

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091280** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.09.08

(51) Int. Cl. *A21D 2/26* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.21

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ, СОДЕРЖАЩИХ РОЖЬ**

(31) **17202797.1**

(32) **2017.11.21**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2018/082081**

(87) **WO 2019/101794 2019.05.31**

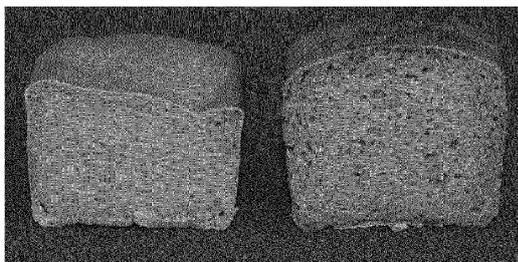
(71) Заявитель:
**ТЕХНИШЕ УНИВЕРЗИТЕТ
МЮНХЕН (DE)**

(72) Изобретатель:

**Граубнер Сигрид, Зверлов Владимир,
Шварц Вольфганг, Гауф Вальдемар,
Адрессен Бьёрн, Брёкер Янис,
Верхейен Кристоф, Екле Марио,
Бекер Томас, Шульте Филлип, Либль
Вольфганг (DE)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта, содержащего рожь, который включает стадии получения первичной пищевой смеси; добавление к указанной первичной пищевой смеси композиции, содержащей по меньшей мере один фермент семейства 10 (GH10) гликозидгидролаз; и обработку указанной первичной пищевой смеси с получением указанного пищевого продукта, содержащего рожь. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены ферменты GH10, композиции, содержащие указанные ферменты, и применение указанных ферментов и указанной композиции для получения пищевых продуктов.



A1

202091280

202091280

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ, СОДЕРЖАЩИХ РОЖЬ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения пищевых продуктов, содержащих рожь, где указанный способ включает стадии получения первичной пищевой смеси; добавление к указанной первичной пищевой смеси композиции, содержащей по меньшей мере один фермент семейства 10 (GH10) гликозидгидролаз; и обработку указанной первичной пищевой смеси с получением указанных пищевых продуктов, содержащих рожь. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены ферменты GH10, композиции, содержащие указанные ферменты, и применение указанных ферментов и указанных композиций для получения пищевых продуктов.

Предпосылки изобретения

Пищевые продукты, содержащие рожь, широко применяются в рационе человека благодаря диетическим преимуществам для здоровья человека. Такие преимущества основаны на благоприятном содержании отличных от крахмала полисахаридов, например, высоком содержании арабиноксилана (AX). Тем не менее, обработка первичных пищевых смесей, содержащих рожь, и получение конечных пищевых продуктов, например, посредством выпекания, затрудняется клейкостью и нестабильностью теста пищевых смесей, содержащих рожь, что обусловлено неспособностью ржаной муки образовывать вязкоупругую белковую сеть, которая способна удерживать газ, такой как газ, находящийся в клейковинном каркасе пшеничного теста (Courtin & Delcour, 2002). Это приводит к получению плотной, влажной и клейкой структуры мякиша, а также хлебобулочных изделий с плотным мякишем и уменьшенным объемом буханки. Следовательно, высокое содержание AX представляет собой в равной степени благоприятный и неблагоприятный фактор для пищевых продуктов, содержащих рожь.

Один из возможных подходов для улучшения свойств теста, содержащего рожь, представляет собой ферментативный гидролиз арабиноксилана с применением

ферментов с ксиланазной активностью. Ксиланазы повышают допустимое отклонение в отношении различных качеств муки и параметров обработки (Dervilly et al., 2002). В зависимости от их специфичности, ксиланазы расщепляют гликозидную связь линейного (1→4)-бета-D-ксилопиранозного остова AX. Большинство ксиланаз можно обнаружить в семействах 5, 7, 8, 10, 11 и 43 гликозидгидролаз (GH) (Lombard et al., 2013); тем не менее, в соответствии с базой данных Carbohydrate-Active enZymes (CAZy), они также встречаются в других семействах, таких как 16, 51, 52, 62 (Adelsberger et al., 2004; Bouraoui et al., 2016; Collins et al., 2005). Наиболее значимыми семействами ферментов в случае ксиланаз являются GH10 и GH11, которые значительно отличаются как по своим физико-химическим свойствам, так и по субстратной специфичности.

Несмотря на иногда низкое сходство последовательностей среди двух представителей ферментов GH10 (часто менее 30% аминокислотных (aa) остатков в каталитическом модуле), трехмерная вторичная структура ксиланаз семейства 10 характеризуется структурой (бета/альфа)₈-бочонка, который образует чашеобразную форму (Larson et al., 2003), тогда как ферменты GH11 демонстрируют тип укладки бета-желе-ролл. Эту трехмерную структуру ферментов можно предсказать по последовательности и белки могут иметь идентичную укладку, даже если степень идентичности последовательностей очень низкая. Активный центр и связывающие субстрат аминокислотные остатки являются относительно хорошо консервативными, даже несмотря на то, что эти консервативные aa остатки являются довольно короткими последовательностями по отношению к полной последовательности белка.

Ксиланазы семейства 10 обычно имеют более высокий молекулярный вес и более низкую pI по сравнению с ксиланазами семейства 11 (Kolenová et al. 2006; Collins et al. 2005, Biely et al., 1997). Ксиланазы GH10 способны расщеплять ксилановый остов гораздо ближе к боковым цепям остова, таким как 1,2- или 1,3-альфа-L-арабинофуранозидные боковые группы и боковые группы 1,2-O-метил-альфа-D-глюкуроновой кислоты, чем ксиланазы GH11 (Biely et al., 2016).

Ксиланазы, обычно применяемые для увеличения объема хлебобулочных изделий, содержащих пшеницу, в основном входят в состав семейства 11 GH, тогда как ксиланазы семейства 10 GH считаются менее эффективными для применения для выпекания (Dornez et al. 2011). Тем не менее, ксиланазы семейства 11 GH не способны

повышать качество хлебобулочных изделий из ржи; в частности, они не способны улучшать такие характеристики, как структура мякиша и объем буханки (Döring et al., 2017).

Краткое описание изобретения

Поэтому целью настоящего изобретения было обеспечение способа получения пищевых продуктов, содержащих рожь, который преодолевает затруднения предшествующего уровня техники.

Эту задачу решают с помощью способа по п. 1, причем указанный способ включает стадию добавления к пищевому продукту, содержащему рожь, композиции, содержащей по меньшей мере один фермент семейства 10 GH (GH10). Было обнаружено, что добавление ксиланаз семейства GH10 к пищевым продуктам, содержащим рожь, во время обработки первичных пищевых смесей, таких как разновидности теста для выпекания, значительно улучшало обработку теста и качество хлебобулочных изделий после выпекания. Ксиланазы GH снижают вязкость теста, одновременно повышая способность к связыванию воды, что приводит к улучшению макроструктуры. Пищевые продукты, содержащие рожь, демонстрировали менее плотную структуру теста и улучшенную технологичность при обработке ксиланазами GH10 во время их получения. Это приводило к значительному увеличению объема и более мягкой структуре мякиша.

В одном варианте осуществления указанный по меньшей мере один фермент GH10 содержится в первичной пищевой смеси или применяется для получения пищевого продукта в форме, выбранной из группы, состоящей из клеточного экстракта, бесклеточного экстракта, частично очищенного белка и очищенного белка.

В одном варианте осуществления указанный по меньшей мере один фермент GH10 выделяют из микроорганизма.

В одном варианте осуществления указанный по меньшей мере один фермент GH10 представляет собой рекомбинантный фермент.

В одном варианте осуществления указанный по меньшей мере один фермент GH10 содержит, фактически состоит или состоит из полипептида, который характеризуется по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с

полипептидом, выбранным из SEQ ID NO: 1-6, и который демонстрирует гемицеллюлолитическую активность.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен фермент GH10 с гемицеллюлолитической активностью, который содержит, фактически состоит или состоит из полипептида, который характеризуется по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом в соответствии с SEQ ID NO 4 и 5 или полипептидом в соответствии с SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления фермент GH10 с гемицеллюлолитической активностью содержит, фактически состоит или состоит из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 4, 5 или 6.

Настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент GH10 с гемицеллюлолитической активностью в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, экспрессирующей фермент GH10 с гемицеллюлолитической активностью в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления указанная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli* или *Bacillus*. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен способ получения фермента GH10 с гемицеллюлолитической активностью, включающий культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих возможность продуцирования фермента, и выделение фермента из культуры.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая по меньшей мере один GH10.

Настоящее изобретение также относится к способам применения по меньшей мере одного фермента GH10 для получения пищевых продуктов.

Подробное описание изобретения

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения пищевого продукта, содержащего рожь, причем указанная рожь содержит арабиноксилан, и указанный способ включает стадию добавления к

указанному пищевому продукту композиции, содержащей по меньшей мере один фермент GH10.

Более предпочтительно, указанный по меньшей мере один фермент GH10 обладает гемицеллюлолитической активностью, наиболее предпочтительно ксиланолитической активностью.

«Гемицеллюлолитическая активность» в соответствии с настоящим изобретением определяется как способность фермента гидролизировать гемицеллюлозу. Гемицеллюлоза представляет собой общее название полисахаридов, которые можно получать посредством щелочной экстракции из растительных тканей. Некоторые из основных полисахаридов, которые входят в состав гемицеллюлозы, представляют собой ксилан, глюкуроноксилан, арабиноксилан, глюкоманнан, бета-глюкан со смешанными связями и ксилоглюкан. Ферменты, которые деполимеризируют эти полисахариды посредством гидролитической активности, называются гемицеллюлазами. Ксиланазы представляют собой один иллюстративный класс ферментов, которые принадлежат к группе гемицеллюлаз.

«Ксиланазная активность» в соответствии с настоящим изобретением определяется как способность фермента разрушать линейный полисахаридный бета-1,4-ксилановый остов ксилана до более коротких олигосахаридов. В частности, в соответствии с настоящим изобретением ксиланазная активность означает изменение содержания полимерного арабиноксилана в зерновом источнике для преодоления недостатков продуктов, содержащих рожь, например, плотной, влажной и клейкой структуры мякиша, а также хлебобулочных изделий с плотным мякишем и уменьшенным объемом буханки. Изменение микроструктуры арабиноксилана сопровождается макроструктурными изменениями теста, что проявляется в модифицированной способности к связыванию воды и улучшенной технологичности в виде повышенной стабильности теста.

«Фермент GH10», «ксиланаза GH10» или «ксиланаза семейства 10» в соответствии с настоящим изобретением означает ферменты, которые имеют 3-мерную вторичную структуру, которая характеризуется структурой (бета/альфа)₈бочонка, который образует чашеобразную форму (Larson et al., 2003). Напротив, ферменты GH11 демонстрируют тип укладки бета-желе-ролл. Активный центр и связывающие субстрат

аминокислотные остатки являются относительно хорошо консервативными, даже несмотря на то, что эти консервативные аминокислотные остатки являются довольно короткими последовательностями по отношению к полной последовательности белка. Ксиланазы семейства 10 обычно имеют более высокий молекулярный вес и более низкую рI по сравнению с семейством 11 (Kolenová et al. 2006; Collins et al. 2005, Biely et al., 1997). Ксиланазы GH10 способны расщеплять ксилановый остов гораздо ближе к боковым цепям остова, таким как 1,2- или 1,3-альфа-L-арабинофуранозидные боковые группы и боковые группы 1,2-4-*O*-метил-альфа-D-глюкуроновой кислоты, чем ксиланазы GH11 (Biely et al., 2016). Классификация ферментов в семейство GH соответствует критериям, раскрытым в базе данных Carbohydrate-Active enZymes (CAZy, <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>): существует прямая связь между последовательностью и сходствами укладки, и такая классификация:

- (i) отражает структурные признаки этих ферментов лучше, чем их специфичность к единственному субстрату,
- (ii) помогает выявить эволюционные связи между этими ферментами,
- (iii) обеспечивает удобный инструмент для получения информации о механизме действия,
- (iv) иллюстрирует сложность установления связей между членством в семействе и субстратной специфичностью

Выбор примеров ферментов GH10 в соответствии с настоящим изобретением

Три выбранные ксиланазы GH10 из микроорганизмов с максимальным филогенетическим расстоянием демонстрируют эффективность ферментов GH10 в модифицировании смесей пищевых продуктов, содержащих рожь. Каждая из ксиланаз получена из:

Царство грибы, отдел *Ascomycota*, род *Fusarium*, вид *Fusarium verticilloides*

Царство бактерии, тип *Proteobacteria*, род *Aeromonas*, вид *Aeromonas punctata*

Царство бактерии, тип *Firmicutes*, род *Clostridium*, вид *Clostridium thermocellum*, также известный как *Ruminiclostridium thermocellum*.

Несмотря на низкое сходство последовательностей, трехмерная укладка, а также способ гидролиза и паттерн активности сохраняются, о чем свидетельствуют результаты, представленные в примерах: низкая активность на модельных субстратах и высокая модифицирующая активность в смесях пищевых продуктов, содержащих рожь.

«Рожь» в контексте настоящего изобретения означает все продукты, полученные посредством обработки ржаного зерна, включая хлопья, измельченные продукты, такие как мука, и продукты, полученные из зерна, а также указанные продукты, обработанные с помощью физических, химических и/или биологических процедур. Кроме того, «рожь» в контексте настоящего изобретения также включает смеси ржи с другими зерновыми культурами или обработанным зерном. Такие другие зерновые культуры могут быть выбраны из группы, включающей пшеницу, ячмень, тритикале, эммер, овес, кукурузу, просо, сорго, гречиху, киноа, амарант и рис. Доля ржи в соответствующих ржаных смесях предпочтительно составляет 10% или более, 20% или более или 30% или более, более предпочтительно 40% или более, 50% или более или 60% или более, наиболее предпочтительно 70% или более или 80% или более, особенно предпочтительно 90% или более или 95% или более ржи.

Указанный «пищевой продукт, содержащий рожь», может представлять собой пищевой продукт, который был отварен, отварен на пару, экструдирован или иным образом нагрет. Соответственно, способ по настоящему изобретению предпочтительно включает стадию нагревания, на которой для получения конечного пищевого продукта применяют, например, выпекание, варку на пару, варку или нагревание иным образом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения указанный пищевой продукт, содержащий рожь, может представлять собой выпеченный пищевой продукт. Примерами являются хлеб, обычно в форме буханок или булок, французский хлеб типа багет, плоский хлеб, пита, тортильи, пироги, блины, сухое печенье, печенье, коржи для пирогов, хлебцы, крекер, пицца, самса и т. п. В одном варианте осуществления указанный пищевой продукт, содержащий рожь, может представлять собой пищевой продукт, отваренный на пару. Примерами являются паровой хлеб, булочки или пельмени. В одном варианте осуществления указанный пищевой продукт, содержащий рожь, может представлять собой отваренный пищевой продукт. Примерами являются вареные пельмени и макароны. В дополнительном варианте осуществления указанный пищевой продукт, содержащий рожь, может представлять собой экструдированный или

коэкструдированный пищевой продукт. Примерами являются батончики, кукурузные палочки, крекеры, печенье или зерновые хлопья.

В одном варианте осуществления способа по настоящему изобретению указанную композицию, содержащую по меньшей мере один фермент GH10, добавляют во время смешивания и/или перемешивания первичной пищевой смеси, содержащей ингредиенты пищевого продукта. Композицию, содержащую по меньшей мере один фермент GH10, также можно добавлять перед смешиванием и/или перемешиванием ингредиентов пищевого продукта. Для некоторых путей применения композицию, содержащую по меньшей мере один фермент GH10, можно добавлять после смешивания и/или перемешивания первичной пищевой смеси, содержащей ингредиенты пищевого продукта.

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ получения пищевого продукта, содержащего рожь, включает стадии:

получения первичной пищевой смеси;

добавления к указанной первичной пищевой смеси композиции, содержащей по меньшей мере один фермент GH10; и

обработки указанной первичной пищевой смеси с получением указанного пищевого продукта, содержащего рожь, где указанная обработка представляет собой обработку первичной пищевой смеси посредством нагревания.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения продуктов, содержащих рожь, при этом указанный способ включает стадию смешивания и/или перемешивания фермента GH10 и других улучшающих композиций с получением теста, жидкого теста, порошка, сухой смеси ингредиентов или любой другой формы первичной пищевой смеси, которую применяют для получения пищевого продукта по настоящему изобретению.

Рожь, добавляемую в способе и в продукты по настоящему изобретению, обычно добавляют в виде муки, но также она может быть в форме хлопьев, отрубей или зерен.

Арабиноксилан содержится в нескольких сортах зерновых культур. В следующей таблице показан обзор содержания арабиноксилана в зерновых культурах:

Зерновая культура	г/кг арабиноксилана в зерновках в пересчете на с.в.
Пшеница*	59
Ячмень*	65
Рожь*	86
Тритикале*	111
Кукуруза*	37
Сорго**	24
Овес**	97
Рис***	89

с.в. сухой вес

* (Oloffs et al., 1999)

** (Knudsen 2014)

*** (Frølich et al., 2013)

В дополнительном варианте осуществления способ по настоящему изобретению также можно осуществлять с применением вместо ржи другой зерновой культуры, которая содержит арабиноксилан или бета-глюкан со смешанными связями. Такие другие зерновые культуры могут быть выбраны из группы, включающей пшеницу, ячмень, тритикале, эммер, овес, кукурузу, просо, сорго, гречиху, киноа, амарант и рис.

Соответственно, первичная пищевая смесь и/или пищевой продукт по настоящему изобретению дополнительно содержит, помимо ржи, первичное и вторичное сырье. Первичное сырье выбирают, например, из дрожжей, соли, воды и основных структурных компонентов, таких как другие зерновые культуры. Вторичное сырье представляет собой материалы, которые улучшают тесто или конечный продукт тем или иным образом, например, улучшают вкус или мягкость пищевого продукта. В предпочтительном варианте осуществления первичная пищевая смесь и/или пищевой продукт по настоящему изобретению дополнительно содержит одно или несколько улучшающих пищевой продукт средств в качестве вторичного сырья, которые выбраны из группы, состоящей из ферментов, гидроколлоидов, эмульгаторов, окислителей,

жиров и липидов, ароматизаторов, (поли)сахаридов, включая (поли)сахаридные спирты, белков, солей и кислот, разрыхлителей теста, молочных и сырных продуктов и других пищевых добавок, или их смеси.

Указанные улучшающие пищевой продукт средства способны улучшать обработку первичной пищевой смеси или улучшать свойства пищевого продукта, такие как объем, текстура, микроструктура, пищевая ценность, переносимость, усвояемость, стабильность, вкус, запах, срок хранения и т. п.

Неисключающие примеры ферментов, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей альфа-амилазы, бета-амилазы, мальтогенные амилазы, протеиназы, другие ксиланазы, арабинофуранозидазы, мальтотетрагидролазы, глюкозооксидазы, оксидоредуктазы, глюканазы, целлюлазы, трансглутаминазы, изомеразы, липазы, фосфолипазы, липооксигеназы, пектиназы или их смесь.

Неисключающие примеры гидроколлоидов, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей ксантан, карбоксиметилцеллюлозу (СМС), метилцеллюлозу (МС) и гидроксипропилметилцеллюлозу (НРМС), гуммиарабик, камедь бобов рожкового дерева и камедь тары, конжаковый маннан, трагакантовую камедь, пектин, желатин и карраген.

Неисключающие примеры эмульгаторов, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей лецитин E322, моноглицериды E471, DATEM E472e, ACETEM E472a, LACTEM E472b, SSL E481, CSL E482, сложные эфиры полиглицерина E475 и сложный эфир пропиленгликоля E477.

Неисключающие примеры окислителей и восстановителей, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей азодикарбонамид, аскорбиновую кислоту, йодат калия, йодат кальция, бромат калия, глутатион и цистеин.

Неисключающие примеры жиров и липидов, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей омега-3

жирные кислоты, животные жиры, например, масло животного происхождения или сало, растительное масло или моно- и диглицериды жирных кислот.

Неисключающие примеры ароматизаторов, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, раскрыты в перечнях ЕС базы данных ароматизаторов Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA), которые на данный момент содержат >2500 записей (см. https://webgate.ec.europa.eu/foods_system/main/?event=substances.search&substances.sort.by=substanceName&substances.sort.order=DESC&substances.pagination=1).

Неисключающие примеры (поли)сахаридов и (поли)сахаридных спиртов, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей крахмал, целлюлозу, гемицеллюлозу, полидекстрозу, циклодекстрины, мальтодекстрины, инулин, бета-глюкан, пектин, слизь из шелухи семян подорожника, галактоманнаны или камеди, глюкоманнан или конжаковую камедь, камедь акации (аравийскую), карайю, трагакант, геллан, ксантан, агар-агар, альгинат, каррагинан, хитин и хитозан, сахарозу, глюкозу, декстрозу, лактозу, мальтозу и эритрит.

Неисключающие примеры белков, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей клейковинные белки, происходящие из зерновых и псевдозерновых культур, соевую муку, животные белки и белки насекомых.

Неисключающие примеры солей и кислот, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей карбонат кальция E170, сорбиновую кислоту E200, сорбат калия E202, сорбат кальция E203, уксусную кислоту E260, ацетат натрия E262, ацетат кальция E263, молочную кислоту E270, пропионовую кислоту E280, пропионат кальция E282, аскорбиновую кислоту E300, лецитин E322, лимонную кислоту E330, цитрат натрия E331, цитрат калия E332, цитрат кальция E333, ортофосфат кальция E341, дифосфат E450 и сульфат кальция E516.

Неисключающие примеры разрыхлителей теста, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей бикарбонат,

монокальцийфосфат, динатрийпирофосфат, алюмофосфат натрия, пекарские дрожжи и закваску.

Неисключающие примеры молочных и сырных продуктов, которые можно добавлять в качестве улучшающих пищевой продукт средств, выбраны из группы, включающей сухое молоко, сухую пахту, сухое молоко с пониженным содержанием жира, йогуртовый порошок, творожный сыр в виде порошка и лактопротеин.

Фермент GH10 можно добавлять в первичную пищевую смесь или пищевой продукт в форме, выбранной из группы, состоящей из клеточного экстракта, бесклеточного экстракта, частично очищенного белка и очищенного белка.

Кроме того, фермент GH10 можно добавлять в первичную пищевую смесь или пищевой продукт в виде раствора или в виде твердого вещества, в зависимости от применения и/или способа применения и/или способа введения. Твердая форма может быть либо в виде сухого порошкообразного фермента, либо в виде гранулированного фермента.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена ферментная композиция для добавления к первичной пищевой смеси или к пищевому продукту, причем указанная композиция содержит по меньшей мере один фермент GH10 и необязательно по меньшей мере одно средство для составления, вспомогательное вещество, стабилизатор и/или консервант. Состав может представлять собой жидкий состав, такой как раствор, или сухой состав, такой как порошок или гранулят.

Жидкие ферментные составы выбраны, например, из группы, включающей глицерин или воду.

В одном варианте осуществления ферментная композиция содержит стабилизатор. Стабилизаторы можно выбирать, без ограничения этими примерами, из:

солей, таких как хлорид натрия, хлорид магния, сульфат натрия и сульфат калия,

низкомолекулярных растворимых веществ, таких как эктоин,

аминокислот или белков, таких как гистидин, глицин, аргинин или BSA,

полиолов, полимеров и (поли)сахаридов, например, крахмала, олигосахаридов, мальтодекстрина, трегалозы, лактозы, мальтозы, целлобиозы, сахарозы, маннита, сорбита, декстрана или PEG;

поверхностно-активных веществ, таких как желатин, полочсамеры Brij, октилглюкопиранозид, пальмитиновая кислота, дипальмитилфосфатидилхолин, гидроксипропил- β -циклодекстрин, полисорбат 20 или полисорбат 80,

антиоксидантов, таких как DTT, EDTA, THPP и меркаптоэтанол,

поликатионов, таких как полиэтиленимин, и

полианионов, таких как полиакриловая кислота.

В дополнительном варианте осуществления ферментная композиция содержит консервант. Консервант представляет собой, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат, сорбат или другие одобренные для применения в пищевой промышленности консерванты или их смесь.

В еще одном дополнительном варианте осуществления ферментная композиция содержит по меньшей мере одно другое средство, выбранное из сухих разбавителей, наполнителей, связующих веществ, веществ, маскирующих запах, блокаторов горького вкуса и усилителей активности.

Соответственно, все средства, применяемые в ферментной композиции для добавления в первичную пищевую смесь или пищевой продукт, применяют при совместимости с пищевыми продуктами.

Фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, можно получать из микроорганизмов любого рода или вида. Для целей настоящего изобретения термин «полученный из», применяемый в настоящем документе в связи с данным источником, будет означать, что полипептид, кодируемый нуклеотидной последовательностью, продуцируется источником или штаммом, в геном которого была вставлена нуклеотидная последовательность из источника. Ферменты по настоящему изобретению могут продуцироваться внеклеточно или могут продуцироваться внутриклеточно. В предпочтительном варианте осуществления полипептид, полученный из данного источника, секретируется внеклеточно. Соответственно,

фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, может быть получен с применением природной, рекомбинантной или синтетической последовательности гена/полинуклеотида.

Фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, может быть получен из бактериального источника. Например, фермент GH10 может быть получен с применением рода грамположительных бактерий, таких как *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Herbinix*, *Herbivorax*, *Geobacillus* или *Oceanobacillus*, или с применением рода грамотрицательных бактерий, таких как *Aeromonas*, *Cellovibrio*, *Shewanella*, *Duganella*, *Cystobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Sorangium*, *Colwellia*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Thermotoga*, *Ilyobacter*, *Neisseria* или *Ureaplasma*.

В предпочтительном варианте осуществления фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, получают с применением группы бактерий, включающей виды *Clostridium aldrichii*, *Clostridium alkalicellulosi*, *Clostridium caenicola*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulosi*, *Clostridium clariflavum*, *Clostridium hungatei*, *Clostridium josui*, *Clostridium leptum*, *Clostridium methylpentosum*, *Clostridium papyrosolvens*, *Clostridium sporosphaeroides*, *Clostridium stercorarium*, *Clostridium straminosolvens*, *Clostridium sufflavum*, *Clostridium termitidis*, *Clostridium thermosuccinogenes*, *Clostridium viride* или *Clostridium thermocellum*, *Herbinix hemicellulosilytica*, *Herbinix luporum* и *Herbivorax saccincola*.

В другом предпочтительном варианте осуществления фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, получают с применением группы бактерий, включающей *Aeromonas caviae*, *Tolumonas lignilytica*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Cellvibrio japonicus*, *Cellvibrio mixtus*, *Shewanella japonica*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Sorangium cellulorum* и *Cystobacter ferrugineus*.

В другом предпочтительном варианте осуществления фермент GH10 получают с применением группы бактерий, включающей *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces mirabilis*, *Streptomyces hyaluromycini*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* и *Streptomyces lividans*.

Фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, также может представлять собой грибной полипептид и, более предпочтительно, дрожжевой полипептид, например, из рода дрожжей, входящего в группу, состоящую из *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* и *Yarrowia*; или, более предпочтительно, из рода мицелиальных грибов, входящего в группу, состоящую из *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Hypocrea*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella* и *Xylaria*.

В предпочтительном варианте осуществления фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, получают из группы дрожжей, включающей *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* и *Saccharomyces oviformis*.

В другом предпочтительном варианте осуществления фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, получают из группы грибов, включающей *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium commune*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium fujikori*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium mangiferae*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Fusarium verticilloides*,

Humicola grisea, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Talaromyces cellulolyticus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* и *Trichoderma viride*.

Следует понимать, что в случае вышеупомянутых родов и видов настоящее изобретение охватывает как совершенные и несовершенные стадии, так и другие таксономические эквиваленты, например, анаморфы, независимо от названия вида, под которым они известны. Специалисты в данной области техники легко распознают идентичность соответствующих эквивалентов.

Штаммы этих видов легко доступны для общественности в ряде коллекций культур, таких как Американская коллекция типовых культур (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) и Коллекция патентованных культур Службы сельскохозяйственных исследований, Северный региональный научный центр (NRRL).

Более того, такие полипептиды можно идентифицировать и получать из других источников, включая микроорганизмы, выделенные из природы (например, почвы, компостов, воды и т. д.). Методики выделения микроорганизмов из природных местообитаний хорошо известны из уровня техники. Более того, гены таких полипептидов можно выделять посредством скрининга в отношении активности ДНК-библиотек, полученных из клонированной фрагментированной метагеномной ДНК в подходящих для экспрессии хозяевах, таких как *E. coli*, *Bacillus subtilis* или *Thermus thermophilus*. Скрининг метагеномных библиотек представляет собой современную технологию получения новых генов ферментов. Затем полинуклеотид можно получать посредством подобного скрининга библиотеки геномной ДНК или кДНК такого микроорганизма или образца из окружающей среды. После выявления полинуклеотида, кодирующего полипептид, с помощью подходящего(их) зонда(ов) полинуклеотид можно выделять или клонировать с применением методик, которые хорошо известны специалистам в данной области техники (см. например, Sambrook et al., 1989).

В предпочтительном варианте осуществления фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, обладает ксиланазной и/или бета-глюканазной активностью. Более предпочтительно, фермент GH10, применяемый в способах по настоящему изобретению, изменяет содержание гемицеллюлозных компонентов. Фермент GH10 изменяет содержание арабиноксилана для преодоления недостатков продуктов, содержащих рожь, например, плотной, влажной и клейкой структуры мякиша, а также хлебобулочных изделий с плотным мякишем и уменьшенным объемом буханки. В одном варианте осуществления изменение содержания арабиноксилана означает изменение содержания арабиноксилана. В другом варианте осуществления изменение содержания арабиноксилана означает изменение микроструктуры пищевой системы, что приводит к улучшению способности к связыванию воды и взаимосвязанности белков (Döring et al., 2015). В связи с возникающими реологическими изменениями могут улучшаться свойства теста и хлеба.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена первичная пищевая смесь, содержащая ржаную муку вместе с по меньшей мере одним ферментом GH10.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен пищевой продукт, содержащий ржаную муку вместе с по меньшей мере одним ферментом GH10.

Преимущества и преимущественные варианты осуществления, описанные выше для способа, в равной степени применимы к первичной пищевой смеси и пищевому продукту по настоящему изобретению, так что для их описания следует обратиться к вышеописанному.

Первичная пищевая смесь может содержать другие улучшающие тесто и/или улучшающие хлеб добавки, например, любую из указанных выше добавок.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены полипептиды, которые имеют аминокислотную последовательность, выведенную из SEQ ID NO: 1-6, а также фрагменты, аналоги и производные таких полипептидов. Термины «фрагмент», «производное» и «аналог», если относятся к полипептиду под SEQ ID NO: 1-6, означают полипептиды, которые сохраняют фактически ту же биологическую функцию или активность, которая характерна для ксиланазы. К аналогу может относиться,

например, пробелок, который может быть активирован посредством расщепления пробелка с образованием активного зрелого белка.

Полипептиды по настоящему изобретению могут представлять собой рекомбинантные полипептиды, природные полипептиды или синтетические полипептиды. Фрагмент, производное или аналог полипептида под SEQ ID NO 4-6 может представлять собой (i) фрагмент, в котором один или несколько аминокислотных остатков заменены консервативным или неконсервативным аминокислотным остатком (предпочтительно консервативным аминокислотным остатком), и такой замененный аминокислотный остаток может представлять или не представлять собой остаток, кодируемый генетическим кодом, или (ii) фрагмент, в котором один или несколько аминокислотных остатков включают заменяющую группу, или (iii) фрагмент, в котором дополнительные аминокислоты слиты со зрелым белком, такой как лидерная или секреторная последовательность или последовательность, которую применяют для очистки или для связывания субстрата или комплекса зрелого полипептида или последовательности пробелка. Такие фрагменты, производные и аналоги считаются подпадающими под компетенцию специалистов в данной области техники, что обеспечивает для них основу идей, предусмотренных в данном документе.

К полипептидам по настоящему изобретению относятся полипептиды под SEQ ID NO 4-6, а также полипептиды, которые характеризуются по меньшей мере 75% сходством (например, предпочтительно по меньшей мере 50% и более предпочтительно по меньшей мере 70% идентичностью) с полипептидом под SEQ ID NO 4-6, более предпочтительно по меньшей мере 85% сходством (например, предпочтительно по меньшей мере 70% идентичностью) с полипептидом под SEQ ID NO 4-6 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% сходством (например, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичностью) с полипептидом под SEQ ID NO 4-6. Более того, к ним предпочтительно относятся точные части таких полипептидов, содержащие последовательность из по меньшей мере 30 аминокислот, и более предпочтительно из по меньшей мере 50 аминокислот.

Фрагменты или части полипептидов по настоящему изобретению можно применять в качестве промежуточных соединений для получения соответствующих полноразмерных полипептидов посредством синтеза пептидов. Фрагменты или части

полинуклеотидов по настоящему изобретению также можно применять для синтеза полноразмерных полинуклеотидов по настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления указанный фермент GH10 содержит, фактически состоит или состоит из полипептида, который характеризуется по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом, выбранным из SEQ ID NO 1-6, и который демонстрирует ксиланазную активность.

SEQ ID NO: 1: GH10 (Clostridium thermocellum) WT

SEQ ID NO: 2: GH10 (Fusarium verticilloides) WT

SEQ ID NO: 3: GH10 (Aeromonas punctata) WT

SEQ ID NO: 4: GH10 (Clostridium thermocellum) w/o CBM

SEQ ID NO: 5: GH10 (Clostridium thermocellum) w/o doc

SEQ ID NO: 6GH10 (Clostridium thermocellum) w/o doc/CBM

В более предпочтительном варианте осуществления указанный фермент GH10 с ксиланазной активностью содержит, фактически состоит или состоит из полипептида, который характеризуется по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом в соответствии с SEQ ID NO. 4, при условии, что фермент GH10 не представляет собой полипептид под SEQ ID NO: 1, 2 или полипептид под SEQ ID NO: 3.

В еще более предпочтительном варианте осуществления указанный фермент GH10 содержит, фактически состоит или состоит из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 4-6.

В особенно предпочтительном варианте осуществления указанный фермент GH10 содержит, фактически состоит или состоит из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 4, где в указанном ферменте GH10 делегирован CBM, что приводит к 4-кратному повышению ферментативной активности.

В дополнительном особенно предпочтительном варианте осуществления указанный фермент GH10 содержит, фактически состоит или состоит из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 5, где в указанном ферменте GH10 делегирован докеринный модуль, что приводит к 4-кратному повышению ферментативной активности.

В дополнительном особенно предпочтительном варианте осуществления указанный фермент GH10 содержит, фактически состоит или состоит из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 6, где в указанном ферменте GH10 делегированы СВМ и докеринный модуль, что приводит к 8-кратному повышению ферментативной активности.

В соответствии с настоящим изобретением является предпочтительным фермент GH10 под любой из SEQ ID NO: 1-3, который проявляет оптимальную ферментативную активность, в частности, ксиланазную активность, при кислотном pH, предпочтительно в диапазоне 3,5-6,5, предпочтительно в диапазоне 3,5-6,0, более предпочтительно 3,5-5,5 или 3,5-5,0, наиболее предпочтительно в диапазоне 3,5-4,5, например, 4,3.

Такие ферменты особенно пригодны для применения для обработки первичных пищевых смесей по настоящему изобретению, которые подвергаются обработке посредством нагревания с образованием конечных пищевых продуктов. Ферменты GH10, предусмотренные в настоящем изобретении, все еще проявляют достаточную ксиланазную активность для изменения содержания арабиноксилана или длины его цепи, например, в тесте, содержащем рожь, также при более высоких температурах. Оптимум pH в кислотном диапазоне является преимущественным, например, также для обработки кислых разновидностей теста.

Способ и фермент GH10 по настоящему изобретению являются преимущественными в том, что они приводят, например, к улучшению теста, особенно теста, содержащего рожь. Улучшение теста означает улучшение обработки теста и/или улучшение качества конечных пищевых продуктов таким образом, чтобы конечные пищевые продукты демонстрировали менее плотную структуру, повышенную мягкость, увеличение объема

и/или более мягкую структуру мякиша, например, повышение стабильности, снижение сопротивляемости теста растяжению, снижение клейкости.

Предпочтительно, повышения стабильности теста достигают с помощью фермента GH10 по настоящему изобретению в диапазоне 115-225%, предпочтительно по меньшей мере 115%, 130% или 145%, более предпочтительно 160%, 175% или 190%, наиболее предпочтительно 205%, 220% или 225% по сравнению с тестом, обработанным без фермента GH10 по настоящему изобретению.

Предпочтительно, снижения сопротивляемости теста растяжению достигают с помощью фермента GH10 по настоящему изобретению в диапазоне 9-30%, предпочтительно по меньшей мере 9%, 12% или 15%, более предпочтительно 18%, 21% или 24%, наиболее предпочтительно 27% или 30% по сравнению с тестом, обработанным без фермента GH10 по настоящему изобретению.

Предпочтительно, снижения клейкости теста достигают с помощью фермента GH10 по настоящему изобретению в диапазоне 8-18%, предпочтительно по меньшей мере 8%, 9% или 10%, более предпочтительно 11%, 12%, 13% или 14%, наиболее предпочтительно 15%, 16%, 17% или 18% по сравнению с тестом, обработанным без фермента GH10 по настоящему изобретению.

Предпочтительно, снижения твердости мякиша достигают с помощью фермента GH10 по настоящему изобретению в диапазоне 18-49%, предпочтительно по меньшей мере 8%, 13% или 18%, более предпочтительно 23%, 28% или 33%, наиболее предпочтительно 38%, 43% или 49% по сравнению с тестом, обработанным без фермента GH10 по настоящему изобретению.

Предпочтительно, увеличения объема достигают с помощью фермента GH10 по настоящему изобретению в диапазоне 108-122%, предпочтительно по меньшей мере 108%, 109%, 110%, 111% или 112%, более предпочтительно 113%, 114%, 115%, 116% или 117%, наиболее предпочтительно 118%, 119%, 120%, 121% или 122% по сравнению с тестом, обработанным без фермента GH10 по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент GH10 в

соответствии с настоящим изобретением, в частности, кодирующую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO 4-6.

«Полинуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты» по настоящему изобретению могут быть представлены в форме РНК или в форме ДНК; следует понимать, что к ДНК относится кДНК, геномная ДНК, рекомбинантная ДНК и синтетическая ДНК. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной и, если она одноцепочечная, может быть кодирующей цепью или не кодирующей (антисмысловой) цепью. Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может быть идентична кодирующей последовательности полипептидов, показанных под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6, или она может представлять собой другую кодирующую последовательность, кодирующую тот же полипептид, в результате избыточности или вырожденности генетического кода или однонуклеотидного полиморфизма. Например, она также может представлять собой РНК-транскрипт, который включает полную длину кодирующей последовательности полипептида под любой из SEQ ID NO 4-6. В предпочтительном варианте осуществления «полинуклеотид» в соответствии с настоящим изобретением представляет собой одну из SEQ ID NO 16-18.

Нуклеиновые кислоты, которые кодируют полипептиды под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6 могут содержать без ограничения кодирующую последовательность только одного полипептида; кодирующую последовательность полипептида плюс дополнительную кодирующую последовательность, такую как лидерная или секреторная последовательность или последовательность пробелка; и кодирующую последовательность полипептида (и необязательно дополнительную кодирующую последовательность) плюс не кодирующую последовательность, такую как интроны или не кодирующая последовательность 5' и/или 3'-конца кодирующей последовательности полипептида.

Таким образом, термин «полинуклеотид, кодирующий полипептид», или термин «нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид», следует понимать как охватывающий полинуклеотид или нуклеиновую кислоту, которая содержит только кодирующую последовательность фермента GH10 по настоящему изобретению, например, полипептида, выбранного из SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6, а также полинуклеотид или нуклеиновую кислоту, которая включает

дополнительную кодирующую и/или не кодирующую последовательность. Термины полинуклеотиды и нуклеиновая кислота применяются взаимозаменяемо.

Настоящее изобретение также включает полинуклеотиды, в которых кодирующая последовательность полипептида может быть слита в одной рамке считывания с полинуклеотидной последовательностью, которая способствует экспрессии и секреции полипептида из клетки-хозяина; например, она таким образом может быть слита с лидерной последовательностью, которая функционирует в качестве секреторной последовательности для регуляции транспорта полипептида из клетки. Полипептид, имеющий такую лидерную последовательность, называется пребелком или препребелком и может иметь лидерную последовательность, отщепляемую клеткой-хозяином с образованием зрелой формы белка. Эти полинуклеотиды могут иметь удлиненный участок на 5'-конце таким образом, что он кодирует пробелок, который представляет собой зрелый белок плюс дополнительные аминокислотные остатки на N-конце. Продукт экспрессии, имеющий такую пропоследовательность, называется пробелком, который представляет собой неактивную форму зрелого белка; тем не менее, при отщеплении пропоследовательности остается активный зрелый белок. К белку также может быть присоединена дополнительная последовательность, и она может представлять собой часть зрелого белка. Таким образом, например, полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать полипептиды или белки, имеющие пропоследовательность, или белки, имеющие как пропоследовательность, так и препоследовательность (такую как лидерная последовательность).

Полинуклеотиды по настоящему изобретению также могут иметь кодирующую последовательность, слитую в рамке с маркерной последовательностью, что позволяет осуществлять очистку полипептидов по настоящему изобретению. Маркерная последовательность может представлять собой аффинную метку или эпитопную метку, такую как полигистидиновая метка, стрептавидиновая метка, Xpress-метка, FLAG-метка, связывающая целлюлозу или хитин метка, глутатион-S-трансферазная метка (GST), гемагглютининовая (HA) метка, с-мус-метка или V5-метка.

HA-метка будет соответствовать эпитопу, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., 1984), а с-мус-метка может представлять собой эпитоп из белка Мус человека (Evans et al., 1985).

Настоящее изобретение рассматривается как изобретение, в котором дополнительно предусмотрены полинуклеотиды, которые гибридизуются с описанными в данном документе выше последовательностями, которые характеризуются по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью или сходством между последовательностями и, таким образом, кодируют белки, обладающие схожей биологической активностью. Более того, как известно из уровня техники, между двумя полипептидами существует «сходство», если аминокислотные последовательности содержат одинаковые или консервативные аминокислотные замены по каждому отдельному остатку в последовательности. Идентичность и сходство можно измерять с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей (например, ClustalW на сайте PBI (Pôle Bioinformatique Lyonnais) <http://npsa-pbil.ibcp.fr>). В настоящем изобретении, в частности, предусмотрены такие полинуклеотиды, которые в жестких условиях гибридизуются с описанными в данном документе выше полинуклеотидами.

Соответственно, жесткие условия могут определяться, например, концентрацией соли или формамида в растворе для предварительной гибридизации и в растворе для гибридизации, или температурой гибридизации и хорошо известны из уровня техники. В частности, жесткость можно повышать посредством уменьшения концентрации соли, посредством увеличения концентрации формамида и/или посредством повышения температуры гибридизации.

Например, при гибридизации в условиях высокой жесткости можно применять приблизительно 50% формамид при температуре приблизительно 37-42°C, тогда как при гибридизации в условиях пониженной жесткости можно применять приблизительно 35-25% формамид при температуре приблизительно 30-35°C. Один конкретный набор условий для гибридизации в условиях высокой жесткости предусматривает применение 42°C, 50% формамида, 5x SSPE, 0,3% SDS и 200 мкг/мл расщепленной и денатурированной ДНК спермы лосося. Для гибридизации при пониженной жесткости можно применять условия, схожие с описанными выше, в 35% формамиде при пониженной температуре, составляющей 35°C. Диапазон температуры, соответствующий конкретному уровню жесткости, можно дополнительно сузить с помощью расчета соотношения пуринов и пиримидинов в представляющей интерес нуклеиновой кислоте и соответствующей корректировки температуры. Вариации

вышеуказанных диапазонов и условий хорошо известны из уровня техники. Предпочтительно, гибридизация должна происходить только в том случае, если между последовательностями существует по меньшей мере 95% идентичность, и более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичность. Полинуклеотиды, которые гибридизуются с описанными в данном документе выше полинуклеотидами, в предпочтительном варианте осуществления кодируют полипептиды, которые проявляют практически ту же биологическую функцию или активность, что и зрелый белок под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6.

Как уже упоминалось, подходящий полинуклеотидный зонд может иметь по меньшей мере 14 оснований, предпочтительно 30 оснований и более предпочтительно по меньшей мере 50 оснований и будет гибридизоваться с полинуклеотидом по настоящему изобретению, который характеризуется идентичностью с ним, как описано в данном документе выше. Например, такие полинуклеотиды можно применять в качестве зонда для гибридизации с полинуклеотидами, кодирующими полипептиды под SEQ ID NO: 4-6, такими как полинуклеотиды под SEQ ID NO 16-18, соответственно, например, для выделения такого полинуклеотида, или в качестве диагностического зонда, или в качестве праймера для ПЦР. Таким образом, настоящее изобретение включает полинуклеотиды, характеризующиеся по меньшей мере 70% идентичностью, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичностью и более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью с полинуклеотидом под SEQ ID NO 16-18, который кодирует полипептид под SEQ ID NO: 4-6, а также их фрагменты, причем эти фрагменты предпочтительно имеют по меньшей мере 30 оснований и более предпочтительно по меньшей мере 50 оснований.

Термины «гомология» или «идентичность», применяемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидными последовательностями, причем идентичность является более строгим сравнением. Фразы «процент идентичности или гомологии» и «идентичность или гомология» относятся к проценту сходства последовательностей, обнаруженного при сравнении двух или более полинуклеотидных последовательностей или двух или более полипептидных последовательностей. «Сходство последовательностей» относится к проценту сходства в последовательности пар оснований (определяемому любым

подходящим способом) между двумя или более полинуклеотидными последовательностями. Две или более последовательностей могут быть схожими в любом месте на 0-100% или на любое целочисленное значение между ними. Идентичность или сходство можно определять посредством сравнения положения в каждой последовательности, которое может быть выровнено для целей сравнения. Если положение в сравниваемой последовательности занято тем же нуклеотидным основанием или аминокислотой, то молекулы являются идентичными в этом положении. Степень сходства или идентичности между полинуклеотидными последовательностями зависит от количества идентичных или совпадающих нуклеотидов в положениях, общих для полинуклеотидных последовательностей.

Степень идентичности полипептидных последовательностей зависит от количества идентичных аминокислот в положениях, общих для полипептидных последовательностей. Степень гомологии или сходства полипептидных последовательностей зависит от количества аминокислот в положениях, общих для полипептидных последовательностей. Применяемый в настоящем документе термин «практически идентичный» относится к идентичности или гомологии, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

Степень идентичности последовательностей определяют посредством выбора одной последовательности в качестве запрашиваемой последовательности и ее выравнивания с помощью интернет-инструмента ClustalW с гомологичными последовательностями, взятыми из GenBank с применением алгоритма blastp (NCBI).

Как хорошо известно из уровня техники, генетический код является избыточным в том смысле, что определенные аминокислоты кодируются более чем одним триплетом нуклеотидов (кодоном), и настоящее изобретение включает те полинуклеотидные последовательности, которые кодируют одни и те же аминокислоты с помощью другого кодона из тех, которые конкретно проиллюстрированы в приведенных в данном документе последовательностях. Такая полинуклеотидная последовательность называется в данном документе «эквивалентной» полинуклеотидной последовательностью. Настоящее изобретение дополнительно включает варианты описанных в данном документе выше полинуклеотидов, которые кодируют фрагменты, такие как часть или весь белок, аналоги и производные полипептида под SEQ ID NO 4-

6. Вариантные формы полинуклеотида могут представлять собой встречающийся в природе аллельный вариант полинуклеотида или не встречающийся в природе вариант полинуклеотида. Например, вариант нуклеиновой кислоты может просто характеризоваться отличием в последовательности кодонов в случае аминокислоты, являющейся результатом вырожденности генетического кода, или могут существовать варианты с делециями, варианты с заменами и варианты с добавлениями или вставками. Как известно из уровня техники, аллельный вариант представляет собой альтернативную форму полинуклеотидной последовательности, которая может иметь замену, делецию или добавление одного или нескольких нуклеотидов, которые практически не изменяют биологическую функцию кодируемого полипептида.

Настоящее изобретение также включает векторы, которые включают такие полинуклеотиды, клетки-хозяева, которые генетически сконструированы с помощью таких векторов, и получение полипептидов под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6 с помощью рекомбинантных методик с применением вышеизложенного. Клетки-хозяева генетически конструируют (трансдуцируют или трансформируют, трансконъюгируют или трансфицируют) с помощью таких векторов, которые могут представлять собой, например, клонирующий вектор или вектор экспрессии. Вектор может быть представлен, например, в форме плазмиды, конъюгативной плазмиды, вирусной частицы, фага и т. д. Вектор или ген можно встроить в хромосому в специфический или неспецифический сайт. Способы встраивания рекомбинантной ДНК в геном, такие как гомологичная рекомбинация или опосредованное транспозазой встраивание, хорошо известны из уровня техники. Сконструированные клетки-хозяева можно культивировать в общепринятых питательных средах, модифицированных при необходимости для активации промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов по настоящему изобретению. Условия культивирования, такие как температура, pH и т. п. являются такими, которые обычно применяют с выбранной для экспрессии клеткой-хозяином, что хорошо известно специалисту в данной области техники.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению можно применять для получения полипептидов под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6 с помощью рекомбинантных методик. Так, например, полинуклеотиды можно встроить в любой из множества векторов экспрессии.

Подходящую последовательность ДНК можно вставить в вектор с помощью любой из множества процедур. Как правило, последовательность ДНК встраивают в соответствующий(ие) сайт(ы) рестрикционных эндонуклеаз с помощью процедур, хорошо известных из уровня техники, и эти процедуры считаются подпадающими под компетенцию специалистов в данной области техники.

Последовательность ДНК в векторе экспрессии функционально связана с соответствующей(ими) последовательность(ями) для регуляции экспрессии (промотором) для управления синтезом mRNA. В качестве иллюстративных примеров таких промоторов можно упомянуть: промотор LTR или SV40, *lac*, *ara*, *rha* или *trp E. coli*, промотор P_L фага лямбда и другие промоторы, о которых известно, что они регулируют экспрессию генов в прокариотических или эукариотических клетках или их вирусах.

Более предпочтительно, ферменты GH10 по настоящему изобретению можно экспрессировать с помощью следующих инструментов:

Конкретными примерами подходящих промоторов для управления транскрипцией конструкций на основе нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, особенно в бактериальной клетке-хозяине, являются промоторы, полученные из *lac*-оперона *E. coli*, гена агаразы (*dagA*) *Streptomyces coelicolor*, гена левансахаразы (*sacB*) *Bacillus subtilis*, гена альфа-амилазы (*amyL*) *Bacillus licheniformis*, гена мальтогенной амилазы (*amyM*) *Bacillus stearothermophilus*, гена альфа-амилазы (*amyQ*) *Bacillus amyloliquefaciens*, гена пенициллиназы (*penP*) *Bacillus licheniformis*, генов *xylA* и *xylB* системы ксилозозависимой экспрессии *Bacillus subtilis*, генов белков общего стресса (*gsiB*) sigma^B-зависимой системы экспрессии *B. subtilis* и прокариотического гена бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978), а также промотор *tac* (DeBoer et al., 1983). Кроме того, конститутивные промоторы *p43 B. subtilis* и *hpaII Staphylococcus aureus*. Дополнительные промоторы описаны в «Useful proteins from recombinant bacteria» в *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; и в Sambrook et al., 1989. Также возможны гибриды и двойные или тройные комбинации вышеупомянутых промоторов, а также их мутантные и усеченные варианты.

Примерами подходящих промоторов для управления транскрипцией конструкций на основе нуклеиновых кислот по настоящему изобретению в клетке-хозяине

мицелиального гриба являются промоторы, полученные из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger*, кислотостабильной альфа-амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы (*glaA*) *Aspergillus niger* или *Aspergillus awamori*, липазы *Rhizomucor miehei*, щелочной протеазы *Aspergillus oryzae*, триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*, ацетамидазы *Aspergillus nidulans*, амилоглюкозидазы *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), трипсин-подобной протеазы *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), бета-глюкозидазы *Trichoderma reesei*, целлобиогидролазы I *Trichoderma reesei*, целлобиогидролазы II *Trichoderma reesei*, эндоглюканызы I *Trichoderma reesei*, эндоглюканызы II *Trichoderma reesei*, эндоглюканызы III *Trichoderma reesei*, эндоглюканызы IV *Trichoderma reesei*, эндоглюканызы V *Trichoderma reesei*, ксиланызы I *Trichoderma reesei*, ксиланызы II *Trichoderma reesei*, бета-ксилозидазы *Trichoderma reesei*, а также промотор NA2-tpi (модифицированный промотор из гена, кодирующего нейтральную альфа-амилазу *Aspergillus niger*, в котором нетранслируемая лидерная последовательность заменена нетранслируемой лидерной последовательностью из гена, кодирующего триозофосфатизомеразу *Aspergillus nidulans*); и их мутантные, усеченные и гибридные промоторы.

В дрожжевой клетке-хозяине пригодные промоторы получают из генов енолазы (ENO-1) *Saccharomyces cerevisiae*, галактокиназы (GAL1) *Saccharomyces cerevisiae*, алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ADH1, ADH2/GAP) *Saccharomyces cerevisiae*, триозофосфатизомеразы (TPI) *Saccharomyces cerevisiae*, металлотионеина (CUP1) *Saccharomyces cerevisiae* и 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие пригодные промоторы для дрожжевых клеток-хозяев описаны в Romanos et al., 1992. У хозяина *Pichia* пригодные промоторы получают из генов алкогольоксидазы (AOX1) *Pichia pastoris* и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAP) *Pichia pastoris*.

Регуляторная последовательность также может представлять собой подходящую последовательность-терминатор транскрипции, последовательность, распознаваемую клеткой-хозяином для терминации транскрипции. Терминаторная последовательность функционально связана с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид. В настоящем изобретении можно применять любой терминатор, который

является функциональным в выбранной клетке-хозяине. Предпочтительные терминаторные структуры представляют собой, например, терминаторные структуры из гена *amyE Bacillus amyloliquefaciens*, гена *penP Bacillus licheniformis*, гена *bglS* или *apreE B. subtilis* и гена *cry Bacillus thuringiensis*.

Предпочтительные терминаторы для клеток-хозяев мицелиальных грибов получают из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger* и трипсин-подобной протеазы *Fusarium oxysporum*.

Предпочтительные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев получены из генов енолазы *Saccharomyces cerevisiae*, цитохрома С (CYC1) *Saccharomyces cerevisiae* и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие пригодные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев описаны в Romanos et al., 1992.

Регуляторная последовательность также может представлять собой подходящую лидерную последовательность, нетранслируемый участок mRNA, который является важным для трансляции в клетке-хозяине. Лидерная последовательность функционально связана с 5'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид. В настоящем изобретении можно применять любую лидерную последовательность, которая является функциональной в выбранной клетке-хозяине. Предпочтительные нетранслируемые участки представляют собой нетранслируемые участки из гена *amyE Bacillus amyloliquefaciens*, гена *penP Bacillus licheniformis*, гена *bglS* или *apreE B. subtilis* и гена *cry Bacillus thuringiensis*.

Предпочтительные лидерные последовательности для клеток-хозяев мицелиальных грибов получены из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus nidulans*.

Подходящие лидерные последовательности для дрожжевых клеток-хозяев получены из генов енолазы (ENO-1) *Saccharomyces cerevisiae*, 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ADH2/GAP) *Saccharomyces cerevisiae*.

Регуляторная последовательность также может представлять собой последовательность полиаденилирования, последовательность, функционально связанную с 3'-концом нуклеотидной последовательности, которая при ее транскрипции распознается клеткой-хозяином как сигнал для добавления остатков полиаденозина к транскрибируемой mRNA. В настоящем изобретении можно применять любую последовательность полиаденилирования, которая является функциональной в выбранной клетке-хозяине.

Предпочтительные последовательности полиаденилирования для клеток-хозяев мицелиальных грибов получают из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, трипсин-подобной протеазы *Fusarium oxysporum* и альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger*.

Пригодные последовательности полиаденилирования для дрожжевых клеток-хозяев описаны в Guo and Sherman, 1995.

Регуляторная последовательность также может представлять собой последовательность, кодирующую сигнальный пептид, которая кодирует сигнальный пептид, связанный с аминоконцом полипептида, и направляет кодируемый полипептид в секреторный путь клетки. 5'-конец кодирующей последовательности нуклеотидной последовательности может по своей природе содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид, естественным образом связанную в трансляционной рамке считывания с сегментом кодирующей последовательности, которая кодирует секреторируемый полипептид. В качестве альтернативы, 5'-конец кодирующей последовательности может содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид, которая является чужеродной в отношении кодирующей последовательности. Чужеродная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, может быть необходима, если кодирующая последовательность естественным образом не содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В качестве альтернативы, чужеродная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, может просто заменять природную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, для усиления секреции полипептида. Тем не менее, в настоящем изобретении можно применять любую последовательность, кодирующую сигнальный пептид, которая направляет экспрессированный полипептид в секреторный путь выбранной клетки-хозяина, т. е. он секреторируется в культуральную среду.

Эффективные последовательности, кодирующие сигнальный пептид, для бактериальных клеток-хозяев представляют собой последовательности, кодирующие сигнальный пептид, полученные из генов мальтогенной амилазы *Bacillus* NCIB 11837, альфа-амилазы *Bacillus stearothermophilus*, субтилизина *Bacillus licheniformis*, бета-лактамазы *Bacillus licheniformis*, нейтральных протеаз (*nprT*, *nprS*, *nprM*) *Bacillus stearothermophilus* и *prsA* *Bacillus subtilis*. Дополнительные сигнальные пептиды описаны в Simonen and Palva, 1993 и в Brockmeier et al., 2006.

Эффективные последовательности, кодирующие сигнальный пептид, для клеток-хозяев мицелиальных грибов представляют собой последовательности, кодирующие сигнальный пептид, полученные из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, нейтральной амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, целлюлазы *Humicola insolens*, эндоглюканазы *V Humicola insolens* и липазы *Humicola lanuginosa*.

Пригодные сигнальные пептиды для дрожжевых клеток-хозяев получают из генов альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие пригодные последовательности, кодирующие сигнальный пептид, описаны в Romanos et al., 1992, выше.

Регуляторная последовательность также может представлять собой последовательность, кодирующую пропептид, которая кодирует пропептид, расположенный на аминоконце полипептида. Полученный полипептид известен как профермент или прополипептид (или, в некоторых случаях, зимоген). Пропептид обычно неактивен и может быть превращен в зрелый активный полипептид посредством каталитического или автокаталитического отщепления пропептида от прополипептида. Последовательность, кодирующая пропептид, может быть получена из генов щелочной протеазы (*aprE*) *Bacillus subtilis*, нейтральной протеазы (*nprT*) *Bacillus subtilis*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei* и лакказы *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

Когда на аминоконце полипептида присутствуют как последовательность сигнального пептида, так и последовательность пропептида, последовательность пропептида расположена рядом с аминоконцом полипептида, а последовательность сигнального пептида расположена рядом с аминоконцом последовательности пропептида.

Также может быть необходимо добавление регуляторных последовательностей, которые позволяют осуществлять регуляцию экспрессии полипептида относительно роста клетки-хозяина. Примерами регуляторных систем являются системы, которые вызывают включение или выключение экспрессии гена в ответ на химический или физический стимул, включая присутствие регуляторного соединения. К регуляторным системам в прокариотических системах относятся системы операторов *lac*, *tac* и *trp*. В случае дрожжей можно применять систему ADH2, систему GAL1 или систему AOX1. В случае мицелиальных грибов в качестве регуляторных последовательностей можно применять промотор ТАКА-альфа-амилазы, промотор глюкоамилазы *Aspergillus niger* и промотор глюкоамилазы *Aspergillus oryzae*. Другими примерами регуляторных последовательностей являются последовательности, которые позволяют осуществлять амплификацию генов. В эукариотических системах к этим регуляторным последовательностям относятся ген дигидрофолатредуктазы, который амплифицируется в присутствии метотрексата, и гены металлотioneина, которые амплифицируются в присутствии тяжелых металлов. В этих случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, будет функционально связана с регуляторной последовательностью.

Векторы экспрессии

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим полинуклеотид по настоящему изобретению, промотор и сигналы остановки транскрипции и трансляции. Различные нуклеиновые кислоты и регуляторные последовательности, описанные в данном документе, можно соединять друг с другом с получением рекомбинантного вектора экспрессии, который может содержать один или несколько (некоторое количество) удобных сайтов рестрикции для обеспечения возможности вставки или замены нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, в таких сайтах. В качестве альтернативы, полинуклеотидную последовательность по настоящему изобретению можно экспрессировать с помощью вставки нуклеотидной последовательности или конструкции на основе нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, в подходящий вектор для экспрессии. При создании вектора экспрессии кодирующую последовательность располагают в векторе таким образом, что кодирующая последовательность функционально связана с соответствующими регуляторными последовательностями для экспрессии.

Рекомбинантный вектор экспрессии может представлять собой любой вектор (например, плазмиду или вирус), который можно легко подвергнуть процедурам для получения рекомбинантной ДНК и который способен вызывать экспрессию нуклеотидной последовательности. Выбор вектора обычно будет зависеть от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую вектор необходимо ввести. Векторы могут быть линейными или замкнутыми кольцевыми плазмидами.

Вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор, т. е. вектор, который существует в виде внехромосомного объекта, репликация которого не зависит от репликации хромосомы, например, плазмиду, внехромосомный элемент, минихромосому или искусственную хромосому. Вектор может содержать любые средства для обеспечения саморепликации. В качестве альтернативы, вектор может представлять собой вектор, который при введении в клетку-хозяина встраивается в геном и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую он был встроен. Кроме того, можно применять один вектор или плазмиду или два или более векторов или плазмид, которые вместе содержат общую ДНК, которую необходимо ввести в геном клетки-хозяина, или транспозон.

Векторы по настоящему изобретению предпочтительно содержат один или несколько (некоторое количество) селективируемых маркеров, которые позволяют легко осуществлять отбор трансформированных, трансфицированных, трансдуцированных или подобных клеток. Селективируемый маркер представляет собой ген, продукт которого обеспечивает устойчивость к биоцидам или вирусам, устойчивость к тяжелым металлам, прототрофность ауксотрофам и т. п. (Kroll et al., 2009). К таким ауксотрофностям относятся без ограничения нарушения или делеции в генах биосинтеза аминокислот, например, аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина, соответственно. К таким ауксотрофностям также могут относиться без ограничения нарушения или делеции в генах биосинтеза пуринов, пиримидинов или кофакторов ферментов. Ауксотрофный фенотип восполняется с помощью эписомы, содержащей интактный и экспрессируемый вариант мутантного гена, вызывающего ауксотрофность, вместе с кассетой экспрессии, содержащей представляющий интерес ген.

Примерами бактериальных селективируемых маркеров являются гены *dal* из *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis* или маркеры, которые придают устойчивость к антибиотикам, таким как ампициллин, канамицин, хлорамфеникол или тетрациклин. Подходящими маркерами для дрожжевых клеток-хозяев являются ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 и URA3. К селективируемым маркерам для применения в клетке-хозяине мицелиальных грибов относятся без ограничения *amdS* (ацетамидаза), *argB* (орнитин

карбамоилтрансфераза), *bar* (фосфинотрицинацетилтрансфераза), *hph* (гигромицинфосфотрансфераза), *niaD* (нитратредуктаза), *pyrG* (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза), *sC* (сульфатаденилтрансфераза) и *trpC* (антранилатсинтаза), а также их эквиваленты. Предпочтительными для применения в клетке *Aspergillus* являются гены *amdS* и *pyrG* *Aspergillus nidulans* или *Aspergillus oryzae* и ген *bar* *Streptomyces hygroscopicus*.

Векторы по настоящему изобретению предпочтительно содержат элемент(ы), который(е) позволяет(ют) осуществлять встраивание вектора в геном клетки-хозяина или автономную репликацию вектора в клетке независимо от генома.

Для встраивания в геном клетки-хозяина вектор может представлять собой вектор на основе последовательности полинуклеотида, кодирующей полипептид или любой другой элемент вектора, для встраивания в геном посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации. В качестве альтернативы, вектор может содержать дополнительные нуклеотидные последовательности для направленного встраивания посредством гомологичной рекомбинации в геном клетки-хозяина в точное(ые) местоположение(я) на хромосоме(ах). Для повышения вероятности встраивания в точное местоположение встраиваемые элементы предпочтительно должны содержать достаточное количество нуклеиновых кислот, такое как 100-10000 пар оснований, предпочтительно 400-10000 пар оснований и наиболее предпочтительно 800-10000 пар оснований, которые характеризуются высокой степенью идентичности последовательности с соответствующей целевой последовательностью для повышения вероятности гомологичной рекомбинации. Встраиваемые элементы могут представлять собой любую последовательность, которая гомологична целевой последовательности в геноме клетки-хозяина. Более того, встраиваемые элементы могут представлять собой некодирующие или кодирующие нуклеотидные последовательности. С другой стороны,

вектор можно встраивать в геном клетки-хозяина посредством негомологичной рекомбинации.

Для автономной репликации вектор может дополнительно содержать точку начала репликации, позволяющую вектору автономно реплицироваться в рассматриваемой клетке-хозяине. Точка начала репликации может представлять собой любой опосредующий автономную репликацию плазмидный репликатор, который функционирует в клетке. Термин «точка начала репликации» или «плазмидный репликатор» определяется в данном документе как нуклеотидная последовательность, которая позволяет плазмиде или вектору реплицироваться *in vivo*.

Примерами бактериальных точек начала репликации являются точки начала репликации плазмид pBR322, pUC19, pACYC177 и pACYC184, позволяющие осуществлять репликацию в *E. coli*, и pUB110, pE194, pTA1060 и pAM β 1, позволяющие осуществлять репликацию в *Bacillus*.

Примерами точек начала репликации для применения в дрожжевой клетке-хозяине являются точка начала репликации 2-микронной плазмиды, ARS1, ARS4, комбинация ARS1 и CEN3 и комбинация ARS4 и CEN6.

Примерами точек начала репликации, пригодных для применения в клетке мицелиального гриба, являются AMA1 и ANS1 (Gems et al., 1991). Выделение гена AMA1 и конструирование плазмид или векторов, содержащих этот ген, можно осуществлять согласно способам, раскрытым в WO 00/24883.

Для повышения продуцирования продукта гена в геном клетки-хозяина можно вставить более одной копии полинуклеотида по настоящему изобретению. Увеличение числа копий полинуклеотида можно достичь посредством встраивания по меньшей мере одной дополнительной копии последовательности в геном клетки-хозяина или посредством включения амплифицируемого селективируемого маркерного гена с полинуклеотидом, при этом клетки будут содержать амплифицированные копии селективируемого маркерного гена, и тем самым можно выделить дополнительные копии полинуклеотида посредством культивирования клеток в присутствии соответствующего средства для отбора.

Процедуры, применяемые для лигирования описанных выше элементов для конструирования рекомбинантных векторов экспрессии по настоящему изобретению, хорошо известны специалисту в данной области техники (см. например, Sambrook et al., 1989, выше).

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, экспрессирующая фермент GH10 в соответствии с одной из SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно SEQ ID NO: 4-6. Более предпочтительно, указанная клетка-хозяин содержит нуклеотидную молекулу по настоящему изобретению, которая кодирует полипептид под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6. Наиболее предпочтительно, указанная клетка-хозяин представляет собой *E. coli* или *Bacillus subtilis*.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения фермента GH10 под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях, обеспечивающих возможность продуцирования фермента, и выделение фермента из культуры.

Способы получения

Более предпочтительно, в настоящем изобретении предусмотрены способы получения полипептида по настоящему изобретению, т. е. фермента GH10 под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6, включающие: (a) культивирование клетки, которая продуцирует полипептид, в условиях, благоприятных для продуцирования полипептида; и (b) выделение полипептида. В предпочтительном аспекте клетка относится к роду *Bacillus*. В более предпочтительном аспекте клетка представляет собой *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis*.

Настоящее изобретение также относится к способам получения полипептида по настоящему изобретению, включающим: (a) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях, благоприятных для продуцирования полипептида; и (b) выделение полипептида.

Настоящее изобретение также относится к способам получения полипептида по настоящему изобретению, включающим: (a) культивирование рекомбинантной клетки-

хозяина в условиях, благоприятных для продуцирования полипептида, причем клетка-хозяин содержит ген фермента GH10, более конкретно фермента GH10, полученного из бактерии, более конкретно рекомбинантного бактериального фермента GH10.

В способах получения по настоящему изобретению клетки культивируют в питательной среде, подходящей для получения полипептида, с применением способов, хорошо известных из уровня техники. Например, клетку можно культивировать посредством культивирования во встряхиваемой колбе и посредством мелкомасштабной или крупномасштабной ферментации (включая непрерывную, периодическую, с подпиткой или твердофазную ферментации) в лабораторных или промышленных ферментерах, которое осуществляют в подходящей среде и в условиях, позволяющих осуществлять экспрессию и/или выделение полипептида. Культивирование происходит в подходящей питательной среде, содержащей источник углерода и азота, а также неорганические соли, с применением процедур, известных из уровня техники. Подходящие среды доступны у коммерческих поставщиков, или их можно получать в соответствии с опубликованными композициями (например, в каталогах Американской коллекции типовых культур). Если полипептид секретируется в питательную среду, полипептид можно выделить непосредственно из среды. Если полипептид не секретируется в среду, его можно выделить из клеточных лизатов.

Полипептиды можно выявлять с помощью способов, известных из уровня техники, которые являются специфическими для полипептидов. Эти способы выявления могут включать применение специфических антител, образование продукта реакции, катализируемой ферментом, или разрушение субстрата фермента. Например, для определения активности описанного в данном документе полипептида можно применять ферментный анализ.

Полученный полипептид можно выделить с помощью способов, известных из уровня техники. Например, полипептид можно выделять из питательной среды с помощью общепринятых способов, включая без ограничения центрифугирование, фильтрацию, экстракцию, высушивание посредством распыления, выпаривание или осаждение.

Полипептиды по настоящему изобретению можно очищать с помощью различных процедур, известных из уровня техники, включая без ограничения хроматографию (например, ионообменную, аффинную, гидрофобную, хроматофокусирование и

эксклюзионную), электрофоретические процедуры (например, препаративное изоэлектрическое фокусирование), дифференциальную растворимость (например, осаждение с помощью сульфата аммония), SDS-PAGE или экстракцию (см. например, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) с получением практически чистых полипептидов.

Композиции

Настоящее изобретение также относится композициям, содержащим полипептид по настоящему изобретению, т. е. фермент GH10 под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6. Предпочтительно, композиции обогащены таким полипептидом. Термин «обогащенный» указывает на то, что активность ксиланазы GH10 в композиции была повышена, например, с коэффициентом обогащения, составляющим по меньшей мере 1,1.

Полипептидные композиции можно получать в соответствии со способами, известными из уровня техники, и они могут быть представлены в форме жидкости или сухой композиции. Полипептид, который должен быть включен в композицию, можно стабилизировать в соответствии со способами, известными из уровня техники и описанными в данном документе выше.

Ферментный препарат

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен ферментный препарат, содержащий фермент GH10 под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6, для применения в качестве добавки для выпекания, варки, варки на пару или экструзии в способе по настоящему изобретению. Ферментный препарат предпочтительно представлен в форме жидкости, гранулята или агломерированного порошка, более предпочтительно в форме гранулята или агломерированного порошка.

Гранулят или агломерированный порошок предпочтительно характеризуется узким распределением частиц по размерам с более чем 95% (по весу) частиц в диапазоне 25-500 микрон.

Грануляты и агломерированные порошки можно получать с помощью общепринятых способов, например, посредством распыления ксиланазы на носитель в грануляторе с псевдооживленным слоем. Носитель может состоять из определенных основных

компонентов, имеющих подходящий размер частиц. Носитель может быть растворимым или нерастворимым, например, носитель может представлять собой соль (такую как хлорид натрия или сульфат натрия), сахар (такой как сахароза или лактоза), сахарный спирт (такой как сорбит), олигосахарид (такой как мальтодекстрин), крахмал, рис, кукурузную крупу или сою.

В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению фермента GH10 для получения пищевых продуктов, содержащих арабиноксилан.

В целом, преимущества и преимущественные варианты осуществления, описанные выше для способа, первичной пищевой смеси и пищевого продукта по настоящему изобретению, в равной степени применимы к путям применения и способам применения в соответствии с настоящим изобретением, так что для их описания следует обратиться к вышеописанному.

В частности, настоящее изобретение также направлено на способы применения фермента GH10, такого как фермент GH10 под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6, или композиций, содержащих его, для выпекания с получением выпеченного пищевого продукта.

Настоящее изобретение также направлено на способы применения фермента GH10, такого как фермент GH10 под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6, или композиций, содержащих его, для варки с получением пищевого продукта, отваренного на пару.

Настоящее изобретение также направлено на способы применения фермента GH10, такого как фермент GH10 под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6, или композиций, содержащих его, для варки с получением отваренного пищевого продукта.

Настоящее изобретение также направлено на способы применения фермента GH10, такого как фермент GH10 под SEQ ID NO: 1-6, предпочтительно под SEQ ID NO: 4-6, или композиций, содержащих его, для экструзии с получением экструдированного пищевого продукта.

Настоящее изобретение дополнительно описано с помощью последующих фигур и примеров, которые не следует толковать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

В данном документе,

на фигуре 1 показано относительное повышение ферментативной активности (%) ферментов под SEQ ID NO 4-6 по отношению к ферментативной активности фермента дикого типа под SEQ ID NO 1. Ферментативная активность ферментов под SEQ ID NO 4-6 повышается в 4-8 раз по сравнению с ферментативной активностью фермента под SEQ ID NO 1. Ферментативная активность: высвобождение микромолей редуцирующих сахаров из арабиноксилана на мг фермента в минуту определяли с применением DNSA-анализа. Ферментативную активность измеряли в трех повторностях.

На фигуре 2 показаны результаты SDS-PAGE рекомбинантно полученных ферментов под SEQ ID NO: 1, 4, 5 и 6, соответственно. В качестве белкового стандарта применяли предварительно окрашенный маркер молекулярного веса с фрагментами, молекулярный вес которых составляет 10-180 кДа (№ 26616, ThermoFischer Scientific).

На фигуре 3 показана относительная ферментативная активность ферментов GH10 под SEQ ID NO 2 и 3 по сравнению с ферментами семейства GH11 под SEQ ID NO 7 и Pentopan Mono BG*. Активность ксиланазы под SEQ ID NO 6 принимали за 100%. Ферментативная активность: высвобождение микромолей редуцирующих сахаров из арабиноксилана на мг фермента в минуту определяли с применением DNSA-анализа. Ферментативную активность измеряли в трех повторностях.

На фигуре 4 показаны результаты применения ферментов GH10 под SEQ ID NO 2, 3 и 6 по сравнению с ферментами семейства GH11 под SEQ ID NO 7 и Pentopan Mono BG* для изменения объема хлеба в способе выпекания ржаного хлеба. Применяемая концентрация каждого из ферментов составляла 0,1 ppm. Оценки выпекания и объема осуществляли в трех повторностях. За 100% принимали стандартный объем хлеба без добавления ферментов. Значения с разными буквами значимо различаются (однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием Тьюки, $p < 0,05$, $n=3$).

На фигуре 5 показана фотография ржаного хлеба, выпеченного при рН 4,3 с 0,13 ppm фермента GH10 под SEQ ID NO 6 (справа) в сравнении со стандартом без добавления (слева) фермента GH10.

На фигуре 6 показан эффект улучшения мякиша при применении 0,13 ppm фермента GH10 под SEQ ID NO: 6 в сравнении со стандартом без добавления фермента GH10 для снижения твердости мякиша в способе выпекания ржаного хлеба при рН 4,3. Расчеты твердости осуществляли в двух повторностях.

На фигуре 7 показано влияние ксиланаз GH10 и GH11 на стабильность образцов ржаного теста в тестомесильной машине с Z-образными лопастями и измерением крутящего момента. Значения с разными буквами значимо различаются (однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием Тьюки, $p < 0,05$, $n=4$).

На фигуре 8 показано влияние ксиланазы GH10 с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6 при применении различных количеств ксиланазы, составляющих 0,0 ppm (■), 0,01 ppm (□) 0,1 ppm (▣), на стабильность разновидностей ржано-пшеничного теста в образцах теста с соотношением, составляющим 70% ржи и 30% пшеницы (A) и 10% ржи и 90% пшеницы (B), в тестомесильной машине с Z-образными лопастями и измерением крутящего момента. Значения с разными буквами значимо различаются (однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием Тьюки, $p < 0,05$, $n=2$).

На фигуре 9 показано влияние различных количеств ксиланазы, составляющих 0,0 ppm (■), 0,01 ppm (□) 0,1 ppm (▣), на клейкость образцов ржано-пшеничного теста (соотношение ржи (R) и пшеницы (W) составляет 30%:70%), определенную с помощью анализатора текстуры Ta.XT plus (Stable Micro Systems Ltd., Годалминг, Соединенное Королевство), оснащенного установкой для определения клейкости теста Чена-Хосни. Значения с разными буквами значимо различаются (однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием Тьюки, $p < 0,05$, $n=2$).

На фигуре 10 показано влияние различных количеств ксиланазы, составляющих 0,0 ppm (■), 0,01 ppm (□) 0,1 ppm (▣), на сопротивляемость растяжению $R_{\text{макс}}^K$ образцов ржано-пшеничного (соотношение ржи (R) и пшеницы (W) A) составляет 10%:90%, B) 30%:70% и C) 70%:30%) теста, определенную с помощью анализатора текстуры Ta.XT

plus (Stable Micro Systems Ltd., Годалминг, Соединенное Королевство), оснащенного установкой для определения растяжимости SMS/Kieffer. Значения с разными буквами значимо различаются (однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием Тьюки, $p < 0,05$, $n=2$).

Пример 1: клонирование SEQ ID NO 14-19, кодирующих ксиланазы

Материалы

Химические вещества, применяемые в качестве буферов и субстратов, представляли собой коммерческие продукты по меньшей мере чистые для анализа. DH10B *Escherichia coli* применяли для рутинного клонирования, а BL21 Star *E. coli* (DE3) — для экспрессии генов ксиланаз DSM1237 *Clostridium thermocellum* (также известного как DSM1237 *Ruminiclostridium thermocellum*) и DSM101079 *Herbivorax saccincola* под SEQ ID NO 14 с SEQ ID NO 16-19, соответственно. Синтетическую ДНК для клонирования получали от Integrated DNA Technologies (Левен, Бельгия). Для экспрессии ксиланазы *Fusarium verticilloides* под SEQ ID NO 15 применяли *Pichia pastoris* X33 (ThermoFisher). Ксиланазу GH10 *Aeromonas punctata* под SEQ ID NO 3 приобретали в Megazyme (E-XYNAP, Megazyme, Брей, Ирландия), а Pentopan Mono BG* приобретали в Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)

Модификация ДНК

Получение хромосомной и плазмидной ДНК, расщепление эндонуклеазами и лигирование проводили согласно стандартным процедурам (Sambrook J and Russell DW. 2001).

Клонирование генов, кодирующих ксиланазы GH10 и GH11

Гены с последовательностями нуклеиновых кислот под SEQ ID NO: 14, 16-18, кодирующие ксиланазы GH10, амплифицировали с хромосомной ДНК из *C. thermocellum* DSM1237 в соответствии с инструкциями производителя (высокоточная ДНК-полимераза Phusion, F530S, ThermoFisher Scientific) с применением набора праймеров под SEQ ID NO: 8 и 9, а также под SEQ ID NO: 10 и 9, набора праймеров под SEQ ID NO 8 и 11 и набора праймеров под SEQ ID NO 10 и 11, соответственно. С помощью ферментов под SEQ ID NO 4-6 исследовали влияние различных делеций в белковом модуле на ферментативную активность и функцию. В ферменте под SEQ ID

NO 4 делетировали домен, связывающий целлюлозу. В ферменте под SEQ ID NO 5 делетировали докеринный модуль, а в ферменте под SEQ ID NO 6 делетировали оба модуля. Все ПЦР-продукты затем клонировали согласно сборке по Gibson (NEB, кат. № E2611S) в расщепленном с помощью *NdeI/XhoI* векторе pET24c(+) (Novagen, MerckMillipore) и секвенировали с помощью Eurofins для подтверждения верной последовательности.

ДНК, кодирующую последовательность ксиланазы GH10 *Fusarium verticilloides* под SEQ ID NO 15, выводили из аминокислотной последовательности, раскрытой в WO2014019219A1. ДНК синтезировали с помощью Integrated DNA Technologies, вводили в расщепленный с помощью *SalI/EcoRI* вектор pICZα A (EasySelect™ Pichia Expression Kit) с применением сборки по Gibson (NEB, кат. № E2611S) и секвенировали с помощью Eurofins для подтверждения верной последовательности.

Кодирующую последовательность ксиланазы GH11 из *Herbivorax saccincola* под SEQ ID NO 19 амплифицировали с соответствующей хромосомной ДНК штамма DSM101079 с применением пары праймеров под SEQ ID NO: 12 и 13. Новый разрушающий целлюлозу бактериальный штамм под названием *Herbivorax saccincola* выделяли из ферментера объемом 20 л, работавшего с коровьим навозом, с подпиткой кукурузным силосом при 55°C (Koeck et al. 2016). Для секвенирования генома штамма *Herbivorax saccincola* применяли геномную ДНК общим количеством 4 микрограмма для конструирования библиотеки для секвенирования емкостью 8 тыс. совпадающих пар (с применением набора Nextera Mate Pair Sample Prep Kit, Illumina Inc.), которую секвенировали с применением протокола со парными концами в системе Illumina MiSeq. Анализ и интерпретация последовательности генома *Herbivorax saccincola* в GenDB и с применением средств dbCAN из базы данных ферментов, активных в отношении углеводов (Yin et al., 2012), позволили выявить более 100 генов, которые, согласно прогнозу, кодируют ферменты, в основном принадлежащие к различным семействам гликозидгидролаз (GH), а также модули, связывающие углеводы (CBM). Один из ферментов (SEQ ID NO 7) идентифицировали как представителя семейства 11 гликозидгидролаз.

Конструирование рекомбинантных штаммов Pichia pastoris X33, экспрессирующих ксиланазу под SEQ ID NO 15.

Для трансформации штамма X33 *P. pastoris* линейаризировали вектор pICZalpha A, содержащий нуклеиновую кислоту под SEQ ID NO 15, с помощью *SacI* и применяли его для трансформации электрокомпетентных клеток *P. pastoris* (Lin-Cereghino *et al.*, 2005). Клоны, выращиваемые на содержащей антибиотика агаровой среде YPDS (1% (вес/объем) с дрожжевым экстрактом, 2% (вес/объем) пептона и 2% (вес/объем) декстрозы, 1 М сорбита и 1,5% (вес/объем) агара), подвергали скринингу в отношении вставки нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO 15 с применением ПЦР для отбора колоний с праймерами, предусмотренными в наборе EasySelect™ Pichia Expression Kit. Положительные клоны отбирали для продуцирования фермента под SEQ ID NO 2.

Пример 2: получение белков-ферментов под SEQ ID NO 1-7

Рост клеток

Процедуры ферментации с подпиткой рекомбинантных штаммов *E. coli*, несущих гены ксиланазы GH10 из *C. thermocellum* ATCC27405/DSM1237 под SEQ ID NO 14, 16-18 и ген ксиланазы *Herbivorax saccincola* DSM101079 под SEQ ID NO 19 проводили в ферментере Uni-Vessel объемом 10 л, контролируемом и оснащенным Biostat В Twin DCU (Sartorius AG, Геттинген, Германия). Температуру, pH, пену, мутность, вес и растворенный кислород контролировали онлайн в ходе ферментации. Уровень растворенного кислорода (DO%) устанавливали на 25% (объем/объем) и поддерживали посредством усиленного перемешивания и постоянного потока воздуха. Образование пены контролировали посредством добавления Antifoam 206 (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Поддерживали pH 6,9 посредством добавления 25% (объем/объем) раствора гидроксида аммония и 25% (объем/объем) раствора HPO_4 . Штаммы *E. coli* культивировали в среде Ризенберга (Korz *et al.*, 1995) в масштабе 10 л, при этом раствор для подпитки состоит из 1021 г/л глицерина, 20 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 13 мг/л EDTA, 4 мг/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 23,5 мг/л $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 мг/л $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 5 мг/л H_3BO_3 , 4 мг/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 16 мг/л $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 40 мг/л цитрата Fe(III) (Korz *et al.*, 1995). После потребления начального углеводного субстрата скорость роста контролировали в соответствии с УРАВНЕНИЕМ 1, где m_S представляет собой массовый расход субстрата (г ч^{-1}), $\mu_{\text{уст}}$ — требуемую удельную скорость роста (ч^{-1}), $Y_{X/S}$ — коэффициент выхода биомассы/субстрата (г г^{-1}), m — удельный коэффициент поддержания ($\text{г г}^{-1} \text{ ч}^{-1}$), V — объем культивирования (л), и X — концентрацию биомассы (г л^{-1}):

УРАВНЕНИЕ 1

$$m_S = \left(\frac{\mu_{\text{уст.}}}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot V(t) \cdot X(t) \cdot e^{\mu_{\text{уст.}}(t-t_F)}$$

Процедуру инокуляции осуществляли следующим образом: на основе замороженного исходного материала получали свежий агаровый диск, содержащий соответствующие антибиотики. Одной колонией инокулировали колбу Эрленмейера, содержащую 30 мл лизогенного бульона (Sambrook et al. 1989), и инкубировали в течение 12-15 ч при 30°C. 30 мл этой первой прекультуры применяли для инокуляции 500 мл ферментационной среды в колбе Эрленмейера объемом 5 л и инкубировали в течение еще 14 часов. Ферментер объемом 10 л наполняли ферментационной средой объемом 6 л и инокулировали второй прекультурой объемом 500 мл. Добавляли канамицин в концентрации 50 мкг/мл. Продуцирование белка индуцировали посредством замены питательной среды на основе глицерина на питательную среду на основе лактозы. Клетки собирали через 48 ч посредством центрифугирования в течение 1 ч при 9000 об/мин и 22°C. Порции по 300 г клеток растворяли в 3 л лизирующего буфера (50 mM MOPS, pH 7,3, 0,1 M NaCl, 20 mM имидазола). Лизис клеток осуществляли посредством обработки ультразвуком в потоке ультразвука через камеру. Клеточный дебрис отделяли посредством центрифугирования (9000 об/мин, 22°C). Супернатант очищали от оставшихся клеток или дебриса посредством тангенциальной фильтрации с применением фильтрующей кассеты с диаметром отверстий, составляющим 0,2-мкм, и промывания тремя объемами лизирующего буфера. Раствор фермента концентрировали с применением тангенциальной фильтрации с помощью фильтровальной кассеты со значением отсечки по молекулярному весу, составляющим 30 кДа, с последующим диализом тремя объемами лизирующего буфера. Ксиланазы GH10 очищали с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (IMAC). Очищенные ферменты элюировали элюирующим буфером, содержащим 50 mM MOPS, pH 7,3, 0,25 M имидазола, 0,1 M NaCl и 20 mM CaCl₂.

Другая возможность получения вариантов фермента под SEQ ID NO 1, такого как ферменты под SEQ ID NO 4-6 по настоящему изобретению, заключается в трансформации компетентного штамма *B. subtilis* подходящим вектором, содержащим

мутантную ДНК, и культивировании рекомбинантного штамма в соответствии с Park et al., 1991.

Получение ксиланазы *Fusarium verticilloides* под SEQ ID NO 2 осуществляли в *P. pastoris* X33 посредством инокуляции прекультурой, несущей геномную вставку SEQ ID NO 15, бульона YPD объемом 5 мл (1% (вес/объем) дрожжевого экстракта, 2% (вес/объем) пептона и 2% (вес/объем) декстрозы) в колбе Эрленмейера объемом 50 мл, из одной колонии, выращенной на агаровой среде YPD (1% (вес/объем) дрожжевого экстракта, 2% (вес/объем) пептона и 2% (вес/объем) декстрозы, 1,5% (вес/объем) агара), и инкубации прекультуры в течение 6 ч при 30°C в орбитальном шейкере при 180 об/мин. Один мл прекультуры применяли для инокуляции культуры для экспрессии объемом 300 мл в 1% среде BMD (0,2М калий-фосфатный буфер, pH 6, 13,4 г/л дрожжевой азотсодержащей основы, 0,4 мг/л биотина, 1,1% (вес/объем) глюкозы) в разделенной перегородкой колбе Эрленмейера объемом 5 л и инкубировали в течение 64 ч при 22°C в орбитальном шейкере при 180 об/мин. Экспрессию индуцировали добавлением 240 мл среды BMM2 (0,2М калий-фосфатный буфер, pH 6, 13,4 г/л дрожжевой азотсодержащей основы, 0,4 мг/л биотина, 1% (объем/объем) метанола) и переносили на 28°C. Культуру для экспрессии подпитывали каждые 24 часа 9% (объем/объем) средой BMM 10 (0,2М калий-фосфатный буфер, pH 6, 13,4 г/л дрожжевой азотсодержащей основы, 0,4 мг/л биотина, 5% (объем/объем) метанола) и 1% (объем/объем) чистого метанола. Культуральный супернатант применяли для очистки фермента с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (IMAC), как описано выше.

Пример 3: электрофоретические способы

Электрофорез в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (SDS) проводили в соответствии с Laemmli (1970). Белки ресуспендировали в денатурирующем буфере и нагревали в течение 15 мин при 95°C. В качестве стандарта молекулярного веса применяли предварительно окрашенный маркер молекулярного веса с фрагментами, молекулярный вес которых составляет 10-180 кДа (№ 26616, ThermoFischer Scientific). Белки окрашивали кумасси бриллиантовым голубым R-250 (Weber and Osbourne, 1969).

Пример 4: определение количества белка

Количество белка определяли с применением набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (№ 23225, ThermoFischer Scientific) в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 5: тест в отношении активности, разрушение арабиноксилана*Ксиланазная активность*

Для цели настоящего изобретения для определения ксиланазной активности подходит любой из коммерчески доступных наборов для измерения ксиланазной активности. Один подходящий способ измерения ксиланазной активности заключается в следующем:

Измерение ксиланазной активности проводили при температуре и pH, которые оптимальны для соответствующих ферментов под SEQ ID NO 1, 4, 5, 6 и 7 при 60°C, pH 5,8, и под SEQ ID NO 2 и Pentopan Mono BG* при 50°C, pH 5,8, в течение 1 часа с конечной концентрацией арабиноксилана, составляющей 0,86% (вес/объем) (арабиноксилан пшеницы, средняя вязкость, Megazyme, Ирландия), реакционным буфером (100 mM MOPS, pH 6,5, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) и соответствующим количеством фермента. Определение количества редуцирующих сахаров проводили как описано в Wood and Bhat (1988) с применением 3,5-динитросалициловой кислоты (DNSA). Количество высвобожденных концов редуцирующих сахаров определяли на основе калибровочной кривой для глюкозы. Одна единица (ед) определяется как количество фермента, необходимое для высвобождения одного микромоля эквивалентов редуцирующих сахаров за одну минуту. Все анализы проводили в по меньшей мере трех повторностях.

Пример 6: характеристика ферментов под SEQ ID NO 4-6 в сравнении с ферментом под SEQ ID NO 1

Ксиланазы GH10 *Clostridium thermocellum* (SEQ ID NO: 1, 4-6) получали, очищали и количественно оценивали как описано в примерах 1-4. Ксиланазную активность определяли как описано в примере 5, за исключением того, что ксиланазную активность каждого фермента измеряли с применением температуры и диапазона pH с целью определения оптимума pH (диапазона pH) и оптимума температуры (диапазона температуры). Удельную активность ферментов под SEQ ID NO 1 и 4-6 рассчитывали в

ед./мг. Результаты рассчитывали в виде соотношения к ферменту дикого типа под SEQ ID NO 1. На фигуре 2 показан размер ферментов под SEQ ID NO: 4-6 по сравнению с белком дикого типа под SEQ ID NO 1. Все варианты под SEQ ID NO 4-6 были на 12-36% меньше по сравнению с белком дикого типа. Однако значения удельной ферментативной активности вариантов под SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 и SEQ ID NO 6 были в по меньшей мере 4 раза выше (фиг. 1), что не соответствует только лишь изменениям размера (фиг. 2). Делеция белковых доменов, как показано у вариантов под SEQ ID NO: 4-6, приводит к значительному повышению ферментативной активности. Делеции отдельных доменов в ферментах под SEQ ID NO 4 и 5 приводят к приблизительно 4-кратному повышению активности каждого фермента. Делеция обоих доменов в ферменте под SEQ ID NO 6 приводит к еще большему повышению удельной ферментативной активности, что не отражается уменьшением размера фермента.

Пример 7: сравнение ферментативной активности GH11 и GH10

Фермент GH11 под SEQ ID NO 7 и ферменты GH10 под SEQ ID NO 2 и 6 клонировали и получали как описано в примерах 1 и 2. Концентрацию соответствующих белков, включая приобретенный фермент GH11 Pentopan Mono BG*, определяли как описано в примере 4. Удельная ферментативная активность SEQ ID NO 3 была предоставлена производителем (Megazyme, Ирландия). Удельная ферментативная активность, рассчитанная в соответствии с примером 5, позволила выявить очень высокие значения удельной ферментативной активности как ферментов GH11, так и фермента под SEQ ID NO 7 и Pentopan Mono BG* по сравнению с довольно низкими значениями удельной ферментативной активности ферментов GH10 под SEQ ID NO 2, 3 и 6. На фигуре 3 результаты показаны в виде относительной ферментативной активности. Активность ксиланазы под SEQ ID NO 6 принимали за 100%.

Пример 8: эксперименты по выпеканию с применением ферментов GH10 и GH11

Эксперименты по выпеканию проводили для определения влияния ферментов GH11 и GH10 на объем хлеба, содержащего ржаную муку (100%). В каждом случае в экспериментах по выпеканию добавляли 0,1 ppm фермента относительно ржаной муки в соответствии со следующим рецептом.

Рецепт выпечки 1

Ржаная мука 120 г	(тип 1150, Rosenmühle)
Сухие быстрорастворимые дрожжи (вид <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1% (в пересчете на количество муки)
Соль	2% (в пересчете на количество муки)
Сахар	2% (в пересчете на количество муки)
Вода	57% (в пересчете на количество муки)

Применяли ферменты под SEQ ID NO 2, 3, 6 и 7, а также Pentoran Mono BG*, каждый в количестве 0,1 ppm в пересчете на количество ржаной муки.

Процедура

1. Определение количества ингредиентов, добавление муки, дрожжей, соли, сахара и фермента
2. Фермент дозировали по 0,1 ppm относительно муки; за исключением отрицательного контроля (без фермента)
3. Доведение температуры воды для достижения температуры теста 30°C после смешивания, определения количества и добавления воды в дежу тестомесильной машины
4. Смешивание: 1 мин с помощью мешалки с ручным управлением (Philips) на полной скорости
5. Тесто помещали в духовой шкаф на 30 мин при 30°C.
6. Смешивание: 1 мин с помощью мешалки с ручным управлением (Philips) на полной скорости
7. Тесто помещали в духовой шкаф на 45 мин при 30°C.

8. Смешивание: 1 мин с помощью мешалки с ручным управлением (Philips) на полной скорости
9. Тесто разделяли на равные тяжелые порции и формовали в булки
10. Сформованную булку выдерживали в течение 10 мин
11. Булки переносили на противень с покрытием.
12. Булки выпекали в течение 25 мин (с нагреванием при 220°C сверху и снизу)
13. Булкам позволяли остыть
14. Оценивали булки

Оценка объема

Объем выпеченных булок и хлеба измеряли по вытеснению семян рапса. Подходящий стакан (высота которого в три раза, ширина в два раза и длина в два раза превосходила наибольший тестируемый образец при сравнении с ним) наполняли семенами рапса до полного заполнения стакана. Избыток семян рапса удаляли с помощью пластины, которая полностью покрывала отверстие в стакане. Тестируемую булку помещали сверху на семена рапса в середине стакана и накрывали пластиной. Посредством приложения стабильного умеренного давления на пластину булку погружали в семена рапса. Вытесненные семена рапса собирали и занимаемый ими объем измеряли в мерном стакане. Вытесненные мл семян рапса считали объемом булок. Для каждого эксперимента по выпеканию расчеты объема проводили в трех повторностях. Тестировали несколько ксиланаз, принадлежащих к семействам 10 и 11, полученных от различных видов. На фигуре 4 обобщены результаты экспериментов по выпеканию с применением пяти ксиланаз, двух представителей семейства GH11 и трех ксиланаз GH10, полученных от различных бактерий или грибов. Для испытаний по выпеканию применяли одинаковое количество отдельных ферментов. Ферменты GH10 характеризовались низкой удельной активностью в отношении арабиноксилана, однако эти ферменты демонстрировали лучшее увеличение объема хлеба. Как показано в примере 7, представители ферментов GH11 демонстрировали гораздо более высокую удельную ферментативную активность по сравнению с ферментом GH10. Тем не менее было обнаружено, что при применении одинаковых количеств ферментов в

экспериментах по выпеканию ферменты GH11 были не способны увеличить объем хлеба.

Пример 9: влияние фермента под SEQ ID NO 6 на ржаной хлеб с доведенным рН

Влияние фермента под SEQ ID NO 6 на объем и твердость ржаного хлеба тестировали согласно другому рецепту (2) выпечки, включающему доведение рН.

Рецепт выпечки 2

Ржаная мука	100%	тип 997
Сухие быстрорастворимые дрожжи	1,8% (вид: <i>S. cerevisiae</i>)	(в пересчете на количество муки)
Соль	1,8%	(в пересчете на количество муки)
Вода	70%	(в пересчете на количество муки)
Фермент:	SEQ ID NO 6, 0,13 мг/кг муки (контрольные эксперименты без фермента) (в пересчете на количество муки)	
Лактат	0,0-2,0 мл для доведения рН (4,3, 4,7, 5,1 и 5,9) в пересчете на количество муки	

Процедура

1. Определение количества ингредиентов, добавление муки, дрожжей, соли и фермента
2. Доведение температуры воды для достижения температуры теста 30°C после смешивания, определения количества и добавления воды в дежу тестомесильной машины
4. Замешивание: 3 мин с помощью тестомесильной машины с Z-образными лопастями при 63 об/мин
5. Тесто выдерживали в течение 10 минут при 30°C в расстойной камере
6. Каждый хлеб весом 200 г формовали и переносили в формы для выпечки

7. Расстойку осуществляли 75 мин при 30°C в расстоечной камере (с относительной влажностью 90%).
8. Хлеб выпекали в течение 5 мин (230°C сверху, 200°C снизу) и подвергали воздействию пара объемом 0,5 л
9. Хлеб выпекали в течение 7 минут (200°C сверху, 200°C снизу)
10. Хлеб выпекали в течение 7 минут (200°C сверху, 200°C снизу)
11. Хлеб охлаждали и хранили при комнатной температуре
12. Оценивали хлеб

Определение структуры мякиша

Твердость мякиша анализировали с помощью анализатора текстуры (TVT 300 XR, TexVol Instruments AB, Вика, Швеция) в соответствии с международным способом, одобренным ААСС в 2011 г.

Эксперименты по выпеканию проводили в двух повторностях и продемонстрировали увеличение объема ржаного хлеба с доведенным рН, как показано на фигуре 5. По сравнению с контрольным экспериментом по выпеканию без фермента структура мякиша была значительно улучшена. На фигуре 6 показано, что применение фермента под SEQ ID NO 6 значительно снижало твердость мякиша хлеба.

Пример 10: влияние ферментов с аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6 на ржано-пшеничный хлеб при различных соотношениях муки

Согласно другому рецепту выпечки 3, включающему доведение рН, тестировали влияние ферментов с аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6 при 0,3 ppm на объем ржано-пшеничного хлеба и мякиша.

Рецепт выпечки 3

Ржаная мука, тип 997: 70%, 50% и 30%

Пшеничная мука Radboud: 30%, 50% и 70%

Соль: 1,8%

Спрессованные дрожжи: 3,5%

Аскорбиновая кислота: 25 ppm

Лимонная кислота: 0,3%

Пропионат кальция: 0,1%

Вода: 65%

Процедура

1. Определение количества ингредиентов, добавление муки, дрожжей, соли и 0,3 ppm фермента
2. Доведение температуры воды для достижения температуры теста 30°C после смешивания, определения количества и добавления воды в дежу тестомесильной машины
4. Замешивание: 3 мин с помощью тестомесильной машины с Z-образными лопастями при 63 об/мин
5. Тесто выдерживали в течение 15 мин при 33°C в расстоечной камере (с относительной влажностью 80%).
6. Каждый хлеб весом 750 г формовали и переносили в формы для выпечки.
7. Расстойку осуществляли 30 мин при 33 °C в расстоечной камере (с относительной влажностью 80%).
8. Хлеб выпекали в течение 30 мин при 225°C
9. Хлеб охлаждали и хранили при комнатной температуре
10. Оценивали хлеб

Увеличение удельного объема в процентах определяли как удельный объем хлеба с ферментом (мл/г), деленный на удельный объем стандарта (мл/г), умноженный на 100.

Таблица 1. Увеличение удельного объема ржано-пшеничного хлеба и твердости мякиша через 1 день и 6 дней после выпекания с добавлением ксиланаз

Фермент	Ржаная мука	Пшеничная мука	Увеличение удельного объема [%]	Твердость мякиша после выпекания [N]	
				День 1	День 6
стандарт	70	30	100	1604	2795
SEQ ID NO: 6	70	30	110	1307	2131
SEQ ID NO: 2	70	30	118	1010	1406
стандарт	50	50	100	1237	1965
SEQ ID NO: 6	50	50	114	730	1239
SEQ ID NO: 2	50	50	122	661	1490
стандарт	30	70	100	868	1481
SEQ ID NO: 6	30	70	110	690	1107
SEQ ID NO: 2	30	70	115	714	1381

Обе ксиланазы под SEQ ID NO: 2 и под SEQ ID NO: 6 были способны увеличивать удельный объем ржано-пшеничного хлеба и в значительной степени снижать твердость мякиша через 1 и 6 дней после выпекания по сравнению с хлебом без добавления ферментов.

Пример 11: влияние фермента под SEQ ID NO: 6 на ржано-пшеничное тесто при различных соотношениях муки

Исследовали влияние ферментов под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 и Pentopan mono BG на различные качества теста. Тесто получали в соответствии с рецептом теста 3 или 4 и анализировали как описано ниже.

Рецепт теста 3

Ржаная мука 100% тип 1150

Сухие быстрорастворимые дрожжи 1,8% (вид: *S. cerevisiae*) (в пересчете на количество муки)

дрожжи 1,8% (вид: *S. cerevisiae*)

Соль	1,8%	(в пересчете на количество муки)
Вода	70%	(в пересчете на количество муки)
Фермент:	SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или Pentopan mono BG добавляли в концентрациях без фермента при 0,17 ppm (в пересчете на количество муки)	

Рецепт теста 4

Ржаная мука	10% и 70%	тип 1150
Пшеничная мука	90% и 70%	тип 550
Сухие быстрорастворимые дрожжи 1,8% (вид: <i>S. cerevisiae</i>)		(в пересчете на количество муки)
Соль	1,8%	(в пересчете на количество муки)
Вода	57%	(в пересчете на количество муки)

В соответствии со способом 54-21.02 Американской ассоциации специалистов по химии зерновых культур (AACC) для получения ржано-пшеничного теста в соотношениях 100%:0%, 70%:30% и 10%:90% применяли тестомесильную машину с Z-образными лопастями и измерением крутящего момента (doughLAB; Perten Instruments, Германия) с применением коммерческой ржаной муки типа 1150 и пшеничной муки типа 550 (Rosenmühle, Ландсхут, Германия). К 100 частям смеси муки (содержание влаги скорректировано до 14,00 г/100 г муки) добавляли 70,0 частей деминерализованной воды и 0,17 ppm ксиланазы под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 и Pentopan mono BG. Затем осуществляли замешивание в течение 153 с при 63 об/мин и 30°C.

К 100 частям смеси муки (содержание влаги скорректировано до 14,00 г/100 г муки) добавляли 57,0 частей деминерализованной воды и 0,01 ppm ксиланазы или добавляли 0,01 ppm ксиланазы под SEQ ID NO: 2 к смесям ржано-пшеничной муки. Затем осуществляли замешивание в течение 153 с при 63 об/мин и 30°C.

Способы

1. Свойства замешивания, определенные с помощью тестомесильной машины с Z-образными лопастями

В соответствии с упомянутым способом 54-21.02 ААСС для определения стабильности теста применяли тестомесильную машину с Z-образными лопастями и измерением крутящего момента (doughLAB; Perten Instruments, Германия), которая описывает период времени между превышением линии 500 FU и первым падением ниже 500 FU и предоставляет информацию о технологичности теста. Все измерения проводили по меньшей мере посредством двойной идентификации.

Как показано на фиг. 7, добавление ксиланазы под SEQ ID NO: 2 или под SEQ ID NO: 6 вызывает повышение стабильности теста в ходе замешивания ржаного теста, в то время как коммерческая ксиланаза GH11 Pentopan mono не вызывает такого повышения. Это позволяет улучшить технологичность теста только с ржаной мукой. При применении различных количеств ксиланазы под SEQ ID NO: 2 с различными соотношениями ржано-пшеничной муки (70%:30% (А) или 10%:90% (В)) также улучшалась стабильность теста в ходе замешивания, как показано на фиг. 8. Повышение стабильности теста в ходе замешивания улучшает надежность способа и технологичность разновидностей ржано-пшеничного теста в ходе (промышленного) хлебопекарного производства.

2. Определение клейкости теста с помощью ячейки для определения клейкости теста Чена-Хосни

Анализ клейкости теста проводили с применением анализатора текстуры Та.ХТ plus (Stable Micro Systems Ltd., Годалминг, Соединенное Королевство), оснащенного установкой для определения клейкости теста, как описано Ченом и Хосни (1995). Клейкость (g) теста измеряли на кусочке теста, экструдированного через решетку в цилиндр из полированного плексигласа (с диаметром 25 мм). Тесто помещали в ячейку после замешивания и выдерживали в течение 5 минут при комнатной температуре. Образец теста спрессовывали цилиндром со скоростью 0,5 мм/с, прилагаемым усилием 40 g и временем контакта 0,10 с; затем цилиндр возвращается на 4 мм со скоростью 10 мм/с. Все измерения проводили посредством двойной идентификации.

Как показано на фиг. 9, при увеличении количества ксиланазы под SEQ ID NO: 6 клейкость теста значительно снижается, что свидетельствует об улучшении ручной обработки и механической обработки теста с долей ржаной муки, составляющей 30%.

3. Определение свойств удлинения с помощью установки для определения растяжимости SMS/Kieffer

Одноосное удлинение анализировали с применением установки для определения растяжимости SMS/Kieffer для анализатора текстуры Та.XT plus (Stable Micro Systems Ltd., Годалминг, Соединенное Королевство). С этой целью каждый образец теста помещали на пластину для образцов Kieffer. Через 40 минут уравнивания при 30°C регистрировали максимальное пиковое усилие (сопротивляемость растяжению ($R_{\text{Макс}}$)) для десяти тяжей каждого образца теста. Настройки для проведения теста были следующими: скорость до проведения теста: 2,00 мм/с; скорость во время теста: 3,3 мм/с; скорость после теста: 10,0 мм/с; расстояние: 75 мм; усилие срабатывания: 5,0 g. Все измерения проводили посредством двойной идентификации.

Как показано на фиг. 10, при увеличении количества ксиланазы под SEQ ID NO 6 сопротивляемость теста растяжению значительно снижается, что улучшает разрыхляемость теста в ходе ферментации и позволяет достигать более высоких значений объема хлеба с применением теста, характеризующегося всеми протестированными долями ржаной муки, составляющими 10% (A), 30% (B) и 70% (C).

Перечень литературы

AACC International, 2011; AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed. Method 74-10.02. Measurement of Bread Firmness—Compression Test. January 6, 2011. AACC International: St. Paul, MN, U.S.A.

AACC International, 2011; AACC International. Approved methods of analysis, 11th ed. Method 54-21.02. Measurement of Bread Firmness—Compression Test. January 6, 2011. AACC International: St. Paul, MN, U.S.A.

Adelsberger, H., Hertel, C., Glawischnig, E., Zverlov, V.V., Schwarz, W.H., 2004. Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the in vivo system from recombinant enzymes. *Microbiology* 150 (7), 2257–2266.

Biely, P., Singh, S., Puchart, V., 2016. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. *Biotechnol. Adv.* 34 (7), 1260–1274.

Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D., 1997. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of biotechnology* 57 (1-3), 151–166.

Bouraoui, H., Desrousseaux, M.-L., Ioannou, E., Alvira, P., Manai, M., Remond, C., Dumon, C., Fernandez-Fuentes, N., O'Donohue, M.J., 2016. The GH51 alpha-L-arabinofuranosidase from *Paenibacillus* sp. THS1 is multifunctional, hydrolyzing main-chain and side-chain glycosidic bonds in heteroxylans. *Biotechnology for biofuels* 9, 140.

Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer A., Noll, T. and Eggert T., 2006, Systematic Screening of All Signal Peptides from *Bacillus subtilis*: A Powerful Strategy in Optimizing Heterologous Protein Secretion in Gram-positive Bacteria, *Journal of Molecular Biology*. Volume 362, Issue 3, Pages 393-402.

Chen, W. Z. and Hosene, R.C., 1995. Development of an Objective Method for Dough Stickiness, In *LWT - Food Science and Technology*, Volume 28, Issue 5, Pages 467-473.

Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 3-23.

Courtin, C. M. and Delcour, J. A., 2002. Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread-making. *Journal of Cereal Science* 35 (2002) 225–243.

Courtin, C. M. Roelants, A. Delcour, J. A., 1999. Reconstitution Experiments Provide Insight into the Role of Endoxylanases in Bread-Making, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (5), 1870-1877.

De Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M., 1983. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl Aca. Sci. USA* 80: 21-25.

Dervilly, G., Leclercq, C., Zimmermann, D., Roue, C., Thibault, J.F., Saulnier, L., Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt, *Carbohydr. Polym.* 47 (2002) 143–149

Döring, C., Nuber, C., Stukenborg, F., Jekle, M., Becker, T., 2015. Impact of arabinoxylan addition on protein microstructure formation in wheat and rye dough, *Journal of Food Engineering*, Volume 154, 2015, Page 10-16

Döring, C., Hussein, M. A., Jekle, M., Becker, T., 2017. On the assessments of arabinoxylan localization and enzymatic modifications for enhanced protein networking and its structural impact on rye dough and bread, In Food Chemistry, Volume 229, Pages 178-187.

Döring C., Grossmann, I., Roth, M., Jekle, M., Koehler, P., Becker, T., 2017. Effect of rye bran particles on structure formation properties of rye dough and bread. Food Processing and Preservation. Journal of Food Processing and Preservation. Volume 41, Issue 4.

Dornez, E., Verjans, P., Arnaut, F., Delcour, J. A., Courtin, C. M., 2011. Use of Psychrophilic Xylanases Provides Insight into the Xylanase Functionality in Bread Making, J. Agric. Food Chem. 59 (17), Page 9553-9562

Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J.M., 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. Mol Cell Biol. Dec; 5 (12):3610-6.

Gems, D., Johnstone, I. L. and Clutterbuck, A. J., 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. Gene. Feb 1; 98 (1):61-7.

Guo and Sherman, 1995. *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

Izydorczyk, M. S., Biliaderis, C. G., 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. Carbohydr. Polym., 28, 33–48.

Johnson, E.A., Sakajoh, M., Halliwell, G., Madia, A., Demain, A. L., 1982. Saccharification of Complex Cellulosic Substrates by the Cellulase System from *Clostridium thermocellum* Appl. Environ. Microbiol. 43(5), 1125–1132.

Knudsen, K. E. B., 2014. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. Poultry Science 93: 2380–2393.

Koeck, D.E., Mechelke, M., Zverlov, V.V., Liebl, W., Schwarz, W.H., 2016. *Herbivorax saccincola* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic, anaerobic, thermophilic bacterium isolated via in sacco enrichments from a lab scale biogas reactor. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiolog. 66: 4458-4463.

Kolenová, K., Vršanská, M., Biely, P., 2006. Mode of endo- β , 4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. Journal of Biotechnology, 121:338-345.

Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth K., Sanders, E. A., Deckwer, W.D., 1995. Simple fed-batch

technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 39:59-65.

Kroll, J., Steinle, A., Reichelt, R., Ewering, C. and Steinbüchel, A., 2009. Establishment of a novel anabolism-based addiction system with an artificially introduced mevalonate pathway: Complete stabilization of plasmids as universal application in white biotechnology. *Metabolic Engineering* 11: 168–177.

Larson, S. B., Day, J., Barba de la Rosa, A. P., Keen, N. T., McPherson, A., 2003. First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis. *Biochemistry*, 42: 8411-8422.

Lin-Cereghino, J., Won, W. W., Xiong, S., Gian, W., Luong, L.T., Vu, J., Johnson, S.D. and Lin-Cereghino G.P., 2005. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques*. 38(1):44, 46, 48.

Lombard V., Golaconda R.H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B., 2014. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490–D495. [PMID: 24270786].

Meuser, F., Suckow, P., 1986. Non-starch polysaccharides. In *Chemistry and Physics of Baking*; Blanchard, J. M. V., Frazier, P. J., Galliard, T., Eds.; The Royal Society of Chemistry: London, U.K; pp 42–61.

Oloffs K, Jeroch H, Schöner FJ., 1999. Efficacy of non-starch polysaccharide hydrolyzing enzymes on nutrient digestibility and gross energy convertibility of barley-rye and wheat-rye based diets for laying hens. *Arch Tierernähr.*; 52(2):155-65.

Park, Y.S., Kai, K., Iijima, S., Kobayashi, T., 1991. Enhanced β -Galactosidase Production by High Cell-Density Culture of Recombinant *Bacillus subtilis* with Glucose Concentration control). *Biotechnol Bioeng.* 40(6), 686-696.

Romanos, M. A., Scorer, C. A. and Jeffrey, J. C., 1992. Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *YEAST VOL.* 8: 423-488.

Sambrook, J, Russell, D. W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd edition. Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis. T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Simonen, M. and Palva, I., 1993. Protein secretion in *Bacillus* вид. *Microbiological Reviews* 57:

109-137.

Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, S. P., Chick, W. L., Gilbert, W., 1978. A bacterial clone synthesizing proinsulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731.

Wenche Frølich, W., Aman, P. and Inge Tetens, T., 2013. Whole grain foods and health a Scandinavian perspective. *Food & Nutrition Research*, 57.

Wilson, I. A., Niman, H. L., Houghten, R. A., Cherenon, A. R., Conolly, M. L., Lerner, R. A., 1984. The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell.* ; 37(3):767-78.

Wood, T. M., Bhat, K. M., 1988. Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*. 160: Academic Press, 87-112.

Yin, Y.B., Mao, X.Z., Yang, J.C., Chen, X., Mao, F.L., Xu, Y., 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res* 40, W445-W451.

Формула изобретения

1. Способ получения пищевого продукта, содержащего рожь, причем указанная рожь содержит арабиноксилан, и указанный способ включает стадии:

получения первичной пищевой смеси;

добавления к указанной первичной пищевой смеси композиции, содержащей по меньшей мере один фермент семейства 10 гликозидгидролаз (GH10); и

обработки указанной первичной пищевой смеси с получением указанного пищевого продукта, содержащего рожь;

где добавление указанного по меньшей мере одного фермента GH10 приводит к улучшению теста.

2. Способ по п. 1, где указанный по меньшей мере один фермент GH10 обладает гемицеллюлолитической активностью, предпочтительно ксиланолитической активностью.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где указанная обработка означает обработку указанной первичной пищевой смеси посредством нагревания, например, выпекания, варки на пару, варки или нагревания иным образом.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанную композицию, содержащую по меньшей мере один фермент GH10, добавляют во время смешивания и/или перемешивания первичной пищевой смеси.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанная композиция, содержащая по меньшей мере один фермент GH10, дополнительно содержит другое средство, которое выбрано из группы, состоящей из других ферментов, гидроколлоидов, эмульгаторов, окислителей, жиров и липидов, ароматизаторов, (поли)сахаридов, белков, солей и кислот, разрыхлителей теста, молочных и сырных продуктов или их смеси.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанный по меньшей мере один фермент GH10 добавляют к указанной первичной пищевой смеси в форме, выбранной

из группы, состоящей из клеточного экстракта, бесклеточного экстракта, частично очищенного белка и очищенного белка.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанная композиция, содержащая по меньшей мере один фермент GH10, дополнительно содержит носитель фермента и необязательно стабилизатор, и/или консервант, и/или другое средство, выбранное из сухих разбавителей, наполнителей, связующих веществ, веществ, маскирующих запах, блокаторов горького вкуса и усилителей активности.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанный по меньшей мере один фермент GH10 выделяют из микроорганизма.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанный по меньшей мере один фермент GH10 представляет собой рекомбинантный фермент.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где улучшение теста означает улучшение обработки теста таким образом, что повышается стабильность теста, снижается сопротивляемость теста растяжению, снижается клейкость и/или улучшается качество конечных пищевых продуктов таким образом, что конечные пищевые продукты демонстрируют менее плотную структуру, повышенную мягкость, увеличение объема, однородное распределение пор и/или более мягкую структуру мякиша.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, где улучшение теста означает повышение стабильности теста в диапазоне 115-225%, снижение сопротивляемости теста растяжению в диапазоне 9-30%, снижение клейкости теста в диапазоне 8-18%, снижение твердости мякиша в диапазоне 18-49% и/или увеличение объема в диапазоне 108-122% по сравнению с тестом, обработанным без фермента GH10 по настоящему изобретению.

12. Применение фермента GH10 для получения пищевых продуктов, содержащих арабиноксилан.

13. Способ или применение по любому из предыдущих пунктов, где указанный фермент GH10 содержит полипептид, который характеризуется по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом, выбранным из

SEQ ID NO: 1-6, и который демонстрирует гемицеллюлолитическую активность, или состоит из него.

14. Фермент GH10 с гемицеллюлолитической активностью, который содержит полипептид, который характеризуется по меньшей мере 75% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом в соответствии с SEQ ID NO 4-6, или состоит из него, при условии, что фермент GH10 не представляет собой полипептид под SEQ ID NO: 1, 2 или полипептид под SEQ ID NO: 3.

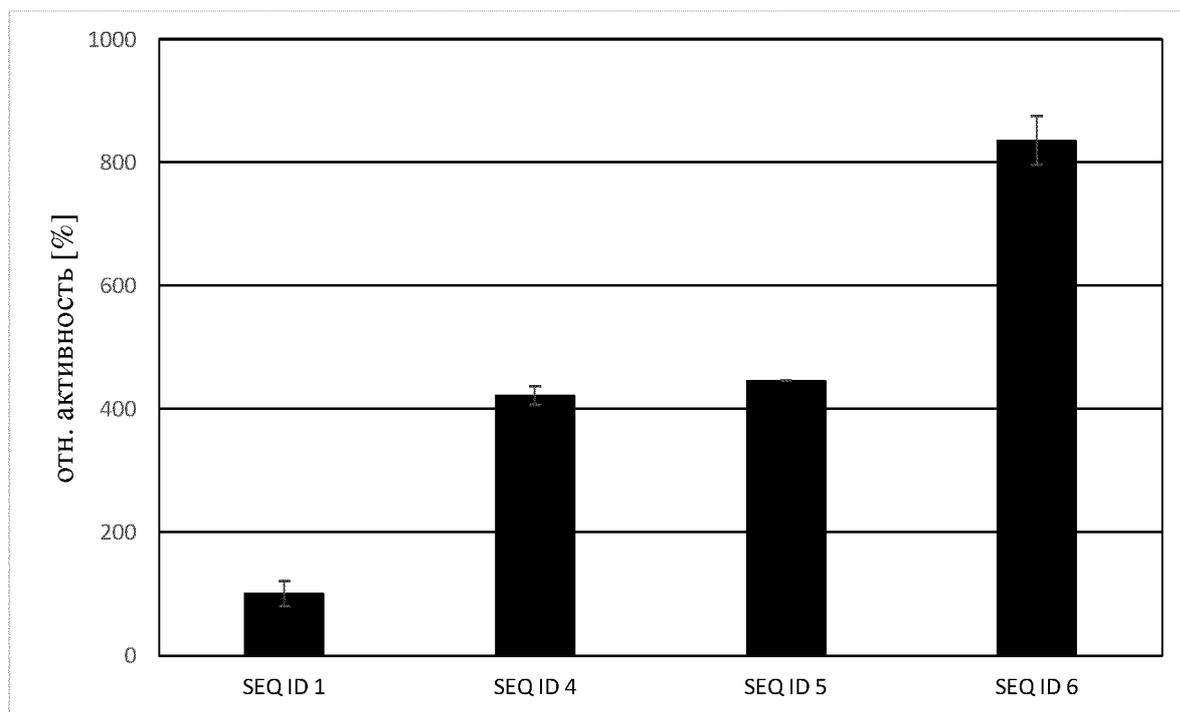
15. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент GH10 по п. 14, или состоящая из нее.

16. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 15.

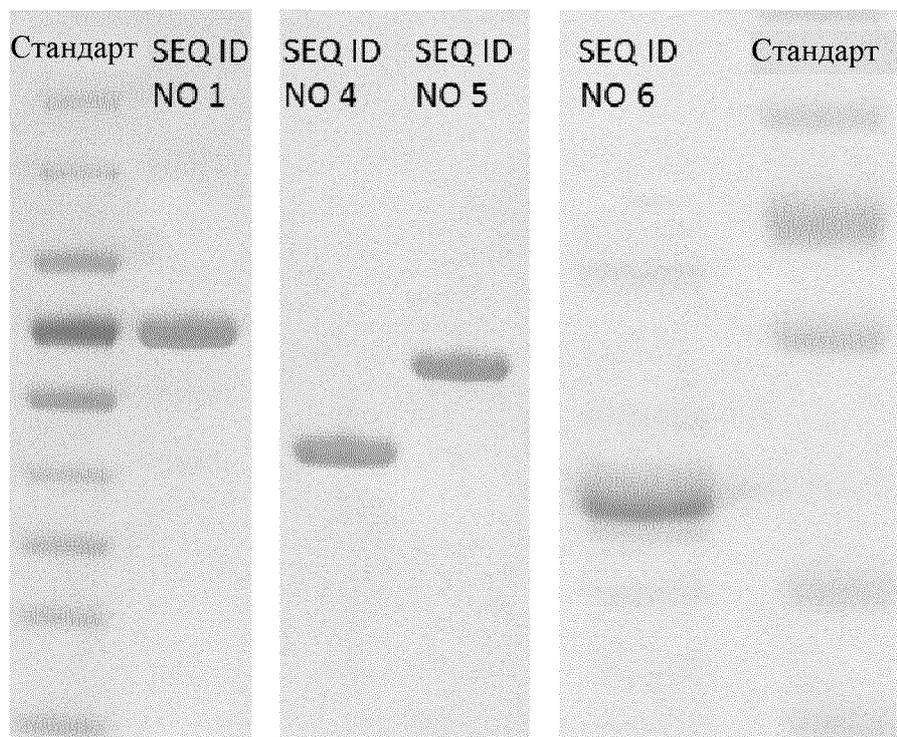
17. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 15 или вектор экспрессии по п. 16, где указанная клетка-хозяин экспрессирует фермент GH10 по п. 14.

18. Способ получения фермента GH10 по п. 15, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина по п. 17 в условиях, обеспечивающих возможность продуцирования фермента, и выделение фермента из культуры.

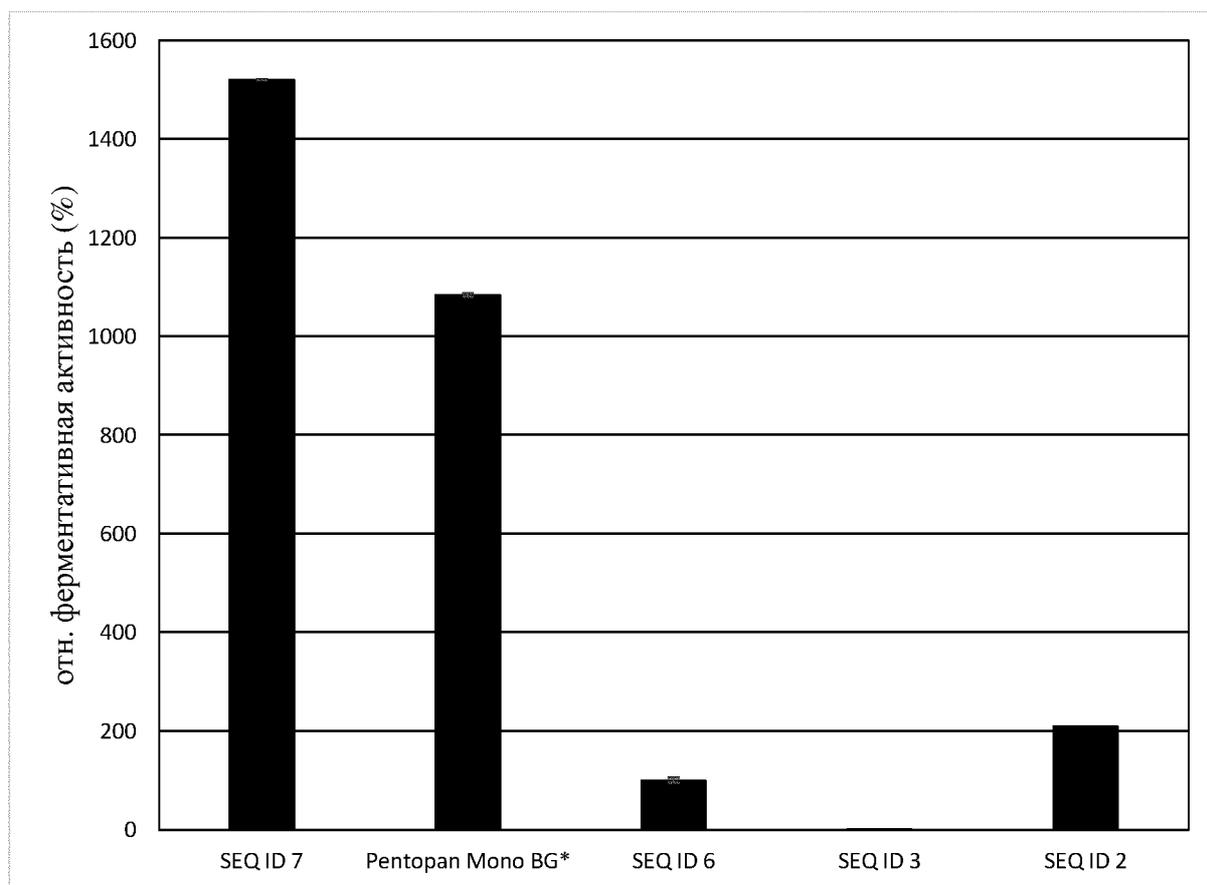
Фиг. 1



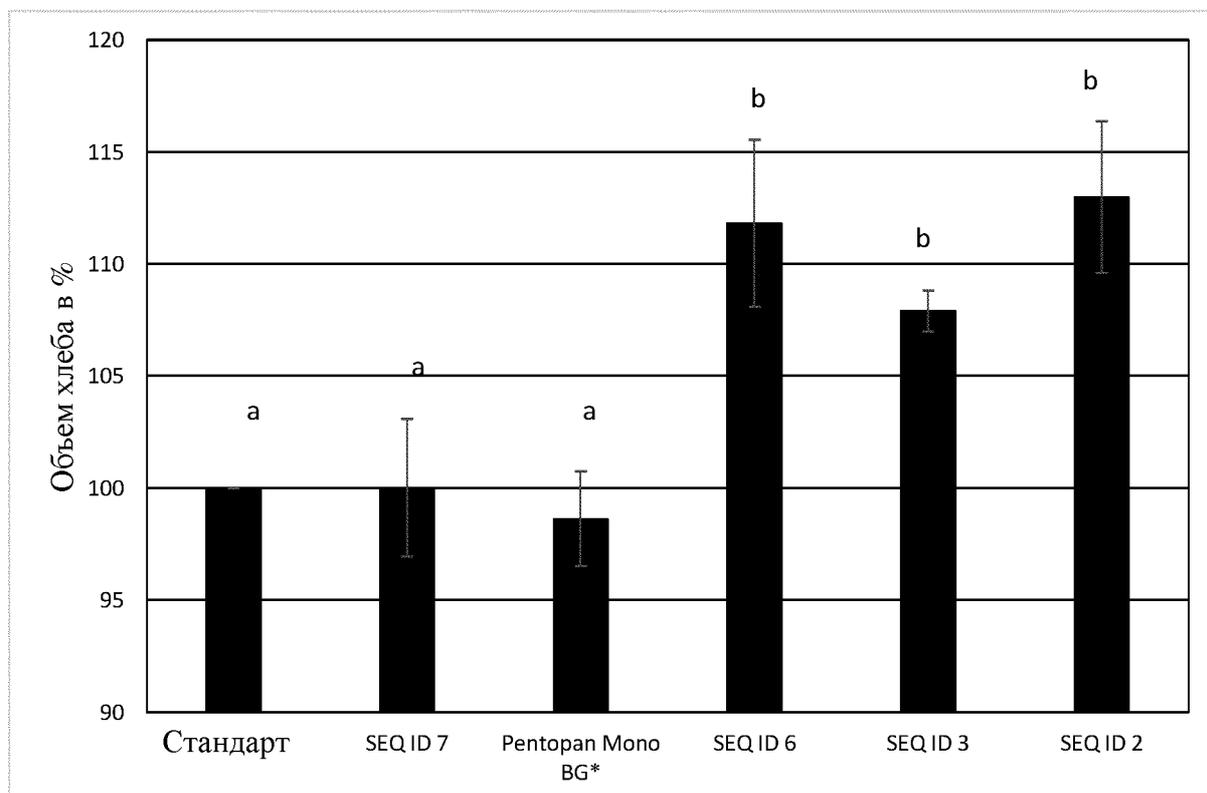
Фиг. 2



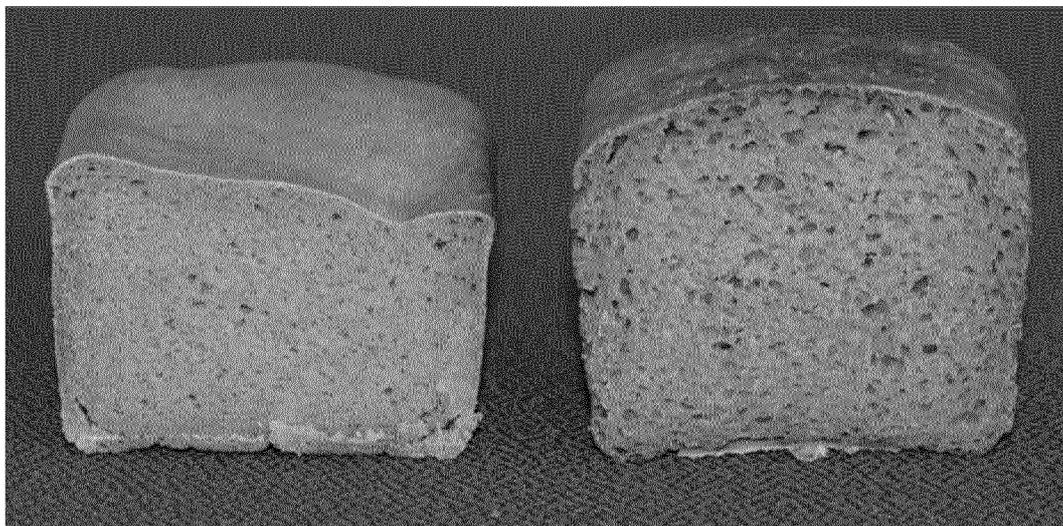
Фиг. 3



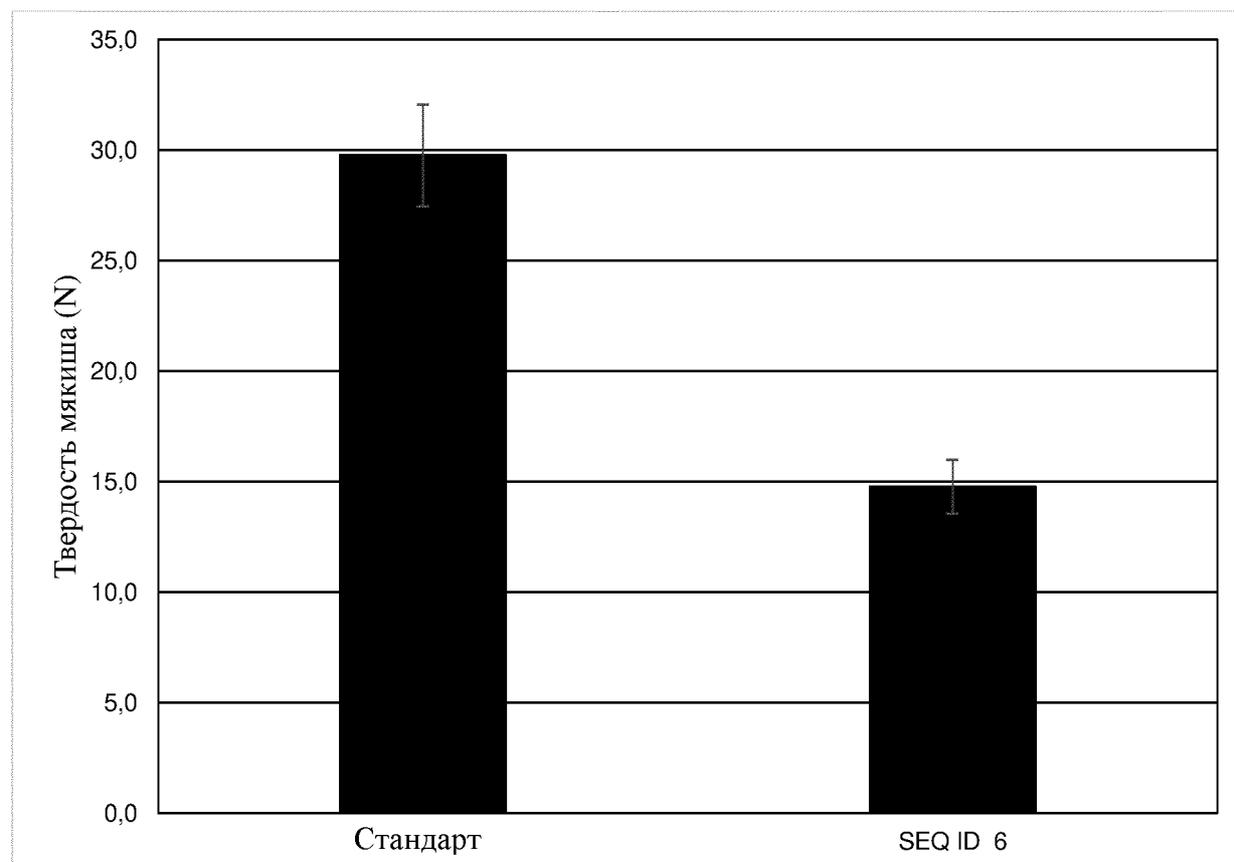
Фиг. 4



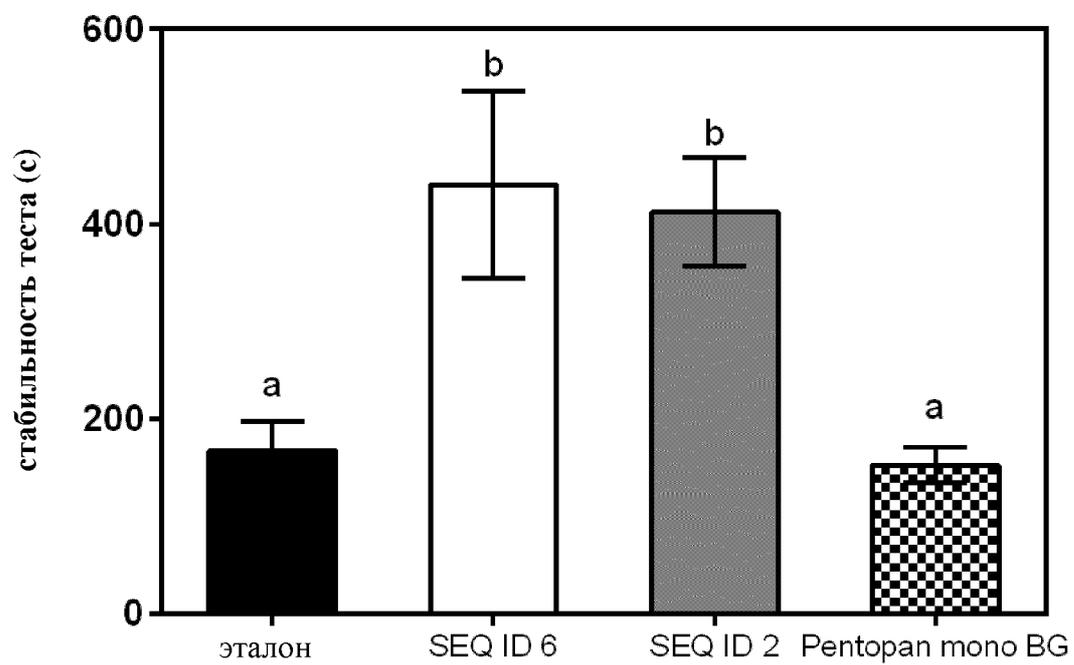
Фиг. 5



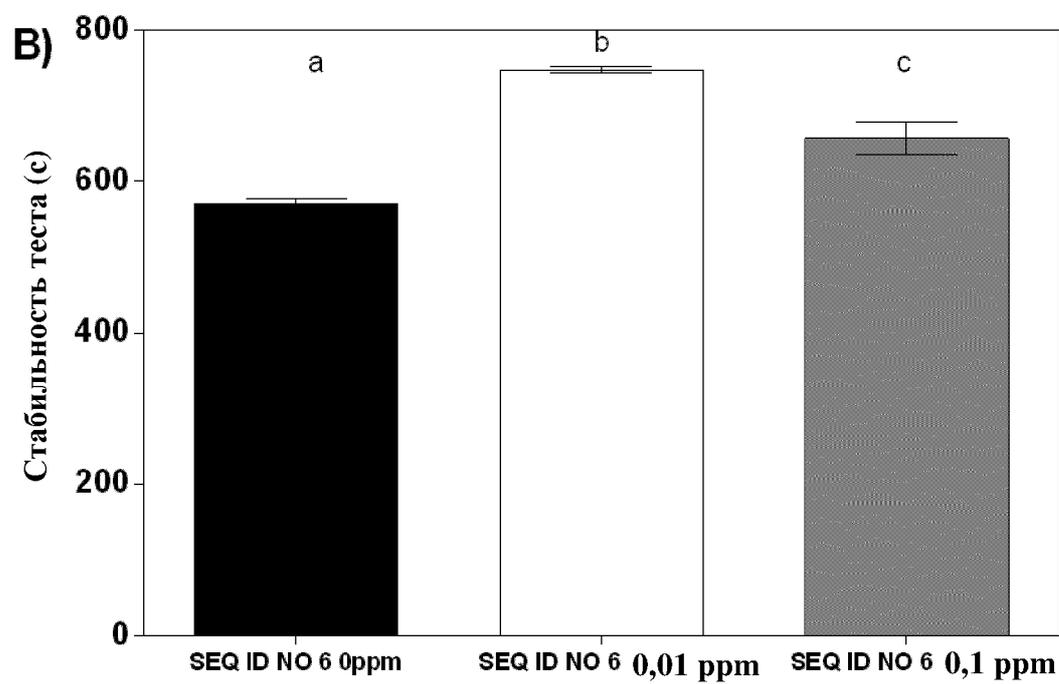
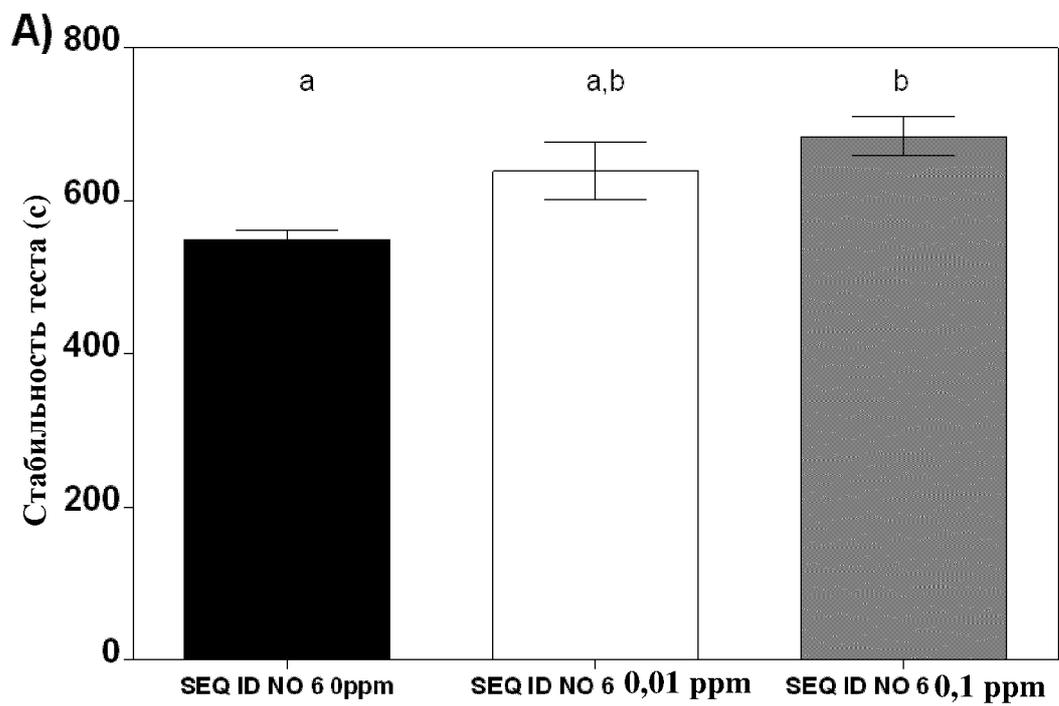
Фиг. 6



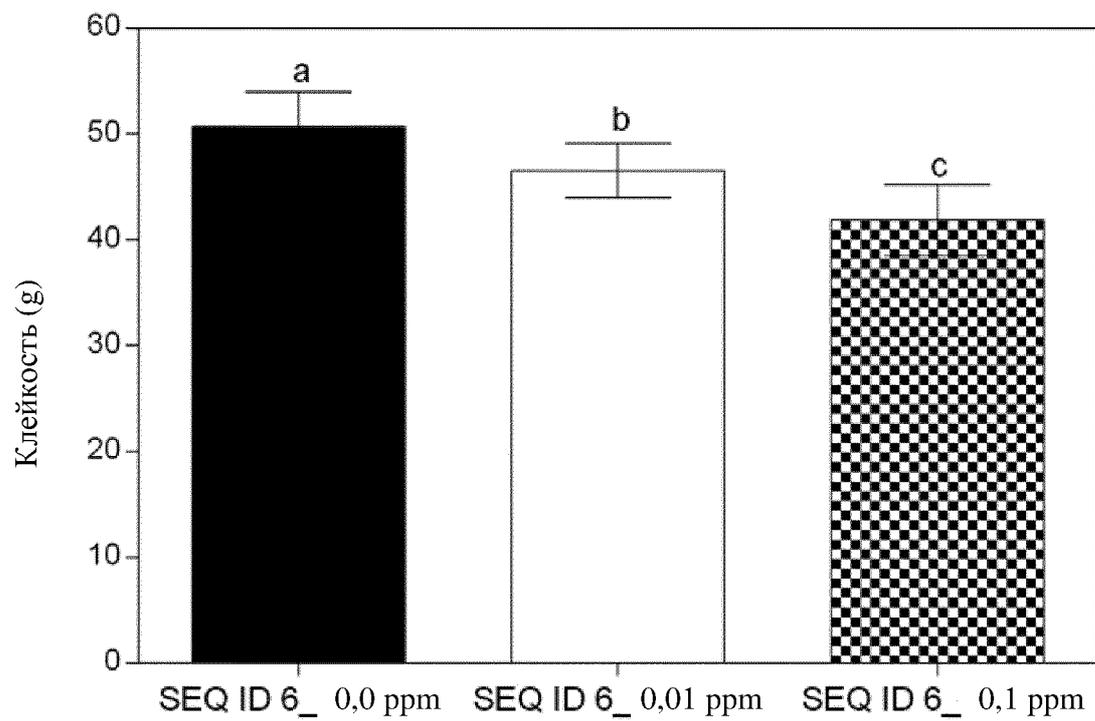
Фиг. 7



Фиг. 8

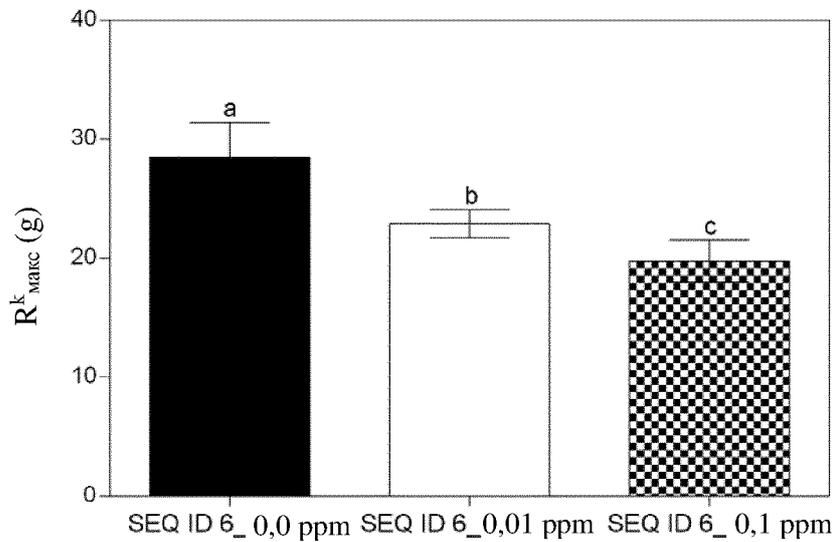


Фиг. 9

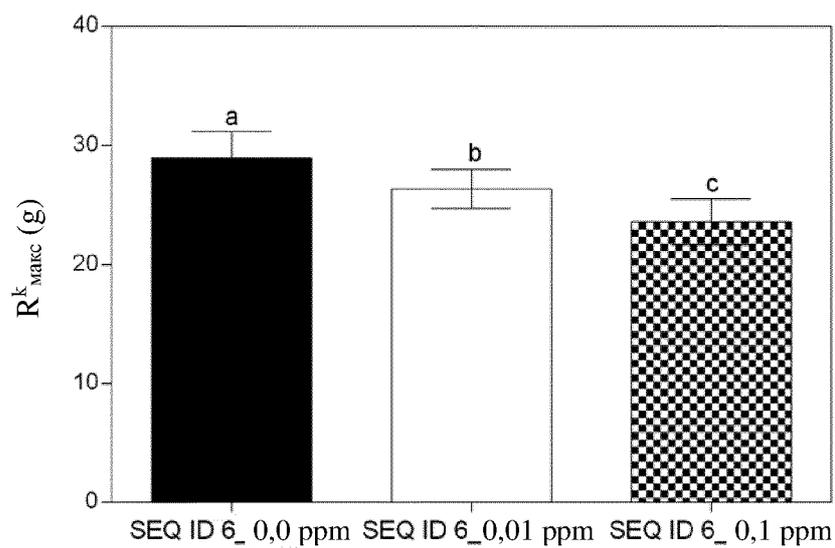


Фиг. 10

A)



B)



C)

