрицевтиках і дієтичних композиціях жири й олії з рослин, наприклад, з насіння олійних культур, включаючи, наприклад, канолу, рицину, кокос, коріандр, кукурудзу, насіння бавовнику, фундук, конопельне насіння, лляне насіння, пінник луговий, оливу, пальму, ядро кокосового горіха, арахіс, насіння рапсу, рисове борошенце, сафлор, сасанкву, соєві боби, соняшник, талову олію, цубаки, різні "натуральні" олії, що мають змінений склад жирних кислот за рахунок генетично модифікованих організмів (ГМО) або традиційної "селекції", такі як олії з високим вмістом олеїнової кислоти, з низьким вмістом ліноленової кислоти або з низьким вмістом насичених жирних кислот (канола з високим вмістом олеїнової кислоти, соєві боби з низьким вмістом ліноленової кислоти або соняшник з високим вмістом стеаринової кислоти), суміші будь-яких з зазначених вище обробляють або одержують з використанням гідролази за винаходом. Див., наприклад, патент США № 4944944.

В одному з аспектів ферменти за винаходом надані у формі, яка зберігає стабільність при збереженні в складі і/або в шлунку, але активна, коли склад досягає тієї частини шлунково-кишкового тракту, у якій склад в нормі засвоюється. У даній галузі добре відомі складі (наприклад, мікрокапсули) для вивільнення в кишечнику, наприклад, біоруйновні полімери, такі як полілактид і полігліколід, як описано, наприклад, у патентах США №№ 4767628; 4897268; 4925673; 5902617.

Кондитерські вироби, масло какао і продукти харчування

В одному з аспектів композиції і способи за винаходом можна використовувати для одержання й обробки твердих масел, таких як масло какао. В іншому аспекті в даному

документі надані кондитерські вироби, масло какао і продукти харчування, що містять поліпептиди (наприклад, ферменти, пептиди, антитіла) за винаходом.

Композиції і способи за винаходом можна використовувати для одержання альтернатив масла какао за допомогою способів "структурованого" синтезу з використанням ферментів, наприклад, гідролаз, наприклад, ліпаз, сатураз, пальмітаз і/або стеаратаз за винаходом. Наприклад, в одному з аспектів, способи за винаходом, дозволяють обробляти або синтезувати триацилгліцериди, діацилгліцериди і/або моноацилгліцериди для застосування як, наприклад, альтернативи масла какао. В одному з аспектів способи за винаходом дозволяють одержувати тверде масло з визначеною "пластичною областю" для підтримання достатньої твердості при кімнатній температурі або нижче. В одному з аспектів передбачена дуже вузька "пластична область" обробленого або синтезованого ліпиду, наприклад, в одному з аспектів, він швидко плавиться приблизно при температурі тіла. Натуральне масло какао починає розм'якшуватися при температурі приблизно від 30 °C до 32 °C і повністю плавиться при температурі приблизно 36 °C. Натуральне масло какао може містити три 1,3-динасичених 2-олеїлгліцерини, що являють собою 1,3-дипальмітоїл-2-олеїлгліцерин (POP), 1-пальмітоїл-2-олеїл-3-стеароїлгліцерин (POSt) і 1,3-дистеароїл-2-олеїлгліцерин (StOSt), у кількості 70% мас. або більше. Ці три гліцерини мають схожі характеристики плавлення і відповідають за властивості плавлення масла какао, маючи дуже вузьку пластичну область. У визначених варіантах здійснення в даному документі надані синтетичні масла какао або оброблені масла какао (синтезовані або оброблені з використанням гідролази за винаходом, усі можливі композиції позначають як альтернативні масла какао) з різними процентними частками 1,3-дипальмітоїл-2-олеїлгліцерину (POP), 1-пальмітоїл-2-олеїлгліцерину (POSt) і 1,3-дистеароїл-2-олеїлгліцерину (StOSt), залежно від бажаних властивостей синтетичного масла какао, і синтетичні масла какао з вмістом трьох 1,3-динасичених 2-олеїлгліцеринів більше або менше 70% мас. Синтетичні масла какао за винаходом можуть частково або повністю замінити натуральні або необроблені масла какао і можуть зберегти або поліпшити важливі властивості твердого масла.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані синтетичні масла какао або оброблені масла какао (синтезовані або оброблені з використанням гідролази за винаходом) з бажаними властивостями для використання в кондитерських výroбах, хлібобулочних výroбах і фармацевтичних препаратах. В інших варіантах здійснення в даному документі надані кондитерські вироби, хлібобулочні вироби і фармацевтичні препарати і т. п., що містять гідролазу за винаходом. В одному з аспектів способи за винаходом дозволяють одержувати або обробляти ліпід (жир) з кондитерського виробу (наприклад, із шоколаду) або підлягаючий використанню в кондитерському виробі. В одному з аспектів ліпід одержують або обробляють так, що шоколад менше бруднить пальці, ніж шоколад, одержаний з натурального масла какао, при цьому зберігаючи визначені характеристики плавлення в роті. В одному з аспектів ліпід одержують або обробляють так, що кондитерський виріб (наприклад, шоколад) можна одержувати при порівняно високій температурі навколишнього середовища або одержувати з використанням охолоджувальної води з відносно високою температурою. В одному з аспектів ліпід одержують або обробляють так, що кондитерський виріб (наприклад, шоколад) можна зберігати у відносно теплих умовах, наприклад, тропічних або субтропічних умовах або у будинках з центральним опаленням. В одному з аспектів ліпід одержують або обробляють так, що кондитерський виріб (наприклад, шоколад) буде мати вміст ліпиду (жиру) твердої композиції і якості. Ферменти за винаходом, можна використовувати для надання композиції, яка заміняє масло какао, яка може в значній мірі поліпшити його теплову стабільність і замінити його в широкому спектрі застосувань.

Одержання маргаринів і розпушувачів

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані синтетичні або оброблені жири, наприклад, маргарин і розпушувач, синтезовані або оброблені з використанням гідролази за винаходом. В інших варіантах здійснення в даному документі надані синтетичні або оброблені жири, наприклад, маргарин і розпушувач, що містять поліпептиди (наприклад, ферменти, пептиди, антитіла) за винаходом.

В одному з варіантів здійснення в даному документі надані оброблені жири, включаючи рослинну олію такого типу як олія з каноли, рицини, кокоса, коріандру, кукурудзи, насіння бавовнику, фундука, конопельного насіння, лляного насіння, пінника лугового, оливи, пальмової олії, ядра кокосового горіха, арахісу, насіння рапсу, рисового борошенця, сафлору, сасанкви, кунжуту, соєвих бобів, соняшника, талова олія, цубаки, різні "натуральні" олії, що мають змінений склад жирних кислот за рахунок генетично модифікованих організмів (ГМО) або традиційної "селекції", такі як олії з високим вмістом олеїнової кислоти, з низьким вмістом

ліноленової кислоти або з низьким вмістом насичених жирних кислот (канола з високим вмістом олеїнової кислоти, соєві боби з низьким вмістом ліноленової кислоти або соняшник з високим вмістом стеаринової кислоти), олії, синтезовані або оброблені з використанням гідролази за винаходом. Синтетичні або оброблені жири, наприклад, маргарин і розпушувач, мають

5 заплановану бажану "пластичність". Багато продуктів пластичних жирів, такі як маргарин і розпушувач, одержують із твердих продуктів і рідких олій як сировини. Наприклад, рідкі олії, такі як олія з каноли, ріцини, кокоса, коріандру, кукурудзи, насіння бавовнику, фундука, конопельного насіння, лляного насіння, пінника лугового, оливи, пальмової олії, ядра кокосового горіха, арахісу, насіння рапсу, рисового борошенця, сафлору, сасанкви, кунжуту, соєвих бобів,

10 соняшника, талова олія, цубаки, різні "натуральні" олії, що мають змінений склад жирних кислот за рахунок генетично модифікованих організмів (ГМО) або традиційної "селекції", такі як олії з високим вмістом олеїнової кислоти, з низьким вмістом ліноленової кислоти або з низьким вмістом насичених жирних кислот (канола з високим вмістом олеїнової кислоти, соєві боби з низьким вмістом ліноленової кислоти або соняшник з високим вмістом стеаринової кислоти),

15 змішують з їх отвердженими маслами (тверді продукти) і суміш доводять до придатної консистенції (пластичності). Продукти пластичних жирів, такі як одержані таким чином маргарин і розпушувач, схильні викликати утворення відносно грубої кристалічної структури, оскільки жири й олії, використовувані як сировина, складаються з жирних кислот, що мають вуглецевий ланцюг майже такої ж довжини. Іншими словами, вони мають дуже однаковий склад жирних

20 кислот. З цієї причини можна підтримувати придатну міру пластичності цих продуктів тільки у вузькому температурному діапазоні для того, щоб рідкі олії, що містяться в них, мали схильність виділятися на поверхні. У даному документі надані способи одержання або обробки жирів, розроблені так, що вони мають різноманітні (і визначені) склади жирних кислот. Одержане масло, наприклад, маргарин або розпушувач, може мати більш широкий діапазон пластичності.

В одному з аспектів способи і композиції за винаходом використовують для одержання або обробки рослинних олій таких типів, як олія з каноли, ріцини, кокоса, коріандру, кукурудзи, насіння бавовнику, фундука, конопельного насіння, лляного насіння, пінника лугового, оливи, пальми, ядра кокосового горіха, арахісу, насіння рапсу, рисового борошенця, сафлору, сасанкви, кунжуту, соєвих бобів, соняшника, талова олія, цубаки, різні "натуральні" олії, що

30 мають змінений склад жирних кислот за рахунок генетично модифікованих організмів (ГМО) або традиційної "селекції", такі як олії з високим вмістом олеїнової кислоти, з низьким вмістом ліноленової кислоти або з низьким вмістом насичених жирних кислот (канола з високим вмістом олеїнової кислоти, соєві боби з низьким вмістом ліноленової кислоти або соняшник з високим вмістом стеаринової кислоти), з використанням гідролаз за винаходом, включаючи переетерифікацію і ферментативну трансетерифікацію, див., наприклад, патент США № 5288619 і патентну заявку США № 11/567318. Способи і композиції за винаходом можна використовувати замість випадкової переетерифікації, як описано, наприклад, у патенті США № 3949105. В одному з аспектів способи і композиції за винаходом використовують у

35 ферментативній трансетерифікації для одержання масла, наприклад, маргаринового масла, що має як низький вміст транс-ізомерів жирних кислот, так і низький вміст жирних кислот із середньою довжиною ланцюга.

В одному з аспектів симетричну структуру олії, наприклад, олії пальмового або лауринового типу, модифікують, наприклад, з одержанням випадкової структури. Таким чином, способи за винаходом, можна використовувати для модифікації властивостей продуктів пластичних жирів.

45 В одному з аспектів модифікацію олій способами за винаходом можна призначити для запобігання повільному поступовому затвердінню масла з часом, конкретно при зберіганні продуктів.

В одному з аспектів способи і композиції за винаходом у реакційній суміші для трансетерифікації містять речовину джерела стеаринової кислоти і їстівну рідку рослинну олію, трансетерифікацію речовини джерела стеаринової кислоти і рослинної олії з використанням ліпази зі специфічністю по положеннях 1,3 за винаходом і потім гідрогенізацію суміші жирних кислот, щоб надати повторно використовувану речовину джерела стеаринової кислоти для повторної реакції з рослинною олією. Див., наприклад, патент США № 5288619.

В одному з аспектів реакцію переетерифікації проводять з використанням ліпази за винаходом. В одному з аспектів ліпаза за винаходом має вибірковість по положеннях 1 і 3 триацилгліцериду для уповільнення або стримування збільшення кількості тринасичених триацилгліцеридів в олії. У цій реакції за винаходом можна перебороти недолік стандартної випадкової переетерифікації й утруднення переетерифікації з використанням неспецифічної ліпази, оскільки переетерифікацію проводять за допомогою ферменту за винаходом, що має специфічність по положеннях 1 і 3 триацилгліцеридів. В одному з аспектів виділення рідких олій,

60

що містяться в продуктах, на поверхні сповільнюють або попереджують при підвищенні температури в реакції для інгібування росту температури плавлення, викликаного збільшенням кількості тринасичених триацилгліцеридів. Це дозволяє вирішити проблему затвердіння продуктів протягом тривалого зберігання.

5 Фармацевтичні композиції і лікування недостатностей гідролаз

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи і композиції (ферменти за винаходом, наприклад, естерази, ацилази, ліпази, фосфоліпази або протеази за винаходом), які можна використовувати для лікування недостатності гідролази у тварини, наприклад, у свавця, такого як людина. Наприклад, в одному з аспектів способи і композиції за винаходом використовують для лікування пацієнтів, що страждають на недостатність ліпази підшлункової залози. В одному з аспектів ліпазу вводять перорально. Фермент за винаходом можна доставляти замість або разом із препаратом ферменту підшлункової залози свині.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані фармацевтичні композиції, які містять поліпептиди (наприклад, ферменти, пептиди, антитіла) за винаходом. Ці фармацевтичні композиції можуть знаходитися у формі таблеток, драже, гелів, капсул, гідрогелів, спреїв, порошків, аерозолів, імплантатів, ліпосом, кремів, мазей, рідин, мікросфер, частинок ядра у вигляді мікрочастинок, емульсії, суспензії, наноструктур і т. п. Фармацевтичні композиції, які містять поліпептиди (наприклад, ферменти, пептиди, антитіла) за винаходом, можна вводити в будь-якій формі, наприклад, перорально, внутрішньошкірно, інтраперитонеально, внутрішньо, місцево і т. п. В одному з аспектів фармацевтичні композиції за винаходом мають склад для місцевої, сублінгвальної, пероральної, внутрішньовенної, підшкірної, внутрішньом'язової, черезшкірної, внутрішньоартеріальної, внутрішньосуглобової або внутрішньошкірної доставки.

В одному з аспектів композиції за винаходом, використовувани для такого лікування, мають активність у кислих умовах. В одному з аспектів композиції за винаходом вводять перорально в складах (наприклад, таблетках, драже, гелях, капсулах, гідрогелях, спреях, порошках, аерозолях), які проходять через ділянки шлунка з кислим рН і вивільняють фермент тільки у відносно лужному середовищі порожньої кишки. В одному з аспектів гідролаза за винаходом входить до складу, що містить носій, такий як лактоза, сахароза, сорбіт, маніт, крохмаль, похідні целюлози або желатин або будь-який інший такий ексципієнт. Також можна додати лубрикант, такий як стеарат магнію, стеарат кальцію або поліетиленгліколевий віск. Як покриття можна додати концентрований цукровий розчин, що може містити добавки, такі як тальк, діоксид титану, желатин або аравійську камедь. Щоб інкапсулювати гідролазу у вигляді рідкого або у вигляді твердого препарату, можна використовувати м'які або тверді капсули. Див., наприклад, патенти США №№ 5691181; 5858755.

35 Детергенти

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи і композиції (ферменти, наприклад, ліпази, сатурази, пальмітази і/або стеаратази за винаходом), які можна використовувати в одержанні і використанні детергентів. Гідролазу за винаходом можна додати, наприклад, змішати з будь-яким відомим мийним складом, твердим або рідким, змінюючи або не змінюючи складу мийної композиції. Для прикладу, гідролазу за винаходом можна додати в будь-яке мило, наприклад, аліфатичні сульфати, такі як алкіл- або алкенілсульфати з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, сульфати амідів, сульфати алкілових або алкенілових простих ефірів, що містять алкілову або алкенілову групу з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, до якого приєднують один або декілька етиленоксидів, пропіленоксидів і бутиленоксидів, аліфатичні сульфонати, такі як алкілсульфонати, сульфонати амідів, діалкілсульфосукцинати, сульфонати α -олефінів, олефінів вініліденового типу і внутрішніх олефінів, ароматичні сульфонати, такі як алкілбензолсульфонати з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, карбонати або аміді алкілових або алкенілових простих ефірів, що містять алкілову або алкенілову групу з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, до якого приєднують один або декілька етиленоксидів, пропіленоксидів і бутиленоксидів, або аміді, солі або складні ефіри α -сульфо жирних кислот, поверхнево-активні речовини амінокислотного типу, фосфатні поверхнево-активні речовини, такі як кислі алкіл- або алкенілфосфати, й алкіл- або алкенілфосфати, амфотерні поверхнево-активні речовини типу сульфонової кислоти, амфотерні поверхнево-активні речовини типу бетаїну, алкілові або алкенілові прості ефіри або спирти, що місти алкілову або алкенілову групу з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, до якого приєднують один або декілька етиленоксидів, пропіленоксидів і бутиленоксидів, поліоксіетиленалкілфенілові ефіри, що містять алкільну групу з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, до якого приєднують один або декілька етиленоксидів, пропіленоксидів і бутиленоксидів, алканоламіді вищих жирних кислот або їх продукти приєднання алкіленоксиду, складні ефіри сахарози і жирної кислоти, складні

гліцеринові моноєфіри жирних кислот, алкіл- або алкеніламіноксиди, катіонні поверхнево-активні речовини типу солей тетраалкіламонію або їх сполучення. Див., наприклад, патент США № 5827718.

У деяких варіантах здійснення в даному документі надані мийні композиції, які містять один або декілька поліпептидів (гідролаз) за винаходом. Можна використовувати поверхнево-активні і/або неповерхнево-активні форми. В одному з аспектів загальна кількість гідролази, поверхнево-активної і/або неповерхнево-активної, може складати приблизно від 0,0001% приблизно до 1,0% або приблизно від 0,0002% приблизно до 0,5% по масі мийної композиції. В одному з аспектів у мийній композиції поверхнево-активна гідролаза складає приблизно від 5% приблизно до 67% і неповерхнево-активна гідролаза складає приблизно від 33% приблизно до 95% від загальної гідролазної активності у ферментативній суміші. В одному з аспектів оптимальний рН усієї ферментативної суміші складає приблизно від 5 приблизно до 10,5.

В одному з аспектів мийні композиції за винаходом містять лужні гідролази за винаходом, що функціонують при лужних значеннях рН, оскільки в звичайних умовах миття рН мийного розчину може знаходитися в діапазоні лужних рН. Див., наприклад, патент США № 5454971

Надані в даному документі поліпептиди (ферменти за винаходом) можна використовувати в будь-яких мийних композиціях, що добре відомі в даній галузі, див., наприклад, патенти США №№ 5069810; 6322595; 6313081. Наприклад, в одному з аспектів надані мийні композиції для прання. Вони можуть містити від 0,8 м.ч. до 80 м.ч. ліпази за винаходом.

Будь-який спосіб одержання і використання мийних композицій можна використовувати з ферментами за винаходом, див., наприклад, патенти США №№ 6413928; 6399561; 6365561; 6380147. Мийні композиції можуть являти собою одно- і двокомпонентну водну композицію, неводну рідку композицію, суцільнолітиту, гранулярну форму, композицію у формі частинок, пресовану таблетку, гелеподібну форму, порошок, гель, гідрогель, ліпосоми, аерозоль, пасту і/або суспензію. Гідролази за винаходом також можна використовувати як мийну добавку у твердій або рідкій формі. Також добавки призначені для посилення або підвищення ефективності стандартних мийних композицій і їх можна додавати на будь-якому етапі процесу очищення.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи, які дозволяють видаляти сильні харчові забруднення, плівки від залишків їжі й інші другорядні харчові композиції з використанням цих мийних композицій. Гідролази за винаходом можуть полегшувати видалення плям за допомогою каталітичного гідролізу ліпідів, жирів або олій. Гідролази за винаходом можна використовувати в детергентах для миття посуду й у детергентах для прання текстилю.

Фактичний вміст активного ферменту залежить від способу виробництва мийної композиції і не є критичним, за умови, що мийна композиція має бажану ферментативну активність. В одному з аспектів кількість гідролаз, присутніх у кінцевій композиції, знаходиться в діапазоні приблизно від 0,001 мг до 0,5 мг на грам мийної композиції. Вибір конкретного ферменту для використання в процесі і продуктах, наданих у даному документі, залежить від умов кінцевого використання, включаючи зовнішній вигляд продукту, використовуваного рН, використовуваної температури і типів забруднювачів, що підлягають руйнуванню або зміні. Можна вибрати фермент для забезпечення оптимальної активності і стабільності для заданого набору придатних умов застосування. У даному документі в одному з аспектів надані гідролази, активні в діапазоні рН приблизно від 4 приблизно до 12 і в температурному діапазоні приблизно від 20 °С приблизно до 95 °С. Детергенти за винаходом, можуть містити катіонні, напівполярні неіонні або цвітер-іонні поверхнево-активні речовини або їх суміші.

В одному з варіантів здійснення ферменти за винаходом можуть входити до складу порошкоподібних і рідких детергентів, що мають рН між 4,0 і 12,0 при концентрації приблизно від 0,01% приблизно до 5% (альтернативно від 0,1% до 0,5%) по масі. Ці мийні композиції також можуть містити інші ферменти, такі як протеази, целюлази, ліпази або ендоглікозидази, ендо- β -1,4-глюканази, β -глюканази, ендо- β -1,3(4)-глюканази, кутинази, пероксидази, лакази, амілази, глюкоамілази, пектинази, редуктази, оксидази, фенолоксидази, лігнінази, пулуланизи, арабінази, геміцелюлази, мананази, ксилоглюканази, ксиланази, пектинацетилестерази, рамногалактуронацетилестерази, полігалактуронази, рамногалактуронази, галактанази, пектинліази, пектинметилестерази, целобіогідролази і/або трансглутамінази. Ці мийні композиції також можуть включати мийні компоненти і стабілізатори.

Додавання гідролаз за винаходом у стандартні чистильні композиції не створює яких-небудь конкретних обмежень використання. Іншими словами, будь-які температура і рН, придатні для детергенту, також придатні для композицій за винаходом, за умови, що фермент активний або стійкий до рН і/або температури передбачуваного використання. Крім того, гідролази за

винаходом можна використовувати в чистильних композиціях без детергентів, знову ж окремо або в сполученні з мийними компонентами і стабілізаторами.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані чистильні композиції, включаючи мийні композиції для чищення твердих поверхонь, мийні композиції для очищення

тканин, композиції для миття посуду, чистильні композиції для догляду за порожниною рота, чистильні композиції для зубів і чистильні розчини для контактних лінз.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи миття об'єкта, які включають контакт об'єкта з поліпептидом за винаходом, в умовах, достатніх для миття. Гідролазу за винаходом можна включити як мийну добавку. Мийні композиції за винаходом можна, наприклад, ввести до складу у вигляді мийної композиції для ручного або машинного прання, що містять поліпептид за винаходом. Добавка для прання, придатна для попередньої обробки забрудненої тканини, може містити поліпептид за винаходом. Зм'якшувальна композиція для тканини може містити гідролазу за винаходом. Альтернативно, гідролазу за винаходом можна ввести до складу як мийну композицію для використання в основних господарських операціях по очищенню твердих поверхонь. В альтернативних аспектах мийні добавки і мийні композиції за винаходом можуть містити один або декілька інших ферментів, таких як протеаза, ліпаза, кутиназа, інша протеаза, карбогідраза, целюлаза, пектиназа, мананаза, арабіназа, галактаназа, ксиланаза, оксидаза, наприклад, лактаза, і/або пероксидаза (також див. вище). Вибирають фермент(и) за винаходом із властивостями, сумісними з

вибраним детергентом (тобто, оптимальний рН, сумісність з іншими ферментативними і неферментативними компонентами і т. д.), і фермент(и) є присутніми в ефективній кількості. В одному з аспектів ферменти за винаходом використовують для усунення речовин з неприємним запахом із тканин. Різні мийні композиції і способи їх одержання, які можна використовувати, описані, наприклад, у патентах США №№ 6333301; 6329333; 6326341; 6297038; 6309871; 6204232; 6197070; 5856164.

Коли гідролази за винаходом вводять у склади композицій, придатних для використання в способі машинного прання, вони можуть містити як поверхнево-активну речовину, так і сполуку мийного компонента. Вони можуть додатково містити один або декілька компонентів детергенту, наприклад, органічні полімерні сполуки, відбілювачі, додаткові ферменти, інгібітори піноутворення, дисперсанти, дисперсанти кальцієвого мила, засоби, суспендуючі забруднювачі, засоби проти повторного відкладення й інгібітори корозії. Композиції для прання за винаходом також можуть містити зм'якшувачі як додаткові компоненти детергенту. Композиції, які містять гідролази за винаходом, можуть забезпечити очищення тканини, видалення плям, зберігання білизни, зм'якшення, проявлення кольору, інгібування перенесення фарби і санітарну обробку, коли їх вводять у склади як мийні композиції для прання.

Густина мийних композицій для прання за винаходом може знаходитися в діапазоні приблизно від 200 до 1500 г/л або приблизно від 400 до 1200 г/л, або приблизно від 500 до 950 г/л, або від 600 до 800 г/л композиції; її можна виміряти приблизно при 20 °С.

"Компактна" форма мийних композицій для прання за винаходом найкраще відображена в густині і, у перерахуванні на композицію, у кількості неорганічної наповнювальної солі. Неорганічні наповнювальні солі є стандартними компонентами мийних композицій у формі порошку. У стандартних мийних композиціях наповнювальні солі присутні в значних кількостях, як правило від 17% до 35% по масі від загальної композиції. В одному з аспектів компактних композицій наповнювальна сіль присутня в кількостях, що не перевищують 15% від загальної композиції або не перевищують 10%, або не перевищують 5% по масі композиції. Неорганічні наповнювальні солі можна вибрати із сульфатів і хлоридів лужних і лужноземельних металів, наприклад, сульфату натрію.

Рідкі мийні композиції за винаходом також можуть знаходитися в "концентрованій формі". В одному з аспектів рідкі мийні композиції можуть містити меншу кількість води в порівнянні зі стандартними рідкими детергентами. В альтернативних аспектах вміст води в концентрованому рідкому детергенті складає менше 40% або менше 30%, або менше 20% по масі мийної композиції. Сполуки детергентів за винаходом можуть включати складі, як описано в WO 97/01629.

Гідролази за винаходом можна використовувати при складанні різних чистильних композицій. Як поверхнево-активна речовина придатна множина відомих сполук, включаючи неіонні, аніонні, катіонні або цвітер-іонні детергенти, наприклад, як розкрито в патентах США №№ 4404128; 4261868; 5204015. Крім того, ферменти за винаходом можна використовувати, наприклад, у застосуваннях кускового або рідкого мила, складах для догляду за посудом, чистильних розчинах або продуктах для контактних лінз, гідролізі пептидів, обробці відходів, у текстильних застосуваннях, як ферменти, що розщеплюють злиті білки, при одержанні білків і т.

п. Гідролази за винаходом можуть забезпечити підвищені експлуатаційні характеристики в мийній композиції в порівнянні з іншою мийною протеазою, тобто, ферментативна група може підсилити очищення від визначених плям, чутливих до ферментів, таких як трава або кров, як визначають за допомогою звичайної оцінки після стандартного циклу прання. Гідролази за

5 винаходом можна ввести до складу відомих порошкових і рідких детергентів, що мають рН між 6,5 і 12,0 при концентрації приблизно від 0,01% приблизно до 5% (наприклад, приблизно від 0,1% до 0,5%) по масі. Ці мийні чистильні композиції також можуть містити інші ферменти, такі як інші відомі естерази, фосфоліпази, протеази, амілази, целюлази, ліпази або ендоглікозидази, а також мийні компоненти і стабілізатори.

10 Обробка і виробництво продуктів харчування

Гідролази за винаходом можна використовувати для відділення компонентів речовин клітин рослин. Наприклад, гідролази за винаходом можна використовувати в поділі багатой білком речовини (наприклад, клітин рослин) на компоненти, наприклад, сахарози з цукрового буряка або крохмалю або цукрів з картоплі, фракції м'якоті або шкірки. В одному з аспектів гідролази за

15 винаходом можна використовувати для поділу сільськогосподарських продуктів з високим вмістом білка або олії на корисні фракції білка, олії і шкірки. Процес поділу можна здійснювати за допомогою способів, відомих у даній галузі.

Гідролази за винаходом можна використовувати в одержанні фруктових або овочевих соків, сиропів, екстрактів і т. п. для збільшення виходу. Гідролази за винаходом можна

20 використовувати у ферментативній обробці (наприклад, гідролізі білків) різних речовин, одержаних зі стінок клітин рослин, або відходів, наприклад, від виробництва вина або соку, або сільськогосподарських залишків, таких як шкірка овочів, шкірка бобів, бурячна пульпа, маслинова пульпа, картопляна пульпа і т. п. Гідролази за винаходом можна використовувати для модифікації консистенції і зовнішнього вигляду оброблених фруктів або овочів. Гідролази за

25 винаходом можна використовувати для обробки речовини рослин для полегшення переробки речовини рослин, включаючи продукти харчування, полегшення очищення або екстракції компонентів рослин. Гідролази за винаходом можна використовувати для підвищення харчової цінності, зниження здатності до зв'язування води, поліпшення розкладаності в рослинах стічних вод і/або поліпшення перетворення речовини рослин у силос і т. п.

30 Тваринні корми і харчові або кормові добавки

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані способи обробки тваринних кормів і продуктів харчування і харчових або кормових добавок з використанням гідролаз за винаходом, тварини включають ссавців (наприклад, людину), птахів, риб і т. п. В інших

35 варіантах здійснення в даному документі надані тваринні корми, продукти харчування, кормові і харчові добавки і добавки, що містять гідролази за винаходом.

У визначених варіантах здійснення в даному документі надані гідролази для використання в модифікації тваринного корму або їжі, наприклад, для обробки їжі або корму або *in vitro* (за допомогою модифікації компонентів або корму їжі), або *in vivo*. В іншому аспекті гідролазу за винаходом можна доставляти за допомогою експресії ферментів безпосередньо в трансгенних

40 кормових культурах (у вигляді, наприклад, трансгенних рослин, насіння і т. п.), таких як кукурудза, соєві боби, рапсове насіння, люпин і т. п. В одному з аспектів у даному документі надані трансгенні рослини, частини рослин і клітини рослин, які містять послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид за винаходом. В одному з аспектів нуклеїнову кислоту експресують так, що гідролазу за винаходом одержують у кількостях, що піддаються витяганню. Гідролазу можна одержувати з будь-якої рослини або частини рослини. Альтернативно, рослину або частину рослини, що містить рекомбінантний поліпептид, можна використовувати по суті для поліпшення якості їжі або корму, наприклад, підвищення харчової цінності, смакової привабливості і реологічних властивостей або для руйнування антиживильного фактора.

Переетерифікація

50 В одному з аспектів способи і композиції, надані в даному документі, можна використовувати для модифікації властивостей сумішей триацилгліцеридів і, в одному з аспектів, їх консистенції. В одному з аспектів фермент за винаходом можна використовувати в присутності каталізатора, такого як металевий натрій або метоксид натрію, для прискорення перегрупування залишку карбонової кислоти між молекулами гліцериду так, що продукти

55 складаються із сумішей гліцеридів, у яких залишки жирних кислот випадково розподілені по молекулах гліцеридів.

В одному з аспектів ферменти за винаходом можна використовувати для одержання продуктів переетерифікації при умовах реакції, у яких мінімізований гідроліз жиру для того, щоб переважною реакцією стала переетерифікація, каталізована ліпазою. Ці умови можуть

60 включати, наприклад, обмеження кількості води в системі.

В одному з аспектів ферменти за винаходом, можна використовувати для каталізу реакцій переетерифікації з використанням сумішей триацилгліцеридів і вільних жирних кислот, як описано, наприклад, в EP 0093602 B2. У цих випадках ацильні групи триацилгліцеридів можна замінити вільною жирною кислотою для одержання нових триацилгліцеридів, збагачених

приєднаною жирною кислотою. В одному з аспектів 1,3-специфічні ліпази за винаходом можна використовувати, щоб обмежувати реакцію положеннями 1 і 3 у гліцеридах, що дозволяє одержати суміш триацилгліцеридів, які не можна одержати за допомогою хімічної переетерифікації або реакції з неспецифічною ліпазою. В одному з аспектів неспецифічні ліпази використовують для досягнення результатів, схожих на хімічну переетерифікацію.

Можливість одержання сумішей нових триацилгліцеридів з використанням ліпаз зі специфічністю по визначених положеннях за винаходом можна використовувати у виробництві олій і жирів, оскільки деякі з цих сумішей мають корисні властивості. Одним із прикладів є каталізована 1,3-специфічною ліпазою переетерифікація 1,3-дипальмітоїл-2-монолеїну (POP), що є основним триацилгліцеридом середньої фракції пальмової олії, зі стеариновою кислотою або тристеарином для одержання продуктів, збагачених корисним 1-пальмітоїл-3-стеароїл-2-монолеїном (POSt) і 1,3-дистеароїл-2-монолеїном (StOSt). POSt і StOSt є важливими компонентами масла какао. Таким чином, в одному аспекті за винаходом, передбачена реакція переетерифікації для одержання еквівалентів масла какао з дешевої вихідної речовини.

В одному з аспектів у даному документі надані способи одержання заміникового твердого жиру з використанням 1,3-специфічних ліпаз за винаходом. В одному з аспектів заміник твердого жиру містить середню фракцію пальмової олії і StOSt, POSt або StOSt/POSt з чистотою щонайменше 85%.

Далі даний винахід описаний з посиланням на наступні приклади; однак варто розуміти, що даний винахід не обмежений такими прикладами.

Приклади

Приклад 1: Зразкові аналізи ліпази-сатурази

У наступному прикладі описані зразкові аналізи для скринінгу гідролазної, наприклад, ліпазної, сатуразної, пальмітазної і/або стеаратазної, активності. В одному з аспектів ці зразкові аналізи можна використовувати як повсякденний скринінг для визначення того, чи входить поліпептид в обсяг винаходу. Такі аналізи включають використання сполук-індикаторів pH для визначення відщеплення жирних кислот від триацилгліцеридів, спектрофотометричні способи, BEXX, GX, MS, TLC і інші. Jaeger (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* 15:29-63; Ader (1997) *Methods Enzymol.* 286:351-386; Vorderwulbecke (1992) *Enzyme Microb. Technol.* 14:631-639; Renard (1987) *Lipids* 22:539-541.

Скринінг ліпазної/естеразної активності

Колонії збирали стерильними зубочистками і використовували для однократної інокуляції кожної ямки 96-ямкових мікротитрувальних планшетів. Ямки містили по 250 мкл середовища LB з 100 мкг/мл ампіциліну, 80 мкг/мл метициліну і 10% об./об. гліцерину (LB амп./мет., гліцерин). Клітини вирощували протягом ночі при 37 °C без струшування. Таким чином, кожна ямка містила вихідну культуру клітин *E. coli*, кожна з яких містила pBLUESCRIPT™ з унікальною вставкою ДНК.

96-ямкові планшети використовували для багаторазової інокуляції одного планшета ("конденсований планшет"), що містить у кожній ямці по 200 мкл LB амп./мет., гліцерин. Цю стадію здійснювали з використанням High Density Replicating Tool (HDRT) з BIOMEK™ (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) з 1% відбілювачем, водою, ізопропанолом, циклом стерилізації повітряним сушінням між кожною інокуляцією. Таким чином, кожна ямка конденсованого планшета містила від 10 до 12 різних клонів pBLUESCRIPT™ з кожного планшета вихідної бібліотеки. Конденсований планшет вирощували протягом 16 годин при 37 °C і потім використовували для інокуляції двох білих 96-ямкових мікротитрувальних дочірніх планшетів (Polyfiltronics, Inc., Rockland MA), які у кожній ямці містили по 250 мкл LB амп./мет. (без гліцерину). Вихідний конденсований планшет поміщали на зберігання при -80 °C. Два конденсовані дочірні планшети інкубували при 37 °C протягом 18 годин.

"600 мкМ вихідний розчин субстрату" естерази з короткими ланцюгами одержували наступним чином: у придатному об'ємі ДМСО розчиняли по 25 мг кожної з наступних сполук для одержання 25,2 мМ розчину. Використовували сполуки 4-метилумбеліферилпропіонат, 4-метилумбеліферилбутират і 4-метилумбеліферилгептаноат. 250 мкл кожного розчину в ДМСО додавали приблизно в 9 мл 50 мМ буфера HEPES, pH 7,5, що містив 0,6% Triton X-100 і 0,6 мг/мл додецилмальтозиду (Anatrace, Maumee, OH). Об'єм доводили до 10,5 мл буфером HEPES, щоб одержати злегка замутнену суспензію.

"600 мкМ вихідний розчин субстрату" з довгими ланцюгами одержували наступним чином: у ДМСО розчиняли по 25 мг кожної з наступних сполук до концентрації 25,2 мМ, як зазначено вище. Використовували сполуки 4-метилумбеліферилелаїдат, 4-метилумбеліферилпальмітат, 4-метилумбеліферилолеат і 4-метилумбеліферилстеарат. Усі їх необхідно було нетривало нагрівати у ванні при температурі 70 °С, щоб домогтися розчинення. 250 мкл кожного розчину в ДМСО додавали в буфер HEPES і розбавляли до 10,5 мл, як зазначено вище. Усі сім похідних умбеліферилу одержували з Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

У кожну ямку білого конденсованого планшета додавали 50 мкл "600 мкМ вихідного розчину субстрату" естерази з довгими ланцюгами або естерази з короткими ланцюгами з використанням BIOMEK™ для одержання кінцевої концентрації субстрату приблизно 100 мкМ. Значення флуоресценції реєстрували (збудження=326 нм, випромінювання=450 нм) на флуориметрі для зчитування планшетів безпосередньо після додавання субстрату. Планшет інкубували при 70 °С протягом 60 хвилин у випадку субстратів з довгими ланцюгами і протягом 30 хвилин при КТ у випадку субстратів з короткими ланцюгами. Знову реєстрували значення флуоресценції. Для визначення присутності активного клону порівнювали вихідні і кінцеві значення флуоресценції.

Для виділення окремого клону, що має активність, планшети Source GenBank відтавали і використовували окремі ямки для однократної інокуляції нового планшета, що містить LB амп./мет. Як зазначено вище, для росту клітин планшет інкубували при 37 °С, додавали 50 мкл 600 мкМ вихідного розчину субстрату з використанням BIOMEK™ і визначали флуоресценцію. Після ідентифікації активної ямки з вихідного планшета, клітини з цієї активної ямки переносили смугами на агар з LB/амп./мет. і росли протягом ночі при 37 °С для одержання окремих колоній. Стерильною зубочисткою зібрали вісім окремих колоній і використовували для однократної інокуляції ямок 96-ямкового мікротитрувального планшета. Ямки містили по 250 мкл LB амп./мет. Клітини росли протягом ночі при 37 °С без струшування. Аліквоту 200 мкл видаляли з кожної ямки й аналізували з використанням придатних субстратів з довгим або коротким ланцюгом, як зазначено вище. Ідентифікували найбільш активний клон і 50 мкл культури, що залишилися, використовували для перенесення смугами на чашку з агаром з LB/амп./мет. Вісім окремих колоній збирали, вирощували й аналізували, як зазначено вище. Найбільш активний клон використовували для інокуляції 3 мл культур LB/амп./мет., які росли протягом ночі. Плазмідну ДНК виділяли з культур і використовували для секвенування.

Приклад 2: Зразкові протоколи для визначення профілів вивільнених жирних кислот у результаті ферментативного гідролізу рослинної олії за допомогою LCMS

У наступному прикладі описані зразкові способи (протоколи) проведення ферментативного гідролізу рослинної олії, такої як соєва олія (використовували в цьому прикладі), (включаючи одержання ферменту) з використанням, наприклад, ферментів за винаходом. У цьому прикладі також описані зразкові способи (протоколи) якісного і кількісного визначення жирних кислот, вивільнених з олії. Описано спосіб з використанням ліпази SEQ ID NO:2, але можна використовувати інші ферменти, включаючи ферменти за винаходом, наприклад, зразкові ферменти, що мають послідовності, як зазначено в SEQ ID NO:2, і містять модифікації одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше або всіх амінокислотних залишків, описані в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23.

Експресія білка в глибокому 96-ямковому планшеті

1. Ростити ліпазні клони E. coli протягом ночі при 30 °С у 1 мл середовища TB, що містить карбеніцилін (100 мкг/мл), у глибоких 96-ямкових планшетах. Реєструвати положення й ідентичність клонів.

2. Інокулювати свіжі глибокі 96-ямкові планшети, що містять середовище TB (1 мл; карбеніцилін 100 мкг/мл), рідкими культурами (10 мкл/ямку).

3. Інкубувати культуру протягом ночі при 30 °С при струшуванні зі швидкістю 200 об./хв.

4. Індукувати експресію білка за допомогою перенесення 500 мкл кожної нічної культури у свіжий 96-ямковий планшет, що містить середовище TB (500 мкл/ямку; карбеніцилін 100 мкг/мл) і безводний тетрациклін (200 нг/мл).

5. Інкубувати при 30 °С протягом 2 годин при струшуванні зі швидкістю 200 об./хв.

6. Зібрати клітини центрифугуванням кожного планшета протягом 10 хвилин на швидкості 3000×g. Видалити супернатант. Клітинні осадки можна використовувати відразу в аналізі олій або зберігати при -20 °С для подальшого використання.

Реакція ферментативного гідролізу олії

1. У кожен клітинний осад додати 100 мкл B-PER™ (Pierce Chemical, Rockford, IL). Якщо осад зберігали при -20 °С, то перед додаванням B-PER™ залишити відтавати протягом 10 хв.

при кімнатній температурі.

2. Додати 400 мкл соєвої олії в кожну ямку глибокого 96-ямкового планшета.

3. У кожну ямку додати декілька бусин (скло 710-1180 мкм). Запечатати планшети, використовуючи CAPMATS™ (Whatman, Florham Park, NJ).

5 4. Лізувати клітини й одержати емульсію олія/фермент/буфер з використанням Mixer Mill (Retsch Inc., Newtown, PA). Помістити пари запечатаних планшетів у Mixer Mill і струшувати протягом 30 секунд із частотою 30 циклів/секунду.

5. Замінити ізоляцію CAPMATS™ на газопроникну ізоляцію.

10 6. Інкубувати планшети протягом 2 годин при 37 °C при струшуванні на швидкості 200 об./хв. Екстракція жирних кислот

1. У кожну ямку глибокого 96-ямкового планшета додати по 1 мл розчинника для екстракції (CHCl_3 :MeOH:4N HCl (2:1:0,075)).

2. Піпетувати суміш декілька разів доти, поки вона не набуде гомогенного вигляду.

3. Закрити планшети ізоляцією з алюмінієвої фольги.

15 4. Центрифугувати протягом 5 хвилин при 3000×g. Порушити ізоляцію надрізанням, використовуючи лезо бритви.

5. Пройти кінцем піпетки через верхню фазу і перенести 5 мкл нижньої фази в новий глибокий 96-ямковий планшет, що містить MeOH 995 мкл/ямку (тобто, розведення нижньої фази 1/200). Уникати контамінації верхньою фазою. Зберігати відділені екстракційні суміші при 4 °C.

20 6. Перенести по 150 мкл розведень усіх зразків 1/200 у полістироловий 96-ямковий планшет.

7. Для запобігання випаровуванню запечатати планшети термозварюванням. Переконайтеся у відсутності контакту MeOH з ізоляцією, оскільки це буде перешкоджати правильній адгезії.

8. Аналізувати зразки за допомогою LC/MS.

Аналіз LC/MS

25 1. Зразки, представлені у форматі 96-ямкових планшетів, упорскували через автодозатор HTCPAL™ (LEAP Technologies, Carrboro, NC) у ізократну суміш $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (10/90, об./об.) і 0,1% мурашину кислоту, що подаються насосами LC-10ADVP™ (Shimadzu, Kyoto, Japan) зі швидкістю 1,2 мл/хв.

30 2. Поділ здійснювали за допомогою 150×2,00 мм колонки SYNERGI MAX-RP™ (Phenomenex, Sutter Creek, CA) і визначення. Кількісне визначення виконували за допомогою потрібного квадрупольного мас-спектрометра API 4000™ (Applied Biosystems, Foster, CA) з використанням електророзпилювальної іонізації (ESI) і моніторингу декількох іонів з масами 277, 279, 281, 255, 283 у режимі негативно заряджених іонів.

35 3. Контроль обладнання і генерацію даних виконували з використанням програмного забезпечення ANALYST™ 1.3 (Applied Biosystems, Foster, CA).

4. LC/MS калібрували для кожної жирної кислоти в діапазоні від 0,5 до 50 мкг із використанням еталонних зразків (Sigma). Цей діапазон найкраще відповідає калібрований кривій квадратичної регресії, яку використовують для обчислення кількості кожної жирної кислоти, вивільненої в зразках ферментів.

40 Приклад 3: Зразкові протоколи для високопродуктивного скринінгу еволюційних бібліотек ліпаз на підвищену вибірковість гідролізу складних ефірів пальмітинової або стеаринової кислоти в порівнянні зі складними ефірами олеїнової кислоти

У наступному прикладі описані зразкові способи (протоколи) високопродуктивного скринінгу "еволюційних бібліотек" ліпаз на підвищену вибірковість до гідролізу складних ефірів пальмітинової або стеаринової кислоти в порівнянні зі складними ефірами олеїнової кислоти. У цьому зразковому способі (протокол/високопродуктивний скринінг) описаний скринінг еволюційних бібліотек ліпаз, одержаних з SEQ ID NO:2, який можна застосовувати і до інших ферментів, включаючи ферменти за винаходом, наприклад, зразкові ферменти, що містять послідовності, як зазначено в SEQ ID NO:2, і мають модифікації одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше або всіх амінокислотних залишків, описані в таблиці 3 або таблиці 4; і цей зразковий спосіб (протокол) можна застосовувати до інших типів бібліотек.

Ці зразкові високопродуктивні скринінги проводять з використанням двох флуорогенних субстратів: метилумбеліферилінові складні ефіри пальмітинової або стеаринової кислоти в порівнянні з метилумбеліфериліновим складним ефіром олеїнової кислоти.

Порядок проведення високопродуктивного скринінгу

1. Клоні з бібліотек поміщають у мікротитрувальні планшети й аналізують у первинному високопродуктивному скринінгу.

2. Клоні, у яких установлена підвищена вибірковість, позначають як первинні хіти.

60 3. Первинні хіти повторно поміщають у мікротитрувальні планшети й аналізують у

вторинному високопродуктивному скринінгу.

4. Клони, у яких підтверджена підвищена вибірковість, позначають як вторинні хіти.

5. Вторинні хіти секвенують для ідентифікації присутніх мутацій послідовності і проводять аналіз з олією (див. окремий протокол).

5 Протокол високопродуктивного аналізу

1. Нанести штрих-коди на чорні 384-ямкові планшети для аналізу; нанести штрих-коди на 384-ямкові планшети для росту і внести середовище LB по 30 мкл/ямку (карбеніцилін 100 мкг/мл).

10 2. Вибірково перенести клони в планшети для росту і ростити протягом ночі при 30 °C у вологому інкубаторі.

3. Індукувати експресію ліпази додаванням середовища LB по 30 мкл/ямку (карбеніцилін 100 мкг/мл), що містить 4 мкг/мл безводного тетрацикліну, і інкубувати 2 години при 30 °C.

4. Лізувати клітини додаванням 20 мкл/ямку B-PER™ (Pierce Chemical, Rockford, IL); зберігати при кімнатній температурі доти, поки не помістять на робота.

15 5. Запустити аналіз ліпазної активності на роботі (див. нижче).

6. Клони, у яких встановлена підвищена вибірковість до MeUMB складних ефірів пальмітинової або стеаринової кислоти в порівнянні з MeUMB складним ефіром олеїнової кислоти, позначають як хіти.

20 7. Вибірково перенести клони хітів у глибокі 96-ямкові планшети, що містять середовище LB (1 мл/ямку; карбеніцилін 100 мкг/мл), і ростити протягом ночі при 30 °C.

8. У вторинному скринінгу первинні хіти повторно поміщають у 384-ямкові планшети і повторюють стадії 1-8; позначають клони хітів як вторинні хіти.

9. Після стадії 8 вторинні хіти передають на секвенування.

Приклад протоколу автоматизованого високопродуктивного скринінгу

25 1. Абрикос: змішати і перенести аліквоту (10 мкл) лізованих клітин з "планшета для росту" (див. стадії 1-4 вище) у кожний із двох окремих планшетів для аналізу (1 і 2).

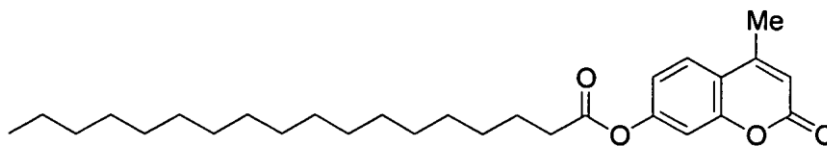
2. MULTIDROP™ (Thermo Electron Corporation, Milford, MA): додати 70 мкл субстрату 1 (УМБ-16:0) у планшет для аналізу 1; додати 70 мкл субстрату 2 (УМБ-18:1) у планшет для аналізу 2.

3. Інкубувати планшети для аналізу протягом 20 хвилин при 37 °C.

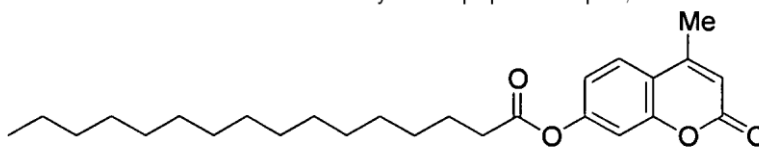
30 4. Прочитати на флуориметрі: збудження 360 нм і випромінювання 465 нм.

Клони вторинних хітів, у яких визначили наявність унікальних послідовностей, поміщають і ростять у 96-ямкових планшетах і проводять аналіз на соєвій олії (див. нижче).

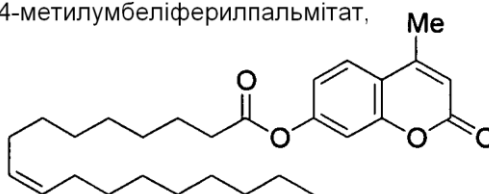
Структури флуорогенних субстратів, використовуваних у високопродуктивному скринінгу,



4-метилумбеліферилстеарат,



4-метилумбеліферилпальмітат,



4-метилумбеліферилолеат

35 Приклад 4: Зразкова еволюція для удосконаленого гідролізу складних ефірів пальмітинової або стеаринової кислоти з використанням технології GSSMSM

У наступному прикладі описані й узагальнені результати зразкової "еволюції ферменту" і протоколи скринінгу, які дозволяють ідентифікувати зразкові ферменти за винаходом, наприклад, ферменти, що містять послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також містять модифікації залишків, як зазначено в таблиці 3 або таблиці 4; або ферменти, кодовані нуклеїновою кислотою, що містить послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:1, але також

містять модифікації залишків, як зазначено у таблиці 3 або таблиці 4. В одному з аспектів у зразковому скринінг-аналізі для ідентифікації цих зразкових ферментів за винаходом використовують соєву олію як субстрат, а жирні кислоти, вивільнені (гідролітично відщеплені) із соєвої олії, характеризують, наприклад, як ліноленову кислоту, лінолеву кислоту, олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту або стеаринову кислоту.

Соєва олія має наступний розподіл жирних кислот: ліноленова = 8%; лінолева = 53%; олеїнова = 23%; пальмітинова = 12%; стеаринова = 4%. Таким чином, якщо процент пальмітинової кислоти, вивільненої (гідролітично відщепленої) із соєвої олії зразковим ферментом за винаходом, перевищує 12%, то цей фермент має схильність до гідролітичного відщеплення (вивільнення) пальмітинової кислоти.

Скринінг пальмітаз: одержання "бібліотеки пальмітаз"

Бібліотеку варіантів пальмітази SEQ ID NO:2 одержували за допомогою технології GSSMSM (патент № 6171820). Точкові мутації вводили з використанням вироджених олігонуклеотидів в одне положення амінокислоти за один раз для того, щоб кожен вихідний кодон замінити на кожну з 20 кодованих природних амінокислот. Варіанти, що мутували, трансформували в організм-хазяїн *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen, USA) для експресії і скринінгу. Бібліотеку конструювали в експресуючому векторі pASK-5, який є модифікацією вектора pASK-IBA (IBA GmbH, Germany). Щоб одержати pASK-5, вихідний лінкер клонування заміняли новими сайтами клонування, а саме послідовність з XbaI до HindIII вектора pASK-IBA заміняли на наступну послідовність:

	RBS		ArgSerHisHisHisHisHisHisHis	
	<u>TCTAGATAACGAGGCCAAAACCATGGGAGGATCCAGATCTCATCACCATCACCATCAAGCTT</u> (SEQ ID NO:21)			
XbaI		NcoI	BamHI BglII	HindIII

Експресію варіантів GSSMSM індукували ангідротетрацикліном після досягнення оптимальних густин клітин-хазяїнів.

Проводили скринінг ферментів, які містять амінокислотні послідовності, створені за допомогою технології GSSMSM, використовуючи протокол високопродуктивного скринінгу, наприклад, протокол, описаний у прикладі 3, у якому визначали, яка жирна кислота переважно піддається гідролітичному відщепленню від жиру - соєвої олії в цьому аналізі. Ціль еволюційного проекту полягала в удосконаленні вибіркості вихідної послідовності, SEQ ID NO:2, до пальмітату на олії. Аналіз включає приведення ферменту з новою/модифікованою послідовністю в контакт із соєвою олією, що містить різні жирні кислоти, включаючи ліноленову кислоту, лінолеву кислоту, олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту і стеаринову кислоту (див. розподіл у %, наведений вище), і вимірювання кількості кожної жирної кислоти, гідролітично відщепленої за допомогою кожного модифікованого ферменту. Ідентифікували "бібліотеку" послідовностей, які дозволяли ферменту гідролітично відщеплювати переважно пальмітинову кислоту (або стеаринову кислоту, див. нижче) від соєвої олії (так називана "бібліотека пальмітаз"):

- первинний і вторинний скринінг проводили з використанням високопродуктивного скринінгу, наприклад, способу, описаного в прикладі 3;

- секвенування вторинних хітів дозволило ідентифікувати мутації амінокислот, що ведуть до удосконаленої вибіркості гідролітичного відщеплення пальмітату в порівнянні з олеатом у високопродуктивному скринінгу в порівнянні, наприклад, з вихідною послідовністю, SEQ ID NO:2;

- один клон для кожного варіанта кодону, що кодує мутацію амінокислоти, вибирали і переносили в 96-ямкові планшети для проведення аналізу з олією;

- в аналізах з олією одержували вибіркості ферментів, що мутували, до пальмітату або стеарату або інших жирних кислот (таблиця 3);

- для найбільш ефективного хіта вихід пальмітату складав 59% від вивільнених жирних кислот (ЖК) у порівнянні з 43% для SEQ ID NO:2 у тому ж аналізі; це відповідає збільшенню коефіцієнта вибіркості від 3,6 до 4,9;

- деякі клони показали збільшення вибіркості до стеарату.

Нижче в таблиці 1 підсумовані мутації GSSMSM (див. вище), відібрані для включення в "бібліотеку пальмітаз", що підлягають об'єднанню за допомогою технології GeneReassemblySM (див. приклад 5). В одному зразковому аналізі ідентифікували чотирнадцять (14) мутацій окремих амінокислот як таких, що надають найбільше збільшення гідролітичного відщеплення пальмітату в аналізах з олією (також нижче див. таблиці 1, 3 і 4). Залишки позначали відповідно до того порядку, у якому вони зустрічаються в батьківській SEQ ID NO:2 (див. фіг. 7), серед залишків, що дають значне збільшення гідролітичного відщеплення пальмітату або стеарату в

аналізах з олією. Наведені "вихідна AA" у SEQ ID NO:2 і корисна мутація ("нові амінокислоти"), тобто, зразкові послідовності за винаходом. В одному з аспектів, одиночні мутації в аргінін (R) у положеннях залишків 163 і 164 можна включати поперемінно так, що ця зразкова бібліотека буде містити клони з послідовностями 163V-164D (SEQ ID NO:2), 163R-164D і 163V-164R, але не з послідовністю 163R-164R.

Таблиця 1

Залишок	Вихідна амінокислота	Нові амінокислоти
61	D	A, E
72	R	E, K
116	E	A, Q, R, T, V
133	S	A
151	I	G, A
163	V	R
164	D	R

На фіг. 6а показані ефекти GSSMSM мутацій зразкової пальмітази на гідроліз пальмітату і стеарату стосовно вихідної SEQ ID NO:2. Для кожної з чотирнадцяти (14) одиночних мутацій амінокислот, відібраних для включення в бібліотеку пальмітаз GeneReassembly, графічно відображена зміна процентної частки вивільненого пальмітату і стеарату стосовно вихідної SEQ ID NO:2. Багато які з цих мутацій дають значні підвищення гідролізу пальмітату, що супроводжується підвищенням гідролізу стеарату в невеликій або значній мірі. Однак деякі мутації викликають легке зниження гідролізу стеарату. Зірочки позначають мутації, ідентифіковані як такі, що передають підвищену вибіркковість сатуразного типу.

Скринінг стеаратаз: одержання "бібліотеки стеаратаз"

Бібліотеку варіантів стеаратази SEQ ID NO:2 одержували за допомогою технології GSSMSM (патент № 6171820). Точкові мутації вводили з використанням вироджених олігонуклеотидів, в одне положення амінокислоти за один раз, для того, щоб можна було замінити кожен вихідний кодон на кожен з 20 кодованих природних амінокислот. Варіанти, що мутували, трансформували в організм-хазяїн *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen, USA) для експресії і скринінгу. Бібліотеку конструювали в експресуючому векторі pASK-5 (як описано вище). Експресію варіантів GSSMSM індукували ангідротетрацикліном після досягнення оптимальних густин клітин-хазяїнів.

Проводили скринінг ферментів, що містять амінокислотні послідовності, створені за допомогою технології GSSMSM, з використанням протоколу високопродуктивного скринінгу, наприклад, протоколу, описаного в прикладі 3, який дозволяє визначити, яка жирна кислота переважно гідролітично відщеплювалася від жиру - соєвої олії в цьому аналізі. Аналіз включав приведення ферменту з новою/модифікованою послідовністю в контакт із соєвою олією, що містить різні жирні кислоти, включаючи ліноленову кислоту, лінолеву кислоту, олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту і стеаринову кислоту (див. % розподіл, наведений вище), і вимірювання кількості кожної жирної кислоти, гідролітично відщепленої за допомогою кожного модифікованого ферменту. Ідентифікували "бібліотеку" послідовностей, які дозволяють ферменту переважно гідролітично відщеплювати стеаринову кислоту (або пальмітинову кислоту, див. вище) від соєвої олії (так називана "бібліотека стеаратаз"):

- первинний і вторинний скринінг проводили з використанням високопродуктивного скринінгу, наприклад, способу, що описаний у прикладі 3;

- секвенування ідентифікованих амінокислотних мутацій вторинних хітів, що ведуть до удосконаленої вибіркковості гідролізу стеарату в порівнянні з олеатом у високопродуктивному скринінгу в порівнянні, наприклад, з вихідною послідовністю, SEQ ID NO:2;

- один клон для кожного варіанта кодону, що кодує мутацію амінокислоти, вибирали і переносили в 96-ямкові планшети для аналізу з олією;

- Аналізи з олією секвенованих вторинних хітів давали вибіркковості ферментів, що мутували, до пальмітату або стеарату або до інших жирних кислот (таблиця 3);

- найбільш ефективний хіт давав стеарат у кількості 22% від вивільнених ЖК у порівнянні з 9% для SEQ ID NO:2 у тому ж аналізі; це відповідає збільшенню коефіцієнта вибіркковості з 2,3 до 5,5;

- декілька клонів також показали збільшення вибіркковості до пальмітату.

Нижче в таблиці 2 підсумовані мутації GSSMSM (див. вище), вибрані для включення в "бібліотеку стеаратаз", що підлягають об'єднанню за допомогою технології GeneReassemblySM.

В одному зразковому аналізі двадцять дві (22) мутації окремих амінокислот ідентифікували як такі, що дають найбільше збільшення гідролітичного відщеплення стеарату в аналізах з олією (також нижче див. таблиці 2, 3 і 4). Залишки позначали відповідно до порядку, у якому вони зустрічаються в "вихідній" SEQ ID NO:2, серед залишків, що дають значне збільшення гідролізу пальмітату або стеарату в аналізах з олією. Наведені "Вихідна амінокислота" у SEQ ID NO:2 і корисні мутації ("Нові амінокислоти"), тобто, зразкові послідовності за винаходом. В одному з аспектів одиночна мутація в аланін (а) у положенні залишку 223 включена як фіксована мутація так, щоб кожен клон у цій зразковій бібліотеці містив цю мутацію.

Таблиця 2

Залишок	Вихідна амінокислота	Нові амінокислоти
20	I	L
62	V	S
77	G	P
83	V	C
88	D	H
113	Y	G
116	E	G, T
140	H	K
146	K	S
167	I	S
180	L	E
194	E	M
211	A	Q
212	S	Y
215	G	C, V, W
218	A	H, S
223	V	A
225	A	Q, M

На фіг. 6b (також див. вище) показані ефекти дванадцяти (12) із двадцяти двох (22) основних GSSMSM мутацій стеаратази на гідроліз пальмітату і стеарату стосовно вихідної SEQ ID NO:2. Для кожної з дванадцяти (12) окремих мутацій амінокислот, наведених на фіг. 6b і вибраних для включення в бібліотеку стеаратаз GeneReassembly, графічно відображена зміна процентної частки вивільненого пальмітату і стеарату стосовно вихідної SEQ ID NO:2. Більшість цих мутацій давали значні збільшення гідролізу стеарату, але легке або значне зниження гідролізу пальмітату. Зірочки позначають мутації, ідентифіковані як такі, що передають підвищену вибірковість сатуразного типу, тобто, збільшення вибірковості гідролітичного розщеплення пальмітату і стеарату в порівнянні з гідролітичним відщепленням ненасичених жирних кислот в олії, наприклад, олеату, лінолеату і ліноленату.

- Зведення

- Скринінг "бібліотеки GSSMSM" (див. докладний опис технології GSSMSM вище) на основі батьківської SEQ ID NO:2 дав клони з одиночними мутаціями амінокислот зі значним збільшенням вибірковості до пальмітату і стеарату і вибірковості до складних ефірів насичених жирних кислот, тобто, вибірковості гідролізу пальмітату і стеарату (наприклад, вибіркового гідролітичного відщеплення пальмітату і/або стеарату від соєвої олії).

- Виявлені клони зі значним поліпшенням вибірковості до стеарату (вибіркового гідролітичного відщеплення стеаринової кислоти стосовно інших жирних кислот).

- Виявлені мутанти GSSMSM зі збільшеною вибірковістю до пальмітату (вибіркоче гідролітичне відщеплення пальмітинової кислоти стосовно інших жирних кислот) стосовно ферменту SEQ ID NO:2.

Нижче в таблиці 3 і таблиці 4 описані (додатково резюмовані) послідовності зразкових ферментів гідролаз за винаходом, наприклад, зразкові ферменти, що містять послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, і містять зміни щонайменше одного (одного, декількох або всіх) амінокислотного залишку, описані в таблицях. У таблиці 3 і таблиці 4 також резюмовані дані про активність вибраних зразкових ферментів; дані включають зіставлення конкретних зразкових ферментів з їх позитивною гідролазною активністю, включаючи каталіз гідролітичного відщеплення (вивільнення) пальмітинової або стеаринової жирної кислоти від соєвої олії, як встановлено за допомогою протоколу високопродуктивного скринінгу, як описано вище.

У таблиці 3 і таблиці 4 термін "Вихідна амінокислота" позначає намічений амінокислотний залишок (зазначений під "Амінокислотним залишком") у "батьківському" ферменті SEQ ID NO:2 ("намічений" для зміни); а термін "Нові амінокислоти" позначає знову спроектований амінокислотний залишок (який замінює відповідний "намічений" залишок у "старій послідовності") у зразковому (новому) ферменті за винаходом. Перерахування залишків "Нових амінокислот" у колонці "стеарат" проти колонки "пальмітат" указує на те, який із двох високопродуктивних скринінгов жирних кислот (тобто, вивільнення пальмітинової кислоти в одному скринінгу і вивільнення стеаринової кислоти в іншому скринінгу, див. приклад 3) використовували для визначення (ідентифікації) конкретного ферменту з зазначеною зміною залишку (послідовність нового ферменту, залишки "Нова Амінокислота").

Наприклад, у першому рядку в таблиці 3 у 7 амінокислотному залишку тирозин (або "Y") з "батьківського" ферменту SEQ ID NO:2 заміщають амінокислотним залишком аргініну (або "R") і цей новий фермент (Y7R) має активність, що відрізняється від активності батьківського ферменту (див. таблицю 3); наприклад, у "Даних про олію" резюмована субстратна перевага (жирної кислоти) нового ферменту (наприклад, ферменту Y7R) шляхом перерахування вивільнених (гідролізованих) жирних кислот, одержаних при впливі (контакті) ферменту із соєвою олією (аналізи описані вище); потрібно відзначити, що соєва олія субстрату містить декілька доступних для гідролітичного відщеплення складових груп жирних кислот, включаючи ліноленову кислоту, лінолеву кислоту, олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, стеаринову кислоту.

Наприклад, у першому рядку для ферменту Y7R 8,3% вивільнених жирних кислот (із соєвої олії, що реагувала) складала ліноленова кислота, 22,1% вивільнених жирних кислот складала лінолева кислота; 19,7% вивільнених жирних кислот складала олеїнова кислота; 41,5% вивільнених жирних кислот складала пальмітинова кислота; 8,4% вивільнених жирних кислот складала стеаринова кислота (сума цих чотирьох чисел складає 100%).

У колонці P+S наведені суми двох окремих значень P і S, щоб показати, яку частину від усіх вивільнених жирних кислот складали пальмітинова кислота і стеаринова кислота ($41,5\% + 8,4\% = 49,9\%$ гідролітично відщеплених жирних кислот складали пальмітинова кислота і стеаринова кислота, або "P+S").

Таблиця 3

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
7	Y	R		49.9%
8	G	E, A218R		
12	R		F	47.8%
			K	54.2%
			L	45.4%
			M	43.3%
16	D	M		43.2%
18	P		G	41.8%
20	I		L	50.3%
			V	44.6%
22	T		M, G215V	52.1%
27	G	Q		57.2%
		S		43.6%
29	A		G	51.5%
32	G		E	масштаб
			D, L180E	44.6%
34	L		E	45.8%
			V	масштаб
36	D		A	51.0%
			G	50.9%
40	V		P	32.2%
42	V		I	47.2%
43	L	V	L	47.8%
				51.5%
45	G	A		44.4%
		L		52.7%
48	A		G	45.4%
			V	70.1%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
			V	55.7%
		T		33.60%
54	S	H		55.6%
61	D	A		60.5%
		E		55.0%
		S		49.8%
62	V	E	E	53.0%
		A		56.6%
		G		56.5%
		M		51.9%
		N		49.7%
		Q		52.4%
		S		55.5%
		T		50.7%
			D	52.5%
			L	
			W	50.2%
66	A		N	54.2%
			R	52.1%
72	R	E		58.3%
		K		61.0%
		P		27.2%
		S		55.3%
		T		55.9%
		Y		50.1%
74	F	I		53.8%
		L		54.8%
		P		52.3%
		R		50.5%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
77	G	P		38.1%
78	I		D	47.1%
			E	37.1%
			P	40.9%
80	G	P		51.9%
82	L		P	37.3%
83	V	C		47.7%
		M		59.3%
84	D	V		40.2%
87	V		A	49.2%
			C	46.1%
			D	43.9%
			E	46.6%
			G	
			P	53.3%
			S	45.2%
			T	42.8%
			H	52.9%
			N	50.3%
88	D		E	44.6%
			F	50.3%
			H	45.9%
			L	49.1%
			P	59.6%
			P	48.9%
			Q	47.1%
89	R	S		54.5%
92	A		D	47.3%
			E	59.3%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
			R	42.6%
			S	48.7%
			T	52.1%
			V	57.5%
93	V		M	48.2%
96	A	C	C	51.4%
		I	I	масштаб
		S	S	46.8%
98	G	A		45.0%
		L		масштаб
101	K		A	49.8%
103	I		L	36.8%
107	W		P	46.20%
			A	39.5%
			C	39.4%
			G	47.5%
			H	42.0%
			R	68.0%
			S	36.8%
			L	64.8%
			P, E217Q	46.2%
			V	37.8%
			V, E217Q	44.80%
108	S		стоп	19.0%
			A	43.0%
			C	26.0%
			G	47.5%
			K	57.8%
			L	44.0%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
		T, A218T	P	56.9%
			Q	58.6%
			R	54.7%
			V	53.4%
			E, E217Q	46.50%
109	L		M	49.0%
110	G		L	54.4%
113	Y	F	E	35.8%
			G	39.8%
				36.5%
116	E	A		66.6%
		F		54.7%
		G		53.8%
		H		57.9%
		L		58.5%
		L		55.1%
		P		58.0%
		Q		59.6%
		Q		60.5%
		R, H140R		60.6%
		R		61.8%
		S		58.6%
		S		59.7%
		T		67.6%
		V		67.8%
		R, H140R		
117	L	R, I161L		54.1%
			R	51.6%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
120	K	I		46.7%
		L	L	60.8%
		F		52.6%
		M		49.9%
		S	S	53.3%
132	G		D, S212A	56.2%
133	S		A	53.2%
			A	55.8%
			G	45.6%
			P	56.0%
			R	51.7%
			T	54.9%
			V, L139,H	53.2%
134	P		G	7.2%
			R	
135	F		K	51.8%
139	L		H, S133V	53.2%
140	H		K	45.5%
		R, E116R		
141	A		R	40.2%
			T	43.3%
142	N		M	46.1%
			R	53.8%
			S	43.2%
			T	64.3%
144	A		T, N142K	33.9%
146	K		S	50.2%
			G	49.4%
			L	51.6%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
		A		52.2%
147	I	F		56.5%
		F		50.5%
		L		52.2%
150	A		L	59.7%
			L	53.3%
151	I	A		48.6%
		G		53.0%
		H		60.0%
		P		33.7%
		S		52.2%
		T		49.2%
152	N		E	28.0%
			G	53.0%
			H	46.7%
			M	35.7%
			R	21.1%
155	T	C		51.1%
157	D	S		50.4%
		G		48.7%
		T		54.7%
158	N	A		51.2%
159	L	M		51.5%
160	P	T		52.8%
161	I		L, L117R	54.1%
			L	51.6%
162	P		K	масштаб
			R	масштаб
163	V		E	55.7%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
			R	63.9%
			T	49.7%
164	D		A	42.1%
			E	масштаб
			H	39.8%
			K	49.4%
			L	масштаб
			R	61.3%
			S	47.9%
			T	53.0%
			V	42.3%
			W	
166	Q		G	49.9%
			N	41.3%
			R	масштаб
167	I	R	R	53.3%
		S	S	47.3%
170	P		Q	45.6%
			A	52.5%
			A, S212H	34.7%
171	V		K	34.1%
172	R	P		51.7%
		Q		54.9%
		S		40.2%
178	S		K	50.6%
180	L		E	54.0%
			H	44.6%
			Q	масштаб
			F, G32D	44.6%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
183	V		I	масштаб
193	P			49.4%
194	E		A	масштаб
			M	47.9%
			Q	масштаб
			D, P193S	49.4%
197	D	K		39.4%
198	E	стоп		56.1%
200	L		V	55.3%
204	V		L	45.9%
			R	45.7%
210	A	V		50.2%
211	A		E	35.3%
			H	48.1%
			K	39.4%
			L	45.0%
			Q	50.3%
			F	32.6%
			N	46.1%
			P	49.2%
			R	55.2%
			W	47.8%
			Y	48.9%
		T		50.8%
		S		52.7%
			S	52.7%
		I	I	49.8%
		T, E217A		46.2%
212	S	C		49.3%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
		R		50.3%
			A, G132D	53.2%
		A		36.8%
		E		36.6%
		G		44.3%
		H		46.5%
		L		53.2%
		P		12.2%
		Q		41.8%
		R		50.2%
		T		53.7%
		V		38.7%
		W		48.4%
		Y		47.1%
			H, P170A	34.7%
213	K	I		47.9%
		G		57.7%
		T		56.7%
		T		55.5%
		стоп		
214	T		C	51.6%
			G	53.0%
		V	V	52.2%
		V		54.5%
		P		51.9%
		N		56.9%
		R		55.1%
		Y		62.7%
		Y		62.7%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
215	G	A	A	56.6%
			I	54.1%
			L	29.9%
		H		50.2%
		S		52.1%
		M		47.9%
		V		55.6%
		P		47.3%
		C		60.4%
		W		52.8%
		стоп		53.9%
			V, T22M	52.1%
216	A	T	T	50.9%
		R		41.9%
		Y		34.8%
		V	V	56.9%
		C		59.7%
		S	S	55.0%
		L		55.6%
217	E	Q		36.6%
		R		59.4%
		S		53.5%
		A		46.2%
		G		44.8%
		P		46.2%
218	A	M		42.5%
		H	H	49.1%
		Q	Q	47.7%
		R		53.4%

Амінокис- лотний залишок	Вихідна аміно- кислота	Хіти високопродуктивного скринінгу		P+S
		Пальмітат Нова аміно- кислота	Стеарат Нова аміно- кислота	
		W		51.9%
		S		51.1%
		T		50.0%
		K		52.4%
		R, G8E		
		R, 228K		
223	V		A	48.8%
			M	31.6%
			R	23.4%
			T	масштаб
224	A		F	49.5%
			G	58.2%
			G	48.4%
			I	41.7%
			Q	46.4%
			Y	43.7%
225	A		G	49.3%
			L	54.3%
			M	49.0%
			Q	45.8%
			T	43.2%
226	R		H	48.3%
			T	41.2%
227	L		R	41.4%

Таблиця 3 (продовження)

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
7	8.3%	22.1%	19.7%	41.5%	8.4%	49.9%
8						
12	11.5%	13.0%	27.7%	38.5%	9.3%	47.8%
	5.2%	22.1%	18.5%	47.2%	7.1%	54.2%
	14.7%	13.9%	26.0%	34.4%	11.0%	45.4%
	10.3%	12.8%	33.6%	34.0%	9.4%	43.3%
16	7.2%	25.1%	24.6%	36.1%	7.1%	43.2%
18	12.5%	20.0%	25.7%	36.2%	5.6%	41.8%
20	8.2%	21.2%	20.3%	38.5%	11.7%	50.3%
	12.2%	23.2%	20.0%	40.1%	4.5%	44.6%
22	8.0%	19.5%	20.4%	47.1%	5.0%	52.1%
27	7.5%	17.6%	17.6%	47.4%	9.8%	57.2%
	9.1%	23.2%	24.0%	35.8%	7.8%	43.6%
29	9.0%	19.9%	19.6%	40.9%	10.7%	51.5%
32	19.8%	29.1%	34.0%	масштаб	17.1%	масштаб
	14.6%	12.1%	28.7%	36.6%	7.9%	44.6%
34	5.6%	31.0%	17.5%	40.9%	4.9%	45.8%
	21.1%	35.3%	37.1%	масштаб	6.5%	масштаб
36	7.1%	22.1%	19.9%	43.8%	7.1%	51.0%
	8.7%	22.9%	17.6%	48.2%	2.7%	50.9%
40	0.0%	51.4%	16.4%	22.4%	9.7%	32.2%
42	14.8%	12.1%	25.8%	34.6%	12.6%	47.2%
	7.7%	13.9%	30.7%	34.8%	13.0%	47.8%
43	8.9%	19.9%	19.7%	44.4%	7.1%	51.5%
45	10.3%	23.8%	21.5%	38.5%	5.9%	44.4%
	5.9%	22.3%	19.1%	49.7%	3.0%	52.7%
48	15.0%	18.0%	21.7%	38.1%	7.2%	45.4%
	4.3%	11.5%	14.2%	61.0%	9.1%	70.1%
	7.6%	17.3%	19.4%	43.8%	12.0%	55.7%
	23.6%	13.4%	29.3%	22.5%	11.1%	33.60%
54	8.1%	19.3%	17.0%	48.4%	7.3%	55.6%

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
61	5.6%	19.8%	14.1%	53.9%	6.6%	60.5%
	6.4%	20.1%	18.5%	47.3%	7.7%	55.0%
	7.7%	19.9%	22.6%	41.5%	8.3%	49.8%
62	7.6%	18.8%	20.7%	44.6%	8.3%	53.0%
	9.2%	17.6%	16.6%	45.6%	11.0%	56.6%
	6.7%	20.3%	16.5%	47.6%	8.8%	56.5%
	7.7%	20.9%	19.5%	44.9%	6.9%	51.9%
	7.9%	21.7%	20.7%	40.7%	9.0%	49.7%
	8.5%	20.8%	18.4%	42.6%	9.8%	52.4%
	5.4%	26.0%	13.1%	37.0%	18.5%	55.5%
	10.0%	21.9%	17.5%	40.2%	10.5%	50.7%
	6.1%	23.2%	18.2%	47.1%	5.4%	52.5%
	9.9%	21.3%	18.6%	46.7%	3.6%	50.2%
66	7.5%	16.8%	21.5%	48.0%	6.2%	54.2%
	11.4%	18.0%	18.5%	47.2%	4.8%	52.1%
72	7.9%	16.5%	17.3%	54.2%	4.1%	58.3%
	4.4%	20.7%	13.9%	52.2%	8.7%	61.0%
	6.8%	44.6%	21.4%	20.2%	7.0%	27.2%
	8.6%	17.3%	18.8%	45.7%	9.6%	55.3%
	7.5%	17.4%	19.3%	45.1%	10.7%	55.9%
	6.7%	23.1%	20.1%	40.2%	9.9%	50.1%
74	7.4%	19.6%	19.3%	45.4%	8.4%	53.8%
	8.0%	19.3%	18.0%	44.8%	10.0%	54.8%
	8.7%	20.5%	18.6%	42.2%	10.1%	52.3%
	7.1%	21.7%	20.7%	41.1%	9.4%	50.5%
77	10.3%	41.0%	10.6%	17.8%	20.4%	38.1%
78	9.8%	22.5%	20.6%	43.8%	3.4%	47.1%
	26.2%	23.0%	13.8%	15.4%	21.7%	37.1%

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
	14.4%	13.2%	31.4%	32.3%	8.6%	40.9%
80	7.4%	21.0%	19.7%	42.9%	9.0%	51.9%
82	13.0%	28.3%	21.4%	33.3%	4.0%	37.3%
83	7.5%	20.0%	24.7%	31.1%	16.6%	47.7%
	6.8%	18.6%	15.3%	51.5%	7.8%	59.3%
84	0.0%	32.4%	27.4%	21.0%	19.2%	40.2%
87	12.7%	11.9%	26.2%	39.7%	9.5%	49.2%
	14.5%	11.8%	27.6%	33.1%	13.0%	46.1%
	9.3%	12.3%	34.5%	32.7%	11.2%	43.9%
	12.2%	10.5%	30.8%	33.6%	13.0%	46.6%
	10.6%	9.9%	26.2%	40.6%	12.7%	53.3%
	14.4%	12.4%	27.9%	36.0%	9.2%	45.2%
	6.7%	25.8%	24.7%	39.5%	3.3%	42.8%
	4.4%	23.2%	19.4%	48.5%	4.5%	52.9%
	11.7%	11.3%	26.7%	31.5%	18.8%	50.3%
88	14.1%	13.4%	27.9%	34.7%	9.9%	44.6%
	13.4%	15.2%	21.0%	36.7%	13.6%	50.3%
	13.3%	12.5%	28.3%	32.5%	13.4%	45.9%
	13.0%	9.2%	28.7%	40.3%	8.8%	49.1%
	2.9%	22.5%	15.0%	59.0%	0.7%	59.6%
	4.2%	35.5%	11.4%	35.6%	13.3%	48.9%
	14.7%	9.7%	28.5%	34.9%	12.2%	47.1%
89	0.0%	35.4%	10.1%	39.0%	15.5%	54.5%
92	13.1%	16.1%	23.5%	36.4%	10.9%	47.3%
	12.0%	10.4%	18.2%	48.0%	11.4%	59.3%
	13.5%	11.3%	32.6%	34.8%	7.7%	42.6%
	8.3%	25.1%	17.9%	46.1%	2.6%	48.7%
	13.7%	9.8%	24.4%	39.6%	12.5%	52.1%

Жирині кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
	4.9%	20.0%	17.5%	51.7%	5.8%	57.5%
93	11.7%	9.3%	30.8%	40.8%	7.4%	48.2%
96	10.3%	12.4%	25.9%	37.8%	13.6%	51.4%
	17.5%	35.4%	35.5%	масштаб	11.6%	масштаб
	12.5%	12.0%	28.7%	33.3%	13.6%	46.8%
98	13.4%	19.9%	21.7%	39.7%	5.3%	45.0%
	18.5%	30.8%	36.8%	scale	13.9%	scale
101	9.8%	12.5%	27.9%	39.7%	10.1%	49.8%
103	9.1%	36.6%	17.5%	26.0%	10.8%	36.8%
107	11.9%	10.1%	31.8%	30.5%	15.7%	46.20%
	0.0%	20.4%	40.1%	12.1%	27.4%	39.5%
	0.0%	29.6%	30.9%	6.8%	32.6%	39.4%
	0.0%	29.6%	22.9%	9.5%	38.0%	47.5%
	2.2%	12.0%	43.9%	22.0%	19.9%	42.0%
	30.4%	12.5%	46.2%	10.9%	57.1%	68.0%
	12.0%	20.5%	30.7%	5.2%	31.6%	36.8%
	5.0%	16.0%	14.2%	62.2%	2.6%	64.8%
	11.9%	10.1%	31.8%	30.5%	15.7%	46.2%
	0.0%	15.6%	46.5%	10.2%	27.6%	37.8%
	13.2%	21.6%	20.4%	31.3%	13.5%	44.80%
108	9.0%	49.0%	23.0%	12.3%	6.7%	19.0%
	0.0%	51.0%	6.1%	33.1%	9.9%	43.0%
	11.0%	18.4%	44.6%	4.1%	21.9%	26.0%
	0.0%	29.6%	22.9%	9.5%	38.0%	47.5%
	0.0%	32.0%	10.2%	53.5%	4.3%	57.8%
	0.0%	45.6%	10.4%	38.2%	5.8%	44.0%
	0.0%	28.4%	14.7%	51.2%	5.7%	56.9%
	5.4%	18.9%	17.2%	52.8%	5.8%	58.6%
	0.0%	10.6%	34.7%	5.9%	48.8%	54.7%

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту					P+S
	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	
	0.0%	21.9%	24.7%	32.7%	20.8%	53.4%
	12.1%	13.9%	27.6%	33.8%	12.7%	46.50%
109	10.9%	8.8%	31.3%	37.7%	11.3%	49.0%
110	0.4%	21.4%	23.9%	54.4%	0.0%	54.4%
113	5.0%	44.1%	15.1%	21.0%	14.8%	35.8%
	13.6%	14.6%	32.0%	15.2%	24.6%	39.8%
	13.9%	25.9%	23.7%	36.5%	0.0%	36.5%
116	4.8%	17.4%	11.2%	55.5%	11.1%	66.6%
	7.8%	17.7%	19.8%	47.0%	7.7%	54.7%
	3.3%	26.7%	16.1%	33.1%	20.7%	53.8%
	7.3%	18.3%	16.5%	47.8%	10.1%	57.9%
	4.3%	22.9%	14.2%	54.3%	4.2%	58.5%
	4.6%	26.8%	13.5%	41.6%	13.5%	55.1%
	0.0%	32.4%	9.6%	38.3%	19.8%	58.0%
	8.1%	16.1%	16.2%	50.4%	9.3%	59.6%
	7.3%	20.5%	11.7%	49.2%	11.2%	60.5%
	6.9%	19.6%	12.9%	52.1%	8.5%	60.6%
	5.4%	17.4%	15.4%	50.8%	11.0%	61.8%
	8.7%	18.7%	13.9%	49.1%	9.5%	58.6%
	6.7%	22.8%	10.8%	46.3%	13.4%	59.7%
	6.4%	17.2%	8.8%	50.3%	17.2%	67.6%
	5.6%	17.6%	9.0%	59.0%	8.8%	67.8%
117	6.2%	21.4%	18.3%	46.0%	8.0%	54.1%
	8.9%	21.8%	17.7%	40.6%	11.0%	51.6%
120	15.3%	17.9%	20.1%	44.4%	2.3%	46.7%
	7.5%	15.4%	16.3%	51.3%	9.5%	60.8%
	17.3%	4.4%	25.7%	44.0%	8.6%	52.6%

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
	4.1%	25.5%	20.5%	36.9%	13.0%	49.9%
	15.7%	10.1%	20.9%	36.8%	16.5%	53.3%
132	0.0%	32.8%	10.9%	56.2%	0.0%	56.2%
133	6.6%	20.7%	19.5%	49.9%	3.3%	53.2%
	9.3%	18.3%	16.5%	45.1%	10.8%	55.8%
	3.3%	30.4%	20.7%	45.6%	0.0%	45.6%
	0.0%	34.3%	9.6%	56.0%	0.0%	56.0%
	13.2%	12.9%	22.2%	42.7%	9.0%	51.7%
	10.1%	11.6%	23.3%	46.5%	8.4%	54.9%
	0.0%	35.9%	10.9%	46.9%	6.3%	53.2%
134	0.0%	56.2%	36.6%	7.2%	0.0%	7.2%
135	0.0%	41.1%	7.2%	51.8%	0.0%	51.8%
139	0.0%	35.9%	10.9%	46.9%	6.3%	53.2%
140	9.7%	23.4%	21.4%	32.7%	12.8%	45.5%
141	11.2%	12.1%	36.5%	28.2%	12.1%	40.2%
	14.7%	13.9%	28.1%	38.3%	5.0%	43.3%
142	16.3%	18.8%	18.8%	10.3%	35.7%	46.1%
	0.0%	34.5%	11.7%	43.4%	10.5%	53.8%
	8.6%	15.8%	32.5%	22.8%	20.4%	43.2%
	2.4%	9.6%	23.7%	47.7%	16.7%	64.3%
144	0.0%	14.9%	51.2%	13.4%	20.4%	33.9%
146	13.6%	10.3%	26.0%	31.4%	18.7%	50.2%
	12.6%	12.4%	25.5%	36.5%	12.9%	49.4%
	6.6%	22.4%	19.5%	48.2%	3.4%	51.6%
	9.0%	19.7%	19.0%	41.7%	10.5%	52.2%
147	8.0%	17.9%	17.6%	48.8%	7.7%	56.5%
	7.2%	24.5%	17.9%	33.0%	17.4%	50.5%

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
	9.5%	20.6%	17.7%	42.2%	9.9%	52.2%
150	7.7%	15.1%	17.5%	50.4%	9.2%	59.7%
	7.5%	20.6%	18.6%	41.3%	12.0%	53.3%
151	7.8%	26.1%	17.5%	46.4%	2.2%	48.6%
	5.0%	29.6%	12.4%	48.9%	4.1%	53.0%
	0.0%	25.5%	14.5%	55.5%	4.5%	60.0%
	0.0%	14.2%	52.1%	20.0%	13.7%	33.7%
	0.0%	17.3%	30.5%	43.3%	8.9%	52.2%
	8.0%	22.7%	20.2%	44.0%	5.1%	49.2%
152	0.0%	56.3%	15.7%	23.6%	4.4%	28.0%
	8.0%	12.7%	26.3%	22.5%	30.5%	53.0%
	0.0%	27.1%	26.2%	26.2%	20.5%	46.7%
	0.0%	20.1%	44.2%	24.8%	10.8%	35.7%
	9.5%	31.2%	38.3%	2.2%	18.9%	21.1%
155	18.4%	4.9%	25.6%	41.5%	9.6%	51.1%
157	7.9%	19.5%	22.2%	41.2%	9.2%	50.4%
	9.6%	21.7%	20.1%	39.1%	9.6%	48.7%
	7.2%	25.2%	13.0%	34.9%	19.8%	54.7%
158	14.0%	1.2%	33.5%	42.8%	8.5%	51.2%
159	6.3%	28.4%	13.8%	36.7%	14.8%	51.5%
160	5.6%	20.8%	20.8%	46.6%	6.2%	52.8%
161	6.2%	21.4%	18.3%	46.0%	8.0%	54.1%
	8.9%	21.8%	17.7%	40.6%	11.0%	51.6%
162	10.2%	45.6%	38.4%	масштаб	5.7%	масштаб
	22.1%	39.2%	32.7%	масштаб	6.0%	масштаб
163	5.9%	22.9%	15.5%	47.4%	8.3%	55.7%
	8.6%	17.1%	10.4%	61.4%	2.5%	63.9%
	6.4%	23.5%	20.4%	45.7%	4.0%	49.7%
164	8.4%	26.9%	22.6%	39.2%	2.9%	42.1%

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
	13.0%	38.4%	37.5%	масштаб	11.2%	масштаб
	9.6%	29.5%	21.1%	35.1%	4.7%	39.8%
	17.8%	12.3%	20.5%	38.7%	10.7%	49.4%
	23.3%	23.1%	39.1%	масштаб	14.5%	масштаб
	6.5%	15.2%	17.1%	58.0%	3.3%	61.3%
	9.1%	23.1%	19.8%	40.1%	7.8%	47.9%
	9.2%	20.1%	17.7%	41.2%	11.8%	53.0%
	15.6%	17.7%	24.4%	29.9%	12.4%	42.3%
	15.9%	37.0%	35.5%	масштаб	11.7%	масштаб
166	5.5%	21.8%	22.8%	44.5%	5.4%	49.9%
	14.6%	22.3%	21.8%	33.2%	8.1%	41.3%
	22.3%	33.3%	36.8%	масштаб	7.6%	масштаб
167	7.2%	19.4%	20.1%	44.8%	8.4%	53.3%
	10.0%	21.9%	20.7%	36.3%	11.0%	47.3%
170	12.5%	12.4%	29.4%	37.8%	7.8%	45.6%
	8.5%	18.2%	20.8%	43.0%	9.5%	52.5%
	3.5%	22.0%	39.8%	8.9%	25.9%	34.7%
171	8.0%	22.4%	35.5%	33.4%	0.7%	34.1%
172	8.0%	18.8%	21.4%	43.6%	8.1%	51.7%
	7.4%	19.1%	18.6%	45.1%	9.8%	54.9%
	22.5%	0.0%	37.3%	40.2%	0.0%	40.2%
178	14.5%	12.9%	22.0%	32.3%	18.3%	50.6%
180	8.6%	19.0%	18.5%	42.1%	11.8%	54.0%
	11.8%	14.2%	29.3%	32.1%	12.5%	44.6%
	11.5%	40.0%	36.3%	масштаб	12.2%	масштаб
	14.6%	12.1%	28.7%	36.6%	7.9%	44.6%
183	10.6%	35.4%	40.7%	масштаб	13.3%	масштаб
193	3.0%	32.4%	15.2%	49.4%	0.0%	49.4%
194	10.9%	38.7%	42.0%	масштаб	8.4%	масштаб

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
	9.6%	21.8%	20.7%	34.6%	13.2%	47.9%
	12.6%	31.0%	37.8%	масштаб	18.6%	масштаб
	3.0%	32.4%	15.2%	49.4%	0.0%	49.4%
197	9.8%	0.0%	50.9%	39.4%	0.0%	39.4%
198	7.7%	19.7%	16.6%	46.8%	9.3%	56.1%
200	8.5%	16.8%	19.3%	48.7%	6.7%	55.3%
204	13.7%	12.8%	27.6%	32.2%	13.7%	45.9%
	9.9%	14.0%	30.5%	23.2%	22.5%	45.7%
210	7.2%	22.0%	20.7%	39.0%	11.2%	50.2%
211	9.0%	16.2%	39.4%	24.0%	11.2%	35.3%
	10.2%	17.0%	24.7%	35.7%	12.4%	48.1%
	13.8%	10.4%	36.5%	24.1%	15.3%	39.4%
	6.5%	12.2%	36.3%	30.5%	14.5%	45.0%
	6.9%	26.6%	16.1%	32.7%	17.7%	50.3%
	3.4%	36.2%	27.7%	32.6%	0.0%	32.6%
	6.9%	26.5%	20.5%	28.9%	17.3%	46.1%
	0.0%	35.1%	15.6%	39.6%	9.7%	49.2%
	0.0%	25.3%	19.5%	46.8%	8.4%	55.2%
	6.6%	19.7%	25.9%	37.2%	10.6%	47.8%
	7.7%	22.8%	20.7%	36.6%	12.3%	48.9%
	16.3%	4.6%	28.2%	49.1%	1.7%	50.8%
	8.0%	22.1%	17.2%	41.2%	11.5%	52.7%
	8.0%	22.1%	17.2%	41.2%	11.5%	52.7%
	18.2%	3.2%	28.7%	42.4%	7.5%	49.8%
	11.9%	10.1%	31.8%	30.5%	15.7%	46.2%
212	7.5%	25.6%	17.6%	36.5%	12.8%	49.3%
	19.1%	0.9%	29.7%	46.8%	3.5%	50.3%
	8.8%	28.4%	9.6%	33.7%	19.5%	53.2%
	19.4%	24.8%	18.9%	33.5%	3.3%	36.8%

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
	19.1%	26.9%	17.5%	31.6%	4.9%	36.6%
	5.5%	42.3%	7.9%	30.8%	13.5%	44.3%
	4.6%	23.9%	25.1%	35.5%	11.0%	46.5%
	8.8%	28.4%	9.6%	33.7%	19.5%	53.2%
	0.0%	65.4%	22.4%	10.5%	1.7%	12.2%
	3.3%	14.2%	40.6%	30.7%	11.1%	41.8%
	11.2%	13.6%	25.0%	40.3%	9.9%	50.2%
	10.6%	16.6%	19.1%	42.7%	11.0%	53.7%
	21.1%	22.7%	17.4%	17.5%	21.2%	38.7%
	7.6%	24.0%	20.0%	38.9%	9.5%	48.4%
	10.3%	20.4%	22.2%	33.7%	13.4%	47.1%
	3.5%	22.0%	39.8%	8.9%	25.9%	34.7%
213	7.6%	28.2%	16.3%	30.4%	17.5%	47.9%
	5.3%	18.8%	18.1%	41.3%	16.4%	57.7%
	7.5%	21.0%	14.8%	48.5%	8.2%	56.7%
	8.3%	17.8%	18.5%	44.6%	10.9%	55.5%
214	9.1%	20.2%	19.1%	47.0%	4.5%	51.6%
	8.3%	19.8%	18.9%	44.6%	8.4%	53.0%
	7.7%	20.5%	19.6%	45.3%	7.0%	52.2%
	7.1%	21.5%	16.9%	42.4%	12.1%	54.5%
	7.0%	25.9%	15.1%	39.9%	12.0%	51.9%
	6.9%	18.0%	18.3%	48.5%	8.4%	56.9%
	7.4%	19.2%	18.2%	45.6%	9.5%	55.1%
	5.3%	21.1%	10.9%	47.3%	15.4%	62.7%
	5.3%	21.1%	10.9%	47.3%	15.4%	62.7%
215	7.8%	19.8%	15.8%	46.4%	10.2%	56.6%
	7.9%	20.2%	17.7%	40.6%	13.6%	54.1%
	20.0%	24.8%	25.4%	25.7%	4.1%	29.9%

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
	4.4%	26.2%	19.2%	45.1%	5.1%	50.2%
	8.1%	19.6%	20.1%	42.7%	9.4%	52.1%
	2.3%	30.1%	19.7%	31.8%	16.1%	47.9%
	5.9%	23.7%	14.8%	39.3%	16.3%	55.6%
	9.6%	26.0%	17.0%	36.5%	10.9%	47.3%
	4.7%	20.8%	14.1%	42.2%	18.2%	60.4%
	4.2%	31.0%	12.0%	40.7%	12.1%	52.8%
	6.7%	21.3%	18.1%	41.7%	12.3%	53.9%
	8.0%	19.5%	20.4%	47.1%	5.0%	52.1%
216	8.3%	21.9%	18.9%	40.9%	10.0%	50.9%
	0.0%	28.0%	30.1%	22.8%	19.1%	41.9%
	34.6%	0.0%	30.6%	33.7%	1.1%	34.8%
	7.3%	17.8%	17.9%	47.0%	10.0%	56.9%
	6.6%	16.6%	17.2%	50.0%	9.7%	59.7%
	7.7%	18.1%	19.2%	44.5%	10.5%	55.0%
	7.5%	20.3%	16.5%	45.0%	10.6%	55.6%
217	0.0%	42.3%	21.0%	24.3%	12.3%	36.6%
	6.8%	16.7%	17.1%	50.1%	9.3%	59.4%
	7.4%	20.5%	18.7%	44.1%	9.4%	53.5%
	11.9%	10.1%	31.8%	30.5%	15.7%	46.2%
	13.2%	21.6%	20.4%	31.3%	13.5%	44.8%
	12.1%	13.9%	27.6%	33.8%	12.7%	46.2%
218	0.7%	39.0%	17.8%	30.3%	12.1%	42.5%
	4.7%	26.8%	19.4%	30.5%	18.7%	49.1%
	7.1%	22.8%	22.4%	38.3%	9.4%	47.7%
	7.2%	19.9%	19.6%	44.1%	9.2%	53.4%
	8.5%	19.7%	19.9%	42.2%	9.7%	51.9%
	7.2%	25.9%	15.8%	37.6%	13.5%	51.1%
	8.0%	21.1%	20.9%	41.9%	8.2%	50.0%

Жирні кислоти, вивільнені з олії за допомогою ферменту

Аміно- кислотний залишок	Ліноленова	Лінолева	Олеїнова	Пальмі- тинова	Стеари- нова	P+S
	8.7%	19.9%	19.0%	42.9%	9.4%	52.4%
223	4.5%	29.5%	17.2%	15.8%	33.0%	48.8%
	0.0%	38.4%	30.1%	31.6%	0.0%	31.6%
	20.2%	22.8%	33.6%	17.3%	6.0%	23.4%
	19.0%	37.0%	34.9%	масштаб	9.1%	масштаб
224	8.0%	20.5%	22.1%	41.0%	8.4%	49.5%
	6.6%	18.2%	17.1%	51.4%	6.8%	58.2%
	7.9%	22.1%	21.6%	37.0%	11.4%	48.4%
	14.4%	19.0%	24.9%	33.1%	8.5%	41.7%
	3.1%	26.3%	24.2%	40.8%	5.6%	46.4%
	10.3%	20.1%	25.8%	38.1%	5.7%	43.7%
225	9.7%	22.2%	18.8%	41.8%	7.5%	49.3%
	4.3%	23.5%	17.8%	47.9%	6.4%	54.3%
	12.0%	21.9%	17.1%	39.1%	9.9%	49.0%
	12.9%	23.8%	17.5%	34.1%	11.7%	45.8%
	15.9%	22.6%	18.3%	38.0%	5.2%	43.2%
226	4.9%	24.9%	21.9%	45.8%	2.5%	48.3%
	6.5%	29.5%	22.8%	32.4%	8.8%	41.2%
227	13.6%	23.1%	21.9%	38.3%	3.2%	41.4%

Таблиця 4 являє собою короткий виклад або додаткову копіїцію даних, наведених у таблиці 3 (вище). Наприклад, термін "Положення" позначає положення амінокислотного залишку в SEQ ID NO:2; термін "Вихідна амінокислота", як і в таблиці 3, позначає незмінений "вихідний" залишок, тоді як термін "Нова амінокислота", як і в таблиці 3, позначає змінений (новий) амінокислотний залишок у цьому положенні. Терміни "WT_P" і "WT_S" позначають субстратні (вивільнення жирних кислот) переваги "вихідного" ферменту, наприклад, SEQ ID NO:2, для конкретного субстрату (жирної кислоти), відображуючи кількість вивільненої (гідролітично відщепленої) жирної кислоти із соєвої олії (як і в таблиці 3), де "P" позначає пальмітинову кислоту, а "S" позначає стеаринову кислоту.

У колонках "пальмітат" і "стеарат" показана кількість пальмітинової кислоти і стеаринової кислоти, вивільненої (шляхом ферментативного гідролізу) із соєвої олії, що містить ліноленову кислоту, лінолеву кислоту, олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, стеаринову кислоту, як зазначено вище. У "P+S" наведені об'єднані кількості гідролітично відщеплених жирних кислот, пальмітинової кислоти і стеаринової кислоти, або "P+S". Терміни "delta_P" і "delta_S" позначають зміну в перевазі зразкового ферменту за винаходом (наприклад, D61A з першого рядка) відносно гідролітичного відщеплення пальмітинової кислоти і стеаринової кислоти, відповідно, у порівнянні з відповідною активністю SEQ ID NO:2. Термін "delta P+S" позначає загальну або сумарну зміну переваги зразкового ферменту за винаходом (наприклад, D61A з

- першого рядка) відносно гідролітичного відщеплення пальмітинової кислоти і стеаринової кислоти в порівнянні з відповідною активністю SEQ ID NO:2. У розділі "пальмітатні мутації" коротко описані зразкові ферменти за винаходом, які мають переважну активність (гідролітичне відщеплення жирних кислот) стосовно вивільнення пальмітинової кислоти в порівнянні з іншими жирними кислотами. У розділі "стеаратні мутації" коротко описаний зразковий фермент за винаходом, який має переважну активність стосовно вивільнення стеаринової кислоти в порівнянні з іншими жирними кислотами (із соєвої олії, аналіз описаний вище).

Таблиця 4

Зразкові пальмітатні мутації						
Положення	Вихідна аміно-кислота	Нова аміно-кислота	WT_P	WT_S	Пальмітат	Стеарат
61	D	A	45%	6%	54%	7%
61	D	E	45%	6%	47%	8%
72	R	E	45%	6%	54%	4%
72	R	K	45%	6%	52%	9%
116	E	A	45%	6%	56%	11%
116	E	Q	45%	6%	50%	9%
116	E	R	45%	6%	52%	9%
116	E	T	45%	6%	50%	17%
116	E	V	45%	6%	59%	9%
133	S	A	45%	6%	45%	11%
151	I	G	45%	6%	49%	4%
151	I	A	45%	6%	46%	2%
163	V	R*	45%	6%	61%	2%
164	D	R*	45%	6%	58%	3%

Таблиця 4 (продовження)

Стеаратні мутації						
Положення	Вихідна аміно- кислота	Нова аміно- кислота	WT_P	WT_S	Пальмітат	Стеарат
20	I	L	45%	6%	39%	12%
62	V	S	45%	6%	37%	18%
77	G	P	45%	6%	18%	20%
83	V	C	45%	6%	31%	17%
88	D	H	45%	6%	33%	13%
113	Y	G	45%	6%	15%	25%
116	E	T	45%	6%	50%	17%
116	E	G	45%	6%	33%	21%
140	H	K	45%	6%	33%	13%
146	K	S	45%	6%	31%	19%
167	I	S	45%	6%	36%	11%
180	L	E	45%	6%	42%	12%
194	E	M	45%	6%	35%	13%
211	A	Q	45%	6%	33%	18%
212	S	Y	45%	6%	34%	13%
215	G	C	45%	6%	42%	18%
215	G	V	45%	6%	39%	16%
215	G	W	45%	6%	41%	12%
218	A	H	45%	6%	30%	19%
218	A	S	45%	6%	38%	14%
223	V	A	45%	6%	16%	33%
225	A	M	45%	6%	39%	10%
		Q	45%	6%	34%	12%

Таблиця 4 (продовження)

Пальмітатні мутації						
Положення	Вихідна аміно- кислота	Нова аміно- кислота	P + S	delta P	delta S	delta P+S
61	D	A	60%	9%	1%	9%
61	D	E	55%	2%	2%	4%
72	R	E	58%	9%	-2%	7%
72	R	K	61%	7%	3%	10%
116	E	A	67%	11%	5%	16%
116	E	Q	60%	5%	3%	9%
116	E	R	61%	7%	3%	10%
116	E	T	68%	5%	11%	17%
116	E	V	68%	14%	3%	17%
133	S	A	56%	0%	5%	5%
151	I	G	53%	4%	-2%	2%
151	I	A	49%	1%	-4%	-2%
163	V	R*	64%	16%	-4%	13%
164	D	R*	61%	13%	-3%	10%

Таблиця 4 (продовження)

Стеаратні мутації						
Положення	Вихідна амінокислота	Нова амінокислота	P + S	delta_P	delta_S	delta_P+S
20	I	L	51%	-6%	6%	0%
62	V	S	55%	-8%	12%	4%
77	G	P	38%	-27%	14%	-13%
83	V	C	48%	-14%	11%	-3%
88	D	H	46%	-12%	7%	-5%
113	Y	G	40%	-30%	19%	-11%
116	E	T	68%	5%	11%	17%
116	E	G	54%	-12%	15%	3%
140	H	K	46%	-12%	7%	-5%
146	K	S	50%	-14%	13%	-1%
167	I	S	47%	-9%	5%	-4%
180	L	E	54%	-3%	6%	3%
194	E	M	48%	-10%	7%	-3%
211	A	Q	50%	-12%	12%	-1%
212	S	Y	47%	-11%	7%	-4%
215	G	C	60%	-3%	12%	9%
215	G	V	56%	-6%	10%	5%
215	G	W	53%	-4%	6%	2%
218	A	H	49%	-15%	13%	-2%
218	A	S	51%	-7%	8%	0%
223	V	A	49%	-29%	27%	-2%
225	A	M	49%	-6%	4%	-2%
		Q	46%	-11%	6%	-5%

Приклад 5: зразкова еволюція для удосконалення гідролізу пальмітату з використанням технології GeneReassemblySM

- 5 Чотирнадцять (14) окремих мутацій амінокислот, ідентифікованих у скринінгу GSSM, що покривають сім (7) положень амінокислот, комбінували за допомогою технології GeneReassemblySM (патент США № 6605449). Повнорозмірні послідовності нуклеїнових кислот, створені у фазі GeneReassembly, клонували в експресуючий вектор pASK-5 (див. опис вище) для експресії в організмі-хазяїні *Escherichia coli* HMS175 (Novagen, USA). Експресію варіантів
- 10 GeneReassembly індукували ангідротетрацикліном після досягнення оптимальних густин клітин-хазяїнів.

14 мутацій, які давали найбільші збільшення гідролізу пальмітату, ідентифіковані в таблиці 2, відбирали для включення в бібліотеку пальмітаз GeneReassembly, створену способами,

описаними вище. Скринінг вихідних клонів 3 умбеліферилпальмітатом на активність дав приблизно 145 клонів з унікальними послідовностями, які аналізували на активність на соєвій олії, як описано вище.

На фіг. 8 показані дані первинного і вторинного скринінгу для аналізів на соєвій олії для відібраних клонів з бібліотеки пальмітаз. Клони, які давали пальмітат у кількості більше 70% гідролітично відщеплених ЖК у первинному аналізі (в умовах стандартного вихідного рівня для способу аналізу), відбирали для повторного аналізу на соєвій олії. Для кожного аналізу на соєвій олії, екстраговані ЖК розбавляли в 50 і 100 разів для аналізу за допомогою LCMS або ГХ. Якщо виявляли додаткові, нецільові мутації, це також позначено. Представлені встановлені міри гідролізу ЖК і кількості кожної ЖК. На фіг. "високе" і "низьке" позначають величини, що виходили за межі каліброваної кривої. Рядки відсортовані по процентній частці вивільненого пальмітату у вторинному аналізі, а потім по загальному вивільненому пальмітату. Множину клонів, які показали значне збільшення вибіркової до пальмітату (аж до 100%), порівнювали з батьківською SEQ ID NO:2 (61,2%).

Відібрані на основі вторинного аналізу, описаного вище, кращі 25 хітів пальмітаз субклонували в системи *Pseudomonas* (Dow Global Technologies Inc., публікація заявки на патент США № 20050130160, і Dow Global Technologies Inc., публікація заявки на патент США № 20050186666). Послідовність нуклеїнової кислоти, кодує фермент або поліпептид, вбудовували або у вектор pMYC (Dow Global Technologies Inc., публікація заявки на патент США № 20050130160), або у вектор pDOW1169 (Dow Global Technologies Inc., публікація заявки на патент США № 20080058262) і потім вводили в організм-хазяїн *Pseudomonas fluorescens* за допомогою електропорації. Трансформовані клітини відбирали або за допомогою росту на мінімальному середовищі у випадку з конструкціями pDOW1169, або на насиченому середовищі з тетрацикліном у випадку з конструкціями pMYC. Експресію ферменту або поліпептиду індукували, використовуючи IPTG, після досягнення оптимальних густин клітин-хазяїнів.

У таблиці 5 наведені дані з аналізів на соєвій олії, проведених двічі, для кращих 25 хітів, експресованих у системах *Pseudomonas*. 4 хіти, вбудовані у вектор pDOW1169, наведені в жирному підкресленому накресленні, всі інші хіти вбудовували у вектор pMYC. До 5 г нерафінованої олії додавали фермент, у результаті чого кінцевий вміст води складав 20%. Потім суміш гомогенізували з використанням 7 мм зонда і інкубували протягом 40 годин при 25 °C, помішуючи за допомогою мішалки. Брالی аліквати і проводили аналіз ЖК за допомогою перетворення ЖК у СМЕЖК і кількісного визначення СМЕЖК за допомогою ГХ, як описано в прикладі 8. 25 ферментів завантажували в 5 г соєвої олії, виходячи з рівної кількості одиниць активності стосовно УМБ-пальмітату. У цих реакціях вміст пальмітату в олії значно знизився з 11% у обробленій олії до 5% або менше в оброблених ферментами оліях, що вказує на збільшену перевагу стосовно гідролізу пальмітату в порівнянні з батьківським ферментом SEQ ID NO:2.

Таблиця 5

Фермент	Пальмітат	Стеарат	Олеат	Лінолеат	Ліноленат	Положення амінокислоти і присутня амінокислота									
						53	61	72	116	126	133	151	160	163	164
1	6,0%	4,3%	24,9%	59,7%	5,1%		A	E	A		A			R	
1	6,4%	4,3%	24,8%	59,3%	5,2%		A	E	A		A			R	
2	6,6%	4,3%	24,8%	59,2%	5,1%		A	E	V		A			R	
2	6,9%	4,3%	24,7%	59,0%	5,1%		A	E	V		A			R	
3	9,0%	4,3%	24,1%	57,3%	5,2%		E	E	V		A				R
3	8,4%	4,3%	24,3%	57,8%	5,2%		E	E	V		A				R
4	3,9%	4,3%	25,1%	61,6%	5,1%	A	A	K	A					R	
4	5,8%	4,4%	25,0%	59,7%	5,2%	A	A	K	A					R	
5	5,6%	4,3%	25,0%	60,0%	5,1%			E	V					R	
5	5,8%	4,3%	25,0%	59,8%	5,1%			E	V					R	
6	4,9%	4,3%	24,9%	60,8%	5,1%			E	V						
6	5,7%	4,3%	24,8%	60,1%	5,1%			E	V						
7	5,0%	4,3%	24,9%	60,7%	5,1%		E	E	V		A	A			
7	4,9%	4,3%	24,9%	60,8%	5,1%		E	E	V		A	A			
8	5,2%	4,0%	24,7%	61,3%	4,8%		E		V		A			R	
8	5,2%	4,0%	24,7%	61,3%	4,8%		E		V		A			R	

Таблиця 5 (Продовження)

9	5,3%	4,1%	24,8%	60,9%	4,9%				V		A			R	
9	5,5%	4,2%	24,9%	60,6%	4,9%				V		A			R	
10	5,7%	4,0%	23,3%	56,2%	10,8%		E	E	V		A			R	
10	5,6%	4,3%	25,0%	60,1%	5,0%		E	E	V		A			R	
11	8,3%	5,7%	23,3%	57,7%	5,0%	T	E	E	A		A		P		R
11	5,9%	3,8%	24,5%	60,6%	5,2%		E	E	A		A				R
12	7,8%	5,1%	24,8%	57,3%	5,0%		E	E	V						R
12	5,7%	4,4%	25,0%	59,7%	5,1%		E	E	V						R
13	4,8%	3,3%	24,7%	62,2%	4,9%		E	K	V						R
13	5,9%	4,0%	24,5%	60,8%	4,9%		E	K	V						R
14	5,5%	3,8%	25,2%	60,6%	5,0%		E	K	V						
14	5,9%	4,5%	24,8%	59,9%	4,9%		E	K	V						
15	5,8%	3,6%	25,0%	60,7%	5,0%		E	E	T						R
15	5,6%	4,3%	24,9%	60,4%	4,9%		E	E	T						R
16	6,1%	4,0%	24,1%	60,9%	4,9%		E	E	V		A				
16	6,2%	4,0%	24,1%	60,9%	4,8%		E	E	V		A				
17	5,7%	4,4%	24,9%	59,9%	5,1%		E	K							R
17	5,0%	4,3%	25,0%	60,8%	4,9%		E	K							R
18	8,3%	4,2%	23,5%	55,7%	8,2%		E	E	V						R
18	7,9%	4,2%	23,7%	56,0%	8,2%		E	E	V						R
19	6,8%	4,2%	24,0%	56,9%	8,1%			K	V		A				R
19	6,8%	4,2%	24,0%	56,9%	8,1%			K	V		A				R
20	6,1%	4,2%	24,0%	57,5%	8,2%		E	R		A					R
20	5,4%	4,1%	23,9%	58,5%	8,0%		E	R		A					R
21	6,7%	4,0%	23,3%	58,0%	8,0%		A	E	A		A				
21	6,5%	3,9%	23,2%	58,5%	7,9%		A	E	A		A				
22	5,4%	4,0%	23,9%	58,6%	8,0%		E	E	A		A				R
22	5,3%	4,1%	24,0%	58,7%	8,0%		E	E	A		A				R
23	6,6%	3,9%	23,2%	58,4%	7,9%		E		V		A				
23	6,4%	3,9%	23,1%	58,8%	7,8%		E		V		A				
24	6,0%	4,3%	24,3%	57,3%	8,1%		A	E	V						
24	5,7%	4,3%	24,3%	57,6%	8,1%		A	E	V						
25	ND	ND	ND	ND	ND		A	E	V						R
25	6,0%	4,0%	24,0%	58,1%	8,0%		A	E	V						R
26	4,8%	4,2%	24,2%	58,9%	7,9%		E	K							R

ND - не встановлено

- Нижче в таблиці 6 наведені дані про термостабільність кращих 25 хітів пальмітаз, відібраних на основі вторинного аналізу, описаного вище. Ці дані одержані з використанням хітів, експресованих в організмі-хазяїні *E. coli* HMS174. Клони поміщали в 96-ямкові планшети і інкубували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (КТ), 45 °С, 50 °С або 55 °С, а потім проводили аналіз з метил-УМБ-пальмітатом при КТ. Процентну частку залишкової активності визначали за допомогою ділення активності після інкубації при кожній температурі на активність після інкубації при КТ. Також для кожної пальмітази наведені присутні мутації і приклади вибіркості й активності стосовно пальмітату в соєвій олії. SEQ ID NO:2 зберігала приблизно 15% активності після інкубації протягом 10 хв. при 50 °С, але не мала активності після інкубації при 55 °С.

Таблиця 6

	% Стабільність			Положення амінокислоти і присутня амінокислота								
Фермент	55°C	50°C	45°C	61	72	116	133	151	163	164	Інше	
27		23.0%	62.7%	E	K	V						
28		22.8%	62.1%	E	K	V				R		
29			55.9%	E	K					R		
30	24.1%	68.8%	75.6%	E	E	V	A					
31	22.0%	68.1%	82.5%	E	E	V	A			R		
32		27.1%	58.4%	E	E	V				R		
33		26.1%	56.6%	E	E	V		A		R		
34		24.7%	54.0%	E	E	V	A				R	
35	8.1%	64.1%	67.6%	E	E	T				R		
36	10.3%	53.8%	75.7%	E	E	A	A			R		
37	9.2%	54.8%	61.5%	E	E	A				R		
38		45.4%	68.4%	E	E	A	A	A				
39		22.9%	61.9%	E	E	A	A				R	
40		35.3%	77.1%	E		V	A			R		
41		30.6%	70.2%	E		V	A					
42	20.3%	71.8%	79.3%	E		A	A	G		R		
43			64.2%	E		A	A					
44			63.2%	A	K	V						
45			56.0%	A	K	V	A	A		R		
46			80.7%	A	K	A				R		
47	22.2%	71.8%	88.1%	A	E	V	A			R		
48		60.6%	83.2%	A	E	V		A		R		
49		50.7%	68.0%	A	E	V						
50		50.2%	77.2%	A	E	V				R		
51		21.1%	53.6%	A	E	V		A			R	
52			56.5%	A	E	Q	A	A		R		
53		73.6%	118.3%	A	E	A	A					
54		69.2%	110.7%	A	E	A	A			R		
55			82.2%	A		V						
56			51.4%	A		A	A					
57			82.8%		K	V	A	G				
58			60.1%		K	V				R		
59			58.3%		K	V	A				P162S	
60			57.9%		K	V	A			R	V62F	
61			56.3%		K	V	A			R		
62			51.9%		K	Q	A			R		
63			74.8%		K	A						
64			58.8%		K	A	A					

Таблиця 6 (продовження)

Фермент	% Стабільність			Положення амінокислоти і присутня амінокислота							
	55°C	50°C	45°C	61	72	116	133	151	163	164	Інше
65		49.6%	72.0%	E	V				R		
66		46.3%	66.0%	E	V						
67			55.1%	E	V	A			R		
68			51.7%	E	V	A	A				
69		23.6%	54.6%	E	A						
70			76.2%	E	A					R	
71			59.2%		V	A					
72			51.8%		V	A			R		

Приклад 6: Лабораторний протокол для оцінки придатних ферментів пальмітаз, стеаратаз або сатураз

Зразкові ферменти і надані в даному документі поліпептиди експресували в системі *Pseudomonas* (Dow Global Technologies Inc., публікація заявки на патент США № 20050130160). Нуклеїнову кислоту, яка кодує фермент або поліпептид, вбудовували у вектор рMYC (Dow Global Technologies Inc., публікація заявки на патент США № 20050130160) і потім вводили в ауксотрофний організм-хазяїн *Pseudomonas fluorescens* за допомогою електропорації. Трансформовані клітини відбирали вирощуванням на мінімальному середовищі. Експресію ферменту або поліпептиду індукували, використовуючи IPTG, після досягнення оптимальних густин клітин-хазяїнів.

Наступну процедуру потрібно використовувати для оцінки здатності ферменту або іншого поліпептиду за винаходом гідролізувати зразок олії. У 1 кг нерафінованої олії додавали фермент пальмітазу, у результаті чого кінцевий вміст води складав 20%. Потім суміш гомогенізували, використовуючи навісний змішувач, і інкубували при кімнатній температурі при постійному перемішуванні з використанням лопаткового змішувача. Брили аліквати (0,5 мл) у моменти часу 0 год., 21 год., 43 год., 65 год. і 72 год. і обробляли для перетворення в СМЕЖК і ГХ аналізу, як описано в прикладі 8.

У наведеній вище процедурі використовували SEQ ID NO:2, а зразок олії являв собою нерафіновану соєву олію. Через 72 год. з використанням зразків необробленої олії й обробленої ферментом олії одержували результати, наведені в таблиці 7.

Таблиця 7

Склад жирних кислот	Необроблена олія (%)	Оброблена ферментом олія (%)
C16:0	11,1	3,7
C18:0	4,1	4,2
C18:1	22,1	24,3
C18:2	54,5	59,5
C18:3	8,2	8,3

Результати показують значне зниження кількості пальмітинової кислоти (C16:0), і таке зниження розглядали як бажане.

Приклад 7: Оцінка ліпаз, сатураз або пальмітаз, що містять послідовності, гомологічні зразковому поліпептиду SEQ ID NO:2

Декілька гомологічних послідовностей ліпаз субклонували у вектор pMAL-c2x (New England Biolabs, USA) способом хі-клонування (Genlantis, USA). Конструкції, що містять SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16, трансформували в організм-хазяїн *Escherichia coli* ArcticExpress RP (Stratagene, USA) для експресії. Ліпази під керуванням промотору, який індукували з використанням IPTG, експресували після досягнення оптимальних густин клітин-хазяїнів. Реконбінантні ферменти тестували на соєвій олії на вибірковість до ЖК (таблиця 8). Ліпази, що містять SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16, експресували і від мітки злиття MBP з використанням стандартних умов. У середовище LB, що містить гентаміцин 20 мкг/мл, інокулювали одну колонію і струшували зі швидкістю 200 об./хв. протягом ночі при 30 °C. Цю нічну культуру інокулювали у свіже середовище LB, що містить гентаміцин 20

мкг/мл, до одержання значення OD600, що дорівнює 0,05. Цю культуру струшували зі швидкістю 200 об./хв. і при температурі 30 °С до одержання значення OD600, що дорівнює 0,5. Культури переносили в 12 °С, струшували зі швидкістю 200 об./хв. і дозволяли прийти в рівновагу при зниженій температурі, перш ніж індукувати експресію ліпази шляхом додавання 0,5 мМ IPTG, за яким ішов додатковий ріст протягом 24 годин. Клітини збирали центрифугуванням, суспендували в буфері Tris pH 8, що містить NaCl, CaCl₂, ДНКазу I і лізоцим, і потім лізували, використовуючи обробку ультразвуком. Клітинні лізати прояснювали за допомогою центрифугування. Ферменти відщепляли від MBP за допомогою інкубації злитого білка ліпаза-MBP з фактором Ха протягом 6 годин при кімнатній температурі, за яких ішли додаткові 18 годин при 12 °С. Усі прояснені лізати з інтактними активними рекомбінантними ферментами виявляли виражені і схожі переваги стосовно гідролізу пальмітату стосовно інших ЖК при аналізі на соєвій олії (таблиця 8).

Таблиця 8

Фермент	Подібність з SEQ ID NO:2		Гідролітично відщеплені жирні кислоти (%)				
	Ідентичність	Подібність	Пальмі-тат	Стеарат	Олеат	Ліно-леат	Ліно-ленат
Соєва олія	Немає даних	Немає даних	11,0%	4,3%	24,9%	59,7%	5,1%
SEQ ID NO:2	100%	100	50,9%	5,1%	16,9%	18,1%	9,0%
SEQ ID NO:14	27%	42%	45,8%	2,0	14,2%	37,9%	0,0%
SEQ ID NO:12	47%	62%	50,4%	4,1%	16,1%	23,4%	6,0%
SEQ ID NO:6	41%	56%	37,0%	6,2%	28,5%	20,7%	7,6%

Приклад 8: Спосіб перетворення вільних жирних кислот або тригліцеридів у складні метилові ефіри жирних кислот (СМЕЖК) і кількісне визначення СМЕЖК газовою хроматографією

Визначити кількість жирних кислот, вивільнених з ліпідів, тригліцеридів, жирів або олій під дією ліпаз, наприклад, сатураз, пальмітаз і/або стеаратаз, можна прямо за допомогою LCMS з використанням способу, описаного в прикладі 2. Альтернативно, ці гідролітично відщеплені жирні кислоти можна перетворити в складні метилові ефіри жирних кислот (СМЕЖК) з використанням каталізованого кислотою метанолізу, а потім визначити кількість за допомогою газової хроматографії (ГХ). У цьому прикладі:

- олію після реакції з ліпазами, наприклад, сатуразами, пальмітазами і/або стеаратазами, обробляли за допомогою додавання 1 мл розчинника для екстракції (CHCl₃:MeOH:4N HCl (2:1:0,075)) на 0,5 мл реакційного об'єму;

- аліквоту екстрагованої олії 45 мкл переносили в 4 мл посудину з гвинтовою кришкою. У кожному посудині додавали маленьку мішалку, а потім 2 мл гексану і 400 мкл 20% (об./об.) MeOH у HCl;

- потім посудини закупорювали і нагрівали при перемішуванні протягом 15 хвилин. Потім припиняли нагрівання посудин і залишали їх остигати перед додаванням 800 мкл H₂O;

- потім суміш перемішували на вортексі і зразок (500 мкл) верхнього гексанового шару, що містить СМЕЖК, переносили в посудину автодозатора для ГХ. У кожен 500 мкл зразок з 0,5 мг/мл C15:0 СМЕЖК додавали як внутрішній стандарт.

Потім СМЕЖК, синтезовані з використанням цього способу, аналізували за допомогою газової хроматографії з використанням наступних експлуатаційних параметрів:

- обладнання Hewlett Packard 6890 Series GC з автодозатором;

- використовували колонку Supelco SP-2380 Fused Silica Capillary Column 30 м × 0,25 мм і товщина плівки 0,2 мкм;

- температуру інжектора і детектора встановлювали рівною 260 °С; потік несучого газу гелію встановлювали таким, що дорівнює 0,6 мл/хв.; вихідну температуру печі встановлювали такою, що дорівнює 150 °С;

- зразки (1 мл) упорскували з розділенням потоку 10:1.

Використаний спосіб ГХ включає:

- швидкість зміни температури 1:4 °С/хв. протягом 10 хв. = 190 °С;

- швидкість зміни температури 2:15 °С/хв. протягом 4 хв. = 250 °С;

- утримання: 250 °С протягом 2 хв.

ЖК тригліцеридів також можна аналізувати за допомогою перетворення СМЕЖК, навіть у присутності гідролітично відщеплених жирних кислот. Використовуючи спосіб, наведений вище, у сполученні зі способом, наведеним нижче, це можна використовувати для визначення

вибірковості ліпази, наприклад, сатурази, пальмітази і/або стеаратази, до жирних кислот і дії ферменту на олію. У способі аналізу ЖК, зв'язаних із гліцерином (або з іншими спиртами), використовують каталізований основою метаноліз:

- олію після реакції з ліпазами, наприклад, сатуразами, пальмітазами і/або стеаратазами, обробляли за допомогою додавання 1 мл розчинника для екстракції ($\text{CHCl}_3\text{:MeOH:4N HCl}$ (2:1:0,075)) на 0,5 мл реакційного об'єму;
- аліквоту екстрагованої олії 45 мкл переносили в пробірку для мікроцентрифуги; додавали 500 мкл гептану, за якими ішло 50 мкл 2N метанольної КОН;
- суміш енергійно перемішували на вортексі протягом 30 секунд, а потім центрифугували;
- аліквоту (50 мкл) верхнього гептанового шару, що містить СМЕЖК, переносили в посудину автодозатора і об'єднували її з 450 мкл гексану, що містить внутрішній стандарт С15:0;
- Аналіз СМЕЖК за допомогою ГХ викладений вище.

Приклад 9: Зразкова еволюція для удосконалення теплової стійкості пальмітази з використанням технології GSSMSM

- Зразкову пальмітазу за винаходом, що містить мутації D61E, R72K і V163R у SEQ ID NO:2 (фермент 17, таблиця 5, вище), вибрали як лідируючий по вибірковості мутант з попередніх раундів еволюції (приклади 4 і 5, вище). Проводили додаткову еволюцію для удосконалення теплової стійкості основного по вибірковості ферменту (SEQ ID NO:2 з мутаціями D61E, R72K і V163R) з використанням технології GSSM (див., наприклад, патент США № 6171820).

- Коротко, еволюцію GSSM здійснюють за допомогою введення точкових мутацій з використанням вироджених олігонуклеотидів в одному положенні амінокислоти за один раз для того, щоб можна було замінити кожен вихідний кодон на кожен з 20 кодованих природних амінокислот. Бібліотеку конструювали у векторі pDOW-Kan, аналіз проводили в агарозному гелі, обробляли DpnI і потім трансформували в компетентні клітини *E. coli* XL1-Blue. Колонії росли, збирали і секвенували. Колонії об'єднували, а ДНК одержували з використанням набору Qiagen mini-prep (за каталогом № 27106, Qiagen, Valencia, CA).

- Потім компетентні клітини *Pseudomonas fluorescens* трансформували, використовуючи ДНК. Організм-хазяїн *Pseudomonas fluorescens* одержували з Dow Global Technologies Inc. (публікація заявки на патент США № 20050130160, публікація заявки на патент США № 20050186666 і публікація заявки на патент США № 20060110747). Вектор pDOW-Kan конструювали за допомогою приєднання маркера стійкості до канаміцину до pDOW1169 (Dow Global Technologies Inc., публікація заявки на патент США № 20080058262). Клітини росли в мінімальному середовищі M9 (Dow Global Technologies Inc., публікація заявки на патент США № 20050186666) з додаванням урацилу і канаміцину. Усі приклади, що відповідають цьому опису, використовували вектор pDOW-Kan, *Pseudomonas fluorescens* і середовище M9, усі стосуються того ж вектора pDOW-Kan, *Pseudomonas fluorescens* і середовища M9, описаних вище.

- Скринінг бібліотеки GSSM проводили в 384-ямковому форматі. Первинний і вторинний високопродуктивний скринінг проводили з використанням УМБ-пальмітату (як описано вище в прикладі 3). Для того, щоб ідентифікувати мутації, що зберігають активність ферменту при підвищеній температурі, проводили аналіз за допомогою інкубації флуорогенного субстрату з повним клітинним лізатом при 54 °C протягом 30 хвилин, якій передувала інкубація повного клітинного лізату з буфером протягом 30 хвилин при 54 °C, щоб гарантувати, що фермент досяг 54 °C перед завантаженням субстрату. Вимірювали флуоресценцію кожного мутанта (див. колонку 2 у таблиці 9), і всіх мутантів з показанням флуоресценції, що перевищує контроль більше ніж на 2 стандартні відхилення, визначали як "хіти" - тобто, як мутанти з достатньо збільшеною тепловою стійкістю. У скринінгу з УМБ-пальмітатом ідентифікували 117 хітів з унікальними амінокислотними замінами (нижче див. таблицю 9). Амінокислотні заміни в 117 хітах з одиночними мутаціями відбувалися в 50 залишках; 22% амінокислотних замін представленого білка. Додатково оцінювали ефективність 117 хітів на нерафінованій олії в стандартному аналізі з 5 г (див. приклад 5) при 25 °C і 45 °C. Результати наведені нижче в таблиці 10.

Таблиця 9

Фермент	УМБ-паль- мітат	Вихідний кодон	Новий кодон	Вихідна аміно- кислота	Нова аміно- кислота	Положення амінокис- лотного залишку	Додаткові мутації
TT1	43670	TAC	CTT	Y	L	7	
TT2	40432	GCC	CTG	A	L	15	
TT3	21247	GCC	ATG	A	M	15	
TT4	65535	GAT	TGG	D	W	16	
TT5	23779	ATG	ATT	M	I	31	
TT6	65535	GGC	GAG	G	E	32	
TT7	65535	GGC	CCT	G	P	32	
TT8	26222	CTG	ATG	L	M	34	
TT9	60900	CTG	ATT	L	I	43	
TT10	28008	TTC	TTT	F	F	46	
TT11	65535	GCC	TGT	A	C	48	
TT12	55409	GCC	ATG	A	M	48	
TT13	65535	GCC	ACT	A	T	48	
TT14	65535	GAC	AAT	D	N	49	
TT15	57979	GAC	CGT	D	R	49	
TT16	65535	GAC	TCT	D	S	49	
TT17	23108	GCC	ATG	A	M	52	
TT18	65535	TCG	TTT	S	F	68	
TT19	65535	TCG	TAT	S	Y	68	
TT20	24003	CGG	GCT	R	A	85	
TT21	37005	CGG	GAT	R	D	85	
TT22	65535	CGG	CAG	R	Q	85	
TT23	39478	CGG	TCT	R	S	85	
TT24	65535	CGG	ACG	R	T	85	
TT25	65535	CGG	TAT	R	Y	85	
TT26	52743	GAG	AAG	E	K	95	(GCG)92 (GCT)
TT27	30520	GCG	GTT	A	V	92	
TT28	18239	GCG	GAG	A	E	92	
TT29	25819	GAG	GAT	E	D	95	
TT30	21805	GAG	GCT	E	A	95	
TT31	42531	GCG	AAG	A	K	96	
TT32	23046	GCG	AGG	A	R	96	
TT33	19889	GCC	TCG	A	S	97	
TT34	17199	AAG	CGT	K	R	101	
TT35	33316	GTG	TTG	V	L	104	
TT36	45591	TAT	CTT	Y	L	113	
TT37	31618	GAG	GCG	E	A	116	
TT38	65535	GAG	TGT	E	C	116	
TT39	65535	GAG	GAT	E	D	116	
TT40	36485	GAG	TTT	E	F	116	
TT41	65535	GAG	ATT	E	I	116	(TTC)135 (TTT)
TT42	48338	GAG	ATT	E	I	116	
TT43	38696	GAG	CTT	E	L	116	
TT44	58069	GAG	AAT	E	N	116	
TT45	65535	GAG	CAG	E	Q	116	
TT46	42681	GAG	AGT	E	S	116	
TT47	65535	GAG	ACT	E	T	116	
TT48	65535	GAG	GTT	E	V	116	

Таблиця 9 (Продовження)

TT49	60385	GAG	TGG	E	W	116	
TT50	42924	GAG	TAT	E	Y	116	
TT51	18591	CTG	ATG	L	M	117	
TT52	65535	AAG	AGG	K	R	120	
TT53	50984	AGT	GCT	S	A	133	
TT54	65535	GCG	TCG	A	S	136	
TT55	32933	GGC	TTT	G	F	137	
TT56	65535	CTC	ATG	L	M	139	
TT57	54461	CAC	AGG	H	R	140	
TT58	20741	AAC	TGG	N	W	142	
TT59	25491	GCG	ATT	A	I	144	
TT60	19150	GCG	TTG	A	L	144	
TT61	54979	GCG	ATG	A	M	144	
TT62	33234	GCG	GTG	A	V	144	
TT63	51208	GAG	CAT	E	H	149	
TT64	21503	GCG	ATT	A	I	150	
TT65	51405	GCG	ATG	A	M	150	
TT66	65535	GCG	TGG	A	W	150	
TT67	25795	AGC	AAT	S	N	153	
TT68	18156	AGC	GGT	S	G	153	
TT69	65535	AAC	GAC	N	D	158	
TT70	65535	CCG	GGT	P	G	162	
TT71	18622	CCG	AAG	P	K	162	
TT72	55639	CCG	TCG	P	S	162	R163F
TT73	26167	CCG	TCG	P	S	162	I167L
TT74	20774	CCG	TCG	P	S	162	
TT75	65535	GTG	ATT	V	I	183	
TT76	20029	CAG	GCG	Q	A	166	
TT77	21399	CAG	GAG	Q	E	166	
TT78	32863	CAG	ACG	Q	T	166	
TT79	25576	ATT	TTT	I	F	167	
TT80	16567	ATT	AAG	I	K	167	
TT81	26239	ATT	CTG	I	L	167	
TT82	19330	ATT	CGT	I	R	167	
TT83	31994	ATT	TAT	I	Y	167	
TT84	65535	CGC	CAT	R	H	172	
TT85	38603	CGC	AAG	R	K	172	
TT86	24428	CGC	CTT	R	L	172	
TT87	37581	CGC	TAT	R	Y	172	
TT88	30655	CTC	AAG	L	K	180	
TT89	65535	CTC	AGG	L	R	180	
TT90	64023	GCG	TGT	A	C	185	
TT91	41225	GCG	AAT	A	N	185	
TT92	65535	GAA	GCG	E	A	190	
TT93	65535	GAA	AAG	E	K	190	
TT94	65535	GAA	ATG	E	M	190	
TT95	65535	GAA	CAG	E	Q	190	
TT96	65535	GAA	AGG	E	R	190	
TT97	17914	CTA	ATT	L	I	200	
TT98	18910	CTA	GTA	L	V	200	E201Y
TT99	35222	CTA	GTT	L	V	200	
TT100	38817	GAG	TAT	E	Y	201	
TT101	65535	GCG	CAT	A	H	203	
TT102	65535	GCG	CCG	A	P	203	
TT103	65535	GCG	AGG	A	R	203	

Таблица 9 (Продовження)

ТТ104	47048	ATG	CTT	M	L	207	
ТТ105	65535	ACC	CAT	T	H	214	
ТТ106	65535	ACC	AAG	T	K	214	
ТТ107	48095	ACC	AGG	T	R	214	
ТТ108	35774	ACC	TCG	T	S	214	
ТТ109	65535	ACC	GTT	T	V	214	
ТТ110	53546	GGG	GCG	G	A	215	
ТТ111	65535	CTG	ATT	L	I	222	
ТТ112	24987	GCG	TCT	A	S	225	
ТТ113	26618	CGG	TAT	R	Y	163	
ТТ114	22246	CGG	ATG	R	M	163	
ТТ115	42199	CGG	ACG	R	T	163	
ТТ116	42127	CGG	TTG	R	L	163	
ТТ117	33933	CGG	TGT	R	C	163	

Таблиця 10

Фермент	Мутації	Пальмітат				3 год. Пальмітат			24 год. Пальмітат		
		45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55c 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H
TT41	E116I, (TTC)135(TTT)	8.0%	9.9%	9.4%	7.2%	9.4%	9.3%	10.7%	9.3%	7.1%	9.5%
TT43	E116L	7.3%	7.6%	6.8%	6.5%	9.0%	9.1%	9.8%	6.3%	6.8%	8.1%
TT44	E116N	5.9%	6.5%	5.3%	4.9%	8.9%	9.9%	10.3%	7.1%	6.4%	8.1%
TT59	A144I	9.7%	10.1%	9.7%	9.2%	10.4%	10.3%		9.8%	9.5%	10.2%
TT61	A144M	9.0%	9.2%	8.4%	8.4%	10.6%	10.5%	10.3%	9.8%	10.1%	9.5%
TT62	A144V	7.4%	7.5%	6.7%		9.2%	9.7%	9.9%	7.7%	8.6%	7.6%
TT63	E149H	9.0%	10.2%	9.5%	8.8%	10.2%	9.8%	10.7%	9.4%	8.7%	9.6%
TT64	A150I	6.9%	7.3%	6.8%	6.5%	7.4%	7.0%	8.8%	6.6%	5.9%	6.8%
TT118	N158D, P162G	7.5%	8.2%	6.7%		9.7%	10.2%	10.4%	8.3%	6.7%	9.1%
TT70	P162G	8.5%	9.7%	7.9%	7.3%	9.7%	10.2%	10.9%	7.6%	6.6%	9.4%
TT71	P162K	6.6%	8.7%	6.9%	6.3%	9.0%	9.1%	10.4%	8.2%	6.1%	7.9%
TT113	R163Y	6.4%	7.3%	6.0%	5.6%	7.6%	7.0%	9.7%	6.4%	6.1%	6.2%
TT84	R172H	6.3%	6.3%	5.5%	5.2%	8.1%	8.0%	9.5%	6.3%	6.9%	7.5%
TT86	R172L	6.1%	6.8%	6.1%	5.8%	8.7%	8.6%	9.6%	6.8%	6.3%	6.9%
TT105	T214H	6.4%	7.3%	6.1%	6.1%	8.3%	7.8%	9.5%	6.7%	7.3%	7.0%
TT112	A225S	8.6%	9.2%	8.6%	8.1%	9.9%	9.8%	10.3%	8.9%	7.9%	8.9%
TT7	G32P	6.1%	8.7%	8.3%	5.8%	8.6%	8.5%	9.0%	8.1%	7.1%	7.0%
TT11	A48C	8.0%	8.2%	7.5%	7.3%	8.7%	9.3%	10.1%	6.5%	6.7%	7.5%
TT25	R85Y	6.8%	8.7%	6.8%		7.8%	7.6%	9.9%	8.0%	6.0%	7.1%
TT26	E95K, (GCG)92(GCT)	7.5%	8.9%	6.9%	6.8%	8.1%	7.9%	9.8%	6.7%	5.7%	7.1%
Нега- тивний контроль	Негативний	10.7%	10.8%	10.8%	10.5%						
Нега- тивний контроль	Негативний	10.7%	10.8%	10.7%	10.6%						
Нега- тивний контроль	Негативний	10.8%	10.8%	10.8%	10.7%						
TT35	V104L	6.0%	7.3%	5.6%	5.7%	7.9%	7.7%	9.1%	6.3%	6.3%	6.5%
TT36	Y113L	7.1%	7.3%	6.5%	6.7%	8.9%	8.8%	9.3%	7.1%	6.9%	6.6%
TT37	E116A	8.0%	8.2%	7.3%	7.6%	9.6%	9.5%	10.2%	8.5%	7.4%	8.6%
TT38	E116C	7.1%	7.5%	5.7%	6.5%						
TT39	E116D	6.4%	6.6%	5.8%	5.9%						
TT48	E116V	6.9%	7.5%	6.2%	6.6%						
TT52	K120R	5.7%	6.0%	5.1%	6.5%						
TT56	L139M	7.6%	8.1%	6.9%	7.1%	9.9%	10.1%	9.9%	9.5%	9.5%	8.5%
TT65	A150M	6.2%	6.4%	5.6%	5.9%						

Таблиця 10 (продовження)

Фермент	Мутації	Пальмітат				3 год. Пальмітат			24 год. Пальмітат		
		45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55c 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H
TT74	P162S	7.0%	7.0%	5.8%	6.2%						
TT116	R163L	6.3%	6.4%	5.8%	6.1%						
TT80	I167K	6.5%	6.9%	5.6%	6.4%						
TT4	D16W	6.3%	6.7%	5.7%	6.4%						
TT92	E190A	6.7%	6.7%	5.9%	5.9%						
TT95	E190Q	6.7%	6.9%	5.9%	6.3%						
TT100	E201Y	6.5%	7.4%	5.8%	6.4%						
TT101	A203H	6.2%	6.5%	5.8%	6.3%						
TT104	M207L	7.8%	7.8%	6.8%	7.4%	9.5%	9.3%	10.3%	8.7%	6.9%	7.9%
TT107	T214R	6.6%	6.9%	5.5%	6.1%						
TT109	T214V	6.3%	7.8%	5.4%	5.7%						
TT6	G32E	6.6%	6.9%	5.7%	6.5%						
TT8	L34M	6.8%	7.2%	6.2%	6.6%						
TT12	A48M	10.2%	10.8%	10.1%	10.4%						
TT14	D49N	6.7%	7.6%	5.3%	6.4%	8.5%	7.8%	8.9%	7.7%	5.4%	5.8%
TT1	Y7L	6.5%	7.2%	5.0%	6.2%						
TT120	P162S, R163F	6.6%	7.5%	6.3%	6.4%	8.7%	9.1%	10.3%	6.9%	6.6%	7.5%
Нега- тивний контроль	Негативний	10.6%	10.7%	10.6%	10.7%						
SEQ ID NO:2 з	Батько	6.1%	6.1%	4.8%	6.2%						
D61E, R72K, i V163R											
SEQ ID NO:2 з D61E, R72K, i V163R	Батько	6.0%	6.2%	5.4%	6.0%						
TT45	E116Q	5.9%	5.7%	5.6%	4.9%	8.2%	8.4%	8.4%	7.4%	7.1%	7.0%
TT47	E116T	5.7%	4.7%	5.4%	4.2%	8.0%	8.6%	8.6%	6.9%	7.9%	6.2%
TT52	K120R	6.0%	5.7%	5.6%	5.0%	8.4%	9.4%	8.8%	9.7%	8.6%	6.4%
TT57	H140R	7.1%	6.8%	6.8%	6.0%	8.8%	8.7%	9.5%	7.9%	8.2%	7.2%
TT58	N142W	10.3%	3.5%	10.3%	10.2%						
TT59	A144I	10.5%	10.2%	10.3%	9.8%						
TT60	A144L	9.1%	8.4%	8.9%	8.1%						
TT66	A150W	7.1%	6.5%	6.5%		7.3%	7.7%	9.0%	6.9%	6.1%	6.7%
TT2	A15L	7.5%	6.7%	7.1%	6.5%						
TT3	A15M	7.7%	7.3%	7.4%	7.3%						
TT115	R163T	7.1%	6.5%	6.3%	5.9%						

Таблиця 10 (продовження)

Фермент	Мутації	Пальмітат				3 год. Пальмітат			24 год. Пальмітат		
		45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55c 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H
TT78	Q166T	5.8%	4.5%	5.5%	4.0%						
TT79	I167F	6.7%	5.4%	6.2%	4.7%	8.5%	8.7%	9.4%	8.0%	7.2%	6.2%
TT83	I167Y	5.8%	5.7%	5.2%	4.9%	8.6%	9.0%	8.6%	8.0%	9.2%	6.3%
TT89	L180R	6.1%	5.2%	5.8%	4.6%						
TT75	V183I	6.1%	5.6%	5.6%	5.0%						
TT90	A185C	7.2%	6.2%	6.9%		8.8%	8.1%	9.2%	8.3%	6.5%	6.8%
TT89	L180R	6.2%	5.4%	5.4%	4.4%						
TT108	T214S	6.6%	5.6%	5.0%		8.5%	8.5%	8.5%	7.8%	9.1%	6.2%
TT110	G215A	6.2%	6.1%	5.4%	5.1%						
TT9	L43I	6.2%	5.9%	5.5%	4.9%	8.0%	7.6%	9.2%	7.0%	5.9%	5.8%
TT15	D49R	7.9%	7.1%	8.0%		9.0%	8.6%	9.7%	8.3%	7.5%	8.6%
TT16	D49S	6.8%	5.8%	6.5%	4.7%						
TT18	S68F	6.2%	5.6%	6.1%	4.9%						
TT19	S68Y	6.5%	5.5%	7.0%	4.7%						
TT22	R85Q	6.8%	6.2%	6.3%	5.3%						
TT23	R85S	6.6%	6.0%	6.3%	5.3%						
TT24	R85T	6.9%	5.9%	6.7%	5.2%						
TT31	A96K	6.7%	5.5%	6.4%	4.8%						
SEQ ID NO:2 3 D61E, R72K, i V163R	Батько	6.4%	5.7%	6.1%	4.7%						
TT34	K101R	6.9%	5.6%	4.4%	6.3%						
TT40	E116F	7.1%	6.4%	5.7%	6.8%						
TT46	E116S	7.1%	7.0%	5.9%	7.0%						
TT49	E116W	7.5%	7.4%	6.6%	7.6%						
TT50	E116Y	6.9%	6.6%	5.4%	6.3%						
TT53	S133A	7.2%	7.2%	6.0%	7.1%						
TT54	A136S	7.1%	6.6%	5.8%	6.9%						
TT55	G137F	7.7%	6.6%	5.6%	7.2%						
TT60	A144L	10.5%	10.0%	9.3%	9.8%						
TT68	S153G	6.9%	6.4%	5.5%	6.5%						
TT3	A15M	7.3%	6.9%	5.8%	6.9%						
TT13	A48T	7.2%	6.0%	5.1%	7.0%						
TT115	R163T	8.2%	8.1%	6.8%	7.8%						
TT73	P162S, I167L	6.4%	6.3%	5.4%	6.4%						
TT117	R163C	6.7%	6.1%	5.2%	6.4%						
TT114	R163M	8.2%	7.3%	7.2%	7.2%						
TT115	R163T	5.7%	5.1%	4.4%	5.0%						
TT113	R163Y	6.9%	6.6%	5.8%	6.6%						
TT77	Q166E	6.2%	5.8%	5.0%	6.0%						

Таблиця 10 (продовження)

Фермент	Мутації	Пальмітат				3 год. Пальмітат			24 год. Пальмітат		
		45C	25C	25C	45C	55c	45C	25C	55C	45C	25C
		24H	24H	48H	48H	3H	3H	3H	24H	24H	24H
TT81	I167L	7.1%	6.9%	6.1%	6.6%						
TT82	I167R	7.8%	7.2%	6.2%	7.2%						
TT85	R172K	6.4%	5.7%	5.0%	5.9%						
TT87	R172Y	6.5%	6.4%	5.2%	6.0%						
TT88	L180K	6.2%	6.1%	5.2%	6.7%						
TT89	L180R	7.2%	6.0%	5.1%	6.9%						
TT93	E190K	7.3%	6.7%	5.6%	7.1%						
TT94	E190M	6.9%	6.8%	5.5%	6.0%						
TT96	E190R	6.9%	6.3%	5.4%	6.5%						
TT97	L200I	5.7%	5.7%	5.0%	5.9%						
TT5	M31I	6.8%	5.8%	5.0%	6.4%						
TT102	A203P	7.5%	6.6%	5.9%	6.8%						
TT103	A203R	6.6%	6.2%	5.4%	6.2%						
TT5	M31I	7.4%	7.1%	6.2%	7.1%						
TT6	G32E	7.2%	6.7%	6.3%	6.4%						
TT13	A48T	7.1%	6.8%	5.8%	6.9%						
TT17	A52M	6.9%	5.7%	5.0%	6.4%						
TT1	Y7L	6.5%	6.5%	5.8%	6.6%						
TT20	R85A	7.1%	5.7%	5.1%	6.3%						
TT28	A92E	7.3%	5.8%	5.0%	6.7%						
TT27	A92V	6.9%	5.5%	4.8%	6.3%						
TT30	E95A	7.9%	5.7%	4.9%	7.2%						
TT29	E95D	7.6%	5.6%	5.0%	6.9%						
TT32	A96R	6.7%	6.6%	5.8%	6.2%						
TT33	A97S	7.4%	5.4%	4.8%	6.7%						
TT114	R163M	7.2%	5.8%	5.8%	7.6%	7.5%	7.0%	8.9%	6.0%	7.2%	5.8%
TT116	R163L	7.0%	5.9%	5.1%	7.2%	8.1%	7.4%	9.4%	7.8%	7.0%	5.9%

Заміну кодону в даному залишку, що не веде до амінокислотної заміни, позначають як мовчазну мутацію. Мовчазні мутації одержували у вигляді хітів внаслідок збільшеної експресії стосовно батьківського ферменту і спостерігали в 37 сайтах у скринінгу GSSM (таблиця 11, нижче).

Таблиця 11

Вихідний кодон	Новий кодон	Амінокислота	Амінокислота	Положення амінокислоти
GCG	GCT	A	A	35
GGC	GGT	G	G	37
CTG	CTT	L	L	41
GGC	GGA	G	G	45
GCC	GCT	A	A	52
CGG	CGA	R	R	89
GCC	GCT	A	A	97
GTG	GTT	V	V	102
AGC	AGT	S	S	108
CTC	TTG	L	L	109
GCG	GCT	A	A	114
CGC	CGG	R	R	115
CTG	CTT	L	L	117
CTG	TTG	L	L	124
CGG	AGG	R	R	126
GTC	GTG	V	V	128
GTC	GTG	V	V	129
AGT	TCT	S	S	133
GGC	GGT	G	G	137
GAC	GAT	D	D	138
CTC	CTT	L	L	139
AAC	AAT	N	N	142
CGC	AGG	R	R	172
GTG	GTT	V	V	183
ACC	ACG	T	T	188
TCG	AGT	S	S	192
CCC	CCT	P	P	193
CTG	CTT	L	L	202
GCG	GCT	A	A	203
ACC	ACT	T	T	205
CAC	CAT	H	H	206
GGC	GGT	G	G	208
TCG	TCT	S	S	212
CTG	CTT	L	L	222
GTC	GTG	V	V	223
CGG	AGG	R	R	226
CTC	TTG	L	L	227

Приклад 10: Зразкова Еволюція для удосконалення теплової стійкості пальмітази з використанням технології TMCASM

- 5 Найбільш ефективні мутації, ідентифіковані в процесі еволюції GSSM (приклад 9, вище), оцінювали в первинному і вторинному аналізі з олією для включення в еволюцію TMCA. Аналізи 117 унікальних хітів з 5 г нерафінованої олії проводили, як описано в прикладі 5, при температурі 25 °C і 45 °C, але при вмісті води 10%. Профіль олії оцінювали після реакції протягом 24 і 48 годин. Первинні хіти піддавали вторинному аналізу з олією при 25 °C, 45 °C і 10 55 °C. Для оцінки профілів олії аліквоти брали в моменти часу 3, 24 і 48 годин. Найбільш ефективні ферменти перераховані нижче в таблиці 12, де пальмітат, що залишилася в олії, зазначений у вигляді процента від усіх зв'язаних жирних кислот. Для оцінки впливу проміжного лужного рафінування, в аналізах при 45 °C проводили лужне рафінування за допомогою додавання 11% NaOH (оцінювали для 7% FFA) і при безупинному перемішуванні нагрівали до 15 60 °C. Свіжий фермент додавали в рафіновану олію при вмісті води 20%, гомогенізували і продовжували реакцію при перемішуванні протягом додаткових 24 годин при 45 °C. Кінцевий вміст пальмітату в рафінованих лугом зразках наведений в останньому стовпчику, "ЛР 24 год."

Серед найбільш ефективних ферментів, наведених у таблиці 12, для комбінування з використанням технології ТМСА відібрали 15 мутантів (показані жирним курсивним накресленням у таблиці 12). Бібліотеку ТМСА конструювали, як описано в публікації РСТ № WO 2009/018449 і відповідно до нижченаведеного додаткового опису. Ця бібліотека містила 9216 унікальних варіантів.

Таблиця 12

Фермент	Мутації	Пальмітат				3 год. Пальмітат			24 год. Пальмітат			48 год. Пальмітат			ЛР 24 год
		45°C 24 ч	25°C 24 ч	25°C 48 ч	45°C 48 ч	55°C 3 ч	45°C 3 ч	25°C 3 ч	55°C 24 ч	45°C 24 ч	25°C 24 ч	55°C 48 ч	45°C 48 ч	25°C 48 ч	
TT11	A48C	8.0%	8.2%	7.5%	7.3%	8.7%	9.3%	10.1%	6.5%	6.7%	7.5%	6.7%	6.6%	6.8%	5.3%
TT41	E116I, (TTC)135(TTT)	8.0%	9.9%	9.4%	7.2%	9.4%	9.3%	10.7%	9.3%	7.1%	9.5%	9.1%	6.5%	9.1%	5.6%
TT43	E116L	7.3%	7.6%	6.8%	6.5%	9.0%	9.1%	9.8%	6.3%	6.8%	8.1%	6.2%	6.0%	6.8%	4.8%
TT44	E116N	5.9%	6.5%	5.3%	4.9%	8.9%	9.9%	10.3%	7.1%	6.4%	8.1%	6.5%	5.6%	7.2%	4.4%
TT70	P162G	8.5%	9.7%	7.9%	7.3%	9.7%	10.2%	10.9%	7.6%	6.6%	9.4%	6.7%	5.6%	8.4%	4.7%
TT84	R172H	6.3%	6.3%	5.5%	5.2%	8.1%	8.0%	9.5%	6.3%	6.9%	7.5%	6.8%	6.4%	6.7%	6.1%
TT64	A150I	6.9%	7.3%	6.8%	6.5%	7.4%	7.0%	8.8%	6.6%	5.9%	6.8%	6.8%	5.4%	6.0%	5.2%
TT63	E149H	9.0%	10.2%	9.5%	8.8%	10.2%	9.8%	10.7%	9.4%	8.7%	9.6%	9.4%	8.7%	9.6%	8.2%
TT26	E95K, (GCG)92(GCT)	7.5%	8.9%	6.9%	6.8%	8.1%	7.9%	9.8%	6.7%	5.7%	7.1%	6.9%	5.1%	6.4%	4.7%
TT71	P162K	6.6%	8.7%	6.9%	6.3%	9.0%	9.1%	10.4%	8.2%	6.1%	7.9%	7.6%	5.3%	6.7%	4.5%
TT86	R172L	6.1%	6.8%	6.1%	5.8%	8.7%	8.6%	9.6%	6.8%	6.3%	6.9%	6.7%	6.4%	6.3%	5.1%
TT25	R85Y	6.8%	8.7%	6.8%		7.8%	7.6%	9.9%	8.0%	6.0%	7.1%	8.2%	6.7%	6.7%	6.3%
TT118	N158D, P162G	7.5%	8.2%	6.7%		9.7%	10.2%	10.4%	8.3%	6.7%	9.1%	9.2%	6.1%	7.6%	
TT59	A144I	9.7%	10.1%	9.7%	9.2%	10.4%	10.3%		9.8%	9.5%	10.2%	9.9%	9.6%	10.3%	9.1%
TT112	A225S	8.6%	9.2%	8.6%	8.1%	9.9%	9.8%	10.3%	8.9%	7.9%	8.9%	9.5%	7.5%	8.6%	6.1%
TT15	D49R	7.9%	7.1%	8.0%		9.0%	8.6%	9.7%	8.3%	7.5%	8.6%	8.9%	7.4%	8.8%	8.2%
TT14	D49N	6.7%	7.6%	5.3%	6.4%	8.5%	7.8%	8.9%	7.7%	5.4%	5.8%	7.9%	5.5%	5.6%	4.8%
TT62	A144V	7.4%	7.5%	6.7%		9.2%	9.7%	9.9%	7.7%	8.6%	7.6%	7.6%	8.7%	7.4%	6.8%
TT105	T214H	6.4%	7.3%	6.1%	6.1%	8.3%	7.8%	9.5%	6.7%	7.3%	7.0%	6.3%	6.8%	5.7%	4.8%
TT61	A144M	9.0%	9.2%	8.4%	8.4%	10.6%	10.5%	10.3%	9.8%	10.1%	9.5%	9.0%	9.7%	8.6%	
TT113	R163Y	6.4%	7.3%	6.0%	5.6%	7.6%	7.0%	9.7%	6.4%	6.1%	6.2%	6.5%	5.9%	5.5%	5.3%
TT7	G32P	6.1%	8.7%	8.3%	5.8%	8.6%	8.5%	9.0%	8.1%	7.1%	7.0%	7.6%	6.8%	6.5%	
TT120	P162S, R163F	6.6%	7.5%	6.3%	6.4%	8.7%	9.1%	10.3%	6.9%	6.6%	7.5%				
TT37	E116A	8.0%	8.2%	7.3%	7.6%	9.6%	9.5%	10.2%	8.5%	7.4%	8.6%				

Технологія Tailored Multi-Site Combinatorial Assembly (TMCA), технологія ТМСА (див. публікацію РСТ № WO 09/018449), включає спосіб одержання декількох дочірніх полінуклеотидів, що містять різні сполучення різноманітних мутацій у декількох сайтах. Способи можна виконувати частково за допомогою комбінування щонайменше однієї або декількох стадій, представлених нижче.

Одержання інформації про послідовність ("першого" або "матричного") полінуклеотиду. Наприклад, перша або матрична послідовність може являти собою послідовність дикого типу (наприклад, SEQ ID NO:2 з мутаціями D61E, R72K і V163R) або послідовність, що матирувала. Інформація про послідовність може стосуватися повнорозмірного полінуклеотиду (наприклад, гена або відкритої рамки зчитування) або фрагментарних ділянок, що представляють інтерес, таких як послідовність, що кодує сайт для зв'язування, специфічності зв'язування, каталізу або субстратної специфічності.

Ідентифікація трьох або більше мутацій, що представляють інтерес, у першій або матричній послідовності полінуклеотиду. Наприклад, у першій або матричній послідовності мутації можуть бути присутніми у 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 20 або більшій кількості положень. Положення можна попередньо визначити за допомогою абсолютного положення або за допомогою контексту оточуючих залишків або гомології. Наприклад, для ТМСА поліпептидів пальмітаз як мутації, що представляють інтерес, включали кращі термостабільні амінокислотні заміни, що приводять до

удосконаленої ефективності ферменту. Можуть бути відомі послідовності, що фланкують положення мутацій з будь-якої сторони. Кожне положення мутації може містити дві або більше мутацій, наприклад, для різних амінокислот. Такі мутації можна ідентифікувати шляхом використання технології Gene Site Saturation MutagenesisSM (GSSMSM), як описано в даному документі і, наприклад, у патентах США №№ 6171820; 6562594 і 6764835.

Надання праймерів (наприклад, синтетичних олігонуклеотидів), які містить мутації, що представляють інтерес. В одному з варіантів здійснення надають праймер для кожної мутації, що представляє інтерес. Таким чином, перший або матричний полінуклеотид, який містить 3 мутації, що представляють інтерес, може використовувати 3 праймери в цьому положенні. Також праймер можна надати у вигляді пулу праймерів, що містять вироджене положення, для того, щоб мутація, що представляє інтерес, являла собою діапазон будь-яких нуклеотидів або амінокислот, що зустрічаються в природі, або підмножину цього діапазону. Наприклад, можна надати пул праймерів, що сприяють утворенню мутацій аліфатичних амінокислотних залишків. Праймери можна одержати у вигляді прямих або зворотних праймерів або праймери можна одержати у вигляді щонайменше одного прямого праймера і щонайменше одного зворотного праймера. Коли мутації розташовані близько одна до одної, може виявитися доцільним використовувати праймери, що містять мутації більше ніж для одного положення або різні сполучення мутацій у декількох положеннях.

Надання полінуклеотиду, що містить матричну послідовність. Перший або матричний полінуклеотид може бути кільцевим або може бути суперскрученим, таким як плазмід або вектор для клонування, секвенування або експресії. Полінуклеотид може бути одноланцюжковим ("олДНК") або може бути дволанцюжковим ("длДНК"). Наприклад, у способі ТСМА суперскручену ("сс") длДНК матрицю піддають стадії нагрівання при 95 °C протягом 1 хв. (див. Levy, Nucleic Acid Res., 28(12):e57(i-vii) (2000)).

Приєднання праймерів до матричного полінуклеотиду в реакційній суміші. Праймери і матричний полінуклеотид об'єднують в умовах, які дозволяють праймерам гібридизуватися з матричним полінуклеотидом. В одному з варіантів здійснення протоколу ТМСА праймери приєднують до полінуклеотиду в одній реакційній суміші, але їх можна приєднувати й у декількох реакціях.

Здійснення реакції(й) полімеразного подовження. Продукти подовження (наприклад, як "потомства" або "модифікованого подовженого полінуклеотиду") можна ампліфікувати стандартними засобами. Можна аналізувати довжину, послідовність, бажані властивості нуклеїнової кислоти продуктів або експресувати їх у вигляді поліпептидів. Інші способи аналізу включають гібридизацію *in situ*, скринінг послідовностей або скринінг експресії. Аналіз може включати один або декілька раундів скринінгу і відбору по бажаній властивості. Також продукти можна трансформувати в клітину або іншу систему експресії, таку як безклітинна система. Безклітинна система може містити ферменти, пов'язані з реплікацією, репарацією, рекомбінацією, транскрипцією або трансляцією ДНК. Зразкові організми-хазяїни включають клітини бактерій, дріжджів, рослин і тварин і клітинні лінії і включають *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pichia pastoris* і *Aspergillus niger*. Наприклад, як організми-хазяїни штамів можна використовувати *E. coli* XL1-Blue або Stbl2.

Спосіб за винаходом можна використовувати з однаковими або різними праймерами при різних умовах реакції, щоб сприяти утворенню продуктів, що містять різні сполучення або число мутацій.

При здійсненні зразкового способу, описаного вище, цей протокол також передбачає один або декілька полінуклеотидів, одержаних за допомогою цього способу еволюції ТМСА, які потім можна піддати скринінгу або відбору по бажаній властивості. Один або декілька дочірніх полінуклеотидів можна експресувати у вигляді поліпептидів і необов'язково піддати скринінгу або відбору по бажаній властивості. Таким чином, цей варіант здійснення протоколу еволюції ТМСА передбачає полінуклеотиди і кодовані поліпептиди, а також бібліотеки таких полінуклеотидів, що кодують такі поліпептиди. Цей варіант здійснення протоколу еволюції ТМСА додатково передбачає скринінг бібліотек за допомогою скринінгу або відбору бібліотеки для одержання одного або декількох полінуклеотидів, що кодують один або декілька поліпептидів, які мають бажану активність.

Інший варіант здійснення протоколу еволюції ТМСА, описаний у публікації РСТ № WO 2009/018449, включає спосіб одержання декількох модифікованих полінуклеотидів. Такі способи, як правило, включають (а) додавання щонайменше трьох праймерів до дволанцюжкового матричного полінуклеотиду в одній реакційній суміші, де щонайменше три праймери не перекриваються і де кожний із щонайменше трьох праймерів містить щонайменше одну мутацію, що відрізняється від інших праймерів, де щонайменше один праймер являє

собою прямий праймер, який може гібридизуватися з мінус-ланцюгом матриці, і щонайменше один праймер являє собою зворотний праймер, який може гібридизуватися з плюсом-ланцюгом матриці, і (b) проведення реакції полімеразного подовження в реакційній суміші, щоб щонайменше з трьох праймерів одержати декілька подовжених модифікованих полінуклеотидів.

Інший варіант здійснення протоколу еволюції ТМСА, описаний у публікації РСТ № WO 2009/018449, включає спосіб, де клітину трансформують декількома подовженими продуктами, які не обробляли лігазою. В іншому варіанті здійснення винаходу декілька подовжених модифікованих полінуклеотидів одержують із клітини. В іншому варіанті здійснення декілька одержаних подовжених модифікованих полінуклеотидів аналізують, наприклад, за допомогою експресії щонайменше одного з декількох подовжених модифікованих полінуклеотидів і аналізу поліпептиду, експресованого з них. В іншому варіанті здійснення відбирають декілька подовжених модифікованих полінуклеотидів, які містять мутації, що представляють інтерес. В іншому варіанті здійснення протоколу еволюції ТМСА одержують інформацію про послідовність, що стосується матричного полінуклеотиду, і по всій довжині матричного полінуклеотиду можна ідентифікувати три або більше мутацій, що представляють інтерес. В іншому варіанті здійснення продукти, одержані за допомогою полімеразного подовження, можна аналізувати перед трансформацією клітини декількома подовженими модифікованими продуктами.

В одному з варіантів здійснення протоколу еволюції ТМСА продукти, одержані за допомогою полімеразного подовження, обробляють ферментом, наприклад, рестрикційним ферментом, таким як рестрикційний фермент DpnI, за допомогою чого руйнують послідовність матричного полінуклеотиду. Обробленими продуктами можна трансформувати клітину, наприклад, клітину *E. coli*. В одному з варіантів здійснення протоколу еволюції ТМСА можна використовувати щонайменше два або щонайменше три, або щонайменше чотири, або щонайменше п'ять, або щонайменше шість, або щонайменше сім, або щонайменше вісім, або щонайменше дев'ять, або щонайменше десять, або щонайменше одинадцять, або щонайменше дванадцять, або більше праймерів. В одному з варіантів здійснення кожен праймер містить одну точкову мутацію. В іншому варіанті здійснення два прямих або два зворотних праймери містять різні зміни в тому самому положенні в матричному полінуклеотиді. В іншому варіанті здійснення щонайменше один праймер містить щонайменше дві зміни в різних положеннях у матричному полінуклеотиді. У ще одному іншому варіанті здійснення щонайменше один праймер містить щонайменше дві зміни в різних положеннях і щонайменше два прямих або два зворотних праймери містять різні зміни в тому самому положенні в матричному полінуклеотиді. В одному з варіантів здійснення протоколу еволюції ТМСА прямі праймери згруповані в пряму групу, а зворотні праймери згруповані в зворотну групу, і праймери в прямій групі і праймери в зворотній групі, незалежно від одного, нормалізовані стосовно рівної концентрації у відповідній групі, незалежно від положень у матричному полінуклеотиді, і де після нормалізації в реакцію додають рівну кількість прямого і зворотного праймерів. У цьому способі нормалізації, сполучення деяких положень може бути зміщеним. Зміщення може відбуватися в результаті, наприклад, відносно низької концентрації праймера в одному положенні, що містить один праймер, у порівнянні з положенням, що містить декілька праймерів. "Зміщення по положенню" стосується одержаних полінуклеотидів, що виявляють виражену перевагу стосовно вбудовування праймерів в одному положенні стосовно інших положень у межах їх групи прямих або зворотних праймерів. Це веде до сполучення модифікованих полінуклеотидів, що можуть містити високу процентну частку мутацій в одному положенні праймера, але низьку процентну частку мутацій в іншому положенні в їх групі прямих або зворотних праймерів. Таке зміщення є несприятливим, коли задача ТМСА полягає в створенні дочірніх полінуклеотидів, які містять усі можливі сполучення змін у матриці. Зміщення можна коректувати, наприклад, за допомогою нормалізації праймерів у вигляді пулу в кожному положенні для додержання рівності.

В одному з варіантів здійснення протоколу еволюції ТМСА нормалізацію праймерів здійснюють за допомогою організації праймерів декількома групами залежно від їх місця розташування на матричному полінуклеотиді, де праймери, що покривають одну і ту ж вибрану ділянку на матриці, знаходяться в одній групі; нормалізації згрупованих праймерів усередині кожної групи для досягнення рівної концентрації; об'єднання прямих праймерів усередині однієї групи в пряму групу і нормалізації концентрація між кожною групою прямих праймерів для додержання рівності; об'єднання зворотних праймерів усередині однієї групи в зворотну групу і нормалізації концентрації між кожною групою зворотних праймерів для додержання рівності; і додавання рівної кількості об'єднаних прямих і зворотних праймерів у реакцію. Для сполучень положень відхилення не спостерігали. В одному з варіантів здійснення протоколу еволюції ТМСА передбачений набір вироджених праймерів, кожний містить вироджене положення, де мутація, що представляє інтерес, являє собою спектр різних нуклеотидів у виродженому

положенні. В іншому варіанті здійснення передбачений набір вироджених праймерів, що містять щонайменше один вироджений кодон, який відповідає щонайменше одному кодону матричного полінуклеотиду, і щонайменше одну суміжну послідовність, яка гомологічна послідовності, суміжній з кодоном послідовності матричного полінуклеотиду. В іншому варіанті здійснення вироджений кодон являє собою N,N,N і кодує будь-які з 20 амінокислот, що зустрічаються в природі. В іншому варіанті здійснення вироджений кодон кодує менше ніж 20 амінокислот, що зустрічаються в природі.

Інший варіант здійснення протоколу еволюції ТМСА, описаний у публікації РСТ № WO 2009/018449, включає спосіб одержання декількох модифікованих полінуклеотидів, які містять мутації, що представляють інтерес. Такі способи, як правило, включають (а) додавання щонайменше двох праймерів до дволанцюжкового матричного полінуклеотиду в одну реакційну суміш, де щонайменше два праймери не перекриваються і де кожний із щонайменше двох праймерів містить щонайменше одну мутацію, відмінну від іншого праймера(ів), де щонайменше один праймер являє собою прямий праймер, що може гібридизуватися з мінус-ланцюгом матриці, і щонайменше один праймер являє собою зворотний праймер, що може гібридизуватися з плюсом-ланцюгом матриці, (b) проведення реакції полімеразного подовження в реакційній суміші, щоб одержати декілька подовжених модифікованих полінуклеотидів із щонайменше двох праймерів, (c) обробку декількох подовжених модифікованих полінуклеотидів ферментом, за допомогою чого руйнують матричний полінуклеотид, (d) трансформацію клітини обробленими подовженими модифікованими полінуклеотидами, які не обробляли лігазою, (e) одержання декількох подовжених модифікованих полінуклеотидів із клітини, і (f) відбір декількох подовжених модифікованих полінуклеотидів, які містять мутації, що представляють інтерес.

У цьому прикладі 15 мутацій, відібраних для включення в термостабільну бібліотеку ТМСА, представлені нижче в таблиці 13. Використовували шість ДНК-матриць: SEQ ID NO:2 з мутаціями D61E, R72K і V163R (батьківська послідовність), батьківська послідовність з мутацією E95K, батьківська послідовність з мутацією P162G, батьківська послідовність з мутацією P162K, батьківська послідовність з мутаціями E95K і P162G і батьківська послідовність з мутаціями E95K і P162K. Плазміди батьківської послідовності з мутацією E95K, батьківської послідовності з мутацією P162G, батьківської послідовності з мутацією P162K не пасивували за допомогою компетентних клітин E. coli XL1-Blue, щоб метилювати ДНК. Проводили шість окремих еволюцій ТМСА, по одній на кожну із шести матриць у сполученні з олігонуклеотидами, перерахованими нижче в таблиці 14.

Таблиця 13

Мутація	Новий кодон
A48C	TGT
D49R	CGT
R85Y	TAT
E95K	AAG
E116I	ATT
E116L	CTT
E116N	AAT
A144I	ATT
E149H	CAT
A150I	ATT
P162G	GGT
P162K	AAG
R172H	CAT
R172L	CTT
A225S	TCT

Таблиця 14

Назва олігонуклеотиду	Послідовність олігонуклеотиду 5'-3'
A144I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATCGCCTCGTAGATCTTCCAAATATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEQ ID NO:24)
A144I-A150I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATAATCTCGTAGATCTTCCAAATATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEQ ID NO:25)
A144I-E149H-A150I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATAATATGGTAGATCTTCCAAATATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEQ ID NO:26)
A144I-E149H-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATCGCATGGTAGATCTTCCAAATATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEQ ID NO:27)
A150I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATAATCTCGTAGATCTTCCACGCATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEQ ID NO:28)
A225S-R	TTGGGCTCGAGTCAGAGCCGAGACGCGACCGGACCCAG (SEQ ID NO:29)
A48C-D49R-F	TGGTGCTGCCCGGCTTCTGTGTGTCGACACGCCACCTCGGTGCT (SEQ ID NO:30)
A48C-F	TGGTGCTGCCCGGCTTCTGTGTGTCGACACGCCACCTCGGTGCT (SEQ ID NO:31)
D49R-F	TGGTGCTGCCCGGCTTCTGGCCGTCGACACGCCACCTCGGTGCT (SEQ ID NO:32)
E116I-F	TCGGCGGCCTCTATGCGCGCAATCTGGGCCACAAGGCGCCCGA (SEQ ID NO:33)
E116L-F	TCGGCGGCCTCTATGCGCGCCTTCTGGGCCACAAGGCGCCCGA (SEQ ID NO:34)
E116N-F	TCGGCGGCCTCTATGCGCGCAATCTGGGCCACAAGGCGCCCGA (SEQ ID NO:35)
E149H-A150I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATAATATGGTAGATCTTCCACGCATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEQ ID NO:36)
E149H-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATCGCATGGTAGATCTTCCACGCATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEQ ID NO:37)
R172H-R	GGCGACCACACCGCGATGGTATGACCGCGCGCTTAATCTGGA (SEQ ID NO:38)
R172L-R	GGCGACCACACCGCGATGTAAGCACCGCGCGCTTAATCTGGA (SEQ ID NO:39)
R85Y-F	TTCTGTGGCGACCTCGTGGACTATCTGGTCGACCGGCTGCGGGC (SEQ ID NO:40)

Членів бібліотеки ампліфікували у векторі pDOW-Kan, аналізували в агарозному гелі й обробляли за допомогою DpnI. Потім зразки трансформували в компетентні клітини E. coli XL1-Blue. Колонії збирали, ростили і секвенували. Результати секвенування показали, що мутація E116L і мутації амінокислот 144, 149 і 150 представлені в недостатній мірі в порівнянні з теоретичним максимумом. Тому створювали іншу бібліотеку TMCA з використанням нормалізованої суміші всіх шести матриць. Реакції TMCA повторювали з використанням всіх олігонуклеотидів, перерахованих у таблиці 14, за винятком олігонуклеотидів для мутацій E116I і E116N. Подвоювали кількість праймерів, використаних для мутації E116L і для ділянки 4 (амінокислоти 144, 149 і 150). Зразки ампліфікували у векторі pDOW-Kan, аналізували в агарозному гелі й обробляли за допомогою DpnI. Зразок ДНК трансформували в компетентні клітини E. coli XL1-Blue. Колонії збирали, ростили і секвенували. Удосконалили введення мутацій амінокислот 144, 149 і 150, E116L усе ще була представлена в недостатній мірі в порівнянні з теоретичним максимумом. ДНК з обох бібліотек трансформували в компетентні клітини E. coli XL1-Blue. Колонії об'єднували й одержували ДНК із використанням набору Qiagen mini-prep. Потім ДНК використовували для трансформації компетентних клітин Pseudomonas fluorescens. Клітини ростили в середовищі LB з додаванням урацилу (750 мкг/мл) і канаміцину (50 мкг/мл). Для бібліотеки одержували достатнє число колоній з 10-кратним надлишком. Щоб врахувати представлену в недостатній мірі E116L, бібліотеку наповнювали зразками в 10-кратному надлишку.

Одержану термостабільну бібліотеку TMCA ростили в мінімальному середовищі M9 з додаванням урацилу (750 мкг/мл) і канаміцину (50 нг/мл) і проводили скринінг із використанням високопродуктивного скринінгу, який описаний вище в прикладі 3. Бібліотеку інкубували при температурі 60 °C протягом 30 хвилин до і після додавання УМБ-пальмітату. Потім 384-ямкові планшети зчитували при довжині хвилі збудження 365 нм і довжині хвилі випромінювання 460 нм. Кожен планшет швидко охолоджували за допомогою центрифугування, спектрофотометр попередньо нагрівали, щоб мінімізувати артефакти в показаннях. Відображали значення флуоресценції по кожному 384-ямковому планшету. Хіти ідентифікували по перевищенню позитивного контролю більше ніж на 2 стандартні відхилення (одиначна мутація E116L). Аналіз хітів первинного високопродуктивного скринінгу проводили за допомогою вторинного високопродуктивного скринінгу при двох температурах 60 °C і 63 °C. Вторинні хіти визначали по перевищенню усередненого позитивного контролю більше ніж на 4 стандартні відхилення в планшеті при 63 °C і по збереженню >50% активності при температурі від 60 °C до 63 °C.

Ідентифікували 318 хітів вторинного високопродуктивного скринінгу з унікальними послідовностями. Ці хіти містили від 2 до 9 мутацій. Використовуючи прояснені лізати 318 хітів, проводили стандартні аналізи з 5 г нерафінованої олії (як описано в прикладі 5). З 318 хітів вторинного високопродуктивного скринінгу як "олійні хіти" з тепловою стійкістю вибирали ті хіти, які в аналізі з олією знижували вміст пальмітату більш ефективно при підвищених температурах (45 °C або 60 °C), ніж при 25 °C. За допомогою додаткових аналізів з олією ідентифікували й охарактеризували 57 первинних олійних хітів з тепловою стійкістю (нижче див. таблиці 15 і 16). Проводили додаткові аналізи з 5 г олії й ідентифікували 9 олійних хітів, що мали переважні

профілі температурної ефективності на доповнення до зміни рівнів загальної активності (нижче див. таблицю 17).

Таблиця 15

№ хіта теплової стійкості											Пальмітат 24 год.			Пальмітат 48 год.		
	48	85	95	116	144	149	150	162	172	225	25°C	45°C	60°C	25°C	45°C	60°C
12	A48C			E116I	A144I	E149H	A150I				8.1%	7.5%	9.6%	7.3%	7.1%	9.5%
16	A48C			E116I					R172H	A225S	10.4%	9.5%	10.4%	9.7%	9.1%	10.6%
17	A48C								R172H	A225S	7.3%	7.4%	10.2%	6.4%	6.8%	10.2%
29*		R85Y							R172H		5.0%	5.8%	6.3%	4.3%	6.3%	6.7%
38	A48C	R85Y	E95K	E116L					R172H	A225S	9.9%	7.8%	9.9%	8.7%	7.1%	9.8%
40*	A48C	R85Y	E95K					P162G	R172H	A225S	10.0%	9.1%	8.8%	9.7%	8.4%	9.3%
41*	A48C	R85Y	E95K					P162G	R172H		10.1%	8.4%	8.7%	9.8%	8.8%	8.6%
53	A48C	R85Y		E116I				P162K	R172H	A225S	10.0%	9.1%	8.1%	9.7%	8.6%	7.7%
64		R85Y		E116L				P162G		A225S	7.5%	6.7%	10.2%	6.3%	6.0%	10.1%
66								P162G	R172H	A225S	9.6%	9.4%	10.5%	8.3%	8.8%	10.6%
74*		R85Y	E95K	E116L					R172H	A225S	5.5%	6.2%	6.3%	4.9%	5.7%	6.5%
77	A48C		E95K				A150I	P162G	R172H	A225S	10.0%	9.0%	10.5%	9.7%	9.0%	10.6%
81	A48C	R85Y		E116L				P162G	R172H	A225S	10.2%	8.9%	7.4%	9.4%	8.3%	7.2%
88			E95K					P162G	R172H	A225S	8.2%	7.4%	8.0%	7.2%	6.8%	10.6%
89		R85Y						P162G	R172H	A225S	9.2%	7.9%	7.6%	8.1%	7.5%	7.6%
94	A48C	R85Y	E95K	E116L					R172H	A225S	10.5%	10.1%	10.8%	10.3%	9.9%	10.9%
104	A48C	R85Y		E116I	A144I			P162K			10.7%	10.5%	10.6%	10.7%	10.6%	10.7%
105	A48C	R85Y		E116L			A150I		R172H	A225S	6.6%	9.1%	9.0%	10.0%	8.9%	8.8%
108	A48C			E116L				P162G	R172H	A225S	9.2%	7.8%	10.4%	8.6%	7.2%	10.5%
109	A48C	R85Y	E95K	E116L				P162G	R172H	A225S	10.0%	10.3%	8.4%	9.6%	10.0%	7.8%

Таблиця 15 (продовження)

№ хіта теплової стійкості											Пальмітат 24 год.			Пальмітат 48 год.		
	48	85	95	116	144	149	150	162	172	225	25°C	45°C	60°C	25°C	45°C	60°C
114		R85Y	E95K					P162G	R172H	A225S	9.5%	9.1%	8.4%	8.5%	8.7%	8.4%
118		R85Y						P162G	R172H		9.7%	8.7%	8.1%	8.9%	8.3%	7.9%
134	A48C							P162G	R172H	A225S	10.3%	9.4%	9.2%	10.3%	9.0%	9.2%
135		R85Y						P162K	R172H		6.8%	7.0%	9.6%	6.0%	7.0%	9.4%
136	A48C							P162K	R172H		9.2%	8.1%	8.0%	8.7%	8.1%	7.6%
155								P162K	R172H	A225S	9.5%	8.6%	10.5%	8.5%	8.1%	10.5%
161		R85Y	E95K	E116N	A144I						9.8%	9.6%	9.8%	9.7%	11.6%	9.7%
184	A48C		E95K	E116N	A144I		A150I				10.5%	10.4%	10.4%	10.5%	10.5%	10.4%
202				E116N				P162G	R172H		8.8%	7.4%	8.2%	8.1%	6.9%	8.0%
204		R85Y		E116I				P162G	R172H		9.4%	8.3%	6.7%	8.8%	7.4%	7.1%
211	A48C	R85Y		E116L				P162G	R172H		9.6%	8.9%	8.7%	8.6%	8.3%	8.5%
215	A48C			E116I				P162G	R172L	A225S	10.4%	10.1%	10.3%	10.5%	10.0%	10.0%
216		R85Y						P162G	R172H	A225S	9.7%	9.6%	8.9%	9.0%	8.0%	8.8%
229	A48C	R85Y						P162G	R172L	A225S	10.3%	9.8%	10.1%	10.0%	9.7%	10.1%
235	A48C			E116I				P162G	R172L		10.3%	10.0%	10.3%	10.0%	9.3%	10.4%
236	A48C							P162G			10.1%	9.7%	9.7%	10.1%	9.3%	9.6%
238		R85Y		E116N				P162G	R172H	A225S	9.2%	7.6%	7.6%	8.3%	6.9%	7.6%
239	A48C							P162G			10.2%	8.8%	10.1%	9.8%	7.8%	10.3%
241				E116L				P162G	R172L	A225S		7.4%	10.2%	6.5%	6.6%	10.3%
243				E116I				P162G		A225S	9.2%	7.5%	10.3%	8.2%	6.8%	10.4%
244		R85Y						P162G			10.1%	7.6%	7.8%	9.6%	6.9%	8.0%
246	A48C	R85Y	E95K	E116I				P162G	R172H		10.2%	9.7%	10.6%	9.7%	9.7%	10.5%
247		R85Y	E95K	E116I				P162G		A225S	10.1%	7.8%	10.0%	9.8%	7.0%	10.1%
248		R85Y	E95K					P162G	R172H		9.6%	8.7%	9.8%	8.6%	7.9%	9.9%
257			E95K					P162G	R172H		8.7%	8.0%	9.5%	7.2%	7.4%	9.4%
263											10.3%	9.9%	9.8%	10.1%	10.0%	9.7%
269			E95K	E116I				P162G	R172L	A225S	9.5%	8.6%	10.5%	9.1%	8.0%	10.6%
274		R85Y	E95K					P162G	R172L		10.1%	9.4%	10.5%	10.5%	9.0%	10.5%

Таблиця 15 (продовження)

№ хіта теплової стійкості											Пальмітат 24 год.			Пальмітат 48 год.		
	48	85	95	116	144	149	150	162	172	225	25°C	45°C	60°C	25°C	45°C	60°C
278	A48C			E116L					R172H	A225S	10.1%	9.2%	10.4%	10.2%	9.1%	10.4%
282	A48C	R85Y		E116N	A144I				R172H	A225S	10.6%	10.6%	10.5%	10.6%	10.5%	10.4%
284	A48C		E95K	E116I	A144I	E149H			R172H	A225S	10.6%	10.6%	10.5%	10.6%	10.5%	10.5%
286				E116I	A144I				R172H		10.5%	10.5%	10.2%	10.4%	10.4%	10.0%
288		R85Y			A144I		A150I				10.4%	10.4%	9.9%	10.3%	10.1%	9.8%
292	A48C			E116N	A144I		A150I		R172H		10.5%	10.6%	10.0%	10.2%	10.9%	9.8%
296	A48C			E116N	A144I	E149H	A150I		R172H		10.6%	10.6%	10.6%	10.6%	10.6%	10.5%
297	A48C	R85Y		E116I							10.3%	9.8%	10.5%	10.2%	9.7%	10.5%
298		R85Y		E116N					R172H		8.6%	7.8%	10.2%	7.9%	7.3%	10.2%

Хіти теплової стійкості 29, 40, 41 і 74 також містять додаткові мутації (див. додаткові мутації, перераховані нижче в таблиці 16).

Таблиця 16

Додаткові мутації, які також містяться в хітах теплової стійкості 29, 40, 41 і 74

№ хіта теплової стійкості	Старий кодон	Новий кодон	Стара амінокислота	Нова амінокислота	Положення амінокислоти
29	GTG	ATG	V	M	83
40	GCG	GCT	A	A	92
41	GCG	GCT	A	A	92
74	GCG	GCT	A	A	92

Таблиця 17

Фермент	Пальмітат 3 год.			Пальмітат 24 год.			Пальмітат 48 год.		
	25 °C	45 °C	60 °C	25 °C	45 °C	60 °C	25 °C	45 °C	60 °C
Негативний	10,7%	10,6%	10,7%	10,6%	10,5%	10,6%	10,6%	10,5%	10,6%
Батьківський	7,8%	7,3%	10,3%	5,4%	6,2%	10,3%		5,9%	10,3%
29	8,1%	6,5%	9,1%	4,9%	5,7%	8,8%	4,2%	5,9%	8,9%
40	10,5%	10,3%	10,0%	10,0%	9,1%	8,8%	9,7%	8,4%	9,3%
41	10,5%	10,3%	9,9%	10,1%	8,4%	8,7%	9,8%	8,8%	8,6%
74	9,2%	8,0%	9,9%	6,2%	6,1%	9,8%	5,1%	6,1%	9,8%
81	10,3%	9,8%	9,3%	9,5%	8,1%	8,0%	8,2%	7,4%	7,9%
202	10,2%	9,4%	10,5%	9,3%	7,4%	10,4%	8,5%	7,2%	10,4%
204	10,5%	10,1%	9,7%	10,0%	9,0%	8,7%	9,4%	8,6%	8,5%
238	10,4%	9,8%	9,5%	9,8%	7,7%	9,0%	8,5%	7,6%	8,9%
244	10,3%	9,6%	10,4%	9,5%	8,0%	10,2%	8,3%	7,5%	10,2%

Приклад 11: Зразкова еволюція для посилення експресії пальмітази з використанням технології TMCASM

Оцінювали експресію (див. нижче таблицю 18) 37 індивідуальних мовчазних мутацій, ідентифікованих у процесі скринінгу GSSM (див. вище таблицю 11, приклад 9). У колбах по 250 мл експресували 50 мл культури в середовищі M9 з додаванням урацилу і канаміцину. Хіти росли при 30 °C протягом від 16 до 20 год. до і після індукції з використанням 0,3 mM IPTG. Клітини осаджували центрифугуванням і лізували з використанням B-PERTM (за каталогом № 78248, Pierce Protein Research Products, Rockford, IL). Частина повного лізату центрифугували для прояснення. Проводили аналіз концентрації загального білка як у повному клітинному лізаті, так і в прояснених лізатах з використанням Bio-Rad Protein Analysis (Bio-Rad, Hercules, CA, № за каталогом 500-0006) на основі способу Бредфорда, і аналіз активності на флуорогенному субстраті УМБ-пальмітат, і за допомогою SDS-PAGE. Значення нормалізували стосовно значення батьківського білка, прийнятого за 100%. Ідентифікували 16 хітів, які демонстрували підвищену активність стосовно батьківського білка.

Таблиця 18

Положення а.о.	% активність батьківського білка		% розчинного	
	Повний	Прояснений	Активність	Білок
35	352	247	53	79
37	191	126	50	83
41	163	103	48	91
45	706	640	68	89
52	252	161	48	57
89	281	190	51	47
97	167	102	46	77
102	617	525	64	72
108	583	452	58	60
109	373	244	49	72

Таблиця 18 (Продовження)

114	238	147	46	72
115	Немає даних			
117	653	555	64	70
124	442	336	57	62
126	509	368	55	70
128	416	327	59	70
129	354	260	55	73
133	511	455	67	47
137	339	240	53	54
138	266	186	53	75
139	135	101	56	105
142	221	175	60	63
172	243	210	65	59
183	433	356	62	65
188	455	325	54	97
192	253	179	53	60
193	117	59	38	57
202	196	121	47	63
203	339	247	55	68
205	63	31	37	68
206	125	78	47	63
208	232	162	53	99
212	320	238	56	87
222	126	75	45	86
223	149	88	45	99
226	213	110	39	81
227	183	174	71	71
Позитивний	100	100	75	71
Негативний	0	1		

Кращі 11 індивідуальних мовчазних мутацій (таблиця 19, нижче) об'єднували з використанням технології TMCA, як описано в публікації PCT № WO 2009/018449 і додатково описано нижче.

5

Таблиця 19

Вихідний кодон	Новий кодон	Положення амінокислоти
GCG	GCT	35
GGC	GGA	45
GTG	GTT	102
AGC	AGT	108
CTG	CTT	117
CTG	TTC	124
CGG	AGG	126
GTC	GTG	128
AGT	TCT	133
GTG	GTT	183
ACC	ACG	188

Для еволюції TMCA використовували чотири ДНК-матриці: (1) пальмітазу "Батько А" (SEQ ID NO:2 з мутаціями D61E, R72K і V163R), (2) пальмітазу "Батько В" (Батько А з додатковими мутаціями (GGC)45(GGA) і (CTG)117(CTT)), (3) пальмітазу "Батько С" (Батько А з додатковою мутацією (GGC)45(GGA)) і (4) "Батько D" (Батько А з додатковою мутацією (CTG)117(CTT)). Коментар: у мутаціях зазначений вихідний кодон, за яким іде номер положення модифікованої амінокислоти, за яким іде новий кодон. Наприклад, у (GGC)45(GGA) зазначено, що кодон для амінокислоти в положенні 45 з SEQ ID NO:2 замінили з (GGC) на (GGA).

10

- Перший раунд реакцій ТМСА виконували з використанням кожної з чотирьох ДНК-матриць і праймерів для ділянок 1 і 4 (див. нижче таблицю 20; ділянка 1: амінокислота 35; ділянка 4: амінокислоти 183 і 188), за допомогою чого створювали чотири підбібліотеки. Продукти підбібліотек очищали з використанням Qiagen PCR Cleanup Kit. Потім кожну підбібліотеку, що містить суміш очищених продуктів і, отже, містить декілька матриць, використовували в одній другій реакції ТМСА на одну підбібліотеку з праймерами для ділянок 2 і 3 (див. нижче таблицю 21; ділянка 2: амінокислоти 102 і 108; ділянка 3: амінокислоти 124, 126, 128 і 133).

Таблиця 20

Назва олігонуклеотиду	Послідовність олігонуклеотиду 5'-3'
35GCT	CTGCGAAAATGGGCAAACTGGCTGATGGCGAGCCGGTACTGGT (SEQ ID NO:41)
183GTT	TGCTCGGGCGAGCCTTCCGAGGTCTCCGGCGCCACAACCCCGTCGAGCGGCGACCACA (SEQ ID NO:42)
183GTT188ACG	TGCTCGGGCGAGCCTTCCGACGTCTCCGGCGCCACAACCCCGTCGAGCGGCGACCACA (SEQ ID NO:43)
188ACG	TGCTCGGGCGAGCCTTCCGACGTCTCCGGCGCCACCACCCCGTCGAGCGGCGACCACA (SEQ ID NO:44)

Таблиця 21

Назва олігонуклеотиду	Послідовність олігонуклеотиду 5'-3'
102GTT-RC	AGGCGGCCGGTGGTCAGAAAGTTATCGTGGTGGCTGGAGCCTCGGCGGCCCTCTATGCGC (SEQ ID NO:45)
102GTT108AGT-RC	AGGCGGCCGGTGGTCAGAAAGTTATCGTGGTGGCTGGAGTCTCGGCGGCCCTCTATGCGC (SEQ ID NO:46)
108AGT-RC	AGGCGGCCGGTGGTCAGAAAGTTATCGTGGTGGCTGGAGTCTCGGCGGCCCTCTATGCGC (SEQ ID NO:47)
124TTG133TCTshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCGGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:48)
124TTG126AGGshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGTGGCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:49)
124TTG126AGG128GTGshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGTGGCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:50)
126AGG133TCTshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAGTTTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:51)
124TTG126AGG128GTG133TCTshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:52)
133TCTshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCGGATCAGTTTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:53)
128GTG133TCTshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCGGATCAGTTTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:54)
124TTG126AGG133TCTGshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:55)
126AGGshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGTGGCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAGTTTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:56)
124TTG128GTGshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGTGGCGAGCGTGACGACCATCCGGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:57)
126AGG128GTG133TCTshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAGTTTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:58)
124TTG128GTG133TCTshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCGGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:59)
124TTGshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGTGGCGAGCGTGACGACCATCCGGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:60)
128GTGshort-RC	TCGCCCCGGAACGGAGTGGCGAGCGTGACGACCATCCGGATCAGTTTCGGGCGCCTTGTGG (SEQ ID NO:61)

Зразки ампліфікували у векторі pDOW-Kan, аналізували в агарозному гелі, обробляли з використанням DpnI і потім трансформували в компетентні клітини E. coli XL1-Blue. Колонії росли, збирали і секвенували. Колонії об'єднували й одержували ДНК для кожної підбібліотеки з використанням набору Qiagen mini-prep (за каталогом № 27106, Qiagen, Valencia, CA). Потім компетентні клітини Pseudomonas fluorescens трансформували цією ДНК. Клітини росли в середовищі LB з додаванням урацилу (750 мкг/мл) і канаміцину (50 мкг/мл). Для бібліотеки одержували достатню кількість колоній з 7-кратним надлишком (щонайменше 14000 колоній).

Бібліотеку упорядкували, росли в мінімальному середовищі М9 з додаванням урацилу (750 мкг/мл) і канаміцину (50 мкг/мл) і проводили аналіз з використанням 400 мкМ 4-метилумбеліферилпальмітату в 80 мМ HEPES з pH 7,5. Зразки інкубували протягом 30 хвилин при температурі 54 °C до і після додавання субстрату. Флуоресценцію зчитували при довжині хвилі збудження 360 нм і довжині хвилі випромінювання 465 нм. 46 зразків з мовчазними мутаціями дали унікальні послідовності (див. нижче таблицю 22). Показання флуоресценції для кожного з 46 зразків з мовчазними мутаціями також перераховані в таблиці 22, у першій колонці "УМБ активність". На доповнення до мовчазних мутацій зразки з мовчазними мутаціями 2, 7, 9, 10, 13, 16, 23, 25, 40 і 44 містили зміни амінокислот (АК) (див. нижче таблицю 23).

Таблиця 22

УМБ активність	№ хіта	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК
31850	1	GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
33936	2	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
42764	3	GCG	GCT	35	ACC	ACG	188												
39330	4	GCG	GCT	35	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188									
38876	5	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	GTC	GTG	128						
31705	6	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
35315	7				GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128			
36662	8	GCG	GCT	35	GTG	GTT	183												
35945	9	GCG	GCT	35	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133									
37161	10	GCG	GCT	35	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
35399	11	GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	CTG	TTG	124	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
39316	12	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126
39682	13	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124				GTG	GTT	183
46354	14	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126	ACC	ACG	188
39952	15	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133			
37049	16				GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126
34741	17	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117									
34261	18	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188			
30495	19	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
31485	20	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	AGT	TCT	133
34474	21	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	AGT	TCT	133	ACC	ACG	188

Таблиця 22 (продовження)

УМБ актив- ність	№ хита	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК
36301	22	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	CGG	AGG	126
37711	23	GGC	GGA	45				AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188			
37855	24	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188						
34094	25	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CGG	AGG	126	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
41223	26	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	AGT	TCT	133						
35751	27	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45												
34878	28	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	TTG	90	GTG	GTT	183						
36361	29	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133			
35801	30	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	GTC	GTG	128	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
42393	31	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CGG	AGG	126	GTC	GTG	128
29278	32	GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188									
34274	33	GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
36610	34	GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGC	AGT	153
42445	35	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126	AGT	TCT	133
41151	36	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126						
39376	37	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188			
35116	38	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
35224	39	GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183
39996	40	GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	AGT	TCT	133						
35206	41	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126	AGT	TCT	133	CGC	CAC	172	ACC	ACG	188			
34163	42	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
34789	43	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	CGG	AGG	126	GTC	GTG	128	GTG	GTT	183
33168	44				GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188						
37120	45	GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183									
38626	46	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188

Таблица 22 (продовження)

УМБ актив- ність	№ хіта	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК
31850	1									
33936	2				GTG	GTT	183			
42764	3									
39330	4									
38876	5									
31705	6	GTG	GTT	183						
35315	7									
36662	8									
35945	9									
37161	10									
35399	11									
39316	12	AGT	TCT	133						
39682	13	ACC	ACG	188						
46354	14									
39952	15									
37049	16	ACC	ACG	188						
34741	17									
34261	18									
30495	19									
31485	20									
34474	21									
36301	22	GTC	GTG	128						

Таблиця 22 (продовження)

УМБ актив- ність	№ хіта	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК	Старий кодон	Новий кодон	№ АК
37711	23									
37855	24									
34094	25									
41223	26									
35751	27									
34878	28									
36361	29									
35801	30									
42393	31	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
29278	32									
34274	33									
36610	34	ACC	ACG	188						
42445	35	ACC	ACG	188						
41151	36									
39376	37									
35116	38									
35224	39	ACC	ACG	188						
39996	40									
35206	41									
34163	42									
34789	43	ACC	ACG	188						
33168	44									
37120	45									
38626	46									

Таблиця 23

№ Хіта з мовчазною мутацією	Додаткові мутації				
	Старий кодон	Новий кодон	Стара АК	Нова АК	№ АК
2	CCG	TCG	P	S	162
7	ACG	ATG	T	M	22
9	AGC	GGC	S	G	153
10	GAA	AAA	E	K	190
13	CGC	CAC	R	H	172
16	ATG	ATA	M	I	31
23	GTG	ATG	V	M	83
25	CTA	ATA	L	I	200
40	GCA	GTA	A	V	211
44	ACG	ATG	T	M	22

46 зразків з унікальними мовчазними мутаціями ростили в струшуваних колбах об'ємом 250 мл. Проводили кількісне визначення прояснених лізатів з використанням Bio-Rad Protein Analysis (Bio-Rad, Hercules, CA, за каталогом № 500-0006) на основі способу Бредфорда і потім нормалізували стосовно експресії загального білка. Експресію аналізували за допомогою SDS-PAGE.

Батьківський білок (SEQ ID NO:2 з мутаціями D61E, R72K і V163R), негативний контроль і кращі 4 хіти з мовчазними мутаціями експресували в масштабі 1 л. Кожен зразок лізували за допомогою мікрофлюїдазера або в присутності детергенту BPER. Визначення концентрації білка проводили для неочищених і прояснених лізатів з використанням Bio-Rad Protein Analysis (Bio-Rad, Hercules, CA, за каталогом № 500-0006) на основі способу Бредфорда. Потім на кожному доріжку SDS-PAGE гелю завантажували рівну кількість загального білка. Схожі рівні пальмітази спостерігали при всіх протестованих умовах розчинення і лізису. Хіти з мовчазними мутаціями 26, 34, 35 і 37 (таблиці 22 і 23, вище) показували більш високу процентну частку експресії пальмітази в порівнянні з батьківським білком (SEQ ID NO:2 з мутаціями D61E, R72K і V163R). Хіт з мовчазною мутацією 35 мав найвищу процентну частку експресії пальмітази. Хіт з мовчазною мутацією 35 містив наступні сім мовчазних мутацій у порівнянні з батьківським білком: (GCG)35(GCT), (GTG)102(GTT), (AGC)108(AGT), (CTG)117(CTT), (CGG)126(AGG), (AGT)133(TCT) і (ACC)188(ACG).

Приклад 12: Зразкова еволюція для підвищення експресії термостабільних пальмітаз

Для оцінки експресії 9 придатних лідируючих термостабільних пальмітаз (приклад 10, таблиці 15, 16 і 17), кращі 7 мовчазних мутацій (приклад 11) вводили в кожен термостабільну лідируючу пальмітазу, як описано нижче. У результаті кожна термостабільна лідируюча пальмітаза (хіти теплової стійкості 29, 40, 41, 74, 81, 202, 204, 238 і 244) містила наступні мовчазні мутації: 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT, 188ACG, введені в кожен з них. Кожну термостабільну лідируючу пальмітазу з введеними мовчазними мутаціями перейменовували шляхом додавання "SM" після номера термостабільного хіта. Наприклад, термостабільний хіт 29 із введеними мовчазними мутаціями перейменовували в "29 SM". Подібним чином, хіт 40 перейменовували в "40 SM", хіт 41 перейменовували в "41 SM", хіт 74 перейменовували в "74 SM", хіт 81 перейменовували в "81 SM", хіт 202 перейменовували в "202 SM", хіт 204 перейменовували в "204 SM", хіт 238 перейменовували в "238 SM", а хіт 244 перейменовували в "244 SM".

Для того, щоб ввести кращі 7 мовчазних мутацій у 9 лідируючих термостабільних пальмітаз, використовували технологію TMCA, як описано в публікації PCT № WO 2009/018449 і додатково описано нижче.

Для першого раунду еволюції TMCA кращі 9 лідируючих термостабільних пальмітаз і лідируючий експресійний хіт (хіт з мовчазною мутацією № 35) пасивували за допомогою компетентних клітин E. coli XL1-Blue для того, щоб метилювати ДНК. Хіт з мовчазною мутацією № 35 використовували як ДНК-матрицю. Олігонуклеотиди, перераховані нижче в таблиці 24, використовували для введення сполучень мутацій у ДНК-матрицю.

Таблиця 24

Назва олігонуклеотиду	Послідовність олігонуклеотиду 5'-3'
1-ForJC	TGGTGTGCGCCGCTTCTGTGTGACGACAACGCCACCTCGGT (SEQ ID NO:62)
2-ForJC	TTCGTGGCGACCTCGTGGACTATCTGGTCGACCGGCTGCGG (SEQ ID NO:63)
2-Alt-ForJC	TCGGCATTCGTGGCGACCTCATGGACTATCTGGTCGACCGGCTGCGG (SEQ ID NO:64)
3-ForJC	CTGGTCGACCGGCTGCGGGCTGTGTGCAAGGCGGCGGTGGTCAGAAG (SEQ ID NO:65)
4-RevJC	TCGGGCGCCTTGTGGCCAAGAATGCGCGCATAGAGGCCGCCGA (SEQ ID NO:66)
4-Alt-RevJC	TCGGGCGCCTTGTGGCCAAGAATTGCGCGCATAGAGGCCGCCGA (SEQ ID NO:67)
4-Alt2-RevJC	TCGGGCGCCTTGTGGCCAAGAAGGCGCGCATAGAGGCCGCCGA (SEQ ID NO:68)
5-RevJC	cGGCTTAATCTGGAAATCCCGACCGATCGGCAGGTTGTGACCG (SEQ ID NO:69)
6-RevJC	GGCGACCACACCGCGATGGTATGCACCGGCGGCTTAATCTGGA (SEQ ID NO:70)
7-RevJC	TTGGGCTCGAGTCAGAGCCGAGACGCGACCGAGCCGGACCACAG (SEQ ID NO:71)

Зразки ампліфікували у векторі pDOW-Kan, аналізували в агарозному гелі й обробляли з використанням DpnI. Зразки трансформували в компетентні клітини E. coli XL1-Blue. Колонії збирали, ростили і секвенували. За допомогою секвенування ідентифікували кілька сполучень мутацій. Однак деякі сполучення були представлені в недостатній мірі. Отже, для наступного раунду еволюції TMCA для застосування як матриці відбирали деякі нові конструкції з першого раунду еволюції TMCA. Використані матриці перераховані нижче в таблиці 25.

Таблиця 25

Назва матриці	Амінокислоти з бажаними мутаціями
F8	48, 92, 95, 162, 172
H10	48, 116L, 162, 172
A8	85, 92, 95
C11	116N, 172

- Сполучення матриць і олігонуклеотидів, використані в другому раунді еволюції TMCA, перераховані нижче в таблиці 26. Для кожного рядка в таблиці 26А проводили окрему реакцію
- 5 TMCA і створювали окрему бібліотеку для кожного рядка. Наприклад, один цикл складався з матриці F8 і праймерів 2For і 7Rev. Другий цикл складався з матриці F8 і праймерів 2For і 6 Rev. Слід зазначити, що використовували декілька тих же праймерів, що й у першому раунді. Два додаткові праймери призначені для другого раунду ПЛР. Ці олігонуклеотиди мають назви 116LF і 162F. Олігонуклеотид 116LF містить зворотну і комплементарну олігонуклеотиду 4-Alt2-RevJC
- 10 послідовність. Олігонуклеотид 162F містить зворотну і комплементарну олігонуклеотиду 5-RevJC послідовність.

Таблиця 26

Матриця для другого раунду TMCA	Амінокислоти для додавання у другому раунді TMCA	Праймери для другого раунду TMCA
F8	85, 225	2For і 7Rev
F8	85	2For і 6Rev
H10	85, 225	2For і 7Rev
Хіт з мовчазною мутацією № 35	83, 85, 172	2Alt і 6REV
A8	116L, 172, 225	116L F і 6Rev і 7Rev
C11	85, 162, 225	2For і 5Rev і 7Rev
Хіт з мовчазною мутацією № 35	85, 116, 162, 172	2For, 4Rev, 5Rev, 6Rev
Хіт з мовчазною мутацією № 35	85, 162	2For і 5Rev
C11	162	162F і 5Rev

- Зразки ампліфікували у векторі pDOW-Kan, аналізували в агарозному гелі й обробляли з використанням DpnI. Зразки трансформували в компетентні клітини E. coli XL1-Blue. Колонії збирали, ростили і секвенували. За допомогою секвенування встановили, що 7 з 9 бажаних конструкцій представлені в достатньо високій кількості. Однак оскільки інші дві конструкції представлені в недостатній мірі, то був потрібний додатковий раунд еволюції TMCA для одержання інших лідируючих термостабільних пальмітаз у сполученні з сімома мовчазними
- 20 мутаціями. Для третього раунду еволюції TMCA як матриці використовували дві нові конструкції. Ці матриці перераховані нижче в таблиці 27. Сполучення матриць і олігонуклеотидів, використаних у третьому раунді, перераховані нижче в таблиці 28. Для кожного рядка в таблиці 28А проводили окремі реакції TMCA і створювали для кожного рядка окрему бібліотеку. Наприклад, один цикл складався з матриці F3 і праймерів 162F і 7Rev. Другий цикл складався з
- 25 матриці B5 і праймерів 162F і 6Rev.

Таблиця 27

Назва матриці	Амінокислоти з бажаними мутаціями
F3	85, 116N, 172
B5	85, 116I, 162

Таблиця 28

Матриця для третього раунду TMCA	Амінокислоти для додавання в третьому раунді TMCA	Праймери для використання в третьому раунді TMCA
F3	162, 225	162F і 7Rev
B5	172	162F і 6Rev

Зразки ампліфікували у векторі pDOW-Kan, аналізували в агарозному гелі і обробляли з використанням DpnI. Зразки трансформували в компетентні клітини E. coli XL1-Blue.

Колонії збирали, ростили і секвенували. Добилися представлення інших двох конструкцій в достатній кількості. ДНК для всіх бажаних конструкцій E. coli XL1-Blue одержували і трансформували в компетентні клітини Pseudomonas fluorescens. Клітини ростили в середовищі LB з додаванням урацилу (750 нг/мл) і канаміцину (50 мкг/мл). Зразки підтверджували секвенуванням.

Для скринінгу бібліотеку ростили в мінімальному середовищі M9 з додаванням урацилу (750 нг/мл) і канаміцину (50 нг/мл). Стандартні аналізи з олією проводили за допомогою завантаження прояснених лізатів при вмісті води 10% з використанням фосфатного буфера в аналізі з нерафінованою олією при рівнях активності стосовно УМБ-пальмітату, перерахованих в лівій колонці таблиці 29. Аналізи з олією завантажували, гомогенізували і надалі безперервно змішували, як для стандартних реакцій, при температурі 25 °C, 45 °C і 60 °C. Аліквоти 11% NaOH по 50 мкл додавали через 3 і 20 год. для кожної надалі гомогенізованої реакції з олією. Аліквоти брали через 20, 44 і 68 год. і піддавали стандартній екстракції хлороформом:метанолом і загальному метанолізу з подальшим аналізом СМЕЖК за допомогою ГХ (як описано вище в прикладі 8). Для кожної аліквоти в таблиці 29 наведений вміст пальмітату, що залишився в олії. Термостабільний хіт з мовчазною мутацією 29 SM кардинально знижував вміст пальмітату протягом всього часу аналізу при 25 °C (таблиця 29).

Таблиця 29

УМБ активність	Фермент	Пальмітат 20 год. (50 мкл луку через 3 год.)			Пальмітат 44 год. (лук через 3 год. і 20 год.)			Пальмітат 68 год. (лук через 3 год. і 20 год.)		
		25 °C	45 °C	60 °C	25 °C	45 °C	60 °C	25 °C	45 °C	60 °C
0	Негативний	10,6%	10,6%	10,7%	10,7%	10,6%	10,6%	10,6%	10,6%	10,6%
3,2	Батьківський фермент	6,6%	7,0%	9,1%	5,5%	7,0%	8,9%	5,4%	7,0%	9,0%
10,8	29 SM	4,5%	5,1%	6,3%	3,3%	4,8%	6,3%	2,8%	5,0%	6,3%
1,1	40 SM	10,3%	9,9%	8,8%	10,1%	7,9%	8,7%	9,3%	7,1%	8,7%
1,1	41 SM	10,3%	10,1%	8,1%	10,2%	8,4%	7,9%	9,6%	7,5%	7,9%
11,8	74 SM	8,2%	5,3%	7,2%	5,0%	4,4%	7,4%	3,0%	4,4%	7,6%
7,2	81 SM	10,2%	9,2%	7,2%	9,2%	6,7%	6,7%	6,6%	5,7%	6,6%
3,7	202 SM	9,7%	6,6%	7,6%	7,8%	5,3%	7,6%	5,3%	5,1%	
9,1	204 SM	10,2%	8,6%	7,3%	8,9%	6,3%	7,4%	9,6%	5,9%	7,4%
4,7	238 SM	9,9%	8,1%	6,7%	7,6%	6,0%	6,5%	5,0%	5,9%	6,5%
3,7	244 SM	9,7%	8,3%	8,1%	7,3%	6,1%	8,1%	5,3%	6,2%	8,1%

Приклад 13: Калієва сіль олеїнової кислоти як емульгатор дозволяє ферменту створювати олію з вмістом пальмітату 1%

Зразки олії інкубували з 10% олеатом калію для оцінки впливу цього емульгатора на реакції олії з пальмітазою. В аналізи з попередньо обробленою олією (A і B) і нерафінованою олією (C) завантажували прояснені лізати хіта 29 SM або негативний контроль при вмісті води 5%. Попередню обробку здійснювали за допомогою ферментативної обробки, нагрівання, центрифугування, а потім фільтрування олії для видалення смоли і водної фази і для зниження вмісту вільних жирних кислот, як описано в прикладі 14, для створення олії, що не містить смоли, з вмістом пальмітату менше 5%. Олію гомогенізували до і після додавання ферменту, щоб забезпечити гомогенність емульсії. У 5 г олії відважували 0,5 г калієвої солі олеїнової кислоти, одержаної в комерційному джерелі, перемішували при 60 °C для розчинення, а потім гомогенізували. Лужну добавку для нейтралізації 1% FFA додавали в реакції, позначені як "лук". В аналізи з олією завантажували фермент, повторно гомогенізували і надалі безупинно змішували як для стандартних реакцій. Через 3, 24, 48, 72 і 120 год. брали аліквоти. Аліквоти піддавали екстракції хлороформом:метанолом і загальному метанолізу з наступним аналізом СМЕЖК за допомогою ГХ (як описано вище в прикладі 8). Для кожної аліквоти пальмітат, що залишився в олії, наведений нижче в таблиці 30. У попередньо оброблених оліях рівень пальмітату успішно знизили до 1%.

Таблиця 30

		Пальмітат				
A	Олія із вмістом пальмітату 3,7%	3 год.	24 год.	48 год.		
	Фермент	3,4%	3,2%	3,1%		
	Олеат+фермент	2,3%	1,2%	1,2%		
	Олеат+луг+фермент	2,3%	1,1%	1,2%		
	Олеат+луг (аналіз з негативним контролем)	3,4%	3,3%	3,3%		
B	Олія із вмістом пальмітату 4,5%	3 год.	24 год.			
	Олеат+фермент	4,2%	1,1%	1,0%		
	Олеат (аналіз з негативним контролем)	7,0%	6,7%	6,9%		
C	Нерафінована олія	3 год.	24 год.	48 год.	72 год.	120 год.
	Фермент	7,9%	4,9%	4,7%	4,6%	5,4%
	Олеат+фермент	10,0%	7,9%	6,6%	5,5%	3,9%
	Олеат+луг+фермент	10,7%	10,4%	10,6%	10,5%	10,4%
	Олеат+луг (аналіз з негативним контролем)	10,7%	10,6%	10,6%	10,5%	10,5%

Приклад 14: використання проміжного центрифугування і емульсифікації олеатом дозволяє одержати олію з вмістом пальмітату 1% у 2 кг масштабі

- 5 Комбінований вплив поліпептиду, проміжної стадії фільтрування і додавання олеату калію для одержання олії з вмістом пальмітату 1% оцінювали в лабораторному масштабі. Проводили реакцію 2 кг нерафінованої олії з 29 SM при вмісті води 5%. Реакційну суміш з олією гомогенізували протягом 1 хвилини за допомогою ІКА на 6-й швидкості, досягаючи температури 25 °С. Навісний змішувач обладнали лопаткою змішувача для фарби і перемішували реакційну
- 10 суміш з олією зі швидкістю 390 об./хв. Після протікання реакції протягом 1 год. швидкість змішування збільшували до 530 об./хв. Стежили за температурою реакційної суміші, що коливалася від 21 °С до 29 °С, при періодичному нагріванні за допомогою нагрівального блока. Зразки брали, щоб стежити за змінами в профілі олії. Після 28 год. реакційну суміш з олією нагрівали до 66 °С і центрифугували в гіротестері. Фракцію олії охолоджували до кімнатної
- 15 температури протягом ночі при перемішуванні мішалкою, потім охолоджували в льодяній ванні менше ніж до 10 °С. Додавали діатомову землю і відділяли ТАГ і ДАГ від вільних жирних кислот за допомогою фільтрування через охолоджену бюхнерівську лійку з ватманським папером.

- 1 кг цієї олії зі зниженим вмістом пальмітату використовували для ініціації реакцій, використовуючи олеат калію як емульгатор. В олію додавали 100 г олеату калію. Реакційні суміші нагрівали до 60 °С при перемішуванні, щоб забезпечити розчинність. Олію охолоджували до 23 °С, потім додавали 50 мл ферменту для досягнення вмісту води 5%. Цю олію гомогенізували до і після додавання ферменту 29 SM, щоб забезпечити рівномірні емульсії. Аліквоти брали через 6, 21, 24, 28 год., після фільтрування, після додавання олеату, після початку нового аналізу і через 3, 20, і 22 год. у другому аналізі. Аліквоти піддавали стандартній
- 20 екстракції хлороформом:метанолом і загальному метанолізу з наступним аналізом СМЕЖК за допомогою ГХ (як описано вище в прикладі 8). Жирні кислоти, що залишилися зв'язаними з олією, перераховані для кожної аліквоти нижче в таблиці 31. Хіт 29 SM здатний знижувати вміст пальмітату в олії до 1%.
- 25

Таблиця 31

	Пальмітат	Стеарат	Олеат	Лінолеат	Ліноленат
Олія	10,7%	4,8%	23,2%	52,9%	8,4%
6 год.	7,5%	4,7%	23,7%	55,4%	8,7%
21 год.	5,0%	4,7%	24,2%	57,5%	8,7%
24 год.	4,9%	4,7%	24,2%	57,6%	8,7%
28 год.	4,7%	4,6%	24,2%	57,9%	8,6%
Фільтрована олія	4,8%	4,6%	24,2%	57,8%	8,6%
Олія+олеат	4,9%	4,6%	24,2%	57,7%	8,6%
+0 год.	4,7%	4,6%	24,2%	57,9%	8,5%
+3 год.	2,6%	4,6%	24,5%	59,9%	8,4%
+20 год.	1,0%	4,3%	24,4%	62,7%	7,7%
+22 год.	1,0%	4,2%	24,3%	62,8%	7,6%

Приклад 15: Подвійне центрифугування і фільтрування дають олію з низьким вмістом пальмітату

- 5 Нижче продемонстрована здатність відділяти олеат калію після реакцій з олією. Проводили реакцію 2 кг нерафінованої олії і 29 SM при вмісті води 5%. Реакційну суміш з олією гомогенізували протягом 1 хвилини за допомогою ІКА на 6-й швидкості, досягаючи температури 25 °С. Навісний змішувач обладнали лопаткою змішувача для фарби і перемішували реакційну суміш з олією зі швидкістю 390 об./хв. Після протікання реакції протягом 1 год. швидкість
- 10 змішування збільшували до 530 об./хв. Стежили за температурою реакційної суміші, що коливалася від 21 °С до 29 °С, при періодичному нагріванні за допомогою нагрівального блока. Зразки брали, щоб стежити за змінами в профілі олії. Після 28 год. реакційну суміш з олією нагрівали до 80 °С і центрифугували в гіротестері. Фракцію олії охолоджували до кімнатної температури протягом ночі при перемішуванні мішалкою, потім охолоджували в льодяній ванні
- 15 менше ніж до 10 °С. Додавали діатомову землю і відділяли ТАГ і ДАГ від вільних жирних кислот за допомогою фільтрування через охолоджену бюхнерівську лійку з ватманським папером. 1 кг цієї обробленої олії використовували для ініціації реакцій, використовуючи олеат калію як емульгатор. В олію додавали 50 г олеату калію для досягнення 5%, перемішували і гомогенізували. 50 мл ферменту завантажували, щоб досягти вмісту води 5%, і гомогенізували
- 20 протягом 1 хвилини за допомогою ІКА на 6-й швидкості, досягаючи температури 26,6 °С. Цю реакційну суміш з олією перемішували з використанням навісного змішувача, обладнаного лопаткою змішувача для фарби, на швидкості 400 об./хв. Використовували періодичне нагрівання нагрівальним блоком. Аліквоти брали через 3, 20, 24 і через 8, 28 і 48 годин після початку другого аналізу. Аліквоти піддавали стандартній екстракції хлороформом:метанолом і загальному метанолізу з наступним аналізом СМЕЖК за допомогою ГХ (як описано вище в прикладі 8). Жирні кислоти, що залишилися зв'язаними в олії, перераховані для кожної аліквоти
- 25 нижче в таблиці 32. 29 SM знижував вміст пальмітату до 1,5%. Цю олію нагрівали до 85 °С і центрифугували для видалення залишків білків. Фракцію олії охолоджували до 6 °С при перемішуванні мішалкою, додавали діатомову землю і речовину розділяли на бюхнерівській лійці. Фільтрування продовжували при температурі 25 °С.
- 30

Таблиця 32

	Пальмітат	Стеарат	Олеат	Лінолеат	Ліноленат
Олія	10,7%	4,8%	23,2%	52,9%	8,4%
3 год.	8,3%	4,7%	23,5%	54,8%	8,7%
20 год.	4,9%	4,7%	24,3%	57,4%	8,7%
24 год.	4,7%	4,6%	24,1%	57,9%	8,7%
+8 год.	3,2%	4,6%	24,4%	59,3%	8,5%
+28 год.	1,9%	4,5%	24,4%	60,9%	8,3%
+48 год.	1,5%	4,4%	24,5%	61,5%	8,1%

Приклад 16: Оптимізація кодонів

- 35 Версії з оптимізованими кодонами для експресії в *Pseudomonas fluorescens* лідируючого термостабільного хіта з мовчазною мутацією 29 SM (приклад 12) конструювали двома різними

способами. У першій версії з оптимізованими кодонами заміняли всі кодони в хіті 29 SM на кодони, переважні для *Pseudomonas fluorescens*, включаючи введені кращі 7 мовчазних мутацій (приклад 12). Цю версію назвали 29 SM-Pf (SEQ ID NO:22). Переважну частоту використання кодонів для *Pseudomonas fluorescens* визначали по огляду Бази даних про частоту використання кодонів, доступної в режимі он-лайн на веб-сайті Kazusa DNA Research Institute (2-6-7 Kazusa-kamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818 JAPAN, одержана в 2009 з Інтернету <URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>>). Зокрема, у конструюванні послідовності з оптимізованими кодонами SEQ ID NO:22 використовували патерни частот використання кодонів для *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 (одержана в 2009 з Інтернету <URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgUbin/showcodon.cgi?species=205922>>) і *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (одержана в 2009 з Інтернету <URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=220664>>).

В другій версії з оптимізованими кодонами також заміняли всі кодони в хіті 29 SM на кодони, переважні для *Pseudomonas fluorescens*, за винятком того, що зберегли 7 лідируючих мовчазних мутацій (приклад 11). Цю версію назвали 29 SM-Pf+SM (SEQ ID NO:23). 29 SM-Pf+SM (SEQ ID NO:23) є більш переважним кандидатом у порівнянні з 29 SM-Pf (SEQ ID NO:22).

SEQ ID NO:22:

```
ATGCTCAAGCCCCACCTTACGGCCGTCTGCTCCGCGAACTGGCTGATATCCC,
GGCGATCGTGACTGCTCCGTTCCGCGGCGCAGCCAAAATGGGCAAACCTGGCA,
GATGGCGAGCCGGTACTGGTGCTGCCCGGCTTCCTGGCGGACGACAACGCGA,
CCAGCGTGCTGCGGAAGACCTTCGAGGTGCGCCGGCTTTGCGTGCAGCGGCTG,
GGAAGAGGGCTTCAACCTCGGCATTCTGCGGACCTCATGGAACCTGCTGTCG,
ACCGCCTGCGCGCCGTGAGCGAGGCGCGGGGGGGCAGAAGGTAATCGTGG,
TCGGCTGGTCCCTCGGCGGCCTCTACGCCCGGGAGTTGGGCCACAAGGCCCC,
CGAACTGATCCGTATGGTCGTACGCTCGGCTCCCCGTTTCGCCGCGCACCTCC,
ACGCGAACCATGCCTGGAAGATCTACGAGGCCATCAACTCCCACACGGTTCGAC,
AACCTGCCGATCCCGCGCGATTTCAGATTAAGCCGCCGGTGCATACCATCGC,
CGTGTGGAGCCCGCTCGACGGGGTGGTGGCCCCGGAGACGAGCGAAGGCAG,
CCCCGAGCAGAGCGACGAGCGCTTGGAGCTGGCCGTGACCCACATGGGCTTT,
GCGGCTAGCAAGACCGGGGCGGAGGCACTGGTCCGCCTGGTCGCCGCCCGC,
CTCTGA;
```

SEQ ID NO:23:

```
ATGCTCAAGCCCCACCTTACGGCCGTCTGCTCCGCGAACTGGCTGATATCCC,
GGCGATCGTGACTGCTCCGTTCCGCGGCGCAGCCAAAATGGGCAAACCTGGCT,
GATGGCGAGCCGGTACTGGTGCTGCCCGGCTTCCTGGCGGACGACAACGCGA,
CCAGCGTGCTGCGGAAGACCTTCGAGGTGCGCCGGCTTTGCGTGCAGCGGCTG,
GGAAGAGGGCTTCAACCTCGGCATTCTGCGGACCTCATGGAACCTGCTGTCG,
ACCGCCTGCGCGCCGTGAGCGAGGCGCGGGGGGGCAGAAGGTTATCGTGG,
TCGGCTGGAGTCTCGGCGGCCTCTACGCCCGGGAGCTTGGGCCACAAGGCCCC,
CGAACTGATCAGGATGGTCGTACGCTCGGCTCTCCGTTTCGCCGCGCACCTCC,
ACGCGAACCATGCCTGGAAGATCTACGAGGCCATCAACTCCCACACGGTTCGAC,
AACCTGCCGATCCCGCGCGATTTCAGATTAAGCCGCCGGTGCATACCATCGC,
CGTGTGGAGCCCGCTCGACGGGGTGGTGGCCCCGGAGACGAGCGAAGGCAG,
CCCCGAGCAGAGCGACGAGCGCTTGGAGCTGGCCGTGACCCACATGGGCTTT,
GCGGCTAGCAAGACCGGGGCGGAGGCACTGGTCCGCCTGGTCGCCGCCCGC,
CTCTGA.
```

Послідовності обох версій з оптимізованими кодонами відсилали в DNA 2.0 Incorporated (Menlo Park, CA) для синтезу ДНК. Гени синтезували у векторі pJ201 з ділянками рестрикції SpeI і XhoI по обидва боки гена. Після доставки синтезованих генів плазміді різали рестрикційними ферментами. ДНК вектора pDOW-Kap також різали тими ж рестрикційними ферментами і потім обробляли лужною фосфатазою з кишечнику теляти (New England Biolabs, № продукту M0290L). Усі зразки очищали в гелі й екстрагували з використанням QIAquick gel extraction kit (Qiagen, № продукту 28706). Потім вектор і вставки лігували з використанням Roche Rapid Ligation kit (Roche, № продукту 11635379001). Потім продукти лігування трансформували в компетентні клітини *E. coli* XL1-Blue. Колонії збирали, ростили й одержували ДНК із використанням Qiagen mini-prep kit. Підтверджували послідовності зразків ДНК, а потім використовували ДНК для трансформації *Pseudomonas fluorescens*.

Потім 29 SM-Pf (SEQ ID NO:22), 29 SM-Pf+SM (SEQ ID NO:23), 29 SM, батьківську послідовність (SEQ ID NO:2 з мутаціями D61E, R72K і V163R) і організм-хазяїн/векторний контроль ростили і індукували в 250 мл струшуваних колбах. Концентрацію в прояснених

лізатах визначали з використанням Bio-Rad Protein Analysis (Bio-Rad, Hercules, CA, за каталогом № 500-0006) на основі способу Бредфорда, а потім нормалізували по експресії загального білка. Експресію аналізували за допомогою SDS-PAGE, причому на кожну доріжку гелю SDS-PAGE завантажували рівну кількість загального білка. 29 SM-Pf і 29 SM-Pf+SM мали більшу

5 процентну частку експресованого білка пальмітази в порівнянні з 29 SM і батьківським білком. 29 SM-Pf+SM мав злегка підвищену процентну частку експресії пальмітази, ніж 29 SM-Pf. Отже, у присутності мовчазних мутацій удосконалення експресії виражене дещо більше.

Описано багато варіантів здійснення винаходу. Проте, варто розуміти, що можна виконати різні модифікації, не відступаючи від суті й обсягу винаходу. Таким чином, інші варіанти

10 здійснення входять в обсяг наступної формули винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб гідролізу олії або жиру, який включає стадії:

15 (a) одержання композиції, що містить олію або жир, де олію або жир можна гідролізувати за допомогою поліпептиду, який має гідролазну активність, зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, які мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або

i) кодується або

20 (1) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти, або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

25 (2) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується при суворих умовах з нуклеїновою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або

30 ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, або

35 iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх сполучення, або

40 iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;

(b) додавання поліпептиду зі стадії (a) у композицію, що містить зазначену олію або жир, у достатній кількості й у достатніх умовах для того, щоб викликати гідроліз олії або жиру, за допомогою чого гідролізують олію або жир.

2. Спосіб за п. 1, де зазначена гідролізована олія або жир має знижений вміст насичених жирних кислот стосовно зазначеної олії або жиру перед гідролізом.

3. Спосіб за п. 1 або 2, де зазначена гідролізована олія або жир має знижений вміст транс-ізомерів жирних кислот стосовно зазначеної олії або жиру перед гідролізом.

4. Спосіб за п. 1 або 2, де зазначена олія або жир містить олію водоростей, тваринний жир, рослинну олію, олію, що має змінений склад жирних кислот, олію з низьким вмістом насичених

50 жирних кислот, риб'ячий жир або їх сполучення.

5. Спосіб за п. 4, де зазначена олія включає олію *Neochloris oleoabundans*, олію *Scenedesmus dimorphus*, олію *Euglena gracilis*, олію *Phaeodactylum tricomutum*, олію *Pleurochrysis carterae*, олію *Prymnesium parvum*, олію *Tetraselmis chui*, олію *Tetraselmis suecica*, олію *Isochrysis galbana*, олію *Nannochloropsis salina*, олію *Botryococcus braunii*, олію *Dunaliella tertiolecta*, олію видів

55 *Nannochloris*, олію видів *Spirulina*, олію *Chlorophyceae*, олію *Bacilliarophy*, олію канולי, рицинову олію, кокосову олію, коріандрову олію, кукурудзяну олію, бавовняну олію, олію лісового горіха, олії інших горіхів, конопельну олію, лляну олію, олію пінника лугового, маслинову олію, пальмову олію, кісточкову пальмову олію, арахісову олію, рапсову олію, рисову олію, сафлорову олію, олію сасанкви, сезамову олію, соєву олію, олію соняшника, талову олію,

олію цубаки, сало, лярд, жир коров'ячого масла, курячий жир або суміш з будь-яких зазначених жирів або олій.

6. Спосіб за п. 4, де змінена жирна кислота включає олію з високим вмістом олеїнової кислоти, олію з низьким вмістом ліноленої кислоти або їх сполучення.

5 7. Спосіб за п. 4, де олія з низьким вмістом насичених жирних кислот включає олію каноли з високим вмістом олеїнової кислоти, соєву олію з низьким вмістом ліноленої кислоти, олію соняшника з високим вмістом стеаринової кислоти або їх сполучення.

8. Спосіб за п. 4, де риб'ячий жир включає жир тихоокеанського талеїхти, жир печінки тріски, жир хоплостета, жир сардини, жир оселедця, жир менхадена або їх сполучення.

10 9. Спосіб за п. 1, де зазначені жири або олії містять молекули, що містять триацилгліцеридний кістяк, і де в ході зазначеного гідролізу жирні кислоти видаляються щонайменше з деяких триацилгліцеридних кістяків.

10. Спосіб за п. 9, де зазначені жирні кислоти містять одну або декілька кислот з числа оцтової, масляної, капронової, каприлової, ундеканової, лауринової, міристинової, пентадеканової, пальмітинової, маргаринової, стеаринової, арахінової або бегенової кислоти.

15 11. Спосіб за п. 9, де зазначені жирні кислоти вибірково видаляються з положень Sn1, Sn2 або Sn3 на триацилгліцеридному кістяку.

12. Спосіб за п. 1, де зазначені олії або жири присутні у кормі або продукті харчування, і зазначений гідроліз виконують до вживання зазначеного корму або продукту харчування твариною або індивідумом.

20 13. Спосіб за п. 1, де зазначена олія або жир містить одну або декілька речовин із триацилгліцерину, діацилгліцерину або моноацилгліцерину, і де зазначений поліпептид зі стадії (а) приводять у контакт із зазначеною олією або жиром в умовах, у яких зазначений поліпептид гідролізує один або декілька зазначених триацилгліцеринів, діацилгліцеринів або моноацилгліцеринів.

25 14. Спосіб за п. 13, де зазначений гідроліз веде до зниження кількості триацилгліцерину, діацилгліцерину або моноацилгліцерину в композиції.

15. Спосіб за п. 1, де олія або жир містить гліцериновий ефір поліненасиченої жирної кислоти.

30 16. Спосіб за п. 1, де зазначена гідролізована олія або жир містить будь-яку одну або декілька речовин з олії або жиру з низьким вмістом насичених жирних кислот, олії або жиру, що не містить транс-ізомери жирних кислот, ліпиду, що містить незамінні жирні кислоти, ліпиду, що містить мононенасичені жирні кислоти, ліпиду, що містить фосфохолін, ліпиду, що містить фосфосерин, ліпиду, що містить фітостерол, 1,3-діацилгліцериду, 2-моноацилгліцериду і триацилгліцериду.

35 17. Спосіб за п. 1, де зазначена композиція включає дієтичну композицію на основі молока або на рослинній основі, де поліпептид може гідролізувати олію або жир у композиції, за допомогою чого знижувати в ній вміст жиру.

18. Спосіб біокаталітичного синтезу структурованого ліпиду, який включає наступні стадії:

40 (а) одержання поліпептиду, який має гідролазну активність, причому зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, які мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або

i) кодується або

45 (1) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

50 (2) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується в суворих умовах з нуклеїновою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або

55 ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і містить зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, або

iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх сполучення, або

- iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх сполучення;
- 5 (b) одержання композиції, що містить триацилгліцерид (ТАГ);
- (c) приведення поліпептиду зі стадії (a) у контакт із композицією зі стадії (b) в умовах, у яких поліпептид гідролітично відщеплює залишок карбонової кислоти в положенні Sn2 триацилгліцериду (ТАГ), за допомогою чого одержують 1,3-діацилгліцерид (ДАГ);
- (d) одержання R1-складного ефіру;
- 10 (e) одержання R1-специфічної гідролази, і
- (f) приведення 1,3-ДАГ зі стадії (c) у контакт із R1-складним ефіром зі стадії (d) і R1-специфічною гідролазою зі стадії (e) в умовах, у яких R1-специфічна гідролаза каталізує етерифікацію положення Sn2, за допомогою чого одержують структурований ліпід.
19. Спосіб за п. 18, де R1-специфічна гідролаза являє собою Sn2-специфічну ліпазу.
- 15 20. Спосіб за п. 18, де структурований ліпід вибраний із групи, що складається з альтернативи масла какао (CBA), синтетичного масла какао, натурального масла какао, 1,3-дипальмітоїл-2-олеоїлгліцерину (POP), 1,3-дистеароїл-2-олеоїлгліцерину (SOS), 1-пальмітоїл-2-олеоїл-3-стеароїлгліцерину (POS) і 1-олеоїл-2,3-диміристоїлгліцерину (OMM).
21. Спосіб за п. 18, де зазначений R1-складний ефір містить менш насичену жирну кислоту, ніж зазначений гідролітично відщеплений залишок карбонової кислоти.
- 20 22. Спосіб за п. 18, де зазначений R1-складний ефір може містити одну або декілька речовин з омега-3 жирної кислоти, омега-6 жирної кислоти, омега-9 жирної кислоти, мононенасиченої жирної кислоти, фосфогрупи, складного ефіру фітостерину або оризанолу.
23. Спосіб за п. 18, де зазначений R1-складний ефір містить фрагмент, вибраний із групи, що складається з α -ліноленової кислоти, стеаридонової кислоти, ейкозапентаєнової кислоти, докозагексаєнової кислоти, γ -ліноленової кислоти, дигомо- γ -ліноленової кислоти, арахідонової кислоти, олеїнової кислоти, пальмолеїнової кислоти, холіну, серину, β -ситостерину, куместролу і діетилстильбестролу.
- 25 24. Спосіб за п. 18, де зазначений синтезований структурований ліпід має знижений вміст насичених жирних кислот стосовно зазначеного триацилгліцериду.
- 30 25. Спосіб за п. 18, де зазначений синтезований структурований ліпід має знижений вміст транс-ізомерів жирних кислот стосовно зазначеного триацилгліцериду.
26. Спосіб біокаталітичного синтезу структурованого ліпиду, який включає наступні стадії:
- (a) одержання поліпептиду, який має гідролазну активність, зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, які мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або
- 35 i) кодується або
- (1) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або
- 40 (2) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується при суворих умовах з нуклеїновою кислотою, яка включає SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або
- 45 ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, або
- 50 iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або
- 55 iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх сполучення;
- (b) одержання композиції, що містить триацилгліцерид (ТАГ);

(с) приведення поліпептиду зі стадії (а) у контакт із композицією зі стадії (b) в умовах, у яких поліпептид гідролітично відщеплює залишок карбонової кислоти в положенні Sn1 або Sn3 триацилгліцериду (ТАГ), за допомогою чого одержують 1,2-ДАГ або 2,3-ДАГ; і

5 (d) промотування перегрупування залишку карбонової кислоти в 1,2-ДАГ або 2,3-ДАГ зі стадії (с) у кінетично контрольованих умовах, за допомогою чого одержують 1,3-ДАГ.

27. Спосіб за п. 26, який включає додаткову стадію одержання R1-складного ефіру і R1-специфічної ліпази і приведення 1,3-ДАГ зі стадії (d) у контакт із R1-складним ефіром і R1-специфічною ліпазою в умовах, у яких R1-специфічна ліпаза каталізує етерифікацію положення Sn2, за допомогою чого одержують структурований ліпід.

10 28. Спосіб за п. 27, де зазначена R1-специфічна ліпаза являє собою Sn1- або Sn3-специфічну ліпазу.

29. Спосіб за п. 27, де зазначений структурований ліпід вибраний із групи, що складається з альтернативи масла какао (CBA), синтетичного масла какао, натурального масла какао, 1,3-дипальмітоїл-2-олеоїлгліцерину (POP), 1,3-дистеароїл-2-олеоїлгліцерину (SOS), 1-пальмітоїл-2-олеоїл-3-стеароїлгліцерину (POS) або 1-олеоїл-2,3-диміристоїлгліцерину (OMM).

15 30. Спосіб за п. 27, де зазначений R1-складний ефір містить менш насичену жирну кислоту, ніж зазначений гідролітично відщеплений залишок карбонової кислоти.

31. Спосіб за п. 30, де зазначений R1-складний ефір може містити одну або декілька речовин з омега-3 жирної кислоти, омега-6 жирної кислоти, мононенасиченої жирної кислоти, фосфогрупи, складного ефіру фітостерину й оризанолу.

20 32. Спосіб за п. 30, де зазначений R1-складний ефір містить фрагмент, вибраний із групи, що складається з α -ліноленової кислоти, ейкозапентаєнової кислоти, докозагексаєнової кислоти, γ -ліноленової кислоти, дигомо- γ -ліноленової кислоти, арахідонової кислоти, олеїнової кислоти, пальмолеїнової кислоти, холіну, серину, β -ситостерину, куместролу, діетилстильбестролу й оризанолу.

25 33. Спосіб за п. 26, де стадія (d) додатково включає використання іонообмінних смол.

34. Спосіб за п. 26, де зазначені кінетично контрольовані умови на стадії (d) включають нерівноважні умови, які ведуть до утворення кінцевого продукту, що має відношення 1,3-ДАГ до 2,3-ДАГ, яке перевищує 2:1.

30 35. Спосіб за п. 27, де зазначений синтезований структурований ліпід має знижений вміст насичених жирних кислот стосовно зазначеного триацилгліцериду.

36. Спосіб за п. 27, де зазначений синтезований структурований ліпід має знижений вміст транс-ізомерів жирних кислот стосовно зазначеного триацилгліцериду.

35 37. Спосіб каталізу реакції переетерифікації для одержання нових триацилгліцеридів, який включає наступні стадії:

(а) одержання композиції, що містить поліпептид, який має 1,3-специфічну ліпазну активність, зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних або рекомбінантних поліпептидів, які мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або і) кодується або

40 (1) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

45 (2) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується при суворих умовах з нуклеїновою кислотою, яка включає SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або

50 ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, або

55 iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або

60 iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;

(b) одержання суміші триацилгліцеридів і вільних жирних кислот;

(c) обробка композиції зі стадії (b) поліпептидом в умовах, у яких поліпептид може каталізувати обмін вільних жирних кислот і ацильних груп триацилгліцеридів, за допомогою чого одержують нові триацилгліцериди, збагачені зазначеними жирними кислотами.

5 38. Спосіб за п. 37, де зазначена композиція зі стадії (b) містить 1,3-дипальмітоїл-2-монолеїн (POP), і нові триацилгліцериди зі стадії (c) містять одну або дві речовини з 1-пальмітоїл-3-стеароїл-2-монолеїну (POSt) і 1,3-дистеароїл-2-монолеїну (StOSt).

39. Спосіб за п. 37, де зазначені нові триацилгліцериди зі стадії (c) мають знижений вміст насичених жирних кислот стосовно зазначених триацилгліцеридів зі стадії (b).

10 40. Спосіб за п. 37, де зазначені нові триацилгліцериди зі стадії (c) мають знижений вміст транс-ізомерів жирних кислот стосовно зазначених триацилгліцеридів зі стадії (b).

41. Спосіб переетерифікації для одержання продукту харчування, корму або олії, який включає наступні стадії:

15 (a) одержання реакційної суміші для переетерифікації, яка містить речовину джерела стеаринової кислоти, вибрану з групи, що складається зі стеаринової кислоти, складних стеаринових моноефірів низькомолекулярних одноатомних спиртів і їх сумішей,

(b) одержання продукту харчування, корму або олії, що містить триацилгліцерид;

(c) одержання поліпептиду, який має гідролазну активність, зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, які мають

20 гідролазну активність, і зазначений поліпептид або

i) кодується або

(1) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх

25 залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

(2) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується в суворих умовах з нуклеїновою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх

30 залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або

ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх

35 амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, або

iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або

40 iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;

(d) переетерифікація речовини джерела стеаринової кислоти і триацилгліцериду з продукту харчування, корму або олії; і

45 (e) відділення компонентів вільних жирних кислот від переетерифікованих гліцеридних компонентів суміші для переетерифікації, щоб надати переетерифікований продукт олії і суміш жирних кислот, що містить жирні кислоти, складні моноефіри жирних кислот або їх суміші, вивільнені з продукту харчування, корму або олії.

42. Спосіб за п. 41, де зазначену реакцію переетерифікації продовжують до досягнення по суті

50 рівноваги складноефірних груп у положеннях 1 і 3 гліцеридного компонента і компонентів негліцеридних жирних кислот реакційної суміші.

43. Спосіб за п. 41, який включає додаткову стадію гідрогенізації суміші жирних кислот.

44. Спосіб за п. 41, де зазначені переетерифіковані триацилгліцериди мають знижений вміст насичених жирних кислот стосовно зазначених триацилгліцеридів зі стадії (b).

55 45. Спосіб за п. 41, де зазначені переетерифіковані триацилгліцериди мають знижений вміст транс-ізомерів жирних кислот стосовно зазначених триацилгліцеридів зі стадії (b).

323.

46. Спосіб одержання ДАГ, який включає наступні стадії:

(a) одержання композиції олій, що містить деяку кількість ТАГ,

(b) одержання поліпептиду, який має гідролазну активність, зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, які мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або

i) кодується або

5 (1) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

10 (2) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується в суворих умовах з нуклеїновою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або

15 ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3 або таблиці 4, або

20 iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або

25 iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;

(c) приведення зазначеної композиції олій зі стадії (a) у контакт із зазначеним поліпептидом зі стадії (b) в умовах, достатніх для гідролітичного відщеплення поліпептидом залишку карбонової кислоти на ТАГ для одержання ДАГ.

30 47. Спосіб за п. 46, де зазначений поліпептид є Sn2-специфічним і зазначений ДАГ являє собою 1,3-ДАГ.

48. Спосіб за п. 46, де зазначений поліпептид є Sn1- або Sn3-специфічним і зазначений ДАГ являє собою 1,2-ДАГ або 2,3-ДАГ.

49. Спосіб за п. 46, де зазначений залишок карбонової кислоти містить насичену жирну кислоту, а зазначений ДАГ являє собою менш насичений жир, ніж зазначений ТАГ.

35 50. Спосіб за п. 46, де зазначений залишок карбонової кислоти містить транс-ізомер жирної кислоти, а зазначений ДАГ являє собою жир зі зниженим вмістом транс-ізомерів жирних кислот стосовно зазначеного ТАГ.

51. Композиція, яка містить олію або жир, гідролізовані способом за п. 1.

40 52. Композиція за п. 51, де зазначена композиція вибрана з маргарину, розпушувача, майонезу, заправки, яку можна наливати, заправки, яку можна черпати ложкою, соусу, маринаду, приправи, олії для змазування розбризкуванням, кулінарної олії, олії для смаження, олії для салату, кондитерських виробів, альтернативи масла какао, замітника масла какао, замісника масла какао, еквівалента масла какао, продукту харчування, харчової добавки або будь-якої виробничої проміжної сполуки для будь-чого з зазначеного вище.

45 53. Спосіб гідролізу олії або жиру, який включає реакцію олії або жиру з ферментом пальмітазою у присутність емульгатора, ГЛБ якого перевищує 12, де фермент пальмітазу кодує послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає i) нуклеотидну заміну (або її еквівалент), що кодує амінокислотний залишок у положенні 95 (або в його еквіваленті), як зазначено в таблиці 9, ii) нуклеотидні заміни (або їх еквіваленти), що кодують амінокислотні залишки в положеннях 85 і 172 (або в їх еквівалентах), як зазначено в таблиці 15, iii) нуклеотидну заміну (або її еквівалент), що кодує амінокислотний залишок у положенні 83 (або в його еквіваленті), як зазначено в таблиці 16, i iv) наступні мовчазні мутації 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT і 188ACG.

50 54. Спосіб за п. 53, де послідовність нуклеїнової кислоти являє собою послідовність SEQ ID NO:1 і включає i) нуклеотидну заміну (або її еквівалент), що кодує амінокислотний залишок у положенні 95 (або в його еквіваленті), як зазначено в таблиці 9, ii) нуклеотидні заміни (або їх еквіваленти), що кодують амінокислотні залишки в положеннях 85 і 172 (або в їх еквівалентах), як зазначено в таблиці 15, iii) нуклеотидну заміну (або її еквівалент), що кодує амінокислотний залишок у положенні 83 (або в його еквіваленті), як зазначено в таблиці 16, i iv) наступні мовчазні мутації 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT і 188ACG.

60

55. Спосіб за п. 53 або 54, де емульгатор вибраний з олеату натрію, олеату калію, лінолеату натрію, лінолеату калію, ліноленату натрію, ліноленату калію, лауреату натрію, лауреату калію, стеарату натрію, стеарату калію, пальмітату натрію, пальмітату калію, натрієвої солі жирної кислоти пальмової олії, калієвої солі жирної кислоти пальмової олії або їх комбінації.

5 56. Спосіб за будь-яким з пп. 53-55, де реакцію проводять при температурі приблизно від 20 °C до 70 °C.

57. Спосіб за будь-яким з пп. 53-56, де реакційна суміш містить приблизно від 1 % до 20 % води від загальної маси реагентів.

10 58. Спосіб за будь-яким з пп. 53-57, де реакція дає олію або жир, що містить приблизно 5 % пальмітату від загальної маси олії або жиру.

59. Спосіб за будь-яким з пп. 53-57, де реакція дає олію або жир, що містить приблизно 1 % пальмітату від загальної маси олії або жиру.

60. Спосіб за будь-яким з пп. 53-59, де олія являє собою рафіновану олію.

61. Спосіб за будь-яким з пп. 53-60, де реакція додатково включає додавання фосфоліпіду.

15 62. Спосіб гідролізу олії або жиру, який включає наступні стадії:

(а) одержання композиції, яка містить олію або жир, де олію або жир можна гідролізувати за допомогою поліпептиду, який має гідролазну активність, зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, які мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або

20 i) кодується або

(1) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16
25 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

(2) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується в суворих умовах з нуклеїноювою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх
30 залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або

ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх
35 амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або

iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або

40 iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;

45 (b) додавання поліпептиду зі стадії (а) у композицію, що містить зазначену олію або жир, у достатній кількості й у достатніх умовах для того, щоб викликати гідроліз олії або жиру, за допомогою чого гідролізують олію або жир.

63. Спосіб біокаталітичного синтезу структурованого ліпіду, який включає наступні стадії:

(а) одержання поліпептиду, який має гідролазну активність, причому зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, що
50 мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або

i) кодується або

(1) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх
55 залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

(2) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується в суворих умовах з нуклеїноювою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох,
60 п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх

- залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або
- ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або
- iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або
- iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;
- (b) одержання композиції, що містить триацилгліцерид (ТАГ);
- (c) приведення поліпептиду зі стадії (a) у контакт із композицією зі стадії (b) в умовах, у яких поліпептид гідролітично відщеплює залишок карбонової кислоти в положенні Sn2 триацилгліцериду (ТАГ), за допомогою чого одержують 1,3-діацилгліцерид (ДАГ);
- (d) одержання R1-складного ефіру;
- (e) одержання R1-специфічної гідролази, і
- (f) приведення 1,3-ДАГ зі стадії (c) у контакт із R1-складним ефіром зі стадії (d) і R1-специфічною гідролазою зі стадії (e) в умовах, у яких R1-специфічна гідролаза каталізує етерифікацію положення Sn2, за допомогою чого одержують структурований ліпід.
64. Спосіб біокаталітичного синтезу структурованого ліпиду, який включає наступні стадії:
- (a) одержання поліпептиду, який має гідролазну активність, зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, які мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або
- i) кодується або
- (1) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або
- (2) нуклеїновою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується в суворих умовах з нуклеїновою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або
- ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або
- iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або
- iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;
- (b) одержання композиції, що містить триацилгліцерид (ТАГ);
- (c) приведення поліпептиду зі стадії (a) у контакт із композицією зі стадії (b) в умовах, у яких поліпептид гідролітично відщеплює залишок карбонової кислоти в положенні Sn1 або Sn3 триацилгліцериду (ТАГ), за допомогою чого одержують 1,2-ДАГ або 2,3-ДАГ; і
- (d) промотування перегрупування залишку карбонової кислоти в 1,2-ДАГ або 2,3-ДАГ зі стадії (c) у кінетично контрольованих умовах, за допомогою чого одержують 1,3-ДАГ.
65. Спосіб каталізу реакції переетерифікації для одержання нових триацилгліцеридів, який включає наступні стадії:

(а) одержання композиції, яка містить поліпептид, що має 1,3-специфічну ліпазну активність, зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних або рекомбінантних поліпептидів, які мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або і) кодується або

5 (1) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

10 (2) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується в суворих умовах з нуклеїноювою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або

15 ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або

20 iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або

25 iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;

(b) одержання суміші триацилгліцеридів і вільних жирних кислот;

30 (c) обробка композиції зі стадії (b) поліпептидом в умовах, у яких поліпептид може каталізувати обмін вільних жирних кислот і ацильних груп триацилгліцеридів, за допомогою чого одержують нові триацилгліцериди, збагачені зазначеними жирними кислотами.

66. Спосіб переетерифікації для одержання продукту харчування, корму або олії, який включає наступні стадії:

35 (а) одержання реакційної суміші для переетерифікації, яка містить речовину джерела стеаринової кислоти, вибрану з групи, що складається зі стеаринової кислоти, складних стеаринових моноєфірів низькомолекулярних одноатомних спиртів і їх сумішей,

(b) одержання продукту харчування, корму або олії, що містить триацилгліцерид;

40 (c) одержання поліпептиду, який має гідролазну активність, зазначений поліпептид вибраний з групи, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, які мають гідролазну активність, і зазначений поліпептид або

i) кодується або

45 (1) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

50 (2) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується в суворих умовах з нуклеїноювою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або

55 ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або

60 iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або

iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;

5 (d) переетерифікація речовини джерела стеаринової кислоти і триацилгліцериду продукту харчування, корму або олії; і

(е) відділення компонентів вільних жирних кислот від переетерифікованих гліцеридних компонентів суміші для переетерифікації, щоб надати переетерифікований продукт олії і суміш жирних кислот, що містить жирні кислоти, складні моноєфіри жирних кислот або їх суміші,

10 вивільнені з продукту харчування, корму або олії.

67. Спосіб одержання ДАГ, який включає наступні стадії:

(а) одержання композиції олій, що містить деяку кількість ТАГ,

(b) одержання поліпептиду, який має гідролазну активність, зазначений поліпептид вибраний з груп, що складається з виділених, синтетичних і рекомбінантних поліпептидів, які мають

15 гідролазну активність, і зазначений поліпептид або

i) кодується або

(1) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх

20 залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує щонайменше один поліпептид, що має гідролазну активність, або

(2) нуклеїноювою кислотою, яка містить послідовність, що гібридизується в суворих умовах з нуклеїноювою кислотою, яка містить SEQ ID NO:1 і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або усіх

25 залишків основ, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, де нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що має гідролазну активність; або

ii) має щонайменше 50 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:2 на ділянці довжиною щонайменше приблизно 100 залишків і включає зміни одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти або дванадцяти або більше, або всіх

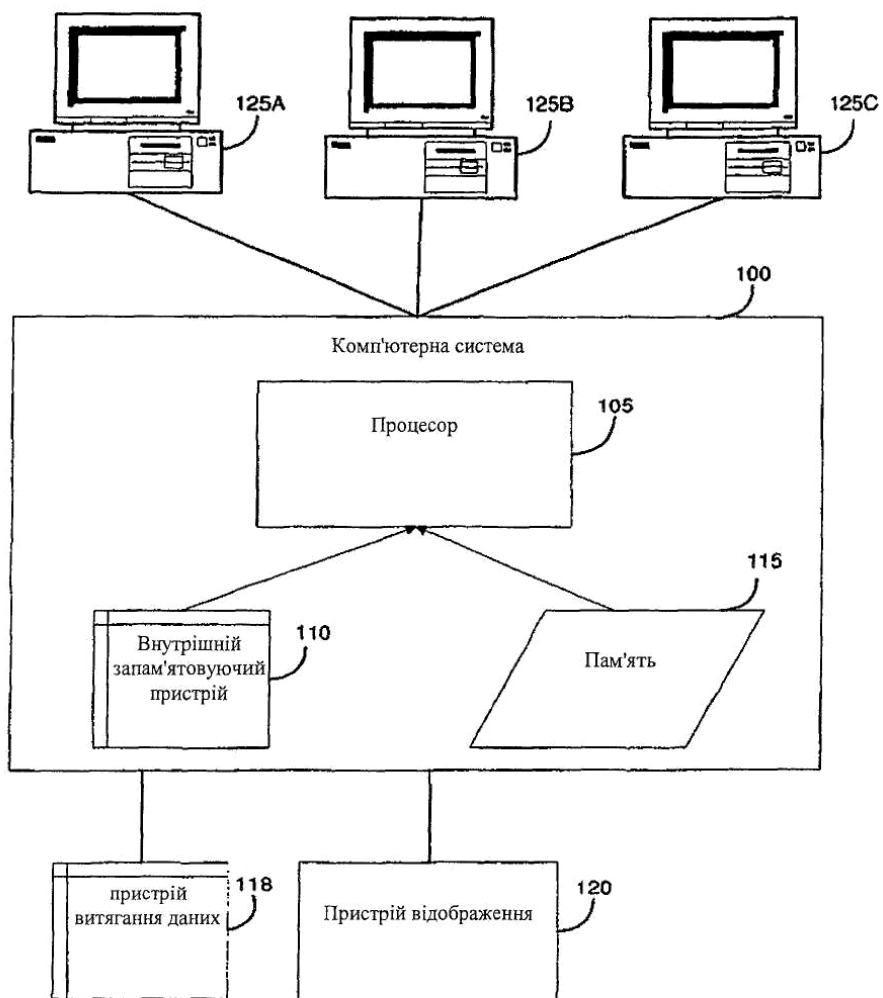
30 амінокислотних залишків, зазначені в таблиці 3, таблиці 4, таблиці 9, таблиці 10, таблиці 11, таблиці 16 або таблиці 23, або

iii) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R або їх комбінацію, або

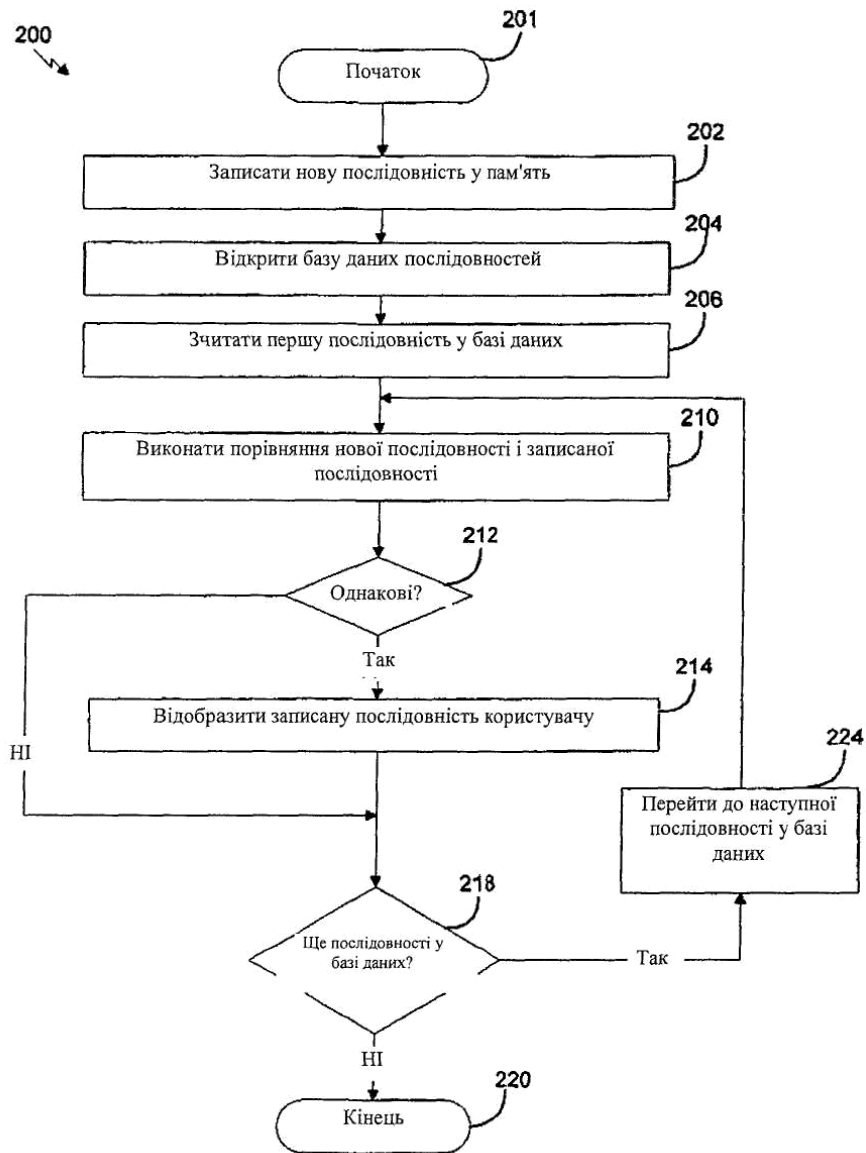
35 iv) містить амінокислотну послідовність, як зазначено в SEQ ID NO:2, але також включає щонайменше одну модифікацію амінокислотного залишку I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q або їх комбінацію;

(c) приведення зазначеної композиції олій зі стадії (а) у контакт із зазначеним поліпептидом зі стадії (b) в умовах, достатніх для гідролітичного відщеплення поліпептидом залишку карбонової

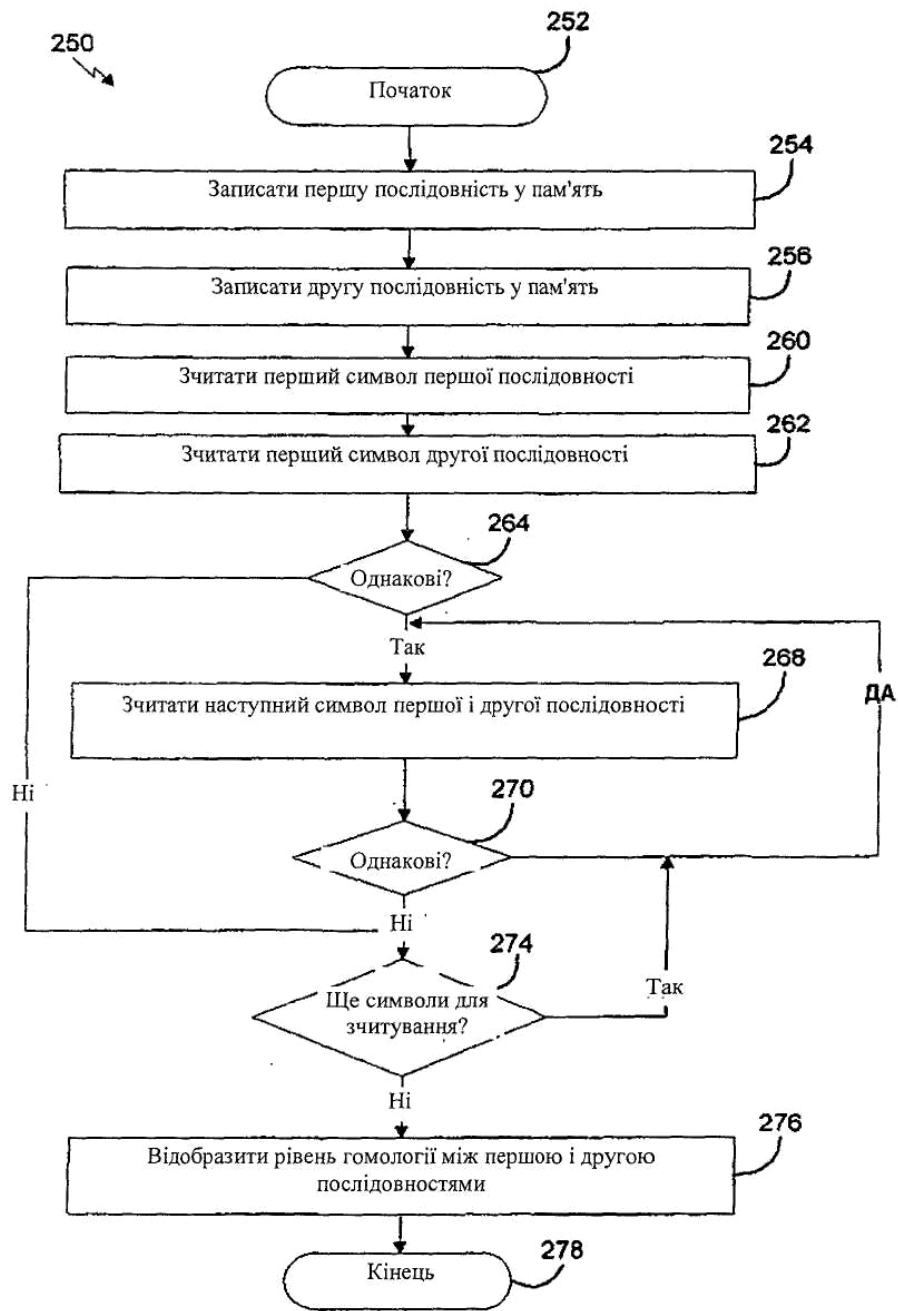
40 кислоти на ТАГ для одержання ДАГ.



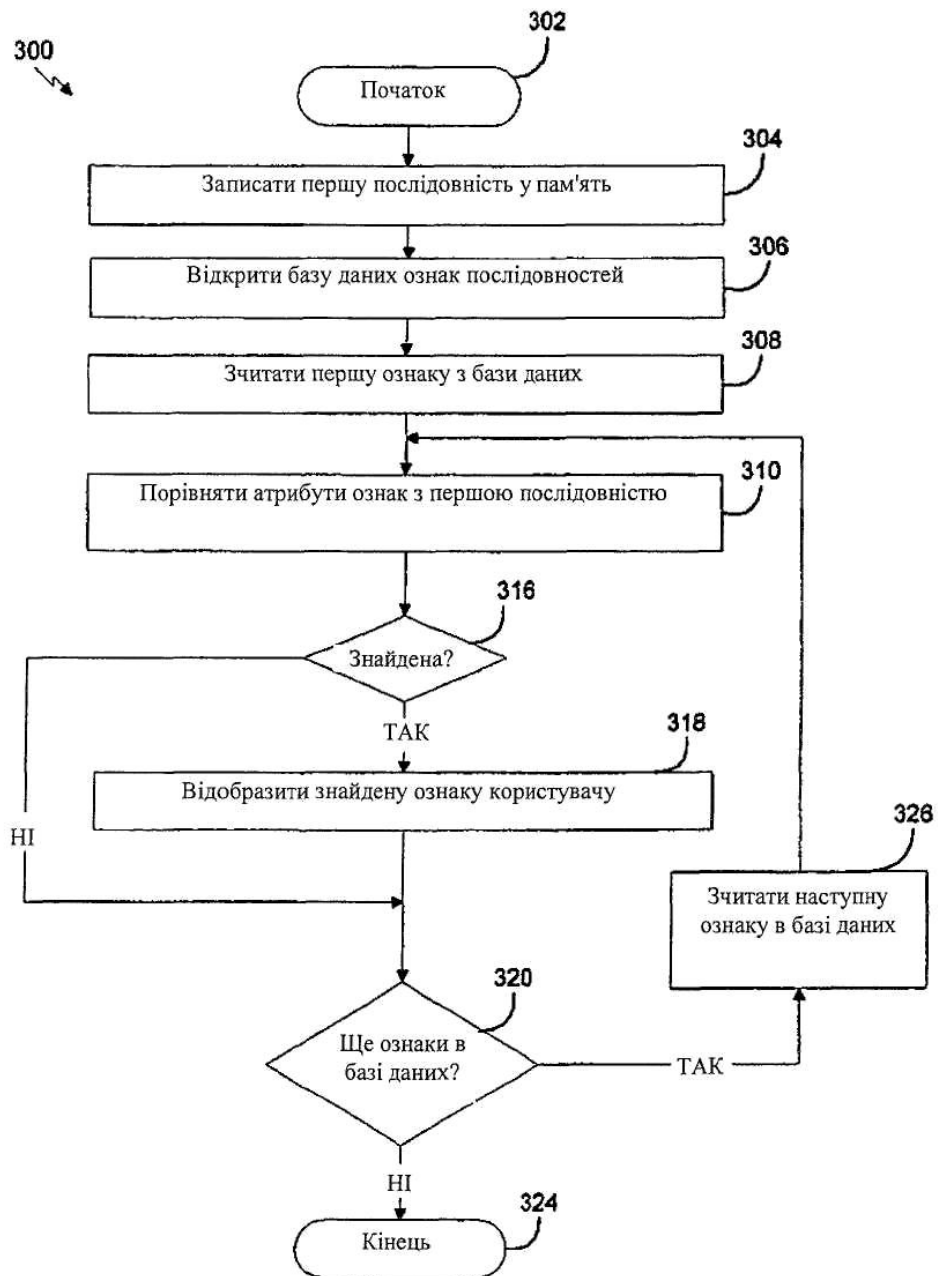
Фіг. 1



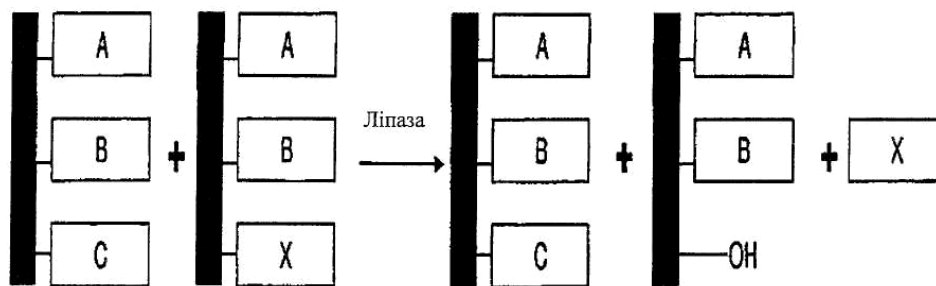
Фіг. 2



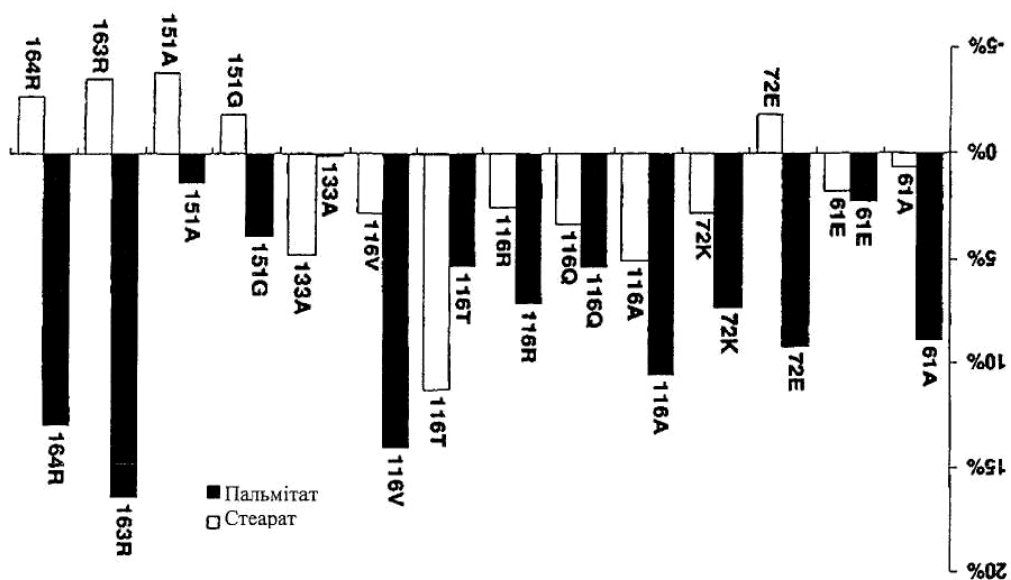
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6a

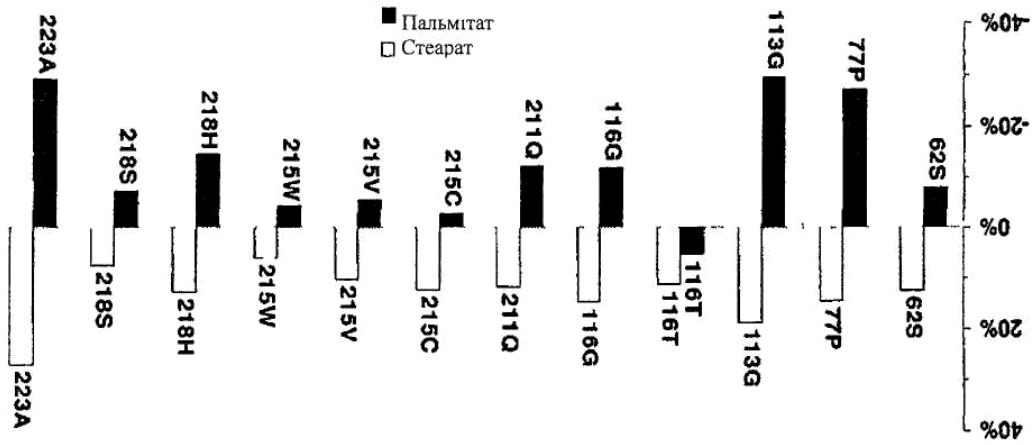


Fig. 6b

MLKPPPYGRL LRELADIPA**I** VTAPFRGAAG MGKLADGEPV LVLPGFLADD
20L

61A,E 72E,K
NATSVLRKTF **D**VAGFACSGW **E**RGFNL**G**IRG DL**V**DRLV**D**RL RAVSEAAGGQ
62S 77P 83C 88H

113G 133A
KVIVVGWSLG GL**Y**ARE**E**LGHK APELIRMVVT LG**S**PFAGDL**H** ANHAW**K**IYEA
116A,Q,R,T,V;G,T 140K 146S

167S
151G,A 163R
INSHTVDNLP IP**V**D**F**Q**I**KPP VRTIAVWSP**L** DGVVAPETSE GSP**E**QSDERL
164R 180E 194M

212Y
211Q 218H,S 225M,Q
ELAVTHMGFA **A**SKT**G**A**E**AVV RL**V**A**A**RL- (SEQ ID NO:2)
215C,V,W 223A

Fig. 7

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Інші зміни амінокислот	Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
61	72	116	133	151	163	164		Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
E	K	V	A	A	R			0.0%	1.1%	0.0%	98.9%	0.0%	0.00	0.04	0.00	4.03	0.00	4.07
E	K	V	A	A				0.0%	2.7%	2.9%	94.4%	0.0%	0.00	0.19	0.20	6.70	0.00	7.10
E	K	V	A			R		Високий	Високий	Низький	Високий	Висо- кий	немає пiku	немає пiku	0.00	немає пiku	немає пiku	Висо- кий
E	K	V		G	R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	K	V		A				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	K	V			R			0.3%	5.0%	3.5%	91.2%	0.0%	0.03	0.55	0.38	10.00	0.00	10.96
E	K	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	99.9%	0.1%	0.00	0.00	0.00	2.86	0.00	2.86
E	K	V				R		0.0%	1.0%	0.0%	99.0%	0.0%	0.00	0.06	0.00	5.52	0.00	5.58
E	K	V						0.0%	3.1%	0.0%	96.9%	0.0%	0.00	0.21	0.00	6.50	0.00	6.71
E	K	T		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.53	0.00	5.53
E	K	T		A	R			Низький	Низький	Низь- кий	Низь- кий	Низь- кий	Низь- кий	Низь- кий	Низь- кий	Низький	Низький	Низь- кий
E	K	T		A	R			Низький	Низький	Низь- кий	Низь- кий	Низь- кий	Низький	Низький	Низь- кий	Низький	Низький	Низь- кий
E	K	Q		A	R			4.0%	7.8%	5.4%	82.5%	0.3%	0.50	0.15	0.23	6.88	0.08	7.83
E	K	Q		A	R			4.5%	9.4%	5.6%	80.5%	0.0%	0.56	0.18	0.24	6.71	0.00	7.69
E	K	Q		A	R			11.0%	38.5%	34.4%	Висо- кий	16.1%	1.38	0.73	1.49	Висо- кий	4.03	Висо- кий
E	K	Q		A	R			4.2%	8.6%	6.4%	80.2%	0.7%	0.52	0.16	0.28	6.68	0.17	7.81
E	K	A	A	A	R			0.0%	1.7%	0.0%	98.3%	0.0%	0.00	0.11	0.00	6.47	0.00	6.58
E	K	A	A	A	R			0.0%	3.7%	0.0%	96.3%	0.0%	0.00	0.30	0.00	7.80	0.00	8.10
E	K	A	A			R		0.9%	4.1%	6.7%	88.0%	0.4%	0.09	0.43	0.70	9.26	0.04	10.52
E	K	A		G	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.94	0.00	0.94
E	K	A		A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.97	0.00	0.97
E	K	A		A				0.0%	2.6%	4.3%	93.1%	0.0%	0.00	0.15	0.26	5.56	0.00	5.97
E	K	A				R		0.0%	2.2%	5.0%	92.4%	0.5%	0.00	0.19	0.44	8.20	0.04	8.88
E	K	A				R		0.0%	3.0%	4.7%	91.9%	0.4%	0.00	0.19	0.30	5.79	0.03	6.30
E	K	A				R		1.0%	5.2%	6.4%	87.2%	0.3%	0.08	0.41	0.51	6.97	0.02	8.00
E	K	A				R		0.0%	6.2%	0.0%	93.8%	0.0%	0.00	0.36	0.00	5.44	0.00	5.80
E	K		A	G		R	S18G,K12M	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	K		A	A	R		L86M	5.2%	14.1%	8.1%	72.6%	0.0%	0.66	0.27	0.35	6.05	0.00	7.32

Фіг. 8-1

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- мито- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- мито- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
E	K		A	A	R		L86M	0.0%	10.3%	5.6%	84.1%	0.0%	0.00	0.19	0.24	7.01	0.00	7.45
E	K		A	A				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	K		A	A			K12M	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький
E	K		A	A			K12M	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький
E	K		A				W17L	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	K		A			R		Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький
E	K		A			R		Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький
E	K				R			0.6%	3.7%	3.7%	91.9%	0.0%	0.09	0.55	0.55	13.50	0.00	14.68
E	E	V	A	A		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.60	0.00	0.60
E	E	V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.30	0.00	1.30
E	E	V	A		R			0.0%	3.8%	3.0%	93.2%	0.0%	0.00	0.31	0.24	7.53	0.00	8.08
E	E	V	A				A52S	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.17	0.00	2.17
E	E	V	A				A52S	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	E	V	A			R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.73	0.00	4.73
E	E	V	A					0.0%	8.0%	8.0%	83.9%	0.0%	0.00	0.64	0.64	6.68	0.00	7.96
E	E	V	A			R		0.0%	1.9%	4.0%	94.1%	0.0%	0.00	0.08	0.18	4.17	0.00	4.43
E	E	V		G				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	E	V			R			1.3%	7.4%	4.9%	86.4%	0.0%	0.16	0.85	0.56	9.92	0.00	11.48
E	E	V						0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.31	0.00	2.31
E	E	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.23	0.00	2.23
E	E	V		G				6.0%	0.0%	0.0%	94.0%	0.0%	0.17	0.00	0.00	2.61	0.00	2.78
E	E	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.90	0.00	0.90
E	E	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.43	0.00	2.43
E	E	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.89	0.00	4.89
E	E	V			R			1.7%	0.0%	0.0%	98.3%	0.0%	0.05	0.00	0.00	2.59	0.00	2.64
E	E	V				R		0.0%	3.3%	0.0%	96.7%	0.0%	0.00	0.17	0.00	4.91	0.00	5.08
E	E	T			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	8.01	0.00	8.01
E	E	Q	A	G				5.9%	11.7%	11.6%	67.2%	3.6%	0.73	0.22	0.50	5.60	0.91	7.97

Фіг. 8-2

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- мито- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- мито- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
E	E	Q	A	G				4.1%	12.6%	11.7%	68.1%	3.5%	0.52	0.24	0.51	5.67	0.88	7.82
E	E	A	A	G				0.0%	13.5%	23.3%	63.2%	0.0%	0.00	0.11	0.20	0.53	0.00	0.84
E	E	A	A	G				2.6%	0.0%	0.0%	97.4%	0.0%	0.04	0.00	0.00	1.57	0.00	1.61
E	E	A	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.99	0.00	1.99
E	E	A	A	A	R			0.0%	1.0%	2.3%	96.3%	0.5%	0.00	0.06	0.15	6.27	0.03	6.51
E	E	A	A	A				0.0%	4.9%	2.8%	92.2%	0.0%	0.00	0.14	0.08	2.53	0.00	2.74
E	E	A	A		R			2.2%	7.6%	6.8%	83.4%	0.0%	0.28	0.99	0.87	10.80	0.00	12.95
E	E	A	A					0.0%	2.3%	3.4%	94.3%	0.0%	0.00	0.13	0.19	5.36	0.00	5.68
E	E	A	A					1.9%	4.1%	6.3%	87.1%	0.5%	0.13	0.27	0.42	5.78	0.03	6.63
E	E	A	A			R		0.0%	2.9%	0.0%	97.1%	0.0%	0.00	0.12	0.00	4.07	0.00	4.19
E	E	A		A		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.93	0.00	0.93
E	E	A		A				1.6%	5.8%	5.4%	86.3%	0.9%	0.20	0.73	0.69	10.90	0.12	12.63
E	E	A		A		R		1.3%	4.7%	4.7%	88.1%	1.2%	0.11	0.39	0.40	7.37	0.10	8.37
E	E	A			R			1.7%	5.1%	6.4%	85.8%	1.0%	0.18	0.56	0.70	9.32	0.11	10.86
E	E	A			R			0.0%	2.9%	0.0%	97.1%	0.0%	0.00	0.17	0.00	5.79	0.00	5.96
E	E	A			R			0.0%	2.8%	0.0%	97.2%	0.0%	0.00	0.23	0.00	8.19	0.00	8.42
E	E		A	G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.18	0.00	0.18
E	E		A	G				6.6%	7.6%	8.5%	77.1%	0.2%	0.35	0.40	0.45	4.06	0.01	5.27
E	E		A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.53	0.00	5.53
E	E		A	A	R		P18S,A21V	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.10
E	E		A	A	R			2.5%	9.4%	7.2%	78.0%	3.0%	0.31	0.18	0.31	6.50	0.75	8.04
E	E		A	A	R			5.8%	14.4%	8.2%	71.6%	0.0%	0.73	0.27	0.35	5.97	0.00	7.32
E	E		A	A	R			4.5%	11.9%	8.6%	73.5%	1.6%	0.56	0.22	0.37	6.12	0.39	7.67
E	E		A	A	R			4.4%	10.4%	5.8%	79.4%	0.0%	0.55	0.20	0.25	6.62	0.00	7.62
E	E		A		R		K12M	4.4%	10.2%	7.0%	76.7%	1.7%	0.55	0.19	0.31	6.39	0.43	7.87
E	E		A		R		K12M	4.8%	8.6%	7.0%	79.5%	0.1%	0.60	0.16	0.30	6.63	0.01	7.71
E	E			G	R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	E			G		R		2.7%	7.8%	10.2%	79.2%	0.0%	0.47	1.35	1.77	13.70	0.00	17.29
E	E			A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.61	0.00	3.61

Фіг. 8-3

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Загаль- на ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
E	E			G	R		F65V	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький
E	E			G	R		F65V	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький
E		V	A	G	R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E		V	A	G				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E		V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.31	0.00	5.31
E		V	A	A	R			0.0%	0.5%	1.1%	97.3%	1.1%	0.00	0.04	0.10	8.81	0.10	9.05
E		V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.51	0.00	2.51
E		V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.71	0.00	1.71
E		V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.68	0.00	1.68
E		V	A		R			0.0%	2.9%	2.4%	94.6%	0.0%	0.00	0.24	0.20	7.83	0.00	8.27
E		V	A		R			0.0%	0.0%	0.8%	99.2%	0.0%	0.00	0.00	0.06	7.62	0.00	7.68
E		V	A		R			1.7%	5.7%	5.4%	87.3%	0.0%	0.19	0.62	0.60	9.63	0.00	11.04
E		V	A					0.4%	3.6%	0.0%	95.8%	0.2%	0.03	0.25	0.00	6.52	0.01	6.80
E		V		A	R			0.4%	3.4%	3.2%	92.5%	0.5%	0.05	0.42	0.40	11.40	0.06	12.33
E		V			R			1.7%	5.8%	6.3%	86.2%	0.0%	0.20	0.66	0.72	9.82	0.00	11.40
E		V				R		0.0%	0.4%	2.7%	96.9%	0.0%	0.00	0.03	0.17	6.01	0.00	6.20
E		Q						2.7%	7.7%	10.9%	77.5%	1.2%	0.75	2.16	3.08	21.80	0.34	28.13
E		Q	A			R		5.4%	12.0%	15.2%	66.1%	1.3%	1.07	2.37	2.99	13.00	0.25	19.68
E		Q		A	R			1.9%	4.1%	4.6%	88.9%	0.5%	0.31	0.68	0.75	14.60	0.08	16.42
E		A	A	G	R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E		A	A	A				0.4%	0.0%	0.0%	99.6%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.73	0.00	0.73
E		A	A					2.6%	6.4%	8.5%	81.5%	1.0%	0.19	0.45	0.59	5.71	0.07	7.01
E		A		A	R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E		A		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.07	0.00	2.07
E		A		A				0.0%	0.0%	2.2%	97.8%	0.0%	0.00	0.00	0.07	2.93	0.00	3.00
E		A		A				0.0%	3.6%	0.0%	96.4%	0.0%	0.00	0.14	0.00	3.64	0.00	3.78
E		A			R		G132V	0.1%	0.0%	0.0%	99.9%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.99	0.00	1.99
E		A				R		3.3%	2.5%	6.3%	87.9%	0.0%	0.15	0.11	0.28	3.89	0.00	4.43
E				G	R		K12M	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Fig. 8-4

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Інші зміни амінокислот	Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
								Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
E				G		R	K12M	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.04
E				A			A15S	4.1%	10.5%	14.4%	70.2%	0.8%	0.43	1.11	1.52	7.41	0.08	10.55
E			A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.29
E		Q			R			5.1%	9.7%	7.0%	77.6%	0.6%	0.63	0.18	0.30	6.46	0.16	7.74
E		Q			R			5.4%	8.4%	7.6%	78.6%	0.0%	0.68	0.16	0.33	6.55	0.00	7.71
E		Q	A	G		R		4.2%	14.2%	12.1%	62.6%	7.0%	0.52	0.27	0.53	5.21	1.75	8.28
E		Q	A	G		R		7.9%	12.0%	13.7%	65.5%	0.9%	0.98	0.23	0.60	5.46	0.21	7.48
E					R			Низький	Низький	Низь- кий	Низький	Низький	Низький	Низький	Низь- кий	Низький	Низький	Низь- кий
E					R			Низький	Низький	Низь- кий	Низький	Низький	Низький	Низький	Низь- кий	Низький	Низький	Низь- кий
E			A			R		4.9%	11.3%	8.3%	73.9%	1.7%	0.62	0.21	0.36	6.16	0.41	7.76
E			A			R		4.6%	10.2%	8.1%	77.1%	0.0%	0.57	0.19	0.35	6.42	0.00	7.54
E			A		R			3.3%	8.5%	6.9%	77.8%	3.5%	0.42	0.16	0.30	6.49	0.87	8.23
E			A		R			5.0%	8.6%	7.8%	76.2%	2.4%	0.63	0.16	0.34	6.35	0.60	8.08
A	K	V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	6.48	0.00	6.48
A	K	V	A	A	R			1.1%	3.0%	2.4%	93.5%	0.0%	0.12	0.33	0.25	10.00	0.00	10.70
A	K	V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.75	0.00	2.75
A	K	V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.20	0.00	3.20
A	K	V	A	A				0.0%	0.6%	0.0%	99.4%	0.0%	0.00	0.02	0.00	3.55	0.00	3.57
A	K	V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.92	0.00	2.92
A	K	V	A			R		0.9%	3.6%	0.0%	95.5%	0.0%	0.05	0.19	0.00	4.88	0.00	5.11
A	K	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.32	0.00	4.32
A	K	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.16	0.00	2.16
A	K	V				R		0.0%	0.0%	0.8%	99.2%	0.0%	0.00	0.00	0.06	7.36	0.00	7.42
A	K	V				R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.85	0.00	2.85
A	K	V						0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.81	0.00	4.81
A	K	V						2.3%	8.0%	8.5%	81.1%	0.1%	0.23	0.79	0.84	8.01	0.01	9.87
A	K	T	A	A				6.7%	10.5%	9.2%	73.6%	0.0%	0.84	0.20	0.40	6.13	0.00	7.57
A	K	T	A	A				7.1%	9.6%	7.9%	75.4%	0.0%	0.89	0.18	0.34	6.28	0.00	7.70
A	K	T	A		R			5.1%	8.3%	6.0%	79.2%	1.4%	0.63	0.16	0.26	6.60	0.36	8.01

Фіг. 8-5

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Інші зміни амінокислот	Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
								Ліноле-нова	Ліноле-нова	Олеї-нова	Паль-міти-нова	Стеа-рино-ва	Ліноле-нова	Ліноле-нова	Олеї-нова	Паль-міти-нова	Стеа-рино-ва	Загальна ЖК
61	72	116	133	151	163	164		—				—	—				—	
A	K	T	A		R			4.8%	6.2%	5.3%	83.7%	0.0%	0.60	0.12	0.23	6.97	0.00	7.92
A	K	Q	A	G			A48S	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A	K	Q		G	R			3.8%	9.0%	5.8%	79.9%	1.5%	0.48	0.17	0.25	6.66	0.37	7.93
A	K	Q		G	R			0.0%	7.5%	5.8%	86.7%	0.0%	0.00	0.14	0.25	7.23	0.00	7.62
A	K	A	A		R			1.4%	5.9%	5.2%	87.4%	0.0%	0.27	1.12	1.00	16.60	0.00	18.98
A	K	A	A		R			1.9%	5.5%	5.0%	87.6%	0.0%	0.30	0.84	0.77	13.40	0.00	15.31
A	K	A	A		R			0.0%	0.2%	0.4%	99.5%	0.0%	0.00	0.01	0.02	6.25	0.00	6.28
A	K	A		A	R			0.0%	3.2%	0.0%	96.8%	0.0%	0.00	0.17	0.00	4.95	0.00	5.12
A	K	A		A				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A	K	A			R			2.2%	2.3%	1.8%	93.7%	0.0%	0.15	0.16	0.12	6.37	0.00	6.80
A	K	A			R			0.0%	3.1%	3.0%	93.3%	0.6%	0.00	0.21	0.21	6.50	0.04	6.96
A	K		A	G		R		5.8%	11.8%	10.4%	69.2%	2.8%	0.72	0.22	0.45	5.77	0.71	7.87
A	K		A	G		R		7.7%	11.6%	11.5%	68.2%	1.0%	0.97	0.22	0.50	5.68	0.24	7.61
A	K		A	A	R			5.4%	13.0%	8.0%	73.7%	0.0%	0.67	0.25	0.35	6.14	0.00	7.40
A	K		A	A	R			4.2%	10.3%	7.3%	78.3%	0.0%	0.52	0.19	0.32	6.52	0.00	7.55
A	K		A	A	R		A48S	5.0%	12.2%	7.5%	75.3%	0.0%	0.62	0.23	0.33	6.28	0.00	7.45
A	K		A	A	R		A48S	0.0%	13.8%	0.0%	86.2%	0.0%	0.00	0.26	0.00	7.19	0.00	7.45
A	K		A		R			4.4%	7.9%	6.4%	80.3%	1.0%	0.55	0.15	0.28	6.69	0.25	7.92
A	K		A		R			5.3%	10.9%	7.6%	76.2%	0.0%	0.67	0.21	0.33	6.35	0.00	7.55
A	K			A	R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A	K				R		K12M	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A	K							3.6%	8.9%	8.9%	78.6%	0.0%	0.77	1.91	1.92	16.90	0.00	21.50
A	K			A	R			6.0%	9.8%	7.5%	76.0%	0.7%	0.75	0.19	0.33	6.33	0.18	7.77
A	K			A	R			0.0%	6.6%	4.2%	87.9%	1.3%	0.00	0.12	0.18	7.33	0.33	7.96
A	K			A	R			4.1%	11.2%	7.1%	76.2%	1.4%	0.52	0.21	0.31	6.35	0.36	7.74
A	K			A	R			4.9%	12.0%	7.2%	76.0%	0.0%	0.61	0.23	0.31	6.33	0.00	7.48
A	E	V	A	G		R	G99C	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.59	0.00	4.59
A	E	V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.78	0.00	0.78
A	E	V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.53	0.00	2.53

Фіг. 8-6

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
A	E	V	A		R			0.0%	4.0%	3.6%	92.4%	0.0%	0.00	0.33	0.30	7.60	0.00	8.23
A	E	V	A		R			0.0%	4.2%	3.8%	92.1%	0.0%	0.00	0.36	0.33	8.02	0.00	8.71
A	E	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.02	0.00	1.02
A	E	V	A					2.7%	4.3%	4.2%	88.8%	0.0%	0.13	0.20	0.20	4.17	0.00	4.70
A	E	V		G				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A	E	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.31	0.00	0.31
A	E	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.53	0.00	0.53
A	E	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.71	0.00	0.71
A	E	V		A	R			1.6%	7.1%	1.8%	89.6%	0.0%	0.18	0.81	0.20	10.20	0.00	11.39
A	E	V		A		R		Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A	E	V		A		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.09	0.00	1.09
A	E	V			R			0.8%	5.3%	4.2%	89.7%	0.0%	0.07	0.50	0.39	8.39	0.00	9.35
A	E	V						0.0%	5.4%	0.0%	94.6%	0.0%	0.00	0.39	0.00	6.77	0.00	7.16
A	E	Q	A	A	R			0.0%	1.2%	2.4%	96.5%	0.0%	0.00	0.13	0.28	10.70	0.00	11.09
A	E	Q		G				5.2%	12.4%	11.4%	69.3%	1.7%	0.65	0.23	0.50	5.77	0.41	7.57
A	E	Q		G				6.1%	15.9%	10.6%	67.4%	0.0%	0.76	0.30	0.46	5.62	0.00	7.14
A	E	A	A	G		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.19
A	E	A	A		R			0.0%	4.2%	6.2%	89.7%	0.0%	0.00	0.32	0.48	6.93	0.00	7.73
A	E	A	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	7.06	0.00	7.06
A	E	A	A					1.2%	5.5%	6.4%	85.9%	1.0%	0.09	0.42	0.48	6.52	0.07	7.59
A	E	A	A			R		0.0%	0.0%	1.0%	99.0%	0.0%	0.00	0.00	0.06	5.72	0.00	5.78
A	E	A		G		R		0.8%	0.0%	0.0%	99.2%	0.0%	0.01	0.00	0.00	1.31	0.00	1.32
A	E	A		A	R			0.0%	3.7%	0.0%	96.3%	0.0%	0.00	0.23	0.00	6.12	0.00	6.35
A	E	A		A		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.91	0.00	0.91
A	E	A		A				1.1%	8.8%	2.3%	86.3%	1.4%	0.08	0.59	0.16	5.79	0.09	6.71
A	E							Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A	E				R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький
A	E				R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький
A	E			A	R		K12M	2.9%	10.9%	7.7%	75.3%	3.3%	0.37	0.21	0.33	6.27	0.81	7.99

Fig. 8-7

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
A	E			A	R		K12M	5.5%	13.8%	7.7%	71.7%	1.3%	0.69	0.26	0.34	5.97	0.33	7.59
A		V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.39	0.00	0.39
A		V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.87	0.00	0.87
A		V	A	A				0.0%	3.6%	0.0%	96.4%	0.0%	0.00	0.12	0.00	3.05	0.00	3.17
A		V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.16	0.00	3.16
A		V	A		R			0.0%	4.8%	5.9%	89.3%	0.0%	0.00	0.44	0.54	8.18	0.00	9.16
A		V	A		R			0.0%	1.4%	0.0%	98.6%	0.0%	0.00	0.11	0.00	7.57	0.00	7.68
A		V	A			R		4.7%	11.0%	10.4%	74.0%	0.0%	0.50	1.18	1.12	7.96	0.00	10.76
A		V	A			R		0.4%	3.3%	4.0%	90.9%	1.4%	0.02	0.18	0.22	4.92	0.08	5.41
A		V	A			R		1.9%	5.5%	1.7%	90.9%	0.0%	0.18	0.50	0.16	8.33	0.00	9.17
A		V	A			R		0.0%	3.7%	0.0%	96.3%	0.0%	0.00	0.16	0.00	4.10	0.00	4.26
A		V	A			R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.79	0.00	1.79
A		V	A			R		0.1%	4.6%	0.0%	95.3%	0.0%	0.01	0.34	0.00	7.05	0.00	7.40
A		V		G	R			Низький	Низький	Низь- кий	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A		V		A		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.04	0.00	1.04
A		V				R		4.3%	9.0%	9.7%	76.9%	0.0%	0.59	1.23	1.33	10.50	0.00	13.65
A		V				R		0.7%	3.4%	3.5%	92.1%	0.3%	0.05	0.25	0.26	6.80	0.02	7.39
A		V						0.3%	7.6%	0.0%	92.1%	0.0%	0.02	0.41	0.00	4.98	0.00	5.41
A		V				R		2.6%	8.3%	4.2%	84.7%	0.2%	0.29	0.91	0.45	9.23	0.03	10.90
A		V						0.1%	3.9%	0.5%	95.5%	0.0%	0.01	0.26	0.03	6.43	0.00	6.73
A		V				R	V22D	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.35	0.00	0.35
A		T					D138E,K213E	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A		Q	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.54	0.00	3.54
A		A	A	G		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.39	0.00	0.39
A		A	A			R	K146N	1.7%	6.4%	6.6%	85.3%	0.0%	0.25	0.90	0.93	12.10	0.00	14.18
A		A	A					1.7%	4.5%	8.2%	83.8%	1.7%	0.18	0.46	0.85	8.64	0.18	10.31
A		A		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.45	0.00	1.45
A		A		A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.65	0.00	1.65
A		A				R		1.2%	4.1%	5.6%	88.8%	0.3%	0.13	0.45	0.63	9.85	0.03	11.09

Fig. 8-8

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
								Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164	Інші зміни амінокислот											
A			A	G	R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A			A		R	S54L		5.3%	11.0%	8.2%	74.6%	0.9%	0.66	0.21	0.36	6.22	0.24	7.67
A			A		R	S54L		5.2%	9.3%	9.1%	76.5%	0.0%	0.65	0.18	0.39	6.37	0.00	7.59
A			A		R	K12M		4.4%	10.2%	7.0%	76.8%	1.6%	0.55	0.19	0.31	6.40	0.40	7.84
A			A		R	K12M		5.3%	10.1%	8.4%	75.4%	0.9%	0.66	0.19	0.36	6.28	0.22	7.72
	K	V	A	G				3.8%	8.3%	7.9%	80.0%	0.0%	0.62	1.37	1.31	13.20	0.00	16.50
	K	V	A	G				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K	V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.25	0.00	2.25
	K	V	A	A	R			0.5%	0.0%	0.0%	99.5%	0.0%	0.02	0.00	0.00	3.73	0.00	3.75
	K	V	A	A	R			0.7%	0.0%	0.0%	99.3%	0.0%	0.03	0.00	0.00	3.76	0.00	3.79
	K	V	A	A				0.7%	0.0%	0.0%	99.3%	0.0%	0.02	0.00	0.00	3.10	0.00	3.12
	K	V	A		R	A141T		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.54	0.00	4.54
	K	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.16	0.00	3.16
	K	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.68	0.00	3.68
	K	V	A		R	V62F		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	7.51	0.00	7.51
	K	V	A			P162S		2.2%	8.5%	7.5%	81.8%	0.0%	0.39	1.51	1.32	14.50	0.00	17.72
	K	V		G		R		1.2%	0.0%	0.0%	98.8%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.33
	K	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.43
	K	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.58	0.00	0.58
	K	V		A				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K	V		A		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.14	0.00	0.14
	K	V		A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.38	0.00	1.38
	K	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	6.35	0.00	6.35
	K	V			R	A35V		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.56	0.00	4.56
	K	V			R			2.7%	1.8%	0.0%	95.5%	0.0%	0.19	0.12	0.00	6.64	0.00	6.95
	K	V						2.2%	9.4%	9.5%	78.9%	0.0%	0.27	1.15	1.16	9.63	0.00	12.21
	K	V						0.0%	0.8%	1.1%	98.1%	0.0%	0.00	0.04	0.06	5.11	0.00	5.21
	K	T	A	G				6.8%	0.0%	0.0%	93.2%	0.0%	0.11	0.00	0.00	1.51	0.00	1.62
	K	Q	A		R			0.3%	2.4%	1.9%	95.4%	0.0%	0.04	0.36	0.28	14.00	0.00	14.68

Фіг. 8-9

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Інші зміни амінокислот	Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
61	72	116	133	151	163	164		Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
	K	Q	A		R			0.5%	2.5%	1.8%	95.1%	0.1%	0.07	0.38	0.28	14.20	0.01	14.93
	K	A	A	A	R			0.0%	1.8%	0.0%	98.2%	0.0%	0.00	0.13	0.00	7.33	0.00	7.46
	K	A	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.84	0.00	0.84
	K	A	A		R			1.7%	6.0%	5.6%	86.6%	0.0%	0.42	1.47	1.37	21.10	0.00	24.36
	K	A	A					1.0%	5.3%	2.4%	91.3%	0.0%	0.09	0.45	0.20	7.76	0.00	8.50
	K	A		G				6.7%	0.0%	0.0%	93.3%	0.0%	0.05	0.00	0.00	0.89	0.00	0.74
	K	A			R			0.1%	1.4%	0.9%	97.6%	0.0%	0.01	0.09	0.06	6.73	0.00	6.90
	K	A			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.17	0.00	4.17
	K	A			R			3.6%	0.4%	0.1%	95.9%	0.0%	0.20	0.02	0.01	5.34	0.00	5.57
	K	A				R		0.8%	4.7%	6.0%	88.5%	0.0%	0.05	0.32	0.40	5.92	0.00	6.69
	K	A						0.5%	5.1%	0.0%	94.5%	0.0%	0.03	0.26	0.00	4.93	0.00	5.22
	E	V	A	G	R			2.8%	2.4%	0.0%	94.8%	0.0%	0.05	0.04	0.00	1.59	0.00	1.68
	E	V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.47	0.00	1.47
	E	V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.53	0.00	1.53
	E	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.27	0.00	4.27
	E	V	A			R		0.7%	5.3%	5.7%	87.6%	0.7%	0.06	0.45	0.49	7.50	0.06	8.56
	E	V		G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.55	0.00	0.55
	E	V		G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.06
	E	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.25	0.00	2.25
	E	V			R			0.0%	4.9%	3.6%	91.5%	0.0%	0.00	0.38	0.28	7.10	0.00	7.76
	E	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.01	0.00	2.01
	E	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.03	0.00	4.03
	E	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.80	0.00	3.80
	E	V						0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.72	0.00	0.72
	E	V				R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.03	0.00	3.03
	E	V						0.0%	0.3%	0.0%	99.7%	0.0%	0.00	0.01	0.00	4.93	0.00	4.94
	E	T	A	G	R			2.8%	1.1%	1.6%	94.6%	0.0%	0.15	0.06	0.08	5.03	0.00	5.32
	E	Q	A	A	R		N55M	1.9%	1.7%	3.1%	93.4%	0.0%	0.20	0.18	0.33	9.95	0.00	10.66
	E	Q		G		R		4.4%	4.6%	6.5%	84.5%	0.0%	0.28	0.29	0.41	5.34	0.00	6.32

Фіг. 8-10

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Інші зміни амінокислот	Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
61	72	116	133	151	163	164		Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
	E	A	A	G	R			0.0%	2.8%	0.0%	97.2%	0.0%	0.00	0.11	0.00	3.75	0.00	3.86
	E	A	A	G	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.36	0.00	1.36
	E	A	A	G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01
	E	A	A	A	R			0.2%	2.9%	5.0%	91.1%	0.8%	0.02	0.27	0.47	8.50	0.08	9.33
	E	A	A	A				1.3%	5.3%	6.6%	86.3%	0.5%	0.08	0.34	0.42	5.55	0.03	6.43
	E	A	A			R		0.0%	5.6%	1.7%	92.6%	0.0%	0.00	0.40	0.12	6.59	0.00	7.12
	E	A		G	R			Низький	Низький	Низь- кий	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	E	A		G	R			0.0%	0.0%	0.9%	99.1%	0.0%	0.00	0.00	0.03	3.25	0.00	3.28
	E	A		G	R			0.0%	3.8%	3.1%	93.1%	0.0%	0.00	0.16	0.13	3.86	0.00	4.15
	E	A				R		4.1%	14.7%	9.4%	68.8%	3.0%	0.34	1.21	0.78	5.67	0.25	8.24
	E	A						1.3%	6.4%	1.0%	90.9%	0.5%	0.08	0.40	0.06	5.69	0.03	6.26
	E		A	A		R	A35V	2.9%	6.3%	7.6%	83.2%	0.0%	0.51	1.13	1.36	14.90	0.00	17.90
	E					R	K12M	5.4%	14.5%	16.2%	60.6%	3.3%	1.06	2.86	3.21	12.00	0.66	19.79
	E		A			R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.27	0.00	5.27
	E					R		0.4%	3.1%	3.5%	93.0%	0.0%	0.04	0.38	0.43	11.30	0.00	12.15
	E					R	V128A	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.79	0.00	3.79
		V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.54	0.00	0.54
		V	A	A	R			2.9%	7.7%	9.0%	78.5%	1.8%	0.43	1.13	1.32	11.50	0.27	14.65
		V	A	A	R			1.8%	0.0%	0.0%	98.2%	0.0%	0.07	0.00	0.00	3.72	0.00	3.79
		V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.85	0.00	3.85
		V	A					2.8%	8.2%	9.4%	79.6%	0.0%	0.28	0.84	0.97	8.15	0.00	10.24
		V		G				1.9%	0.0%	0.0%	98.1%	0.0%	0.04	0.00	0.00	1.90	0.00	1.94
		V				R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.16	0.00	1.16
		V						Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		V						0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.67	0.00	1.67
		A	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.08	0.00	5.08
		A	A		R			0.3%	1.7%	2.1%	95.9%	0.0%	0.02	0.15	0.19	8.42	0.00	8.78
		A	A		R			2.2%	6.7%	7.1%	84.0%	0.0%	0.38	1.16	1.23	14.60	0.00	17.37
		A	A		R			7.3%	8.6%	5.2%	71.8%	7.1%	0.79	0.92	0.56	7.72	0.77	10.76

Fig. 8-11

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Інші зміни амінокислот	Вторинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
61	72	116	133	151	163	164		Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Загальна ЖК
		A	A				P179Q	0.3%	2.6%	6.3%	90.7%	0.0%	0.02	0.17	0.41	5.83	0.00	6.42
		A	A			R		0.0%	5.7%	8.7%	85.2%	0.5%	0.00	0.32	0.50	4.87	0.03	5.72
		A		A	R			Низький	Низький	Низь- кий	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		A		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.73	0.00	0.73
		A			R			3.0%	8.2%	7.2%	81.4%	0.2%	0.92	2.55	2.24	25.30	0.06	31.07
		A			R			Низький	Низький	Низь- кий	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		A				R		0.9%	6.1%	4.8%	87.1%	1.1%	0.06	0.43	0.34	6.15	0.08	7.06
		A				R		2.9%	4.5%	10.1%	80.9%	1.6%	0.22	0.34	0.77	6.15	0.12	7.61
								5.1%	14.5%	17.4%	61.2%	1.7%	0.75	2.12	2.55	8.96	0.26	14.63
							мас	0.0%	1.4%	0.8%	97.8%	0.0%	0.00	0.24	0.14	17.00	0.00	17.38
	K	T		A	R		Змішаний	5.5%	10.4%	6.4%	76.1%	1.5%	0.69	0.20	0.28	6.34	0.37	7.88
	K	T		A	R			5.5%	8.7%	5.6%	80.1%	0.0%	0.69	0.16	0.24	6.68	0.00	7.78
	K	Q	A	A				4.4%	8.7%	9.9%	74.8%	2.2%	0.54	0.16	0.43	6.24	0.54	7.92
	K	Q	A	A				7.6%	11.1%	9.4%	71.9%	0.0%	0.95	0.21	0.41	5.99	0.00	7.56
	K	Q	A	G	R			3.6%	7.6%	7.7%	80.1%	1.0%	0.46	0.14	0.33	6.67	0.25	7.86
	K	Q	A	G	R			3.7%	8.1%	5.8%	82.4%	0.0%	0.46	0.15	0.25	6.86	0.00	7.73
	K		A		R			4.3%	10.0%	6.7%	78.1%	0.9%	0.54	0.19	0.29	6.51	0.23	7.76
	K		A		R			4.0%	9.9%	6.3%	79.6%	0.2%	0.50	0.19	0.28	6.64	0.04	7.64
	E		A	A	R			3.5%	10.9%	7.9%	74.9%	2.8%	0.44	0.21	0.34	6.24	0.70	7.93
	E		A	A	R			5.6%	13.2%	7.2%	74.0%	0.0%	0.70	0.25	0.31	6.17	0.00	7.43
	E			G		R		5.7%	12.8%	11.1%	67.5%	2.9%	0.72	0.24	0.48	5.62	0.72	7.79
	E			G		R		7.1%	13.9%	12.4%	64.9%	1.8%	0.88	0.26	0.54	5.41	0.45	7.54
	E			A		R		5.7%	11.9%	11.1%	69.5%	1.9%	0.71	0.22	0.48	5.79	0.47	7.67
	E			A		R		6.6%	13.2%	10.9%	68.2%	1.1%	0.82	0.25	0.48	5.68	0.26	7.50
		Q		A	R		A97V	3.6%	7.6%	6.2%	80.9%	1.5%	0.47	0.14	0.27	6.74	0.38	8.00
		Q		A	R		A97V	4.1%	7.7%	5.9%	82.3%	0.0%	0.51	0.15	0.26	6.86	0.00	7.77
			A		R			0.6%	4.3%	3.6%	91.4%	0.0%	0.06	0.42	0.35	8.87	0.00	9.70

Фіг. 8-11

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Первинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
E	K	V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	14.20	0.00	14.20
E	K	V	A	A				0.0%	5.4%	0.0%	94.6%	0.0%	0.00	0.52	0.00	9.01	0.00	9.53
E	K	V	A			R		2.5%	4.9%	3.4%	89.2%	0.0%	1.23	2.44	1.69	44.10	0.00	49.46
E	K	V		G	R			0.0%	5.2%	0.0%	94.8%	0.0%	0.00	0.18	0.00	3.27	0.00	3.45
E	K	V		A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.69	0.00	4.69
E	K	V			R			1.5%	3.7%	2.6%	92.2%	0.0%	0.67	1.69	1.19	42.20	0.00	45.75
E	K	V			R			0.3%	5.3%	6.1%	88.2%	0.0%	0.03	0.50	0.57	8.23	0.00	9.33
E	K	V				R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	19.70	0.00	19.70
E	K	V						0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	12.70	0.00	12.70
E	K	T		A	R			3.5%	8.3%	11.9%	76.3%	0.0%	1.31	3.16	4.52	28.90	0.00	37.89
E	K	T		A	R			3.5%	8.3%	11.9%	76.3%	0.0%	1.31	3.16	4.52	28.90	0.00	37.89
E	K	T		A	R			3.5%	8.3%	11.9%	76.3%	0.0%	1.31	3.16	4.52	28.90	0.00	37.89
E	K	Q		A	R			5.9%	12.1%	11.4%	67.4%	3.2%	5.51	11.30	10.60	62.80	2.97	93.18
E	K	Q		A	R			5.9%	12.1%	11.4%	67.4%	3.2%	5.51	11.30	10.60	62.80	2.97	93.18
E	K	Q		A	R			5.3%	11.8%	13.4%	66.9%	2.5%	4.65	10.40	11.80	58.70	2.23	87.78
E	K	Q		A	R			5.3%	11.8%	13.4%	66.9%	2.5%	4.65	10.40	11.80	58.70	2.23	87.78
E	K	A	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	19.50	0.00	19.50
E	K	A	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	19.00	0.00	19.00
E	K	A	A			R		0.0%	2.5%	0.0%	97.5%	0.0%	0.00	0.21	0.00	8.16	0.00	8.37
E	K	A		G	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.28	0.00	3.28
E	K	A		A				2.6%	6.4%	6.1%	84.9%	0.0%	0.67	1.64	1.57	21.90	0.00	25.78
E	K	A		A				0.0%	6.0%	3.2%	90.7%	0.0%	0.00	0.77	0.41	11.50	0.00	12.67
E	K	A				R		0.0%	6.5%	4.6%	88.9%	0.0%	0.00	1.19	0.85	16.30	0.00	18.34
E	K	A				R		0.0%	7.8%	2.8%	89.4%	0.0%	0.00	1.04	0.37	11.90	0.00	13.31
E	K	A				R		0.0%	2.0%	2.0%	96.0%	0.0%	0.00	0.43	0.45	21.10	0.00	21.98
E	K	A				R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	17.10	0.00	17.10
E	K		A	G		R	S18G,K12M	Низький	Низький	Низький	Висок	Низький	0.00	0.00	0.00	Висок	0.00	0.00
E	K		A	A	R		L86M	0.0%	11.8%	7.3%	76.8%	4.0%	0.01	4.44	2.77	29.00	1.52	37.74
E	K		A	A	R		L86M	0.0%	11.8%	7.3%	76.8%	4.0%	0.01	4.44	2.77	29.00	1.52	37.74

Фіг. 8-13

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Первинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- мити- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- мити- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
E	K		A	A				8.0%	12.6%	16.2%	63.2%	0.0%	5.42	8.48	10.90	42.60	0.00	67.40
E	K		A	A			K12M	4.4%	7.9%	15.9%	71.7%	0.0%	2.56	4.55	9.20	41.40	0.02	57.73
E	K		A	A			K12M	4.4%	7.9%	15.9%	71.7%	0.0%	2.56	4.55	9.20	41.40	0.02	57.73
E	K		A				W17L	11.2%	7.5%	19.3%	55.6%	6.4%	3.04	2.03	5.25	15.10	1.74	27.16
E	K		A			R		3.0%	11.9%	11.7%	73.3%	0.0%	1.17	4.60	4.52	28.30	0.00	38.59
E	K		A			R		3.0%	11.9%	11.7%	73.3%	0.0%	1.17	4.60	4.52	28.30	0.00	38.59
E	K				R			3.9%	7.7%	6.3%	76.5%	5.5%	2.19	4.34	3.54	43.00	3.11	56.18
E	E	V	A	A		R		2.4%	3.9%	3.2%	90.5%	0.0%	0.46	0.77	0.63	17.70	0.00	19.56
E	E	V	A	A				1.1%	2.7%	2.6%	93.6%	0.0%	0.16	0.38	0.37	13.30	0.00	14.21
E	E	V	A		R			1.2%	2.6%	2.6%	93.6%	0.0%	0.14	0.29	0.30	10.70	0.00	11.43
E	E	V	A				A52S	1.1%	6.3%	4.6%	88.0%	0.0%	0.09	0.53	0.39	7.40	0.00	8.41
E	E	V	A				A52S	7.1%	11.2%	24.7%	56.6%	0.5%	3.04	4.83	10.60	24.30	0.19	42.96
E	E	V	A			R		2.3%	8.2%	3.9%	83.8%	1.8%	0.24	0.88	0.42	8.95	0.19	10.67
E	E	V	A					2.2%	2.1%	3.0%	91.7%	1.1%	0.36	0.35	0.50	15.30	0.18	16.68
E	E	V	A			R		0.0%	2.9%	0.0%	97.1%	0.0%	0.00	0.32	0.00	10.80	0.00	11.12
E	E	V		G				0.2%	12.9%	5.0%	82.0%	0.0%	0.01	0.53	0.21	3.39	0.00	4.14
E	E	V			R			1.4%	4.4%	2.8%	91.0%	0.4%	0.19	0.60	0.38	12.50	0.06	13.73
E	E	V						1.2%	7.9%	3.8%	87.2%	0.0%	0.07	0.45	0.22	5.00	0.00	5.74
E	E	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.73	0.00	0.73
E	E	V		G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00
E	E	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.98	0.00	5.98
E	E	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.83	0.00	5.83
E	E	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	12.50	0.00	12.50
E	E	V			R			0.0%	6.9%	0.9%	92.2%	0.0%	0.00	0.23	0.03	3.04	0.00	3.30
E	E	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	15.00	0.00	15.00
E	E	T			R			3.6%	6.8%	4.2%	85.4%	0.0%	0.82	1.54	0.95	19.30	0.00	22.60
E	E	Q	A	G				0.0%	17.5%	8.2%	74.3%	0.0%	0.00	1.17	0.55	4.98	0.00	6.70
E	E	Q	A	G				0.0%	17.5%	8.2%	74.3%	0.0%	0.00	1.17	0.55	4.98	0.00	6.70
E	E	A	A	G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01

Fig. 8-14

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Первинний скринінг												
							Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)							
												Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова
61	72	116	133	151	163	164													
E	E	A	A	G				0.0%	8.5%	0.0%	91.5%	0.0%	0.00	0.38	0.00	4.09	0.00	4.47	
E	E	A	A	A	R			1.3%	3.5%	3.5%	91.8%	0.0%	0.34	0.93	0.93	24.60	0.00	26.80	
E	E	A	A	A	R			0.0%	3.0%	0.0%	97.0%	0.0%	0.00	0.41	0.00	13.20	0.00	13.61	
E	E	A	A	A				1.4%	4.9%	4.0%	87.4%	2.3%	0.31	1.11	0.91	19.90	0.53	22.76	
E	E	A	A		R			3.2%	4.1%	3.7%	88.9%	0.0%	1.22	1.56	1.41	33.70	0.00	37.89	
E	E	A	A					0.1%	5.5%	5.9%	88.4%	0.0%	0.02	0.76	0.82	12.30	0.00	13.91	
E	E	A	A					0.0%	0.0%	1.5%	98.5%	0.0%	0.00	0.00	0.29	18.50	0.00	18.79	
E	E	A	A			R		0.0%	0.3%	0.0%	99.7%	0.0%	0.00	0.02	0.00	6.23	0.00	6.25	
E	E	A		A		R		11.1%	54.2%	26.3%	Високий	8.4%	0.99	4.81	2.33	Високий	0.74	8.87	
E	E	A		A				0.0%	6.3%	4.6%	89.1%	0.0%	0.00	0.78	0.57	11.00	0.00	12.35	
E	E	A		A		R		0.0%	5.7%	4.5%	89.9%	0.0%	0.00	0.85	0.67	13.40	0.00	14.91	
E	E	A			R			0.0%	1.4%	0.0%	98.6%	0.0%	0.00	0.16	0.00	11.40	0.00	11.56	
E	E	A			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	8.61	0.00	8.61	
E	E	A			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	28.30	0.00	28.30	
E	E		A	G				5.6%	18.7%	11.5%	61.3%	2.8%	2.86	9.52	5.86	31.20	1.44	50.88	
E	E		A	G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.94	0.00	0.94	
E	E		A	A	R			0.3%	10.6%	12.8%	76.2%	0.0%	0.06	1.90	2.29	13.60	0.00	17.85	
E	E		A	A	R		P18S,A21V	2.2%	7.7%	3.3%	83.7%	3.2%	0.24	0.87	0.37	9.43	0.36	11.26	
E	E		A	A	R			0.3%	10.6%	12.8%	76.2%	0.0%	0.06	1.90	2.29	13.60	0.00	17.85	
E	E		A	A	R			0.3%	10.6%	12.8%	76.2%	0.0%	0.06	1.90	2.29	13.60	0.00	17.85	
E	E		A	A	R			0.1%	12.0%	4.3%	83.6%	0.0%	0.02	2.74	0.99	19.10	0.00	22.85	
E	E		A	A	R			0.1%	12.0%	4.3%	83.6%	0.0%	0.02	2.74	0.99	19.10	0.00	22.85	
E	E		A		R		K12M	3.0%	10.0%	12.4%	71.8%	2.7%	0.82	2.69	3.36	19.40	0.73	27.00	
E	E		A		R		K12M	3.0%	10.0%	12.4%	71.8%	2.7%	0.82	2.69	3.36	19.40	0.73	27.00	
E	E			G	R			0.0%	18.2%	5.5%	76.4%	0.0%	0.00	1.47	0.44	6.18	0.00	8.09	
E	E			G		R		12.8%	9.1%	15.4%	60.3%	2.4%	4.47	3.19	5.40	21.10	0.84	35.00	
E	E			A	R			0.2%	10.5%	10.0%	79.4%	0.0%	0.05	3.53	3.35	26.70	0.00	33.63	
E	E			G	R		F65V	0.0%	0.0%	2.1%	84.0%	13.9%	0.00	0.00	0.51	20.40	3.37	24.28	
E	E			G	R		F65V	0.0%	0.0%	2.1%	84.0%	13.9%	0.00	0.00	0.51	20.40	3.37	24.28	

Fig. 8-15

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Первинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
E		V	A	G	R			1.8%	9.3%	4.3%	83.8%	0.9%	0.11	0.57	0.26	5.13	0.05	6.12
E		V	A	G				1.4%	12.3%	5.4%	80.9%	0.0%	0.07	0.64	0.28	4.18	0.00	5.17
E		V	A	A	R			2.6%	5.9%	5.8%	85.7%	0.0%	0.56	1.25	1.24	18.30	0.00	21.35
E		V	A	A	R			0.0%	1.6%	0.0%	98.4%	0.0%	0.00	0.09	0.00	5.58	0.00	5.67
E		V	A	A	R			2.9%	6.4%	3.8%	85.8%	1.1%	0.80	1.76	1.04	23.70	0.31	27.62
E		V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	9.14	0.00	9.14
E		V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	9.13	0.00	9.13
E		V	A		R													
E		V	A		R			2.3%	4.8%	3.5%	88.3%	1.0%	0.36	0.73	0.55	13.60	0.16	15.40
E		V	A		R			1.9%	4.0%	3.1%	90.9%	0.0%	0.84	1.77	1.37	39.90	0.00	43.88
E		V	A					0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	8.55	0.00	8.55
E		V		A	R			0.0%	2.5%	0.0%	97.5%	0.0%	0.00	0.33	0.00	12.60	0.00	12.93
E		V			R			18.2%	39.1%	29.5%	Високий	13.2%	0.47	1.01	0.76	Високий	0.34	2.58
E		V				R		0.0%	2.9%	0.0%	97.1%	0.0%	0.00	0.24	0.00	7.89	0.00	8.13
E		Q						6.4%	8.1%	14.7%	70.6%	0.2%	2.57	3.28	5.92	28.40	0.08	40.25
E		Q	A			R		8.9%	5.3%	25.6%	57.2%	2.9%	1.92	1.15	5.51	12.30	0.63	21.51
E		Q		A	R			1.4%	7.1%	5.8%	85.7%	0.0%	0.32	1.63	1.33	19.60	0.00	22.88
E		A	A	G	R			0.0%	0.9%	0.0%	99.1%	0.0%	0.00	0.08	0.00	8.13	0.00	8.21
E		A	A	A				0.0%	11.4%	1.3%	87.3%	0.0%	0.00	0.31	0.04	2.36	0.00	2.70
E		A	A					0.0%	3.2%	5.2%	91.5%	0.0%	0.00	0.75	1.21	21.10	0.00	23.06
E		A		A	R			0.0%	13.2%	0.0%	86.8%	0.0%	0.00	0.22	0.00	1.45	0.00	1.67
E		A		A	R			2.7%	6.1%	4.5%	86.0%	0.6%	1.90	4.28	3.17	60.20	0.42	69.97
E		A		A				0.0%	7.5%	4.3%	88.3%	0.0%	0.00	0.75	0.43	8.86	0.00	10.04
E		A		A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	11.80	0.00	11.80
E		A			R		G132V	2.5%	5.1%	3.9%	88.4%	0.0%	0.06	0.12	0.09	2.00	0.00	2.26
E		A				R		0.0%	9.1%	5.5%	84.8%	0.6%	0.00	1.44	0.87	13.40	0.09	15.80
E				G	R		K12M	9.4%	24.0%	20.5%	40.6%	5.5%	6.69	17.00	14.50	28.80	3.89	70.88
E				G		R	K12M	9.4%	24.0%	20.5%	40.6%	5.5%	6.69	17.00	14.50	28.80	3.89	70.88
E				A			A15S	8.5%	15.4%	18.9%	53.7%	3.5%	9.98	18.00	22.10	62.70	4.03	116.81

Фіг. 8-16

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Інші зміни амінокислот	Первинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
61	72	116	133	151	163	164	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК	
E			A	A	R													
E		Q			R		2.3%	6.6%	6.7%	82.3%	2.1%	2.29	6.75	6.81	83.60	2.09	101.54	
E		Q			R		2.3%	6.6%	6.7%	82.3%	2.1%	2.29	6.75	6.81	83.60	2.09	101.54	
E		Q	A	G		R	Низький	Низький	Низький	Високий	Низький	0.00	0.00	0.00	Високий	0.00	0.00	
E		Q	A	G		R	Низький	Низький	Низький	Високий	Низький	0.00	0.00	0.00	Високий	0.00	0.00	
E					R		3.7%	8.4%	8.2%	79.7%	0.0%	3.20	7.17	6.97	68.00	0.00	85.34	
E					R		3.7%	8.4%	8.2%	79.7%	0.0%	3.20	7.17	6.97	68.00	0.00	85.34	
E			A			R	4.9%	8.6%	9.9%	76.5%	0.0%	2.92	5.12	5.91	45.50	0.00	59.45	
E			A			R	4.9%	8.6%	9.9%	76.5%	0.0%	2.92	5.12	5.91	45.50	0.00	59.45	
E			A		R		4.5%	9.7%	10.7%	72.9%	2.2%	6.00	12.90	14.30	97.00	2.89	133.09	
E			A		R		4.5%	9.7%	10.7%	72.9%	2.2%	6.00	12.90	14.30	97.00	2.89	133.09	
A	K	V	A	A	R		0.3%	6.6%	3.1%	90.0%	0.0%	0.02	0.39	0.18	5.33	0.00	5.92	
A	K	V	A	A	R		0.0%	1.5%	0.0%	98.5%	0.0%	0.00	0.12	0.00	7.53	0.00	7.65	
A	K	V	A	A														
A	K	V	A	A			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	8.48	0.00	8.48	
A	K	V	A	A			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.67	0.00	5.67	
A	K	V	A	A			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	8.05	0.00	8.05	
A	K	V	A			R	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	12.70	0.00	12.70	
A	K	V		A	R		1.7%	4.7%	4.4%	87.5%	1.7%	0.44	1.19	1.12	22.30	0.43	25.48	
A	K	V		A	R		0.0%	0.7%	0.0%	99.3%	0.0%	0.00	0.07	0.00	9.38	0.00	9.45	
A	K	V				R	1.6%	7.2%	3.5%	87.7%	0.0%	0.15	0.68	0.33	8.21	0.00	9.37	
A	K	V				R	2.4%	7.7%	4.1%	84.8%	0.9%	0.35	1.16	0.62	12.70	0.14	14.97	
A	K	V					3.9%	9.5%	5.3%	80.5%	0.8%	0.60	1.44	0.80	12.20	0.12	15.16	
A	K	V					0.0%	2.2%	0.0%	97.8%	0.0%	0.00	0.17	0.00	7.70	0.00	7.87	
A	K	T	A	A			4.8%	8.0%	12.9%	74.4%	0.0%	1.02	1.69	2.74	15.80	0.00	21.25	
A	K	T	A	A			4.8%	8.0%	12.9%	74.4%	0.0%	1.02	1.69	2.74	15.80	0.00	21.25	
A	K	T	A		R		1.6%	11.9%	6.6%	79.9%	0.0%	0.47	3.49	1.92	23.40	0.00	29.28	
A	K	T	A		R		1.6%	11.9%	6.6%	79.9%	0.0%	0.47	3.49	1.92	23.40	0.00	29.28	
A	K	Q	A	G		A48S												

Фіг. 8-17

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Первинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- мити- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- мити- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
A	K	Q		G	R			1.3%	4.5%	4.2%	89.9%	0.0%	0.69	2.43	2.27	48.20	0.00	53.59
A	K	Q		G	R			1.3%	4.5%	4.2%	89.9%	0.0%	0.69	2.43	2.27	48.20	0.00	53.59
A	K	A	A		R			2.4%	6.6%	3.2%	87.8%	0.0%	1.22	3.27	1.61	43.80	0.00	49.90
A	K	A	A		R			1.6%	3.7%	2.3%	92.3%	0.0%	0.94	2.20	1.38	54.40	0.00	58.92
A	K	A	A		R			1.6%	7.6%	5.1%	85.7%	0.0%	0.14	0.68	0.46	7.62	0.00	8.90
A	K	A		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	14.90	0.00	14.90
A	K	A		A				3.3%	8.2%	7.1%	80.5%	0.9%	0.38	0.95	0.83	9.36	0.11	11.62
A	K	A			R			2.0%	7.9%	5.6%	84.6%	0.0%	0.21	0.81	0.57	8.70	0.00	10.29
A	K	A				R		0.0%	6.7%	3.7%	89.6%	0.0%	0.00	1.09	0.59	14.50	0.00	16.18
A	K		A	G		R		5.0%	4.7%	17.5%	72.8%	0.0%	1.44	1.35	5.05	21.00	0.00	28.84
A	K		A	G		R		5.0%	4.7%	17.5%	72.8%	0.0%	1.44	1.35	5.05	21.00	0.00	28.84
A	K		A	A	R			0.3%	12.7%	9.3%	77.6%	0.0%	0.09	3.63	2.66	22.10	0.00	28.48
A	K		A	A	R			0.3%	12.7%	9.3%	77.6%	0.0%	0.09	3.63	2.66	22.10	0.00	28.48
A	K		A	A	R	A48S		0.3%	12.7%	9.3%	77.6%	0.0%	0.09	3.63	2.66	22.10	0.00	28.48
A	K		A	A	R	A48S		0.3%	12.7%	9.3%	77.6%	0.0%	0.09	3.63	2.66	22.10	0.00	28.48
A	K		A		R			3.4%	8.7%	11.8%	76.1%	0.0%	1.28	3.29	4.49	28.90	0.00	37.96
A	K		A		R			3.4%	8.7%	11.8%	76.1%	0.0%	1.28	3.29	4.49	28.90	0.00	37.96
A	K			A	R			1.8%	10.0%	3.7%	83.8%	0.6%	0.19	1.04	0.39	8.70	0.06	10.38
A	K				R	K12M		13.4%	5.3%	21.4%	51.1%	8.8%	3.70	1.46	5.90	14.10	2.42	27.58
A	K							9.0%	16.7%	17.4%	51.6%	5.3%	3.74	6.92	7.21	21.40	2.21	41.48
A	K			A	R			0.0%	10.0%	7.6%	82.4%	0.0%	0.00	1.82	1.38	15.00	0.00	18.20
A	K			A	R			0.0%	10.0%	7.6%	82.4%	0.0%	0.00	1.82	1.38	15.00	0.00	18.20
A	K			A	R			1.6%	3.9%	18.7%	75.8%	0.0%	0.59	1.42	6.76	27.40	0.00	36.17
A	K			A	R			1.6%	3.9%	18.7%	75.8%	0.0%	0.59	1.42	6.76	27.40	0.00	36.17
A	E	V	A	G		R	G99C	2.5%	5.6%	4.6%	87.0%	0.4%	0.57	1.29	1.06	20.20	0.09	23.21
A	E	V	A	A	R			0.6%	2.3%	3.1%	94.0%	0.0%	0.12	0.43	0.59	17.80	0.00	18.94
A	E	V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	7.03	0.00	7.03
A	E	V	A		R			1.7%	4.4%	2.8%	90.9%	0.3%	0.20	0.52	0.34	10.90	0.03	12.00
A	E	V	A		R			0.1%	1.0%	1.0%	98.0%	0.0%	0.01	0.15	0.14	14.10	0.00	14.39

Фіг. 8-18

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Первинний скринінг											
							Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)						
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
A	E	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.62	0.00	0.62
A	E	V	A					0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.97	0.00	3.97
A	E	V		G				0.0%	11.2%	2.6%	86.1%	0.0%	0.00	0.46	0.11	3.56	0.00	4.13
A	E	V		A	R			0.5%	0.0%	0.0%	99.5%	0.0%	0.04	0.00	0.00	9.40	0.00	9.44
A	E	V		A	R			0.1%	0.0%	1.2%	98.7%	0.0%	0.02	0.00	0.12	10.10	0.00	10.23
A	E	V		A	R			1.2%	2.2%	1.1%	95.5%	0.0%	0.20	0.35	0.17	15.20	0.00	15.92
A	E	V		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	9.77	0.00	9.77
A	E	V		A		R		2.9%	9.7%	5.3%	82.1%	0.0%	0.31	1.04	0.57	8.80	0.00	10.72
A	E	V		A		R		0.0%	1.3%	0.0%	98.7%	0.0%	0.00	0.09	0.00	6.64	0.00	6.73
A	E	V				R		1.5%	4.6%	3.3%	89.2%	1.4%	0.59	1.87	1.32	36.10	0.58	40.46
A	E	V						0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	10.90	0.00	10.90
A	E	Q	A	A	R			1.4%	8.5%	3.0%	87.2%	0.0%	0.21	1.28	0.45	13.20	0.00	15.14
A	E	Q		G														
A	E	Q		G														
A	E	A	A	G		R		4.2%	1.2%	94.6%	0.0%	94.6%	0.10	0.03	2.27	0.00	2.40	
A	E	A	A		R			1.1%	1.9%	2.5%	92.2%	2.3%	0.44	0.70	0.96	34.90	0.86	37.86
A	E	A	A		R			1.4%	8.1%	5.4%	85.0%	0.0%	0.11	0.62	0.42	6.53	0.00	7.68
A	E	A	A					0.0%	1.6%	1.3%	97.1%	0.0%	0.00	0.35	0.29	21.20	0.00	21.84
A	E	A	A			R		0.0%	7.1%	4.6%	88.3%	0.0%	0.00	1.02	0.66	12.70	0.00	14.38
A	E	A		G		R		0.0%	3.4%	0.0%	96.6%	0.0%	0.00	0.03	0.00	0.73	0.00	0.76
A	E	A		A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	11.40	0.00	11.40
A	E	A		A		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	8.22	0.00	8.22
A	E	A		A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	12.00	0.00	12.00
A	E							10.3%	7.0%	23.5%	58.2%	0.9%	2.56	1.73	5.82	14.40	0.23	24.74
A	E					R		3.9%	10.4%	7.6%	77.1%	1.0%	1.09	2.92	2.12	21.60	0.28	28.01
A	E					R		3.9%	10.4%	7.6%	77.1%	1.0%	1.09	2.92	2.12	21.60	0.28	28.01
A	E			A	R		K12M	4.4%	5.5%	9.5%	80.6%	0.0%	1.83	2.31	4.00	33.90	0.00	42.04
A	E			A	R		K12M	4.4%	5.5%	9.5%	80.6%	0.0%	1.83	2.31	4.00	33.90	0.00	42.04
A		V	A	A	R			1.4%	0.9%	2.4%	95.3%	0.0%	0.27	0.19	0.48	18.90	0.00	19.83

Фіг. 8-19

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Первинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
A		V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	9.82	0.00	9.82
A		V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	11.30	0.00	11.30
A		V	A		R			3.1%	5.4%	2.9%	87.4%	1.2%	0.38	0.65	0.35	10.60	0.15	12.13
A		V	A		R			3.1%	5.1%	4.0%	87.8%	0.0%	1.41	2.34	1.85	40.40	0.00	46.00
A		V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	8.05	0.00	8.05
A		V	A			R		3.3%	6.7%	5.0%	85.0%	0.0%	0.98	1.98	1.50	25.30	0.00	29.76
A		V	A			R		0.0%	5.3%	2.0%	92.7%	0.0%	0.00	0.74	0.28	12.80	0.00	13.81
A		V	A			R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	13.90	0.00	13.90
A		V	A			R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	22.80	0.00	22.80
A		V	A			R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.39	0.00	5.39
A		V	A			R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.39	0.00	5.39
A		V		G	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.21	0.00	1.21
A		V		A		R		2.8%	9.6%	6.2%	81.4%	0.0%	0.29	0.98	0.64	8.31	0.00	10.21
A		V				R		2.5%	5.4%	5.2%	86.5%	0.4%	1.16	2.48	2.39	39.80	0.21	46.04
A		V				R		0.0%	6.2%	0.7%	93.2%	0.0%	0.00	0.82	0.09	12.40	0.00	13.31
A		V						0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	8.62	0.00	8.62
A		V				R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	15.40	0.00	15.40
A		V						0.0%	0.8%	0.0%	99.2%	0.0%	0.00	0.06	0.00	7.27	0.00	7.33
A		V				R	V22D	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.85	0.00	0.85
A		T					D138E,K213E	18.1%	44.5%	28.1%	Високий	9.3%	0.42	1.04	0.66	Високий	0.22	2.34
A		Q	A	A	R			3.9%	8.9%	6.2%	77.1%	4.0%	3.33	7.59	5.26	65.70	3.38	85.26
A		A	A	G		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	3.72	0.00	3.72
A		A	A		R		K146N	16.4%	41.1%	28.3%	Високий	14.2%	0.56	1.39	0.96	Високий	0.48	3.38
A		A	A					0.0%	0.0%	3.1%	96.9%	0.0%	0.00	0.00	0.57	17.70	0.00	18.27
A		A		A	R			13.9%	39.1%	35.5%	Високий	11.4%	0.62	1.75	1.59	Високий	0.51	4.47
A		A		A				0.0%	7.7%	5.6%	86.6%	0.0%	0.00	0.98	0.71	10.90	0.00	12.58
A		A			R			0.0%	2.5%	0.8%	96.7%	0.0%	0.00	0.43	0.14	16.50	0.00	17.07
A			A	G	R			10.3%	8.7%	14.8%	58.5%	7.7%	2.66	2.25	3.83	15.10	1.99	25.83
A			A		R		S54L	4.1%	11.2%	11.3%	70.6%	2.8%	1.96	5.43	5.45	34.10	1.35	48.29

Фіг. 8-20

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Інші зміни амінокислот	Первинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
61	72	116	133	151	163	164		Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- рино- ва	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- рино- ва	Зага- льна ЖК
A			A		R		S54L	4.1%	11.2%	11.3%	70.6%	2.8%	1.96	5.43	5.45	34.10	1.35	48.29
A			A		R		K12M	2.2%	13.6%	12.0%	72.1%	0.0%	0.42	2.57	2.27	13.60	0.00	18.86
A			A		R		K12M	2.2%	13.6%	12.0%	72.1%	0.0%	0.42	2.57	2.27	13.60	0.00	18.86
	K	V	A	G				2.9%	5.8%	4.1%	87.2%	0.0%	1.23	2.44	1.70	36.50	0.00	41.87
	K	V	A	G				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K	V	A	A	R													
	K	V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.18	0.00	4.18
	K	V	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.07	0.00	4.07
	K	V	A	A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.64	0.00	4.64
	K	V	A		R		A141T	1.2%	6.0%	3.8%	89.0%	0.0%	0.11	0.53	0.33	7.76	0.00	8.72
	K	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	7.10	0.00	7.10
	K	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	23.50	0.00	23.50
	K	V	A		R		V62F	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	6.40	0.00	6.40
	K	V	A				P162S	2.2%	6.7%	3.8%	87.3%	0.0%	1.00	3.03	1.71	39.30	0.00	45.04
	K	V		G		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.52	0.00	0.52
	K	V		A	R			1.3%	4.9%	3.0%	89.5%	1.4%	0.16	0.63	0.38	11.40	0.17	12.74
	K	V		A	R			1.2%	5.5%	2.0%	91.3%	0.0%	0.29	1.31	0.47	21.60	0.00	23.67
	K	V		A				1.7%	4.4%	3.5%	90.4%	0.0%	0.36	0.92	0.72	18.80	0.00	20.80
	K	V		A		R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.77	0.00	5.77
	K	V		A				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	9.05	0.00	9.05
	K	V			R			0.6%	7.2%	3.1%	89.2%	0.0%	0.06	0.79	0.34	9.83	0.00	11.02
	K	V			R		A35V	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	21.10	0.00	21.10
	K	V			R			0.2%	6.1%	1.6%	92.2%	0.0%	0.01	0.31	0.08	4.72	0.00	5.12
	K	V						3.4%	6.2%	4.6%	85.8%	0.0%	1.33	2.44	1.80	33.60	0.00	39.17
	K	V						0.0%	7.4%	0.1%	92.6%	0.0%	0.00	0.99	0.01	12.40	0.00	13.40
	K	T	A	G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.75	0.00	0.75
	K	Q	A		R			2.3%	8.6%	4.1%	84.9%	0.0%	1.25	4.56	2.20	45.20	0.00	53.21
	K	Q	A		R			0.6%	5.1%	3.6%	90.4%	0.3%	0.16	1.30	0.90	22.90	0.07	25.33
	K	A	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	29.70	0.00	29.70

Фіг. 8-21

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Первинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
	K	A	A	A				2.8%	5.4%	5.9%	84.0%	1.9%	0.66	1.27	1.40	19.80	0.46	23.58
	K	A	A		R			1.8%	5.3%	3.0%	89.5%	0.4%	1.71	4.92	2.78	83.70	0.39	93.50
	K	A	A					0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	15.30	0.00	15.30
	K	A		G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.65	0.00	0.65
	K	A			R			0.0%	1.6%	0.0%	98.4%	0.0%	0.00	0.21	0.00	12.90	0.00	13.11
	K	A			R			1.7%	8.6%	4.0%	85.8%	0.0%	0.14	0.70	0.33	6.98	0.00	8.14
	K	A			R			0.9%	8.9%	5.8%	84.4%	0.0%	0.06	0.61	0.40	5.80	0.00	6.88
	K	A				R		0.0%	5.4%	0.7%	93.9%	0.0%	0.00	0.57	0.08	9.83	0.00	10.47
	K	A						0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	20.50	0.00	20.50
	E	V	A	G	R			0.0%	2.4%	0.0%	97.6%	0.0%	0.00	0.07	0.00	2.98	0.00	3.05
	E	V	A	A	R			0.5%	5.9%	1.3%	92.2%	0.0%	0.04	0.43	0.10	6.67	0.00	7.23
	E	V	A	A				1.5%	0.0%	0.8%	97.8%	0.0%	0.09	0.00	0.05	5.83	0.00	5.96
	E	V	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	5.40	0.00	5.40
	E	V	A			R		0.0%	2.2%	0.0%	97.8%	0.0%	0.00	0.19	0.00	8.28	0.00	8.47
	E	V		G				0.0%	12.8%	3.1%	84.1%	0.0%	0.00	0.98	0.24	6.40	0.00	7.61
	E	V		G				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	E	V		A	R			0.6%	10.7%	2.7%	86.1%	0.0%	0.03	0.54	0.14	4.38	0.00	5.09
	E	V			R			2.2%	0.0%	1.9%	95.9%	0.0%	0.35	0.00	0.30	15.40	0.00	16.06
	E	V			R			0.0%	2.7%	0.0%	97.3%	0.0%	0.00	0.20	0.00	7.30	0.00	7.50
	E	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	12.00	0.00	12.00
	E	V			R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	7.92	0.00	7.92
	E	V						2.6%	6.8%	3.7%	84.4%	2.5%	0.24	0.64	0.35	7.84	0.23	9.29
	E	V				R		0.0%	6.0%	0.0%	94.0%	0.0%	0.00	0.58	0.00	9.15	0.00	9.73
	E	V						0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	12.20	0.00	12.20
	E	T	A	G	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.42	0.00	0.42
	E	Q	A	A	R		N55M	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.98	0.00	1.98
	E	Q		G		R		0.0%	9.6%	3.8%	86.7%	0.0%	0.00	0.44	0.17	4.02	0.00	4.64
	E	A	A	G	R			0.0%	5.9%	2.8%	91.3%	0.0%	0.00	0.63	0.30	9.74	0.00	10.67
	E	A	A	G	R													

Фіг. 8-22

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні								Первинний скринінг										
								Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)					
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
	E	A	A	G				Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	E	A	A	A	R			0.0%	5.2%	3.2%	91.5%	0.0%	0.00	1.36	0.86	24.10	0.01	26.33
	E	A	A	A				0.0%	6.6%	1.1%	92.2%	0.0%	0.00	0.66	0.11	9.16	0.00	9.93
	E	A	A			R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	12.30	0.00	12.30
	E	A		G	R			Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	E	A		G	R			18.1%	44.5%	28.1%	Високий	9.3%	0.42	1.04	0.66	Високий	0.22	2.34
	E	A		G	R			0.0%	10.5%	0.0%	89.5%	0.0%	0.00	0.82	0.00	7.01	0.00	7.83
	E	A				R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	10.20	0.00	10.20
	E	A						0.0%	0.0%	1.0%	99.0%	0.0%	0.00	0.00	0.19	18.40	0.00	18.59
	E		A	A		R	A35V	3.6%	6.7%	14.9%	70.4%	4.4%	2.83	5.18	11.60	54.60	3.39	77.60
	E					R	K12M	11.4%	15.9%	11.9%	57.2%	3.6%	3.76	5.22	3.91	18.80	1.19	32.88
	E		A		R			3.7%	10.1%	6.1%	79.9%	0.2%	1.20	3.24	1.94	25.60	0.06	32.04
	E				R			3.8%	7.3%	5.6%	79.5%	3.7%	3.99	7.64	5.80	82.70	3.83	103.96
	E				R		V128A	3.7%	8.4%	8.2%	79.7%	0.0%	3.20	7.17	6.97	68.00	0.00	85.34
		V	A	A	R			2.7%	1.8%	2.8%	92.7%	0.0%	0.56	0.37	0.59	19.30	0.00	20.82
		V	A	A	R			0.0%	1.9%	0.0%	98.1%	0.0%	0.00	0.18	0.00	8.93	0.00	9.11
		V	A	A	R			0.0%	6.1%	0.0%	93.9%	0.0%	0.00	0.15	0.00	2.30	0.00	2.45
		V	A		R			3.2%	6.7%	3.9%	85.1%	1.1%	0.67	1.39	0.80	17.60	0.23	20.69
		V	A					2.9%	3.0%	5.4%	87.4%	1.3%	0.59	0.61	1.10	17.70	0.26	20.26
		V		G				0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	1.75	0.00	1.75
		V				R		3.3%	8.2%	6.4%	80.9%	1.2%	0.49	1.21	0.96	12.00	0.18	14.83
		V						0.0%	0.0%	100.0%	Високий	0.0%	0.00	0.00	0.09	Високий	0.00	0.09
		V						1.4%	5.6%	4.1%	88.4%	0.6%	0.11	0.43	0.32	6.85	0.05	7.75
		A	A	A	R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	18.30	0.00	18.30
		A	A		R			1.9%	5.6%	3.8%	87.8%	0.9%	0.29	0.87	0.59	13.60	0.13	15.49
		A	A		R			2.4%	5.2%	4.2%	88.2%	0.0%	0.92	2.00	1.64	34.20	0.00	38.76
		A	A		R			0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	20.70	0.00	20.70
		A	A				P179Q	0.0%	0.3%	2.9%	96.8%	0.0%	0.00	0.06	0.56	18.90	0.00	19.52
		A	A			R		0.0%	5.2%	0.0%	94.8%	0.0%	0.00	0.38	0.00	6.88	0.00	7.26

Fig. 8-23

Амінокислота - номер положення залишку й амінокислота у цьому положенні							Первинний скринінг											
							Процентна частка вивільнених ЖК					Кількість вивільнених ЖК (мкг)						
							Інші зміни амінокислот	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Ліноле- нова	Ліноле- нова	Олеї- нова	Паль- міти- нова	Стеа- ринова	Зага- льна ЖК
61	72	116	133	151	163	164												
		A		A	R			2.2%	5.7%	4.4%	86.7%	1.0%	0.47	1.20	0.94	18.40	0.22	21.22
		A		A	R			1.8%	4.4%	4.6%	89.2%	0.0%	0.45	1.09	1.14	22.10	0.00	24.78
		A			R			18.4%	42.4%	32.4%	Високий	6.8%	0.69	1.60	1.22	Високий	0.26	3.77
		A			R			13.9%	38.8%	40.0%	Високий	7.2%	1.63	4.56	4.70	Високий	0.85	11.74
		A				R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	13.30	0.00	13.30
		A				R		0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.00	0.00	0.00	4.28	0.00	4.28
							мас											
							Змішаний	3.2%	7.2%	5.9%	78.5%	5.2%	1.82	4.04	3.30	44.00	2.89	56.05
	K	T		A	R			1.8%	7.3%	6.6%	84.3%	0.0%	0.52	2.16	1.94	24.90	0.00	29.52
	K	T		A	R			1.8%	7.3%	6.6%	84.3%	0.0%	0.52	2.16	1.94	24.90	0.00	29.52
	K	Q	A	A				4.7%	6.2%	9.4%	79.7%	0.0%	2.94	3.83	5.83	49.60	0.00	62.20
	K	Q	A	A				4.7%	6.2%	9.4%	79.7%	0.0%	2.94	3.83	5.83	49.60	0.00	62.20
	K	Q	A	G	R			0.0%	8.0%	10.6%	81.4%	0.0%	0.00	1.30	1.72	13.20	0.00	16.22
	K	Q	A	G	R			0.0%	8.0%	10.6%	81.4%	0.0%	0.00	1.30	1.72	13.20	0.00	16.22
	K		A		R			0.2%	8.8%	8.4%	82.6%	0.0%	0.05	1.79	1.71	16.90	0.00	20.45
	K		A		R			0.2%	8.8%	8.4%	82.6%	0.0%	0.05	1.79	1.71	16.90	0.00	20.45
	E		A	A	R			5.5%	11.2%	8.5%	74.8%	0.0%	6.91	14.20	10.80	94.70	0.00	126.61
	E		A	A	R			5.5%	11.2%	8.5%	74.8%	0.0%	6.91	14.20	10.80	94.70	0.00	126.61
	E			G		R		4.0%	7.2%	11.8%	77.0%	0.0%	1.95	3.48	5.70	37.20	0.00	48.33
	E			G		R		4.0%	7.2%	11.8%	77.0%	0.0%	1.95	3.48	5.70	37.20	0.00	48.33
	E			A		R		4.5%	9.7%	10.7%	72.9%	2.2%	6.00	12.90	14.30	97.00	2.89	133.09
	E			A		R		4.5%	9.7%	10.7%	72.9%	2.2%	6.00	12.90	14.30	97.00	2.89	133.09
		Q		A	R		A97V	1.4%	4.2%	8.4%	86.0%	0.0%	0.52	1.59	3.16	32.30	0.00	37.57
		Q		A	R		A97V	1.4%	4.2%	8.4%	86.0%	0.0%	0.52	1.59	3.16	32.30	0.00	37.57
			A		R			5.3%	9.1%	7.4%	76.9%	1.4%	4.69	8.02	6.56	68.10	1.21	88.58

Фіг. 8-24

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> BUNGE OILS, INC.
DAYTON, Christopher L. G.
HITCHMAN, Timothy
KLINE, Katie
LYON, Jonathan
WALL, Mark A.
BARTON, NELSON R.
BUENO, ANALIA
CUENCA, JOSLIN G.

<120> ГІДРОЛАЗИ, КОДУЧІ ЇХ НУКЛЕІНОВІ КИСЛОТИ
І СПОСОБИ ЇХ ОДЕРЖАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ

<130> 564462014740

<140> Ще не присвоєно
<141> Паралельно даному

<150> US 12/202,204
<151> 2008-08-29

<160> 71

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 684
<212> ДНК
<213> Невідомо

<220>
<223> ДНК, одержана зі зразка навколишнього середовища

<400> 1
atgctgaaac cgcctcccta cggacgcctg ctgcgcgaac tggccgatat cccggccatc 60
gtgacggcac cgttcggggg cgctgcgaaa atgggcaaac tggcggatgg cgagccggta 120
ctggtgctgc cgggttcctt ggccgacgac aacgccacct cgggtgctgcg caagaccttc 180
gatgtcgcgg gctttgcctg ttccgggctgg gaacgcggct tcaacctcgg cattcgtggc 240
gacctcgtgg accggctggg cgaccggctg cgggcgggtgt cggaggcggc cggtggtcag 300
aagggtgatc tggtcggctg gagcctcggc ggctctatg cgcgcgagct gggccacaag 360
gcgcccgaac tgatccggat ggtcgtcacg ctccggcagtc cgttcgcggg cgacctccac 420
gccaaccatg cgtggaagat ctacgaggcg atcaacagcc acacggtcga caacctgccg 480
atcccggtcg atttccagat taagccggcg gtgcgcacca tcgcgggtgtg gtcgccgctc 540
gacgggggtg tggcgccgga gacctcgga ggctcgcccg agcagtcgga cgagcggcta 600
gagctggcgg tgacctacat gggctttgcc gcatcgaaga cgggggccga ggctgtggtc 660
cggctggctg cggcgcggtc ctag 684

<210> 2
<211> 227

<212> БІЛОК

<213> Невідомо

<220>

<223> Білок, одержаний зі зразка навколишнього середовища

<220>

<221> САЙТ

<222> (51)...(54)

<223> Сайт N-глікозилювання. Prosite id = PS00001

<220>

<221> САЙТ

<222> (103)...(112)

<223> Ліпази, сериновий активний центр. Prosite id = PS00120

<400> 2

Met Leu Lys Pro Pro Pro Tyr Gly Arg Leu Leu Arg Glu Leu Ala Asp
1 5 10 15

Ile Pro Ala Ile Val Thr Ala Pro Phe Arg Gly Ala Ala Lys Met Gly
20 25 30

Lys Leu Ala Asp Gly Glu Pro Val Leu Val Leu Pro Gly Phe Leu Ala
35 40 45

Asp Asp Asn Ala Thr Ser Val Leu Arg Lys Thr Phe Asp Val Ala Gly
50 55 60

Phe Ala Cys Ser Gly Trp Glu Arg Gly Phe Asn Leu Gly Ile Arg Gly
65 70 75 80

Asp Leu Val Asp Arg Leu Val Asp Arg Leu Arg Ala Val Ser Glu Ala
85 90 95

Ala Gly Gly Gln Lys Val Ile Val Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu
100 105 110

Tyr Ala Arg Glu Leu Gly His Lys Ala Pro Glu Leu Ile Arg Met Val
115 120 125

Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ala Gly Asp Leu His Ala Asn His Ala
130 135 140

Trp Lys Ile Tyr Glu Ala Ile Asn Ser His Thr Val Asp Asn Leu Pro
145 150 155 160

Ile Pro Val Asp Phe Gln Ile Lys Pro Pro Val Arg Thr Ile Ala Val
165 170 175

Trp Ser Pro Leu Asp Gly Val Val Ala Pro Glu Thr Ser Glu Gly Ser
180 185 190

Pro Glu Gln Ser Asp Glu Arg Leu Glu Leu Ala Val Thr His Met Gly
195 200 205

Phe Ala Ala Ser Lys Thr Gly Ala Glu Ala Val Val Arg Leu Val Ala
210 215 220

Ala Arg Leu
225

<210> 3
<211> 633
<212> ДНК
<213> Невідомо

<220>
<223> ДНК, одержана зі зразка навколишнього середовища

<400> 3
atggccggcc accagggcgc gcggggcccc aaagacggtc cgcggcgat ggtgatcccg 60
ggcttcctcg ccacacacag gcacacgaca cgattgcgcc gggaactcgc cgaggcgggg 120
ttcagggttc acccctggcg gcagggttg aacatgggag cgcgtgccga cacgctcgag 180
aaattgaagc gggcagtgga ccagtgcggt catgacgagc cgatcctgct ggtcggctgg 240
agtctgggcg ggctctacgc gagggaggtc gcgcgcgccg agccggatca ggtgcgggcg 300
gtggctactc ttgggtcccc ggtgtcgggc gaccggcgcc gctacacca cgtgtggaag 360
ctgtacgaat ggggtggcggg tcaccgggtg gacgaccgc cgatccccga caaggaggaa 420
aagccgcggg tgccgaccct ggctttgtgg tcggcggatg acgggatcgt cggcgccccg 480
tcggcgcgcg ggactcagtt atctcacgac aaggcggtcg agatgcgaac gagccacatg 540
ggctttgcc a tgtcggcgaa gagcgcacgc tttgtgtcg ccgagatcgt gaagttcctg 600
aagaaaaccg aaggttccga gtcgcacgat tga 633

<210> 4
<211> 210
<212> БІЛОК
<213> Невідомо

<220>
<223> Білок, одержаний зі зразка навколишнього середовища

<220>
<221> САЙТ
<222> (76)...(85)
<223> Ліпази, сериновий активний центр. Prosite id = PS00120

<400> 4
Met Ala Gly His Gln Gly Ala Arg Gly Pro Lys Asp Gly Pro Pro Ala
1 5 10 15

Met Val Ile Pro Gly Phe Leu Ala His Asp Arg His Thr Thr Arg Leu
20 25 30

Arg Arg Glu Leu Ala Glu Ala Gly Phe Arg Val His Pro Trp Arg Gln
35 40 45

Gly Trp Asn Met Gly Ala Arg Ala Asp Thr Leu Glu Lys Leu Lys Arg
50 55 60

Ala Val Asp Gln Cys Gly His Asp Glu Pro Ile Leu Leu Val Gly Trp
65 70 75 80

Ser Leu Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Glu Val Ala Arg Ala Glu Pro Asp
85 90 95

Gln Val Arg Ala Val Val Thr Leu Gly Ser Pro Val Ser Gly Asp Arg
100 105 110

Arg Arg Tyr Thr Asn Val Trp Lys Leu Tyr Glu Trp Val Ala Gly His
115 120 125

Pro Val Asp Asp Pro Pro Ile Pro Asp Lys Glu Glu Lys Pro Pro Val
130 135 140

Pro Thr Leu Ala Leu Trp Ser Ala Asp Asp Gly Ile Val Gly Ala Pro
145 150 155 160

Ser Ala Arg Gly Thr Gln Leu Ser His Asp Lys Ala Val Glu Met Arg
165 170 175

Thr Ser His Met Gly Phe Ala Met Ser Ala Lys Ser Ala Arg Phe Val
180 185 190

Val Ala Glu Ile Val Lys Phe Leu Lys Lys Thr Glu Gly Ser Glu Ser
195 200 205

His Asp
210

<210> 5
<211> 711
<212> ДНК
<213> Невідомо

<220>
<223> ДНК, одержана зі зразка навколишнього середовища

<400> 5
gtgagcgaga aaggcgсacc caagggaagg cagcgгctga aggagatcgg cgcgcttctg 60
ttccacgcgc ctgcagctt gggccatctg ggcgcgcgcg gcccсаaggа cggtcctcgg 120

```

gtgatgggtca tcccgggatt cctcgcgcac gacttgcata cgacgcagtt gcgcogggcg 180
ctcgcgaagg caggcttccg agtgcacccg tggcggcagg ggatgaacct tggagcgcgc 240
gccgatacgc tcgaaattct gaagcgcgcg gtggattcct gcgycicgag cgagccgatg 300
ctgctcgtcg gctggagcct gggcgggtctc tatgcccggg agatcgcgcg tgcggagccg 360
gaccgggtgc gggcgggtgt gacgatggga tcgccgggtgt ggggcgaccg caggcgctac 420
accaacgtgt ggaagctgta cgaacggatt gccggccatc cggtcgacaa gccgccgatc 480
ccggacaaga gccagaagcc gccggtgccg actctggctt tgtggtcgca gcatgatggc 540
atcgtcggcg cgccctcggc gagagggacg aagaagacc gcgacaaggc ggtcgccatc 600
gacacgactc acatgggggt tggcatgtcg cccaagacga cgcgcgcggc agtgcgtgag 660
atcgtgggct ttttgaatga agtcgaaggc ggttcgtcac cccgggcgtg a 711

```

<210> 6

<211> 236

<212> БІЛОК

<213> Невідомо

<220>

<223> Білок, одержаний зі зразка навколишнього середовища

<400> 6

Met Ser Glu Lys Gly Ala Pro Lys Gly Arg Gln Arg Leu Lys Glu Ile
1 5 10 15

Gly Ala Leu Leu Phe His Ala Pro Arg Ser Leu Gly His Leu Gly Ala
20 25 30

Arg Gly Pro Lys Asp Gly Pro Pro Val Met Val Ile Pro Gly Phe Leu
35 40 45

Ala His Asp Leu His Thr Thr Gln Leu Arg Arg Ala Leu Ala Lys Ala
50 55 60

Gly Phe Arg Val His Pro Trp Arg Gln Gly Met Asn Leu Gly Ala Arg
65 70 75 80

Ala Asp Thr Leu Glu Ile Leu Lys Arg Ala Val Asp Ser Cys Gly Ser
85 90 95

Ser Glu Pro Met Leu Leu Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu Tyr Ala
100 105 110

Arg Glu Ile Ala Arg Ala Glu Pro Asp Arg Val Arg Ala Val Val Thr
115 120 125

Met Gly Ser Pro Val Trp Gly Asp Arg Arg Arg Tyr Thr Asn Val Trp
130 135 140

Lys Leu Tyr Glu Arg Ile Ala Gly His Pro Val Asp Lys Pro Pro Ile
145 150 155 160

Pro Asp Lys Ser Gln Lys Pro Pro Val Pro Thr Leu Ala Leu Trp Ser
165 170 175

Gln His Asp Gly Ile Val Gly Ala Pro Ser Ala Arg Gly Thr Lys Lys
180 185 190

Thr Arg Asp Lys Ala Val Ala Ile Asp Thr Thr His Met Gly Phe Ala
195 200 205

Met Ser Pro Lys Thr Thr Arg Ala Ala Val Arg Glu Ile Val Gly Phe
210 215 220

Leu Asn Glu Val Glu Gly Gly Ser Ser Pro Arg Ala
225 230 235

<210> 7

<211> 669

<212> ДНК

<213> Невідомо

<220>

<223> ДНК, одержана зі зразка навколишнього середовища

<400> 7

```
atgaggctgc gcgagggggg cgcgctcgta tcgcgggcct atcgcgccct cgggcgccctc 60
ggcgagcgcg gcccgcgga cgggcccgcg ctgatggtga tcccgggctt cctcgccacc 120
gatcgacca ctttggggct gcagcgggcg ctggccaagg gcggtacaa ggtgaccgga 180
tggggcatgg gcctcaacag cggcgctacc gaagacatag tcgaccgcat cgcgctcgg 240
gtcgaaaggt ttggagccgg ccgcaaagt atcctcgctg gctggagcct cggcggactc 300
tacgcgcgcg tggtcgcgca ggagcggccg gatctcgctg acaaggtggt cacgctcggc 360
tcgccctttt cgggcgacag gcgccgcaac aacaatgtct ggcggtctta cgagttcgtc 420
gccggccatc cggtaacag ccgcgcgac gacaaggacc ccgaggtgaa gccgcgggtg 480
ccgacgctcg ctatctggtc gcggcgcgac ggcatcgtct ctccggcggg cgcgcgcggg 540
cgggagggag agcgcgacgc cgagctcgag ctcgactgca gccacatggg ctttgcggtc 600
agcgcagggg cttatcccaa gatcgtggag gcggtgcggg cgtttccgga aaacatccgt 660
tcgcgctga 669
```

<210> 8

<211> 222

<212> БІЛОК

<213> Невідомо

<220>

<223> Білок, одержаний зі зразка навколишнього середовища

<220>

<221> САЙТ

<222> (91)...(100)

<223> Ліпази, сериновий активний центр. Prosite id = PS00120

<400> 8

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

Phe Gly Arg Leu Gly Glu Arg Gly Pro Ala Asp Gly Pro Pro Leu Met
20 25 30

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

Arg Ala Leu Ala Lys Gly Gly Tyr Lys Val Thr Gly Trp Gly Met Gly
50 55 60

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

Val Glu Arg Phe Gly Ala Gly Arg Lys Val Ile Leu Val Gly Trp Ser
85 90 95

Leu Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Val Val Ala Gln Glu Arg Pro Asp Leu
100 105 110

Val Asp Lys Val Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ser Gly Asp Arg Arg
115 120 125

Arg Asn Asn Asn Val Trp Arg Leu Tyr Glu Phe Val Ala Gly His Pro
130 135 140

Val Asn Ser Pro Pro Ile Asp Lys Asp Pro Glu Val Lys Pro Pro Val
145 150 155 160

Pro Thr Leu Ala Ile Trp Ser Arg Arg Asp Gly Ile Val Ser Pro Ala
165 170 175

Gly Ala Arg Gly Arg Glu Gly Glu Arg Asp Ala Glu Leu Glu Leu Asp
180 185 190

Cys Ser His Met Gly Phe Ala Val Ser Ala Arg Ala Tyr Pro Lys Ile
195 200 205

Val Glu Ala Val Arg Ala Phe Pro Glu Asn Ile Arg Ser Arg
210 215 220

<210> 9
<211> 669
<212> ДНК
<213> Невідомо

<220>
<223> ДНК, одержана зі зразка навколишнього середовища

<400> 9
atgaagccgc cgcccgatg gatgaagatc cgggagggcg gctcgctcct cgcgcgcttc 60
taccgcgcgt tcggcaagct cgagccgcgc gggccggcg acgggccgaa gctgatggtg 120
atcccggtt tctcgcggg cgacaggacg acgctcgggc tgcagcgagc gctggcgggc 180
ggcggctacc gggtcgcccg ctgggggctg ggggtgaacc gcggcgtttc ggaggacgtg 240
gtcgaccgga tcggccagca agtcgcgcgg ttccggggcg gcgagaaggt gatcctggtc 300
ggctggagcc ttggcgggct ttatgcgcgc gtgggtggcg aggagcggcc cgacctcgtc 360
gagaaggtgg tgaccttggg ctcgccggtt tcggggcgacc ggcggcgcaa caacaatgtg 420
tggcggtct atgagtgggt ggctgggcat ccggtgaacg atccgccgat cgacaaggac 480
ccggcgaaga agccccggt gccgacgctc gcgatctggt cgcggcggtga tgggatcgtg 540
gcggtcgaag gcgcgcgggg gcggccggag gagcgggatg ccgagctgga gatcgattgc 600
agccacatgg ggtttgggg cagcggcaag gcgtttcccc gaatcgtaga ggcggtgaag 660
gggttctaa 669

<210> 10
<211> 222
<212> БІЛОК
<213> Невідомо

<220>
<223> Білок, одержаний зі зразка навколишнього середовища

<220>
<221> САЙТ
<222> (98)...(107)
<223> Ліпази, сериновий активний центр. Prosite id = PS00120

<400> 10
Met Lys Pro Pro Gly Trp Met Lys Ile Arg Glu Ala Gly Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ala Arg Phe Tyr Arg Ala Phe Gly Lys Leu Glu Pro Arg Gly Pro
20 25 30

Ala Asp Gly Pro Lys Leu Met Val Ile Pro Gly Phe Leu Ala Gly Asp
35 40 45

Arg Thr Thr Leu Gly Leu Gln Arg Ala Leu Ala Gly Gly Gly Tyr Arg

50		55		60
Val Ala Gly Trp Gly Leu Gly Val Asn Arg Gly Val Ser Glu Asp Val				
65		70		80
Val Asp Arg Ile Gly Gln Gln Val Ala Arg Phe Gly Ala Gly Glu Lys				
	85	90		95
Val Ile Leu Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Val Val				
	100	105		110
Ala Gln Glu Arg Pro Asp Leu Val Glu Lys Val Val Thr Leu Gly Ser				
	115	120		125
Pro Phe Ser Gly Asp Arg Arg Arg Asn Asn Asn Val Trp Arg Leu Tyr				
	130	135		140
Glu Trp Val Ala Gly His Pro Val Asn Asp Pro Pro Ile Asp Lys Asp				
145		150		155
Pro Ala Lys Lys Pro Pro Val Pro Thr Leu Ala Ile Trp Ser Arg Arg				
	165	170		175
Asp Gly Ile Val Ala Val Glu Gly Ala Arg Gly Arg Pro Glu Glu Arg				
	180	185		190
Asp Ala Glu Leu Glu Ile Asp Cys Ser His Met Gly Phe Gly Val Ser				
	195	200		205
Gly Lys Ala Phe Pro Arg Ile Val Glu Ala Val Lys Gly Phe				
	210	215		220

<210> 11
 <211> 570
 <212> ДНК
 <213> Невідомо

<220>
 <223> ДНК, одержана зі зразка навколишнього середовища

<400> 11	
gtgttggtgc tgccggcggt cctcgccaac gaccttccca ctctgcttct ccgcaggacg	60
ctgaaggcga acgggtttcg cccgttcggc tgggcgaacg gtttcaactt aggtgcacgg	120
ccggacacgc tccagcgctt gagcgacacg ctcgatgcgg tggttcagga agcgggcagg	180
ccggttgcat tgatcggtcg gagccttggc gggctttatg cccgagagct ggcgaaacgc	240
aggtcggtcg aggtgtcggc agtgatcacg ctcggcacgc ccttctcggt tgacctcaga	300
cgcaacaacg cctggaagct gtacgagctc atcaacgatc atcctgtcga tgccccctcc	360

ttggatgttc aggtcgacgc gaagccaccc gtccgaacct tcgctttgtg gtcgcgtcgc 420
gacgggatcg tagcgcccg gcgagcgcac ggcattggagg gcgagttcga ccaggcgatc 480
gagctgcagt gcacgcacaa cgagatggtc agtgatccgg aggcctctc cagcatcggt 540
accttgcgtgc gggaaaatgt tggctcctga 570

<210> 12
<211> 189
<212> БІЛОК
<213> Невідомо

<220>
<223> Білок, одержаний зі зразка навколишнього середовища

<400> 12
Met Leu Val Leu Pro Ala Phe Leu Ala Asn Asp Leu Pro Thr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Arg Arg Thr Leu Lys Ala Asn Gly Phe Arg Pro Phe Gly Trp Ala
20 25 30

Asn Gly Phe Asn Leu Gly Ala Arg Pro Asp Thr Leu Gln Arg Leu Ser
35 40 45

Ala Arg Leu Asp Ala Val Val Gln Glu Ala Gly Arg Pro Val Ala Leu
50 55 60

Ile Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Glu Leu Ala Lys Arg
65 70 75 80

Arg Ser Ala Glu Val Ser Ala Val Ile Thr Leu Gly Thr Pro Phe Ser
85 90 95

Val Asp Leu Arg Arg Asn Asn Ala Trp Lys Leu Tyr Glu Leu Ile Asn
100 105 110

Asp His Pro Val Asp Ala Pro Pro Leu Asp Val Gln Val Asp Ala Lys
115 120 125

Pro Pro Val Arg Thr Phe Ala Leu Trp Ser Arg Arg Asp Gly Ile Val
130 135 140

Ala Pro Ala Ser Ala His Gly Met Glu Gly Glu Phe Asp Gln Ala Ile
145 150 155 160

Glu Leu Gln Cys Thr His Asn Glu Met Val Ser Asp Pro Glu Ala Leu
165 170 175

Ser Thr Ile Val Thr Leu Leu Arg Glu Asn Val Gly Ser
180 185

<210> 13
 <211> 807
 <212> ДНК
 <213> Невідомо

<220>
 <223> ДНК, одержана зі зразка навколишнього середовища

<400> 13
 gtgaatacacag ccgacctatt gaagccacca cccgcaagca tgacagttct cgaggcgaga 60
 gcgctgctgg acatatgcaa gatgagcgcc ccattggcgc gcttgctatt caaaaagaac 120
 tcgccctggc gcaaaacaacg gggtctcgta atacctggct ttggcgctga tgatcgctac 180
 acctggccgt tgcgcaattt cgtccaggca cagggctatg ccacgactgg ctggggcctg 240
 ggcaccaaca aggcaggtct caatatgccg catcaactat ccgacgtcca cccagatgg 300
 aagctaaaac ccaagacgcc gtaccgtggt gaggcgggag taccttacgt gattgaccgc 360
 ttgatcgaaac gggttgacga attggcatcg acggatccgc aaccatcgcc acttataggt 420
 tggagtctgg gtggtttcat ggcccgtgaa gttgcccgag agcgcccaaa ccaggtgagt 480
 caggttatta cctcgggttc tcctgtcatc ggaggcccaa aatacacctt cgctgcatcg 540
 gctttcatcc ggcgcaaata cgatttggac tgggtggagc aagtgategc ggagcgggaa 600
 gatcgcccca ttactgttcc tattacagca atagtcagcc agtctgatgg catcgctcga 660
 tattcagcgg caatcgatca ccacagtccc gctgtgcagc atttacatat ggatgttgcc 720
 catttgggct ttccttaca cagcaggggt ttggtcagaaa tcgccaatgc gctcaactct 780
 ttagaggtgg agaaggagcg tgtttag 807

<210> 14
 <211> 268
 <212> БІЛОК
 <213> Невідомо

<220>
 <223> Білок, одержаний зі зразка навколишнього середовища

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (138)...(147)
 <223> Ліпази, сериновий активний центр. Prosite id = PS00120

<400> 14
 Met Asn Thr Ala Asp Leu Leu Lys Pro Pro Ala Ser Met Thr Val
 1 5 10 15
 .
 Leu Glu Ala Arg Ala Leu Leu Asp Ile Cys Lys Met Ser Ala Pro Leu
 20 25 30
 Ala Arg Leu Leu Phe Lys Lys Asn Ser Pro Trp Arg Lys Gln Arg Val
 35 40 45

Leu Val Ile Pro Gly Phe Gly Ala Asp Asp Arg Tyr Thr Trp Pro Leu
 50 55 60
 Arg Asn Phe Val Gln Ala Gln Gly Tyr Ala Thr Thr Gly Trp Gly Leu
 65 70 75 80
 Gly Thr Asn Lys Ala Gly Leu Asn Met Pro His Gln Leu Ser Asp Val
 85 90 95
 His Pro Arg Trp Lys Leu Lys Pro Lys Thr Pro Tyr Arg Gly Glu Ala
 100 105 110
 Gly Val Pro Tyr Val Ile Asp Arg Leu Ile Glu Arg Phe Asp Glu Leu
 115 120 125
 Ala Ser Thr Asp Pro Gln Pro Ile Ala Leu Ile Gly Trp Ser Leu Gly
 130 135 140
 Gly Phe Met Ala Arg Glu Val Ala Arg Glu Arg Pro Asn Gln Val Ser
 145 150 155 160
 Gln Val Ile Thr Leu Gly Ser Pro Val Ile Gly Gly Pro Lys Tyr Thr
 165 170 175
 Leu Ala Ala Ser Ala Phe Ile Arg Arg Lys Tyr Asp Leu Asp Trp Val
 180 185 190
 Glu Gln Val Ile Ala Glu Arg Glu Asp Arg Pro Ile Thr Val Pro Ile
 195 200 205
 Thr Ala Ile Val Ser Gln Ser Asp Gly Ile Val Gly Tyr Ser Ala Ala
 210 215 220
 Ile Asp His His Ser Pro Ala Val Gln His Leu His Met Asp Val Ala
 225 230 235 240
 His Leu Gly Phe Pro Tyr Asn Thr Arg Val Trp Ser Glu Ile Ala Asn
 245 250 255
 Ala Leu Asn Ser Leu Glu Val Glu Lys Glu Arg Val
 260 265

<210> 15
 <211> 804
 <212> ДНК
 <213> Невідомо

<220>
 <221> Змішані властивості

<223> Бактеріальна ДНК

<400> 15

```

atggagctcg ccaaggtcac cgcctgatg aaggccaccg cctcgagat cgcgactctc      60
accggccacc tgcctctcta cccctccggg atcgtggccg agcgccctgc ggccgcccc      120
tcttcaccgt cctccccgtc cgcggggccg acgggcccac gtcgggtcgt cctgctgcac      180
ggtttcgtgg acaaccgctc ggtcttcgtc ctgctgcgcc gtgccctcac ccggagcggc      240
cgtgactgcg tcgagtcgct caactactcg ccgctcacct gcgacctgcg ggccgcgcgc      300
gaactgctgg ggccgggggt ggacgagatc cgcgcccga ccggacacgc cgaggtcgac      360
atcgtcggcc acagcctggg cgggctcatc gcccgttatt acgtacagcg tctcggcgggt      420
gacagccggg tgcgcacctt ggtcatgctc ggcacccgc actccggcac caccgtggcc      480
cggctcgccg acgcgcaccc gctggtgcgg cagatgcggc cgggttcgga ggtgctgcgg      540
gagctcgccg cgcctcgcc cggctgccgt acccggttcg tgagcttctg gagcgacctc      600
gaccaggtga tgggtccggg ggacacggcc tgcctggacc accccgacct gctggtgcac      660
aacgtccggg tcagcgggat cggctatctc gcgctgccgg tccatccac ggtggcggcc      720
gggggtccgg aggccctcga cgcgagcggc gcgggggtcc cgggggtgcg ggaggagggg      780
cccggcgcgc gcgcggtggc gtga                                             804

```

<210> 16

<211> 267

<212> БІЛОК

<213> Невідомо

<220>

<221> Змішані властивості

<223> Бактеріальний білок

<220>

<221> САЙТ

<222> (120)...(129)

<223> Ліпази, сериновий активний центр. Prosite id = PS00120

<400> 16

```

Met Glu Leu Ala Lys Val Thr Ala Leu Met Lys Ala Thr Ala Leu Glu
1           5           10          15

Ile Ala Ile Leu Thr Gly His Leu Val Leu Tyr Pro Ser Gly Ile Val
          20          25          30

Ala Glu Arg Leu Ala Ala Ala Pro Ser Ser Pro Ser Ser Pro Ser Ala
          35          40          45

Gly Pro Thr Gly Arg Arg Pro Val Val Leu Leu His Gly Phe Val Asp
          50          55          60

Asn Arg Ser Val Phe Val Leu Leu Arg Arg Ala Leu Thr Arg Ser Gly

```


65		70		75		80
Arg Asp Cys Val	Glu Ser Leu Asn Tyr	Ser Pro Leu Thr	Cys Asp Leu			
	85	90	95			
Arg Ala Ala Ala	Glu Leu Leu Gly	Arg Arg Val Asp	Glu Ile Arg Ala			
	100	105	110			
Arg Thr Gly His	Ala Glu Val Asp	Ile Val Gly His	Ser Leu Gly Gly			
	115	120	125			
Leu Ile Ala Arg	Tyr Tyr Val Gln Arg	Leu Gly Gly Asp	Ser Arg Val			
	130	135	140			
Arg Thr Leu Val	Met Leu Gly Thr	Pro His Ser Gly	Thr Thr Val Ala			
	145	150	155	160		
Arg Leu Ala Asp	Ala His Pro Leu Val	Arg Gln Met Arg	Pro Gly Ser			
	165	170	175			
Glu Val Leu Arg	Glu Leu Ala Ala	Pro Ser Pro Gly	Cys Arg Thr Arg			
	180	185	190			
Phe Val Ser Phe	Trp Ser Asp Leu Asp	Gln Val Met Val	Pro Val Asp			
	195	200	205			
Thr Ala Cys Leu	Asp His Pro Asp	Leu Leu Val His	Asn Val Arg Val			
	210	215	220			
Ser Gly Ile Gly	His Leu Ala Leu	Pro Val His Pro	Thr Val Ala Ala			
	225	230	235	240		
Gly Val Arg Glu	Ala Leu Asp Ala	Ser Gly Ala Gly	Val Pro Gly Val			
	245	250	255			
Arg Glu Glu Gly	Pro Gly Ala Gly	Ala Val Ala				
	260	265				

<210> 17

<211> 798

<212> ДНК

<213> Невідомо

<220>

<223> ДНК, одержана зі зразка навколишнього середовища

<400> 17

gtggccgccc cggacagcgg gacggcgga gggcaaaggc ttcggccgcc gagcctgttc 60

ctgatgctgg ccgaggcgag gggcttgctc gaactgaact cgagcctgtt gttgtcgccg 120

```

ctgttggtgc gggcgccgaa gggcgacgga catccggtgc tggcgctgcc gggctttctc 180
gccagcgatc tgtcgatggc gccgatgcgg cgctatctga aagaactcgg ctacgatgcc 240
catgcgtgga acatggggcg caatctcggc ggcgtcgcgt ccaagcgga agccttgccg 300
gacctgttgc ggcgcattta cagccagacg ggccgcaagg tcagcctggt cggctggagt 360
ctcggcgggc tctatgcgcg cgatctcgct ttgcaggcgc ccgacatggt gcgttccgtg 420
atcacgctcg gcagtcctgt tgccagcgac atcaggcgga ccaacgccac gcggtcttac 480
gaggcgctgt cgggagaaaag ggtcgacgac aatccggagt taacagcggc gatcgccggc 540
gacctgccgg tgccggcgac ctcgatctat tcccgtagcg acggtatcgt gaactggcac 600
accagcctgc tgcgtccttc cgcaacggct gaaaacatcg aggtttactt cgccagccat 660
atcgggctcg gcgtcaaccc ggcagcgctg tggcgcggtg ccgaccgcct ggcgcagccc 720
gagggggaat ttaagcattt tgaccggctg ggtccctttg ccattgccta tggccccct 780
gaaaatgcac aatcctga 798

```

<210> 18
 <211> 265
 <212> БІЛОК
 <213> Невідомо

<220>
 <223> Білок, одержаний зі зразка навколишнього середовища

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (33)...(36)
 <223> Сайт N-глікозилювання. Prosite id = PS00001

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (115)...(124)
 <223> Ліпази, сериновий активний центр. Prosite id = PS00120

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (157)...(160)
 <223> Сайт N-глікозилювання. Prosite id = PS00001

<400> 18
 Met Ala Ala Ala Asp Ser Gly Thr Ala Glu Gly Gln Arg Leu Arg Pro
 1 5 10 15

Pro Ser Leu Phe Leu Met Leu Ala Glu Ala Arg Gly Leu Leu Glu Leu
 20 25 30

Asn Ser Ser Leu Leu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Arg Ala Pro Lys Gly
 35 40 45

Asp Gly His Pro Val Leu Ala Leu Pro Gly Phe Leu Ala Ser Asp Leu
 50 55 60

Ser Met Ala Pro Met Arg Arg Tyr Leu Lys Glu Leu Gly Tyr Asp Ala
65 70 75 80

His Ala Trp Asn Met Gly Arg Asn Leu Gly Gly Val Ala Ser Lys Arg
85 90 95

Glu Ala Leu Arg Asp Leu Leu Arg Arg Ile Tyr Ser Gln Thr Gly Arg
100 105 110

Lys Val Ser Leu Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Val Tyr Ala Arg Asp
115 120 125

Leu Ala Leu Gln Ala Pro Asp Met Val Arg Ser Val Ile Thr Leu Gly
130 135 140

Ser Pro Phe Ala Ser Asp Ile Arg Ala Thr Asn Ala Thr Arg Leu Tyr
145 150 155 160

Glu Ala Leu Ser Gly Glu Arg Val Asp Asp Asn Pro Glu Leu Thr Ala
165 170 175

Ala Ile Ala Gly Asp Leu Pro Val Pro Ala Thr Ser Ile Tyr Ser Arg
180 185 190

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

Thr Ala Glu Asn Ile Glu Val Tyr Phe Ala Ser His Ile Gly Leu Gly
210 215 220

Val Asn Pro Ala Ala Leu Trp Ala Val Ala Asp Arg Leu Ala Gln Pro
225 230 235 240

Glu Gly Glu Phe Lys His Phe Asp Arg Ser Gly Pro Phe Ala Ile Ala
245 250 255

Tyr Gly Pro Pro Glu Asn Ala Gln Ser
260 265

<210> 19
<211> 798
<212> ДНК
<213> Невідомо

<220>
<223> ДНК, одержана зі зразка навколишнього середовища

<400> 19
atgccggagc gaaacgaagc gcaggccccc cgcgctcttc gtccgccggg gctcgggctg 60

```

ttcctcgccg aagcgcgggg cattttcgag ctcaacgcga gcctgttgct gtcgccgctt 120
ctgttgccgc cgcgcgcgcg cgacggccat ccggtgctgg cgttgccggg ctttcttgcc 180
agtgatctat cgatggcgcc gttgcgccgc tacctcaccg agctcggcta cgacacccac 240
gcctggcgca tgggcccga tgtcggcggc atcgcaaga tgcggatcgc gctgctcgag 300
cggctcaocg agatccatgc cgagtgcggc cgcaaggctc cgattgtcgg ctggagtctc 360
ggcggcgtct atgcgcgcga cctcgcgttg caggcgcccg agatggtgcg ctacgtcgtc 420
accctcggca gccccttcgc cagcgacgtc cgcgccacca atgcgacgcg gctctatgag 480
gcgatgtcgg gcgaaacggt cggcgacaat gtcgacctcg tgcaggcgat tgccggcgac 540
ctgccggttc ccgtgacctc gatctattcg aagagcgacg gcatcgtgaa ctggcggacc 600
tgcctgctgc gcccgtccgc gaccgccgag aatatcgagg tctatttcgc gagccatgtc 660
ggcatcggcg tcaatccggc cgcgctgtgg gcgatcgcgg accggctggc ccagcgggaa 720
ggcgaattcc gccccttcga ccggtccggt ccttttgcca ttgcctacgc gcccccgaa 780
caggcacaat cgatctga 798

```

<210> 20
 <211> 265
 <212> БІЛОК
 <213> Невідомо

<220>
 <223> Білок, одержаний зі зразка навколишнього середовища

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (32)...(35)
 <223> Сайт N-глікозилювання. Prosite id = PS00001

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (114)...(123)
 <223> Ліпази, сериновий активний центр. Prosite id = PS00120

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (156)...(159)
 <223> Сайт N-глікозилювання. Prosite id = PS00001

<400> 20
 Met Pro Glu Arg Asn Glu Ala Gln Ala Pro Pro Arg Leu Arg Pro Pro
 1 5 10 15

 Gly Leu Gly Leu Phe Leu Ala Glu Ala Arg Gly Ile Phe Glu Leu Asn
 20 25 30

 Ala Ser Leu Leu Leu Ser Pro Leu Leu Arg Ala Pro Arg Gly Asp
 35 40 45

 Gly His Pro Val Leu Ala Leu Pro Gly Phe Leu Ala Ser Asp Leu Ser

50		55		60											
Met	Ala	Pro	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Thr	Glu	Leu	Gly	Tyr	Asp	Thr	His
65					70					75					80
Ala	Trp	Arg	Met	Gly	Arg	Asn	Val	Gly	Gly	Ile	Ala	Lys	Met	Arg	Ile
			85						90					95	
Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Thr	Gln	Ile	His	Ala	Glu	Cys	Gly	Arg	Lys
			100					105					110		
Val	Ser	Ile	Val	Gly	Trp	Ser	Leu	Gly	Gly	Val	Tyr	Ala	Arg	Asp	Leu
		115					120						125		
Ala	Leu	Gln	Ala	Pro	Glu	Met	Val	Arg	Tyr	Val	Val	Thr	Leu	Gly	Ser
		130					135						140		
Pro	Phe	Ala	Ser	Asp	Val	Arg	Ala	Thr	Asn	Ala	Thr	Arg	Leu	Tyr	Glu
145					150					155					160
Ala	Met	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Gly	Asp	Asn	Val	Asp	Leu	Val	Gln	Ala
				165					170						175
Ile	Ala	Gly	Asp	Leu	Pro	Val	Pro	Val	Thr	Ser	Ile	Tyr	Ser	Lys	Ser
			180						185					190	
Asp	Gly	Ile	Val	Asn	Trp	Arg	Thr	Cys	Leu	Leu	Arg	Pro	Ser	Ala	Thr
		195					200						205		
Ala	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Phe	Ala	Ser	His	Val	Gly	Ile	Gly	Val
	210						215					220			
Asn	Pro	Ala	Ala	Leu	Trp	Ala	Ile	Ala	Asp	Arg	Leu	Ala	Gln	Arg	Glu
225				230						235					240
Gly	Glu	Phe	Arg	Pro	Phe	Asp	Arg	Ser	Gly	Pro	Phe	Ala	Ile	Ala	Tyr
				245					250					255	
Ala	Pro	Pro	Glu	Gln	Ala	Gln	Ser	Ile							
			260					265							

<210> 21
 <211> 65
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<220>

<221> змішані властивості

<222> (1)...(65)

<223> Лінкер клонування з сайтом клонування

<400> 21

tctagataac gagggcaaaa ccatgggagg atccagatct catcaccatc accatcacta 60
agctt 65

<210> 22

<211> 684

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Створена синтетичним способом

<400> 22

atgctcaagc cccacctta cggccgtctg ctccgcgaac tggctgatat cccggcgatc 60
gtgactgctc cgttccgcgg cgcagccaaa atgggcaaac tggcagatgg cgagccggta 120
ctgggtgctgc ccggcttcct ggccgacgac aacgcgacca gcgtgctgcg gaagaccttc 180
gaggtcgccg gctttgcgtg cagcggctgg gaaaagggct tcaacctcgg cattcgtggc 240
gacctcatgg actacctggc cgaccgcctg cgcgccgtga gcgaggccgc gggggggcag 300
aaggtaatcg tggtcggctg gtccctcggc ggcctctacg cccgggagtt gggccacaag 360
gccccogaac tgatcogtat ggtcgtcacg ctccgctccc cgttcgccgg cgacctccac 420
gcgaaccatg cctggaagat ctacaggcc atcaactccc acacggtcga caacctgccg 480
atccgcgcgcg atttccagat taagccgcgc gtgcatacca tcgccgtgtg gagcccgctc 540
gacgggggtg tggccccgga gacgagcga ggcagccccg agcagagcga cgagcgcttg 600
gagctggccg tgaccacat gggctttgcg gctagcaaga ccggggcgga ggcagtggtc 660
cgcttggtcg ccgccgcct ctga 684

<210> 23

<211> 684

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Створена синтетичним способом

<400> 23

atgctcaagc cccacctta cggccgtctg ctccgcgaac tggctgatat cccggcgatc 60
gtgactgctc cgttccgcgg cgcagccaaa atgggcaaac tggctgatgg cgagccggta 120
ctgggtgctgc ccggcttcct ggccgacgac aacgcgacca gcgtgctgcg gaagaccttc 180
gaggtcgccg gctttgcgtg cagcggctgg gaaaagggct tcaacctcgg cattcgtggc 240
gacctcatgg actacctggc cgaccgcctg cgcgccgtga gcgaggccgc gggggggcag 300

aaggttatcg tggtcggctg gagtctcggc ggcctctacg cccgggagct tggccacaag 360
 gccccgaac tgatcaggat ggtcgtcacg ctcggctctc cgttcgccgg cgacctccac 420
 gcgaaccatg cctggaagat ctacgaggcc atcaactccc acacggtcga caacctgccg 480
 atccccgcgcg atttccagat taagccgccg gtgcatacca tcgccgtgtg gagcccgctc 540
 gacgggggtgg tggccccgga gacgagcgaa ggcagccccg agcagagcga cgagcgcttg 600
 gagctggccg tgaccacat gggctttgcg gctagcaaga ccggggcgga ggcagtggtc 660
 cgcttggtcg ccgccgcct ctga 684

<210> 24
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 24
 tcgaccgtgt ggctgttgat cgcctcgtag atcttccaaa tatggttggc gtggaggtcg 60
 c 61

<210> 25
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 25
 tcgaccgtgt ggctgttgat aatctcgtag atcttccaaa tatggttggc gtggaggtcg 60
 c 61

<210> 26
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 26
 tcgaccgtgt ggctgttgat aatatggtag atcttccaaa tatggttggc gtggaggtcg 60
 c 61

<210> 27
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 27
 tcgaccgtgt ggctgttgat cgcattgtag atcttccaaa tatggttggc gtggaggtcg 60
 с 61

<210> 28
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 28
 tcgaccgtgt ggctgttgat aatctcgtag atcttccacg catggttggc gtggaggtcg 60
 с 61

<210> 29
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 29
 ttgggctcga gtcagagccg agacgcgacc agccggacca cag 43

<210> 30
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 30
 tgggtgctgc cggcttcctg tgtcgtgaca acgccacctc ggtgct 46

<210> 31
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 31
 tgggtgctgc cggcttcctg tgtgacgaca acgccacctc ggtgct 46

<210> 32
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 32
 tggtagctgcc cggcttcctg gcccgtagaca acgacacctc ggtgct 46

 <210> 33
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 33
 tcggcggcct ctatgcgcgc attctgggccc acaaggcgcc cga 43

 <210> 34
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 34
 tcggcggcct ctatgcgcgc cttctgggccc acaaggcgcc cga 43

 <210> 35
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 35
 tcggcggcct ctatgcgcgc aatctgggccc acaaggcgcc cga 43

 <210> 36
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 36
 tcgaccgtgt ggctgttgat aatatggtag atcttccacg catggttggc gtggaggtag 60
 c 61

 <210> 37
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 37
 tcgaccgtgt ggctgttgat cgcattgtag atcttcacac catggttggc gtggagggtcg 60
 с 61

<210> 38
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 38
 ggccgaccaca ccgcgatggt atgcaccggc ggcttaattct gga 43

<210> 39
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 39
 ggccgaccaca ccgcgatggt aagcaccggc ggcttaattct gga 43

<210> 40
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 40
 ttctgtggcga cctctgtggac tatctggtcg accggtgcg ggc 43

<210> 41
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 41
 ctgcgaaaat gggcaaaactg gctgatggcg agccggtact ggt 43

<210> 42
 <211> 58
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Створена синтетичним способом

<400> 42
tgctcgggcg agccttcsga ggtctccggc gccacaaccs cgtcgagcgg cgaccaca 58

<210> 43
<211> 58
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Створена синтетичним способом

<400> 43
tgctcgggcg agccttcsga cgtctccggc gccacaaccs cgtcgagcgg cgaccaca 58

<210> 44
<211> 58
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Створена синтетичним способом

<400> 44
tgctcgggcg agccttcsga cgtctccggc gccaccaccs cgtcgagcgg cgaccaca 58

<210> 45
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Створена синтетичним способом

<400> 45
aggcgccgg tggtcagaag gttatcgtgg tcggctggag cctcggcggc ctctatgcgc 60

<210> 46
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Створена синтетичним способом

<400> 46
aggcgccgg tggtcagaag gttatcgtgg tcggctggag tctcggcggc ctctatgcgc 60

<210> 47
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Створена синтетичним способом

<400> 47

aggcggccgg tggtcagaag gtgatcgtgg tcggctggag tctcggcggc ctctatgcgc 60

<210> 48
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 48
 tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacg accatccgga tcaattcggg cgccttgtgg 60

<210> 49
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 49
 tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacg accatcctga tcaattcggg cgccttgtgg 60

<210> 50
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 50
 tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacc accatcctga tcaattcggg cgccttgtgg 60

<210> 51
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 51
 tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacg accatcctga tcagttcggg cgccttgtgg 60

<210> 52
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 52
 tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacc accatcctga tcaattcggg cgccttgtgg 60

<210> 53
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 53
 tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacg accatccgga tcagttcggg cgccttgtgg 60

 <210> 54
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 54
 tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacc accatccgga tcagttcggg cgccttgtgg 60

 <210> 55
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 55
 tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacg accatcctga tcaattcggg cgccttgtgg 60

 <210> 56
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 56
 tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacg accatcctga tcagttcggg cgccttgtgg 60

 <210> 57
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Створена синтетичним способом

 <400> 57
 tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacc accatccgga tcaattcggg cgccttgtgg 60

 <210> 58
 <211> 60
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Створена синтетичним способом

<400> 58

tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacc accatcctga tcagttcggg cgccttgtgg 60

<210> 59

<211> 60

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Створена синтетичним способом

<400> 59

tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacc accatccgga tcaattcggg cgccttgtgg 60

<210> 60

<211> 60

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Створена синтетичним способом

<400> 60

tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacc accatccgga tcaattcggg cgccttgtgg 60

<210> 61

<211> 60

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Створена синтетичним способом

<400> 61

tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacc accatccgga tcagttcggg cgccttgtgg 60

<210> 62

<211> 43

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Створена синтетичним способом

<400> 62

tgggtgctgcc cggcttctctg tgtgacgaca acgccacctc ggt 43

<210> 63

<211> 41

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Створена синтетичним способом

<400> 63
 ttcgtggcga cctcgtggac tatctggtcg accggctgcg g 41

<210> 64
 <211> 47
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 64
 tcggcattcg tggcgacctc atggactatc tggtcgaccg gctgcgg 47

<210> 65
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 65
 ctggtcgacc ggctgcgggc tgtgtcgaag gcggccggtg gtcagaag 48

<210> 66
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 66
 tcgggcgcct tgtggccaag aatgcgcgca tagaggccgc cga 43

<210> 67
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 67
 tcgggcgcct tgtggccaag attgcgcgca tagaggccgc cga 43

<210> 68
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 68

tcgggcgccct tgtggccaag aaggcgcgca tagaggccgc cga 43

<210> 69
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 69
 cggcttaatc tggaatccc gaccgatcgg caggtgtcgc accg 44

<210> 70
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Створена синтетичним способом

<400> 70
 ggcgaccasa ccgcatggt atgcaccggc ggcttaatct gga 43

<210> 71
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 71
 ttgggctcga gtcagagccg agacgcgacc agccggacca cag 43

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601