



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.10

(21) Номер заявки
201401209

(22) Дата подачи заявки
2013.05.03

(51) Int. Cl. *C12N 9/64* (2006.01)
A23C 19/04 (2006.01)

(54) ВАРИАНТЫ ХИМОЗИНА ВЕРБЛЮДА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЫРА

(31) 12166673.9; 61/642,095; 12199277.0;
12199178.0; 61/745,063

(32) 2012.05.03; 2012.05.03; 2012.12.21;
2012.12.21; 2012.12.21

(33) EP; US; EP; EP; US

(43) 2015.05.29

(86) PCT/EP2013/059317

(87) WO 2013/164481 2013.11.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДСМ АйПи АССТЕС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Деккер Петрус Якобус Теодорус, Йонг
Де Рене Марсель, Табелинг Михаэль
Деннис, Мейлвейк Корнелис Маринус
(NL)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2008098973
JUNKO SUZUKI ET AL.: "Site-directed
mutagenesis reveals functional contribution of Thr218,
Lys220 and Asp304 in chymosin", PROTEIN
ENGINEERING, vol. 4, no. 1, 1 October 1990
(1990-10-01), pages 69-71, XP001318411, DOI: 10.1093/
PROTEIN/4.1.69, the whole document

JUNKO SUZUKI ET AL.: "ALTERATION
OF CATALYTIC PROPERTIES OF CHYMOSIN
BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS", PROTEIN
ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS,
SURREY, GB, vol. 2, no. 7, 1 May 1989 (1989-05-01),
pages 563-569, XP000009488, ISSN: 0269-2139, the whole
document

SUPANNEE CHITPINITYOL ET AL.: "Site-
specific mutations of calf chymosin B which influence
milk-clotting activity", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER
LTD, NL, vol. 62, no. 2, 1 June 1998 (1998-06-01), pages
133-139, XP002685255, ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/
S0308-8146(97)00204-5, the whole document

MOLLER KIRSTEN KASTBERG ET AL.: "Camel
and Bovine Chymosin Hydrolysis of Bovine alpha(S1)-
and beta-Caseins Studied by Comparative Peptide
Mapping", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD
CHEMISTRY, vol. 60, no. 45, 4 October 2012 (2012-10-04),
pages 11421-11432, XP055063786, cited in the application,
the whole document

BANSAL N. ET AL.: "Suitability of recombinant
camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for
Cheddar cheese", INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL,
ELSEVIER APPLIED SCIENCE, BARKING, GB, vol.
19, no. 9, 1 September 2009 (2009-09-01), pages
510-517, XP026152366, ISSN: 0958-6946, DOI: 10.1016/
J.IDAIRYJ.2009.03.010 [retrieved on 2009-04-16], cited in
the application, the whole document

CARLES C. ET AL.: "Kinetics of the action of
chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine alphas1-
casein", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM,
NL, vol. 185, no. 2, 17 June 1985 (1985-06-17),
pages 282-286, XP025603894, ISSN: 0014-5793, DOI:
10.1016/0014-5793(85)80923-6 [retrieved on 1985-06-17],
cited in the application, the whole document

MCSWEENEY P. L. ET AL.: "Proteolytic
specificity of chymosin on bovine alpha s1-casein",
JOURNAL OF DAIRY RESEARCH, CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 60, no. 3, 1
August 1993 (1993-08-01), pages 401-412, XP009099544,
ISSN: 0022-0299, the whole document

SUPANNEE CHITPINITYOL ET AL.: "Chymosin
and aspartic proteinases", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER
LTD, NL, vol. 61, no. 4, 1 April 1998 (1998-04-01),
pages 395-418, XP002685254, ISSN: 0308-8146, DOI:
10.1016/S0308-8146(97)00090-3, the whole document

(57) Изобретение относится к полипептиду, имеющему активность химозина, который является вариантом химозина верблюда и способен гидролизовать бычий альфа s1-казеин в положении F23F24 с более быстрым образованием as1-I CN (f24-199), чем верблюжий химозин дикого типа. Также изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей заявленный полипептид; содержащей ее нуклеотидной конструкции; содержащему ее вектору; содержащей его клетке-хозяину, которая может быть культивирована в способе получения заявленного полипептида. Изобретение также относится к применению заявленного полипептида для получения сыра, в частности, в составе композиции; соответствующему способу получения сыра и, собственно, полученному этим способом сыру.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к полипептиду, обладающему модифицированной активностью химозина. Изобретение также относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей такой полипептид, к рекомбинантному экспрессирующему вектору, нуклеотидной конструкции и к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей указанный экспрессирующий вектор. Кроме того, изобретение относится к способу получения модифицированного полипептида химозина посредством применения такой клетки-хозяина. Также изобретение относится к способу получения модифицированного полипептида химозина. Изобретение также относится к композиции, содержащей модифицированный химозин, к применению такого модифицированного химозина или композиции, содержащей модифицированный химозин, в способе приготовления сыра и к полученному сыру.

Предшествующий уровень техники

Большая часть глобальной сырной продукции используется в виде тертого или нарезанного сыра для применения на пицце, сырных бургерах и в других подходящих продуктах. Сыр, используемый для этой цели, как правило, молодой, когда имеет место неполное созревание. Типы сыров, используемые для данного применения, могут представлять собой моцареллу, монтерей джек или плавленый сыр или другие типы сыров, которые в промышленном масштабе тонко нарезаются или нарезаются стружкой и потребляются в виде молодых сыров.

Нарезка стружкой дает возможность более быстрого расплавления сыра по сравнению с другими способами уменьшения размера, такими как нарезка ломтиками и нарезка кубиками. Способность к нарезке стружкой представляет собой распространенный термин, который охватывает множество характеристик нарезанного стружкой сыра. Учитываются легкость, с которой брус сыра обрабатывается в измельчителе, размер и целостность частиц сыра (длина и толщина разреза, шероховатые или гладкие края), склонность частиц к сыпучести или слипанию друг с другом после нарезки стружкой, и склонность нарезанных частиц к рассыпанию на мелкую фракцию во время или после нарезки. Если сыр мягкий, пастообразный или плавленый, то измельчитель может забиться сыром. Нарезанный стружкой сыр может также давать на выходе куски с шероховатыми краями, большое количество мелкой фракции, клейкие сырные шарики и избыточное слипание сырных частиц. Напротив, если сыр слишком твердый и сухой, то полученные в результате частицы, как правило, разламываются на более мелкие частицы и мелкую фракцию.

В идеале куски сыра должны разрезаться единообразно и точно, что позволяет сыру плавиться легко и равномерно. Значительное внимание уделяется целостности частиц сыра в отношении единого размера и формы, поэтому критично, чтобы частицы сохраняли эти характеристики в процессе манипуляций, распределения и хранения. Значительный акцент придается количеству мелкой фракции, получаемой во время нарезки. Выработка мелкой фракции приводит к созданию отходов, чего желательно избежать при обработке сыра.

Нарезка сыра стружкой и нарезка сыра ломтиками проблематичны, если сыр слишком молодой, из-за высоких потерь продукта. В сыре моцарелла через одну или две недели после производства можно наблюдать некоторое количество свободной сыворотки при нарезании сыра ("watering-off"). Уменьшение количества выделяемой сыворотки в сыре моцарелла по мере его созревания часто приписывают увеличению гидратации белка, так как вода абсорбируется в матрице. По мере созревания сыра "watering-off" уменьшается и через одну-две недели выделяется лишь небольшое количество сыворотки при нарезке. Таким образом, нарезка стружкой или нарезка ломтиками до достижения данного момента будет приводить к огромным потерям на выходе.

Кроме того, сыру чеддер требуется около четырех недель созревания перед нарезкой стружкой, с добавлением стоимости хранения в холодильнике и разделки. Основные свойства, улучшаемые в данный период созревания, включают уменьшение количества крошек (мелкой фракции) и улучшение гладкости поверхности, среднего размера частицы и единообразия размера. В очень молодом сыре чеддер сырная матрица еще слишком твердая и ломкая, и слияние частиц коагулята ("сплетение нитей") не полное. Через несколько недель хранения сырная матрица смягчается и сыр можно использовать для нарезки стружкой и/или для нарезки ломтиками.

С другой стороны, продолжительное созревание часто приводит к размягчению структуры моцареллы. Экстенсивное созревание дает на выходе получение мягкой и тягучей консистенции и оказывает отрицательное воздействие на промышленный процесс нарезки стружкой или нарезки ломтиками, и приводит к потерям продуктивности из-за слипания кусков и прилипания сыра к поверхностям оборудования для нарезки.

Кроме того, в полутвердых сырах типа чеддера созревание приводит к повышенной липкости и клейкости. Таким образом, максимальное время хранения этих типов сыра перед промышленной обработкой с помощью нарезки стружкой или нарезки ломтиками часто ограничено.

На основе вышесказанного становится ясно, что эффективная нарезка стружкой и/или тонкая нарезка сыра в промышленном масштабе возможна только в течение конкретного периода времени, когда сыр имеет подходящую текстуру. Точный временной интервал, который может использоваться для этого, очень сильно зависит от типа сыра и условий хранения.

Для промышленного производства удобно, чтобы этот временной интервал был настолько широким насколько это возможно; т.е. нарезка стружкой/тонкая нарезка может начинаться настолько рано, насколько это возможно и может еще осуществляться на сырах, которые хранились в течение более продолжительного периода.

Как правило, считается, что созревание сыра инициируется коагулянт, который захватывается сгустком в процессе изготовления сыра. Коагулянты, используемые в настоящее время в промышленном производстве, также обладают, помимо их активности в отношении каппа-казеина в процессе свертывания молока, низкой активностью в отношении других казеинов, которые образуют часть сырной матрицы. Считается, что эта протеолитическая активность вовлечена как в раннее уплотнение нитей частиц чеддера, так и в уменьшение "watering-off" в моцарелле, а также в дальнейшее созревание и размягчение сырной матрицы при продолжительном хранении. Для предотвращения избыточного созревания общая протеолитическая активность коагулянта должна быть ниже по сравнению с молокосвертывающей активностью.

Данное свойство коагулянта может количественно оцениваться путем измерения соотношения C/P; молокосвертывающая активность, поделенная на общую протеолитическую активность.

Идеальным коагулянт для производства молодого сыра для промышленного применения является такой, который будет давать не только возможность продолжительного хранения, но также и возможность быстрой обработки на ранней стадии созревания без длительного хранения. Однако так как для возможности быстрой обработки требуется высокая протеолитическая активность, а для продолжительного хранения требуется низкая протеолитическая активность в отношении казеинового матрикса, то непонятно как эти два свойства могут быть объединены в одном коагулянте.

Сущность изобретения

Изобретение основано на идентификации коагулянта, который эффективно осуществляет первое расщепление альфа s1-казеина с образованием альфа s1-I-казеина, но который обладает низкой активностью для дальнейшего гидролиза казеина. С точки зрения данной комбинации свойств, коагулянт по изобретению представляет собой превосходный коагулянт для получения, в частности, молодых сыров в промышленном масштабе.

Коагулянт по изобретению приводит к быстрому раннему развитию в процессе созревания благодаря быстрому первому расщеплению альфа s1-казеина, но также приводит к возможности продолжительного хранения сыра благодаря высокому значению соотношения C/P.

Такой коагулянт не был описан ранее, так как все существующие коагулянты либо способствуют быстрому созреванию благодаря высокой протеолитической активности, либо обладают возможностями для увеличенного периода хранения благодаря низкой протеолитической активности. Эти свойства ранее не объединялись вместе в одном ферменте.

Таким образом, согласно изобретению предлагается полипептид, обладающий активностью химозина, и являющийся вариантом аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 химозина верблюда, причем вариант содержит одну или несколько замен аминокислотных остатков, локализованных в связывающем кармане S2, в положениях, соответствующих положениям 223, 288, 290, 295 или 297 при выравнивании относительно SEQ ID NO: 4, при этом указанные замены выбраны из F223C, F223D, F223E, F223L, F223M, F223N, F223Q, F223Y, F223I, Q288G, Q288H, Q288N, Q288R, Q288S, D290A, D290G, D290L, D290M, D290Q, D290S, D290T, L295F, L295I, L295K, L295M, L295R, L295T, L295Y, L295W, I297T и I297V, причем указанный вариант идентичен по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 4 и способен гидролизовать бычий альфа s1-казеин в положении F23F24 с более быстрым образованием первого фрагмента альфа-s1-казеина α s1-I CN (f24-199), чем верблюжий химозин дикого типа.

В изобретении также описаны

нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по изобретению;

нуклеотидная конструкция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению, функционально связанную с одной или несколькими регуляторными последовательностями, способными управлять экспрессией химозина в подходящей экспрессирующей клетке-хозяине;

рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий нуклеотидную конструкцию по изобретению;

рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор по изобретению;

способ получения полипептида по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, способствующих продуцированию химозина и выделению указанного полипептида;

композиция для получения сыра, содержащая полипептид по изобретению или полипептид, получаемый способом по изобретению;

применение полипептида по изобретению или композиции по изобретению при приготовлении сыра;

способ получения сыра, который включает добавление эффективного молокосвертывающего количества полипептида по изобретению или композиции по изобретению в молоко и проведение соответствующих дополнительных стадий изготовления сыра; и

сыр, получаемый способом по изобретению, который содержит полипептид по изобретению.

Описание фигур

На фиг. 1 представлена типичная кривая ТРА в течение анализа структуры (double bite compression test).

На фиг. 2 представлены результаты измерения твердости сыра чеддер, сделанные с использованием коагулянтов Вариант #74, "Maxiren" и "Chymax M". Представлены средние значения для индивидуальных сыров.

Краткое описание списка последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность последовательности гена прохимозина В дикого типа из *Bos taurus*, кодоны которого были адаптированы для экспрессии в *K. lactis* и линкерами для клонирования в pKLAC1.

SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность зрелого химозина В из *Bos taurus*.

SEQ ID NO: 3 представляет последовательность нуклеиновой кислоты про-химозина из *Camelus dromedarius* с кодоновой адаптацией для экспрессии в *K. lactis*.

SEQ ID NO: 4 представляет аминокислотную последовательность зрелого химозина из *Camelus dromedarius*.

SEQ ID NO: 5 представляет аминокислотную последовательность альфа-s1-казеина из *Bos Taurus*.

Подробное описание изобретения

Во всем настоящем описании и в сопровождающих пунктах формулы изобретения слова "содержать", "включать" и "иметь" и вариации, такие как "содержит", "содержащий", "включает" и "включающий" должны толковаться включительно. Т.е. эти слова призваны передать идею возможного включения других элементов или целых специально не перечисленных, где позволяет контекст.

В данном документе слова, употребляемые в единственном числе, также включают и множественное число. К примеру, элемент может обозначать один элемент или больше одного элемента.

Изобретение относится к вариантным коагулянтам, конкретно к вариантам полипептида химозина. Вариант изобретения, как правило, будет сохранять активность химозина. Иначе говоря, вариант изобретения, как правило, будет обладать активностью аспарагиновой протеазы. Вариант по изобретению соответствует такому, который, как правило, способен свертывать молоко и который может использоваться в приготовлении пищевого продукта, такого как сыр.

Вариант по изобретению будет, как правило, демонстрировать улучшенные свойства по сравнению с эталонным полипептидом химозина, из которого он выделен, как правило, с эталонным полипептидом дикого типа. Такое улучшенное свойство относится, как правило, к такому, которое является релевантным, если вариант будет использоваться, как представлено ниже, например, в способе приготовления сыра.

Здесь, "химозин", как правило, служит для обозначения аспарагиновой протеазы, группы 3.4.23.4, согласно Номенклатуре Ферментов, 1992 г., Международного Союза Биохимии и Молекулярной Биологии, IUBMB. Химозин в природе продуцируется главными клетками слизистой оболочки желудка у ювенильных млекопитающих. Химозин является основным ферментативным компонентом сычужного фермента. Телячий сычужный фермент получают из выстилки сычуга (четвертый и конечный отдел желудка) молодых, не отлученных от матери телят.

Прохимозин в контексте настоящего изобретения следует понимать как предшественник или профермент химозина. По-видимому, прохимозин обладает лидерной последовательностью (про-часть) в N-концевой области химозина, и считается, что указанная лидерная последовательность отщепляется во время активации прохимозина. Кроме того, в данном контексте, препрохимозин состоит из прохимозина, к N-концу которого добавлена гидрофобная лидерная последовательность. Данная лидерная последовательность, также называемая сигналом секреции или пре-часть, отщепляется при секреции белка. Хемозин в клетке исходно синтезируется в виде препрохимозина (Harris et al, Nucleic acid Research 1982, April 10, 2177-2187 Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin).

Изобретение относится к новому варианту коагулянта, т.е. к варианту химозина, который эффективно осуществляет первое расщепление альфа-s1-казеина с образованием альфа-s1-I-казеина, но который обладает низкой активностью для дальнейшего гидролиза казеина, и который таким образом представляет собой превосходный коагулянт для промышленного производства молодых сыров.

Такой химозин приводит к быстрому раннему развитию в процессе созревания благодаря быстрому первому разрезанию альфа s1-казеина, но также приводит к возможности продолжительного хранения сыра благодаря высокому значению соотношения С/Р. Эти свойства демонстрируются независимо бычьим и верблюжьим химозинами дикого типа, соответственно. Соответственно, варианты по изобретению могут представлять собой модифицированный бычий химозин, в котором создано более высокое значение соотношения С/Р, или модифицированный верблюжий химозин, в котором создана способность более быстрого проведения первого разреза альфа-s1-казеина. Соответственно вариант химозина по изобретению, как правило, не является последовательностью дикого типа.

Данный тип химозина не был описан ранее, так как все существующие коагулянты либо способст-

вуют быстрому созреванию благодаря высокой протеолитической активности, либо обладают возможностями для увеличенного периода хранения благодаря низкой протеолитической активности. Однако эти два свойства ранее не объединялись в одном ферменте, тогда как в данном изобретении предлагается такой фермент.

В данном документе также описано, как распознать химозин с данными объединенными свойствами, способы для скрининга таких коагулянтов и способы создания этих свойств в существующем коагулянте.

Таким образом, согласно изобретению предлагается полипептид, обладающий активностью химозина, который:

- a) способен гидролизовать бычий альфа s1-казеин в положении F23F24 с более быстрым образованием α s1-I CN (f24-199), чем верблюжий химозин; и
- b) имеет соотношение C/P выше, чем соотношение C/P бычьего химозина.

В данном контексте бычий химозин может относиться к любому бычьему химозину дикого типа, как, например, последовательность зрелого бычьего химозина, представленная в SEQ ID NO: 2, и верблюжий химозин может относиться к любому зрелому верблюжьему химозину, как например, последовательность зрелого верблюжьего химозина, представленная в SEQ ID NO: 4.

Конкретно, такой полипептид по изобретению может быть таким, при котором гидролиз бычьего альфа-s1-казеина (α s1 CN) в положении F23F24 с образованием α s1-I CN (f24-199), по меньшей мере, около в 1,1 раз быстрее, по меньшей мере, около в 1,2 раз быстрее, по меньшей мере, около в 1,25 раз быстрее, например, по меньшей мере, около в 1,5 раз быстрее, например, по меньшей мере, около в 2 раз быстрее, например, по меньшей мере, около в 2,5 раз быстрее, чем при использовании верблюжьего химозина.

Последовательность бычьего альфа-s1-казеина представлена в SEQ ID NO: 5 (без 15 аминокислот сигнального пептида), и последовательность также представлена как UNIPROT P02662. Положение F23F24 относится к двум остаткам фенилаланина в положениях 23 и 24 в SEQ ID NO: 5. Существует несколько изогенов для данного белка со слегка отличающимися аминокислотными последовательностями, но специалист способен идентифицировать аминокислотные последовательности, соответствующие F23 и F24 в SEQ ID NO: 5.

Альфа-s1-I-казеин (α s1-I CN (f24-199)) представляет собой продукт гидролиза одного из основных белков (α s1-CN) в молоке, α s1-I CN (f24-199) представляет собой первый фрагмент α s1-CN, получаемый при действии коагулянта в процессе созревания сыра, где химозин гидролизует связь F23F24 α s1-CN.

Гидролиз связи F23F24 альфа-s1-казеина может измеряться различными путями. Скорость или степень гидролиза может сравниваться, например, по количеству фермента (например, в выражении мг белка) или в выражении эквивалентного количества IMCU. Более высокая степень гидролиза, чем у верблюжьего химозина, является признаком полипептида по изобретению, который способен гидролизовать бычий альфа-s1-казеин в положении F23F24 с образованием α s1-I CN (f24-199), которое происходит более быстро, чем с использованием верблюжьего химозина.

Как описано в данном документе (см. раздел примеры - Материалы и Методы и, конкретно, пример 8 и 9), альфа-казеин может использоваться в качестве субстрата и инкубироваться с конкретными вариантами химозина при определенных условиях. Затем гидролиз может анализироваться с использованием ПААГ, окрашивания белковых фрагментов, идентификации различных фрагментов и сканирования и денситометрического анализа различных продуктов гидролиза. Такой аналитический способ для количественной оценки альфа-s1-казеина и альфа-s1 I казеина (α s1-CN(f24-199)), полученных с использованием различных коагулянтов, был описан ранее в научной литературе (см., например, Bansal et al (2009) International Dairy Journal 19, 510-517). Сравнительный денситометрический анализ для количественной оценки альфа-s1-казеина и продуктов его деградации описан в примерах 8 и 9.

В ином случае, гидролиз связи F23F24 в альфа-s1-казеине и образование продуктов гидролиза может быть осуществлено с использованием RP-HPLC и может оцениваться количественно с использованием описанного метода (Carles and Dumas (1985) FEBS Letters 185(2), 282-286). Коэффициент образования фрагмента альфа-s1 I и удаления интактного альфа-s1-казеина можно, соответственно, отслеживать с использованием данного метода. Специалисту в данной области будет понятно, что такой RP-HPLC также может использоваться для количественной оценки альфа-s1-казеина и продуктов его деградации.

Способ количественной оценки образования данного первого расщепления α s1-CN также описан в общедоступной научной литературе (Møler et al (2012) J. Agric. Food Chem. 60, 11421-11432).

Любой из вышеописанных способов может использоваться для определения степени, до которой полипептид химозина способен гидролизовать бычий альфа-s1-казеин в положении F23F24 с образованием α s1-I CN (f24-199).

Степень гидролиза может выражаться в виде соотношения α s1-I CN к α s1 CN, образованному при инкубации альфа-казеина с химозином, как описано в разделе примеры - Материалы и Методы и, конкретно, в примере 8 и 9.

Соответственно, вариант химозина по изобретению может быть способен гидролизовать бычий

альфа-s1-казеин в положении F23F24 с образованием α 1-I CN (f24-199) более быстро, чем при использовании верблюжьего химозина, и может быть определен как вариант химозина, который дает соотношение α 1-I CN к α 1 CN, составляющее выше, чем около 0,5, при осуществлении инкубации альфа-казеина в течение 6 часов при 11°C, или соотношение α 1-I CN к α 1 CN выше, чем около 1,5, когда осуществляется инкубация с альфа-казеином в течение 24 часов при 11°C.

Соответственно, вариант химозина может быть способен гидролизовать бычий альфа-s1-казеин в положении F23F24 с более быстрым образованием α 1-I CN (f24-199), чем при использовании верблюжьего химозина, и может определяться в виде варианта химозина, который производит соотношение α 1-I CN к α 1 CN выше, чем около 0,5, при осуществлении инкубации с альфа-казеином в течение 6 ч при 11°C и соотношение α 1-I CN к α 1 CN выше, чем около 1,5, при осуществлении инкубации с альфа-казеином в течение 24 при 11°C.

Конкретно, полипептид по изобретению может быть таким, где соотношение C/P составляет около 2 раз выше, например около 5, например около 10, как например, около 10 раз выше, чем соотношение C/P бычьего химозина.

Термин C/P относится к молокосвертывающей активности, поделенной на протеолитическую активность образца конкретного фермента. C/P представляет собой измерение специфичности коагулянта. Методы измерения обеих активностей и расчета C/P описаны в данном документе (см. примеры). Метод измерения молокосвертывающей активности (C) будет количественно оценивать эффективность образца фермента в отношении гидролиза каппа-казеина (k-CN) в конкретном положении (F105M106). Протеолитическая активность (P) будет количественно оценивать способность коагулянта гидролизовать казеин до низкомолекулярных (ТСА-растворимых) пептидных фрагментов и аминокислот.

В данном документе под термином "IMCU" понимают Международные Молокосвертывающие Единицы. Одна IMCU равна около 0,126 нмоль бычьего химозина В (например, "Maxigen" или "CHY-MAX"). Силу молокосвертывающего фермента (такого как фермент химозин, присутствующий в композиции по настоящему изобретению) определяют как молокосвертывающая активность (IMCU на 1 мл или на 1 г). После добавления разведенного коагулянта к стандартному молочному субстрату, молоко будет выпадать в осадок хлопьями. Время свертывания молока представляет собой период времени от добавления коагулянта до образования видимых хлопьев или комков в молочном субстрате. Силу образца коагулянта, которую определяют путем сравнения времени свертывания молока для образца с аналогичным значением эталонного стандарта, является нормальной. Это выражено в стандарте IDF 157A:1997, который дает определение IMCU: суммарная молокосвертывающая активность первой партии порошка с эталонным стандартом телячьего химозина была раз и навсегда установлена на уровне 1000 Международных Молокосвертывающих Единиц на 1 г (IMCU/г). Следующие препараты эталонных стандартов будут устанавливаться относительно предыдущего эталона. Принцип IMCU: Определение времени, необходимого для видимого выпадения в осадок хлопьями молочного субстрата, обработанного сычужным стандартом с использованием 0,05% хлорида кальция, pH6,5. IMCU/мл образца определяют путем сравнения времени свертывания для образца с временем свертывания для стандарта, имеющего известную молокосвертывающую активность и содержащего ту же ферментную композицию в образце.

Вариант химозина по изобретению, как правило, может иметь высокоспецифичную молокосвертывающую активность (C) и низкую общую, т.е. неспецифичную протеолитическую активность (P) по отношению к молочным белкам. Соответственно, соотношение C/P предпочтительно должно быть настолько высоким, насколько это возможно, поскольку относительно высокое P-значение в процессе производства сыра и в процессе созревания сыра будет приводить к образованию низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот, которые, в свою очередь, могут придавать конечному сырному продукту нежелательный горький вкус и, кроме того, может приводить к потере выхода сырного продукта. Соотношение C/P может быть выражено в виде относительного соотношения C/P, например, относительно химозина, такого как бычий химозин SEQ ID NO: 2.

В изобретении также предлагается полипептид, обладающий активностью химозина и имеющий аминокислотную последовательность, которая

а) при выравнивании с химозином, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего аминокислоте 51 и/или 221; и/или

б) при выравнивании с SEQ ID NO: 4 содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, локализованного в связывающем кармане S2, например, в положении, соответствующем аминокислоте 223.

Такой белок будет, как правило, способен гидролизовать бычий альфа-s1-казеин в положении F23F24 с более быстрым образованием α 1-I CN (f24-199), чем с использованием верблюжьего химозина; и имеет соотношение C/P выше, чем соотношение C/P бычьего химозина.

Таким образом, в положении, соответствующем аминокислоте 51 и/или 221, как определено относительно SEQ ID NO: 2, в SEQ ID NO: 2 может присутствовать аминокислота, отличная от аминокислоты в положении 51 и/или 221. Таким образом, в положении, соответствующем аминокислоте в связываю-

шем кармане S2, как определено относительно SEQ ID NO: 4, может присутствовать аминокислота, отличная от аминокислоты в данном положении внутри связывающего кармана S2 в SEQ ID NO: 4.

Как правило, полипептид по изобретению представляет собой полипептид, имеющий, по меньшей мере, около 65% гомологии с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, например, по меньшей мере, около 70% гомологии с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, как например, по меньшей мере, около 75% гомологии с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, как например, по меньшей мере, около 80% гомологии с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, например, по меньшей мере, около 85%, по меньшей мере, около 90%, по меньшей мере, около 95%, по меньшей мере, около 98% или, по меньшей мере, около 99% гомологии с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

Усиленное раннее развитие сырной массы связано с аффинностью специфического участка альфа-s1-казеина к различным связывающим карманам в пептидосвязывающей бороздке коагулянта. Соответственно, в данном документе описаны аминокислоты в S2 связывающем кармане (Schechter en Berger (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157-162), имеющие отношение к данной аффинности, и данная аффинность может модулироваться путем замены аминокислот в данном кармане с целью повышения степени гидролиза бычьего альфа-s1-казеина в положении F23F24 с образованием α s1-I CN(f24-199).

Например, введение различных аминокислот в боковые цепи в положении V223, определенной относительно последовательности бычьего химозина, приводит к уменьшению первого разрезания альфа-s1-казеина. Однако любой химозин с аминокислотной заменой в соответствующем положении и других соседних положениях в S2 связывающем кармане может приводить к измененной аффинности альфа-s1-казеина для химозина и к изменению кинетики первого разрезания альфа-s1-казеина.

Аминокислотные замены в положениях, которые являются частью S2 связывающего кармана, главным образом представляют собой T219, F223, Q288, D290, L295 и I297 в верблюжьем химозине, или аминокислоты в эквивалентных положениях в химозинах других млекопитающих (например, T219, V223, Q288, E290, K295 и I297 в бычьем химозине), также могут модулировать аффинность альфа-s1-казеина для химозина и, таким образом, кинетику первого разрезания альфа-s1-казеина.

Соответственно, предпочтительные варианты полипептидов химозина могут включать последовательности, представленные в SEQ ID NO: 4, несущие одну из следующих мутаций:

F223C, F223D, F223E, F223L, F223M, F223N, F223Q, F223V, F223Y, F223I,
Q288G, Q288H, Q288N, Q288R, Q288S
D290A, D290G, D290L, D290M, D290Q, D290S, D290T,
L295F, L295I, L295K, L295M, L295R, L295T, L295Y, L295W
I297T, I297V

Могут использоваться комбинации таких мутаций в различных положениях. Специалисту в данной области понятно, как использовать, например, насыщающий мутагенез или сайт-направленный мутагенез для замены аминокислот в положениях в S2 кармане бычьего химозина, или эквивалентные аминокислоты в химозинах с происхождением из других млекопитающих, например, в верблюжьем химозине, для получения химозина с измененной кинетикой гидролиза первого расщепления альфа-s1-казеина, что, таким образом, будет приводить к изменению текстурных характеристик сыра, произведенного с использованием такого варианта.

Также в данном документе описаны аминокислотные замены, способствующие более высокому значению C/P бычьего коагулянта. Нами описано, что замены в аминокислотах A51 и K221 в аминокислотной последовательности бычьего химозина, важны для повышенного C/P. Введение таких замен в выбранный коагулянт будет приводить к более высокому значению C/P, и, таким образом, к повышенной стабильности при хранении для сыра, произведенного с использованием такого коагулянта.

Другие положения, которые могут быть заменены (как определено относительно бычьей последовательности SEQ ID NO: 2), представляют собой 48, 50, 61, 62, 109, 117, 126, 135, 144, 160, 161, 201, 202, 203, 221, 240, 242, 244, 254, 267, 280, 292 или 295. Одно или несколько из этих положений может быть изменено так, чтобы оно отличалось от аминокислоты в данном положении, определенном относительно бычьей последовательности SEQ ID NO: 2.

Предпочтительные варианты полипептидов химозина по изобретению могут включать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, несущую одну из следующих мутаций или комбинации мутаций:

A51V;
K221L;
K221M;
K221V;
V223Q;
A51V и K221V;
A51V и K221M;
A51V, K221V, S135T, A126G, S273Y и Q240E;
A51I и K221T или
A51V, K221V, N50D, N144H, N160D, S201D, Q242E, M267E и Q280E

Согласно изобретению объединены два свойства, которые позволяют, например, сконструировать вариант телячьего химозина, имеющий более высокое значение С/Р, применяемый для конструирования варианта верблюжьего химозина, способного к более быстрому гидролизу бычьего альфа-s1-казеина в положении F23F24 с образованием α s1-CN, для производства сыров, которые можно тонко нарезать или нарезать стружкой в течение продолжительного периода времени, например, сыров моцарелла.

Такой химозин также обладает свойством раннего созревания, поэтому он применяется для производства сыров, которые необходимо нарезать стружкой или нарезать ломтиками настолько быстро, как только это будет возможно (т.е. без продолжительного хранения).

Сыр, произведенный с использованием коагулянта (химозина) по изобретению, имеет свойство наиболее раннего развития с повышенной стабильностью при хранении. Таким образом, такой сыр может нарезаться стружкой/нарезан ломтиками быстрее, но также и в течение более продолжительного периода времени без неприемлемых потерь или загрязнения оборудования.

Любой химозин с аминокислотной заменой в соответствующем положении приводит к измененной аффинности альфа-s1-казеина для S2 кармана данного химозина и к изменению кинетики первого расщепления альфа-s1-казеина. Специалисту в данной области понятно, как заменить аминокислоту в бычьем химозине, или эквивалентные аминокислоты в химозинах с происхождением из других млекопитающих, например, в верблюжьим химозине, для получения химозина с измененной кинетикой гидролиза первого расщепления альфа-s1-казеина, и таким образом, это будет приводить к изменению текстурных характеристик сыра, произведенного с использованием такого варианта.

Ген или кДНК, кодирующая химозин или прохимозин, например, вариант по изобретению, может быть клонирован и сверхэкспрессирован в организме-хозяине. Хорошо известные организмы-хозяева, которые используются для сверх-экспрессии ферментов, включают *Aspergillus*, *Kluyveromyces*, *Trichoderma*, *Escherichia coli*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Neurospora*, *Bacillus*, *Fusarium*, *Hansenula*, *Chryso-sporium* или *Candida*.

В настоящее время бычий химозин производится промышленно с использованием технологии рекомбинантных ДНК, например, с использованием в качестве организмов-хозяев мицелиальных грибов, таких как грибы вида *Aspergillus*, дрожжевых штаммов, например видов *Kluyveromyces*, или видов бактерий, например, *E. coli*. Такие рекомбинантные микробные продуцирующие штаммы конструируются и непрерывно улучшаются с использованием ДНК-технологии, а также меру улучшения штаммов детектируют по отношению к оптимизации экспрессии и секреции гетерологичного белка.

В изобретении вариант химозина может предлагаться в форме препрохимозина, прохимозина или (зрелого) химозина. Также может предлагаться соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты, т.е. предлагается полинуклеотид, который кодирует препрохимозин, прохимозин или (зрелый) химозин. Кодированная последовательность такого препрохимозина, прохимозина или (зрелого) химозина может быть оптимизирована для экспрессии в целевых клетках-хозяевах.

Варианты, описанные в данном документе, в совокупности содержатся в терминах "полипептиды по изобретению" или "вариант по изобретению".

Термин "полипептид" и "олигопептид" рассматриваются как синонимы (как это обычно признается), и каждый термин может быть использован взаимозаменяемо в зависимости от контекста для обозначения цепи, по меньшей мере, из двух аминокислот связанных пептидной связью. Слово "полипептид" используется здесь для цепей содержащих больше, чем семь аминокислотных остатков. Олигопептидные и полипептидные формулы и последовательности в данном описании пишутся слева направо и в направлении от N-конца к C-концу. Используемый здесь однобуквенный аминокислотный код широко известен в данной области и может быть найден в Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd,ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Полипептид изобретения может быть в выделенной форме, например, частично выделенной форме. Под "выделенным" полипептидом или белком понимается полипептид или белок, удаленный из своей естественной среды. Например, рекомбинантно-продуцируемые полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, рассматриваются как выделенные в целях изобретения если являются рекомбинантными полипептидами, которые по существу были очищены любым подходящим способом. Полипептидный вариант согласно изобретению может быть извлечен и очищен из культур рекомбинантных клеток с помощью способов, известных в данной области.

Полипептиды по настоящему изобретению включают продукты процедур химического синтеза, и продукты, полученные рекомбинантными методами из прокариотических или эукариотических хозяев, включающих, например, бактерии, дрожжи, клетки высших растений, насекомых и клетки млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого в процедуре рекомбинантного получения, полипептиды настоящего изобретения могут быть гликозилированы или негликозилированы. Кроме того, полипептиды изобретения могут также содержать первый модифицированный остаток метионина, в некоторых случаях как результат опосредованных хозяином процессов.

Изобретение также описывает биологически активные фрагменты полипептидных вариантов по изобретению. Такие фрагменты считаются охваченными термином "вариант изобретения".

Биологически активные фрагменты полипептидного варианта изобретения включают полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, в достаточной степени идентичные или полученные из аминокислотной последовательности вариантного белка изобретения, которые включают меньшее количество аминокислот, чем полноразмерный белок, но которые демонстрируют по меньшей мере одну биологическую активность соответствующего полноразмерного белка. Как правило, биологически активные фрагменты содержат домен или мотив по меньшей мере с одной активностью вариантного белка по изобретению. Биологически активный фрагмент белка по изобретению может быть полипептидом, длина которого составляет, например, 10, 25, 50, 100 или более аминокислот. Более того, другие биологически активные части, в которых удалены другие области белка, могут быть получены путем рекомбинантных технологий и оценены по одному или нескольким биологическим активностям нативной формы полипептида изобретения.

Как правило, фрагмент белка изобретения будет содержать одну или несколько замен, определенных в данном документе.

Изобретение также описывает функции фрагментов нуклеиновых кислот, кодирующих вышеупомянутые биологически активные фрагменты (где биологически активные фрагменты сами являются вариантами изобретения).

Как изложено выше, в настоящем изобретении предлагаются полинуклеотиды, кодирующие варианты полипептиды изобретения. Изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему по меньшей мере один функциональный домен полипептидного варианта изобретения. Как правило, такой домен будет содержать одну или несколько замен, определенных в данном документе.

В одном воплощении изобретения последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению кодирует полипептид, где полипептид представляет собой вариант, содержащий аминокислотную последовательность, которая содержит одно или несколько укорачиваний и/или по меньшей мере одну замену, делецию и/или вставку аминокислоты по сравнению с родительской аспарагиназой. Такой полипептид, однако, будет, как правило, содержать одну или несколько замен, описанных в данном документе.

Использованные здесь термины "ген" или "рекомбинантный ген" относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые включают открытую рамку считывания, кодирующую вариант, описанный в данном документе. Ген может включать кодирующие последовательности, не кодирующие последовательности, интроны и регуляторные последовательности. Иначе говоря, "ген", при использовании в данном документе, может относиться к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, определенной в данном документе. Соответственно термин "ген", в контексте настоящей заявки, относится не только к естественным последовательностям.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть получена с использованием стандартных методов молекулярной биологии, хорошо известных специалисту в данной области, в комбинации с информацией о последовательности, представленной в данном документе.

Например, с использованием стандартных синтетических методов требуемая молекула нуклеиновой кислоты может быть синтезирована *de novo*. Такой синтетический процесс, как правило, может быть автоматизированным процессом.

В ином случае, молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может быть получена с использованием сайт-направленного мутагенеза существующей молекулы нуклеиновой кислоты, например, молекулы нуклеиновой кислоты дикого типа. Сайт-направленный мутагенез может проводиться с использованием ряда методов, хорошо известных специалисту в данной области.

В одном таком способе, упомянутом в данном документе исключительно для примера, ПЦР проводят на плазмидной матрице с использованием олигонуклеотидных "праймеров", кодирующих целевую замену. Поскольку праймеры являются концами вновь синтезированных цепей, то в течение первого цикла должно быть неправильное спаривание при связывании матрицы ДНК-цепи, то цепь на основе праймера (содержащая мутацию) должна быть равной концентрации с исходной матрицей. После успешных циклов пойдет экспоненциальный рост, а после 25 циклов превышение по численности цепи с мутацией относительно исходной цепи, не подвергнутой мутации, будет составлять порядка 8 млн: 1, что в результате приведет к получению почти гомогенного раствора мутированных амплифицированных фрагментов. ДНК-матрица может затем быть удалена с помощью ферментативного гидролиза с использованием, например, фермента рестрикции, который расщепляет только метилированную ДНК, такого как DpnI. Матрица, полученная способом выделения плазмид щелочным лизисом, и, таким образом, являющаяся метилированной, на данной стадии разрушается, а мутированная плаزمид сохраняется, так как она была получена *in vitro* и, таким образом, не является метилированной.

В таком способе за одну реакцию ПНР в молекулу нуклеиновой кислоты может быть введена более чем одна мутация (кодирующая замену, как описано в данном документе), например, путем использования одного или нескольких олигонуклеотидов, каждый из которых включает неправильные пары. В ином случае в молекулу нуклеиновой кислоты может быть введена более чем одна мутация путем проведения более чем одной реакции ПЦР, с введением каждой реакцией одной или нескольких мутаций, так что измененные нуклеиновые кислоты вводятся в нуклеиновую кислоту последовательно, итерационным образом.

Нуклеиновая кислота по изобретению может быть получена с использованием в качестве матрицы кДНК, мРНК или, в ином случае, геномной ДНК и с использованием олигонуклеотидных праймеров с неправильным спариванием в соответствии со способом сайт-направленного мутагенеза, как описано выше. Молекула нуклеиновой кислоты, выделенная таким образом, может быть клонирована в подходящий вектор и охарактеризована с помощью анализа последовательности ДНК.

Последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению может включать одну или несколько делеций, т.е., пропусков по сравнению с родительским химозином. Такие делеции/разрывы также могут быть образованы с помощью сайт-направленного мутагенеза, с использованием соответствующих олигонуклеотидов. Способы образования таких делеций хорошо известны специалистам в данной области.

Кроме того, олигонуклеотиды, соответствующие или гибридуемые с нуклеотидными последовательностями согласно изобретению, могут быть получены с помощью стандартных синтетических методов, например, с использованием автоматического ДНК-синтезатора.

Кроме того, в настоящее изобретение включены комплементарные молекулы нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной другой нуклеотидной последовательности, является последовательностью, которая в достаточной степени комплементарна другой нуклеотидной последовательности, так что может гибридизоваться с другой нуклеотидной последовательностью с образованием стабильного дуплекса.

Один аспект изобретения относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют вариант по изобретению или его биологически активный фрагмент или домен, а также молекулы нуклеиновой кислоты, достаточные для применения в качестве гибридизационных зондов для идентификации молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид по изобретению, и фрагменты таких молекул нуклеиновых кислот, подходящие для применения в качестве ПЦР-праймеров для амплификации или мутации молекул нуклеиновых кислот, как например для получения молекул нуклеиновых кислот по изобретению.

"Выделенный полинуклеотид" или "выделенная нуклеиновая кислота" представляет собой молекулу ДНК или РНК, которая непосредственно не граничит с обоими кодирующими последовательностями, с которыми она непосредственно граничит (с одной с 5' конца и с одной с 3' конца) в естественном геноме организма, из которого данная молекула получена. Таким образом, в одном воплощении изолированная нуклеиновая кислота включает некоторые или все 5' концевые некодирующие последовательности (например, промотор), которые непосредственно граничат с кодирующей последовательностью. Термин, следовательно, включает, например, рекомбинантную ДНК, которая вставлена в вектор, автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус, или в геномную ДНК прокариотического или эукариотического организма, или которая существует в виде отдельной молекулы (например, кДНК, или фрагмента геномной ДНК, полученной ПНР или обработкой эндонуклеазами рестрикции). Термин также включает рекомбинантную ДНК, которая является частью гибридного гена кодирующего дополнительный полипептид, который фактически не содержит клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды (когда производится методами рекомбинантных ДНК), или химическими предшественниками или другими химическими веществами (если молекула синтезирована химически). Более того, "изолированный фрагмент нуклеиновой кислоты" представляет собой фрагмент нуклеиновой кислоты, не существующий в природе как фрагмент, и который не может быть обнаружен в естественном состоянии.

Использованный в данном документе термин "полинуклеотид" или "молекула нуклеиновой кислоты" предназначен для того, чтобы включить молекулы ДНК (например, кДНК или геномной ДНК) и молекулы РНК (например, мРНК) и аналоги ДНК или РНК, полученные с помощью аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно является двухцепочечной ДНК. Нуклеиновая кислота может быть синтезирована с использованием олигонуклеотидных аналогов или производных (например, инозина или фосфоротиоатных нуклеотидов). Такие олигонуклеотиды могут быть использованы, например, для подготовки нуклеиновых кислот, которые имеют измененные способности спаривания оснований или повышенную устойчивость к нуклеазам.

В другом воплощении изобретения предлагается выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая является антисмысловой относительно молекулы нуклеиновой кислоты изобретения.

Термины "гомология" или "процент идентичности" в данном документе используются взаимозаменяемо. Для цели данного изобретения, термин определяется в данном документе для определения процента идентичности последовательностей двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, которые выравниваются для оптимального сравнения (например, разрывы могут быть внесены в последовательность первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью). Затем сравниваются аминокислотные или нуклеотидные остатки в соответствующих аминокислотных или нуклеотидных позициях. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидным остатком, что и в соответствующем положении второй последовательности, то молекулы являются идентичными по этому положению. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений, совместно ис-

пользуемых последовательностями (т.е. % идентичности = числу идентичных положений/общее число положений (т.е. перекрывающихся положений) \times 100). Предпочтительно, если две последовательности имеют одинаковую длину.

Сравнение последовательностей может быть проведено по всей длине двух сравниваемых последовательностей, или по фрагменту двух последовательностей. Как правило, сравнение может быть проведено по всей длине двух сравниваемых последовательностей. Однако идентичность последовательности может быть определена для участка, например, длиной двадцать, пятьдесят, сто или больше смежных аминокислотных остатков.

Специалист в данной области известно о факте того, что для определения гомологии между двумя последовательностями доступно несколько программ. Например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть осуществлено с помощью математического алгоритма. В предпочтительном воплощении, процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеотидными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Нидлмана и Вунша (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), который включен в программу "GAP" программного пакета "Accelrys GCG" (доступного по адресу <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), с помощью либо матрицы "Blossom 62", либо матрицы "PAM250", и с штрафом за открытие разрыва 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафом за длину 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Специалисту будет понятно, что все эти различные параметры дадут несколько различающиеся результаты, но общий процент идентичности двух последовательностей при использовании различных алгоритмов значительно не изменится.

Белковые последовательности или последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут дополнительно использоваться в качестве "последовательности запроса" для осуществления поиска в публичных базах данных, например, для выявления других членов семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут быть осуществлены с помощью программ "BLASTN" и "BLASTP" (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Белковый поиск "Blast" может быть осуществлен с помощью программы "BLAST", сумма баллов = 50, размер слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам по изобретению. Для получения выравнивания содержащего разрывы для целей сравнения, может использоваться "Gapped BLAST", как описано в работе Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ "BLAST" и "Gapped BLAST" могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, "BLASTP" и "BLASTN"). См. домашнюю страницу Национального Центра Биотехнологической Информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Другой аспект изобретения касается векторов, предпочтительно экспрессирующих векторов, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид варианта химозина по изобретению.

Использованный в данном документе термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой они связаны. Один тип вектора является "плазмидой", которая представляет собой кольцевой, замкнутый фрагмент двухцепочечной ДНК, с которым могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором могут быть лигированы в вирусный геном дополнительные сегменты ДНК. Некоторые векторы проявляют способность к автономной репликации в клетке-хозяине в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом, реплицируются вместе с хозяйским геномом. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. В данном документе такие векторы называются "экспрессирующими векторами". В общем, экспрессирующие векторы, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто представлены в виде плазмид. Термины "плазида" и "вектор" в данном документе могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако изобретение имеет целью включить другие формы экспрессирующих векторов, таких как вирусные векторы (например, репликативно-дефектные ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют аналогичные функции.

Рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению включают нуклеиновую кислоту по изобретению в форме подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантный экспрессирующий вектор включает одну или несколько регуляторных последовательностей, выбранных на основе используемых для экспрессии клеток-хозяев, которые функционально связаны с экспрессируемой нуклеотидной последовательности. В рекомбинантном экспрессионном векторе, "функционально связанный" предназначено для обозначения того, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность связана с регуляторной последовательностью(ями), таким образом, который позволяет осуществить экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в *in vitro* системе транскрипции/трансляции или в клетке-хозяине, когда вектор вводится в клетку-хозяина). Термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигнал полиаденилирования). Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego,

СА (1990). Регуляторные последовательности включают те последовательности, которые управляют конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности во множестве типов клеток-хозяев и те, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности только в некоторых клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Специалисту в данной области следует понимать, что конструирование экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина, желаемый уровень экспрессии белка и т.п. Экспрессирующие векторы по изобретению могут быть введены в клетки-хозяева так, чтобы тем самым продуцировать белки или пептиды, кодируемые описанными здесь нуклеиновыми кислотами (например, вариант химозина SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, например, функциональный эквивалент или фрагмент или сшитый белок, содержащий один или несколько из таких вариантов)

Рекомбинатные экспрессирующие векторы по изобретению могут быть сконструированы для экспрессии вариантов белков по изобретению в прокариотических или эукариотических клетках. Например, вариант белка по изобретению может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *E.coli*, клетках насекомых (с помощью бакуловирусовых экспрессирующих векторов), дрожжевых клетках и клетках млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева дополнительно обсуждаются в книге Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). В ином случае, рекомбинантный экспрессирующий вектор может транскрибироваться и транслироваться *in vitro*, например, с помощью регуляторных последовательностей T7-промотора и T7-полимеразы.

Экспрессирующие векторы, применяемые в настоящем изобретении, включают векторы, полученные на основе хромосом, эписом и вирусов, например, векторы, полученные из бактериальных плазмид, бактериофагов, дрожжевой эписомы, дрожжевых хромосомных элементов, вирусов, таких как бакуловирусы, паповавирусы, вирусы коровьей оспы, аденовирусы, вирусы оспы-дефтерита птиц, вирусы псевдобешенства и ретровирусы, и векторы, полученные на основе их комбинаций, таких как те, что получены из генетических элементов плазмид и бактериофагов, такие как космиды и фагмиды.

ДНК-вставка должна быть функционально связана с подходящим промотором, например, таким как PL-промотор фага лямбда, промоторы *E.coli lac*, *trp* и *tac*, ранний и поздний промоторы SV40 и промоторы ретровирусовых LTR. Другие подходящие промоторы будут известны специалисту в данной области. В конкретном воплощении, предпочтительными являются те промоторы, которые способны задавать высокий уровень экспрессии химозина в мицелиальных грибах. Такие промоторы известны в данной области. Экспрессирующие конструкции могут содержать сайты для инициации транскрипции, терминации, и, в транскрибируемой области, сайт связывания с рибосомой для трансляции. Кодирующая часть зрелых транскриптов, экспрессируемых конструкциями, будет включать иницирующий трансляцию триплет AUG в начале и кодон терминации в соответствующем положении в конце транслируемого полипептида.

Векторная ДНК может быть внедрена в прокариотические или эукариотические клетки с помощью обычных методов трансфекции и трансформации. Используемые здесь термины "трансформация" и "трансфекция" предназначены для обозначения множества признанных в данной области методов для внедрения чужеродной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в клетку-хозяина, включая коприципитацию с фосфатом кальция и хлоридом кальция, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, трансдукцию, инфекцию, липофекцию, катионную опосредованную липидами трансфекцию или электропорацию. Подходящие способы для трансформации или трансфекции клеток-хозяев могут быть найдены в Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd,ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) и в других лабораторных руководствах.

Известно что при стабильной трансфекции клеток млекопитающих, в зависимости от экспрессирующего вектора и используемого способа трансфекции, только малая часть клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном. В целях идентификации и отбора этих интегрантов, ген, который кодирует селективный маркер (например, ген устойчивости к антибиотику), как правило, вводится в клетки-хозяева вместе с представляющим интерес геном. Предпочтительные селективные маркеры, включают те, которые придают устойчивость к лекарственным соединениям, таким как G418, гидромицин и метатрексат. Нуклеиновая кислота, кодирующая селективный маркер, может быть введена в клетку-хозяина в том же векторе, который кодирует вариант белка по изобретению, или может быть введена в отдельном векторе. Клетки, стабильно трансфицированные вводимой нуклеиновой кислотой, могут быть идентифицированы отбором по лекарственному средству (например, клетки, которые имеют внедренный селективный маркерный ген, будут выживать, в то время как другие клетки будут умирать).

Экспрессия белков в прокариотах часто проводится в *E.coli* с векторами, содержащими конститутивный или индуцируемый промоторы, управляющие экспрессией либо химерных, либо нехимерных белков. Химерные векторы добавляют ряд аминокислот к кодируемому в них белку, например, к N-концу рекомбинантного белка. Такие химерные векторы, как правило, служат трем целям: 1) повышение экспрессии рекомбинантного белка; 2) повышение растворимости рекомбинантного белка и 3) помощь в очистке рекомбинантного белка в качестве лиганда для аффинной очистки. Часто в химерных экспрессирующих векторах на стыке химерного функционального компонента и рекомбинантного белка вводится

сайт протеолитического гидролиза, для того чтобы можно было отделить рекомбинантный белок от химерного функционального компонента с последующей очисткой химерного белка.

Как уже отмечалось, экспрессирующие вектора предпочтительно будут содержать селекционные маркеры. Такие маркеры включают дигидрофолатредуктазу или устойчивость к неомицину для культуры эукариотических клеток и устойчивость к тетрациклину или ампициллину для культивируемых *E. coli* и других бактерий. Типичные примеры соответствующих хозяев включают бактериальные клетки, такие как *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium* и некоторые виды *Bacillus*; грибные клетки, такие как виды рода *Aspergillus*, например *A. niger*, *A. oryzae* and *A. nidulans*, такие как дрожжи, такие как *Kluyveromyces*, например, *K. lactis* и/или *Pichia*, например, *P. pastoris*; клетки насекомых, такие как *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки животных, такие как CHO, COS и меланомы Боуэса; и растительные клетки. Соответствующие культуральные среды и условия для вышеописанных клеток-хозяев известны в данной области.

Предпочтительные векторы для использования в бактериях раскрыты, например, в WO-A1-2004/074468, который прилагается к данному документу ссылкой. Другие подходящие векторы будут очевидны для специалиста.

Известные бактериальные промоторы, подходящие для использования в настоящем изобретении включают промоторы, раскрытые в WO-A1-2004/074468, который включен в данный документ ссылкой.

Транскрипция ДНК, кодирующей вариант по настоящему изобретению высшими эукариотами, может быть повышена путем включения в вектор энхансерной последовательности. Энхансеры являются *cis*-действующими элементами ДНК, обычно около от 10 до 300 п.н., которые действуют повышая транскрипционную активность промотора в данном типе клеток-хозяев. Примеры энхансеров включают энхансер SV40, который находится на поздней стороне от точки начала репликации (п.н. 100-270), энхансер цитомегаловирусного промотора, энхансер полиомы на поздней стороне от точки начала репликации, и энхансеры аденовируса.

Для секреции транслированного белка в просвет эндоплазматического ретикулума, в периплазматическое пространство или во внеклеточную среду, в экспрессирующийся ген может быть внедрен соответствующий сигнал. Сигналы могут быть эндогенными по отношению к полипептиду или могут быть гетерологичными сигналами.

Вариант по изобретению может экспрессироваться в форме, так что он может включать дополнительные гетерологичные функциональные участки, например сигналы секреции. Вариант по изобретению также может включать, например, участок дополнительных аминокислот, конкретно, заряженных аминокислот, добавленных к N-концу полипептида, например, для улучшения стабильности и устойчивости в клетке-хозяине в процессе очистки или в последующих процессах обработки и хранения. Кроме того, пептидные компоненты могут быть добавлены к варианту по изобретению для облегчения очистки, например, путем добавления гистиридиновых остатков T7-тага.

Варианты по изобретению, такие как белки по настоящему изобретению или их функциональные эквиваленты, например, их биологически активные части, могут быть функционально связаны с невариантным полипептидом (например, с гетерологичными аминокислотными последовательностями) с образованием химерных белков. "Невариантный полипептид" в данном контексте относится к полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую белку, который фактически не гомологичен варианту химозина по изобретению.

В рамках химерного белка вариант по изобретению может соответствовать полноразмерной последовательности или только биологически активному фрагменту полипептида по изобретению. В предпочтительном воплощении, химерный белок по изобретению включает, по меньшей мере, две биологически активные части. Когда речь идет о химерном белке, термин "функционально связанный" должен указывать на то, что вариантный полипептид и не вариантный полипептид сшиваются друг с другом с сохранением рамки считывания. Не вариантный полипептид может быть пришит к N-концу или к C-концу вариантного полипептида.

Экспрессия и секреция варианта химозина может усиливаться с помощью экспрессии варианта в форме химерного белка. В данном контексте последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать химерный белок, содержащий препрохимозин, прохимозин или химозин. Более конкретно, партнером по химере может быть глюкоамилаза или ее фрагмент. В одном воплощении, пре-прохимозин, прохимозин или химозин или их химерный белок секретируется на мембране клетки-хозяина.

Например, в одном воплощении химерный белок представляет собой химерный белок, в котором последовательность(и) варианта пришиты к C-концу GST-последовательностей. Такие химерные белки могут облегчить очистку рекомбинантного варианта по изобретению. В другом воплощении, химерный белок является вариантом по изобретению, содержащим гетерологичную сигнальную последовательность на его N-конце. В некоторых клетках-хозяевах (например, в клетках-хозяевах млекопитающих и дрожжей) экспрессия и/или секреция варианта по изобретению может быть увеличена посредством использования гетерологичной сигнальной последовательности.

В другом примере, секреторная последовательность gp67 бакуловирусного белка оболочки может быть использована в качестве гетерологичной сигнальной последовательности (Current Protocols in Mo-

lecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992). Другие примеры эукариотических гетерологичных сигнальных последовательностей включают секреторные последовательности мелиттина и человеческой плацентарной щелочной фосфатазы (Stratagene; Ла-Хойя, Калифорния). В еще одном примере, полезные прокариотические гетерологичные сигнальные последовательности включают секреторный сигнал *phoA* (Sambrook et al., выше) и секреторный сигнал белка А (Pharmacia Biotech; Пискавказэй, Нью-Джерси).

Сигнальная последовательность может быть использована для облегчения секреции и выделения варианта по изобретению. Сигнальные последовательности, как правило, характеризуются ядром гидрофобных аминокислот, которые, как правило, отрезаются от зрелого белка в процессе секреции за один или два шага расщепления. Такие сигнальные пептиды содержат сайт процессинга, который позволяет отрезать сигнальную последовательность от зрелых белков, как только они проходят через секреторный путь. Сигнальная последовательность направляет секрецию варианта, например, из эукариотического хозяина, в который трансформирован экспрессирующий вектор, и сигнальная последовательность последовательно или параллельно отрезается. Затем вариант по изобретению может быть легко очищен от внеклеточной среды известными способами. В ином случае, сигнальная последовательность может быть связана с вариантом, представляющим интерес, с помощью последовательности, которая облегчает очистку, например, с помощью домена GST. Так, например, последовательность, кодирующая вариант по изобретению, может быть объединена с последовательностью маркера, например, с последовательностью, кодирующую пептид, который способствует очистке химерного полипептида. В некоторых предпочтительных воплощениях этого аспекта изобретения, маркерная последовательность представляет собой пептид гексагистидина, такой как метка предоставляемая в числе прочих вектором pQE (Qiagen, Inc.), многие из которые коммерчески доступны. Как описано в работе Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989) гексагистидин, например, обеспечивает удобную очистку химерного белка. НА-метка является другим полезным для очистки пептидом, который соответствует эпипептиду полученному из белка-гемагглютинина гриппа, который был описан в работе Wilson et al., Cell 37:767 (1984).

Химерный белок по изобретению получают стандартными способами рекомбинантных ДНК. Так, например, фрагменты ДНК, кодирующие различные полипептидные последовательности, лигированы вместе с сохранением рамки считывания, в соответствии с обычными способами, например, путем применения для лигирования тупых или липких концов, гидролиза рестрикционными ферментами для обеспечения необходимых концов, заполнения липких концов в случае необходимости, обработки щелочной фосфатазой для предотвращения нежелательного объединения, и энзиматического лигирования. В другом воплощении, химерный ген может быть синтезирован традиционными способами, включая автоматические синтезаторы ДНК. В ином случае, может быть проведена амплификация ПНР генных фрагментов с помощью якорных праймеров, которые дают начало комплементарному перекрытию между двумя последовательными генными фрагментами, которые могут последовательно отождествлены и реамплифицированы для образования химерной генной последовательности (см., например, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Более того, множество коммерчески доступных экспрессирующих векторов уже кодируют химерный функциональный компонент (например, полипептид GST). Вариант-кодирующая нуклеиновая кислота может быть клонирована в такой экспрессирующий вектор так, чтобы химерная функциональная составляющая была связана с указанным вариантом в рамке считывания.

Термины "функциональные эквиваленты" и "функциональные варианты" в данном описании применяются взаимозаменяемо. Функциональные эквиваленты по изобретению являются выделенными фрагментами ДНК, которые кодируют полипептид, который демонстрирует конкретную функцию варианта, определенного в данном документе). Функциональные эквиваленты, следовательно, также охватывают биологические фрагменты и сами охватываются термином "вариант" изобретения.

Предпочтительно функциональный эквивалент изобретения включает один или несколько замен, описанных в данном документе. Однако функциональный эквивалент может содержать одну или несколько модификаций в дополнение к заменам, описанным выше.

Функциональные эквиваленты нуклеиновых кислот могут, как правило, содержать молчащие мутации или мутации, которые не влияют на биологическую функцию кодируемого полипептида. Соответственно, в изобретении предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вариантный химозинный белок, который содержит аминокислотные остатки, которые не являются существенными для конкретной биологической активности. Такие варианты белки отличаются по аминокислотной последовательности от последовательности родительского химозина, от которой они произошли, сохраняя при этом по меньшей мере одну его биологическую активность, предпочтительно они сохраняют, по меньшей мере, активность химозина. В одном воплощении выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, где белок содержит фактически гомологичную аминокислотную последовательность по меньшей мере около 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или больше гомологичную эталонной аминокислотной последовательности (например, которая показана в SEQ ID NO: 2).

Определенный в данном документе термин "фактически гомологичный" относится к первой амино-

кислотной или нуклеотидной последовательности, которая содержит достаточное или минимальное число идентичных или эквивалентных (например, с похожей боковой цепью) аминокислот или нуклеотидов относительно второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, так чтобы первая и вторая аминокислотная или нуклеотидная последовательности имеют общий домен. Например, аминокислотная или нуклеотидная последовательности, которые содержат общий домен, обладающие идентичностью около 60%, предпочтительно 65%, более предпочтительно 70%, еще более предпочтительно 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или больше, определены здесь как в достаточной степени идентичные.

Специалисту будет понятно, что изменения могут быть введены мутациями в нуклеотидные последовательности по изобретению, что, тем самым, приведет к изменениям в аминокислотной последовательности полученного белка без существенного изменения функции такого белка.

Соответственно, вариант химозина по изобретению предпочтительно является белком, который содержит аминокислотную последовательность гомологичную по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более гомологичной эталонной аминокислотной последовательности, например, которая показана в SEQ ID NO: 2, и который сохраняет по меньшей мере одну функциональную активность эталонного полипептида. Варианты изобретения, например, функциональные эквиваленты белка по изобретению, также могут быть идентифицированы, например, скринингом комбинаторных библиотек мутантов, например, укороченных мутантов, белка изобретения на предмет активности химозина. В одном воплощении неоднородная библиотека вариантов образуется путем комбинаторного мутагенеза на уровне нуклеиновых кислот. Неоднородная библиотека вариантов может быть получена, например, ферментативным лигированием смеси синтетических олигонуклеотидов в последовательности генов так, чтобы образовать вырожденный набор возможных белковых последовательностей экспрессирующихся в виде отдельных полипептидов, или, наоборот, в виде набора больших химерных белков (например, для фагового дисплея). Существуют различные способы, которые могут быть использованы для создания библиотеки возможных вариантов полипептидов изобретения из вырожденных олигонуклеотидных последовательностей. Способы синтеза вырожденных олигонуклеотидов известны в данной области (см., например, Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Кроме того, библиотеки фрагментов последовательности, кодирующей полипептид изобретения, могут быть использованы для создания неоднородной популяции полипептидов для скрининга с последующим отбором вариантов. Например, библиотека фрагментов кодирующей последовательности может быть получена путем: обработки двухцепочечного ПНР-фрагмента, кодирующего представляющие интерес последовательности, нуклеазами в условиях, в которых внесение одностороннего разрыва происходит только один раз на молекулу; денатурации двухцепочечной ДНК; ренатурации ДНК для образования двухцепочечной ДНК, в которую могут включаться смысловые/антисмысловые пары из разных продуктов с одноцепочечным разрывом; удаления одноцепочечной части из преобразованных дуплексов с помощью обработки S1 нуклеазой; и лигирования полученной в результате библиотеки фрагментов в экспрессирующий вектор. С помощью этого способа может быть получена экспрессирующая библиотека, которая кодирует N-концевые и внутренние фрагменты представляющего интерес белка с различными размерами.

В данной области известно несколько способов скрининга генных продуктов комбинаторных библиотек сделанных точечными мутациями или укорачиванием, и скрининга библиотек кДНК для поиска генных продуктов, обладающий особыми свойствами. Наиболее широко используются способы, которые поддаются масштабированию до уровня анализа с высокой пропускной способностью, для скрининга больших генных библиотек, как правило, включают клонирование генной библиотеки в реплицирующиеся экспрессирующие вектора, трансформацию подходящих клеток полученной в результате библиотеки векторов, и экспрессию комбинаторных генов в условиях, в которых обнаружение требуемой активности облегчает выделение вектора кодирующего ген, продукт которого был обнаружен. В сочетании с тестами скрининга для выявления вариантов белка изобретения может быть использован сайт-направленный множественный рекурсивный мутагенез (Recursive ensemble mutagenesis (REM)), метод, который повышает частоту встречаемости функциональных мутантов в библиотеках (Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3): 327-331).

Фрагменты полинуклеотида по изобретению могут включать также полинуклеотиды, не кодирующие функциональные полипептиды. Такие полинуклеотиды может действовать в качестве зондов или праймеров для реакции ПЦР.

Нуклеиновые кислоты по изобретению независимо от того, кодируют ли они функциональные или нефункциональные полипептиды, могут быть использованы в качестве зондов гибридизации или в качестве праймеров полимеразной цепной реакции (ПЦР). Применения молекул нуклеиновых кислот настоящего изобретения, которые не кодируют полипептид с активностью химозина, включают, помимо прочего, (1) гибридизацию *in situ* (например, FISH) в хромосомной метафазной пластинке для определения точной хромосомной локализации химозин-кодирующего гена, как описано в работе Verma et al., *Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York (1988); (2) нозерн-блот анализ для выявления экспрессии мРНК химозина в определенных тканях и/или клетках и (3) зонды и

праймеры, которые можно использовать в качестве диагностического инструмента для анализа наличия нуклеиновых кислот, способных гибридизоваться с зондом или праймером в конкретном биологическом образце (например, в ткани).

Варианты данного эталонного фермента химозина могут быть получены следующей стандартной процедурой:

Мутагенез (сниженной точности, с использованием неэквиволярных количеств олигонуклеотидов, с использованием методики в которой в процессе синтеза олигонуклеотидной последовательности соответствующей последовательности дикого типа, помимо соответствующих нуклеотидов в последовательность включаются определенные количества случайных олигонуклеотидов) или синтез вариантов;

Трансформация, например, в *K. Lactis*;

Культивирование трансформантов, селекция трансформантов;

Экспрессия;

Необязательная очистка и концентрирование;

Первичный Скрининг;

Идентификация улучшенного варианта (например, по специфической активности).

1. Изобретение, таким образом, относится к способу получения варианта пептида химозина, который включает:

a) выбор полипептида, имеющего активность химозина;

b) замену, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка, соответствующего положению 51 или 221, как определено относительно SEQ ID NO: 2; и/или положению внутри связывающего кармана S2, как определено относительно SEQ ID NO: 4;

c) необязательная замена одной или нескольких дополнительных аминокислот, определенных в b);

d) получение варианта, на основании стадий a)-c);

e) определение свойства варианта и

f) выбор варианта, имеющего измененное свойство по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина, с получением посредством этого варианта полипептида химозина.

Изобретение относится к клеткам, например, трансформированным клеткам-хозяевам или рекомбинантным клеткам-хозяевам, которые содержат нуклеиновую кислоту, охватываемую изобретением. "Трансформированная клетка" или "рекомбинантная клетка" является клеткой в которой (или в предшественнике которой) вводится посредством методов рекомбинантных ДНК, нуклеиновая кислота по изобретению. К ним относятся как прокариотические, так и эукариотические клетки, например, бактерии, грибы, дрожжи и т.п., особенно предпочтительными являются клетки дрожжей, например, *K. lactis*. Клетки-хозяева также включают, в частности, клеточные линии млекопитающих, такие как CHO, VERO, VHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 и клеточные линии хорьдиного сплетения.

Примерами подходящих бактериальных организмов-хозяев являются грамположительные виды, такие как *Bacillaceae*, включая *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus thuringiensis*, виды *Streptomyces* такие как *Streptomyces murinus*, виды молочно-кислых бактерий, включая *Lactococcus* spp. такие как *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* spp. включая *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc* spp. и *Streptococcus* spp. В ином случае, штаммы грамотрицательных бактериальных штаммов, таких как виды, принадлежащие *Enterobacteriaceae*, включая *E. coli*, или *Pseudomonadaceae*, могут быть выбраны в качестве организма-хозяина.

Подходящий дрожжевой организм-хозяин предпочтительно может быть выбран из видов *Saccharomyces*, включая *Saccharomyces cerevisiae* или виды, принадлежащие *Schizosaccharomyces*. Другие полезные дрожжевые организмы-хозяева включают *Pichia* spp. такие как их метилотрофные виды, включая *Pichia pastoris*, и *Kluveromyces* spp. включая *Kluveromyces lactis*.

Подходящие организмы-хозяева среди мицелиальных грибов включают виды *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyposcladium* или *Trichoderma*, такие как например, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* или *Aspergillus niger*, включая *Aspergillus nigervar. awamori*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cereals*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichiodes*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola langinosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizomucor miehei*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesii* или *Trichoderma viride*.

Клетка-хозяин может быть выбрана так, чтобы модулировать экспрессию вставленных последовательностей, или модифицировать и осуществлять процессинг продукта, кодируемого включенной нуклеотидной последовательностью, особым, желательным образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, гидролиз) белковых продуктов может облегчать оптимальное функционирование кодируемого белка.

Различные хозяйские клетки обладают характерными и специфичными механизмами для посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Соответствующие клеточные линии или хозяйские системы, хорошо знакомые специалистам в области молекулярной биологии и/или микробиологии, могут быть выбраны для обеспечения требуемой и корректной модификации и обработки продуцируемого чужеродного белка. С этой целью могут использоваться эукариотические хозяйские клетки, которые обладают клеточной машинерией для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева хорошо известны в данной области.

При необходимости стабильно трансформированная клеточная линия может продуцировать вариант по изобретению. Множество векторов подходящих для стабильной трансфекции клеток млекопитающих доступно широкому кругу лиц, способы для конструирования таких клеточных линий также публично известны, например, из Ausubel et al. (выше).

Настоящее изобретение также раскрывает композицию, содержащую варианты химозина по изобретению. Композиция необязательно может включать другие ингредиенты, такие как, например, другие ферменты, например, пепсин. Такая композиция может включать вариантный полипептид изобретения или полипептид, полученный способом изобретения для идентификации вариантного химозина.

Кроме вариантного химозина, и одного или нескольких дополнительных ферментов, в случае наличия, композиция по изобретению может содержать добавки, которые обычно используются в сычужных ферментах животного происхождения, например NaCl.

Изобретение также относится к применению вариантного полипептида по изобретению или композиции изобретения при приготовлении сыра. Соответственно изобретение относится к способу получения сыра, который включает добавление эффективного молокосвертывающего количества вариантного химозина по изобретению или композиции изобретения в молоко и проведение соответствующих дополнительных стадий изготовления сыра.

Иначе говоря, в изобретении предлагается способ приготовления сыра, включающий: (i) добавление в молоко варианта химозина или композиции по изобретению для осуществления свертывания молока, в результате чего получается свернувшееся молоко; и (ii) переработка свернувшегося молока в сыр.

В таком способе изготовления сыра из молока молоко может быть коровьим молоком, верблюжьим молоком, буйволиным молоком, козьим молоком, овечьим молоком и смесью любых таких типов молока. Полипептид изобретения приводит к быстрому раннему развитию созревания из-за быстрого первого расщепления в альфа s1-казеине, но также приводит к возможности пролонгированного хранения сыра из-за высокого значения C/P. Быстрая обрабатываемость требует высокой протеолитической активности, а длительное хранение требует низкой протеолитической активности на казеиновом матриксе. Полипептид изобретения, как правило, объединяет оба этих свойства.

Соответственно изобретение также охватывает применение полипептида или композиции изобретения при приготовлении сыра. Результатом такого применения по изобретению может стать сыр с улучшенной обрабатываемостью, в частности по показателю измельчаемости/способности к нарезанию ломтиками, и/или улучшению созревания и/или улучшению свойств хранения. Эти свойства описаны ниже.

Улучшенная измельчаемость/способность к нарезанию ломтиками в данном контексте относится к сыру, который может быть измельчен/нарезан ломтиками в течение более длительного периода, чем соответствующий сыр, изготовленный с бычьим или верблюжьим химозином (например, с химозином с SEQ ID NO: 2 или 4, соответственно), или к более раннему созреванию, чем сыр, изготовленный с верблюжьим химозином (например, химозином с SEQ ID NO: 4).

Улучшенное хранение в данном контексте относится к сыру, который может быть нарезан стружкой/тонко нарезан в течение более длительного периода, чем соответствующий сыр, изготовленный с бычьим или верблюжьим химозином (например, с химозином с SEQ ID NO: 2 или 4, соответственно), или в течение более продолжительного времени во время созревания, чем сыр, изготовленный с бычьим химозином (например, с SEQ ID NO: 2).

Таким образом, использование полипептида по изобретению приводит к получению коагулянта для производства сыра, конкретно, молодого сыра для промышленного применения, который может храниться в течение продолжительного периода, но также может обрабатываться на раннем этапе созревания без длительного хранения.

Изобретение относится к сыру, получаемому таким способом.

Ссылку данного документа на патентный документ или другой материал, которая приведена в качестве предшествующего уровня техники, не следует понимать как признание того, что документ или материал был известен или что информация, которую он содержит, была частью общедоступных знаний, в тот момент, который соответствует дате приоритета любого из пунктов формулы изобретения.

Описание каждой ссылки, представленной в данном документе, включено сюда ссылкой в полном объеме.

Изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами.

Примеры

Материалы и методы

Состав среды

Среда YEP2D: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л бактопептона, 40 г/л глюкозы. pH довели до 6,7 с помощью 4N NaOH. Среду автоклавировали в течение 30 мин при 110°C.

Среда YEP2D/MES: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л бактопептона, 40 г/л глюкозы, 20 г/л MES. pH довели до pH 6,7 с помощью 4N NaOH. Среду автоклавировали в течение 30 мин при 110°C.

Чашки с YEP2D содержали среду YEP2D с 1,8-2% агара. Среду автоклавировали в течение 30 мин при 110°C и разливали в чашки Петри.

Состав буфера

Буфер NaOH-MES: готовили MES-буфер при pH 6,05, содержащий 50 г/кг MES и разводили 1 объемом 4 N NaOH 7 объемами MES-буфера.

Штаммы

GG799: Этот штамм *Kluveromyces lactis* использовали в качестве штамма дикого типа. Этот штамм получали из New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США.

Методы молекулярной биологии

Использовали молекулярно-биологические методы, известные специалистам (см. Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). Примеры общей конструкции экспрессирующих векторов для сверхэкспрессии гена, трансформации, применения маркеров и селективных сред можно обнаружить в WO 2007060247, WO 2010102982 и US 4943529 и представленных в них ссылках.

Активность сворачивания (C)

Раствор молока получали путем добавления 11 г молочного порошка "Nilac" (NIZO Food Science, Эде, Нидерланды) к 100 мл 4,5 mM CaCl₂ (конечная pH 6,6-6,7). Раствор перемешивали в течение 30 мин и поддерживали в темноте в течение следующих 30 мин. После этого молоко было готовым и его использовали в течение получаса. Далее 5 мл молочного раствора добавляли в тестовую пробирку и предварительно инкубировали в течение 5 мин в водяной бане при 32°C. Реакцию начинали добавлением 100 мкл фермента к раствору молока. Свертывание молока отслеживали визуалью с течением времени. Момент начала коагуляции является точкой времени свертывания. Различные количества разведенного и очищенного препарата "Maxiren1800" (DSM Food-Specialties, Делфт, Нидерланды) использовали для получения эталонной кривой для определения активности. 100 мг "Maxiren 1800" растворяли в 15 мл H₂O, концентрировали и отмывали с помощью H₂O и 40 mM MES-NaOH, pH 5,7 с использованием центрифужного фильтра "Amicon Ultra", 10 кДа. Конечный объем довели до 5 мл. Осуществляли серии измерений свертывания при различных концентрациях (установленных на 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 и 20 IMCU/мл в стоковом растворе Maxiren) и определяли время свертывания для каждого разведения и связь между временем свертывания и количеством единиц в анализе. Время свертывания обнаруженное для протестированных образцов, рассчитывали обратно к активности IMCU оригинального стокового раствора "Maxiren", определенной в данном анализе и выражали в Ед./мл. Эту молокосвертывающую активность протестированных образцов использовали при расчете C/P (см. ниже).

Общая протеолитическая активность (P)

Протеолитическую активность оценивали с помощью натриевой соли казеина из коровьего молока (Sigma, C8654) в качестве субстрата. Реакционная смесь (750 мкл) содержала: 730 мкл субстрата (0,5% казеина в 33 mM MES, pH 5,8) и 20 мкл тестируемого образца. Реакционную смесь инкубировали в течение 120 мин при 32°C и реакцию останавливали путем добавления 250 мкл 12% (мас./мас.) ТХУ при интенсивном перемешивании на вибрационном смесителе. Для определения OD280 (t=0 мин) реакцию останавливали сразу же после старта. OD280 надосадочных жидкостей измеряли после центрифугирования при 12000 об./мин в течение 10 мин. Рассчитывали различие (deltaOD) между OD280 (t=120 мин) и OD280 (t=0 мин) и измерение протеолитической активности при pH 5,8 в тестируемых образцах. Протеолитическую активность (P) рассчитывали обратно к концентрации оригинального образца путем умножения на коэффициент 50 и использовали для расчета C/P (см. ниже).

Анализ профиля текстуры (ТРА)

Для текстурного анализатора с помощью сырного ножа отрезали кусок сыра толщиной 25 мм, толщину уменьшали до 20 мм с помощью электрического мясного слайсера для гарантии гомогенности толщины кусков. От куска сыра с помощью сырного щупа отрезали цилиндры шириной 16 мм. Образцы хранили в течение ночи в холодильнике при ~ 4°C в пластиковых пакетах с застежкой-молнией. Квадратный зажим (7×7 см) прикрепляли к Текстурному Анализатору "TA.HD.plus" (Stable Micro Systems). Образцы сыра сжимали на 70% десять раз со скоростью сжатия 1 мм/с.

Измерения записывали с помощью программы "Exponent". С помощью данной программы определяли положительное усилие пика, положительное расстояние пика, усилие пика, положительная площадь и отрицательная площадь двух пиков каждого измерения. С помощью "Excel" определяли дистанцию в начале второго пика. На основе этих данных могут быть рассчитаны хрупкость (пиковое усилие 1 (F)), твердость (пиковое положительное усилие 1 (H)), свойство сцепления (положительная площадь

2/положительная площадь 1 (A2/A1), клейкость (твердость*свойство сцепления), и липкость (отрицательная площадь 1 (A3)) (фиг. 1). Данные вводили в SPSS для статистического анализа с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием апостериорного критерия Тьюки (при однородности дисперсии) или с использованием апостериорного критерия Геймса-Ховелла (Games-Howell) (в случае, если нарушено допущение однородности дисперсии) для детекции значительных различий между сырами.

Гидролиз и анализ альфа-казеина

Готовили суспензию 20 мг/мл альфа-казеина из коровьего молока (C6780, Sigma) в буфере 50 мМ ацетата натрия pH 5,5, содержащего 0,02% азид натрия и делили на порции по 1 мл. Суспензию предварительно инкубировали в течение по меньшей мере 12 ч при 11°C в условиях непрерывного перемешивания при 1400 об./мин (Eppendorf thermomixer). Каждый коагулянт разводили в 50 мМ натрий-ацетатном буфере pH 5,5 до конечной концентрации 4 IMCU/мл и хранили в течение ночи при 4°C. Затем 100 мкл холодного стокового раствора коагулянта добавляли к 1 мл предварительно инкубированного субстрата. Инкубацию проводили при 11 или 30°C при продолжающемся перемешивании при 1400 об./мин. В качестве контроля вместо коагулянтного стока добавляли 50 мМ натрий-ацетатный буфер pH 5,5. Образцы по 60 мкл отбирали в различные временные точки и сразу же инкубировали в течение 10 мин при 75°C для инактивации коагулянта. Инактивированные образцы хранили на льду.

Затем к образцу добавляли такой же объем буфера, содержащего 0,1 М 1,3-бис[трис(гидроксиметил)метиламино]пропан (Bis-Tris), 8 М Мочевину, 0,3% 2-меркаптоэтанол (ME) и 1,3% тринатрий цитрат дегидрат (pH7) и инкубировали в течение 10 мин при 50°C. Данную смесь охлаждали до комнатной температуры перед забором 5 мкл образца и добавлением к 60 мкл буфера разведения, содержащего 62 мМ Tris и 0,7% ME (pH 7,6). Добавляли буфер для образца Nupage LDS (Life Technologies) в количестве 25 мкл. В конце добавляли восстанавливающий образец агент "Nupage" в объеме 10 мкл (Life Technologies) для достижения конечного объема 100 мкл, который инкубировали при 70°C в течение 5-10 мин перед началом анализа с использованием ДСН-ПААГ. На гель 10% Bis-Tris ДСН-ПААГ (Life Technologies) наносили 4 мкл образца и проводили электрофорез в буфере MES (Life technologies) в течение 15 мин при 50В и продолжали в течение 45 мин при 200В. Гель удаляли из камеры после электрофореза и окрашивали при комнатной температуре с использованием "Instant Blue" (Expedeon) в течение, по меньшей мере, одного часа и затем удаляли краситель в течение нескольких часов. Формировали изображение геля и фотографировали. Окрашенные белки количественно оценивали с использованием программного обеспечения "TotalLab TL 100, 1D analysis".

Пример 1. ДНК-конструкты и трансформация

Синтетические ДНК-конструкты спроектировали так, чтобы они начинались с рестрикционного сайта XhoI, кодирующего аминокислоты L и E за которым в рамке следует ДНК, кодирующая сайт расщепления кex-протеазы, с аминокислотами K и R, за которым в рамке следуют гены, кодирующие варианты бычьего про-химозина В, начиная с аминокислот А, Е, I и Т, и заканчивались рестрикционным сайтом PacI, сразу после стоп кодона. В качестве примера, ДНК-фрагмент, кодирующий последовательность бычьего про-химозина В дикого типа, перечислен как SEQ ID NO: 1, а ДНК-фрагмент, кодирующий последовательность верблюжьего про-химозина дикого типа, перечислен как SEQ ID NO: 3. Использование кодонов адаптировали согласно способу, описанному в патентной заявке US 090286280. Все варианты были разработаны схожим образом и клонированы в виде XhoI PacI - фрагментов в вектор pKLAC1 (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США).

Полученные открытые рамки считывания начинались с лидерной последовательности фактора спаривания альфа K. lactis и продолжались через сайт процессинга кex в варианты про-химозина В. Аминокислотные изменения, которые были введены в варианты бычьего химозина, изображены в табл. 1. Положение изменения указано в сравнении с последовательностью зрелого бычьего химозина В (SEQ ID NO: 2). Аминокислоты в некоторых положениях заменяли на различные другие аминокислоты, например, в положении K221 (вариант #5-7) и положении A51 (вариант #1 и 103). Некоторые другие варианты имеют множественные изменения, внесенные в аминокислотную последовательность химозина, такие как варианты #71, 74, 98, 103 и 110. Ген дикого типа, кодирующий неизменный белок бычьего прохимозина, также использовали в клонировании и трансформации гена и позднее использовали для сравнения с ферментами, сделанными из вариантных генами.

Таблица 1. Аминокислотные замены, введенные в белковую последовательность бычьего химозина В. Аминокислоты изображены согласно однобуквенной аннотации. Нумерация указана относительно SEQ ID NO: 2

Вариант #	Аминокислотная замена									
1	A51V									
5	K221L									
6	K221M									
7	K221V									
62	V223Q									
71	A51V	K221V								
74	A51V	K221M								
98	A51V	K221V	S135T	A126G	S273Y	Q240E				
103	A51I	K221T								
110	A51V	K221V	N50D	N144H	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E	

Трансформацию и отбор штаммов осуществляли электропорацией и селекцией на ацетамид-содержащих чашках, в частности, как описано в WO2 007/060247. Плазмиды лианеризовали расщеплением с помощью SacII и трансформировали электропорацией штамм *Kluuyveromyces lactis* GG799. По шесть трансформантов каждого конструкта тестировали на выработку химозина с помощью ферментаций в перемешиваемых колбах, и наилучший продуцирующий трансформант выбирали для дальнейшего анализа.

Пример 2. Культивирование, активация и концентрирование

Штаммы *Kluuyveromyces lactis*, несущие мутантный ген бычьего про-химозина помещали в чашки YEP2D-агаром и выращивали в течение 48 ч при 30°C. Прекультуру в 20 мл среды YEP2D в 100 мл колбах Эрленмейера инокулировали дрожжевыми клетками, взятыми из чашек. Культуры выращивали в течение 24 ч в инкубируемом шейкере при 30°C и 250 об./мин. Количество прекультуры для инокуляции новых 500 мл колб Эрленмейера со 100 мл среды YEP2D/MES рассчитывали для получения конечного OD600 = 0,01. Эти основные культуры выращивали в течение 65 ч в инкубируемом шейкере при 30°C и 250 об./мин. Для сохранения штамма 2 мл прекультуры центрифугировали (400 об./мин в течение 10 мин), клеточный осадок суспендировали в 0,7 мл 70% глицерина и хранили при -60°C.

Прохимозин конвертировали (активировали) в зрелый химозин с помощью pH-стадии, описанной ниже. 35 г бульона основной культуры после 65 ч культивирования центрифугировали при 8000 об./мин в течение 15 мин (10°C) и 17 мл надосадочной жидкости использовали для активации прохимозина. Активацию завершали добавлением разведенной соляной кислоты (1N) в малых аликвотах (как правило, добавлением 1N HCl в 50-200 мкл объеме) к образцу, обеспечивая хорошее перемешивание для того, чтобы избежать локальных эффектов pH. pH образца корректировали до 2,35-2,40 (pH ростовой культуры составляла 6,7-6,9). Через 30-90 мин инкубации при 30°C pH корректировали до 6,05 ± 0,05 с помощью буфера MES-NaOH.

Активированные образцы химозина сконцентрировали в 20 раз, а компоненты среды отмывали 40 мМ mM MES-NaOH, pH 5,7 с использованием диафильтрации. Для этого использовали центрифужный фильтр "Amicon Ultra", 10 кДа. Начальный объем активированного образца составлял 20 мл, а объем конечного концентрированного образца составлял 1 мл. Образцы были составлены путем добавления 1 мл глицерина. Степень конечной концентрации, следовательно, являлась 10-кратной. Эти образцы использовали для всех образцов, описанных позже. Для анализа уровня экспрессии химозина и для проверки степени активации образцы загружали на 4-12% градиентный ДСН-ПААГ (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen). Использовали следующий маркер молекулярных масс: "SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard", Invitrogen (188, 98, 62, 49, 38, 28, 17, 14, 7, 3 кДа). Активация прохимозина по всей видимости была полной во всех вариантах химозина.

Пример 3. Определение активности

Специфичность химозина (C/P) является важным параметром для функциональных свойств фермента в процессе изготовления сыра. Специфичность индивидуального образца химозина может быть рассчитана путем деления молокосвертывающей активности (C) на общую протеолитическую активность (P). В описанных в данном документе экспериментах использовали относительное C/P. Для этого C/P, рассчитанное для конкретного варианта, делили на C/P, рассчитанное для "Maxiren 1800". Относительное C/P для "Maxiren 1800" составило 1,0.

Как видно из табл. 2, когда варианты с мутациями в положении A51 и/или K221 тестировали данным образом, все демонстрировали более высокое относительное соотношение C/P, чем "Maxiren". Варианты 1-7 все имеют мутации в положении A51 и/или K221 зрелого телячьего химозина В. Хотя одиночные мутанты 1, 5, 6 и 7 дали относительно умеренное увеличение C/P, удивительно, что комбинация мутаций в положениях A51 и K221 (варианты 71, 74, 98, 103 и 110) дали синергичный эффект на увеличение C/P. Относительное C/P, измеренное в этих образцах, было намного выше, чем у любого из коагу-

лянтов, описанных Kappelle et al. Коагулянт с наивысшим относительным C/P в их исследовании является рекомбинантным верблюжьим химозином со значением C/P равным 7, относительно бычьего химозина. Этот верблюжий химозин в настоящее время продается под торговым названием "Chymax M" (Chr. Hansen).

Таблица 2. Относительное C/P, рассчитанное для различных вариантов химозина

Вариант #	Отн. (среднее)	C/P
1	5,3	
5	1,2	
6	1,2	
7	4,1	
62	1,6	
71	16,8	
74	12,2	
98	15,1	
103	23,1	
110	23,1	

Пример 4. Выработка миниатюрного сыра моцарелла с помощью вариантов химозина

Миниатюрную моцареллу производили в 1-литровом масштабе. Использовали необезжиренное, неомогенизированное молоко ("Demeter", органическое молоко, полученное из местного магазина здорового питания), которое доводили до температуры 34°C. В качестве стартовой культуры использовали DelvoTEC TS80M в количестве 2 единицы на 1000 л молока (получено из DSM Food Specialties, Делфт, Нидерланды). Молоко инкубировали в течение 60 мин перед добавлением сычужного фермента (60 IM-CU/л). Молоку давали свернуться в течение 60 мин, после чего коагулят разрезали специально спроектированными кусачками. Смесь сгустка/сыворокты оставляли на 10 мин для восстановления, после чего начинали кулинарную стадию. Температуру повышали до 41°C в пределах получаса, при периодическом перемешивании. При достижении заявленной температуры приготовления регулярно проверяли pH и когда в смеси сгусток/сыворотка pH достигала 6,2, сгусток отжимали и начинали стадию чеддеризации. В ходе этой фазы кусок сгустка делили напополам и аккуратно помещали в стопку и каждые 15 мин стопку переворачивали. При достижении pH 5,1-5,2 сгусток перемалывали и солили до доли 3% (мас./мас.). После 2 мин разрыхления добавляли 400 мл горячей воды, 80°C, и растягивали и формовали сгусток вручную в течение 3 мин. После этого маленькие шары моцарелла помещали на лед и охлаждали. После охлаждения шары моцарелла сушили с помощью папиросной бумаги и упаковывали под вакуумом и давали созреть при 4°C.

Таблица 3. Общий азот (TN), растворимый азот (SN) и аминокислотный азот (AN) определяли в 2-х недельных сырах моцарелла, изготовленных с помощью выбранных вариантов. Контролями являются сыры, изготовленные с помощью "Maxiren" и "Chymax M"

Использованный фермент	сычужный	TN (%)	SN (%)	AN (%)	SN/TN	AN/TN
«Chymax M»		3,54	0,09	0,025	2,5	0,7
«Maxiren»		3,56	0,17	0,02	4,8	0,6
#71		3,57	0,185	0,02	5,2	0,6
#74		3,53	0,15	0,02	4,2	0,6
#103		3,55	0,165	0,025	4,6	0,7

Результаты этого эксперимента показаны в табл. 3. Содержание азота различных сыров определяли с помощью Qlip (Нидерланды) с использованием стандартных процедур. Удивительно, что после 2 недель созревания содержание растворимого азота (SN) в сырах моцарелла, изготовленных с вариантами 71, 74 и 103, схоже с SN, измеренным в сыре с "Maxiren", хотя C/P этих вариантов намного выше. "Chymax M", который имеет C/P равное 7 (Kappelle et al), демонстрирует более низкое значение SN.

Пример 5. Получение сыра чеддер с помощью вариантов химозина

Bansal et al. (Int. Dairy J. 19, 510-517 (2009)) была предложена возможность использования рекомбинантного химозина верблюда для изготовления сыра чеддер с более твердой текстурой. Предполагали, что эти эффекты связаны с более низкой протеолитической активностью и более высоким соотношением C/P верблюжьего химозина по сравнению с телячьим химозином. Так как варианты телячьего химозина, описанные в данном документе, имеют еще более высокое относительное значение C/P, то нам бы хотелось исследовать эти коагулянты при приготовлении сыра чеддер.

Сыр чеддер готовили на пилотном производстве Биотехнологического центра DSM (Delft, Нидерланды) с использованием варианта 74 и сравнивали с контрольным образцом чеддера, приготовленным с использованием рекомбинантного телячьего химозина (готовые пищевые "Maxiren 600": DSM) или рекомбинантного верблюжьего химозина ("Chymax M": Chr. Hansen). Сыры чеддер готовили на пилотном производстве с использованием трех сырных ванн на 200 л. Сырные ванны наполняли 175 л необезжи-

ренного пастеризованного коровьего молока и устанавливали температуру до 32°C. Добавляли стартовую культуру (DelvoTEC LL50A) до уровня 4 единицы на 1000 л сырного молока. В каждую ванну добавляли также хлорид кальция (50 мл 33%-раствора). Через час предварительного созревания в сырную ванну добавляли сычужный фермент и смешивали перед тем, как оставить для коагуляции. Было обнаружено, что IMCU-дозировку варианта 74 можно было уменьшить на 20% по сравнению с "Maxiren" для получения аналогичной коагуляции сырного молока. Таким образом, добавляли 47 IMCU/л для "Maxiren 600" и 37,6 IMCU/л как для "Chymax M", так и для #74. После образования достаточного твердого желе коагулят разрезали с использованием ножей. В течение 10 мин желе разрезали с использованием градиента скорости (от 0 до 11). По истечении этого времени начинали стадию варки и через 30 мин температуру смеси сгустков/сыворожки повышали до 38°C с непрерывным перемешиванием смеси со скоростью 16. После достижения данной температуры смесь сгустков/сыворожки перемешивали до достижения pH 6,2, при котором сгустки высушивали. За этим следует стадия чеддеризации, в которой образовавшиеся куски сгустков поворачивали каждые 15 мин и укладывали стопкой после второго переворачивания. После того, как pH кусков сгустков падала до 5,3, куски перемалывали и мариновали (645 г соли добавляли к перемолотым сгусткам 175 л обезжиренного молока). Посоленные, перемолотые сгустки оставляли размягчаться в течение 15 мин перед переносом в прямоугольные сырные формы. Сыры прессовали в течение ночи при 4 бар. После прессования сыры упаковывали под вакуумом и давали созреть при 11°C.

Пример 6. Анализ текстурного профиля сыра чеддер

Сыры, полученные в примере 5, использовали для анализа текстурного профиля (ТРА) во время 12-недельного созревания. Для каждого момента времени кусок сыра подходящего размера отрезали от бруса сыра и повторно упаковывали. Результаты анализа твердости с использованием анализа сыров ТРА описаны в разделе "Материалы и Методы" и результаты представлены на фиг. 2.

Неожиданно оказалось, что в ранние периоды времени (1-2 недели) развитие твердости сыров, полученных с использованием варианта химозина #74, отличалось от сыров, полученных с использованием "Chymax M", но было более похоже на сыры, полученные с использованием "Maxiren". Этого не ожидали, так как вариант #74 имел относительное значение C/P, которое было даже больше, чем относительное значение C/P "Chymax M". Кроме того, связанные с этим измерения клейкости показали, что она ниже, чем у сыра, приготовленного с использованием "Chymax M" и более похожа на сыр, приготовленный с использованием "Maxiren". В первые несколько недель никаких значительных различий между всеми сырами не было обнаружено по другим текстурным параметрам, например, клейкости.

Неожиданно через несколько недель размягчение в сыре с вариантом #74 остановилось, и твердость оставалась постоянной на уровне, аналогичном твердости сыра, приготовленного с использованием "Chymax M".

Кроме твердости также вовремя проявилась клейкость сыров. Результаты изображены в табл. 4. В течение первых 5 недель созревания различия в клейкости между различными сырами были небольшими и попадали в интервал ошибки эксперимента. Однако через 5 недель созревания клейкость сыра, приготовленного с использованием "Maxiren", стала более выраженной, в то время как сыры, приготовленные с использованием "Chymax M" и #74, не демонстрировали повышенной клейкости.

Таким образом, ТРА продемонстрировал, что на раннем этапе созревания сыра сыр, приготовленный с использованием варианта химозина #74, выглядит как сыр, приготовленный с использованием "Maxiren", но в более поздние моменты времени он больше похож на сыр, приготовленный с использованием "Chymax M".

Таблица 4. Клейкость, измеренная с помощью ТРА на сырах, приготовленных с использованием #74, "Maxiren" и "Chymax M" в качестве коагулянта и созревших в указанное время, выраженное в днях

t (д)	74	«Maxiren»	«ChymaxM»
6	-0,09	-0,23	-0,26
13	-0,08	-0,18	-0,13
20	-0,23	-0,15	0,00
27	-0,24	-0,37	-0,04
33	-0,22	-0,40	-0,08
41	-0,33	-1,51	-0,14
47	-0,30	-1,09	-0,19
55	-0,35	-0,99	-0,48

Пример 7. Нарезка сыра чеддер

Сыр чеддер, полученный в примере 5, разрезали на куски примерно по 250 г с помощью сырного ножа на различных стадиях созревания. Каждый кусок был измельчен с помощью терки для сыра (Santos; версия 2), снабженной стандартным стальным диском с 3 мм отверстиями, прикрепленным к мотору с 1500 об./мин. Натертый сыр в количестве 100 г наносили на верхнюю часть предварительно взвешенного сита с отверстиями 4,00 мм (Endecotts Ltd.), снабженного предварительно взвешенным резервуаром. Тертый сыр распределяли по поверхности сита руками. Стопку заполненного сыром сита с резервуаром помещали на вибрационную пластину шейкера для сит (Octagon D 200; Endecotts Ltd.) и

надежно зажимали. Просеивание осуществляли при уровне амплитуды 6 в течение 6 мин с прерывистой вибрацией 0,4 мин при 8°C. Затем сито и резервуар взвешивали отдельно. Количество сыра в резервуаре определили как мелкая фракция и рассчитывали после коррекции массы пустого резервуара. Процент мелкой фракции рассчитывали с учетом нанесенного тертого сыра в количестве, представленном в табл. 5.

Таблица 5. Процент (мас./мас.) мелкой фракции (< 4 мм) при измельчении сыров Чеддер, изготовленных с различными коагулянтами и созревших в течение указанного периода времени

Неделя	#74	«Maxiren»	«Chymax M»
	10,82		
1	%	8,61%	16,83%
2	7,76%	4,75%	14,42%
3	5,84%	2,99%	8,00%
4	7,14%	4,10%	7,69%
6	6,48%	3,81%	7,65%

Как видно из табл. 5, количество мелкой фракции сыра чеддер, изготовленного с "Chymax M" неприемлемо высоко в ранние временные точки созревания. Количество мелкой фракции, полученной из сыра чеддер, изготовленного с #74, более схоже с количеством для сыра, изготовленного с "Maxiren". Этот результат был неожиданным, поскольку Вариант #74 имеет очень высокое С/Р, и, следовательно, ожидалось, что он будет реагировать также как "Chymax M" в ходе созревания. Однако количество мелкой фракции при измельчении молодых сыров явно снизилось, и этот вариант, следовательно, имеет преимущество перед сырами, полученными с "Chymax M".

Вариантные химозины, описанные в данном документе, следовательно, имеют преимущество при измельчении очень молодых сыров по сравнению коагулянтот типа "Chymax M" и преимущество для более старых сыров по показателю уменьшения липкости по сравнению коагулянтот типа "Maxiren".

Пример 8. Протеолитическая активность вариантов химозина на альфа-казеин

Мы протестировали активность различных вариантов химозина на деградацию альфа-казеина *in vitro*, для определения протеолитической специфичности различных вариантов и сравнения с "Maxiren" и "Chymax M". Альфа s1-казеин известен как первая мишень химозина во время созревания сыра и, следовательно, является релевантным субстратом для тестирования активности различных коагулянтот.

Процедура осуществления гидролиза альфа-казеина и количественной оценки гидролитических продуктов описана в разделе "Материалы и Методы". Интенсивность пикселей полос различных (деградированных) казеинов суммирована в табл. 6 и 7. "αs1 CN" служит для обозначения полосы интактного, негидролизованного αs1-казеина, "αs1-I CN" служит для обозначения полосы, мигрирующей непосредственно перед полосой αs-1 казеина, которая была описана как первый продукт гидролиза αs1-казеина, когда химозин расщепляет связь F23F24. С-концевой продукт гидролиза этого называется αs1-I казеином или αs1-CN (f24-199). Разделение и расположение полос αs1 и αs1-I также описано в литературе и может быть установлено и количественно оценено с помощью различных способов, помимо способа, описанного в данном документе. См., например, Bansal et al (2009) International dairy Journal 19, 510-517, и Borsting et al. (2012) Dairy Sci. & Technol. 92, 593-612. "Small" служит для обозначения интенсивности всех меньших продуктов деградации, все еще видимых с помощью ДСН-ПААГ как описано в "Материалах и Методах". Понятно, что более жесткая деградация альфа-казеина, которая будет приводить к даже еще более меньшим пептидам, в любом случае не детектируется ДСН-ПААГ.

Результаты, представленные в табл. 6, получены при инкубации альфа-казеина с различными вариантами химозина при 11°C, хотя результаты, представленные в табл. 7 получают инкубацией при 30°C.

Таблица 6. Гидролиз альфа-s1 казеина с различными вариантами химозина. Инкубацию осуществляли при 11°C в течение указанного времени. Интенсивность различных белков определяли сканированием окрашенных полос после разделения с помощью ДСН-ПААГ

Коагулянт	6 часов				24 часа			
	Объем (x E6)		αs1-1 Small	CN/αs1	Объем (x E6)		αs1-1 Small	CN/αs1
αs1 CN	αs1-1 CN	αs1 CN			αs1-1 CN			
нет	37,4	0,0	0,0	0,0	34,7	0,0	0,0	0,0
«Chymax M»	27,3	12,8	0,0	0,5	12,5	16,2	11,0	1,3
«Maxiren»	11,4	21,2	0,0	1,9	1,6	15,9	6,7	9,7
1	20,5	18,8	0,0	0,9	5,8	23,6	0,0	4,1
6	18,1	18,9	0,0	1,0	5,1	22,2	4,3	4,3
7	10,7	22,8	0,0	2,1	2,8	18,2	10,5	6,4
71	8,8	25,4	0,0	2,9	2,5	24,6	0,0	9,8
74	20,9	19,8	0,0	0,9	6,3	24,7	0,0	3,9

Таблица 7. Гидролиз альфа-s1 казеина различными вариантами химозина. Инкубацию осуществляли при 30°C в течение указанного времени. Интенсивность различных белков определяли сканированием окрашенных полос после разделения на ДСН-ПААГ

Коагулянт	16 часов Объем (x E6)		
	αs1 CN	αs1-I CN	Small
Нет	37,5	0,0	0,0
«Chymax M»	0,0	4,3	9,0
«Maxiren»	0,9	0,6	8,1
71	1,6	19,7	2,4
74	1,8	18,6	5,1
98	1,5	19,6	1,4
103	1,4	20,3	1,3
110	3,0	22,6	1,4

Из этих экспериментов совершенно ясно, что все варианты, которые содержат изменения в аминокислотах в положениях A51 и/или K221 зрелого телячьего химозина В, демонстрируют явный гидролиз при первом расщеплении альфа-s1-казеина, что приводит к быстрому образованию фрагмента альфа-s1-I казеина. Это быстрое первое расщепление схоже с ситуацией с телячьим химозином дикого типа ("Maxiren") и отличается от действия верблюжьего химозина ("Chymax M"), который демонстрирует медленное первое расщепление в альфа-s1 казеине. После данного первого расщепления гидролиз данного фрагмента проходил очень медленно при использовании вариантов, содержащих замены аминокислот в положениях A51 и/или K221 зрелого телячьего химозина В; фрагмент альфа-s1-I-казеина оставался по большей части интактным при инкубации, продолжающейся до 24 часов (табл. 6), или при повышении температуры до 30°C (табл. 7). Это контрастирует с профилем гидролиза как "Maxiren", так и "Chymax M", которые демонстрируют дальнейшую деградацию фрагмента альфа-s1-I.

Эти результаты и результаты, описанные в предыдущих примерах, предполагают, что первое расщепление альфа-s1-казеина требуется для быстрого развития сырной матрицы, что приводит к улучшению нарезания стружкой молодых сыров. Это свойство молекул варианта химозина, описанных в данном документе, контрастирует с другими коагулянтами с высоким значением C/P типа "Chymax M", описанных ранее. Высокое значение C/P вариантов коагулянтов приводит к очень медленной дальнейшей деградации альфа-s1-I-казеина, что приводит к тому, что сыр не становится слишком липким при более длительном созревании. Таким образом, измельчение будет все еще возможно после продолжительного хранения без серьезных потерь продукта из-за комкообразования и загрязнения.

Пример 9. Протеолитическая активность варианта химозина, мутированного в положении V223

Далее мы исследовали влияние варианта 62 на протеолитическую деградацию альфа-s1-казеина. Эксперимент осуществляли аналогично тому, как описано выше в примере 7, путем инкубации субстрата с различными коагулянтами при 11°C и анализа образцов в различные моменты времени. Результаты представлены в табл. 8.

На основании этих результатов понятно, что вариант 62 неожиданно демонстрирует поведение, аналогичное "Chymax M", в том, что касается активности в отношении альфа-s1-казеина. В отличие от телячьего химозина дикого типа ("Maxiren") вариант 62 демонстрирует медленный гидролиз при первом расщеплении альфа-s1-казеина и, таким образом, медленное накопление альфа-s1-I-казеина. Таким образом, было показано, что аминокислотная замена в положении V223 последовательности телячьего химозина приводит к очевидному изменению кинетики гидролиза данного первого расщепления альфа-s1-казеина. Этот результат говорит о том, что данное аминокислотное положение является важным в модулировании кинетики данного первого расщепления и, таким образом, является важным для раннего развития сыра.

Таблица 8. Гидролиз альфа-s1-казеина с различными вариантами химозина. Инкубацию осуществляли при 11°C в течение указанного времени. Интенсивность различных белков определяли сканированием окрашенных полос после разделения на ДСН-ПААГ

Коагулянт	6 часов Объем (x E6)			24 часа Объем (x E6)		
	αs1 CN	αs1-I CN	Small	αs1 CN	αs1-I CN	Small
Нет	37,4	0,0	0,0	34,7	0,0	0,0
Chymax M	27,3	12,8	0,0	12,5	16,2	11,0
Maxiren	11,4	21,2	0,0	1,6	15,9	6,7
62	26,7	12,9	0,0	13,4	19,9	4,1

Пример 10. Сенсорный анализ сыра чеддер

Через 12 недель созревания взяли образцы сыров чеддер, полученных в примере 5, и использовали для сенсорного анализа. Перед проведением сенсорной сессии на панели сыров сыры чеддер разрезали на кубики. Затем образцы помещали в расширенную полистироновую коробку для предотвращения их

нагревания. Продукты подавали в полистиреновом держателе для образцов с помощью часового стекла наверху для легкого перемешивания продуктов для получения достаточного свободного пространства при оценке аромата сыра чеддер. Для этих экспериментов использовали Количественный Описательный Анализ (QDA). Продукты оценивали дважды 13 тренированными дегустаторами сыров. Поскольку цель эксперимента заключалась в измерении различий между продуктами, продукты подавали случайным образом для того, чтобы избежать эффектов последовательности. Продукты подавали дегустаторам один за другим. Поскольку цель эксперимента заключалась в измерении различий между продуктами, продукты подавали случайным образом для того, чтобы избежать эффектов последовательности. Данные анализировали с помощью программного обеспечения "SenPaq" (QI-statistics). Статистически значимые различия продуктов рассчитывали с помощью ANOVA (дисперсионного анализа) для каждого атрибута. Если статистически значимая разница продуктов имела место, проводили анализ множественного сравнения для изучения, какие из продуктов отличаются от других. Только атрибуты, которые были отмечены как значимо отличные, описаны ниже.

Что касается атрибутов вкусового букета, то чеддер, изготовленный с "Chymax M", демонстрировал наименее интенсивный вкусовой букет. При этом соленый вкусовой букет был значимо ниже, чем в случае сыров, изготовленных с "Maxigen" и вариантом #74. Никаких значимых различий не было обнаружено по другим атрибутам вкусового букета. Следовательно, сыры, изготовленные с вариантом #74 отличаются от сыра, изготовленного с "Chymax M", главным образом в отношении интенсивности вкусового букета.

По атрибутам вкусовых ощущений сыры, изготовленные с "Maxigen", значительно отличались от сыров, изготовленных с "Chymax M" и #74. Сыр "Maxigen" был менее твердым, чем другие два образца. Как атрибут липкости, так и атрибут эластичности были оценены как более низкие в сырах с #74 и "Chymax M", чем в сыре с "Maxigen". Что касается вкусовых ощущений только атрибут жирности был значимо выше в сыре, изготовленном с #74, чем в сыре, изготовленном с "Chymax M". Во всех других аспектах сыр с #74 походил на сыр с "Chymax M".

Что касается атрибутов запаха, то между различными сырами не было выявлено никаких значимых различий.

Эти результаты демонстрируют, что развитие текстуры в сыре с #74 похоже на сыр с "Chymax M", тогда как развитие вкусового букета похоже на сыр с "Maxigen".

Пример 11. Получение сыра моцарелла

Необезжиренный моцарелла получали в 275-литровых сырных ваннах. Всего было сделано 6 сырных ванн: 2 повтора необезжиренного моцарелла с "Maxigen@600" и 3 повтора с коагулянтom #74.

Свежее коровье молоко стандартизовали до искомого уровня жир-белок; пастеризовали в течение 15 с при 73°C и охлаждали до 34°C. После наполнения сырных ванн к сырному молоку добавляли культуру *S. thermophilus*: 60 грамм TS-10C (DSM Food Specialties). Сырное молоко подкислялось в течение 45 мин перед добавлением коагулянта. К 3 сырным ваннам добавляли 19,0 мл "Maxigen@600"; 582 IMCU/мл. Для получения одинакового времени коагуляции 18,0 мл #74; 500 IMCU/мл добавляли к другим 3 сырным ваннам.

Через 35 мин свертывания коагулят разрезали и осторожно перемешивали в течение 20 мин. Температура смеси коагулят-сыворотка медленно поднимали до 41°C с помощью горячей воды в рубашке сырной ванны в течение 30 мин. После постепенного отделения сыворотки из сырной ванны, pH коагулята упала до pH 5,25 при непрерывном перемешивании коагулята.

Коагуляты солили 1,8 кг сухого хлорида натрия и переносили в устройство "cooker-stretcher", заполненное водой 68°C. Блоки сыра прямо из "cooker-stretcher" помещали в баню с рассолом 5% хлорида натрия; pH 5,3 и 1°C. Через 1 ч охлаждения в бане с рассолом сыры упаковывали под вакуумом и хранили при 7°C до анализа.

Результаты экспресс-анализа всех сыров показаны в табл. 9. Значения влажности являются относительно высокими, а значения pH являются относительно низкими для всех типов сыров.

Таблица 9. Анализ сыров моцарелла

Сыр	Сычужный фермент	% Влажности	% Жира	pH	% Соли
Необезжиренный 1	Maxiren	50,99	23,50	5,10	1,08
Необезжиренный 2	Maxiren	52,23	23,00	5,05	1,06
Необезжиренный 3	Maxiren	51,83	23,25	5,12	1,14
Необезжиренный 4	#74	50,81	23,00	5,12	1,12
Необезжиренный 5	#74	50,79	23,50	5,12	1,02
Необезжиренный 6	#74	51,34	23,75	5,15	1,16

Пример 12. Измельчения сыра моцарелла

Примерно по 500 г образцов каждого сыра измельчали в возрасте от одной до трех недель с помощью измельчителя для розничной торговли (Salad Shooter, National Presto Industries, О-Клэр, Висконсин). При измельчении добавляли 7,5 г "Solka-Floc" (International Fiber Cooperation, Норт-Тонаванда, Нью-Йорк) для предотвращения слипания кусочков. Кусочки проводили через набор Стандартных Сит США для Тестирования (Fisher Scientific, Сууони, Джорджия), при непрерывном встряхивании (W.S. Tyler, Ментор, Оклахома) в течение одной минуты. Количество сыра, оставшегося в каждом сите определяли по массе, и результат выражали как процент от общего измельченного сыра.

Распределение размеров кусочков для всех сыров показано в табл. 10. Значения, показанные для сыров "Maxiren" и #74, являются средними трех повторов. Распределение размера измельченных частиц для однонедельных сыров "Maxiren" и #74 являются похожими. Распределение размера кусочков для трехнедельных сыров "Maxiren" и #74 сместилось в большие размеры сит. Это произошло из-за более мягкой текстуры более старых сыров, что привело к комкованию кусочков. Этот эффект гораздо менее выражен в сыре, изготовленном с помощью коагулянта #74. Следовательно, способность к измельчению у более старых сыров улучшилась, когда использовали коагулянт с более высоким С/Р, по сравнению с сырами, сделанными с бычьим химозином дикого типа.

Таблица 10. Средний размер измельченных частиц после созревания сыра моцарелла в течение 1 и 3 недель. Изображен процент общей массы сыра, собранного на различных ситах

Время созревания	Сычужный фермент	Размер сита (мм)								
		25,0	19,0	12,5	9,5	8,0	6,3	4,0	Нет	
1 неделя	«Maxiren»	0,0	0,0	0,1	5,2	9,2	18,8	45,4	21,4	
1 неделя	#74	0,0	0,0	0,1	3,0	7,5	20,2	46,8	22,4	
3 недели	«Maxiren»	26,6	29,7	20,1	8,8	4,2	4,3	4,8	1,5	
3 недели	#74	2,3	10,4	25,8	16,2	10,4	10,2	16,7	7,9	

Пример 13. Поведение сыра Моцарелла при плавлении и растягивании

Тест растягивания вилкой использовали для оценки способности сыра растягиваться после приготовления пиццы. Замороженную основу для пиццы диаметром двенадцать дюймов покрывали 114 г соуса для пиццы и 284 г измельченного сыра (пример 12) равномерно распределяли по пицце. Затем готовили при 250°C в течение 6 минут в печи "Impinger". Давали пицце охладиться до 65°C. Вилку вставляли примерно на 2 см в сыр и поднимали над пиццей. Длину сыра до обрыва записывали как длину растягивания. Каждую пиццу тестировали в трех различных местах и среднюю длину растягивания для всех трех повторов сыров моцарелла показано в табл. 11. Средняя длина растягивания сыров с #74 была явно выше по сравнению с сырами с "Maxiren" при всех возрастах созревания, но особенно отличалась в более старых сырах. По-видимому, коагулянт с высоким соотношением С/Р дает сыр с более лучшей растяжимостью в созревших сырах.

Таблица 11. Средняя длина растяжения (см) сыров различного возраста после плавления на пицце

Время созревания	Сычужный фермент	
	«Maxiren»	#74
1 неделя	52	59
3 недели	38	43
9 недель	4	30

Пример 14. Протеолитическая активность вариантов верблюжьего химозина

Несколько вариантов химозина было получено фактически также, как описано в примере 1, но в данном случае на основании последовательности зрелого химозина верблюда (SEQ ID NO: 4). Амино-

кислоты в некоторых положениях в данном белке были заменены на некоторые другие аминокислоты. Перечень изменений, которые привели к релевантным изменениям протеолитического поведения химозина верблюда, описан в табл. 12. Гены для различных вариантов химозина верблюда клонировали и сверхэкспрессировали в *K.lactis* по существу также, как описано в примерах 1 и 2. Выделенные ферменты использовали для дальнейшего анализа C/P и активности альфа-s1 казеина. C/P вариантов химозина верблюда определяли как описано в разделе "Материалы и Методы" и примере 3. Определение активности вариантов верблюжьего химозина на альфа-s1 казеине и количественная оценка результатов были осуществлены как описано в разделе "Материалы и Методы".

Таблица 12. Аминокислотные замены, введенные в белковую последовательность верблюжьего химозина. Аминокислоты изображены согласно однобуквенному сокращению. Нумерация указана относительно SEQ ID NO: 4

Вариант #	Аминокислотная замена
136	F223C
137	F223D
138	F223E
139	F223L
140	F223M
141	F223N
142	F223Q
143	F223V
144	F223Y
145	F223I
146	Q288G
147	Q288H
148	Q288N
149	Q288R
150	Q288S
151	D290A
152	D290G
153	D290L
154	D290M
155	D290Q
156	D290S
157	D290T
158	L295F
159	L295I
160	L295K
161	L295M
162	L295R
163	L295T
164	L295Y
165	L295W
166	I297T
167	I297V

Несколько вариантов химозина верблюда показали значимое повышение протеолиза связи F23F24 в α s1-казеине, по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа. Результаты данного эксперимента изображены в табл. 13.

Таблица 13. Гидролиз альфа-s1 казеина различными вариантами верблюжьего химозина. Инкубацию осуществляли при 11°C в течение указанного времени. Интенсивность различных белков определяли сканированием окрашенных полос после разделения на ДСН-ПААГ

Вариант #	6 часов			24 часа		
	Объем (x E6) αs1 CN	αs1-I CN	(αSN1-1)/(αSN1)	Объем (x E6) αs1 CN	αs1-I CN	(αSN1-1)/(αSN1)
136	28,6	20,6	0,7	10,6	20,3	1,9
137	31,4	22,6	0,7	11,0	25,5	2,3
138	32,9	20,0	0,6	17,4	24,7	1,4
139	21,0	25,9	1,2	2,9	12,4	4,3
140	32,2	23,4	0,7	11,4	22,7	2,0
141	35,7	25,7	0,7	12,7	24,9	2,0
142	37,2	25,5	0,7	10,2	17,5	1,7
143	23,6	26,2	1,1	4,1	10,0	2,4
144	31,2	30,5	1,0	8,4	28,2	3,3
145	15,7	19,1	1,2	2,8	11,7	4,1
146	23,8	21,7	0,9	12,3	28,5	2,3
147	21,5	22,8	1,1	7,0	23,5	3,3
148	28,3	17,4	0,6	20,3	26,2	1,3
149	22,2	21,6	1,0	6,7	22,5	3,3
150	28,7	18,3	0,6	17,2	23,1	1,3
151	23,1	22,9	1,0	13,1	32,2	2,5
152	25,1	21,8	0,9	9,7	33,3	3,4
153	23,6	23,5	1,0	7,1	34,9	4,9
154	25,2	26,9	1,1	8,3	37,7	4,6
155	30,2	20,3	0,7	13,5	33,6	2,5
156	31,5	17,0	0,5	17,1	31,6	1,9
157	30,7	17,6	0,6	13,6	23,8	1,7
158	26,3	19,5	0,7	9,8	22,2	2,3
159	29,5	17,0	0,6	11,1	19,7	1,8
160	29,5	18,1	0,6	12,0	24,9	2,1
161	31,5	19,6	0,6	11,0	22,3	2,0
162	30,9	16,5	0,5	16,7	31,0	1,9
163	27,9	14,8	0,5	11,4	17,9	1,6
164	24,9	15,9	0,6	14,9	26,6	1,8
165	21,2	30,9	1,5	5,7	37,8	6,7
166	21,0	18,0	0,9	4,2	13,3	3,1
167	27,3	20,2	0,7	8,0	22,9	2,9
среднее для «Чумах М»	35,2	18,1	0,5	17,3	21,3	1,2
среднее для «Maxigen»	15,8	26,3	1,7	4,0	25,2	6,3

Таблица 14. Относительное С/Р, рассчитанное для различных вариантов химозина верблюда

Вариант #	Отн. С/Р
137	6,3
139	7,7
143	>10
144	>10
145	>10
146	5,1
147	8,0
149	5,9
151	8,3
152	>10
153	9,0
154	9,3
155	5,9
165	>10
166	3,1
167	8,1

Были определены С/Р различных вариантов верблюжьего химозина, а результаты отображены в табл. 14. С/Р всех протестированных верблюжьих вариантов были все явно выше, чем С/Р телячьего химозина.

Из этих экспериментов становится ясно, что химозин верблюда можно подвергнуть специфической модификации для получения повышенной гидролитической активности связи F23F24 αs1-казеина без серьезного уменьшения С/Р фермента. Такие варианты химозина верблюда могут, следовательно, подходить для производства сыров, которые могут быть подвергнуты обработке в ранний период созревания, в

отличие от химозина верблюда дикого типа (см. пример 7). Измельчение сыров, сделанных с такими химозинами будет, следовательно, возможно в ранний период созревания и после длительного хранения без серьезных производственных потерь из-за комкообразования и засорения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, обладающий активностью химозина и являющийся вариантом аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 химозина верблюда, причем вариант содержит одну или несколько замен аминокислотных остатков, локализованных в связывающем кармане S2, в положениях, соответствующих положениям 223, 288, 290, 295 или 297 при выравнивании относительно SEQ ID NO: 4,

при этом указанные замены выбраны из F223C, F223D, F223E, F223L, F223M, F223N, F223Q, F223Y, F223I, Q288G, Q288H, Q288N, Q288R, Q288S, D290A, D290G, D290L, D290M, D290Q, D290S, D290T, L295F, L295I, L295K, L295M, L295R, L295T, L295Y, L295W, I297T и I297V,

причем указанный вариант идентичен по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 4 и способен гидролизовать бычий альфа s1-казеин в положении F23F24 с более быстрым образованием первого фрагмента альфа-s1-казеина α s1-I CN (f24-199), чем верблюжий химозин дикого типа.

2. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по п.1.

3. Нуклеотидная конструкция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по п.2, функционально связанную с одной или несколькими регуляторными последовательностями, способными управлять экспрессией химозина в подходящей экспрессирующей клетке-хозяине.

4. Рекombинантный экспрессирующий вектор, содержащий нуклеотидную конструкцию по п.3.

5. Рекombинантная клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор по п.4.

6. Способ получения полипептида по п.1, включающий культивирование клетки-хозяина по п.5 в условиях, способствующих продуцированию химозина, и выделение указанного полипептида.

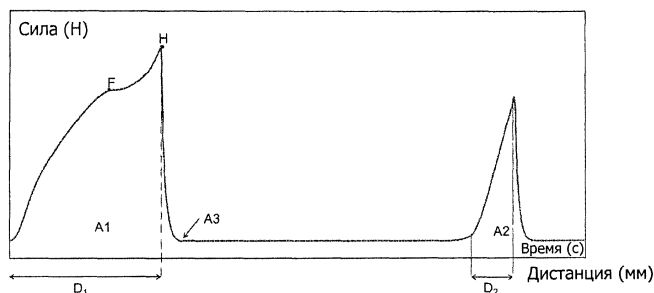
7. Композиция для получения сыра, содержащая полипептид по п.1.

8. Применение полипептида по п.1 при получении сыра.

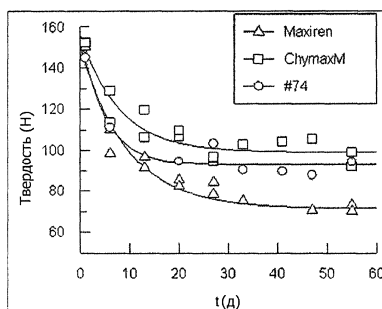
9. Применение по п.8 при получении сыра с улучшенной измельчаемостью/способностью к нарезанию ломтиками, и/или с улучшенной способностью к пролонгированному хранению, и/или с улучшенной способностью к раннему созреванию.

10. Способ получения сыра, включающий добавление эффективного молокосвертывающего количества полипептида по п.1 или композиции по п.9 к молоку и проведение дополнительных соответствующих стадий производства сыра.

11. Сыр, получаемый способом по п.10 и содержащий полипептид по п.1.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2