



(51) МПК
C12N 9/20 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)
C11B 3/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005136868/13, 23.04.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 23.04.2004

(30) Конвенционный приоритет:
 28.04.2003 ДК РА 2003 00634
 14.08.2003 ДК РА 2003 01163

(43) Дата публикации заявки: 27.05.2006

(45) Опубликовано: 10.08.2009 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: WO 99/53769 А, 28.10.1999. WO 99/03962 А,
 28.01.1999. EP 0869167 В1, 07.10.1998. US
 6399121, 04.06.2002.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
 фазу: 28.11.2005

(86) Заявка РСТ:
 ДК 2004/000279 (23.04.2004)

(87) Публикация РСТ:
 WO 2004/097012 (11.11.2004)

Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

**СТРИНГЕР Мэри Энн (ДК),
 ФАТУМ Тине Муксолль (ДК),
 ПАТКАР Шамкант Анант (ДК)**

(73) Патентообладатель(и):

**НОВОЗИМС А/С (ДК),
 КР.ХАНСЕН А/С (ДК)**

(54) ПОЛИПЕПТИД С АКТИВНОСТЬЮ ФОСФОЛИПАЗЫ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано в пищевой промышленности, а также в производстве detergentных материалов. Клонирован ген новой фосфолипазы (FvPLA2) из *Fusarium venenatum*, принадлежащей к группе грибных и бактериальных фосфолипаз XIII PLA2. Определена нуклеотидная последовательность, кодирующая FvPLA2 и ее активную форму,

путем экспрессии которой в гетерологичной системе получен рекомбинантный продукт, обладающий фосфолипазной активностью. Проведено исследование физико-химических свойств и показателей каталитической активности новой фосфолипазы, в соответствии с результатами которого предложено использование FvPLA2 в хлебопечении, производстве растительного масла, изготовлении сыра, а также в составе detergentных композиций. 8 н.п. ф-лы, 7 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 9/20 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)
C11B 3/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2005136868/13, 23.04.2004**

(24) Effective date for property rights:
23.04.2004

(30) Priority:
28.04.2003 DK PA 2003 00634
14.08.2003 DK PA 2003 01163

(43) Application published: **27.05.2006**

(45) Date of publication: **10.08.2009 Bull. 22**

(85) Commencement of national phase: **28.11.2005**

(86) PCT application:
DK 2004/000279 (23.04.2004)

(87) PCT publication:
WO 2004/097012 (11.11.2004)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517

(72) Inventor(s):
STRINGER Mehri Ehmn (DK),
FATUM Tine Muksoll' (DK),
PATKAR Shamkant Anant (DK)

(73) Proprietor(s):
NOVOZIMS A/S (DK),
KR.KhANSEN A/S (DK)

(54) POLYPEPTIDE WITH PHOSPHOLIPASE ACTIVITY AND USE THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and can be used in the food industry, as well as in production of detergent materials. A gene of new phospholipase (FvPLA2) is cloned from *Fusarium venenatum*, which belongs to a group of fungal and bacterial phospholipases XIII PLA2. Analysis has been of physicochemical properties and catalytic activity of the new phospholipase, in accordance with

the results of which proposal is made for using FvPLA2 in baking bread, production of vegetable oil, making cheese, as well as in detergent compositions.

EFFECT: nucleotide sequence is defined, which codes FvPLA2 and its active form, through expression of which a recombinant product with phospholipase activity is obtained in a heterologous system.

8 cl, 6 tbl, 11 ex

Изобретение относится к способу гидролиза фосфолипида, к способу получения фосфолипазы, к способу получения сыра и к фосфолипазе.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Сораньи с соавт. (Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20:5079-5090) описывает фосфолипазу (TbSP1) из *Tuber borchii* и нуклеотидную последовательность к ДНК гена, кодирующего ее. Ниже приведена информация по разным источникам о пептидной последовательности, полученной из указанных ниже организмов:

- COGEME Phytopathogenic Fungi and Oomycete EST Database, Unisequence ID:

VD0100C34, *Vetricillium dahliae*

- NCBI Protein database, gi: 18307435, *Neurospora crassa*

- NCBI Protein database, gi: 16519372, *Helicosporum sp.* NH1

- WO 0056762, SEQ ID NO: 5954, *Aspergillus oryzae*

- TREMBL Protein database, EAA28927, *Neurospora crassa*

В US 6399121 описывается использование фосфолипазы при получении сыра.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения проанализировали известные данные по последовательностям для грибных фосфолипаз А2 из группы XIII и идентифицировали дополнительные последовательности либо на основе данных, приведенных в опубликованных источниках по последовательностям, либо при скрининге соответствующих последовательностей из природных источников. Авторы показали, что при экспрессии генов, кодирующих грибные фосфолипазы А2 из группы XIII, в соответствующем организме-хозяине экспрессированные последовательности состоят из корового пептида, соединенного с пептидной последовательностью на N- или C-концевой стороне, или на обеих сторонах, при этом экспрессия гена в соответствующем организме-хозяине может вести к расщеплению экспрессируемого пептида с получением корового пептида без удлиняющего пептида, достигающего N- или C-конца. Они также показали, что коровый пептид, не включающий какого-либо пептидного удлинения пептида, обладает значительно более высокой активностью фосфолипаз, чем коровый пептид, соединенный с пептидным(ыми) удлинением(ями). И наконец, они показали, что найденный ими при использовании данного способа коровый пептид аналогичен по длине и последовательности известному зрелому пептиду из *Helicosporum sp.* (Wakatsuki, S. et al. (2001) Biochim. Biophys. Acta 1522: 74-81) с неизвестной функцией и к бактериальным фосфолипазам А2 из группы XIII, в которых отсутствуют пептидные удлинения, отличные от тех, которые относятся к сигналам секреции (Sugiyama, M. et.al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 20051-20058).

Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что фосфолипаза, обладающая сходством по последовательности активного сайта и по уровню консервативности по цистеиновому остатку с грибной фосфолипазой А2 из группы XIII, полезна для получения сыра.

Кроме того, авторы изобретения обнаружили и выелили ген, кодирующий новую фосфолипазу из *Fusariumvenenatum* A3/5, который был вначале депонирован как *Fusariumgraminearum* ATCC 20334, а затем классифицирован как *Fusariumvenenatum* (Yoder and Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80 и O'Donnel et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67). Данная фосфолипаза принадлежит к грибной/бактериальной группе XIII PLA2, в соответствии с определением Сораньи с соавт. (Soragni, E., et al., 20 (2001) EMBO J 20:5079-5090). Авторы изобретения также клонировали ген, кодирующий новую фосфолипазу, в штамме *E. coli* и затем использовали клонированный ген для создания конструкции,

экспрессирующей ген фосфолипазы из *Fusarium* в *Aspergillusoryzae*. Авторы изобретения трансформировали *Aspergillusoryzae* данной конструкцией и выделили фосфолипазу из трансформированных клеток *Aspergillus*.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу получения фосфолипазы, который включает процессинг экспрессированного грибного пептида, позволяющий отщепить пептид от С-концевого конца и/или пептид от N-концевого конца с получением корового пептида, где коровый пептид включает:

а) аминокислотную последовательность, образованную аминокислотами 146-153 из SEQ ID NO: 1, аминокислотами 87-94 из SEQ ID NO: 3 или аминокислотами 79-86 из SEQ ID NO: 12, или последовательность, идентичную любой из указанных аминокислотных последовательностей, за исключением замещения одной аминокислоты другой аминокислотой; и

б) по меньшей мере два цистеиновых остатка, расположенных на N-концевом участке последовательности, приведенной в а); и

в) по меньшей мере два цистеиновых остатка, размещенных на С-концевом участке последовательности, приведенной в а).

Изобретение также относится к способу гидролиза фосфолипида фосфолипазой по настоящему изобретению. Кроме того, изобретение относится к способу получения сыра путем взаимодействия молока для сыроделия или фракции такого молока с фосфолипазой с последующим получением сыра из указанного молока для сыроделия.

И наконец, настоящее изобретение относится к фосфолипазе, которая является полипептидом с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична отдельным идентифицированным последовательностям.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Экспрессированный пептид

В практике осуществления настоящего изобретения используется экспрессированный грибной пептид, принадлежащий к группе, определяемой на основе сходства последовательностей активного сайта и уровня консервативности по цистеиновому остатку, как параметров, используемых при определении группы «фосфолипаза А2 из грибной/бактериальной группы XIII», в соответствии с предложением Сораньи с соавт. (Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20:5079-5090). Пептид имеет грибную природу, то есть получен из *Tuber*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Helicosporum* или *Aspergillus*, в особенности *T. borchii*, *T. albidum*, *V. dahliae*, *V. tenerum*, *N. crassa*, *Helicosporum* sp. HN1 или *A. oryzae*.

Пептид может обладать фосфолипазной активностью, например, активностью фосфолипазы А, такой как активность фосфолипазы А1 и/или активность фосфолипазы А2.

Некоторые конкретные примеры представляют собой известные пептиды с аминокислотными последовательностями, перечисленными ниже в перечне последовательностей. Ниже указаны организмы-источники и соответствующие литературные ссылки:

- SEQ ID NO: 1. *Tuberborchii*, Soragni, E., et al., (2001) EMBO J. 20:5079-5090;
- SEQ ID NO: 3. *Verticillium dahliae*, COGEME Phytopathogenic Fungi and Oomycete EST Database, Unisequence ID: VD0100C34;
- SEQ ID NO: 4. *Neurospora crassa*, NCBI Protein database, gi: 18307435;
- SEQ ID NO: 5. *Helicosporum* sp. NH1, NCBI Protein database, gi: 16519372;
- SEQ ID NO: 7. *Aspergillus oryzae*, [WO 0056762](#), SEQ ID NO: 5954;
- SEQ ID NO: 8. *Neurospora crassa*, TREMBL Protein database, EAA28927.

Кроме того, авторами настоящего изобретения были выделены следующие грибные фосфолипазы с указанными ниже последовательностями, из природных источников, приобретенных из общественно доступных коллекций или собранных в указанной стране и в указанный год:

- 5 - SEQ ID NO: 10. *Tuber albidum*, Purchased from Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, изолят CBS272.72;
- SEQ ID NO: 12. *Vetricillium tenerum*, Ireland, 1996.

10 Авторы осуществили встраивание гена из *T.albidum* (SEQ ID NO: 9) в *E. coli* и депонировали клон в Коллекции на условиях Будапештского договора 12 февраля 2003 года. Депонирование было осуществлено в Коллекции микроорганизмов и клеточных культур в Германии (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany) и ему был присвоен депозитарный номер DSM 15441.

15 В одном варианте настоящее изобретение относится к фосфолипазе, которая является полипептидом с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, идентична аминокислотам на участке 91-210 в SEQ ID NO: 10 (*T.albidum*), аминокислотам на участке 92-211 в SEQ ID NO: 1 (*T. borchii*), аминокислотам на участке 30-137 в SEQ ID NO: 12 (*V. tenerum*), аминокислотам на участке 38-145 в SEQ ID NO: 3 (*V.dahliae*), аминокислотам на участке 44-151 в SEQ ID NO: 4 (*N. crassa*), аминокислотам на участке 37-157 в SEQ ID NO: 7 (*A oryzae*) или аминокислотам на участке 58-168 в SEQ ID NO: 8 (*N. crassa*).

25 Процессинг пептида

Анализируя последовательности фосфолипазы, приведенных в перечне последовательностей, авторы изобретения обнаружили, что каждая экспрессированная аминокислотная последовательность состоит из сигнального пептида, корового пептида и дополнительной пептидной последовательности с неизвестной функцией, присоединенной к С- или N-концу, или к обоим концам корового пептида.

30 Коровый пептид

35 Коровые пептиды характеризуются одинаковым сходством последовательности активного сайта и уровнем консервативности по цистеиновому остатку, найденным Сораньи с соавт. (Soragni, E., et al., (2001) EMBO J. 20:5079-5090), с фосфолипазой A2 из грибной/бактериальной группы XIII.

40 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения коровые пептиды включают: а) последовательность, образованную аминокислотами 146-153 в SEQ ID NO: 1, аминокислотами 87-94 в SEQ ID NO: 3 или аминокислотами 79-86 в SEQ ID NO: 12; или последовательность, идентичную любой из указанных аминокислотных последовательностей, за исключением замещения одной аминокислоты другой аминокислотой; и б) два цистеиновых остатка, расположенных на N-концевом участке последовательности, приведенной в а); и с) два цистеиновых остатка, расположенных на С-концевом участке последовательности, приведенной в а).

45 Один из цистеиновых остатков, расположенных на N-концевом участке последовательности, приведенной в а), может быть, например, отделен от последовательности, приведенной в а), 0-5 аминокислотами, например, 0-3 аминокислотами, предпочтительно 0-2 аминокислотами и еще более предпочтительно 1 аминокислотой. Другой из цистеиновых остатков, расположенных на N-концевом участке последовательности, приведенной в а), может быть, например,

отделен от последовательности, приведенной в а), 14-20 аминокислотами, например, 15-19 аминокислотами, предпочтительно 16-18 аминокислотами и еще более предпочтительно 17 аминокислотами.

5 Один из цистеиновых остатков, расположенных на С-концевом участке последовательности, приведенной в а), может быть, например, отделен от последовательности, приведенной в а), 22-29 аминокислотами, например, 23-28 аминокислотами, предпочтительно 24-27 аминокислотами и еще более предпочтительно 25-26 аминокислотами. Другой из цистеиновых остатков,
10 расположенных на С-концевом участке последовательности, приведенной в а), может быть, например, отделен от последовательности, приведенной в а), 27-49 аминокислотами, например, 29-46 аминокислотами, предпочтительно 30-43 аминокислотами, еще более предпочтительно 32-42 аминокислотами и наиболее предпочтительно 35-40 аминокислотами.

15 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения коровый пптитд включает четыре цистеиновых остатка, сопоставляемых с цистеиновыми остатками в SEQ ID NO: 1, под номерами 128, 144, 180 и 194, соответственно, когда полная экспрессированная последовательность фосфолипазы сопоставляется
20 (выравнивается) одновременно с последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

Согласно настоящему изобретению, экспрессированный полипептид расщепляют, с тем чтобы отделить коровый пептид от присоединенного(ых) пептида(ов).
25 Расщепление может быть осуществлено *in vivo* посредством экспрессии в клетке соответствующего нитевидного гриба-хозяина, или *in vitro*, например, при обработке соответствующей фосфолипазой, такой как Kex2.

Точки расщепления могут быть обнаружены в пределах 11 аминокислот в
30 последовательности, которая представляет собой FG, или внутри 10 аминокислот в последовательности, которая представляет собой сайт Kex2. Сайты Kex2 представляют собой, например, RR, KR, KK или RK. В одном варианте осуществления изобретения коровый пептид имеет длину 100-150 аминокислот, например, 110-140 аминокислот, 115-133 аминокислоты, 118-129 аминокислот или 118-126 аминокислот.

35 В одном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессированную фосфолипазу расщепляют на участке, включающем 0-18 аминокислот, таком как участок из 3-16 аминокислот, предпочтительно 5-14 аминокислот, на N-концевом участке последовательности, при сопоставлении с аминокислотами 97-101 в SEQ ID
40 NO: 1, когда полная экспрессированная последовательность фосфолипазы сопоставляется (выравнивается) одновременно с последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

45 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессированную фосфолипазу расщепляют на участке, включающем 0-11 аминокислот, таком как участок из 0-9 аминокислот, предпочтительно 0-7 аминокислот, на С-концевом участке последовательности, при сопоставлении с аминокислотами 204-209 в SEQ ID NO: 1, когда полная экспрессированная
50 последовательность фосфолипазы сопоставляется одновременно с последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения

процессированная фосфолипаза обладает удельной фосфолипазной активностью, которая выше, чем активность экспрессированного пептида до процессинга, например, в одном варианте удельная активность фосфолипазы по меньшей мере в 2
 5 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 10 раз превышает удельную активность фосфолипазы экспрессированного пептида до процессинга. В одном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессированный пептид до процессинга не обладает измеряемой активностью фосфолипазы.

10 Активность фосфолипазы может быть, например, определена в тесте LEU при гидролизе соевого лецитина (L-альфа-фосфатидилхолин) при pH 8,0 и 40°C в течение 2 минут. Активность фосфолипазы выражают в виде относительного потребления титрующего агента (0,1 М NaOH), необходимого для поддержания постоянного pH, на фоне стандарта.

15 Экспрессия в клетках-хозяевах нитевидных грибов

Нитевидный гриб, взятый в качестве клетки-хозяина, может представлять собой, например *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Neurospora*,
 20 *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Thermomyces*, *Thielavia*, *Tolyposcladium* или *Trichoderma*, в особенности *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *F. bac-tridiodes*, *F. cerealis*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. graminum*, *F. heterosporum*, *F. negundi*, *F. oxysporum*, *F. reticulatum*, *F. roseum*, *F. sambucinum*, *F. sarcochroum*, *F. sporotrichioides*, *F. sulphureum*, *F. torulosum*, *F. trichothecioides*, *F. venenatum*,
 25 *H. insolens*, *M. thermophila*, *N. crassa*, *P. purpurogenum*, *R. miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thielaviaterrestris*, *Trichodermaharzianum*, *Trichodermakoningsii*, *Trichodermalongibrachiatum*, *Trichodermareesei* или *Trichodermaviride*.

В предпочтительном варианте организм хозяина представляет собой *Aspergillus*, *Fusarium* или *Trichoderma*, в особенности *A. niger*, *A. oryzae*, *F. venenatum*, *F. sambucinum*
 30 или *F. cerealis*.

Процедуры трансформации, культивирования, экспрессии и восстановления могут быть осуществлены традиционными способами, например, с использованием основных методик, описанных в EP 238023, EP 305216, WO 9600787, EP 244234 или в работе Кристенсена с соавт. (Т. Christensen et al., BioTechnology, vol. 6, Dec. 1988, 1419-
 35 22).

Полипептид фосфолипазы и соответствующая ДНК

В одном варианте настоящее изобретение относится к полипептидам, обладающим фосфолипазной активностью, где указанные полипептиды включают
 40 аминокислотную последовательность (или предпочтительно состоят из нее), которая обладает идентичностью к аминокислотам 29-146 в SEQ ID NO: 16 (например, зрелому полипептиду) на уровне, равном по меньшей мере 80%, таком как по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере на уровне 96%, таком как по
 45 меньшей мере 97%, и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%, таком как по меньшей мере 99%.

Предпочтительно полипептиды включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; ее аллельный вариант или ее фрагмент, который
 50 обладает фосфолипазной активностью. В другом предпочтительном варианте полипептид по настоящему изобретению включает аминокислоты 29-149 из SEQ ID NO: 16. В еще одном предпочтительном варианте полипептид по настоящему изобретению состоит из аминокислот 29-146 из SEQ ID NO: 16.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, который включает нуклеотидную последовательность (или предпочтительно состоит из нее), которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью с нуклеотидами 133-495 в SEQ ID NO: 15. Предпочтительно нуклеотидная последовательность обладает идентичностью по меньшей мере на уровне 85%, такой как по меньшей мере 90% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность, такой как по меньшей мере 96% идентичность, например, по меньшей мере 97% идентичность, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичность, например, по меньшей мере на уровне 99%, с нуклеотидами 133-495 в SEQ ID NO: 15. Предпочтительно нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, обладающий фосфолипазной активностью.

Фосфолипаза может быть получена из штамма *Fusarium*, в особенности *F. Venenatum*, с использованием зондов, разработанных на основе последовательностей ДНК, приведенных в настоящем описании. В одном варианте фосфолипаза обладает активностью фосфолипазы А.

Фосфолипаза может быть получена путем трансформации соответствующей клетки-хозяина последовательностью ДНК, кодирующей фосфолипазу, с последующим культивированием трансформированного организма в условиях, обеспечивающих продуцирование фермента, и выделением фермента из культуры.

Организм хозяина представляет собой предпочтительно эукариотическую клетку, в частности грибную клетку, такую, как дрожжевая клетка, или клетку нитевидного гриба, такого как клетка штамма *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* или *Saccharomyces*, в особенности *A. niger*, *A. oryzae*, *F. venenatum*, *F. sambucinum*, *F. cerealis* или *S. cerevisiae*, например, штамм *A. niger*, продуцирующий глюкоамилазу, такой как штаммы, описанные в US 3677902, или их мутанты. Продуцирование фосфолипазы в таком организме-хозяине может быть обеспечено при использовании основных методик, описанных в EP 238 023 (Novo Nordisk), WO 96/00787 (Novo Nordisk) или EP 244 234 (Alko).

Вектор экспрессии по настоящему изобретению обычно включает управляющие последовательности, функционирующие в качестве промотора, сигнала инициации трансляции и необязательно селективируемый маркер, терминатор транскрипции, ген-репрессор или различные гены-активаторы. Вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор или он может быть интегрирован в геном хозяйской клетки.

Сопоставление последовательностей и определение идентичности

Сопоставление (выравнивание) нуклеотидных последовательностей может быть осуществлено с использованием приложения AlignX программы Vector NTI Program Suite 7,0 с использованием заданных по умолчанию установок, в которых используется модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J. (1994) Nuc. Acid. Res. 22: 4673-4680), матрица swgapdnarnt score matrix, штраф за наличие гэпа 15 и штраф за продолжение гэпа 6,66.

Сопоставление аминокислотных последовательностей может быть осуществлено при использовании приложения AlignX программы Vector NTI Program Suite v8 с использованием заданных по умолчанию установок, в которых используется модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J. (1994)), матрица blosum62mt2 score matrix, штраф за наличие гэпа 10 и штраф за продолжение гэпа 0,1.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения сопоставление последовательностей и расчет балльных показателей гомологии производят с

использованием метода Липмана-Пирсона (Lipman, D.J., and W.R. Pearson (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227: 1435-1441) с использованием таблицы весовых значений остатков PAM250 (Dayhoff, M.O., R.M. Schwartz and B.C. Orcutt (1978) A model of evolutionary change in proteins. In Dayhoff M.O. (ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation. Washington, D.C. Vol. 5. Suppl. 3: pp. 345-358) с использованием заданных по умолчанию установок в программе MegAlign v4.03, инсталлированной в пакет прикладных программ Lasergene (DNASTAR Inc., 1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715). Заданные по умолчанию установки включают параметр K-tuple, равный 2, штраф на наличие гэпа 4 и штраф на удлинение гэпа 12.

Гидролиз фосфолипида

Практическое осуществление настоящего изобретения включает использование при гидролизе фосфолипида, такого как лецитин, цефалин или инозитид.

Изобретение может быть использовано по аналогии с имеющимися в технике процессами, путем замены фосфолипазы, например, в процессе производства хлебобулочных изделий (WO 0032758, WO 9953769), майонезов (GB 1525929, US 4034124) или при обработке растительного масла (US 5264367).

Использование фосфолипазы

Фосфолипаза по настоящему изобретению может использоваться в различных промышленных процессах, включающих фосфолипазы, например, как описано ниже.

Использование в хлебопечении

Фосфолипаза по настоящему изобретению может использоваться при изготовлении теста, хлеба и кексов, например, для повышения эластичности хлеба или кексов. Таким образом, фосфолипаза может использоваться в процессе хлебопечения, включающем добавление фосфолипазы к ингредиентам теста, перемешивание теста и выпечку теста, с получением хлеба. Указанный процесс может быть осуществлен по аналогии с процессом, описанным в US 4567056 или WO 99/53769.

Использование в детергентных материалах

Один из вариантов фосфолипазы может использоваться в качестве детергентной добавки, например, в концентрации (выражаемой в виде чистого ферментного белка) 0,001-10 (например, 0,01-1) мг на грамм детергента или 0,001-100 (например 0,01-10) мг на литр моющей жидкости.

Детергентная композиция по настоящему изобретению может быть, например, изготовлена в виде детергентной добавки, которая применяется при ручной или машинной стирке и которая включает композицию добавки для стирки, подходящую для предварительной обработки окрашенных материалов, и смягчающую композицию для полоскания, или может быть изготовлена в виде детергентной композиции, применяемой в домашнем хозяйстве для очистки сильно загрязненных поверхностей. В составе детергентной композиции для стирки данный вариант может быть эффективным для использования с целью удаления жирных пятен, для отбеливания и для чистки мебели. Детергентная композиция для стирки может быть изготовлена по методике, описанной в GB 2247025, WO 9901531 или WO 9903962.

Детергентная композиция по настоящему изобретению может быть, в частности, изготовлена в виде, подходящем для ручного или машинного мытья посуды, например, как описано в GB 2 247 025 (Unilever) или WO 99/01531 (Procter & Gamble). В композиции для мытья посуды данный вариант может быть эффективным для удаления жирных/масляных пятен, для предупреждения потемнения/обесцвечивания посуды и полимерных компонентов посуды сильно окрашенными компонентами и

для избежания отложения мыла на посуде.

Другие варианты использования

Фосфолипаза по настоящему изобретению может использоваться для улучшения фильтруемости водного раствора или взвеси, получаемых из углеводов после обработки их фосфолипазой. Такая процедура особенно применима к раствору или взвеси, содержащих крахмальный гидролизат, в особенности гидролизат пшеничного крахмала, поскольку он труднее фильтруется и образует мутные фильтраты. Обработка может быть проведена по методике, аналогичной методике, описанной в EP 219 269 (CPC International).

Кроме того, фосфолипаза по настоящему изобретению может использоваться для частичного гидролиза фосфолипидов, предпочтительно лецитина, для получения улучшенных фосфолипидных эмульгаторов. Данный вариант применения описан в энциклопедии Ульмана (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Publisher: VCH Weinheim (1996)), патент JP 2794574 и JP-B 6-087751).

Кроме того, фосфолипаза по настоящему изобретению может использоваться в способе получения корма для животных, который включает перемешивание фосфолипазы с кормовыми веществами и по меньшей мере с одним фосфолипидом. Указанная процедура может быть осуществлена по аналогии с методикой, описанной в EP 743 017.

В еще одном варианте фосфолипаза по настоящему изобретению может использоваться в способе снижения содержания фосфолипидов в пищевом масле, который включает обработку масла фосфолипазой, так что достигается гидролиз основной части фосфолипида, и отделение водной фазы, содержащей гидролизованный фосфолипид, от масла. Данный процесс применим к очистке любого пищевого масла, которое содержит фосфолипид, например, растительного масла, такого как соевое масло, рапсовое масло и подсолнечное масло. Фосфолипаза может, например, использоваться в способах, описанных в JP-A-2-153997 и US 5264367.

Способ получения сыра

Фосфолипаза по настоящему изобретению может использоваться для получения сыра по способу, аналогичному способу, приведенному в US 6399121.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения сыр изготавливают при взаимодействии молока для сыроделия или фракции молока для сыроделия с фосфолипазой по настоящему изобретению с последующим получением сыра из молока для сыроделия.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения сыр изготавливают при взаимодействии молока для сыроделия или фракции молока для сыроделия с фосфолипазой, где указанная фосфолипаза включает:

а) последовательность, приведенную на участке аминокислот 146-153 в SEQ ID NO: 1, аминокислот 87-94 в SEQ ID NO: 3, аминокислот 79-86 в SEQ ID NO: 12; или последовательность, идентичную любой из указанных аминокислотных последовательностей, за исключением замещения одной аминокислоты другой аминокислотой; и

б) два цистеиновых остатка, расположенных на N-концевой стороне последовательности, приведенной в а); и

с) два цистеиновых остатка, расположенных на C-концевой стороне последовательности, приведенной в а).

В контексте настоящего описания термин «молоко для сыроделия» следует понимать как относящийся к любой композиции на основе молока, используемой для

производства сыра. Фракция молока для сыроделия может быть любой фракцией молока для сыроделия, такой как, например, сливки, сепарированное молоко, молоко, пахта, масло или молочный жир.

5 В предпочтительном варианте молоко для сыроделия или фракцию молока для сыроделия подвергают взаимодействию с фосфолипазой по настоящему изобретению в количестве, достаточном для снижения эффекта промасливания в сыре и/или для повышения выхода сыра. Эффект промасливания относится к тенденции сыра выделять масло при хранении и/или расплавлении.

10 В одном аспекте настоящее изобретения относится к способу изготовления сыра, включающему обработку молочной композиции фосфолипазой по настоящему изобретению, с последующим получением сыра из молочной композиции.

15 Другой аспект настоящего изобретения относится к способу изготовления сыра, включающему обработку молочной композиции фосфолипазой, с последующим получением сыра из молочной композиции, где фосфолипазу выбирают из грибных/бактериальных фосфолипаз PLA2 группы XIII. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения грибная/бактериальная PLA2 из группы XIII представляет собой фосфолипазу из гриба, более предпочтительно из гриба, 20 относящегося к *Ascomycetes*. Фосфолипаза, принадлежащая к грибной/бактериальной PLA2 группы XIII, может быть любой фосфолипазой, принадлежащей к данной группе в соответствии с определением Сораньи с соавт. (Soragni, E., et al., (2001) EMBO Journal, 20:5079-5090), и может представлять собой фосфолипазу из любого вида *Tube*, например, *T. borchii*; *Streptomyces*, например, *S. coelicor*; *Verticillium*, например, *V. dahliae*; *Aspergillus*, например, *A. oryzae*; *Neurospore*, например, *N.crassa* или *Helicosporum*.

30 Молочная композиция по настоящему изобретению может представлять собой любую композицию, включающую компоненты молока. Компоненты молока могут быть такими компонентами молока, как молочный жир, молочный белок, казеин, белок сыворотки и лактоза. Молочная фракция может представлять любую фракцию молока, такую как, например, снятое молоко, пахта, сыворотка, сливки, молочный порошок, порошок цельного молока, порошок из снятого молока. В 35 предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения молочная композиция включает молоко, снятое молоко, пахту, цельное молоко, сыворотку, сливки или любое их сочетание. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения молочная композиция состоит из молока, такого как снятое молоко, цельное молоко, сливки, пахта или их любое сочетание.

40 Ферментативная обработка, осуществляемая в соответствии со способом настоящего изобретения, может проводиться путем диспергирования фосфолипазы в молочной композиции в условиях, позволяющих действие фермента, включающих соответствующее время выдерживания и подходящую температуру. Обработка фосфолипазой может проводиться в условиях, выбранных в соответствии с 45 выбранным(ыми) ферментом(ами), на основе подходов, известных в данной области.

50 Ферментативная обработка может проводиться при любом подходящем pH, таком как, например, pH в диапазоне значений 2-10, таком как pH 4-9 или 5-7. В одном варианте обработку фосфолипазой проводят при температуре 3-60°C, такой как 25-45°C (например, в течение по меньшей мере 5 минут, в частности, в течение по меньшей мере 10 минут или по меньшей мере 30 минут, например, в течение 5-120 минут). Фосфолипазу добавляют в подходящем количестве, с тем чтобы достичь желательных свойств получаемого сыра. Предпочтительно фосфолипазу добавляют в

количестве, эффективном для снижения эффекта промасливания сыра и/или для повышения выхода сыра. Подходящая дозировка фосфолипазы обычно укладывается в диапазон 0,001-0,5 мг ферментного белка на г молочного жира, предпочтительно в диапазон 0,01-0,3 мг ферментного белка на г молочного жира и более

5 предпочтительно в диапазон 0,02-0,1 мг ферментного белка на г молочного жира. Сыры, получаемые по способу настоящего изобретения, включают все виды сыра, такие как сыр кампезино, сыр честер, сыр данбо, сыр драбант, сыр херрегард, сыр манчего, сыр проволонский, сыр сан-полен, мягкий сыр, сыр шведский, сыр таледжо, 10 белый сыр, включая творожно-сычужный сыр, сыр, получаемый при сычужном свертывании творога; зрелые сыры, такие как сыр чеддер, сыр колби, эдамский сыр, мюнстерский сыр, сыр грюйер, эмментальский сыр, сыр камамбер, сыр пармезан и сыр романо; голубой сыр, такой как датский голубой сыр; свежие сыры, такие как сыр фета; сыры, получаемые в процессе свертывания с добавлением кислоты, такие как 15 сливочный сыр, сыр невшатель, сыр гуарг, домашний сыр и квезо бланко. В предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к способу получения сыра паста филата, такого как, например сыр моцарелла и сыр пицца. Сыр паста филата, или тянущаяся сырная масса, обычно отличается уникальными 20 пластифицирующими способностями и способностью поддаваться обработке путем проминания свежей сырной массы в горячей воде, которая придает готовому сыру его характерную волокнистую структуру и способностью к плавлению и растяжению (см., например, «Mozzarella and Pizza cheese» by Paul S. Kindstedt, Chees: Chemistry, physics and microbiology, Volume 2: Major Cheese Groups, Second edition, page 337-341, Chapman 25 & Hall).

Перечень последовательностей и депонированные микроорганизмы

Настоящее изобретение содержит информацию в виде перечня последовательностей, внесенного в описание, а также представленного на 30 машиночитаемом носителе, прилагаемом к данной заявке. Кроме того, настоящее изобретение относится к депонированным микроорганизмам. Содержание машиночитаемого носителя данных и информации о депонированных микроорганизмах полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Депонирование биологического материала

35 Приведенный ниже биологический материал был депонирован в соответствии с условиями Будапештского договора в Коллекции микроорганизмов и клеточных культур в Германии (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmBH, Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Germany) и имеет следующие 40 номера доступа:

Депозит	Номер доступа	Дата депонирования
E. coli	DSM 15441	12 февраля 2003 года
E coli	DSM 15442	12 февраля 2003 года

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Среды и субстраты

Среда YP+2%G

10 г дрожжевого экстракта

50 20 г пептона

вода до 1 литра.

Проводят автоклавирование при температуре 121°C в течение 20 минут, добавляют 100 мл 20% стерильного раствора глюкозы.

Среда RA для споруляции

50 г янтарной кислоты

12,1 г нитрата натрия

1 г глюкозы

20 мл 50х соли Фогеля (Davis, R.H and F.J. de Serres (1970), Meth. Enzymol. 17A:79-143)

Все компоненты перемешивают в одном литре дистиллированной воды и фильтруют в стерильных условиях.

Буфер Бриттона-Робинсона

0,023 М фосфорная кислота

0,023 М уксусная кислота

0,023 М борная кислота

Титруют с использованием NaOH или HCl до нужного pH.

МетодыФосфолипазная активность (LEU)

Лецитин гидролизуют при постоянных значениях pH и температуры и определяют активность фосфолипазы как уровень потребления титрующего агента (0,1 N NaOH), добавляемого для нейтрализации высвобожденной жирной кислоты.

Субстрат представляет собой соевый лецитин (L- α -фосфатидилхолин) и условия обработки включают: pH 8,00, температура 40,0°C и длительность реакции 2 минуты. Величину активности в единицах определяют при сравнении со стандартом.

ПРИМЕРЫ**Пример 1: Экспрессия фосфолипазы A2 из *Tuber albidum* в *Aspergillus oryzae***

На основе последовательности ДНК, описанной Сораньи с соавт. (Soragni, E., et al., (supra)), разрабатывают праймеры для проведения реакции амплификации TbSP1 по методу ПЦР на основе геномной ДНК с введением на концы праймера соответствующих сайтов рестрикции для облегчения клонирования продукта ПЦР (SEQ ID NO: 13 и 14). Штамм *Tuber albidum* CBS 272.72 получают из Коллекции культур CBS в Нидерландах (Centraalbureau voor Schimmelkultures, Utecht, The Netherlands) и культивируют на X-агаре при 20°C, в соответствии с рекомендациями CBS, приведенными в перечне культур 1996 года. Отбирают мицелий с поверхности чашек Петри и выделяют суммарную ДНК с использованием

набора FastDNA Spin Kit (BIO101, Inc., Vista, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Амплификацию по методу ПЦР проводят с использованием основной смеси Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (ABgene, Surrey, U.K.) в соответствии с инструкциями производителя и используют для отжига при температуре 52°C в течение первых 5 циклов и при 62°C в течение последних 25 циклов. Получают один продукт ПЦР и определяют последовательность, которая представлена в виде SEQ ID NO: 9, за исключением добавленных синтетических сайтов рестрикции. Сравнение данной геномной последовательности с последовательностью к ДНК, описанной Сораньи с соавт. (E. Soragni, et al.), указывает на наличие единственного интрона.

После удаления интрона нуклеотидная последовательность из *T. albidum* CBS272.72 становится на 92,5% идентична последовательности из *T. borchii* ATCC 96540, штамма, который был использован Сораньи с соавт. (E. Soragni, et al.). Соответствующий пептид, предсказанный на основании геномной последовательности из *T. albidum* CBS272.72, на 93,8% идентичен пептидной последовательности, сообщенной Сораньи с соавт. (Soragni et al.).

Фрагмент ПЦР подвергают рестрикции с использованием *Bam*HI и *Xho*I и клонируют в векторе экспрессии *Aspergillus* pMStr57 с использованием стандартных

методик. Вектор экспрессии pMStr57 содержит те же элементы, что и pCaHj483 (WO 98/00529) с небольшими модификациями, введенными в промотор *Aspergillus* Na2, и содержит последовательности, подходящие для селекции и размножения в *E. coli*, а также для селекции и экспрессии в клетках *Aspergillus*. Конкретно, селекцию в *Aspergillus* осуществляют по гену *amdS* из *Aspergillus nidulans*, который позволяет использовать ацетамид в качестве единственного источника азота. Экспрессия в клетках *Aspergillus* связана с вовлечением промотора модифицированной нейтральной амилазы II (NA2) из *Aspergillus niger*, который слит с 5'-лидерной последовательностью гена из *Aspergillus nidulans*, кодирующего триозофосфатизомеразу (*trp*), и с терминатором из гена *Aspergillus niger*, кодирующего амилоглюкозидазу. Ген, кодирующий фосфолипазу A2, в полученной конструкции экспрессии *Aspergillus*, pMStr70 секвенируют и полученную последовательность сравнивают с последовательностью, определенной ранее для не клонированного фрагмента ПЦР, SEQ ID NO: 9. Единственная мутация Т на С была найдена на расстоянии 52 н.п. в направлении по ходу транскрипции от стоп-кодона.

Клетки *Aspergillus oryzae* трансформируют с использованием pMStr70 в рамках стандартных методик, описанных в работе Кристенсена с соавт. (Т. Christensen et al., (1988), BioTechnology 6, 1419-22). Трансформанты культивируют в среде YP+2%G со встряхиванием при 275 об/мин при 30°C и отслеживают экспрессию фосфолипазы A2 из Tuber, TbPLA2, по результатам электрофореза в ДСН-ПААГ.

Характеристика белка

Анализ в ДСН-ПААГ выявляет две полосы, которые примерно соответствуют м.в. 25 и 16 кДа. Супернатант очищают ионообменной хроматографией на колонке с SP-сефарозой, уравновешенной 50 мМ ацетатным буфером, и проводят элюцию 1М NaCl, pH 5,0. Элюируют два белка в виде двух отдельных фракций. Концентрацию белка определяют с использованием набора Protein Assay ESL, поставляемого компанией Roche. Активность определяют в рамках теста LEU.

	М.в. кДа	Концентрация, мг/мл	Активность, LEU/мл	Удельная активность LEU/мл
Пул 1	23-25	1,32	61	46
Пул 2	16	0,42	272	648

Белки подвергают секвенированию по N-концу. Было показано, что N-концевая последовательность пула 1 (полоса с м.в. 23 25 кДа) соответствует аминокислотам 32-50 в SEQ ID NO: 10. Блоттинг пула 2 (полоса с м.в. 16 кДа) выявляет две полосы с N-концевыми последовательностями, соответствующими аминокислотам 86-98 и 91-103, соответственно. Масс-спектральный анализ двух полос показывает массы, равные 13934 и 14348 Да соответственно, согласуясь с погрешностью 5 Да, с величинами, вычисленными на основании последовательностей аминокислот 86-210 и 91-210 в SEQ ID NO: 10, соответственно.

Пример 2: Процедура очистки двух форм *T. albidum* PLA2, экспрессированных в *Aspergillus oryzae*

Преимущественно при проведении ферментации в *Aspergillus oryzae* трансформанта из примера 1, который продуцирует *T. albidum* PLA2, выявляется две формы ферментов. Одна форма появляется в диапазоне 22-23 кДа, при анализе в ДСН-ПААГ, и соответствует пептиду, сообщенному Сораньи с соавт. (Soragni et al., (supra)). Дополнительно была обнаружена новая форма, которая выявляется в зоне 16-17 кДа при анализе в ДСН-ПААГ и которая обладает высокой удельной активностью и

высокой изоэлектрической точкой.

Очистка пептида 22-23 кДа

Супернатант, получаемый при ферментации и содержащий фосфолипазу из *T. albidum*, экспрессируемую в клетках *A. oryzae* (полученную в примере 1), подвергают стерильному фильтрованию с использованием фильтра EKS, получаемого от

компании Seitz Schenk Bad Kreuznach, Bettrongerstrasse 42, Germany D-73550, Waldstetten. В стерильном профильтрованном супернатанте корректируют pH до значения 8 и ионную силу в районе 4 мСм.

Анионообменная хроматография

Первую стадию очистки проводят по методу анионообменной хроматографии на колонке с 50 мл сефарозы Fast Flow QTM, приобретаемой от компании Амершам Фармация (Amersham Pharmacia). Колонку подвергают предварительному уравниванию с использованием 50 мл Трис-ацетатного буфера, pH 8. Стерильный профильтрованный ферментированный бульон вносят на колонку, которую промывают тем же буфером до вымывания из нее несвязанного материала.

Связанные белки элюируют тем же самым буфером, pH 8, содержащим 1М хлорид натрия, со скоростью течения 5 мл/мин до получения конечного объема 500 мл.

Собирают фракции по 5 мл каждая с использованием коллектора фракций и определяют активность фосфолипазы во всех фракциях по количественному методу с использованием лецитина в качестве субстрата и с использованием L- α -фосфатидилхолина, приобретаемого от компании Сигма (Sigma), продукт P-5638, и активность анализируют с использованием набора NEFA C kit, приобретаемого от компании Вако (Wako Chemicals GmbH, Nissan Strasse 2, 41468 Neuss, Germany). Ниже описана подробная и точная процедура проведения анализа.

Растворы субстрата, содержащие 10 мг/мл лецитина в качестве субстрата, получают в различных буферах, таких как 50 мМ ацетатный буфер, pH 5, 50 мМ Hepes, pH 7, или 50 мМ Трис-ацетатный буфер, pH 9, содержащих 2 мМ CaCl₂ и 0,1% Triton X-100, приобретаемых от компании Fluka chemicals. Затем субстрат эмульгируют при перемешивании и нагревании при температуре 50°C, охлаждают до 40°C и используют в качестве субстрата.

Количественное определение активности проводят с использованием 300 мкл эмульсии субстрата, инкубируемой с 25 мкл фракций фермента в течение 20 минут при 40°C, после чего 30 мкл реакционной смеси добавляют к 300 мкл красящего реагента А NEFA C, приготовленного в соответствии с инструкцией производителя, инкубируют в течение 10 минут при 37°C и затем добавляют к смеси 600 мкл красящего реагента В NEFA C и продолжают инкубировать данную смесь в течение 10 минут. Полученное синее окрашивание измеряют на спектрофотометре при длине волны 505 нм.

Характеристика белка

Объединяют фракции, содержащие ферментативную активность, и характеризуют по величине молекулярного веса при проведении электрофореза в ДСН-ПААГ с использованием предварительных изготовленных гелей Novix Pre casted, содержащих 4-20% Трис-глицина, получаемых от компании Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA 92008, USA.

Выявляют белок с М.в. 22-23 кДа, который подвергают блоттингу и анализу N-концевой последовательности с использованием секвенатора Applied Biosystem.

Определяют первые 19 аминокислотных остатков с N-конца, которые, как было показано, соответствуют последовательности аминокислот 32-50 в SEQ ID NO: 10.

Очистка пептида размером 16-17 кДа

Профильтрованный в стерильных условиях супернатант с экспрессированной в клетках *A. oryzae* фосфолипазой из *T. albidum*, корректируют до pH 4,7 и ионной силы до 4 мСм.

Катионообменная хроматография

Сефарозу SP-sepharoseTM fast flow приобретают от компании Амершам Фармация (Amersham Pharmacia). В колонку вносят 50 мл сефарозы и уравнивают с использованием 50 мл ацетатного буфера, pH 4,7, затем на колонку вносят ферментационной супернатант и связанный материал вымывают тем же буфером.

Связанный белок с высоким значением pI элюируют в линейном градиенте соли с использованием 50 мМ ацетатного буфера, pH 4,7, содержащего 1 М хлорида натрия. В данной процедуре размер фракций и скорость течения аналогичны параметрам, использованным при характеристике формы фосфолипазы с низким pI. Активность фосфолипазы определяют количественно во фракциях с использованием набора NEFA, как указано выше. Фракции, содержащие активные фосфолипазы, объединят и проводят электрофорез в ДСН-ПААГ, как было описано выше.

Выявляют белок размером 16-17 кДа, который обладает высокой изоэлектрической точкой, выше 9.

Проводят анализ белка по N-концевой последовательности после блоттинга белка, секвенируют с использованием системы Applied biosystem, выявляя, что N-концевая последовательность полностью отличается от последовательности, сообщенной Сораньи с соавт. (Soragni et al. supra). Таким образом, было показано, что PLA2 из *T. albidum* имеет две формы, полученные после разного N-концевого процессинга, с N-концевыми последовательностями, соответствующими аминокислотам на участках 86-105 и 91-110 в SEQ ID NO:10, соответственно.

Пример 3: Получение сыра с использованием фосфолипазы *T. albidum*

Используют пастеризованные не гомогенизированные сливки (North Carolina State University Dairy Plant) для стандартизации пятисот граммов пастеризованного, не гомогенизированного сепарированного молока (North Carolina State University Dairy Plant) до содержания жира 3,5%, нужного для получения сыра моццарелла с полным содержанием жира. Молоко для сыроделия, используемое в каждом эксперименте, обрабатывают либо фосфолипазой из *T. albidum* 16-17 кДа, приготовленной в соответствии с процедурой примера 2, либо коммерческим препаратом фосфолипазы Lecitase® 10L (Novozymes A/S, Bagsvard, Denmark), и помещают в водяную баню на 35°C до уравнивания до заданной температуры. Используют исходный pH молока для сыроделия и добавляют 0,01 мас.% культуры закваски.

Отслеживают pH до достижения уровня 6,4. Разбавляют 250 мкл сычуга (Novozym 89L) деионизированной водой до общего объема раствора 9 мл, добавляют один мл данного раствора к молоку для сыроделия и молоко для сыроделия энергично перемешивают в течение 3 минут. Удаляют магнитную мешалку и сычужное молоко оставляют выстаиваться при 35°C.

После проведения указанных выше обработок сырная масса считается готовой для нарезания, если при введении в нее шпателя видны острые края среза. Сыр нарезают, проталкивая нож вниз, и, держа стакан, быстро поворачивают нож и выдергивают вверх. Сырную массу оставляют на 5 минут и затем осторожно перемешивают ложкой. Температуру поднимают до 41°C при перемежающемся осторожном перемешивании в течение примерно 40 минут или пока pH не упадет до 6,0-5,9. После проведения дренажа сырной массы с использованием специальной ткани ее затем

заменяют в стакане и держат при температуре 41°C в водяной бане с удалением сыворотки, по мере необходимости.

Когда значение рН сырной массы достигает 5,3, чашку из нержавеющей стали, содержащую сырную массу, заливают в водяной бане при 69°C в течение 5 минут и затем растягивают руками. Сырную массу кондиционируют в холодной воде в течение 30 минут. Далее сырную массу сушат бумажным полотенцем, взвешивают и оставляют на холоду в течение ночи.

Проводят контрольные эксперименты по изготовлению сыра с той же самой партий молока и по тем же процедурам, за исключением добавления фосфолипазы.

Фактический выход сыра вычисляют на основании веса сыра после растягивания относительно общего веса молока для сыроделия.

Выход сыра после корректировки влажности выражают в виде фактического выхода, скорректированного по уровню стандартного постоянного содержания влаги. Выход, скорректированный по влажности, вычисляют путем умножения фактического выхода на коэффициент отношения фактического содержания влаги к стандартному уровню влажности в соответствии с формулой:

$$Y_{adj} (Y_{act} \times 1 - M_{act}) / (1 - M_{std}),$$

где Y_{adj} = выход сыра, скорректированный по влажности, Y_{act} = фактический выход сыра, M_{act} = фракция с фактической влажностью и M_{std} = фракция со стандартной влажностью (0,48).

Выход сыра с скорректированной влажностью во всех экспериментах и контролях показан в таблице 1.

Таблица 1			
Обработка	мг белка фосфолипазы/г жира	Выход сыра с откорректированной влажностью	Повышение выхода в сравнении с контролем
Контроль	0	10,72	
T. albidum PLA2	0,055	11,04	2,9%
Контроль	0	11,25	
T. albidum PLA2	0,055	11,57	2,8%
Контроль	0	9,22	
Lecitase® 10L	0,18	9,48	2,7%
Контроль	0	9,62	
Lecitase® 10L	0,18	9,90	2,8%

Пример 4: Клонирование и экспрессия фосфолипазы (FvPLA2) из *Fusarium venenatum* в *Aspergillus oryzae*

Клетки *Fusarium venenatum* A3/5 (первоначально депонированные как *Fusarium graminearum* ATCC 20334 и недавно отнесенные к другому классу *Fusarium venenatum* Иодером и Кристиансенем (Yoder and Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80) и О'Донеллом с соавт. (O'Donnel et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67) растят в течение двух дней в минимальной среде Фогеля (Davis, R.H and F.J. de Serres (1970), Meth. Enzymol. 17A:79-143) при 28°C в качалочной культуре, фильтруют через стерильный фильтр Miracloth (Calbiochem, San Diego, California, USA) и переносят в среду для споруляции RA, в которой их инкубируют в качалочной культуре еще в течение 24 часов при 28°C. Клетки и споры собирают центрифугированием и лизируют, после чего экстрагируют РНК и проводят транскрипцию в кДНК, которую клонируют в pZErO-2 в соответствии с методиками, описанными в WO 00/56762. Количество независимых клонов в данной библиотеке до амплификации составляло $2,5 \times 10^5$, в которой 92% содержали вставки, варьирующие по размеру от 550 до 2500

п.н. Частичные последовательности ДНК были определены примерно для 1000 случайным образом выбранных клонов и указанные последовательности были введены для хранения в компьютерной базе данных при использовании для обработки методик, описанных в WO 00/56762.

5 Нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующая TbSP1, фосфолипазу A2 из *Tuberborchii*, и соответствующий пептид, полученный при ее трансляции, были сообщены Сораньи с соавт. (E. Soragni et al., 2001). Последовательность транслированного белка сравнивают с последовательностями белков, полученных
10 при трансляции частичных последовательностей кДНК из *Fusarium venenatum*, с использованием программы TFASTXY, версия 3.3t08 (Pearson et al., 1997). Одна транслированная последовательность из *F. venenatum* была идентифицирована как обладающая 42% идентичностью к TbSP1 на перекрывающемся участке из 125
15 аминокислот. Была определена полная последовательность вставки кДНК из соответствующего клона FM0700, представленная в виде SEQ ID NO: 15, а последовательность пептида, транслированного на основе данной нуклеотидной последовательности, FvPLA2, показана в виде SEQ ID NO: 16. Указанная последовательность была использована для разработки праймеров FvPLA1 и FvPLA2.2
20 с целью применения в реакции амплификации по методу ПЦР гена из FM0700, кодирующего FvPLA2, с добавлением соответствующих сайтов рестрикции к концам праймера для облегчения субклонирования продукта ПЦР.

FvPLA1: CTGGGATCCTCAAGATGAAGTTCAGCG

FvPLA2.2: GACCTCGAGACCCGCCATTTAAGATT

25 Амплификацию по методу ПЦР проводят с использованием основной смеси Extensor PCR Hi-Fidelity Master Mix (ABgene, Surrey, U.K.) в соответствии с инструкциями производителя и с использованием температуры отжига 52°C и температуры достраивания 60°C в течение 20 циклов.

30 Фрагмент, полученный в реакции ПЦР, подвергают рестрикции ферментами BamHI и XhoI и клонируют в векторе экспрессии pMStr57 для *Aspergillus* в соответствии со стандартными методиками. Вектор экспрессии pMStr57 содержит те же элементы, что и pCaHj483 (WO 98/00529) с небольшими модификациями, введенными в промотор *Aspergillus* Na2, как было описано для вектора pMT2188 в WO 01/12794, и включает
35 последовательности, подходящие для селекции и размножения в *E. coli*, а также для селекции и экспрессии в клетках *Aspergillus*. Конкретно, селекцию в *Aspergillus* осуществляют по гену *amdS* из *Aspergillusnidulans*, который позволяет использовать ацетамид в качестве единственного источника азота. Экспрессия в клетках *Aspergillus*
40 вовлекает участие промотора модифицированной нейтральной амилазы II (NA2) из *Aspergillusniger*, который был слит с 5'-лидерной последовательностью гена из *Aspergillusnidulans*, кодирующего триозофосфатизомеразу (*tpi*), и с терминатором из гена *Aspergillus niger*, кодирующего амилоглюкозидазу. Ген, кодирующий фосфолипазу, в полученной конструкции экспрессии *Aspergillus*, pMStr70, секвенируют
45 и получают последовательность, которая полностью соответствует последовательности, ранее определенной для вставки FM0700.

Штамм *Aspergillus oryzae* BECh2 (WO 00/39322) трансформируют с использованием pMStr77 в соответствии со стандартными методиками (T. Christensen
50 et al., (1988). Трансформанты культивируют в среде YP+2%G на качалке со скоростью 275 об/мин при температуре 30°C и отслеживают экспрессию FvPLA2 проведением электрофореза в ДСН-ПААГ.

Штамм *Escherichia coli*, содержащий ген, кодирующий фосфолипазу из *F. Venenatum*,

был депонирован авторами изобретения в соответствии с условиями Будапештского договора в Германской Коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Germany). Депонирование было осуществлено 12 февраля 2003 года под номером доступа DSM 15442.

Пример 5: Очистка и сравнение полученной последовательности FvPLA2

FvPLA2, полученную при ферментации в рамках процедуры примера 4, очищают ионообменной хроматографией на колонке с SP-сефарозой, уравновешенной 50 мМ ацетатным буфером, pH 4,7, и проводят элюцию 1М NaCl, pH 4,7. Фракции анализируют электрофорезом в ДСН-ПААГ и объединяют фракции, содержащие белок размером 14 кДа. Идентичность чистого белка подтверждают определением его N-концевой последовательности, которая идентична последовательности аминокислот 29-40 в SEQ ID NO:16. Дополнительно определяют массу белка при проведении масс-спектрального анализа, поскольку кажущийся размер, установленный при проведении электрофореза в ДСН-ПААГ, 14 кДа, меньше, чем соответствующая величина для пептида, предсказанная для случая процессинга теоретического пептида, в SEQ ID NO: 16. Было показано, что масса очищенного активного FvPLA2 составляет 13336 Да. Данная молекулярная масса указывает на дополнительный процессинг на С-конце, что согласуется с наличием расщепления между аминокислотами 149 и 150 в SEQ ID NO: 16, поскольку пептидная последовательность на участке аминокислот от 29 до 149 имеет теоретическую массу, равную 13335,66 Да.

Сравнение зрелого процессированного пептида (аминокислоты 29-149 в SEQ ID NO: 16) с известными последовательностями показывает, что ближайшая известная последовательность соответствует фосфолипазе из *Verticillium dahliae*, транслированной на основе последовательности Unisequence ID: VD0100C34 из базы данных по фитопатогенным грибам и оомицетам (COGEME Phytopathogenic Fungi and Oomycete EST Database, Version 1.2 (<http://cogeme.ex.ac.uk/>) (Soanes et al., (2002) Genomics of phytopathogenic fungi and the development of bioinformatic resources. Mol Plant Microbe Interact. 15(5):421-7). Оценивают процессинг частичного пептида, предсказанного по данным о последовательности из *V. dahliae*, при сравнении с результатом процессинга FvPLA2. Расчеты показывают, что идентичность между аминокислотами 29-149 в SEQ ID NO: 16 и определенной последовательностью зрелого пептида фосфолипазы из *V. dahliae* составляет 77%.

Пример 6: Физические свойства FvPLA2

Каталитическая активность

Фосфолипазную активность как функцию концентрации фермента определяют в тесте LEU для FvPLA2 из примера 4. Результаты показаны в таблице 1.

Таблица 1	
Концентрация фермента (мкг/мл)	LEU (мкэквNaOH/мин)
71,1	14,0
53,3	12,7
21,3	10,6
10,7	7,4
5,3	5,6
2,7	4,1

Температурный профиль

Ферментативную активность как функцию температуры определяют для раствора фермента с концентрацией 5,3 мкг/мл. Другие условия соответствуют условиям, использованным в тесте LEU. Результаты приведены в таблице 2.

5

Таблица 2	
Температура (°C)	LEU (мкэквNaOH/мин)
25	3,10
35	4,87
40	5,41
45	6,97
50	7,86
55	9,03
60	8,27
65	6,90

10

15

Стабильность в зависимости от pH

Фермент разбавляют в буфере Бриттона-Робинсона (Britton Robinson) при заданном pH в течение 30 минут при 30°C. После дальнейшего разбавления водой измеряют каталитическую активность в тесте LEU. Результаты показаны в таблице 3.

20

Таблица 3	
pH	LEU (мкэквNaOH/мин)
2	3,78
3	5,11
4	5,60
5	5,49
6	5,37
7	5,61
8	5,52
9	5,64
10	5,50
11	5,21

25

30

Термостабильность

Фермент разбавляют в буфере Бриттона-Робинсона (Britton Robinson) при заданных pH 3 и 10, соответственно, и при pH 7 с использованием 30% сорбита. После инкубации при заданной температуре в течение 30 минут раствор охлаждают до температуры реакционной смеси и анализируют в тесте LEU. Результаты показаны в таблице 4; активности приведены относительно наивысшей измеренной активности.

40

Таблица 4			
Относительная активность (%) как функция pH и температуры			
Температура (°C)	pH 3	pH 10	pH 7/30% сорбит
30	100%	100%	87%
40	95%	92%	100%
50	16%	14%	68%
60	1%	0%	2%

45

Пример 7: Изготовление сыра с использованием FvPLA2

Используют пастеризованные не гомогенизированные сливки (North Carolina State University Dairy Plant) для стандартизации пятисот граммов пастеризованного не гомогенизированного сепарированного молока (North Carolina State University Dairy Plant) до содержания жира 3,5%, получая при этом сыр моццарелла с полным

50

содержанием жира.

Молоко для сыроделия, используемое в каждом эксперименте, обрабатывают либо фосфолипазой из *F. venenatum* (FvPLA2), полученной по процедуре примера 5, либо коммерческим препаратом фосфолипазы Lecitase® 10L (Novozymes A/S, Bagsvard, Denmark) и помещают в водяную баню при 35°C до уравнивания до этой температуры. Используют исходный pH молока для сыроделия и добавляют 0,01 мас.% культуры закваски.

Отслеживают pH до достижения уровня 6,4. Разбавляют 250 мкл сычуга (Novozym 89L) деионизированной водой до общего объема раствора 9 мл, добавляют один мл данного раствора к молоку для сыроделия и молоко для сыроделия энергично перемешивают в течение 3 минут. Удаляют магнитную мешалку и сычужное молоко оставляют для выстаивания при 35°C.

После проведения указанных выше обработок сырная масса считается готовой для нарезания, если при введении в нее шпателя видны острые края среза. Сыр нарезают, проталкивая нож вниз, и, держа стакан, быстро поворачивают нож и выдергивают вверх. Сырную массу оставляют на 5 минут и затем осторожно перемешивают ложкой. Температура поднимается до 41°C при перемежающемся осторожном перемешивании в течение примерно 40 минут и пока pH не упадет до 6,0-5,9. После проведения дренажа сырной массы с использованием специальной ткани ее затем заменяют в стакане и держат при температуре 41°C в водяной бане с отливкой сыворотки, по мере необходимости.

Когда значение pH сырной массы достигает 5,3, чашку из нержавеющей стали, содержащую сырную массу, заливают в водяной бане при 69°C в течение 5 минут и затем растягивают руками. Сырную массу кондиционируют в холодной воде в течение 30 минут. Далее сырную массу сушат бумажным полотенцем, взвешивают и оставляют на холоду в течение ночи.

Проводят контрольные эксперименты по изготовлению сыра с той же самой партией молока и по тем же процедурам, за исключением добавления фосфолипазы.

Фактический выход сыра вычисляют на основании веса сыра после растягивания относительно общего веса молока для сыроделия.

Выход сыра после корректирования влажности выражают в виде фактического выхода, скорректированного по уровню стандартного постоянного содержания влаги. Выход, скорректированный по влажности, вычисляют путем умножения фактического выхода на коэффициент отношения фактического содержания влаги к стандартному уровню влажности в соответствии с формулой:

$$Y_{adj} = (Y_{act} \times 1 - M_{act}) / (1 - M_{std}),$$

где Y_{adj} = выход сыра, скорректированный по влажности, Y_{act} = фактический выход сыра, M_{act} = фракция с фактической влажностью и M_{std} = фракция со стандартной влажностью (0,48).

Выход сыра с корректированной влажностью во всех экспериментах и контролях показан в таблице 5.

Таблица 5			
Обработка	мг белка фосфолипазы/г жира	Выход сыра с откорректированной влажностью	Повышение выхода в сравнении с контролем
Контроль	0	11,70	
FvPLA2	0,071	11,95	2,1%
Контроль	0	11,50	2,8%
FvPLA2	0,071	11,83	

Контроль	0	9,22	
Lecitase® 10L	0,18	9,48	2,7%
Контроль	0	9,62	2,8%
Lecitase® 10L	0,18	9,90	

5 **Пример 8: Изготовление сыра с использованием FvPLA2**

Молоко пастеризуют при 72°C в течение 15 секунд и затем охлаждают до температуры ниже 10°C. Молоко стандартизуют до содержания жира 2,4% с использованием сливок. После стандартизации молоко подвергают предварительному нагреванию в теплообменнике при температуре предварительного созревания жира 34,5°C. 150 кг молока вливают в каждый чан с изготавливаемым сыром и добавляют 15 г культуры (F-DVS ST-M6). Добавляют фосфолипазу, полученную по процедуре примера 5, в дозе 5 LEU/г жира и молоко инкубируют в течение 1 часа при температуре 34,5°C. Добавляют сычуг (Chy-Max Plus, 200 IMCU) и продолжают перемешивание в течение не более 4 минут.

После примерно 60 минут, когда видно, что произошло образование сгустка, его нарезают с использованием 10 мм ножей. Подводят смеситель к чану и через 10 минут начинают обваривание при повышении температуры до 40°C в течение 30 минут. После достижения температуры 41°C продолжают дополнительное перемешивание еще в течение примерно 20 минут до уровня титруемой кислотности 0,15-0,16%. Сырной массе позволяют осесть в чане и проводят ее дренирование. Сырную массу нарезают на равные блоки, которые переворачивают и складывают по два в стопку. Далее сырную массу измельчают в размалывающей машине при рН примерно 5,15-5,20. В кусочки сырной массы добавляют два процента соли (вес/вес).

После измельчения всю сырную массу вводят в устройство для растягивания, которое содержит 70 л уже нагретой до 74°C воды. Переносят в верхнюю камеру примерно 20 л горячей воды и добавляют туда сыр. Когда температура сырной массы достигает 62°C, останавливают растягивание и всю массу перемещают в экструдер. Сырную массу подвергают экструзии с получением 8-9 кусков сыра, каждый весом по 2,3 кг, которые охлаждают при температуре 5-7°C в течение 20 минут. Через 20 минут охлажденный сыр переносят в насыщенный соляной раствор и засаливают в течение 1,5 часа при температуре 5-6°C. Соляной раствор получают при перемешивании 120 кг воды, в которую добавлены соль до 22 Ве, 750 г CaCl₂ (34% раствор), и доводят рН до 5,1. После просаливания сыр сушат примерно в течение 30 минут и взвешивают перед проведением вакуумной упаковки. Отбирают образцы для определения рН и анализа состава (уровень влажности, содержание соли, жира и белка) после хранения в течение примерно 1 недели в холодной комнате.

Фактический выход (AY) корректируют до 48% влажности в сыре:

$$\text{Adj Yield} = \text{AY} \times (100\% \text{ влажности}) / 100-48$$

	Откорректированный выход (кг) контроль	Откорректированный выход (кг) эксперимент	Среднее повышение выхода (кг)	Повышение выхода (%)
День 1	10,62	10,81		
	10,70	10,90	0,195	1,8
День 2	9,90	10,16		
	9,95	10,14	0,225	2,3
День 3	10,00	10,15		
	10,01	10,16	0,15	1,5

50 **Пример 9: Сверхэкспрессия *Aspergillus oryzae* PLA2 (AoPLA2) в клетках**

*Aspergillusoryzae*Среда

DAP2C-1

11 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 г KH_2PO_4

2 г лимонной кислоты, моногидрат

30 г мальтодекстрина

6 г $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$

0,5 г дрожжевого экстракта

0,5 мл раствора микроэлементов металла

1 мл Плуроник PE 6100 (Pluronic PE 6100) (BASF, Ludwigshafen, Germany)

Компоненты смешивают в одном литре дистиллированной воды и порциями

15 отбирают в колбы, добавляя 250 мг $CaCO_3$ к каждой порции по 150 мл.

Среду стерилизуют в автоклаве. После охлаждения к 1 л среды добавляют следующие компоненты:

23 мл 50% (вес/объем) $(NH_4)_2HPO_4$, подвергнутого стерильному фильтрованию

20 33 мл 20% молочной кислоты, подвергнутой стерильному фильтрованию

Раствор микроэлементов металла

6,8 г $ZnCl_2$ 2,5 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 25 0,24 г $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 13,9 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 8,45 г $MnSO_4 \cdot H_2O$

3 г лимонной кислоты, моногидрат

30 Компоненты смешивают в одном литре дистиллированной воды.

Клонирование и частичное секвенирование кДНК, кодирующей фосфолипазу A2 из *Aspergillusoryzae*, описаны в WO 00/56762. Полная последовательность клонов AS3812 показана в SEQ ID NO: 6. Данную последовательность используют для разработки праймера AoPLA1, используемого с векторным праймером pYESrev в реакции

35 амплификации по методу ПЦР гена из AS3812, кодирующего PLA2, при добавлении сайта рестрикции для облегчения субклонирования ПЦР продукта:

AoPLA: TGAGGATCCATCATGAAGAACATCTTCG

pYESrev: gggcgtgaatgtaagcgtgac

40 Амплификацию по методу ПЦР проводят с использованием основной смеси Extensor PCR Hi-Fidelity Master Mix (ABgene, Surrey, U.K.) по инструкциям производителя и с использованием для отжига температуры $52^\circ C$ в течение первых 5 циклов и температуры $60^\circ C$ в течение 20 циклов и времени достраивания 1,5 минуты.

45 Фрагмент ПЦР подвергают рестрикции ферментами BamHI и XhoI и клонируют в векторе экспрессии *Aspergillus* pMStr57 (как описано в примере 1) в соответствии со стандартными методиками. В полученной конструкции экспрессии *Aspergillus*, pMStr71, ген, кодирующий фосфолипазу, секвенируют, выявляя при этом, что полученная последовательность полностью соответствует последовательности, ранее

50 определенной для вставки AS3812.

Штамм *Aspergillus oryzae* BECh2 (WO 00/39322) трансформируют с использованием pMStr71, в соответствии со стандартными методиками (T. Christensen et al., (1988)). Трансформанты культивируют в среде DAP2C-1 на качалке со

скоростью 270 об/мин при температуре 37°C в течение 4 дней, оценивая экспрессию фосфолипазы по электрофорезу в ДСН-ПААГ.

Пример 10: Очистка и выявление процессинга пептида

Фосфолипазу *Aspergillusoryzae* после ферментации по процедуре примера 9
5 фильтруют через стерильный фильтр с размером 0,22 мкм SeitZ-EKS, получаемый от
компании Pall Corporation (Pall SeitzSchenk Filter Systems GmbH Pianiger Str. 137 D-55543
Bad Kreuznach, Germany). Полученный после стерилизующего фильтрования раствор
корректируют до pH 4,7 с использованием разбавленной уксусной кислоты. Далее
10 корректируют ионную силу ферментационного супернатанта, так чтобы
концентрация соли была низкой, а ионная сила ниже 4 мСм. Очистку желательного
белка PLA2 проводят катионообменной хроматографией с использованием
SP-сефарозы fast Flow matrix, от компании Амершам Фармация (Amersham-Pharmacia
(Sweden)). Катионообменную матрицу вносят в колонку, промывают и подвергают
15 предварительному уравниванию с использованием 50 мМ натрий-ацетатного
буфера, pH 4,7 (буфер А) на колонке ХК26 от компании Амершам
Фармация (Amersham-Pharmacia). Супернатант, полученный после ферментации,
который содержит искомую PLA2, доводят до соответствующих значений pH и ионной
20 силы и затем наносят на колонку. Несвязанный материал смывают буфером А,
промывая до тех пор, пока не выйдет весь УФ-поглощающий материал, по
показаниям УФ-детектора, присоединенного к коллектору сбора фракций. Далее
связанные белки элюируют линейным градиентом соли с использованием буфера В,
который содержит 1М хлорид натрия, в качестве соли, в 50 мМ натрий-ацетатном
25 буфере, pH 4,7. Общий объем линейного градиента, достигающий в итоге 1 М
концентрации соли, составляет примерно 500 мл (10 объемов колонки). Собирают в
ходе элюции фракции по 10 мл каждая. Все фракции анализируют на фосфолипазную
активность с использованием в качестве субстрата лецитина от компании
30 Сигма (Sigma). Жирные кислоты, высвобождаемые из лецитина при инкубации с
фосфолипазой, определяют с использованием набора NEFA, от компании Waco.
Фракции, содержащие фосфолипазную активность, проверяют на чистоту белка с
использованием стандартной методики проведения электрофореза в ДСН-ПААГ.
Объединяют фракции, которые содержат одну полосу желательного PLA2,
35 демонстрирующую молекулярную массу около 16 кДа, которую определяют в
сравнении с молекулярной массой стандарта, от компании Амершам
Фармация (Amersham-Pharmacia).

Идентичность чистого белка подтверждают определением его N-концевой
40 последовательности, которая была идентична последовательности аминокислот (АК)
37-45 в SEQ ID NO: 7. Дополнительно определяют массу пептида с помощью
масс-спектрального анализа. Очищенный активный PLA2 из *Aspergillus*
характеризуется двумя массами, 14114 и 14242 Да. Данные различающиеся
молекулярные массы указывают на дополнительный процессинг на С-конце,
45 соответствующий расщеплению между аминокислотами 121 и 122 в SEQ ID NO: 7, так
как пептидная последовательность аминокислот 37-121 имеет теоретическую
массу 14114,11 Да и расщепление между аминокислотами 122 и 123, что позволяет
прогнозировать пептидную последовательность от 37 до 123 аминокислоты как
50 имеющую теоретическую массу 14242,29 Да.

Пример 11: Экспрессия не полностью процессированной фосфолипазы из *Aspergillus oryzae* и *Fusarium venenatum*

Процессинг PLA2 из *Aspergillusoryzae* (AoPLA2) и PLA из *Fusariumvenenatum* (FvPLA2)

на обоих, N- и С-концах, осуществляется по одному или многим основным остаткам (lys или arg), что типично для сайтов расщепления Kexin-подобных матураз, которые часто отвечают за процессинг пропептидов (Jalving, R., et al., (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 363-368). Для определения влияния процессинга на
 5 активность AoPLA2 и FvPLA2 ферменты экспрессируют в Kexin-дефицитном штамме *Aspergillus oryzae*. Далее оценивают процессинг по результатам проведения электрофореза в ДСН-ПААГ и определяют фосфолипазную активность в культурах штаммов, экспрессирующих AoPLA2 и FvPLA2, в варианте дикого типа и в
 10 Kexin-дефицитном штамме.

Kexin-дефицитный штамм *Aspergillusoryzae* (kexB⁻) конструируют путем разрушения гена *kexB* из *A. oryzae* (EMBL:AB056727) с использованием методик, известных в данной области техники, таких как методики, описанные в WO 98/12300 и US6013452. Разрушение *kexB* подтверждают при анализе по методу саузерн-блоттинга и
 15 отслеживают экспрессию пептидов, относительно которых известно, что *kexB* отвечает за их созревание. Штамм *kexB*⁻ трансформируют экспрессирующей конструкцией AoPLA2, описанной в примере 9, и экспрессирующей конструкцией FvPLA2, описанной в примере 4. Данные штаммы ферментируют в
 20 среде YP+2%G при температуре 30°C, вместе со штаммами с *kexB*⁺ экспрессией и AoPLA2, и FvPLA2, как описано в примерах 9 и 4, используя нетрансформированные штаммы в качестве контроля. Штаммы, экспрессирующие AoPLA2, культивируют в качалочной культуре при 200 об/мин в течение 4 дней, а штаммы,
 25 экспрессирующие FvPLA2, культивируют в качалочной культуре при 275 об/мин в течение 3 дней. Экспрессию фосфолипазы и процессинг оценивают по результатам электрофореза в ДСН-ПААГ.

При анализе ДСН-ПААГ показано, что AoPLA2 разрешается в виде четкой единичной полосы в обоих штаммах: *kexB*⁺ и *kexB*⁻. При экспрессии в штамме
 30 *kexB*⁺ AoPLA2 демонстрирует свойства, соответствующие размеру 16 кДа, что согласуется с данными по его миграции, полученными ранее для полностью процессированного AoPLA2 (пример 10), тогда как в случае *kexB*⁻ штамма AoPLA2 движется соответственно размеру примерно 27-28 кДа, что согласуется с фактом
 35 отсутствия процессинга или неполного процессинга. При экспрессии в штамме *kexB*⁺ FvPLA2 разрешается в виде двух полос с кажущимися молекулярными массами 17 кДа и 15 кДа. Полоса 14 кДа соответствует полностью процессированному пептиду (пример 5), тогда как пептид 17 кДа представляет собой частично
 40 процессированную форму. При экспрессии в штамме *kexB*⁻ FvPLA2 движется в виде отдельной полосы размером примерно 18-19 кДа, и этот размер соответствует неполному процессингу. Не отмечается похожих полос в каком-либо из контрольных образцов из нетрансформированных штаммов. Относительные интенсивности полосы позволяют полагать, что экспрессия AoPLA2 в штамме *kexB*⁻ составляет от 1/5 до 1/10
 45 от ее уровня в штамме *kexB*⁺, тогда как экспрессия FvPLA2 в штамме *kexB*⁻ была либо той же самой, либо достигала от уровня в штамме *kexB*⁺.

Активность фосфолипаз, продуцируемых в каждом из штаммов, определяют в тесте LEU и их значения приведены в таблице 7.

50

Генотип штамма			Таблица 7
kexB	FvPLA2	AoPLA2	Активность LEU/мл
+	-	-	0

-	-	-	0
+	+	-	38
-	+	-	0
+	-	+	56
-	-	+	0

5

10	0-1	Форма PCT/RO/134 (SAFE) Показания, относящиеся к депонированному(ым) микроорганизму(ам) или другому биологическому материалу (положение PCT 13bis)	
	0-1-1	Использование препарата	PCT-SAFE [EASY model] версия 3.50 (вариант 0002.162)
	0-2	Заявка на международный патент No.	
	0-3	Ссылка на файл регистрации заявителя или агента	10342.504-WO
15	1	Показания, приведенные ниже для депонированного(ых) микроорганизма(ов) или другого биологического материала, относятся к описанию (публикация PCT):	
	1-1	Страница	11
	1-2	Строка	24
20	1-3	Идентификация депозита	
	1-3-1	Наименование депонирующего института	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
	1-3-2	Адрес депонирующего института	Mascheroder, Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
	1-3-3	Дата депонирования	12 февраля 2003 (12.02.2003)
	1-3-4	Номер доступа	DSMZ 15441
25	1-5	Обозначение государств, для которых действуют введенные показания	Все указанные
	2	Показания, приведенные ниже для депонированного(ых) микроорганизма(ов) или другого биологического материала, относятся к описанию (публикация PCT):	
	2-1	Страница	11
30	2-2	Строка	25
	2-3	Идентификация депозита	
	2-3-1	Наименование депонирующего института	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
	2-3-2	Адрес депонирующего института	Mascheroder, Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
	2-3-3	Дата депонирования	12 февраля 2003 (12.02.2003)
35	2-3-4	Номер доступа	DSMZ 15442
	2-5	Обозначение государств, для которых действуют введенные показания	Все указанные
	ТОЛЬКО ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИИ-ПОЛУЧАТЕЛЯ		
0-4	Данная форма была получена вместе с международной заявкой (да или нет)	23 апреля 2004 года	
0-4-1	Уполномоченный сотрудник	/подпись/	
40	ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕЖДУНАРОДНОМ БЮРО		
	0-5	Данная форма была получена в международном бюро	
	0-5-1	Уполномоченный сотрудник	

Формула изобретения

45

1. Полипептид с активностью фосфолипазы, который является нативным для штамма *Fusarium venenatum* и представляет собой:

50

а) полипептид, кодируемый частью последовательности ДНК, клонированной в плазмиде, которая присутствует в *Escherichia coli*, депонированной под номером DSM 15442, и соответствующей нуклеотидам 133-495 последовательности SEQ ID NO: 15, или

б) полипептид с аминокислотной последовательностью, соответствующей аминокислотам 29-149 последовательности SEQ ID NO: 16, или аминокислотной последовательностью, которая может быть получена из нее путем консервативной

замены одной или нескольких аминокислот, или

с) аналог полипептида, определенного в (а) или (b), с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 90% гомологичной аминокислотной последовательности указанного полипептида.

5 2. Последовательность нуклеиновой кислоты, по существу соответствующая последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид с активностью фосфолипазы по п.1.

10 3. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с активностью фосфолипазы, которая является нативной для штамма *Fusarium venenatum* и представляет собой:

а) часть последовательности ДНК, клонированной в плазмиде, которая присутствует в *Escherichia coli*, депонированной под номером DSM 15442, и соответствующей нуклеотидам 133-495 последовательности SEQ ID NO: 15, или

15 б) аналог последовательности согласно (а), который по меньшей мере на 90% идентичен указанной последовательности или гибридизуется в жестких условиях с комплементарной цепью указанной последовательности ДНК.

20 4. Способ изготовления теста и хлебобулочных продуктов, получаемых из теста, включающий добавление полипептида с активностью фосфолипазы к тесту, отличающийся тем, что в качестве указанного полипептида используют полипептид по п.1.

5. Композиция теста, содержащая полипептид с активностью фосфолипазы, отличающаяся тем, что указанный полипептид представлен полипептидом по п.1.

25 6. Детергентная композиция, содержащая поверхностно-активное вещество и полипептид с активностью фосфолипазы, отличающаяся тем, что указанный полипептид представлен полипептидом по п.1.

30 7. Способ снижения содержания фосфора в растительном масле, включающий взаимодействие масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы, в присутствии воды с последующим отделением водной фазы от масла, отличающийся тем, что в качестве указанного полипептида используют полипептид по п.1.

35 8. Способ изготовления сыра, включающий обработку молочной композиции фосфолипазой и получение сыра из молочной композиции, отличающийся тем, что в качестве указанной фосфолипазы используют полипептид с активностью фосфолипазы по п.1.

40

45

50

Перечень последовательностей

<110> Novozymes A/S
 <120> Экспрессия фосфолипазы
 <130> 10342.504-WO
 <160> 16
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> *Tuber borchii*
 <400> 1
 Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Ile Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Asn Lys Arg Gly
 20 25 30
 Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn
 35 40 45
 Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Ala
 50 55 60
 Asp Glu Thr Asn Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala
 65 70 75 80
 Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Leu Ser Pro Val Ser Asp
 85 90 95
 Thr Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ala Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala
 100 105 110
 Lys Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys
 115 120 125
 Ser Lys Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser Cys
 130 135 140
 Lys Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln His Arg Phe
 145 150 155 160
 Thr Glu Ala Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu
 165 170 175
 Tyr Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Glu Ser Trp Lys Gly Val
 180 185 190
 Ala Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Thr Phe

195

200

205

Gly Trp Leu
210

<210> 2
<211> 588
<212> ДНК
<213> *Verticillium dahliae*

<220>
<221> дополнительный признак
<222> (25)..(26)
<223> n-представляет собой a, c, g, или t

<220>
<221> CDS
<222> (72)..(587)

<400> 2
cagtttgaag tcccagcccc tgcntntcct cctgcttctc cccgtccagt ctttgggatt 60
ttcctctcat c atg aag ttc aac gca att ctc ctg gcc ctc gtg cct gcc 110
Met Lys Phe Asn Ala Ile Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala
1 5 10
gcc ctg gct ctg ccc acc acc gac gag gcg cag acc ccc aag ctc gcc 158
Ala Leu Ala Leu Pro Thr Thr Asp Glu Ala Gln Thr Pro Lys Leu Ala
15 20 25
gcg cgc cag agc atc acg gcc gtc acc gac agc ctg tcc ttc tcc ctg 206
Ala Arg Gln Ser Ile Thr Ala Val Thr Asp Ser Leu Ser Phe Ser Leu
30 35 40 45
acg ctg cct cag ttc acc acg cgc cgc aac aac cgc aac ccc gcc aac 254
Thr Leu Pro Gln Phe Thr Thr Arg Arg Asn Asn Arg Asn Pro Ala Asn
50 55 60
ctc gac tgg agc tcc gac ggc tgc aca acg tct cct gac aac cca ttc 302
Leu Asp Trp Ser Ser Asp Gly Cys Thr Thr Ser Pro Asp Asn Pro Phe
65 70 75
gga ttc ccc ttt gtg ccg gcc tgc cac cgc cac gac ttt ggc tac cac 350
Gly Phe Pro Phe Val Pro Ala Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr His
80 85 90
aac ttc cgc gcc cag acc cgc ttc acc gag agc aac aag ctc cgc atc 398
Asn Phe Arg Ala Gln Thr Arg Phe Thr Glu Ser Asn Lys Leu Arg Ile
95 100 105
gac aac cag ttc agg acc gat ctg agg ttc cag tgc cag tct tcg agc 446
Asp Asn Gln Phe Arg Thr Asp Leu Arg Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser
110 115 120 125
gtg cgc ggc gtg tgc aac gcc ctg gcg gac gtc tac tac tct gcc gtc 494
Val Arg Gly Val Cys Asn Ala Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Ser Ala Val
130 135
cgg gcg ttc ggc ggt gac gac gcc acc ccc ggc aag agg gac gag cac 542
Arg Ala Phe Gly Gly Asp Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu His
145 150 155
tcg gaa ctc gtc ggc atc tac gac gag aag gtc ggc atc tac gat a 588
Ser Glu Leu Val Gly Ile Tyr Asp Glu Lys Val Gly Ile Tyr Asp
160 165 170

<210> 3
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Verticillium dahliae

<400> 3

Met Lys Phe Asn Ala Ile Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Thr Asp Glu Ala Gln Thr Pro Lys Leu Ala Ala Arg Gln
 20 25 30
 Ser Ile Thr Ala Val Thr Asp Ser Leu Ser Phe Ser Leu Thr Leu Pro
 35 40 45
 Gln Phe Thr Thr Arg Arg Asn Asn Arg Asn Pro Ala Asn Leu Asp Trp
 50 55 60
 Ser Ser Asp Gly Cys Thr Thr Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro
 65 70 75 80
 Phe Val Pro Ala Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Phe Arg
 85 90 95
 Ala Gln Thr Arg Phe Thr Glu Ser Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asn Gln
 100 105 110
 Phe Arg Thr Asp Leu Arg Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Arg Gly
 115 120 125
 Val Cys Asn Ala Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Ser Ala Val Arg Ala Phe
 130 135 140
 Gly Gly Asp Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu His Ser Glu Leu
 145 150 155 160
 Val Gly Ile Tyr Asp Glu Lys Val Gly Ile Tyr Asp
 165 170

<210> 4
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Neurospora crassa

<400> 4

Met Lys Phe Phe Ser Ala Leu Ala Leu Ser Ser Leu Leu Pro Thr Ala
 1 5 10 15
 Ala Trp Ala Trp Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Thr Gly Ala Asp Ser
 20 25 30

Leu Phe Arg Arg Ala Glu Thr Ile Gln Gln Thr Thr Asp Arg Tyr Leu
 35 40 45
 Phe Arg Ile Thr Leu Pro Gln Phe Thr Ala Tyr Arg Asn Ala Arg Ser
 50 60
 Pro Ala Thr Leu Asp Trp Ser Ser Asp Ser Cys Ser Tyr Ser Pro Asp
 65 70 75 80
 Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Ser Pro Ala Cys Asn Arg His Asp Phe
 85 90 95
 Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Ala Gln Ser Arg Phe Thr Asp Asn Asn Lys
 100 105 110
 Leu Lys Ile Asp Gly Asn Phe Lys Thr Asp Leu Tyr Tyr Gln Cys Asp
 115 120 125
 Thr His Gly Tyr Gly Ser Thr Cys His Ala Leu Ala Asn Val Tyr Tyr
 130 135 140
 Ala Ala Val Arg Glu Phe Gly Arg Thr Lys Gly Glu Leu Gln Glu Glu
 145 150 155 160
 Tyr Asp Leu Leu Leu Ala His Tyr Asn Glu Leu Val Ala Glu Ala Ile
 165 170 175
 Ala Lys Gly Glu Asp Pro Leu Tyr Tyr
 180 185
 <210> 5
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Helicosporium sp.
 <400> 5
 Met Lys Ser Phe Thr Phe Val Val Leu Ala Leu Leu Pro Phe Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Pro Phe Gly Leu Phe His Arg Gly Gly Ile Ala Ser Arg Ala
 20 25 30
 Thr Ile Glu Glu Thr Thr Asp Thr Leu Leu Phe Ser Thr Pro Ile Ala
 35 40 45
 Gln Phe Glu Ala Ala Arg Asn Ala Gln Asn Pro Ser Thr Leu Asp Trp
 50 55 60
 Ser Ser Asp Gly Cys Ser Ser Ser Pro Asp Asp Pro Phe Gly Phe Asp
 65 70 75 80
 Phe Leu Ser Ser Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys

85 90 95
 Lys Gln Asn Arg Phe Thr Ala Pro Asn Lys Ala Arg Ile Asp Thr Asn
 100 105 110
 Phe Lys Thr Asp Met Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Glu Ser Asn Ile Phe
 115 120 125
 Thr Arg Ala Ala Cys Lys Ala Val Ala Asp Ile Tyr Tyr Glu Ala Val
 130 135 140
 Lys Thr Phe Gly Ser Lys Lys Arg Ala Ala Glu Ala Leu Ala Ala Arg
 145 150 155 160
 Gln Met Glu Glu Asn Val Ala Lys Ala
 165

<210> 6
 <211> 942
 <212> JIHK
 <213> Aspergillus oryzae

<220>
 <221> CDS
 <222> (61)..(726)

<400> 6
 cgcaagcatc acatctactt cttattgcct attctgtccg agtgctagcc acctatcatc 60
 atg aag aac atc ttc gtt gcc act ttg ggc ctg ttc gcc gca gtt tcg 108
 Met Lys Asn Ile Phe Val Ala Thr Leu Gly Leu Phe Ala Ala Val Ser
 1 5 10 15
 tct gcc ttg ccc tac aca acc cct gtc aat gac aat ccc atc tct gct 156
 Ser Ala Leu Pro Tyr Thr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala
 20 25 30
 tta caa gca cgc gcg aca aca tgc tcg gcc aag gcc acg gat aac ctc 204
 Leu Gln Ala Arg Ala Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu
 35 40 45
 atc ttc aag gtc tcc atg aag acc ttc cag aag gcg cgc aag gcc aag 252
 Ile Phe Lys Val Ser Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys
 50 55 60
 aac ccc tcc aag tgc aac tgg tca tcg gac aac tgc tcc aag tca ccc 300
 Asn Pro Ser Lys Cys Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro
 65 70 75 80
 gat aag ccc gat gga tac aac ttc atc ccc agc tgc caa aga cac gat 348
 Asp Lys Pro Asp Gly Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp
 85 90 95
 ttc ggc tac cgg aac acg aag aag cag aag cgc ttc aca aag gcc atg 396
 Phe Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met
 100 105 110
 aag aag cgc att gac gac aac ttc aag aag gat ctc tac aag tac tgc 444
 Lys Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys
 115 120 125

agc caa ttc tcg ggc tgg agc tca tgg aag gga gtg gag tgc cgt cgc 492
 Ser Gln Phe Ser Gly Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg
 130 135 140
 ctt gcg gat gtc tac tat act gct gtc cgc cac ttt ggc aag cgt gat 540
 Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Thr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp
 145 150 155 160
 gaa gcg ctt gag ttt gac cct gag gtt gag ttc gag aag cgt gat gag 588
 Glu Ala Leu Glu Phe Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu
 165 170 175
 gtg gcc gat gtc cag cct gac gaa ttt gat aac ttt gac ggt tct gaa 636
 Val Ala Asp Val Gln Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu
 180 185 190
 gtt gac cct gat atc gag ggc cag gtc att ccc gaa gtt ctt gaa gat 684
 Val Asp Pro Asp Ile Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp
 195 200 205
 gat gga gtg gat gtg gag aac ctc gac gat att gaa aac ctg 726
 Asp Gly Val Asp Val Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu
 210 215 220
 taggttttcg gcattggctc tacactttgc aaatgggtcg tcataatcca ttggaagccg 786
 gaggaggagg gaaatcaagg catcttttgg ttgtcagtaa ctttgagtgc ctagtttgtg 846
 aattgttttt tgaggttcta tttgaattct gcttttgttc aatcttatag cttcctacgt 906
 tgtttgcatt taaaaatgga caggagtatc tgtgag 942

<210> 7
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus oryzae*

<400> 7

Met Lys Asn Ile Phe Val Ala Thr Leu Gly Leu Phe Ala Ala Val Ser
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Pro Tyr Thr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala
 20 25 30
 Leu Gln Ala Arg Ala Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu
 35 40 45
 Ile Phe Lys Val Ser Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys
 50 55 60
 Asn Pro Ser Lys Cys Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro
 65 70 75 80
 Asp Lys Pro Asp Gly Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met
 100 105 110

Lys Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys
 115 120 125
 Ser Gln Phe Ser Gly Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg
 130 135 140
 Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Thr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp
 145 150 155 160
 Glu Ala Leu Glu Phe Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu
 165 170 175
 Val Ala Asp Val Gln Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu
 180 185 190
 Val Asp Pro Asp Ile Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp
 195 200 205
 Asp Gly Val Asp Val Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu
 210 215 220
 <210> 8
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Neurospora crassa
 <400> 8
 Met Lys Pro Phe Phe Leu Ile Ser Leu Leu Val Thr Val Phe Met Ser
 1 5 10 15
 Leu Met Leu Ala Thr Thr Ala Gln Pro Ser Leu Pro Leu Asn Asn Arg
 20 25 30
 Arg Glu Leu Ala Glu His Pro Pro Val Lys Gly Asn Pro Pro Asn Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ala Leu Asp Trp Cys Lys Tyr Thr Ala Gly Met Leu Phe Gln
 50 55 60
 Trp Asp Leu Pro Thr Phe Ile Lys His Arg Glu Ala Asn Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Gly Arg Leu Thr Trp Asp Trp Ser Ser Asp Gly Cys Thr His Val Pro
 85 90 95
 Asp Asn Pro Val Gly Phe Pro Phe Lys Pro Ala Cys Gln Arg His Asp
 100 105 110
 Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Gln Val Gln Phe His Phe Thr Pro Arg Ala
 115 120 125
 Arg Trp Lys Ile Asp Glu Asn Phe Leu Lys Glu Met Lys Phe Gln Cys

130 135 140
 Ile Gly His Asn Ile Phe Asn Ala Cys His Phe Met Ala His Val Tyr
 145 150 155 160
 His Trp Gly Val Arg Thr Phe Tyr Lys Gly His Glu Gln Tyr Arg Glu
 165 170 175
 Ser Glu Pro Ser His Lys Met Met Asp Thr Met Val Ala Ser Glu Ser
 180 185 190
 Ser Asp Val Phe Asp Gly Met Asp Ala Asp Glu Ala Arg Asp Ala Leu
 195 200 205
 Asn Pro Tyr Leu Ser Glu Glu Lys Thr Lys Glu Tyr Tyr Asp Arg Ala
 210 215 220
 Leu Ala Arg Tyr Asn Lys Cys Val Glu Glu Ala Met Ala Gln Gly Ile
 225 230 235 240
 Asp Leu Gln Lys Tyr Trp Ala Ala Phe
 245

<210> 9
 <211> 832
 <212> JIHK
 <213> Tuber albidum

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(426)

<220>
 <221> CDS
 <222> (476)..(680)

<400> 9
 a atg gtc aag att gct gcc att gtc ctc cta atg gga att cta gcc aat 49
 Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Val Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn
 1 5 10 15
 gct gcc gcc atc cct gtc agc gag cca gca gcc ctg gcg aag cgt gga 97
 Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Arg Gly
 20 25 30
 aac gct gag gtc att gct gaa caa act ggt gat gtc ccg gat ttc aac 145
 Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn
 35 40 45
 act caa att aca gag cca act ggg gag gga gac cgt ggg gat gtg gtc 193
 Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Val
 50 55 60
 gac gaa acc gat ttg tcc acg gat att gtc cca gag acc gag gct gct 241
 Asp Glu Thr Asp Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala
 65 70 75 80
 tcc ttc gcc gct agt tca gta tct gca gcc tca cca gca tct gac acc 289
 Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Asp Thr

	85	90	95	
	gac agg ctt ctc tac tca acc tcc atg ccc gcc ttc ttg act gct aag			337
	Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ser Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala Lys			
	100	105	110	
	cgc aat aag aac ccc ggc aac ttg gac tgg agc gat gat gga tgc agc			385
	Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys Ser			
	115	120	125	
	aac tcc ccg gac agg cct gca ggg ttt aac ttc ctt gac tc			426
	Asn Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser			
	130	135	140	
	gtaagtcctc cttcatttat gctatctaca ttcactaata ttcgaacag c tgc aag			482
			cys lys	
	cgt cac gac ttc ggg tac cgc aac tac aag aag cag cgc cgc ttc aca			530
	Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln Arg Arg Phe Thr			
	145	150	155	160
	gag cct aat cgc aag cgc att gat gac aat ttc aag aag gac cta tat			578
	Glu Pro Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr			
	165	170	175	
	aat gag tgc gcc aag tac tct ggc ctc caa tcc tgg aaa ggt gtt gcc			626
	Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Gln Ser Trp Lys Gly Val Ala			
	180	185	190	
	tgc cgc aaa atc gcg aac act tac tac gat gct gta cgc tcc ttc ggt			674
	Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Ser Phe Gly			
	195	200	205	
	tgg ttg taaatgtgcg gaagagatat caagtgggat cgaggaagag gatggtgaaa			730
	Trp Leu			
	210			
	gagctgagag gtggatttct ttacattccg caatggctac tacagaagaa ctgtgctcct			790
	caaatttaat ctcatttttg tgtctatcta tccactctag aa			832
	<210> 10			
	<211> 210			
	<212> PRT			
	<213> Tuber albidum			
	<400> 10			
	Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Val Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn			
	1	5	10	15
	Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Arg Gly			
	20	25	30	
	Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn			
	35	40	45	
	Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Val			
	50	55	60	
	Asp Glu Thr Asp Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala			
	65	70	75	80

Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Asp Thr
 85 90 95

Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ser Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala Lys
 100 105 110

Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys Ser
 115 120 125

Asn Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser Cys Lys
 130 135 140

Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln Arg Arg Phe Thr
 145 150 155 160

Glu Pro Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr
 165 170 175

Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Gln Ser Trp Lys Gly Val Ala
 180 185 190

Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Ser Phe Gly
 195 200 205

Trp Leu
 210

<210> 11
 <211> 961
 <212> ДНК
 <213> Verticillium tenerum

<220>
 <221> CDS
 <222> (5)..(628)

<400> 11
 caac atg aag acc acc gct gtt ctc tcc ctc gcc atg ctc cag gcc acc 49
 Met Lys Thr Thr Ala Val Leu Ser Leu Ala Met Leu Gln Ala Thr
 1 5 10 15

tgg gcc tcg ccc gtg gcc aag cgc cag aac gac gtc tcc ctc gtc gac 97
 Trp Ala Ser Pro Val Ala Lys Arg Gln Asn Asp Val Ser Leu Val Asp
 20 25 30

aac tac atg ttc ggc atc tcg ctg ccc acc ttc tcc aac cac cac tcc 145
 Asn Tyr Met Phe Gly Ile Ser Leu Pro Thr Phe Ser Asn His His Ser
 35 40 45

aac agg aac ccc cct cgc ctg gac tgg acc acc gac ggc tgc acc tcg 193
 Asn Arg Asn Pro Pro Arg Leu Asp Trp Thr Thr Asp Gly Cys Thr Ser
 50 55 60

tcg ccc aac aac ccg ctc ggc ttc ccc ttc ctg ccc gcc tgc cac cgc 241
 Ser Pro Asn Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Leu Pro Ala Cys His Arg
 65 70 75

cac gac ttt ggc tac cag aac ttc cgc atc cag agc cgc ttc acc cag 289
 His Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Phe Arg Ile Gln Ser Arg Phe Thr Gln
 80 85 90
 agc aac aag ctc cgc atc gac gac aag ttc aag gag gac ctc tac cac 337
 Ser Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asp Lys Phe Lys Glu Asp Leu Tyr His
 100 105 110
 cag tgc gac ggc cac tgg gcc tgg gtt gcc tgc gct gcc ctc gcc gag 385
 Gln Cys Asp Gly His Trp Ala Trp Val Ala Cys Ala Ala Leu Ala Glu
 115 120 125
 gtc tac tac gcc gcc gtc cgc gcc ttc gcc ggt ggt gac gcc acc ccg 433
 Val Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Gly Asp Ala Thr Pro
 130 135 140
 gga cgc atg cac gtc gcc gtc ttc gcc cag acc cag gcc gag cac gac 481
 Gly Arg Met His Val Ala Val Phe Gly Gln Thr Gln Ala Glu His Asp
 145 150 155
 gcc ctc gtc tcc atc tac gag gag aag ctc gcg gcc tac gag gct gcc 529
 Ala Leu Val Ser Ile Tyr Glu Glu Lys Leu Ala Ala Tyr Glu Ala Ala
 160 165 170 175
 gtc gcc gag gcc gag gcc cgc gcc gag atc ccc cac gtc gag gag acc 577
 Val Ala Glu Ala Glu Ala Arg Gly Glu Ile Pro His Val Glu Glu Thr
 180 185 190
 ctc ccc gag gag cct gcc gcc gag gag ccc gcc gcc gag gag gag cag 625
 Leu Pro Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Glu Gln
 195 200 205
 aag taaacacgag ccccttttag gaccgactag ctcggtgtcg ctgggctagg 678
 Lys
 ctgagctgag tgacggggag gcacgaaaga gagcaatgca tcagacaggc tggaacatgc 738
 ctttgtctga gtgatggatg gacttgatgg acttgatgga cttggatgca ttatgatac 798
 cgccagtgtt gactggcaga gcgagcgact tgattttgga tttcttgaaa ggacggatgt 858
 cccgaggtgg ataagggatg cttatcacc aacttcttca tgtatatatt gtactgcgca 918
 gagaagcgcg ccccgaaaaa tggattgatt cttgatgaga cgt 961

<210> 12
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Verticillium tenerum

<400> 12

Met Lys Thr Thr Ala Val Leu Ser Leu Ala Met Leu Gln Ala Thr Trp
1 5 10 15

Ala Ser Pro Val Ala Lys Arg Gln Asn Asp Val Ser Leu Val Asp Asn
20 25 30

Tyr Met Phe Gly Ile Ser Leu Pro Thr Phe Ser Asn His His Ser Asn
35 40 45

Arg Asn Pro Pro Arg Leu Asp Trp Thr Thr Asp Gly Cys Thr Ser Ser

50 55 60

Pro Asn Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Leu Pro Ala Cys His Arg His
 65 70 75 80
 Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Phe Arg Ile Gln Ser Arg Phe Thr Gln Ser
 85 90 95
 Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asp Lys Phe Lys Glu Asp Leu Tyr His Gln
 100 105 110
 Cys Asp Gly His Trp Ala Trp Val Ala Cys Ala Ala Leu Ala Glu Val
 115 120 125
 Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Gly Asp Ala Thr Pro Gly
 130 135 140
 Arg Met His Val Ala Val Phe Gly Gln Thr Gln Ala Glu His Asp Ala
 145 150 155 160
 Leu Val Ser Ile Tyr Glu Glu Lys Leu Ala Ala Tyr Glu Ala Ala Val
 165 170 175
 Ala Glu Ala Glu Ala Arg Gly Glu Ile Pro His Val Glu Glu Thr Leu
 180 185 190
 Pro Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Glu Gln Lys
 195 200 205

<210> 13
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> праймер TbPLA1

<220>
 <221> дополнительный признак
 <222> (4)..(9)
 <223> сайт BamHI

<400> 13
 caaggatcca aaatgggtcaa gattgctgc

29

<210> 14
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> праймер TbPLA2

<220>
 <221> дополнительный признак

<222> (4)..(9)
 <223> сайт XhoI

<400> 14
 tgcctcgagt tttttctaga gtggatagat agac 34

<210> 15
 <211> 690
 <212> ДНК
 <213> Fusarium venenatum

<220>
 <221> CDS
 <222> (49)..(597)

<400> 15
 cagttttggt tctttccttc cttatccatc acttctagta tcttcaag atg aag ttc 57
Met Lys Phe
1

agc gct acc att ctt tca ctc ctc ccg gca gtt ctc gcc ctg ccc aca 105
 Ser Ala Thr Ile Leu Ser Leu Leu Pro Ala Val Leu Ala Leu Pro Thr
5 10 15

ggc gaa gat gca tct gtc tca aag cgc cag agc gtg aac aca gtg aca 153
 Gly Glu Asp Ala Ser Val Ser Lys Arg Gln Ser Val Asn Thr Val Thr
20 25 30 35

gat cag ctc ctc ttc agc gtc aca ctc cca caa ttc act gct cgt cgt 201
 Asp Gln Leu Leu Phe Ser Val Thr Leu Pro Gln Phe Thr Ala Arg Arg
40 45 50

aac gcc cgt gat cct ccc act gtc gac tgg acc tct gac ggt tgc act 249
 Asn Ala Arg Asp Pro Pro Thr Val Asp Trp Thr Ser Asp Gly Cys Thr
55 60 65

tcc tcg ccc gac aac cct ttc ggc ttc cct ttt atc cct gcc tgc aac 297
 Ser Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro Phe Ile Pro Ala Cys Asn
70 75 80

cgt cac gac ttt ggc tac cac aac tac cgc gcc cag agc cgc ttc acc 345
 Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Tyr Arg Ala Gln Ser Arg Phe Thr
85 90 95

gtg agc gcc aag tcc cgc atc gac aac aac ttc aag acc gat ttg tac 393
 Val Ser Ala Lys Ser Arg Ile Asp Asn Asn Phe Lys Thr Asp Leu Tyr
100 105 110 115

ttc caa tgc caa tcc tcc agt gtt tct ggt gtc tgc aga gca ctt gcc 441
 Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Ser Gly Val Cys Arg Ala Leu Ala
120 125 130

gac gtc tac ttc gcc gcg gtt aga gct ttt ggc ggg gat gat gct act 489
 Asp Val Tyr Phe Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Asp Asp Ala Thr
135 140 145

cct ggc aag aga gat gag gcc ctt gta aag gag tac gaa aag aag gta 537
 Pro Gly Lys Arg Asp Glu Ala Leu Val Lys Glu Tyr Glu Lys Lys Val
150 155 160

gaa gtc tac aac aag ctt gtt gaa gag gct cag aag aag ggt gat ctc 585
 Glu Val Tyr Asn Lys Leu Val Glu Glu Ala Gln Lys Lys Gly Asp Leu
165 170 175

cct cgc ctt gac tagagtgggt caaaaagcat tctttgggtt cattgtacat 637
 Pro Arg Leu Asp

180

aaatccttac gatacatgag ttatgataaa tcttaaattgg cgggtgacga gct

690

<210> 16
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> *Fusarium venenatum*

<400> 16

Met Lys Phe Ser Ala Thr Ile Leu Ser Leu Leu Pro Ala Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Gly Glu Asp Ala Ser Val Ser Lys Arg Gln Ser Val Asn
 20 25 30
 Thr Val Thr Asp Gln Leu Leu Phe Ser Val Thr Leu Pro Gln Phe Thr
 35 40 45
 Ala Arg Arg Asn Ala Arg Asp Pro Pro Thr Val Asp Trp Thr Ser Asp
 50 55 60
 Gly Cys Thr Ser Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro Phe Ile Pro
 65 70 75 80
 Ala Cys Asn Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Tyr Arg Ala Gln Ser
 85 90 95
 Arg Phe Thr Val Ser Ala Lys Ser Arg Ile Asp Asn Asn Phe Lys Thr
 100 105 110
 Asp Leu Tyr Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Ser Gly Val Cys Arg
 115 120 125
 Ala Leu Ala Asp Val Tyr Phe Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Asp
 130 135 140
 Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu Ala Leu Val Lys Glu Tyr Glu
 145 150 155 160
 Lys Lys Val Glu Val Tyr Asn Lys Leu Val Glu Glu Ala Gln Lys Lys
 165 170 175
 Gly Asp Leu Pro Arg Leu Asp
 180