

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290572 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.02

(51) Int. Cl. C12N 9/12 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.27

(54) ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ЛАКТАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММОВ С ИЗМЕНЕННОЙ РЕГУЛЯЦИЕЙ

(31) 19194678.9

(32) 2019.08.30

(33) EP

(86) PCT/EP2020/073985

(87) WO 2021/037986 2021.03.04

(71) Заявитель:
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

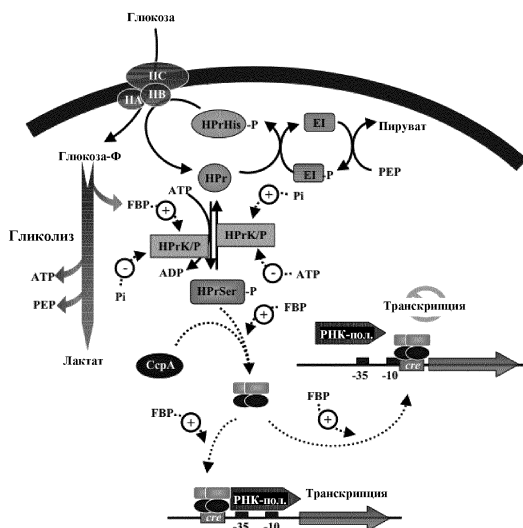
(72) Изобретатель:

Рай Ханс, Шёллер Шарлотта
Элизабет Грюнер, Соэренсен Ким Иб,
Ван Ден Бринк Йоханнес Мортен,
Зейдан Ахмад, Рау Мартин Хольм,
Гаспар Паула, Барой Георге Набин
(DK)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к новым усовершенствованным способам экспрессии нативных лактаз в их нативных хозяевах. Настоящее изобретение включает способы гомологичной, а также гетерологичной экспрессии лактазы в молочнокислых бактериях с измененной динамикой экспрессии.



A1

202290572

202290572

A1

РСТ/ЕР2020/07398

МПК: C12N 9/12 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ЛАКТАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММОВ С ИЗМЕНЕННОЙ РЕГУЛЯЦИЕЙ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым усовершенствованным способам экспрессии нативных лактаз в их природных хозяевах. Здесь описаны способы гомологичной, а также гетерологичной экспрессии лактазы в молочнокислых бактериях с измененной динамикой экспрессии.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Для роста на молоке для молочнокислых бактерий гидролиз лактозы является хорошим способом получить глюкозу и галактозу в качестве источника углерода. Лактаза (бета-галактозидаза; ЕС 3.2.1.23) представляет собой фермент, осуществляющий стадию гидролиза молочного сахара лактозы до моносахаридов. Коммерческое применение лактазы заключается в расщеплении лактозы в молочных продуктах. Люди с непереносимостью лактозы испытывают трудности с перевариванием молочных продуктов с высоким содержанием лактозы. Подсчитано, что около 70% населения мира обладает ограниченной способностью переваривать лактозу. Соответственно, существует растущий спрос на молочные пищевые продукты, которые не содержат лактозу или содержат ее лишь в очень незначительных количествах.

Лактазы были выделены из большого количества организмов, включая такие микроорганизмы, как *Kluyveromyces* и *Bacillus*. *Kluyveromyces*, особенно *Kluyveromyces (K.) fragilis* и *K. lactis*, и другие грибы, такие как грибы родов *Candida*, *Torula* и *Torulopsis*, являются распространенным источником грибных лактаз, тогда как *Bacillus (B.) coagulans* и *B. circulans* являются хорошо известными источниками бактериальных лактаз. В продаже имеются несколько препаратов лактазы, полученных из этих организмов, такие как Lactozym® (предлагаемый Novozymes, Дания), НА-Lactase (предлагаемый Chr. Hansen, Дания) и Maxilact® (предлагаемый DSM, Нидерланды), все из *K. lactis*. Все эти лактазы являются так называемыми нейтральными лактазами, имеющими оптимум pH между pH 6 и pH 8, а также температурный оптимум около 37°C. Когда такие лактазы используют в производстве, например, йогурта с низким содержанием лактозы, обработка ферментами будет проводиться либо на отдельной стадии перед ферментацией, либо придется использовать довольно высокие дозы

ферментов, поскольку их активность будет падать по мере снижения pH во время ферментации. К тому же эти лактазы не подходят для гидролиза лактозы в молоке, проводимого при высокой температуре, что в некоторых случаях было бы полезно для поддержания низкого микробного числа и, таким образом, обеспечения высокого качества молока. Кроме того, известные лактазы не подойдут для применения в требуемом процессе при производстве ультратермически обработанного (УНТ) молока, в котором ферменты добавляют перед УНТ-обработкой.

WO 2010092057 и WO 0104276 относятся к холодоактивным бета-галактозидазам. WO 07110619 относится к бета-галактозидазе с высокой трансгалактозилирующей активностью, тогда как WO 2009071539 относится к бета-галактозидазе с более низкой трансгалактозилирующей активностью.

Кроме того, было сообщено Sørensen *et al.* (в Chr-Hansen, US2015/0086675 A1), что некоторые штаммы *Lactobacillus (L.) delbreuckii* подвид *bulgaricus (Lb)* и *Streptococcus (S.) thermophilus (ST)* растут на лактозе и выделяют часть глюкозы в среду. Выделяемая глюкоза естественным образом подслащивает конечные продукты. Чтобы использовать лактозу в качестве источника углерода, эти штаммы продуцируют ферменты лактазы, которые гидролизуют лактозу до глюкозы и галактозы.

Экспрессия гомологов ферментов дикого типа в их природном хозяине наблюдается редко из-за относительно низких титров продуцируемых ферментов.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу получения обладающего активностью лактазы фермента молочнокислых бактерий, предпочтительно в присутствии лактозы, и/или предпочтительно, при котором молочнокислые бактерии могут быть выбраны из штаммов *Streptococcus* и/или *Lactobacillus*. Более предпочтительно молочнокислые бактерии могут быть выбраны из *Streptococcus thermophilus* и/или *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, как описано здесь. Кроме того, это изобретение также относится к применению молочнокислых бактерий, таких как *Streptococcus* и/или *Lactobacillus*, предпочтительно *Streptococcus thermophilus* и/или *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, как описано здесь.

Описанные здесь бактериальные штаммы, например штаммы *Streptococcus thermophilus*, ферментируют галактозу, кроме того, несут мутацию в последовательности ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота (DNA)) гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, причем эта мутация инактивирует белок глюкокиназу или оказывает

негативное влияние на экспрессию гена. Мутация в гене глюкокиназы приводит к получению мутанта, который, например, способен экспрессировать белок глюкокиназу, однако указанный белок является инактивированным или нефункциональным по сравнению с исходным штаммом, что приводит к отсутствию (выявляемой) активности глюкокиназы в указанном мутанте. Альтернативно, мутация также может приводить к отрицательному влиянию на экспрессию гена, что означает выявление некоторой глюкокиназной активности, однако фенотипический профиль штамма напоминает фенотипический профиль штамма с инактивированным белком.

Кроме того, штаммы *Streptococcus thermophilus* могут дополнительно содержать мутацию в гене переносчика глюкозы (*manM*). Эта мутация приводит к инактивации белка-переносчика глюкозы, ответственного за перенос глюкозы в клетку. Мутация в гене *manM* приводит к получению мутанта, который, например, способен экспрессировать белок-переносчик глюкозы, однако указанный белок является инактивированным или нефункциональным по сравнению с исходным штаммом, что приводит к отсутствию (выявляемой) активности переносчика глюкозы в указанном мутанте. Что удивительно, эти штаммы *Streptococcus thermophilus* все еще полностью способны подкислять молоко самостоятельно, хотя время подкисления до pH 5 задерживается на 2-5 часов. Поэтому они как таковые полезны при использовании ферментированного молока.

Бактериальные штаммы *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, описанные здесь, либо утратили способность расти на глюкозе в качестве источника углерода, либо проявляют пониженную способность расти в таких условиях по сравнению с их исходным штаммом(штаммами). Мутантные штаммы *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus* не только не потребляют глюкозу, выделяемую в молоко другими микроорганизмами, которые могут присутствовать, но также выделяют большое количество глюкозы в окружающую среду и, что удивительно, все еще полностью способны подкислять молоко, хотя время подкисления до pH 5 задерживается на 2-5 часов. Поэтому они как таковые полезны при использовании ферментированного молока.

Авторы изобретения обнаружили, что штаммы *S. thermophilus* с измененной регуляцией, такие как, например DSM 28889, DSM 25850, DSM 25851, DSM 26722, DSM 32227, и *Lb. delbreuckii* подвид *bulgaricus*, такие как, например DSM 26420, DSM 26421, продуцируют в 3-10 раз больше лактазы чем продуцируется их исходными штаммами,

если измерять в мг продуцируемого фермента в лабораторных ферментаторах, тем самым показывая, что эти штаммы могут быть использованы для получения ферментов, обладающих активностью лактазы.

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены штаммы с измененной регуляцией, обеспечивающие гомологичное продуцирование лактаз в их исходных хозяевах. Настоящее изобретение позволяет использовать указанные штаммы в качестве клеточных фабрик для гомологичного продуцирования лактаз с перспективой использования в промышленных масштабах. Полученные ферменты будут признаны негенетически модифицированными (не-ГМ) ферментами. Кроме того, эти штаммы также могут быть одновременно использованы для получения низколактозных или безлактозных молочных продуктов, таких как низколактозное молоко, низколактозный йогурт, низколактозный сыр, низколактозные кисломолочные продукты, безлактозное молоко, безлактозный йогурт, безлактозный сыр и/или безлактозный кисломолочный продукт.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Описанные здесь штаммы имеют мутации в гене глюкокиназы и не могут метаболизировать глюкозу, например, описанные здесь штаммы *Streptococcus thermophilus* имеют мутации в гене глюкокиназы, благодаря чему расщепляют лактозу и галактозу и выделяют глюкозу в окружающую среду при выращивании на молочном субстрате. Кроме того, эти штаммы имеют мутацию в гене переносчика глюкозы PTS, поэтому они не могут импортировать глюкозу с помощью этого механизма. Клетки выделяют образовавшуюся глюкозу в среду, а оставшуюся галактозу используют для роста. Поскольку галактоза менее предпочтительна для микроорганизма чем глюкоза, эти клетки реагируют на более низкий гликолитический поток, возникающий в результате использования только галактозы, сверхэкспрессией генов *lac* оперона (то есть *lacS* и *lacZ*), что экспериментально продемонстрировано здесь.

На основании описанных здесь примеров авторы настоящего изобретения обнаружили, что штаммы с измененной регуляцией могут быть использованы в качестве хозяев-продуцентов новых лактаз в промышленном масштабе и могут служить в качестве хозяев экспрессии как для гетерологичной, так и для гомологичной экспрессии конкретных лактаз.

Для подтверждения этой идеи и применения описанных здесь штаммов, то есть молочнокислых бактерий с измененной регуляцией и экспрессией лактаз, для экспрессии

лактаз в промышленном масштабе авторы изобретения провели ряд экспериментов, которые подробно рассмотрены ниже.

В соответствующем воплощении изобретение относится к новым способам получения лактаз посредством экспрессии указанных ферментов в их природном хозяине. Еще одна задача изобретения состоит в том, чтобы сделать бактериальные штаммы способными обеспечить коммерчески и технически осуществимое продуцирование лактаз, которые могут быть использованы, например, в молочных продуктах, таких как безлактозные или низколактозные продукты, для снижения содержания лактозы в продукте.

Чтобы проанализировать способность продуцирования лактазы этими штаммами, были проведены эксперименты по контролируемой ферментации с этими штаммами и их исходными штаммами дикого типа.

Наблюдали, что эти штаммы растут медленнее (данные не показаны), имеют более низкую конечную оптическую плотность OD_{600} (при 600 нм) (**таблица 4**) и продуцируют меньше экзополисахаридов (EPS) или капсульных полисахаридов (CPS) по сравнению с их исходными штаммами (данные здесь не показаны). После ферментации клетки собирали с помощью высокоскоростного центрифугирования. Образцы отбирали в Basemax (конец фазы экспоненциального роста) и в конце фазы стационарного роста (ЕОВ). Часть осадка клеток лизировали при использовании ультразвука, а клеточный дебрис удаляли посредством центрифугирования. Прозрачный супернатант использовали для анализа активности и измерения концентрации белка (**таблица 5**).

Мутант *Streptococcus thermophilus* показал примерно в 3-10 раз более высокую активность лактазы по сравнению с исходным штаммом. Аналогично этому мутант *Lb. delbreuckii* показал самую высокую активность лактазы среди протестированных образцов, 7700 ЕД/л ферментационной среды (**таблица 5**). Предварительно измеренные значения удельной активности лактаз *Lb. delbreuckii* подвида *bulgaricus* и *S. thermophilus* использовали для расчета количества фермента, продуцируемого на литр ферментационной среды. Мутанты и штаммы дикого типа продуцируют приблизительно 32 мг/л и 3-11 мг/л фермента лактазы соответственно. Измеренная более высокая активность мутантных штаммов была напрямую связана с их более высокой экспрессией ферментов лактаз.

Следовательно, текущие результаты показывают, что описанные здесь штаммы продуцируют большое количество ферментов лактаз и могут быть исследованы в

качестве хозяев для гомологичного (не-ГМ) продуцирования лактаз в промышленном масштабе.

Для гетерологичной экспрессии лактаз широкий спектр лактаз может быть экспрессирован с помощью описанной здесь технологии. Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что некоторые пептиды и димерные пептиды, проявляющие ферментативную активность бета-галактозидазы, неожиданно стабильны во многих различных физических условиях, обеспечивая относительно высокую активность за пределами диапазонов, обычно считающихся оптимальными для этого класса ферментов (таблица 1). Эти ферменты могут быть особенно применимы в контексте настоящего изобретения.

Соответственно, авторы настоящего изобретения идентифицировали ферменты, которые обладают относительно высокой активностью при температуре приблизительно 4°C или 5°C и, таким образом, могут быть использованы для гидролиза лактозы при получении, например, свежего молока. Кроме того, ферменты также обладают относительно высокой активностью в диапазоне температур от 10°C до 25°C, и, таким образом, те же самые ферменты могут быть использованы для гидролиза лактозы в УНТ-молоке. Эта применимость ферментов даже в широком диапазоне температур имеет большое значение, поскольку молоко может храниться при комнатной температуре/температуре окружающей среды, которая может быть разной в разных частях мира, а также в зависимости от времени года. Для УНТ-обработки температура обычно составляет либо приблизительно 135°C, либо приблизительно 140°C. Крайне желательно, чтобы ферменты могли проявлять активность в диапазоне температур до 140°C, чтобы их можно было добавлять в сырое молоко перед стадией УНТ. В современной практике фермент добавляют после стадии УНТ, потому что ферменты, известные в данной области техники, имеют значительное снижение функциональной активности, например до значения ниже измеримой активности, после стадии высокотемпературной обработки. Кроме того, молоко хранят при комнатной температуре, которая может значительно отличаться в разных частях мира.

Кроме того, было обнаружено, что эти пептиды, проявляющие ферментативную активность бета-галактозидазы, обладают активностью в диапазоне температур, обычно используемом для пастеризации. Соответственно, эти ферменты могут быть добавлены в сырое молоко перед пастеризацией. Следует понимать, что ферменты, известные в данной области техники, имеют значительное снижение функциональной активности,

например до значения ниже измеримой активности, после стадии пастеризации. Еще одним преимуществом этих пептидов, проявляющих ферментативную активность бета-галактозидазы, является то, что они имеют относительно низкую степень ингибирования галактозой. Более низкий уровень ингибирования галактозой этих новых ферментов имеет большое значение для применения, где требуются очень низкие концентрации лактозы. С точки зрения применимости для ферментированных продуктов очень выгодно, чтобы описанные здесь ферменты обладали высокой ферментативной активностью бета-галактозидазы в относительно широком диапазоне температур от 4°C до 43°C, например приблизительно при 37°C, при котором ферментация обычно была бы оптимальной, но также чтобы эта активность фермента бета-галактозидазы реализовалась при низком значении pH, например до 4,5; или до 4,0; или до 3,5; или даже до pH 3.

Активность бета-галактозидазы может быть определена посредством измерения количества высвобождаемой глюкозы после инкубирования с лактозой в заданных условиях. Высвобождаемая глюкоза может быть обнаружена с помощью цветной реакции.

Определения

Используемый здесь и в контексте настоящего изобретения термин «молоко» или «молочный субстрат» следует понимать как продукт секреции молочной железы, полученный при доении любого млекопитающего, такого как корова, овца, коза, буйволица или верблюдица. Термины в контексте настоящего изобретения могут представлять собой любой сырой и/или переработанный молочный материал. Полезные молочные субстраты включают растворы/суспензии любого молока или молокоподобных продуктов, содержащих лактозу, таких как цельное молоко или молоко пониженной жирности, обезжиренное молоко, пахта, низколактозное молоко, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, растворы сухого молока, УНТ-молоко, молочная сыворотка, сывороточный пермеат, кислая молочная сыворотка, сливки, кисломолочные продукты, такие как йогурт, сыр, пищевая добавка и пробиотические диетические продукты, но не ограничиваются ими. Как правило, термины относятся к сырому или переработанному молочному материалу, который подвергается дальнейшей обработке для производства молочного продукта.

Используемый здесь термин «композиция, содержащая лактозу» относится к любой композиции, такой как любая жидкость, которая содержит лактозу в

значительной измеримой степени, такой как содержание лактозы выше 0,002% (0,002 г/100 мл). В этот термин входят молоко и молочные субстраты.

Термины «исходный штамм», или «родительский штамм», или «оригинальный штамм» являются здесь взаимозаменяемыми синонимами и используются для обозначения штамма, от которого происходит мутант.

Используемый здесь термин «молочный продукт» может относиться к любому пищевому продукту, в котором один из основных компонентов имеет молочную основу. Обычно основной компонент имеет молочную основу, а в некоторых воплощениях основным компонентом является молочный субстрат, который был обработан ферментом, обладающим бета-галактозидазной активностью, в соответствии со способом по настоящему изобретению. Молочный продукт по изобретению может представлять собой, например, обезжиренное молоко, молоко пониженной жирности, цельное молоко, сливки, УНТ-молоко, молоко с увеличенным сроком хранения, кисломолочный продукт, сыр, йогурт, сливочное масло, молочный спред, пахту, кисломолочный напиток, сметану, напиток на основе молочной сыворотки, мороженое, сгущенное молоко, вареное сгущенное молоко или молочный напиток с вкусовым наполнителем. Молочный продукт может дополнительно содержать немолочные компоненты, например растительные компоненты, такие как, например растительное масло, растительный белок и/или углеводы растительного происхождения. Молочные продукты могут также содержать дополнительные добавки, такие как, например ферменты, ароматизаторы, микробные культуры, такие как пробиотические культуры, соли, подслащивающие вещества, сахара, кислоты, фрукты, фруктовые наполнители, фруктовые соки или любой другой компонент, известный в данной области техники в качестве компонента или добавки к молочному продукту.

Используемый здесь термин «ферментированный молочный продукт» следует понимать как любой молочный продукт, в котором любой тип ферментации является частью производственного процесса. Примерами ферментированных молочных продуктов являются такие продукты, как йогурт, пахта, крем-фреш, мягкий творог (кварк) и свежий сыр. Ферментированный молочный продукт может быть получен посредством любого способа или включать стадии любого способа, известного в данной области техники.

Используемый здесь термин «ферментация» относится к превращению углеводов в спирты или кислоты под действием микроорганизма. В некоторых воплощениях

ферментация по настоящему изобретению включает превращение лактозы в молочную кислоту. В контексте настоящего изобретения «микроорганизм» может включать любую бактерию или грибок, способные ферментировать молочный субстрат.

Используемый здесь термин «пептид, проявляющий ферментативную активность бета-галактозидазы» или «фермент, обладающий активностью лактазы» относится к любому пептиду или ферменту, который обладает ферментативной активностью, чтобы катализировать гидролиз дисахарида лактозы до его составляющих моносахаридов глюкозы и галактозы. Этот пептид или фермент также может называться лактазой или просто бета-галактозидазой (ЕС: 3.2.1.23).

Термины «пептид» и «олигопептид», используемые в контексте настоящей заявки, считаются синонимами (как это общепризнано), и каждый термин может быть использован взаимозаменяемо, поскольку контекст требует обозначения цепи, состоящей по меньшей мере из двух аминокислот, связанных пептидными связями. Слово «полипептид» используют здесь для обозначения цепей, содержащих более десяти аминокислотных остатков. Все формулы или последовательности пептидов и полипептидов здесь написаны слева направо и в направлении от амино-конца к карбокси-концу. Используемый здесь термин «белки» относится к пептидным последовательностям, поскольку они продуцируются каким-либо организмом-хозяином и могут включать посттрансляционную модификацию, такую как добавленные гликаны.

Используемые здесь термины «аминокислота» или «аминокислотная последовательность» относятся к олигопептидной, пептидной, полипептидной или белковой последовательности или фрагменту любой из них и к встречающимся в природе или синтезированным молекулам. В этом контексте «фрагмент» относится к фрагментам пептида, проявляющим ферментативную активность бета-галактозидазы, которые сохраняют некоторую ферментативную активность. В тех случаях, когда «аминокислотная последовательность» приводится здесь для обозначения аминокислотной последовательности белковой молекулы, встречающейся в природе, «аминокислотная последовательность» и подобные термины не предназначены для ограничения аминокислотной последовательности полной нативной аминокислотной последовательностью, связанной с указанной молекулой пептида. Примеры пептидов по изобретению также включают фрагменты по меньшей мере примерно 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800 или более остатков в длину или полноразмерный фермент. Соответственно, «пептидный фрагмент» или «ферментативно

активный фрагмент» по изобретению представляют собой фрагменты, которые сохраняют по меньшей мере некоторую функциональную ферментативную активность. Как правило, пептидный фрагмент по изобретению все еще будет содержать функциональный каталитический домен или другие важные активные участки пептида, проявляющие ферментативную активность бета-галактозидазы. Другие домены могут быть удалены.

Как правило, удельную активность фермента бета-галактозидазы измеряют и указывают в виде мкмоль глюкозы, образующейся в минуту, на мг используемого фермента. Однако эта удельная величина будет варьироваться в зависимости от применяемых условий, таких как температура и pH.

Если не оговорено особо, используемый здесь термин «идентичность последовательностей» для аминокислот относится к идентичности последовательностей, рассчитанной как $(n_{ref} - n_{dif}) \cdot 100 / n_{ref}$, где n_{dif} представляет собой общее количество неидентичных остатков в двух последовательностях при выравнивании, и где n_{ref} представляет собой количество остатков в одной из последовательностей.

В некоторых воплощениях идентичность последовательностей определяют посредством обычных способов, например по Smith и Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, посредством способа поиска сходства по Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, с использованием алгоритма CLUSTAL W по Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res 22:467380, с помощью компьютерной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group). Также может быть использован алгоритм BLAST (Altschul et al., 1990, Mol. Biol. 215:403-10), программное обеспечение для которого можно получить через Национальный центр биотехнологической информации (www.ncbi.nlm.nih.gov/). При использовании любого из вышеупомянутых алгоритмов используют параметры по умолчанию для длины «окна», штрафа за пропуск и так далее.

ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ ВОПЛОЩЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу получения обладающего активностью лактазы фермента, где указанный фермент продуцируется в молочнокислых бактериях, предпочтительно где указанные бактерии несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где мутация инактивирует белок глюкокиназу, и этот способ включает следующие стадии:

а) инокуляция молочнокислых бактерий в подходящую среду для выращивания, предпочтительно в подходящую среду для выращивания, содержащую лактозу;

б) выращивание молочнокислых бактерий со стадии (а) до требуемой плотности с получением первого раствора, содержащего фермент, обладающий активностью лактазы, и бактериальные клетки молочнокислых бактерий;

с) инаktivация и/или разрушение бактериальных клеток молочнокислых бактерий с получением второго раствора;

д) возможно обработка второго раствора с получением третьего раствора.

Настоящее изобретение также относится к способу получения обладающего активностью лактазы фермента, и этот способ включает следующие стадии:

а) инокуляция молочнокислых бактерий, предпочтительно где указанные бактерии несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где мутация инаktivирует белок глюкокиназу, в подходящую среду для выращивания, предпочтительно где подходящая среда для выращивания содержит лактозу;

б) выращивание молочнокислых бактерий со стадии (а) до требуемой плотности с получением раствора, содержащего фермент, обладающий активностью лактазы, и бактериальные клетки молочнокислых бактерий;

с) очистка фермента, обладающего активностью лактазы, из раствора;

д) возможно приготовление указанного фермента в виде подходящей композиции.

Настоящее изобретение также относится к способу получения обладающего активностью лактазы фермента, и этот способ включает следующие стадии:

а) введение последовательности ДНК, кодирующей фермент, обладающий активностью лактазы, в молочнокислые бактерии, предпочтительно где указанные бактерии несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где мутация инаktivирует белок глюкокиназу;

б) инокуляция молочнокислых бактерий в подходящую среду для выращивания, предпочтительно где подходящая среда для выращивания содержит лактозу;

с) выращивание молочнокислых бактерий до требуемой плотности с получением раствора, содержащего фермент, обладающий активностью лактазы;

д) очистка фермента, обладающего активностью лактазы, из раствора;

е) возможно приготовление указанного фермента в виде подходящей композиции.

Предпочтительный аспект изобретения относится к способу получения обладающего активностью лактазы фермента с помощью ферментирующих галактозу молочнокислых бактерий, которые несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где мутация инактивирует белок глюкокиназу или оказывает негативное влияние на экспрессию гена, и этот способ включает следующие стадии:

- а) инокуляция ферментирующих галактозу молочнокислых бактерий в подходящую среду для выращивания;
- б) выращивание молочнокислых бактерий со стадии (а) до требуемой плотности с получением раствора, содержащего лактазу и бактериальные клетки;
- с) инаktivация и/или разрушение бактериальных клеток с получением второго раствора;
- д) возможно обработка второго раствора с получением третьего раствора.

В соответствующем аспекте изобретение относится к способу получения обладающего активностью лактазы фермента, и этот способ включает следующие стадии:

- а) инокуляция ферментирующих галактозу молочнокислых бактерий, которые несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где мутация инактивирует белок глюкокиназу или оказывает негативное влияние на экспрессию гена, в подходящую среду для выращивания;
- б) выращивание молочнокислых бактерий со стадии (а) до требуемой плотности с получением раствора, содержащего лактазу и бактериальные клетки;
- с) очистка фермента, обладающего активностью лактазы, из раствора;
- д) возможно приготовление указанного фермента в виде подходящей композиции.

В другом соответствующем аспекте изобретение относится к способу получения обладающего активностью лактазы фермента, и этот способ включает следующие стадии:

- а) введение последовательности ДНК, кодирующей фермент, обладающий активностью лактазы, в ферментирующие галактозу молочнокислые бактерии, которые несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу,

при этом мутация инактивирует белок глюкокиназу или оказывает негативное влияние на экспрессию гена *glcK*;

b) инокуляция ферментирующих галактозу молочнокислых бактерий в подходящую среду для выращивания;

c) выращивание ферментирующих галактозу молочнокислых бактерий до требуемой плотности с получением раствора, содержащего лактазу;

d) очистка фермента, обладающего активностью лактазы, из раствора;

e) возможно приготовление указанного фермента в виде подходящей композиции.

Последовательность ДНК, вводимая в молочнокислые бактерии, предпочтительно в ферментирующие галактозу молочнокислые бактерии, может быть встроена под контролем регуляторных элементов *lac* оперона, таких как, например СсрА.

В дополнительном аспекте последовательность ДНК, вводимая в молочнокислые бактерии, предпочтительно в ферментирующие галактозу молочнокислые бактерии, кодирует аминокислотную последовательность, которая представляет собой SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, или ее ферментативно активные фрагменты, или аминокислотную последовательность любого из них, содержащую не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 замен, вставок или делеций аминокислот.

Кроме того, последовательность ДНК, вводимая в молочнокислые бактерии, предпочтительно в ферментирующие галактозу молочнокислые бактерии, может кодировать аминокислотную последовательность, кодирующую димерный пептид, проявляющий ферментативную активность бета-галактозидазы, причем димерный пептид состоит из двух пептидов, имеющих аминокислотную последовательность, которая представляет собой SEQ ID NO: 2 и 3, 5 и 6, 20 и 21, 23 и 24, 26 и 27 или 28 и 29; или их ферментативно активные фрагменты, или аминокислотную последовательность любого из них, содержащую не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 замен, вставок или делеций аминокислот.

В предпочтительном аспекте изобретения обладающий активностью лактазы фермент экспрессируется молочнокислыми бактериями, кодирует аминокислотную последовательность, которая представляет собой SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37 или 38, или аминокислотную последовательность любой из них, содержащую не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 замен, вставок или делеций

аминокислот, и предпочтительно где указанные бактерии несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*.

В предпочтительном аспекте изобретения бактерии представляют собой *Lactobacillus delbreuckii* подвида *bulgaricus* (Lb), возможно обладающий функциональными или генотипическими характеристиками *Lactobacillus delbreuckii* подвида *bulgaricus* (Lb), депонированный как DSM 26420 или DSM 26421.

В предпочтительном аспекте изобретения молочнокислые бактерии представляют собой *Lactobacillus delbreuckii* подвида *bulgaricus* (Lb), предпочтительно представляют собой *Lactobacillus delbreuckii* подвида *bulgaricus* (Lb), депонированный как DSM 26420 или его мутанты, или *Lactobacillus delbreuckii* подвида *bulgaricus* (Lb), депонированный как DSM 26421 или его мутанты.

В другом предпочтительном аспекте *Streptococcus thermophilus* (ST) по настоящему изобретению обладают функциональными или генотипическими характеристиками *Streptococcus thermophilus* (ST), депонированного как DSM 28889, DSM 25850, DSM 25851, DSM 26722 или DSM 32227.

В предпочтительном воплощении молочнокислые бактерии представляют собой ферментирующие галактозу молочнокислые бактерии, предпочтительно где ферментирующие галактозу молочнокислые бактерии представляют собой *Streptococcus thermophilus* (ST), более предпочтительно где *Streptococcus thermophilus* обладают функциональными характеристиками *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 28889, DSM 25850, DSM 25851, DSM 26722 или DSM 32227, даже более предпочтительно где молочнокислые бактерии представляют собой *Streptococcus thermophilus*, депонированный как DSM 28889, *Streptococcus thermophilus*, депонированный как DSM 25850, *Streptococcus thermophilus*, депонированный как DSM 25851, *Streptococcus thermophilus*, депонированный как DSM 26722, или *Streptococcus thermophilus*, депонированный как DSM 32227.

Соответствующий аспект настоящего изобретения относится к обладающему активностью лактазы ферменту, полученному посредством описанного здесь способа, и к применению указанного фермента для снижения содержания лактозы в композиции, содержащей лактозу, например в молочных продуктах или молоке, причем применение включает стадию добавления указанного фермента в молочную композицию или молочный продукт при pH в диапазоне от 3 до 10 при температуре в диапазоне от 0°C до 140°C.

Более конкретно, фермент, полученный посредством любого из описанных здесь способов, может быть использован при pH в диапазоне 3-10, например в диапазоне 3-9, например в диапазоне 3-8, например в диапазоне 3-7, например в диапазоне 3-6, например в диапазоне 3-5, например в диапазоне 3-4, например в диапазоне 4-10, например в диапазоне 4-9, например в диапазоне 4-8, например в диапазоне 4-7, например в диапазоне 4-6, например в диапазоне 4-5, например в диапазоне 5-10, например в диапазоне 5-9, например в диапазоне 5-8, например в диапазоне 5-7, например в диапазоне 5-6, например в диапазоне 6-10, например в диапазоне 6-9, например в диапазоне 6-8, например в диапазоне 6-7, и/или при температуре не превышающей 45°C, например не выше приблизительно 35°C, например не выше приблизительно 18°C, например не выше приблизительно 16°C, например не выше приблизительно 14°C, например не выше приблизительно 12°C, например не выше приблизительно 10°C, например не выше приблизительно 8°C, например не выше приблизительно 7°C, например не выше приблизительно 6°C, например не выше приблизительно 5°C, например не выше приблизительно 4°C, например не выше приблизительно 3°C, например не выше приблизительно 2°C.

Как здесь указано, молочный продукт может представлять собой ферментированный молочный продукт. Возможно применение фермента, как описано здесь, не требует добавления дополнительного фермента после ферментации.

Как описано в вышеприведенной части, настоящее изобретение относится к способу получения молочного продукта, включающему стадии:

- a) обеспечение наличия субстрата на молочной основе, содержащего лактозу;
- b) добавление пептида, проявляющего бета-галактозидазную активность, или фермента, обладающего активностью лактазы, и имеющего аминокислотную последовательность, которая представляет собой SEQ ID NO: 1-33, или последовательность с по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с любой из указанных последовательностей, к указанному субстрату на молочной основе, содержащему лактозу; и
- c) обработка указанного субстрата на молочной основе указанным пептидом, проявляющим бета-галактозидазную активность, предпочтительно где пептид, проявляющий бета-галактозидазную активность, или фермент, обладающий

активностью лактазы, продуцируется любым штаммом, выбранным из *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 28889, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25850, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25851, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 26722, *Streptococcus thermophilus* DSM 32227, *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как DSM 26420, или *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как DSM 26421, или их мутантами.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению этот пептид, проявляющий бета-галактозидазную активность, или фермент, обладающий активностью лактазы, получают из любой из бактерий рода *Bifidobacterium*, такой как *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium longum*, или рода *Lactobacillus*, такой как *L. sakei*, *L. amylovorus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. Indicus*, *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. helveticus*, или из *Streptococcus thermophilus*.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению стадию (с) проводят при pH в диапазоне 3-10, например в диапазоне 3-9, например в диапазоне 3-8, например в диапазоне 3-7, например в диапазоне 3-6, например в диапазоне 3-5, например в диапазоне 3-4, например в диапазоне 4-10, например в диапазоне 4-9, например в диапазоне 4-8, например в диапазоне 4-7, например в диапазоне 4-6, например в диапазоне 4-5, например в диапазоне 5-10, например в диапазоне 5-9, например в диапазоне 5-8, например в диапазоне 5-7, например в диапазоне 5-6, например в диапазоне 6-10, например в диапазоне 6-9, например в диапазоне 6-8, например в диапазоне 6-7.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению стадию (с) или часть стадии (с) проводят при температуре не выше приблизительно 25°C, например не выше приблизительно 20°C, например не выше приблизительно 18°C, например не выше приблизительно 16°C, например не выше приблизительно 14°C, например не выше приблизительно 12°C, например не выше приблизительно 10°C, например не выше приблизительно 8°C, например не выше приблизительно 7°C, например не выше приблизительно 6°C, например не выше приблизительно 5°C, например не выше

приблизительно 4°C, например не выше приблизительно 3°C, например не выше приблизительно 2°C.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению стадию (с) или часть стадии (с) проводят при температуре по меньшей мере приблизительно 25°C, например по меньшей мере приблизительно 30°C, например по меньшей мере приблизительно 35°C, например по меньшей мере приблизительно 40°C, например по меньшей мере приблизительно 45°C, например по меньшей мере приблизительно 50°C, например по меньшей мере приблизительно 55°C, например по меньшей мере приблизительно 60°C, например по меньшей мере приблизительно 65°C, например по меньшей мере приблизительно 70°C, например по меньшей мере приблизительно 75°C, например по меньшей мере приблизительно 80°C, например по меньшей мере приблизительно 85°C, например по меньшей мере приблизительно 90°C, например по меньшей мере приблизительно 95°C, например по меньшей мере приблизительно 100°C, например по меньшей мере приблизительно 110°C, например по меньшей мере приблизительно 120°C, например по меньшей мере приблизительно 130°C, например по меньшей мере приблизительно 120°C, например по меньшей мере приблизительно 130°C, например по меньшей мере приблизительно 135°C, например по меньшей мере приблизительно 140°C.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению молочный продукт выбран из группы, состоящей из безлактозного молока, низколактозного молока, йогурта, сыра, кисломолочных продуктов, пищевой добавки и пробиотических пищевых продуктов.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению субстрат на молочной основе выбран из свежего молока или сырого молока, полученного непосредственно со стадии пастеризации, молока, полученного непосредственно после стадии ультратермической обработки (УНТ), или молока, полученного непосредственно после стадии ферментации.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению ингибирование галактозой используемого пептида составляет менее 60%, например менее 55%, например менее 50%, например менее примерно 45%, например менее примерно 40%.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, и указанную стадию (b) проводят во время или до ферментации.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению способ не требует добавления дополнительного фермента после ферментации.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, и указанную стадию (b) проводят сразу после ферментации.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению молочный продукт представляет собой свежее молоко, и указанную стадию (b) проводят до, одновременно или сразу после стадии пастеризации.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению молочный продукт представляет собой ультратермически обработанное (УНТ) молоко, и указанную стадию (b) проводят до, одновременно или сразу после стадии ультратермической обработки.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению стадию (c) начинают при температуре от 40°C до 100°C, например при температуре от 50°C до 100°C, например при температуре от 60°C до 100°C, например при температуре от 70°C до 100°C, например при температуре от 80°C до 100°C, например при температуре от 40°C до 90°C, например при температуре от 40°C до 80°C, например при температуре от 40°C до 70°C, например при температуре от 40°C до 60°C, например, при температуре от 40°C до 50°C.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению пептид при гидролизе лактозы в молочном субстрате имеет отношение активности лактазы к активности трансгалактозилазы более 1:1.

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению было гидролизовано менее 80% лактозы при завершении стадии (c), и при этом более 90% лактозы было гидролизовано через одну неделю.

Настоящее изобретение также относится к применению *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 28889, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25850, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25851, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 26722, *Streptococcus thermophilus* DSM 32227, *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как 26420, или *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как DSM

26421, или их мутантов в качестве продуцирующего лактазу организма или в качестве организма, продуцирующего фермент, обладающий активностью лактазы, предпочтительно в качестве гомологичного организма, продуцирующего лактазу, или в качестве гомологичного организма, продуцирующего фермент, обладающий активностью лактазы, или в качестве гетерологичного организма, продуцирующего лактазу, или в качестве гетерологичного организма, продуцирующего фермент, обладающий активностью лактазы.

Кроме того, это изобретение также относится к применению *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 28889, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25850, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25851, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 26722, *Streptococcus thermophilus* DSM 32227, *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как DSM 26420, или *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как DSM 26421, для получения низколактозного продукта или безлактозного продукта, предпочтительно при этом низколактозный продукт или безлактозный продукт выбран из низколактозного молока, низколактозного йогурта, низколактозного сыра, низколактозных кисломолочных продуктов, безлактозного молока, безлактозного йогурта, безлактозного сыра и/или безлактозного кисломолочного продукта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Кривые роста и профили метаболитов DSM 22934 и DSM 28889 в CDM (химически определенная среда). Большие кружки обозначают образцы транскриптома.

Фиг. 2. Уровни абсолютной экспрессии *lacS* и *lacZ* в средней логарифмической, поздней логарифмической и стационарной фазах. Также указаны кратные изменения между DSM 28889 и DSM 22934 в каждой фазе роста.

Фиг. 3. Регуляторная сеть CsrA (белок регуляции катаболизма углерода A) и HPr (гистидиновый белок) (Bogaard, 2004).

Фиг. 4. Анализ экспрессии белка в различных условиях ферментации. Экспрессию анализировали, загружая 10 мкл бесклеточного экстракта на каждую дорожку. RS1, RS6 и RS7 использовали в качестве контроля для измерения фонового уровня экспрессии белка из различных штаммов *Streptococcus thermophilus*. Очищенный фермент представляет собой рекомбинантно полученный *LacZ* из *Streptococcus thermophilus* в качестве положительного контроля. Подробности проведения эксперимента описаны в **примере 3**, а также в **таблице 2** и **таблице 3**.

Таблица 1. Номера генов с соответствующим идентификационным номером последовательности.

Идентификационный номер последовательности	Родовое и видовое название
SEQ ID NO 1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
SEQ ID NO 2 (домен а) SEQ ID NO 3 (домен b)	<i>Lactobacillus sakei</i>
SEQ ID NO 4	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
SEQ ID NO 5 (домен а) SEQ ID NO 6 (домен b)	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
SEQ ID NO 7	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
SEQ ID NO 8	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
SEQ ID NO 9	<i>Bifidobacterium breve</i>
SEQ ID NO 10	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>
SEQ ID NO 11	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>
SEQ ID NO 12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвиd <i>bulgaricus</i>
SEQ ID NO 13	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвиd <i>lactis</i>
SEQ ID NO 14	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвиd <i>bulgaricus</i>
SEQ ID NO 15	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвиd <i>bulgaricus</i>
SEQ ID NO 16	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвиd <i>lactis</i>
SEQ ID NO 17	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвиd <i>bulgaricus</i>
SEQ ID NO 18	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвиd <i>bulgaricus</i>
SEQ ID NO 19	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвиd <i>lactis</i>
SEQ ID NO 20 (домен а) SEQ ID NO 21 (домен b)	<i>Lactobacillus helveticus</i>
SEQ ID NO 22	<i>Bifidobacterium longum</i>
SEQ ID NO 23 (домен а) SEQ ID NO 24 (домен b)	<i>Lactobacillus reuteri</i>
SEQ ID NO 25	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвиd <i>lactis</i>
SEQ ID NO 26 (домен а) SEQ ID NO 27 (домен b)	<i>Lactobacillus helveticus</i>

SEQ ID NO 28 (домен а)	<i>Lactobacillus crispatus</i>
SEQ ID NO 29 (домен b)	
SEQ ID NO 30	<i>Streptococcus thermophilus</i>
SEQ ID NO 31	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвид <i>indicus</i>
SEQ ID NO 32	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
SEQ ID NO 33	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
SEQ ID NO 34	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвид <i>bulgaricus</i>
SEQ ID NO 35	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвид <i>bulgaricus</i>
SEQ ID NO 36	<i>Streptococcus thermophilus</i>
SEQ ID NO 37	<i>Streptococcus thermophilus</i>
SEQ ID NO 38	<i>Streptococcus thermophilus</i>

SEQ ID NO 1

MADTAELAIVHATTASASWLTDPVFANRKPASSHRYVIGETSEPKQSLDGEWKVRIEQARNVDVES
 APFAAVDFEDGDFGAI EVPGHLQ MAGYLKKNKYVNIQYPWDGHEDPQAPNIPENNHVAIYRRRFALDAQ LARTLEN
 DGTVSLTFHGAATAIYVWLDGTFVGYGEDGFTPSEFDVTEALRNGNGNAADSPEAEHTLTVACYEYSSASWLEDQ
 DFWRLHGLFRTVELAAQPHTHVETVQLEADYTAADTAGTADTAELNAALTLRNSADAMTIESTLRDGDGNVWVES
 TQACNGEIALNSGKMTNIAPWSAESPTLYTLTVRVVGHGDAI IETVTQKIGFRTFRIENGIMTLNGKRIVFKGAD
 RHEFDAKRGRAITREDMLS DVVFCKRHNINAI RTSHYPNQEYWDLCDEYGLYLIDETNMETHGTWVANNVERPE
 DGIPGSRPEWEGACVDRINSMMRRDYNHPSVLIWLSLGNESSAGEVFRAMYRHAHTIDPNRPVHYEGSVHMFED
 VTDIESRMYAHADIEIRYLNDGSPAHTDGPCKPYISCEYMHAMGNSCGNMDEYTALERYPMYQGGFIWDFIDQAI
 ETKLPDGTTRMCYGGDFGDRPSDYEFSGDGLLFADRTPSPKAQEVKQLYANVKIVSVDEARITNDNLFVSTGDY
 RFVLRILADGKPVWSTTRRFDAAGESASFEVDWVPDDYRSNAEELVLEVSQQ LGNACDWAPAGYELAFGQCVA
 GAKTTADAVDAAGAPADGTVT LGRWNAGVRGQGREALFSRTQGGMVSYTFGEREFVLRPSITTFRPLTDNDRGA
 GHAFERA AWAVAGKYARCVDCAIANRGENAVEATYTYELAI PQRKT VTRYVADTAGLVSLDVEYPGEKNGDLPT
 I PAFGIEWALPVEYANLRFYAGPEETYADRRHAKLGWVSTTAGDDCAPYLLPQETGNHEDVRWAEITDDSGHGV
 RVKRGAGAKPFAMSLLPYSSTMLEEALHQDEL PKPRHMFRLRLAAQMGVGGDDSWMSPVHEQYQLPADQPLSLNV
 QLKLF

SEQ ID NO 2

MQPNIQWLDTPAVFRVGLPAHSDHRYATLAEMAQQQSSFEQSLNGTWQFHYSVNAASRPKSFYELAF
 DAQDFEPITVPQHIELAGYEQLHYINTMYPWEGHYRRPAFSTSDDKQHLGMFSEADYNPVGSYLHHFDLTPALR
 NQRVIRFEGVEQAMYVWLNQFIGYAEDSFTPSEFDLTPLYKETDNCLAVEVHKRSSAAFIEDQDFRFFGIFR
 DVKLLAKPRTHLEDLWVIPEYDVVQQTGOVKLRLOFSGDENRVHLRIRDQHQIILTADLTSAQVNGLYKMPVLV
 QAWSNQTPNLYTLELVVDQAGETIEISQQPFGRKIEIKDKVMLLNGKRLVINGVNRHEWHPETGRTITAEDEA
 WDIACMQRNHINAVRTSHYPDRLSFYNGCDQAGIYMAETNLESHGWSWQKMGAVEPSWNVPGSYDEWEAATLDRA
 RTNFETFKNHVSILFWSLGNSYAGSVLEKMNAAYKQQDPTRLVHYEGVFRAPYKATISDVESRMYATPAEIK
 YLDNAPQKPFILCEYMHDMGNSLGGMQSYIDLQSQYDMYQGGFIWDFIDQALLVTD PVTGQRELRYGGDFDRPS
 DYEFSGDGLVFATRDEKPAHQEVRYYYGEHK

SEQ ID NO 3

MKNQQCRRLDTIMANTNKRLAVIFGDVTGLKGPDFHYLFSYQTGGPESLRIQKKEWLYRSPKPTFWRA
 TTDNDRGNQFPLKSGMWLAADQFIACQSITVAIDGQTIPLPIAPENNRYSQETAQEVTVTYTYQTITTPQTVE
 VSYTIQASGKIRVAVTYHGQAGLPSLPVFGRLRFVMPPTPATRFIYQGLSGETYPDRMAGGMAGEYEVTLPTPYL
 VPQDCGVHMATDWVTIYRQAVLDNRLREPVTGLKFKMVDQPPAFASCLPYTAEELNATHHSELPAHRTVLSLL
 GAVRGVGIDSWGSDVEAAYQIDATQDHHLEFEISF

SEQ ID NO 4

MADTAELAIVHATTASASWLTDPVFANRKPASSHRYVIGETSEPKQSLDGEWKVRIEQARNVDVES
 APFAAVDFEDGDFGAI EVPGHLQ MAGYLKKNKYVNIQYPWDGHEDPQAPNIPENNHVAIYRRRFALDAQ LARTLEN
 DGTVSLTFHGAATAIYVWLDGTFVGYGEDGFTPSEFDVTEALRNGNGNAADSPEAEHTLTVACYEYSSASWLEDQ
 DFWRLHGLFRTVELAAQPHTHVETVQLEADYTAADTAGTADTAELNAALTLRNPADAMTIESTLRDGDGNVWVES
 TQACNGEIALNSGKMTNIAPWSAESPTLYTLTVRVVGHGDAI IETVTQKIGFRTFRIENGIMTLNGKRIVFKGAD
 RHEFDAKRGRAITREDMLS DVVFCKRHNINAI RTSHYPNQEYWDLCDEYGLYLIDETNMETHGTWVANNVERPE

DGIPGSRPEWEGACVDRINSMMRRDYNHPSVLIWSLGNES SAGEVFRAMYRHAHTIDPNRPVHYEGSVHMR EFED
 VTDIESRMYAHAEDEIERYLNDGSPAHTDGPKKPYISCEYMHAMGNSCGNMDEYTALERYPMYQGGFIWDFIDQAI
 ETKLPDGTTRMCYGGDFGDRPSDYEFSGDGLLFADRTSPKAEVKQLYANVKIAVSVDEARITNDNLFVSTGDY
 RFVLRILADGKPVWSTTRRFDVAAGESASFEVDWPVDDYRSNAEELVLEVSQQLGNACDWAPAGYELAFGQC VVA
 GAKTTADAVDAAGAPADGTVTLGRWNAGVRGQGREALFSRTQGMVSYTFGEREFVLRPSITTFRPLTDNDRGA
 GHAFERAAWAVAGKYARCVDAIANRGENAVEATYTYELAI PQRKVTVRYVADTAGLVSLDVEYPGEKNGDLPT
 IPAFGIEWALPVEYANLRFYAGPEETYADRRHAKLGVWSTTAGDDCAPYLLPQETGNHEDVRWAEITDDSGHGV
 RVKRGA GAKPFAMSLLPYSSTMLEEALHQDEL PKPRHMFRLRLAAQMGVGGDDSWMSPVHEQYQLPADQPLSLNV
 QLKLF

SEQ ID NO 5 (G40 Домен a)

MKANIKWLDDPEVFRINQLPAHSDHFPYKDYREWQNHSSSFQSLNGAWQFHFSKDPQSRPIDFYKR SF
 DSSSFDTI PVPSEIELNGYAQNQYTNILYPWESKIYRKPAYTLGRGIKDGD FSQKDN TVGSYLKHFDLNPALAG
 HDIHIQFEGVERAMYVYLNHGFIFYAEDSFTPSEFDLPYIQAKDNILAVEVFKHSTASWLEDQDMFRFSGI FRS
 VELLALPRTHLMDLDIKPTVVNDYHDGVFNAKLHFMGKTS GNHVHLIEDIDGKTLNKKLP LKSTVEIENETFAN
 VHLWDNHDPYLYQLII EVHDQDGKLVELIPYQFGFRKIEITKDHVVLLNGKRLIINGVNRHEWDAKRGRSITLAD
 MKQDIATFKHNNINAVRTCHYPNQIPWYYLCDQNGIYMAENNLESHGTWQKLGQVEATSNVPGSIP EWREVVD
 RARSNYETFKNHTAILFWSLGNESYAGSNIAAMNKLYKDHDSSRLTHYEGVFHAP EFKKEISDLESCMYLPPKEA
 EEYLQNPKKPLVECEYMHDMGTPDGGMGSYIKLIDKYPQYMGGF IWDFIDQALLVHDPVSGQDVLRYGGDFDDRH
 SDYEFSGDGLMFADRTPKPAMQEVRYYYGLHK

SEQ ID NO 6

MAYTNNLHVYGEASLGVNGQDFAYLFSYERGGLES LKIKDKEWLYRTPTPTFWRATTDNDRGSGFNQK
 AAQWL GADMTKCVGIHVQVDDHFRDEL P VAPINNQFSNQEF AHEVKVAFDYETLTTPATKVKI IYNINDFGHMT
 ITMHYFGKKGLPPLPVIGMRFIMPTKAKSFDYTGLSGETYPDRMAGAERGFHIDGLPVT KYLVPQENGMMHMQTN
 ELVITRNSTQNNADKGDGDFSLKITQTKQPFNFSLPYTAEELNATHIEELPLARRSVLV IAGAVRGVGGIDSWG
 SDVEEQYHIDPEQDHEFSFTLN

SEQ ID NO 7

MNTTDDQRKNGDP I VSPSIPTTAWLADPRVYAVHRLDAHSDHACWSRSPVDGESTDLRQSLDGEWRVRV
 ETAPTGRFPDGTSDGPDWISDV SPLFAAPGFDDSSFSRVQVPSHLETAGLLAPQYVNVQYPWDGHEDPKAPAIPE
 HGHVAVYRREFDADGEVAQAVREGRPVTLTFQGAATAIYVWLNGSFIGYAEDSFTPSEFDVTDAIKVDGNVLAVA
 CYEYSSASWLEDQDFWRLHGLFRSVELNARPAAHVADLHADADWD LATS RGSLSLDVLIDGAANAATADFALRDK
 NGTIVWRTATKADGTLHAEAEIDDAAPWSAERPDL YELSVTLLDADGKVLETARTRIGFRHVAIEDGILKLNKGR
 LVFRGVNRHEFDCRRGRAITEEDMLWDIRFMKRHNINAVRTSHYPNQSRWYELCDEYGIYLI DETNLETHGSWNS
 PGDIPVGTSPVPGDDEAWLGACIDRLDSMILRDRNHPSVLVWSLGNESYAGEVLKAMSAHAHQLD PGRPVHYEGVN
 WNHAYDGISDFESRMYAKPAEIQDWLEHGDERGEASKPFVVSCEYMHAMGNSCGGLSEFIDLERYERYSGGFIWDY
 IDQGLVQRLPDGSERLSVGGEGWDRPTDYEFVGN GIVFADRTSPKAEVKQLYSPVKLAPDGHGVTIENRN LFA
 GTDGYVFAARLLEDGHEIWHADYRFDVAAGDTQHHDIAFPDIDADGDTREVTYEVDLLLAEATAWAPAGYELAFG
 QLTGTNLNPEQDITETSHDDDGRATRTL SRWNAGIRRDDEEILL SRTQGGIVSWKRDDREMVI RPELVTFRPLTD
 NDRGNHSGFDRAAWFAAGRYAIVTETKIHESDDGLVAEYQYELADPNHTPVSVTYHVNSDMRMQLTVEYPGNATD
 MASLPAFGIEWELPGEYDRLRYYGPGPEETYRDRKQGGKLG IWDATAKASMAPYLMVQETGSHEDVRWLEATDIQ
 GHGLRVTQRGDRHFTASLLPWNTYTI EAARRHEDLPKPRHNYLRLLAAQMGVGGDDSWGAPVHTAYQLPAGRPLT
 LDVNLELI

SEQ ID NO 8

MNTTDDQRKNGDP I VSPSIPTTAWLADPRVYAVHRLDAHSDHACWSRSPVDGESTDLRQSLDGEWRVRV
 ETAPTGRFPDGTSDGPDWISDV SPLFAAPGFDDSSFSRVQVPSHLETAGLLAPQYVNVQYPWDGHEDPKAPAIPE
 HGHVAVYRREFDADGEVAQAVREGRPVTLTFQGAATAIYVWLNGSFIGYAEDSFTPSEFDVTDAIKVDGNVLAVA
 CYEYSSASWLEDQDFWRLHGLFRSVELNARPAAHVADLHADADWD LATS RGSLSLDVLIDGAANAATADFALWDK
 NGTIVWHIVTKADGTLHAEAEIDDAAPWSAERPDL YELSVTLLDADGKVLETARTRIGFRHVAIEDGILKLNKGR
 LVFRGVNRHEFDCRRGRAITEEDMLWDIRFMKRHNINAVRTSHYPNQSRWYELCDEYGIYLI DETNLETHGSWNS
 PGDIPVGTSPVPGDDEAWLGACIDRLDSMILRDRNHPSVLVWSLGNESYAGEVLKAMSAHAHRLDPGRPVHYEGVN
 WNHAYDGISDFESRMYAKPAEIQDWLEHGDERGEASKPFVVSCEYMHAMGNSCGGLSEFIDLERYERYSGGFIWDY
 IDQGLVQRLPDGSERLSVGGEGWDRPTDYEFVGN GIVFADRTSPKAEVKQLYSPVKLAPDGHGVTIENRN LFA
 GTDGYVFAARLLEDGHEIWHADYRFDVAAGDTQHHDIAFPDIDADGDTREVTYEVDLLLAEATAWAPAGYELAFG
 QLTGTNLNPEQDITETSHDDDGRATRTL SRWNAGIRRDDEEILL SRTQGGIVSWKRDDREMVI RPELVTFRPLTD
 NDRGNHSGFDRAAWFAAGRYAIVTETKIHESDDGLVAEYQYELADPNHTPVSVTYHVNSDMRMQLTVEYPGNATD
 MASLPAFGIEWELPGEYDRLRYYGPGPEETYRDRKQGGKLG IWDATAKASMAPYLMVQETGSHEDVRWLEATDIQ
 GHGLRVTQRGDRHFTASLLPWNTYMI EAARRHEDLPEPRHNYLRLLAAQMGVGGDDSWGAPVHTAYQLPAGRPLT
 LDVNLELI

SEQ ID NO 9

MTNSMQGKAKTIMTNLQSAQQFSQAWLTDPRVFAVNRLAAHSSHKFYDHS PQCGEAMD LKQSLDGQWRV
 QMLDLADLADNELAEAAFAQPGYDAAGFSPIEVPSALETKGFLNHQYVNVQYPWSGHESP VAPDVPKHNHVALYR

HEFSLEPKAAVLEANKTAADDAAKRRVTLTFQGAATAIVVWLNAGAFI GYAEDSF T PSEFDVTDVLRDGVNTLAV
ACFEFSSASWLEDQDFWRLHGI FR SVELEAQPLVHVNDLRVLADYDHTTGEGLSDVVALLRNAGTAAVAATVLD
AAGNTVWHSKLTAGADAETLT VKANVGKVN PWSAE EPTLYTLQVVATDAAGQVIEAALQRI GFRHFAIEDGLMKL
NGKRIVFKGVD RHEFDARTGRTIAEADMI EDIHSFKRLNINAVRTSHYPNETRWYELCDEYGIYVLD ETNLETHG
SWTDPGDV FQPARAI PGSKDEWRAACVDR TASMVRRDYNHPSVVIWLSL GNEAFGGDV FYSMRDFVHENDPFRPVH
YEGTFNDPEFSAATDIMS RMYAKPDEIVKLYLGEDGKKPYISCEYSHSMGNSTGGLHLYTELE RYPLYQGGFIWD
YVDQALWQDCGN GTERLAYGGDFEDRPNDYEFSGDGVMFADRT P SPKAQEVKQLYANVKLV PDESGVTITNDNLF
ISTASSLFTARVLVDGAERWHANYRFDVPAGETVREPIAFPKVTDLVALSGSAEVTYEV DQRLAEATDWAPAGYE
LTFGQYVA AVSFDDGAADAVVAGDAEVAADGFNAGIHTDFGEVLLSKTQGGMV SFKRDG REMVIRRPNL TTFRAL
TDNDRGN GSGFERAQWMAAGRYARVTGTSVEETADGKGLKATYSYELADAKHTPVTVHYEVD AALRVHLTVEY PG
EADAATLPAFGLEWILPKQYDRLRFYGLGPEETYADRLHGAKLGVSRTAAEDCAPYLLPQETGNHEQVRWAEIT
DEYGHGMRVTAAGGTRFATSLLPYSSLMFEDALHQNELPKPRHTFLRL LAAQMGVGGDDTWGAPVHDEFQVPADQ
PLKLDVTLELI

SEQ ID NO 10

MTQRRSYRWPQPLAGQQARIWYGGDYNPDQWP EEWDDDVRLMKKAGVNLVSVGI FSWAKIETSEG VYD
FDWLDRIIDKLGEAGIAVDLASATASPPMWLTQAHP EVLWKDYRGDVCQPGARQHWRPTSPVFREYALKLCRAMA
EHYKGNPYVVAWHVSNEYGCHNRFDYSEDAERA FRKWCEERYGTIDAVNDAWGTAFWAQRMNDFTEIVPPRFIGD
GNFMNPGKLLDFKRFS DALKAFYVAERDALAEITPDLPLTTNFMVSAAGSVLDYDDWGREVD FVSNDHYFIPGE
AHLDELAFSASLVDGIARKDPWFLMEHSTSAVNWRPVNYRKEPGQLVRDSL AHVAMGADAVCYFQWRQSKAGAEK
FHSAMVPHTGEDSAVFRDVC ELGADLNTLADNGLLGTKLAKSKVAVVFDYSEWATEHTATPTQKVHHVDEPLQW
FRALADHGVTADVVPVSSNWDEYEVVVLPSVYILSEETTRVRDYV VNGGRLIVTYTGLSDEKDHVWLGGYPGS
IRDVVGV RVEEFMPMGDDFPGVPDCLGLSNGAVAHDIADVIGSVDGTATVLETFRDDPWTGMDGAPAI VANTFGE
GRSVYVGARLGRDGI AKSLPEI FESLGMAETGENDSRVLRVEREGSDGSRFVFSFNRTHEAVQIPFEGKIVVSSF
AEVSGENVSIKPNGVIVTKQ

SEQ ID NO 11

MANSNRVEHASETWLTDATVFEVNRTPAHSNHKCFTHDPQSGEHS DLTQSLDGEWRVEIVQASDIDFNE
EPFVAENFDDSSFCRAQVPGHLQ MAGLLKNKYVNIQYPWDGHENPLEPNVPENNHVALYRRKFV VSKRLADTKES
EGSVSIVFHGMATAIYVWVNGLFAGYGEDGFTPNEFDITDLLHDGENV VAVACYEYSSASWLEDQDFWRLHGLFR
SVELTAQPHVHVENMQLEADWDAESGTASLDAALSVRNASDAATISATLKDSEGNV VWEASTNADANTTFASGSL
QGLEPWSAESPSLYELEVNVIDQAGNIVEAAVQKVGFRFRFRIENGIMTLNGKRIVFKGADRHEFDAKRGRSITEQ
DMIDDVIFCKRHNNINAI RTSHYPNQERWYDLCDEYGIYLI DETNLETHG SWCLPGDVVTAETA VPGSKAHWEGAC
VDRVNSMVRRDYNHPSVVIWLSLGNESYTG DVFRAMYKHVHDI DPNRPVHYEGVTKNRDYDDVTDIETRMYEHADV
VEEYLKNDPQKPYISCEYMHAMGNSVGNLDEY TALERYPHYQGGFIWDFIDQAIYATQPDGSTRLCYGGDFGDRP
SDYEFSGNGLVFADRTPTPKAQEVKQLYSNVHIDVTDRSVSIKNDNLFISTGGYQFVLRLIADGEPVWQSERRFD
VPADSACTFDVEWPVDLYRANADELVLEVSQRLAEATDWAPAGYELAFGQTIVAGTKAAEDAALPADGIVTVGRW
NAGVQSGGREILL SRTQGGVLVS YTFDGHEFVLRRPAITTFRALTDNDRGAGHGFERAQWMVAGRYARCVDNVIEQ
VDEDTLKAVYTYELATPQCTKVTVGYTADTTGRNLNHVEYPGESGELPTIPAFGIEWTLPVQYSNL RFFGAGPEE
TYQDRKHAKLGVWSTDAFKDHAPY LMPQETGNHEEVRWAEITDENGHLRVSRANGAAPFAVSLQPYSSFMIEEA
QHQDELPA PKHMFRLVLA AQMGVGGDDSWMSPVHSQYHITADQPI SLDVNLELI

SEQ ID NO 12

MSNKL VKEKRVDQADLAWLTDPEVYEVNTI PPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLIDYAENGQ
GPVNFYAEDFDDSNF KSVKVPGNLELQGGFGQPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQIPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKE
VSLKFDGAATAIYVWLN GHFVGYGEDSF T PSEFMVTKFLKKENNR LAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVT
LQAKPRLHLEDLKL TASLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASF KLEVRDSEGD LVAEKLGP IRSEQLEFTLADLPV
AAWSAEKP NLYQVRLYLYQAGSLLEVS RQEVGFRNFELKD GIMYLNQRI VFKGANRHEFDSKLGRAITEEDMIW
DIKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDE ANLESHGTWEKVGGHEDPSFNVP GDDQHWLGASLSRV
KNMMARDKNHASILI WSLGNESYAGTVFAQMA DYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEY
LTNKPAPK PFI SVEYAHAMGNSVGD LAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDY EFCNG
LVFADRTESPKLANVKALYANLKLEV KDGQLFLKNDNLFTNSSSYFLTSLLV DGKLTYSRPLTFGLEPGESGT
FALPWPEVADEKGEVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEVAQKLPEFKPEGRPD LVDSDYNLGLKGNNFQILF
SKVKGW PVS LKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLARWENAGKYARLKDISCEVKEDSVLVKTAFTL
PVALKGD LTVTYEVDGRGKIAVTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDY RYYGLGPNESYPDRLEGNYLGIYQ
GAVKKNFSPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADLNL SALPYSAAQIEAADHAFDLTNNYTWVRALS
AQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVIQPLLLK

SEQ ID NO 13

MSNKL VKEKRVDQADLAWLTDPEVYEVNTI PPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGNWLIDYAENGQ
GPINFYAEDFDDSNF KSVKVPGNLELQGGFGQPQYVNIQYPWDGSEEIFPPQVP SKNPLASYVRYFDLDEALWDKE
VSLKFAGAATAIYVWLN GHFVGYGEDSF T PSEFMVTKFLKKEGNRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRLSGLFRSVT
LEAKPL LHLEDLKL TASLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASF KLEVRDSEGD LVAEKVGPIRSEKLGFSLADLPV
AAWSAEKP NLYQVRLYLYQAGSLLEVS RQEVGFRNFELKD GIMYLNQRI VFKGVNRHEFDSKLGRAITEADMIW

DIKTMKQSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGHHEDPSFNVPGDDQHWLGASLSRVK
 NMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYPAPAKEIEEYL
 TKKPAKPFISVEYAHAMGNSVGDLAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEFCGDGL
 VFADRTTSPKLANVKALYSNLKLEVKDQGLFIKNDNLFTNSSAYYFLASLLVDGKLTYSQSQPLTFGLEPGESGT
 VLPWPVEVEDEKGEIVYQVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEAEAVTKLPEFYFAGRPPELVSDSNLGLKGNFRILFS
 KAKGWPVSIKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLAKWENAGKYARLQDISYEIKENSALVKTTFTLP
 VALKGDLTITYEVDLSGKIAVTANFPGAVENGLLPFAFLNLFALPKELSDYRYYGLGPNESYADRLEGSYLGIIYQG
 AVEKNFTPYLRPQEAGNRSKVRYQYLFDEEGGLEFTANGADLNLSALPYSAAQIEAADHAFELTNNYTWVRALAA
 QMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQEARQLKLVIQPLLLK

SEQ ID NO 14

MSNKLVEKRVDQADLAWLTDPEVYEVTNIPPHFDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLIDYAENGQ
 GPVNFYAEDFDDSNFNSVKVPGNLELQGFQGPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQIPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKE
 VSLKFDGAATAIYVWLNHFVGYGEDSFTPSEFMVTKFLKKENNRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVT
 LQAKPRLHLEDLKLTAASLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASFKEVRDSEGLVAEKLGPISRSEQLEFTLADLPV
 AAWSAEKPPLYQVRLYLYQAGSLLEVSQRQEVGFRNFELKDGMIMYLNQORIVFKGANRHEFDSKLGRAITEEDMIW
 DIKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGHHEDPSFNVPGDDQHWLGASLSRV
 KNMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYPAPAKVIEEY
 LTNKPAPKPFISVEYAHAMGNSVGDLAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEFCGNG
 LVFADRTTESPKLANVKALYANLKLEVKDQGLFLKNDNLFTNSSSYFLTSLLVDGKLTYSQSRPLTFGLEPGESGT
 FALPWPVEVADEKGEVVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEAEVAQKLPEFKPEGRPDLDVSDYNLGLKGNFQILF
 SKVKGWVPSLKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLARWENAGKYARLKDISEVVKEDSVLVKTAFTL
 PVALKGDLTVTYEVDDGRGKIAVTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDYRYYGLGPNESYPDRLEGNYLGIIYQ
 GAVKKNFSPYLRPQETGNRSKVRWYQYLFDEKGGLEFTANGADLNLSALPYSAAQIEAADHAFELTNNYTWVRALS
 AQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQARQLRLVIQPLLLK

SEQ ID NO 15

MSNKLVEKRVDQADLAWLTDPEVYEVTNIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLIDYAENGQ
 GPVNFYAEDFDDSNFNSVKVPGNLELQGFQGPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQIPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKE
 VSLKFDGAATAIYVWLNHFVGYGEDSFTPSEFMVTKFLKKENNRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVT
 LQAKPRLHLEDLKLTAASLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASFKEVRDSEGLVAEKLGPISRSEQLEFTLADLPV
 AAWSAEKPPLYQVRLYLYQAGSLLEVSQRQEVGFRNFELKDGMIMYLNQORIVFKGANRHEFDSKLGRAITEEDMIW
 DIKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGHHEDPSFNVPGDDQHWLGASLSRV
 KNMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYPAPAKVIEEY
 LTNKPAPKPFISVEYAHAMGNSVGDLAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEFCGNG
 LVFADRTTESPKLANVKALYANLKLEVKDQGLFLKNDNLFTNSSSYFLTSLLVDGKLTYSQSRPLTFGLEPGESGT
 FALPWPVEVADEKGEVVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEAEVAQKLPEFKPEGRPDLDVSDYNLGLKGNFQILF
 SKVKGWVPSLKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLARWENAGKYARLKDISEVVKEDSVLVKTAFTL
 PVALKGDLTVTYEVDDGRGKIAVTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDYRYYGLGPNESYPDRLEGNYLGIIYQ
 GAVKKNFSPYLRPQETGNRSKVRWYQYLFDEKGGLEFTANGADLNLSALPYSAAQIEAADHAFELTNNYTWVRALS
 AQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQARQLRLVIQPLLLK

SEQ ID NO 16

MSNKLVEKRVDQADLAWLTDPEVYEVTNIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLIDYAENGQ
 GPVNFYAEDFDDSNFNSVKVPGNLELQGFQGPQYVNIQYPWDGSEEIFPPQVPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKE
 VSLKFAGAATAIYVWLNHFVGYGEDSFTPSEFMVTKFLKKENNRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRLSGLFRSVT
 LQAKPLHLEDLKLTAASLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASFKEVRDSEGLVAEKLGPISRSEQLEFTLADLPV
 AAWSAEKPPLYQVRLYLYQAGSLLEVSQRQEVGFRNFELKDGMIMYLNQORIVFKGVNRHEFDSKLGRAITEEDMIW
 DIKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGHHEDPSFNVPGDDQHWLGASLSRVK
 NMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYPAPAKEIEEYL
 TKKPAKPFISVEYAHAMGNSVGDLAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEFCGNG
 LVFADRTTSPKLANVKALYSNLKLEVKDQGLFLKNDNLFTNSSAYYFLTSLLVDGKLTYSQSQPLTFGLEPGESGT
 FVLWPVEVEDEKGEIVYQVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEAEAVTKLPEFYFAGRPPELVSDSNLGLKGNFRILF
 SKAKGWPVSIKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLAKWENAGKYARLQDISYEIKENSVLVKTAFTL
 PVALKGDLTITYEVDLSGKIAVTANFPGAVENGLLPFAFLNLFALPKELSDYRYYGLGPNESYADRLEGSYLGIIYQ
 GAVEKNFTPYLRPQEAGNRSKVRYQYLFDEESGLEFTANGADLNLSALPYSAAQIEAADHAFELSNNYTWVRALA
 AQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQEARQLKLVIQPLLLK

SEQ ID NO 17

MSNKLVEKRVDQADLAWLTDPEVYEVTNIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLIDYAENGQ
 GPVNFYAEDFDDSNFNSVKVPGNLELQGFQGPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQIPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKE
 VSLKFDGAATAIYVWLNHFVGYGEDSFTPSEFMVTKFLKKENNRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVT
 LQAKPRLHLEDLKLTAASLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASFKEVRDSEGLVAEKLGPISRSEQLEFTLADLPV
 AAWSAEKPPLYQVRLYLYQAGSLLEVSQRQEVGFRNFELKDGMIMYLNQORIVFKGVNRHEFDSKLGRAITEEDMIW

DIKTIKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGGHEDPSFNVPGDDQHWLGASLSRV
KNMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMA DYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEY
LTNKPAPKPFISVEYAHAMGNSVGD LAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEFCNG
LVFADRTESPKLANVKALYANLKLEVKGQFLKNDNLFTNSSSYFLTSLLDVGKLTYSRPLTFGLEPGESGT
FALPWPEVADEKGEVVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEVAQKLPEFKPEGRPDLDVSDYNLGLKGNFQILF
SKVKGWVPVSLKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLARWENAGKYARLKDISCEVKEDSVLVKTAFTL
PVALKGDLTVTYEV DGRGKIAVTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDYRYYGLGPNESYPDRLEGNYLGIYQ
GAVKKNFSPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADNLNLSALPYSAAQIEAADHAFDLTNNYTWVRALS
AQMVGVDSDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVIQPLLLK

SEQ ID NO 18

MSNKLKVEKRVDDADLAWLTDPEVYEVNTIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLIDYAENGQ
GPVNFYAEDFDDSNFNSVKVPGNLELQGFQGPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQIPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKE
VSLKFDGAATAIYVWLNHGFVGYGEDSFPTSEFMVTKFLKKNENRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVT
LQAKPRLHLEDLKLTA SLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASFKEVRDSEGLVAEKLGPIGSEQLEFTLADLPV
AAWSAEKPNLYQVRLYLYQAGSLLEVS RQEVGFRNFELKDGIMYLNQRI VFKGVNRHEFDSKLGRAITEEDMIW
DIKTIKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGGHEDPSFNVPGDDQHWLGASLSRV
KNMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMA DYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEY
LTNKPAPKPFISVEYAHAMGNSVGD LAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEFCNG
LVFADRTESPKLANVKALYANLKLEVKGQFLKNDNLFTNSSSYFLTSLLDVGKLTYSRPLTFGLEPGESGT
FALPWPEVADEKGEVVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEVAQKLPEFKPEGRPDLDVSDYNLGLKGNFQILF
SKVKGWVPVSLKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLARWENAGKYARLKDISCEVKEDSVLVKTAFTL
PVALKGDLTVTYEV DGRGKIAVTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDYRYYGLGPNESYPDRLEGNYLGIYQ
GAVKKNFSPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADNLNLSALPYSAAQIEAADHAFELTNNYTWVRALS
AQMVGVDSDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVIQPLLLK

SEQ ID NO 19

MSNKLKVEKRVDDADLAWLTDPEVYEVNTIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGNWLIDYAENGQ
GPINFYAEDFDDSNFNSVKVPGNLELQGFQGPQYVNIQYPWDGSEEIFPPQVPSKNPLASYVRYFDLDEALWDKE
VSLKFAGAATAIYVWLNHGFVGYGEDSFPTSEFMVTKFLKKEGNRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRLSGLFRSVT
LEAKPLHLEDLKLTA SLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASFKEVRDSEGLVAEKVGPIRSEKLDLADLPV
AAWSAEKPNLYQVRLYLYQAGSLLEVS RQEVGFRNFELKDGIMYLNQRI VFKGVNRHEFDSKLGRAITEADMIW
DIKTMKQSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGGHEDPSFNVPGDDQHWLGASLSRVK
NMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMA DYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEYL
TKKPAKPFISVEYAHAMGNSVGD LAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEFCGDGL
VFADRTTSPKLANVKALYSNLKLEVKGQFLKNDNLFTNSSAYYFLTSLLDVGKLTYSQPLTFGLEPGESGTF
ALPWPEVEDEKGEIVYQVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEVAEAVTKLPEFYFAGRPDLVSDFNGLKGNFRI LFS
KAKGWVPSIKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLAKWENAGKYARLQDISYEIKENSALVKTAFTLP
VALKGDLTITYEVD SLGKIAVTANFP GAVENGLLPAFGLNFALPKELSDYRYYGLGPNESYADRLEGSYLGIYQG
MVEKNFTPYLRPQEAGNRSKVRYYQLFDEEGGLEFTANGADNLNLSALPYSAAQIEAADHAFELTNNYTWVRALAA
QMVGVDSDSWGQKVHPEFCLDAQEARQLKLVIQPLLLK

SEQ ID NO 20

MQANINWLDNPEVFRVNLPAHSDHPFRDYREWQKQHSSYQQSLNGKWKHFHSANPMDRPQDFYQRDF
DSSNFDSIPVPSEIELSNYTQNYINVLFPWEGKIFRRPAYALDPNDHEEGSFSGADNTVGSYLKRFDLSSALI
GKDVHIKFEGVEQAMYVWLNHGFVGYAEDSFPTSEFDLTPYIQDKDNL LAVEVFKHSTASWLEDQDMFRFSGIFR
SVELLGIPATHLMDMDLKPRVADNYQDGI FNLKLHFIGKKAGSFHLLVKDIKGHTLLEKNEDIKENVQINNEKFE
NVHLWNNHDPYLYQLLIEVYDEQQNLELIPFQFGFRRIEISPEKVLLNGKRLIINGVNRHEWD AKRGRSITMS
DMTTDINTFKENNINAVRTCHYPNQIPWYYL CDQNGIYVMAENNLESHGTWQKMGEI EPSDNVPGSIPQWKEAVI
DRARNNYETFKNHTSILFWSLGNESYAGDNIIAMNEFYKSHDDTRLVHYEGVVHRPELKD KISDVESCMYLPKK
VEEYLQNDPPKPFMECEYMHDMGNSDGGMGSYIKLLDKYPQYFGGFIWDFIDQALLVHDEISGHDLVRYGGDFDD
RHSDYEFSGDGLMFADRTPKPAMQEVRYYYGLHK

SEQ ID NO 21

MDYTNNQLHIIYGDATFGVNGKDFQYIFSYERGGLES LKVHGKEWLYRVPTPTFWRATTDNDRGSGFNL
KAAQWL GADMFTKCTDIHLKVDRHDFAE LPIAPFNKNFSNHEYAKSAEISFTYQTLTTPATNAKIIYNIDDVGHI
KVTMRYYGKKGLPPLPVIGIRLIMPTAATGFDYEGLSGETYPDRMAGAKEGKFHIDGLPVTEYLV PQENGMHMQT
KKLTINRETTQNNVDRTNEKFSLSIQQA EKPFNFSCLPYTAEELNATHIEELPLVRRTVLVIAGAVRGVGGIDS
WGTDVESAYHINPELDHEFSFILN

SEQ ID NO 22

MTDVTHVDRASQAWLTDPTVFEVNRTPAHSSHKWYARDPQSGQWSDLKQSLDGEWRVEVVQAADINLEE
EPATAESFDDSSFERIQVPGHLQTAGLMNHKYVNVQYPWDGHENPLEPNI PENNHVALYRRKFTVSAPVANAKQA
GGSVSIVFHGMATAIYVWVNGAFVGYGEDGFTPNEFDITELLHDGENVVAVACYEYSSASWLEDQDFWRLHGLFR
SVELAARPHVHIENTQIEADWDPEAGTASLDAALTVLNAADAATVRATLKDADGNTVWQTTGDAAEAQTAISSGPL

QGIAPWSAESPTLYELDVIDQAGDVIETSQKVGFRFRFRIEDGILTINGKRIVFKGADRHEFDAEQGRAITEQ
DMIDDVVFCRHNINSIRTSHPYQERWYELCDEYGIYLIIDEANLEAHGSWSLPGDVLTEDTIVPGSKREWEGAC
VDRVNSMMRRDYNHPSVLIWSLGNESYVGDFVFRAMYKHVHDIDPNRPVHYEGVTHNRDYDDVTDIETRMYSHADE
IEKYLKDDPKPKPYLSCEYMHAMGNSVGNMDEYTALERYPKYQGGFIWDFIDQAIYATQPDGTRSLRYGGDFGDRP
SDYEFSGDGLLFANRKPSPKAQEVKQLYSNVHIDVTKDSVSVKNDNLFTATGDYVFLSVLADGKPVWQSTRRED
VPAGETRTEFDVAVPVAAYRADARELVLQVSQRLAKATDWAESGYELAFGQTVVPADATATPDTKPADGTITVGRW
NAGVRGAGREVLRSRTQGGMVSYTFAGNEFVLRPAITTFRPLTDNDRGAGHGFERVQWLGAAGRYARCVDNVLEQ
IDDSLTKGTYTYELATAQRTKVTVSYTAHTDGRVNLHVEYPPGEQGDLPITPAFGIEWTLVPQYTNLRFFGTGPAAE
TYLDRKHAKLGVWSTNAFADHAPYLMPOETGNHEDVRWAEITDDHGHGMRVSRADGAAPFAVSLLPYSSFMLEEA
QHQDELKPKKHMFLRLVLAQMGVGGDDSWMSPVHPQYHIPADKPISLDVLLELI

SEQ ID NO 23

MDADIKWLDEPETFRVNQLPAHSDHYYYGNYDEWRHNNNSRFAQNLDGQWQFNFAENLRERENDFYKMDY
DSSSFGTIEVPSEIELNNAQNNYINTLIPWEGKIYRRPAYTLPSPDDAQEGSFSDGDDNTIGEYLNKHFDLDPSLR
GKQVRIREFDGVVERAMYVWLNHGFIFYAEDSFTPSEFDLTPIYIQDEGNVLAVEVFKHSTASWIEDQDMFRFSGIFR
SVNLLAQPLVHVEDLNIRPIVTDNYQDGI FNVELQLHGEKTGNVNVVRVIDNDGNTLVNETHPVDSTVKVQDQFLE
NVHLWDNHDPYLYQLLIEIRDDEGNLVELVPYRFGFRRIEINKDHVLLNGQRLIINGVNRHEWDARRGRAITMD
DMTSDIHTFKENNINAVRTCHYPDQIPWYYLCDDNGIYMAENNLESHATWQKMGAIEPSYNVPGSVPPQWRDVVV
DRARTNYETFKNHPSILFWSLGNESYAGDNIVKMNEFYKKHDDSRLVHYEGVCHTPEYRDRISDVESWMYLPPKE
VEEYLKNNPDKPFMECEYMHDMGNSDGGMGYSISLLDKYPQYFGGFIWDFIDQALLVKDPVSGQEVMMRYGGDFDD
RHSDYEFSGDGLMFADRTPKPAMQEVRYYYGLHK

SEQ ID NO 24

MAYTNKLRVIYGDATLGLSGDGFHYIIFYSERGGLESKLNGKEWLYREPMPTFWRATTDNDRGSGFNIR
SAQWLAADTFHKCVGIDLTVDNQHFAELPIAPITNEFSDPVSAESVKIKYTATLTVPATQVTVIYEVNGQGEIK
VTMHYYGHEDLPGLPVVGMRFIMPTVATGFDYQGLSGETYPDRMAGATEGTFHVDGLPVTKYLVPPQENGMHMATH
ALTITRDSTQNNADHSREPFSLTVKQDAQPPAFSCLPYTAELENATHIEELPLARRTVLVVAGAVRGVGGIDSW
GADVEEQYHIPADRDVEFSFVLNAK

SEQ ID NO 25

MSNKLKVEKRVQADLAWLTDPEVYEVNTIIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGNWLIDYAENGQ
GPINFYAEDFDDSNFESVKVPGNLELQGFQGPQYVNIQYPWDGSEEIFPPQVPFSKIPLASYVRYFDLDEALWDKE
VSLKFAGAATAIYVWLNHGFVGYGEDSFTPSEFMVTKFLKKEGNRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRLSGLFRSVT
LEAKPLHLLEDLKLTAASLTLDNYQKGKLEVEANAIYRLPNASFKEVRDSEGLVAEKVGPIRSEKLDLADLPV
AAWSAEKPNLYQVRLYLYQAGSLLEVSQRQEVGFERNFELKDGIMYLNQORIVFKGVNRHEFDSKLGRAITEADMIW
DIKTMKQSNINAVRCSHPYQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGHEDEPSFNVPDGDQHWLGASLSRVK
NMMARDKNHASILIWLSLGNESYAGTVFAQMADYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYPAPAKEIEEYL
TKKPAKPFISVEYAHAMGNSVGDLAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEFCDGL
VFADRTTSPKLANVKALYSNLKLEVKGQFLIKNDNLFTNSSAYYFLTSLLDVGKLTYSQSLPTFGLEPGESGTF
ALPWPEVEDEKGEIVYQVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEAEAVTKLPEFYFAGRPVELVDSDFNLGLKGNFRILFS
KAKGWPVSIKYAGREYLRKLPFTFWRALTDNDRGAGYGYDLAKWENAGKYARLQDISYEIKENSALVKTFTTLP
VALKGDLTITYEVDLSLGIKIAVTANFPAGAVENGLLPAGFLNFALPKELSDYRYYGLGPNESYADRLEGSYLGIIYQ
MVEKNFTPYLRPQAEAGNRSKVRYQLFDEEGGLEFTANGADNLNSALPYSAQIEAADHAFELTNNTYTWVRALAA
QMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQEARQLKLVIQPLLLK

SEQ ID NO 26

MQANINWLDNPEVFRVNQLPAHSDHPPFRDYREWQKQHSYQQSLNGKWKHFHSANPMDRPQDFYQRDF
DSSNFDISIPVPSEIELSNYTQNYINLVFPWEGKIFRRPAYALDPNDHEEGSFSGADNTVGSYLKRFDLSSALI
GKDVHIKFEGVEQAMYVWLNHGFVGYAEDSFTPSEFDLTPIYIQEKDNLAVEVFKHSTASWLEDQDMFRFSGIFR
SVELLGIPATHLMDMDLKPRVADNYQDGI FNKLHLFI GKKGAGSFHLLVKDIKGHTLLEKNEDIKENVQINNEKFE
NVHLWNNHDPYLYQLLIEVYDEQQNLLELIPFQFGFRRIEISPEKVLLNGKRLIINGVNRHEWDAGRGRSITMS
DMTTDINTFKENNINAVRTCHYPNQIPWYYLCDDNGIYVMAENNLESHGTWQKMGAIEPSDNVPGSIPQWKEAVI
DRARNNYETFKNHTSILFWSLGNESYAGDNIIAMNEFYKSHDDTRLVHYEGVVHRPELKDKISDVESCMYLPKK
VEEYLQNDPPKPFMECEYMHDMGNSNGGMDSYIKLLDKYPQYFGGFIWDFIDQALLVHDEISGHDLVRYGGDFDD
RHSDYEFSGDGLMFADRKPKPAMQEVRYYYGLHK

SEQ ID NO 27

MDYTNNQLHIIYGDATFGVNGKDFQYIFYSERGGLESKLVHGKEWLYRVPTPTFWRATTDNDRGSGFNL
KAAQWLGADMFTKCTDIHLKVDRHDAELPIAPFNKFSNHEYAKSAEISFTYQTLTPATNAKIIYNIDGGHI
KVTMRYYGKKGLPLPVIGIRLIMPTAATGFDYEGLSGETYPDRMAGAKEGKFHIDGLPVTEYLVPPQENGMHMOT
KKLTINRETTQNNVDRTNEKFSLSIQQAEPFNFSCLPYTAELENATHIEELPLVRRTVLVVAGAVRGVGGIDS
WGTDVESAYHINPDLDHEFSFILN

SEQ ID NO 28

MKANIKWLDDPEVFRINQLPAHSDHPPFYKDYREWQKHSSSFQKSLNGAWQFHSKDPQSRPIDFYKLSF
DSSSFDITIPVPSEIELNGYAQNQYTNILYPWESKIYRKPAYTLGRGIKDGDFSQKGDNTVGSYLKHFDLNPAALAG

HDIHIQFEGVERAMYVYLNGHFIGYAEDSFTPSEFDLTPYIQAKDNILAVEVFKHSTASWLEDQDMFRFSGIFRS
VELLALPRTHLMDLDIKPTVVNDYHDGVFNAKLHFMGKTSNGNVHVLIEDIDGKTLNKKLPKSTVEIENETFAN
VHLWDNHDPPYLYQLIEVHDQDGKLVLELIPYQFGFRKIEITKDHVLLNGKRLIINGVNRHEWDAKRGRSITLAD
MKQDIATFKHNNINAVRTCHYPNQIPWYYLCDQNGIYMAENNLESHGTWQKLGQVEATSNVPGSIPWEVREVVD
RARSNYETFKNHTAILFWSLGNESYAGSNIAAMNKLYKDHSSRLTHYEGVFHAFEFKKEISDLESCMYLPPKEA
EEYLQNPKKPLVECEYMHDMGNSDGGIGSYIKLIDKYPQYMGGFIDWDFIDQALLVHDPVSGQDVLRYGGDFDDRH
SDYEFSGDGLMFADRTPKPAMQEVRYYYGLHK

SEQ ID NO 29

MAYTNNLHVYGEASLGVNGQDFAYLFSYERGVLLESLKIKDKEWLYRTPPTPTFWRATTDNDRGSGFNQK
AAQWLGA DMFTKCVGIHVQVDDHQFDELPIAPINNQFSNQEF AHEVKVAFDYETLTTPATKVKIIYNINDAGHMT
ITMHYFGKKGLPPLPVIGMRFIMPTKAKSFDYTGLSGETYPDRMAGAERGFHIDGLPVTKYLPQENGMMHMQTN
ELVITRNSTQNNADKDGDFSLKITQTKQPFNFSLLPYTAEELNATHIEELPLARRSVLVIAGAVRGVGGIDSWG
SDVEEQYHIDPEQDHEFSFTLN

SEQ ID NO 30

MNMTKIQTYLNDPKIVSVNTVDAHSDHKYFESLEEFSSEGEMKLRQSLNGKWKIHYAQNTNQVLKDFYKT
EFDETDLNFINVPGHLELQGGFGSPQYVNTQYPWDGKEFLRPPQVPQESNAVASVVKHFTLNDALKDKKVFISFQG
VATSIFVWVNGNFVGYSEDSFTPSEFEISDYLVEGDNKLAVAVRYSTASWLEDQDFWRLYGI FRDVYLYAIPKV
HVQDLFVKGDYDYQTKAGQLDIDLKTVDYEDKKIKYVLSDEYEGIVTEGDASVNGDGELSVSLENLKIKPWSAES
PKLYDLILHVLDDDQVVEVVPVKVGFRFEIKDKMLLNGKRI VFKGVNRHEFNARTGRCITEEDMLWDIKVMKQ
HNINAVRTSHYPNQTRWYELCDEYGLYVIDEANLETHGTWQKLGCEPSWNIPASEPEWLPACLDRANMFQORDK
NHASVIWSCGNESYAGKDIADMADYFRSVDNTRPVHYEGVAWCREFDYITDIESRMYAKPADIEEYLTGKLV
LSSVSDKHFPASGNLTNKPQKPYISCEYMHTMGNSGGGLQLYTDLEKYPEYQGGFIWDFIDQAIYKTL PNGSEFLS
YGGDWHDRPSDYEFCEGNI VFADRTLTPKLQTVKHLYSNIKIAVDEKSVTIKNDNLFE DL SAYTFLARVYEDGRK
VSESEYHFDVKPGEEATFPVNFVVEASNSEQIYEVACVLREATKWAPKGHEIVRGQYVVEKISTETPVKAPLNVV
EGDFNIGIQGQNF SILL SRAQNTLVSAKYNGVEFIEKGP KLSFTRAYTDNDRGAGYPFEMAGWKVAGNYSKVTDT
QIQIEDDSVKVTYVHELPGLS DVEVKVTYQVDYKGRI FVTANYDGKAGLPNFPEFGLEFAIGSQFTNLSYYGYGA
EESYRDKLPGAYLGRYETSVEKTFAPYLM PQESGNHYGTREFTVSDDNHNGLKFTALNKA FEFSALRNSTEQIEN
ARHQYELQESDATWIKVLA AQMGVGGDDSWGAPVHDEFLLSSADSYQLSFMIEPLN

SEQ ID NO 31

MNNKLAQVKRVDQADLAWLTDPEIYEVNTIPPHSDHESFQSLEEELEEGKSSSLVQSLDGDWLIDYAENGE
GPANFYEENFDDSSFKSVKVPGNLELQGGFGQPQYVNVQYPWDGSD EIFPPMIPSKNPVASVYRYFDLEEA FWDKE
VSLKFAGAATAIYVWLNHGFVGYGEDSFTPSEFMVTKFLKKEGNRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSG LFRSVT
LEAKPLHLQLDLKL TASLTNDYQKGS LQVEADIDYRLPNSSFKLELRDSAGELVAEKVGPIRSEKLD FSLADLPV
AAWSAEENPLYQVRLSLYQQGS LLEVSRQEVGFRNFELKD GIMYLN GKRI VFKGVNRHEFDSKLGRAITEADMIW
DIKTMKQSNINAVRCSHYPNQSI FYHLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGGHEDPSFNVPGDDQRWLGASLSRV
KNMMARDKNHASILIWSLGNESYAGKVFAQMADYVRQADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKEIEEY
LTKKPAKPFVSC EYAHAMGNSVGD LAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKEGHLLYGGDFDRPSDYEF CGDG
LVFADRTTSPKLANVKALYSNLKLELKDGLFLKNDNLFTNSSAYYFLTSLLDGKLTYSQSQPLTFALPESG
FALPWPEVEDEKGEIVYQVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEAEAVTKLPEFY PAGRP ELVDS DYNLGIKNGFRILF
SKAKGWPVSIKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLAKWENAGKYARLQDISYEIKENSVLVKTAF
PVALKGDLTITYEVD SLGKIAVTANFP GAVENGLLP AFGLN FALPKELSDYRYYGLGPNESYADRLEGSYLGIYQ
GAVEKNFTPYLRPQEVGNRSKVRYYQLFDEEGGLEFTANGANLNL SALPYSAAQIEAADHAFELTNNTWVRALA
AQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQEARQLKLVIQPLFTE

SEQ ID NO 32

MADTAELAIVHATTASASWLTDP TVFAANRKP AHSSHRYVIGETSEPKQSLDGEWKVRIEQARNVDVES
APFAAVDFEDGDFGAIEVPGHLQ MAGYLKNKYVNIQYPWDGHEDPQAPNIPENNHVAIYRRRFALDAQ LARTLEN
DGTVSLTFHGAATAIYVWLDGTFVGYGEDGFTPSEFDVTEALRNNGNNAADSP EAEHTLT VACYEYSSASWLEDQ
DFWRLHGLFRTVELAAQPHTHVETVQLEADYTAADTAGTADTAELNAALTLRNPADAMTIESTLRDGDGNVWES
TQACNGEIALNSGKMTNIAPWSAESPTLYTLTVRVVGH DGAI IETVTQKIGFRTFRIENGIMTLNGKRIVFKGAD
RHEFDAKRGRAITREDMLSDVVFCKRHNINAI RTSHYPNQEYWYDL CDEYGLYLIDETNMETHGTWVANNVERPE
DGIPGSRPEWEDACVDRINSMMRRDYNHPSVLIWSLGNES SAGEVFRAMYRHAHTIDPNRPVHYEGSVHMFED
VTDIESRMYAHAD EIERYLNDGSPAHTDGPKKPYISCEYMHAMGNSCGNMDEYTALERYPMYQGGFIWDFIDQAI
ETKLPDGTTRMCYGGDFGDRPSDYEFSGDGLLFADRTPSPKAQEVKQLYANVKIAVSVDEARITNDNL FVSTGDY
RFVLRILADGKPVWSTTRRFDV AAGESASFEVDWPVDDYRSNAEELVLEVSQQ LGNACDWAPAGYELAFGQC VVA
GAKTTADA VDAAGAPADGTVT LGRWNAGVRGQGREALFSRTQGMVSYTFGEREFVLR RPSITTFRPLTDNDRGA
GHAFERAAWAVAGKYARCVDCAIANRGENAVEATYTYELAI PQRKVTVRYVADTAGLVSLDVEY PGEKNGDLPT
IPAFGIEWALPVEYANLRFY GAGPEETYADRRHAKLGWSTTAGDDCAPYLLPQETGNHEDVRWAEITD DSGHGV
RVKRGAGAKPFAMSLLPYSSTMLEEALHQDEL PKPRHMF LRLLA AQMGVGGDDSWMSPVHEQYQLPADQPLSLNV
QLKLF

SEQ ID NO 33

MANETRIEHASETWLADSTVFEVNRVPAHSDHKCYAHDSQTNEWSDLRQSLDGEWRVEVVQASDIEFNE
 EPFVRENFDSDAFERIQVPGHLQ MAGLMNNKYVNIQYPWDGHENPAEPNIPENNHVALYRKTFTMANRLADTKNA
 GGTVSIVFHGMATAIYVWVNGMFVGYGEDGFTPNEFDITEMLHDGENVVAVACYEYSSASWLEDQDFWRLHGLFR
 SVELAAQPHVHIENMQIESDWDPESGSASLDAALTVRNAADAATISATLKDS DGNVWETANCADPDTSISTGSL
 NGIRPWSAEDPVLYEFVTVIDHAGNIAEVAVQKVGFRFRFRIEDGIMTINGKRIVFKGADRHEFDPKRGRAITEQ
 DMIDDVVFCKRHNLNAI RTSHYPNQERWYELCDEYGIYLI DETNLETHGWSWCLPGDVLTEETA VPGSKAHWEGAC
 VDRVNSMVRRDYNHPSVLIWSLGNESYTG DVFRAMYKRVHDI DPNRPVHYEGVTHNRDYN DVTDIETRMYAHADA
 IEEYLKNDPQKPYISCEYMHAMGNSCGNMDEY TALERYPKYQGGFIWDFIDQAIYATQPDGTTSLRYGGDFGDRP
 SDYEFSGNGLVFADRKPTPKAQEVKQLYSNVHIDVAEDSVTIKNDNLFTSTGEYTFVLRVLADGEPVWQSERRFD
 VPAGSTEKLDVDWPLDLYRDGASELVLEVSQRLAKATN WAVAGYELAFGQTVVAGSKKASAPVKPVDGIVTVGRW
 NVGVQSGGREVLLSRTQGGLVSYTFNNREFVLRRPAVTTFRALT DNDRGAGHGFERAQWL GAGRYARCIGNEIEQ
 IDENTV KASYTYELATPQRTKVTVSYTADTTGRVNLHVEYPPGPGDLPTIPAFGIEWTL PVQYSNLRFFGAGPEE
 TYQDRKHAKLGVWSTDAFKDHAPY LMPQETGNHEDVRWAEITDEKGHGLRISRAEGAEPFAMSLQPYSSFMLEEA
 QHQDELPA PKHMFRLVLAEQMGVGGDDSWMSPVHPQYHIPADQPI SLDVDLDLI

SEQ ID NO 34

MSNKL VKEKRV DQADLAWLTDPEVYEVNTI PPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLIDYAENGQ
 GPVNFYAEDFDSDSNF KSVKVPGNLELQGGFGQPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQIPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKE
 VSLKFDGAATAIYVWLN GHFVGYGEDSFTPSEFMVT KFLK KENNLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVT
 LQAKPRLHLEDLKL TASLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASF KLEVRDSEGD LVAEKLGP IRSEQLEFTLADLPV
 AAWSAEKP NLYQVRLYLYQAGS LLEVS RQEVGFRNFELKDGIMYLNQRI VFKGANRHEFDSKLGRAITEEDMIW
 DIKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDE ANLESHGTWEKVGGHEDPSFNVPGDDQHWLGASLSRV
 KNMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEY
 LTNKPAKPFISVEYAHAMGNSVGD LAAYTALEKYPHYQGGFIW DWIDQGLEKDGHLLYGGDFDRPTDYEF CGNG
 LVFADRTE SPKLANVKALYANLKLEVKDQGLFLKNDNLFTNSSSYFLTSLLV DGKLTYQSRPLTFGLEPGESGT
 FALPWPEVADEKGEVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAE EVAQKLPEFKPEGRPD LVDSY NLGLKGN NFQILF
 SKVKGW PVS LKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLARWENAGKYARLKDISCEVKEDSVLVKTAFTL
 PVALKGD LTVTYEVDGRGKIAVTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDY RYYGLGPNESYPDRLEGNYLGIYQ
 GAVKKNFSPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADLNLSALPYSAAQIEAADHAFELTNNTWVRALS
 AQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVIQPLLLK

SEQ ID NO 35

MSNKL VKEKRV DQADLAWLTDPEVYEVNTI PPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLIDYAENGQ
 GPVNFYAEDFDSDSNF KSVKVPGNLELQGGFGQPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQIPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKE
 VSLKFDGAATAIYVWLN GHFVGYGEDSFTPSEFMVT KFLK KENNLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVT
 LQAKPRLHLEDLKL TASLTDNYQKGKLEVEANIAYRLPNASF KLEVRDSEGD LVAEKLGP IRSEQLEFTLADLPV
 AAWSAEKP NLYQVRLYLYQAGS LLEVS RQEVGFRNFELKDGIMYLNQRI VFKGANRHEFDSKLGRAITEEDMIW
 DIKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDE ANLESHGTWEKVGGHEDPSFNVPGDDQHWLGASLSRV
 KNMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEY
 LTNKPAKPFISVEYAHAMGNSVGD LAAYTALEKYPHYQGGFIW DWIDQGLEKDGHLLYGGDFDRPTDYEF CGNG
 LVFADRTE SPKLANVKALYANLKLEVKDQGLFLKNDNLFTNSSSYFLTSLLV DGKLTYQSRPLTFGLEPGESGT
 FALPWPEVADEKGEVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAE EVAQKLPEFKPEGRPD LVDSY NLGLKGN NFQILF
 SKVKGW PVS LKYAGREYLKRLPEFTFWRALTDNDRGAGYGYDLARWENAGKYARLKDISCEVKEDSVLVKTAFTL
 PVALKGD LTVTYEVDGRGKIAVTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDY RYYGLGPNESYPDRLEGNYLGIYQ
 GAVKKNFSPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADLNLSALPYSAAQIEAADHAFELTNNTWVRALS
 AQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVIQPLLLK

SEQ ID NO 36

MNMTEKIQT YLNDPKIVSVNTVDAHSDHKYFESLEEFSEGE MKLRQSLNGKWKIHYAQNTNQVLKDFYK
 TEFDETDLNF INVPGHLELQGGFGSPQYVNTQYPWDGKEFLRPPQVPQESNAVAS YVKHFTLNDALKDKKV FISFQ
 GVATSIFVWVNGNFVGYSEDSFTPSEFEISDYLV EGDNKLAVAVYRYSTASWLEDQDFWRLYGI FRDVYLYAIPK
 VHVQDLFVKGDYDYQTKAGQLDIDLKTVGDYEDKKI KYVLSDYEGIVTEGDASVNGDGELSVSLENLKI KPWSAE
 SPKLYDLILHVLDDDQVVEVVPVKVGFR RFEIKDKMLLNGKRIVFKGVNRHEFNARTGRCITEEDMLWDIKVMK
 QHNINAVRTSHYPNQTRWYELCDEYGLYVIDE ANLETHGTWQKLGLCEPSWNI PASEPEWLPA CLDRANNM FQRD
 KNHASV I IWS CGNESYAGKDIADMADYFRSVDNTRPVHYEGVAWCREFDYITDIESRMYAKPADIEEYLTGKLV
 DLSSVSDKH FASGNLTNKPQKPYISCEYMHMTMGNSGGGLQLYTDLEKYPEYQGGFIWDFIDQAIYKTL PNGSEFL
 SYGGDWHDRPSDYEF CGNGIVFADRTLT PKLQTVKHLYSNI KIAVDEKSVTIKNDNL FEDLSAYTFLARVYEDGR
 KVSESEYHFDVKPGEEATFPVNFVVEASNSEQIYEVACVLREATEWAPKGHEIVRGQYVVEKISTETPVKAPLN
 VEGDFNIGIQGNF SILL SRAQNTLVSAKYNGVEFIEKGPKLSFTRAYTDNDRGAGYPFEMAGWKVAGNYSKVTD
 TQIQIEDDSVKVYTVHLEPGLSDVEVKVTVQVDYKGRIFVTANYD GKAGLPNFPEFGLEFAIGSQFTNLSYGYG
 AEESYRDKLP GAYLGRYETSVEKTFAPY LMPQESGNHYGTREFTVSDDNHNGLKFTALNKAFFSALRNSTEQIE
 NARHQYELQESDATWIKVLAAQMGVGGDDTWGAPVHDEFLLSSADSYQLSFMIEPLN

SEQ ID NO 37

MNMTEKIQTYLNDPKIVSVNTVDAHSDHKYFESLEEFSEGEMKLRQSLNGKWKIHYAQNNTQVLKDFYK
TEFDETDLNFINVPGHLELQGFGSPQYVNTQYPWDGKEFLRPPQVPQESNAVASVYKHFTLNDALKDKKVFISFQ
GVATSI FVWVNGNFVGYSEDSFTPSEFEI SDYLVEGDNKLAVAVYRYSTASWLEDQDFWRLYGIFRDVYLYAIPK
VHVQDLFVKG DYDYQTKAGQLDIDLKTVGDYEDKKIKYVLS DYEGIVTEGDASVNGDGELSLSLENLKI KPWSAE
SPKLYDLILHVLDDDDQVVEVVPVKVGFRFEIKDKLMLLNGKRIVFKGVNRHEFNARTGRCITEEDMLWDIKVMK
QHNINAVRTSHYPNQTRWYELCDEYGLYVIDEANLETHGTWQKLGLCEPSWNI PASEPEWLPACLD RANNMFORQD
KNHASV IWS CGNESYAGKDIADMADYFRSVDNTRPVHYEGVAWCREFDYITDIESRMYAKPADIEEYLTGKLV
DLSSVSDKH FASGNLTNKPQKPYISCEYMHMTMGNSGGGLQLYTDLEKYPEYQGGFIWDFIDQAIYKTL PNGSEFL
SYGGDWHDRPSDYEF CGNGIVFADRTLTPKLQTVKHLYSNI KIAVDEKSVTIKNDNL FEDLSAYTFLARVYEDGR
KVSESEYHFDVKPGEEATFPVNFVVEASNSEQIYEACVLREATEWAPKGHEIVRGQYVVEKISTETPVKAPLNV
VEGDFNIGIQGNFSILLSRAQNTLVSAKYNGVEFIEKGPKLSFTRAYTDNDRGAGYPFEMAGWKVAGNYSKVTD
TQIQIEDDSVKVITYVHELPLGLSDVEVKVITYQVDYKGRI FVTANYDYGKAGLPNFPEFGLEFAIGSQFTNLSYGYG
AEESYRDKLP GAYLGRYETSVEKTFAPYLM PQESGNHYGTREFTVSDDNHNLKFTALNKAFEF SALRNSTEQIE
NARHQYELQESDATWIKVLA AQMGVGGDDTWGAPVHDEFLLSSADSYQLSFMIEPLN

SEQ ID NO 38

MNMTEKIQTYLNDPKIVSVNTVDAHSDHKYFESLEEFSEGEMKLRQSLNGKWKIHYAQNNTQVLKDFYK
TEFDETDLNFINVPGHLELQGFGSPQYVNTQYPWDGKEFLRPPQVPQESNAVASVYKHFTLNDALKDKKVFISFQ
GVATSI FVWVNGNFVGYSEDSFTPSEFEI SDYLVEGDNKLAVAVYRYSTASWLEDQDFWRLYGIFRDVYLYAIPK
VHVQDLFVKG DYDYQTKAGQLDIDLKTVGDYEDKKIKYVLS DYEGIVTEGDASVNGDGELSLSLENLKI KPWSAE
SPKLYDLILHVLDDDDQVVEVVPVKVGFRFEIKDKLMLLNGKRIVFKGVNRHEFNARTGRCITEEDMLWDIKVMK
QHNINAVRTSHYPNQTRWYELCDEYGLYVIDEANLETHGTWQKLGLCEPSWNI PASEPEWLPACLD RANNMFORQD
KNHASV IWS CGNESYAGKDIADMADYFRSVDNTRPVHYEGVAWCREFDYITDIESRMYAKPADIEEYLTGKLV
DLSSVSDKH FASGNLTNKPQKPYISCEYMHMTMGNSGGGLQLYTDLEKYPEYQGGFIWDFIDQAIYKTL PNGSEFL
SYGGDWHDRPSDYEF CGNGIVFADRTLTPKLQTVKHLYSNI KIAVDEKSVTIKNDNL FEDLSAYTFLARVYEDGR
KVSESEYHFDVKPGEEATFPVNFVVEASNSEQIYEACVLREATEWAPKGHEIVRGQYVVEKISTETPVKAPLNV
VEGDFNIGIQGNFSILLSRAQNTLVSAKYNGVEFIEKGPKLSFTRAYTDNDRGAGYPFEMAGWKVAGNYSKVTD
TQIQIEDDSVKVITYVHELPLGLSDVEVKVITYQVDYKGRI FVTANYDYGKAGLPNFPEFGLEFAIGSQFTNLSYGYG
AEESYRDKLP GAYLGRYETSVEKTFAPYLM PQESGNHYGTREFTVSDDNHNLKFTALNKAFEF SALRNSTEQIE
NARHQYELQESDATWIKVLA AQMGVGGDDTWGAPVHDEFLLSSADSYQLSFMIEPLN

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Потребление лактозы штаммом DSM 28889

Для изучения потребления лактозы штамм DSM 28889 и предшественник DSM 22934 выращивали в анаэробных условиях в питательной среде с химически определенным составом (CDM), содержащей 20 г/л лактозы, 1 г/л ацетата натрия, 0,6 г/л цитрата аммония, 3 г/л KH_2PO_4 , 2,5 г/л K_2HPO_4 , 0,24 г/л мочевины, 0,42 г/л NaHCO_3 , 0,2 г/л $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,05 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,028 г/л $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,005 г/л $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, а также микроэлементы в составе 7,7 мкМ HCl, 1,5 мг/л $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 70 мкг/л ZnCl_2 , 100 мкг/л $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6 мкг/л H_3BO_3 , 190 мкг/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 мкг/л $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 24 мкг/л $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и витамины, включающие 1 мг/л пиридоксина гидрохлорида, 0,5 мг/л *пара*-аминобензойной кислоты, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 4 мг/л кальций-DL-пантотената, 0,5 мг/л тиамина, 0,5 мг/л липоевой кислоты, 0,5 мг/л рибофлавина, 0,2 мг/л биотина, 0,2 мг/л фолиевой кислоты, 0,01 мг/л витамина B12 наряду с 0,01 мг/л каждого из четырех азотистых оснований: аденина, гуанина, урацила и ксантина, 0,5 г/л цистеина, 0,08 мг/л каждой из L-аминокислот: аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина,

изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина. Для штамма DSM 28889 также была включена сахароза в концентрации 0,05% (масс./об.). Процедура состояла из растворения солей, доведения pH до 6,6, продувки смесью N_2/CO_2 (80/20) в течение 40 мин, аликвотирования в стерильные флаконы для сыворотки, продувки свободного пространства над раствором в течение 5-10 мин, закупоривания флаконов и автоклавирования при 121°C в течение 20 минут. Лактозу, цистеин, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ и $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ растворяли в бескислородной воде в отдельных флаконах для сыворотки, продували азотом свободное пространство над раствором в течение 10 минут и автоклавировали, как описано выше (только лактозу в течение 10 минут). Раствор витаминов, раствор микроэлементов, раствор мочевины и раствор азотистых оснований подвергали стерильной фильтрации в отдельные автоклавированные флаконы для сыворотки, продутые азотом. Аминокислоты растворяли по отдельности и смешивали во флаконе для сыворотки, свободное пространство над раствором продували N_2 в течение 10 минут и автоклавировали при 121°C в течение 10 минут. Непосредственно перед проведением эксперимента к анаэробному солевому раствору в стерильных условиях добавляли лактозу, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, мочевину, раствор витаминов, смесь аминокислот и азотистые основания. В конце в стерильных условиях добавляли цистеин для снижения окислительно-восстановительного потенциала.

Прекультуры для эксперимента по выращиванию в CDM выращивали в течение ночи в анаэробных условиях в среде CDM в колбах для сыворотки при 40°C в серии разведений, так чтобы бактерии находились в экспоненциальной фазе роста, то есть при OD_{600} 0,8-1,2, непосредственно перед инокуляцией. Бактерии из прекультур инокулировали в содержащие анаэробную среду CDM колбы для сыворотки до OD_{600} приблизительно 0,07 и инкубировали при 40°C. Образцы отбирали для измерения OD_{600} и ВЭЖХ-анализа концентраций внеклеточной лактозы, галактозы и глюкозы вдоль кривой роста (фиг. 1).

Штамм-предшественник DSM 22934 потребляет приблизительно 46% лактозы в течение чуть более 24 часов ферментации, в то время как DSM 28889 потребляет всю лактозу до истечения 10 часов. Штамм DSM 22934 потребляет глюкозу, продукт гидролиза лактозы, для роста, выделяя галактозу, как можно видеть по их внеклеточным концентрациям. Напротив, DSM 28889 секретирует и галактозу, и глюкозу, но при этом часть галактозы используется для роста. Следовательно, потребление лактозы и

активность бета-галактозидазы намного выше у штамма DSM 28889, чем у предкового DSM 22934.

Штамм DSM 28889 используют здесь в качестве примера молочнокислых бактерий, в частности, в качестве примера штамма *Streptococcus* или штамма *Streptococcus thermophilus*. Аналогичные результаты могут быть также получены для других штаммов *Streptococcus thermophilus*, таких как штаммы DSM 25850, DSM 25851, DSM 26722 или DSM 32227, и для штаммов *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, таких как штаммы DSM 26420 или DSM 26421.

Пример 2: Экспрессия гена бета-галактозидазы в DSM 28889

Из культур, выращенных на среде CDM, описанных в Примере 1, были взяты три образца для анализа транскрипционного профилирования для обоих штаммов в трех разных временных точках, соответствующих средней логарифмической, поздней логарифмической и стационарной фазам роста. Для штамма DSM 22934 образцы отбирали при OD₆₀₀ приблизительно 1,1, 2,1 и 3,2, в то время как для штамма DSM 28889 образцы отбирали при OD₆₀₀ приблизительно 0,5, 1,0 и для третьей временной точки 2,3-3,0 (**фиг. 1**). Значения OD₆₀₀ при отборе отличаются между штаммами, чтобы провести отбор в одинаковых фазах роста, поскольку штамм DSM 28889 демонстрирует более медленную скорость роста и конечное значение OD₆₀₀, чем штамм DSM 22934. Тщательно перемешивали объем клеточной культуры в реагенте RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) в соотношении 1:2 при отборе клеток, центрифугировали при 10000 g, жидкость аспирировали, клеточный дебрис хранили при -80°C. Клеточный дебрис растворяли в буфере TE, содержащем лизоцим (15 мг/мл), протеиназу К (20 мг/мл) и мутанолизин (250 ЕД/мкл), и инкубировали при 37°C при встряхивании при 1400 об/мин в течение 10 минут. Последующую процедуру выделения РНК (рибонуклеиновая кислота) проводили с помощью набора RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя, включая удаление ДНК с помощью ДНКазы I. Суммарную РНК оценивали с помощью биоанализатора (Agilent), истощение рибосомной РНК и секвенирование 50 п.о. (Illumina) после этого проводили в компании Genewiz (США). Полученные необработанные считывания обрезали с помощью программы Trimmomatic с использованием параметров по умолчанию, обрезанные считывания картировали с использованием программы CLC Genomics Workbench (параметры по умолчанию) и извлекали уникальные количества генов.

Дифференциальную экспрессию генов анализировали с использованием программы DESeq2 в пакете программ SARTools с параметрами по умолчанию.

Сравнение данных экспрессии между фазами роста и штаммами показывает очень высокую экспрессию двух генов *lac* оперона, *lacZ* и *lacS*, в клетках штамма DSM 28889 (фиг. 2). Ген *lacZ* является наиболее экспрессируемым геном как в средней логарифмической, так и в поздней логарифмической фазах роста и занимает 7-е место в стационарной фазе для штамма DSM 28889. Для всех образцов средний уровень экспрессии генов составляет приблизительно 250, а экспрессия *lacZ* (нормализованное количество генов, 194834), таким образом, почти в 1000 раз выше, чем средний уровень экспрессии генов во время средней логарифмической фазы DSM 28889. По сравнению со штаммом DSM 22934 экспрессия *lacZ* в 8 раз и в 5,2 раза выше в средней логарифмической и поздней логарифмической фазах роста, тогда как в стационарной фазе не наблюдается статистически значимого кратного изменения. Аналогичные кратные изменения наблюдаются для *lacS*, части *lac* оперона.

Штамм DSM 28889 используют здесь в качестве примера молочнокислых бактерий, в частности, в качестве примера штамма *Streptococcus* или штамма *Streptococcus thermophilus*. Аналогичные результаты могут быть также получены для других штаммов *Streptococcus thermophilus*, таких как штаммы DSM 25850, DSM 25851, DSM 26722 или DSM 32227, и для штаммов *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, таких как штаммы DSM 26420 или DSM 26421.

Пример 3: Ферментация с импульсной подачей в системе DASGIP

Два цикла (R1, R2) анаэробной ферментации, проводимые в разные дни, осуществляли в масштабе 200 мл для штаммов, например двух штаммов *Streptococcus thermophilus* (DSM 18111 и DSM 28889). Штаммы выращивали при температуре 40°C в подходящей среде, и потребление титранта контролировали в режиме онлайн во время ферментации для поддержания постоянного pH. Образцы отбирали в разное время, как указано в **таблице 2** для R1 и **таблице 3** для R2. 50 мл 20%-ного (масс./об.) стерильного раствора лактозы импульсами подавали в реактор в экспоненциальной фазе (BM) и продолжали подачу в течение часа перед сбором клеток. Аналогичную процедуру применяли для другого реактора, за исключением того, что импульсную подачу лактозы проводили в стационарной фазе (EOF). Образцы из двух повторностей объединяли, и все образцы хранили при температуре -50°C для дальнейшего анализа, например ферментативной активности. **Результаты показаны в таблице 4 ниже.**

Таблица 2: Точки отбора проб во время ферментации (R1). Отобранный образец отмечен знаком «х».

Ферментация	DSM	Число повторностей	ВМ	ВМ+лактоза+1 ч	EOF	EOF+лактоза+1 ч
1	18111	2	х			
2	18111	1			х	
3	18111	1				х
4	28889	2		х		
5	28889	2				х
6	26420	2		х		
7	26420	2				х

Таблица 3 Точки отбора проб во время ферментации (R1). Отобранный образец отмечен знаком «х».

¹ Отбирали образцы объемом приблизительно 50 мл.

Ферментация	DSM	Число повторностей	ВМ ¹	ВМ+лактоза+1 ч
1	18111	2	х	
2	18111	2		Х
3	28889	2	х	
4	28889	2		Х

Таблица 4. Измеренная биомасса (OD_{600}) в конце ферментации (FM1-FM12) различных штаммов. Здесь DSM 28889 представляет собой мутант *S. thermophilus*, DSM 18111 представляет собой исходный штамм мутанта *S. thermophilus*, DSM 26420 представляет собой мутант *Lb. delbreuckii* подвид *bulgaricus*. ВМ означает Basemax (конец фазы экспоненциального роста), а EOF означает конец фазы стационарного роста.

Ферментация FM	DSM	ВМ	ВМ+лактоза+1ч	EOF	EOF+лактоза+1 ч
		OD_{600}	OD_{600}	OD_{600}	OD_{600}
1	18111	17	-	-	-
2	18111	16,4	-	-	-
3	18111	-	-	18,3	-

4	18111	-	-	19,0	-
5	28889	-	10,4	-	-
6	28889	-	10,8	-	-
7	28889	-	-	-	10,5
8	28889	-	-	-	10,5
9	26420	-	12	-	-
10	26420	-	11,8	-	-
11	26420	-	-	-	12,8
12	26420	-	-	-	14,6

Пример 4: Сбор клеток и приготовление бесклеточного экстракта

После ферментации клетки собирали посредством центрифугирования при 6000g или 15000g в течение 20 мин при 4°C. Лактозу, присутствующую в среде для выращивания, удаляли посредством промывания клеток 25 мл буфера для лизиса (50 mM NaH_2PO_4 буфер с pH 6,7, содержащий 10 mM KCl и 1 mM MgCl_2). Влажную клеточную массу измеряли, и клетки хранили при -20°C до дальнейшего использования. Замороженные клетки подвергали оттаиванию и ресуспендировали в буфере для лизиса (50 mM NaH_2PO_4 буфер с pH 6,7, содержащий 10 mM KCl и 1 mM MgCl_2). 1 г клеток растворяли в 10 мл буфера на льду. Клетки разрушали с помощью ультразвука с использованием следующих параметров: программа 1: общая продолжительность: 10 мин, время импульса: 30 с, время между импульсами: 40 с, амплитуда: 60 для объема 50 мл или 40 для объема 20 мл. Клеточный дебрис удаляли посредством высокоскоростного центрифугирования при 15000 g в течение 45 мин при 4°C. Прозрачный супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и хранили при 4°C до дальнейшего использования.

Пример 5: Экспрессия белков и анализ активности

Экспрессию белка анализировали посредством электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с использованием додецилсульфата натрия при использовании готового геля Mini-PROTEAN® TGX™ (Biorad), содержащего полиакриламид (7,5-10%). Концентрации белка также оценивали с помощью ДСН-ПААГ (ПААГ электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия) посредством построения калибровочной кривой с использованием маркера Precision Plus Protein™ Prestained Standard. Для измерения активности бета-галактозидазы прозрачные

супернатанты разводили в 10-50 раз в буфере А (50 мМ NaH_2PO_4 буфер с pH 6,7, содержащий 10 мМ KCl и 1 мМ MgCl_2). В отдельной реакции разведенный фермент инкубировали с раствором лактозы, приготовленным в буфере В (140 мМ лактозы, приготовленной в 100 мМ натрий-цитратном буфере с pH 6,7, содержащем 100 мкМ MgSO_4). Реакционную смесь готовили посредством смешивания 13 мкл разбавленного фермента и 37 мкл раствора лактозы в пробирке для ПЦР (полимеразной цепной реакции). Реакционную смесь инкубировали в ДНК-термоциклере при следующих параметрах инкубации (время реакции; 10 мин при 37°C, инаktivация фермента; 10 мин при 95°C, охлаждение; 4°C). Реакционные смеси хранили в морозильной камере при -20°C до дальнейшего использования. Для определения количества образующейся в ходе реакции глюкозы 10 мкл реакционной смеси переносили в одну лунку стандартного планшета для микротитрования (Thermo Fischer Scientific, Дания), содержащую 80 мкл буфера С (100 мМ NaH_2PO_4 буфера с pH 7,0, содержащего глюкозооксидазу: 0,6 г/л (Sigma Aldrich), диаммониевую соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоикислоты) (ABTS): 1,0 г/л (Sigma Aldrich), пероксидазу хрена: 0,02 г/л (Sigma Adrich)) и инкубировали при 30°C в течение 40 минут. Через 40 мин определяли оптическую плотность при 610 нм с помощью планшетного ридера с УФ спектрометром SpectroStar Omega (BMG Labtech, Германия). Для расчетов использовали значения оптической плотности от 0,1 до 1,5, если значение A_{610} нм больше 1,5, реакционную смесь разбавляли вплоть до 10 раз буфером А. Реакции проводили в трех повторях, и среднее значение трехкратного измерения использовали для расчета. Используя известную концентрацию глюкозы (0-500 мкг/мл), строили стандартную кривую и по наклону кривой рассчитывали глюкозу, образующуюся в ходе реакции. Значение максимума поглощения для каждой лактазы использовали для определения мкмоль глюкозы, образующейся в минуту, описанной как 1 единица активности с лактозой при pH 6,7 при 37°C (Ед). Рассчитывали Ед активности на грамм влажной клеточной массы или на литр ферментационной среды. Оценивали количество продуцируемого белка на грамм влажного клеточного осадка. Результаты показаны в **таблице 5** и **таблице 6** ниже.

Таблица 5. Измеренная активность лактазы и количество белка, продуцируемого на литр при ферментации различных штаммов в условиях конца фазы экспоненциального роста (ВМ) или конца фазы стационарного роста (ЕОВ). 1 Ед активности определяют как количество микромолей глюкозы, образующейся в минуту при использовании 140 мМ лактозы в качестве субстрата при pH 6,7 при 37°C. Здесь

DSM 18111 представляет собой исходный штамм мутанта *S. thermophilus*, DSM 28889 представляет собой мутант *S. thermophilus*, DSM 26420 представляет собой мутант *Lb. delbreuckii bulgaricus*. BM означает конец фазы экспоненциального роста, а EOF означает конец фазы стационарного роста.

обозначает условия конца фазы экспоненциального роста (BM).

□ обозначает условия окончания ферментации (EOF).

Ферментация	DSM	BM+	EOF+	BM+	EOF+
		лактоза+1 ч	лактоза+1 ч	лактоза+1 ч	лактоза+1 ч
		Активность (Ед/л)	Активность (Ед/л)	Концентрация белка (мг/л)	Концентрация белка (мг/л)
1	18111	110 [#]	-	3 [#]	
2	18111	379 [□]	-	11 [□]	
3	18111	-	269		8
4	28889	1116	-	32	
5	28889	-	259		7
6	26420	7689	-	27	
7	26420	-	2144	-	8

Таблица 6. Измеренная активность лактазы и количество белка, продуцируемого на грамм клеточного дебриса условиях конца фазы экспоненциального роста (BM) или конца фазы стационарного роста (EOB). 1 Ед активности определяют как количество микромолей глюкозы, образующейся в минуту при использовании 140 мМ лактозы в качестве субстрата при pH 6,7 при 37°C. Здесь DSM 18111 представляет собой исходный штамм мутанта *S. thermophilus*, а DSM 28889 представляет собой мутант *S. thermophilus*. BM означает конец фазы экспоненциального роста, а EOB означает конец фазы стационарного роста.

Ферментация	DSM	BM	BM+	BM	BM+
		Активность (Ед/г клеточного дебриса) при pH 6,7	лактоза+1 ч Активность (Ед/г клеточного дебриса) при pH 6,7	Концентрация белка (мг/г клеточного дебриса)	лактоза+1 ч Концентрация белка (мг/г клеточного дебриса)
1	18111	38	-	1,1	-

2	18111	-	62	-	1,7
3	28889	80	-	2,3	-
4	28889	-	109	-	3,2

Обсуждение результатов регуляторных элементов *lac* оперона

Механизм регуляции, лежащий в основе этого фенотипа, вероятно, опосредован СсрА (белок регуляции катаболизма углерода А). СсрА действует как репрессор на *lac* оперон и, предположительно, у *Streptococcus thermophilus* высокий гликолитический поток приводит к СсрА-репрессии транскрипции *lac* оперона во время средней логарифмической фазы роста на лактозе, в то время как дерепрессия происходит на более поздних стадиях роста (van den Bogaard et al., 2000). СсрА регуляция является функцией определенных промежуточных звеньев гликолиза во многих организмах (Deutscher et al., 1995), но она также подвергается НРг регуляции (**фиг. 3**). Фосфорилированный НРг активирует СсрА, и его состояние фосфорилирования зависит от энергетического состояния, например в стационарной фазе состояние фосфорилирования НРг низкое, и, таким образом, происходит дерепрессия СсрА и увеличение транскрипции *lac* оперона.

Описанные здесь штаммы оптимизированы для потребления только галактозы, и во время роста лактозы глюкоза будет рассеиваться, а галактоза частично потребляться через путь Лелуара, и результирующий гликолитический поток, таким образом, является низким и, вероятно, запускает СсрА дереессию и, таким образом, наблюдаемую высокую экспрессию *lac* оперона. Лежащие в основе описанные регуляторные механизмы хорошо соответствуют профилю экспрессии *lac* оперона с течением времени у двух штаммов. В DSM 22934 экспрессия *lac* оперона является (относительно) низкой в средней логарифмической фазе (СсрА репрессия), но увеличивается в стационарной фазе (снижение активности СсрА, опосредованное дефосфорилированием НРг). В DSM 28889 экспрессия *lac* оперона, напротив, является очень высокой в средней логарифмической фазе, наиболее вероятно из-за низкого гликолитического потока, и этот эффект затем ослабевает в стационарной фазе, где уровни экспрессии DSM 22934 и DSM 28889 совпадают. В заключение, поскольку профили экспрессии *lac* оперона, наблюдаемые здесь, являются отражением регуляторной сети СсрА, высокий уровень экспрессии *lacZ* должен быть общим для генотипа описанных здесь штаммов.

Ссылки:

1. Bogaard, P.T.C. van den, 2002. Catabolite control of sugar metabolism in *Streptococcus thermophilus*. Ph. D. Thesis.

2. Deutscher, J., Küster, E., Bergstedt, U., Charrier, V., Hillen, W., 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 15, 1049-53.

3. van den Bogaard, P.T.C., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., 2000. Control of Lactose Transport, beta-Galactosidase Activity, and Glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for Carbon Catabolite Repression by a Non-Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System Sugar. *J. Bacteriol.* 182, 5982-5989.

ШТАММЫ

Штаммы *Streptococcus thermophilus* были депонированы в DSMZ-Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур института Лейбница, Инхоффенштрассе 7B, 38124 Брауншвейг, Германия (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) в следующем порядке:

CHCC15757	DSM 25850	3 апреля 2012	в рамках WO2013/160413
CHCC15887	DSM 25851	3 апреля 2012	в рамках WO2013/160413
CHCC16404	DSM 26722	12 декабря 2012	в рамках WO2013/160413
CHCC16731	DSM 28889	4 июня 2014	в рамках WO2017/103051
CHCC19216	DSM 32227	8 декабря 2015	в рамках WO2017/103051
CHCC11976	DSM 22934	08 сентября 2009	
CHCC6008	DSM 18111	23 марта 2006	

Штаммы *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* были депонированы в DSMZ-Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур института Лейбница, Инхоффенштрассе 7B, 38124 Брауншвейг, Германия (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) в следующем порядке:

CHCC16159	DSM 26420	6 сентября 2012	в рамках WO2013/160413
-----------	-----------	-----------------	------------------------

CHCC16160	DSM 26421	6 сентября 2012	в рамках WO2013/160413
-----------	-----------	-----------------	------------------------

ЭКСПЕРТНОЕ РЕШЕНИЕ

Заявитель просит, чтобы образец депонированных микроорганизмов, указанных ниже, мог быть предоставлен только эксперту в соответствии с положениями, регулируемые Ведомством промышленной собственности, до даты выдачи патента.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения обладающего активностью лактазы фермента в молочнокислых бактериях, предпочтительно где указанные бактерии несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, и где мутация инактивирует белок глюкокиназу, при этом указанный способ включает следующие стадии:

- а) инокуляция молочнокислых бактерий в подходящую среду для выращивания, содержащую лактозу;
- б) выращивание молочнокислых бактерий со стадии (а) до требуемой плотности с получением первого раствора, содержащего фермент, обладающий активностью лактазы, и бактериальные клетки молочнокислых бактерий;
- в) инактивация и/или разрушение бактериальных клеток молочнокислых бактерий с получением второго раствора;
- г) возможно обработка второго раствора с получением третьего раствора.

2. Способ получения обладающего активностью лактазы фермента, включающий следующие стадии:

- а) инокуляция молочнокислых бактерий в подходящую среду для выращивания, содержащую лактозу, предпочтительно где указанные бактерии несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где мутация инактивирует белок глюкокиназу;
- б) выращивание молочнокислых бактерий со стадии (а) до требуемой плотности с получением раствора, содержащего фермент, обладающий активностью лактазы, и бактериальные клетки молочнокислых бактерий;
- в) очистка фермента, обладающего активностью лактазы, из раствора;
- г) возможно приготовление указанного фермента в виде подходящей композиции.

3. Способ получения обладающего активностью лактазы фермента, включающий следующие стадии:

- а) введение последовательности ДНК, кодирующей фермент, обладающий активностью лактазы, в молочнокислые бактерии, предпочтительно где указанные бактерии несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, при этом мутация инактивирует белок глюкокиназу;

b) инокуляция молочнокислых бактерий в подходящую среду для выращивания, содержащую лактозу;

c) выращивание молочнокислых бактерий до требуемой плотности с получением раствора, содержащего фермент, обладающий активностью лактазы;

d) очистка фермента, обладающего активностью лактазы, из раствора;

e) возможно приготовление указанного фермента в виде подходящей композиции.

4. Способ по п. 3, где последовательность ДНК, вводимую в молочнокислые бактерии, встраивают под контролем регуляторных элементов *lac* оперона, таких как, например, СсрА, предпочтительно где последовательность ДНК, вводимая в молочнокислые бактерии, кодирует аминокислотную последовательность, кодирующую димерный пептид, проявляющий ферментативную активность бета-галактозидазы, причем димерный пептид состоит из двух пептидов, имеющих аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 и 3, 5 и 6, 20 и 21, 23 и 24, 26 и 27, или 28 и 29; или их ферментативно активные фрагменты, или аминокислотную последовательность любого из них, содержащую не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 замен, вставок или делеций аминокислот.

5. Способ по любому из пп. 3 или 4, где последовательность ДНК, вводимая в молочнокислые бактерии, кодирует аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, или ее ферментативно активные фрагменты, или аминокислотную последовательность любого из них, содержащую не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 замен, вставок или делеций аминокислот, предпочтительно последовательность ДНК, вводимая в молочнокислые бактерии, кодирует аминокислотную последовательность, кодирующую димерный пептид, проявляющий ферментативную активность бета-галактозидазы, причем димерный пептид состоит из двух пептидов, имеющих аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 и 3, 5 и 6, 20 и 21, 23 и 24, 26 и 27 или 28 и 29; или их ферментативно активные фрагменты, или аминокислотную последовательность любого из них, содержащую не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 замен, вставок или делеций аминокислот.

6. Способ по любому из пп. 1 или 2, где обладающий активностью лактазы фермент, экспрессируемый молочнокислыми бактериями, предпочтительно где

указанные бактерии несут мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирует аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37 или 38, или аминокислотную последовательность любой из них, содержащую не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 замен, вставок или делеций аминокислот.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где молочнокислые бактерии представляют собой *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, предпочтительно где *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus* представляют собой *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированный как DSM 26420 или его мутанты, или *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированный как DSM 26421 или его мутанты.

8. Способ по любому из пп. 1-6, где молочнокислые бактерии представляют собой ферментирующие галактозу молочнокислые бактерии, предпочтительно где ферментирующие галактозу молочнокислые бактерии представляют собой *Streptococcus thermophilus*, более предпочтительно где *Streptococcus thermophilus* обладают функциональными характеристиками *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 28889, DSM 25850, DSM 25851, DSM 26722 или DSM 32227, еще более предпочтительно где молочнокислые бактерии представляют собой *Streptococcus thermophilus* DSM 28889, *Streptococcus thermophilus* DSM 25850, *Streptococcus thermophilus* DSM 25851, *Streptococcus thermophilus* DSM 26722 или *Streptococcus thermophilus* DSM 32227.

9. Фермент, обладающий активностью лактазы, полученный способом по любому из пп. 1-8.

10. Применение фермента по п. 9 для снижения содержания лактозы в композиции, содержащей лактозу, например в молочном продукте или молоке, где применение включает стадию добавления указанного фермента в содержащую лактозу композицию, или в молочную композицию, или в молочный продукт при pH в диапазоне от 3 до 10 при температуре в диапазоне от 0°C до 140°C.

11. Применение по п. 10 при pH в диапазоне 3-9, например в диапазоне 3-8, например в диапазоне 3-7, например в диапазоне 3-6, например в диапазоне 3-5, например в диапазоне 3-4, например в диапазоне 4-10, например в диапазоне 4-9, например в диапазоне 4-8, например в диапазоне 4-7, например в диапазоне 4-6, например в диапазоне 4-5, например в диапазоне 5-10, например в диапазоне 5-9, например в диапазоне 5-8, например в диапазоне 5-7, например в диапазоне 5-6,

например в диапазоне 6-10, например в диапазоне 6-9, например в диапазоне 6-8, например в диапазоне 6-7.

12. Применение по любому из пп. 10 или 11, где температура не превышает приблизительно 45°C, например не выше приблизительно 35°C, например не выше приблизительно 18°C, например не выше приблизительно 16°C, например не выше приблизительно 14°C, например не выше приблизительно 12°C, например не выше приблизительно 10°C, например не выше приблизительно 8°C, например не выше приблизительно 7°C, например не выше приблизительно 6°C, например не выше приблизительно 5°C, например не выше приблизительно 4°C, например не выше приблизительно 3°C, например не выше приблизительно 2°C.

13. Применение по любому из пп. 10-12, где указанный молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт.

14. Применение по любому из пп. 10-13, которое не требует добавления дополнительного фермента после ферментации.

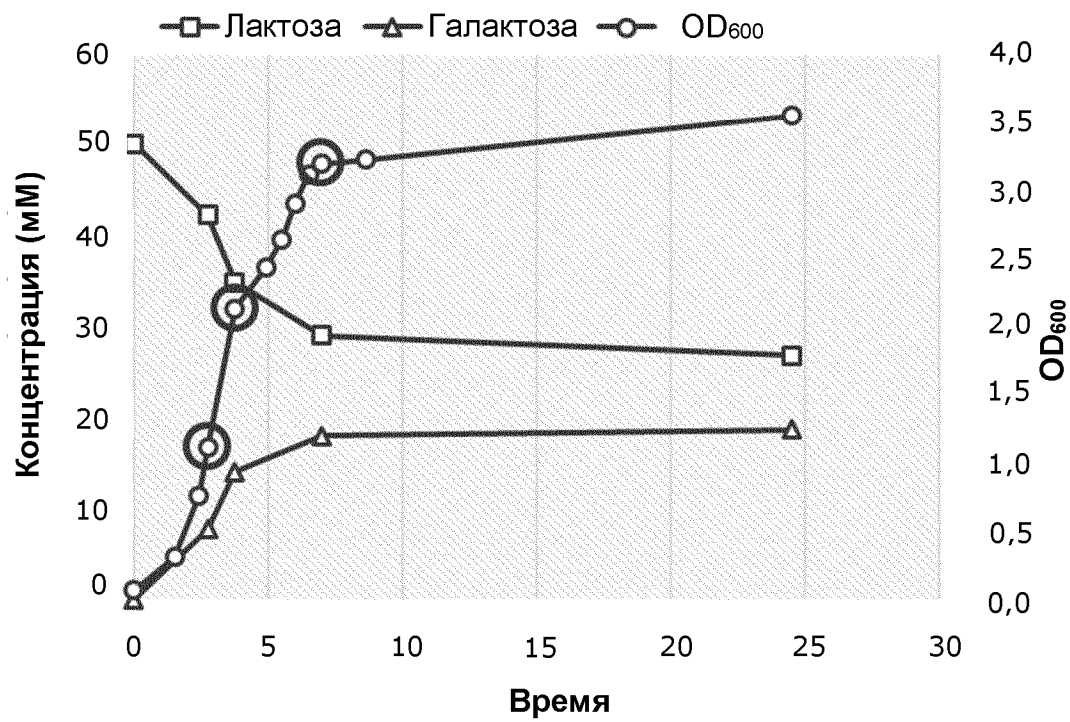
15. Применение *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 28889, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25850, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25851, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 26722, *Streptococcus thermophilus* DSM 32227, *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как 26420, или *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как DSM 26421, или их мутантов в качестве продуцирующего лактазу организма или в качестве организма, продуцирующего фермент, обладающий активностью лактазы, предпочтительно в качестве гомологичного организма, продуцирующего лактазу, или в качестве гомологичного организма, продуцирующего фермент, обладающий активностью лактазы, или в качестве гетерологичного организма, продуцирующего лактазу, или в качестве гетерологичного организма, продуцирующего фермент, обладающий активностью лактазы.

16. Применение *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 28889, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25850, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 25851, *Streptococcus thermophilus*, депонированного как DSM 26722, *Streptococcus thermophilus* DSM 32227, *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как DSM 26420, или *Lactobacillus delbreuckii* подвид *bulgaricus*, депонированного как DSM 26421, для получения низколактозного продукта или безлактозного продукта, предпочтительно где низколактозный продукт или

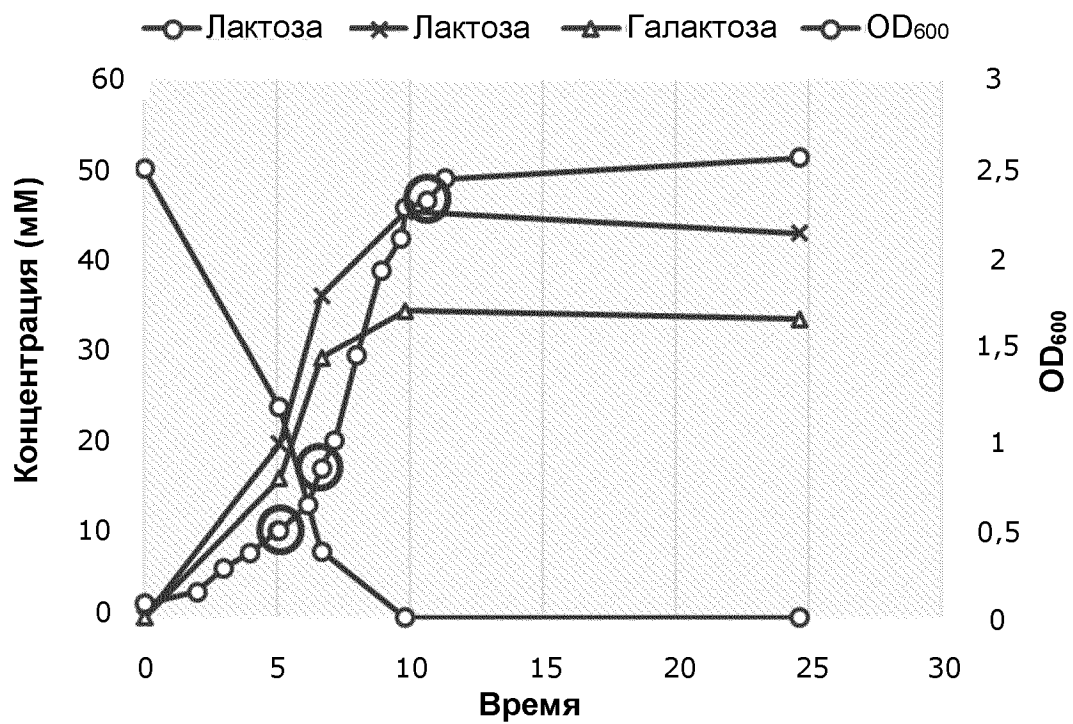
безлактозный продукт выбран из низколактозного молока, низколактозного йогурта, низколактозного сыра, низколактозных кисломолочных продуктов, безлактозного молока, безлактозного йогурта, безлактозного сыра и/или безлактозного кисломолочного продукта.

Фиг. 1

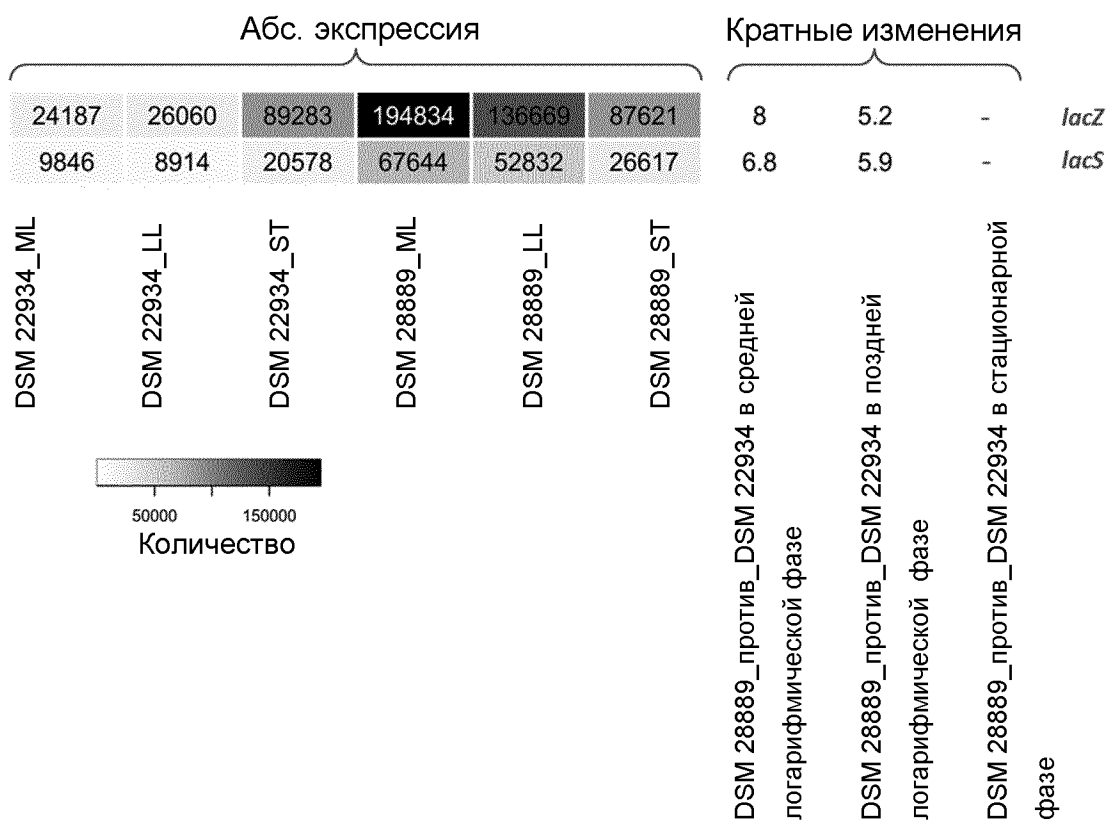
DSM 22934



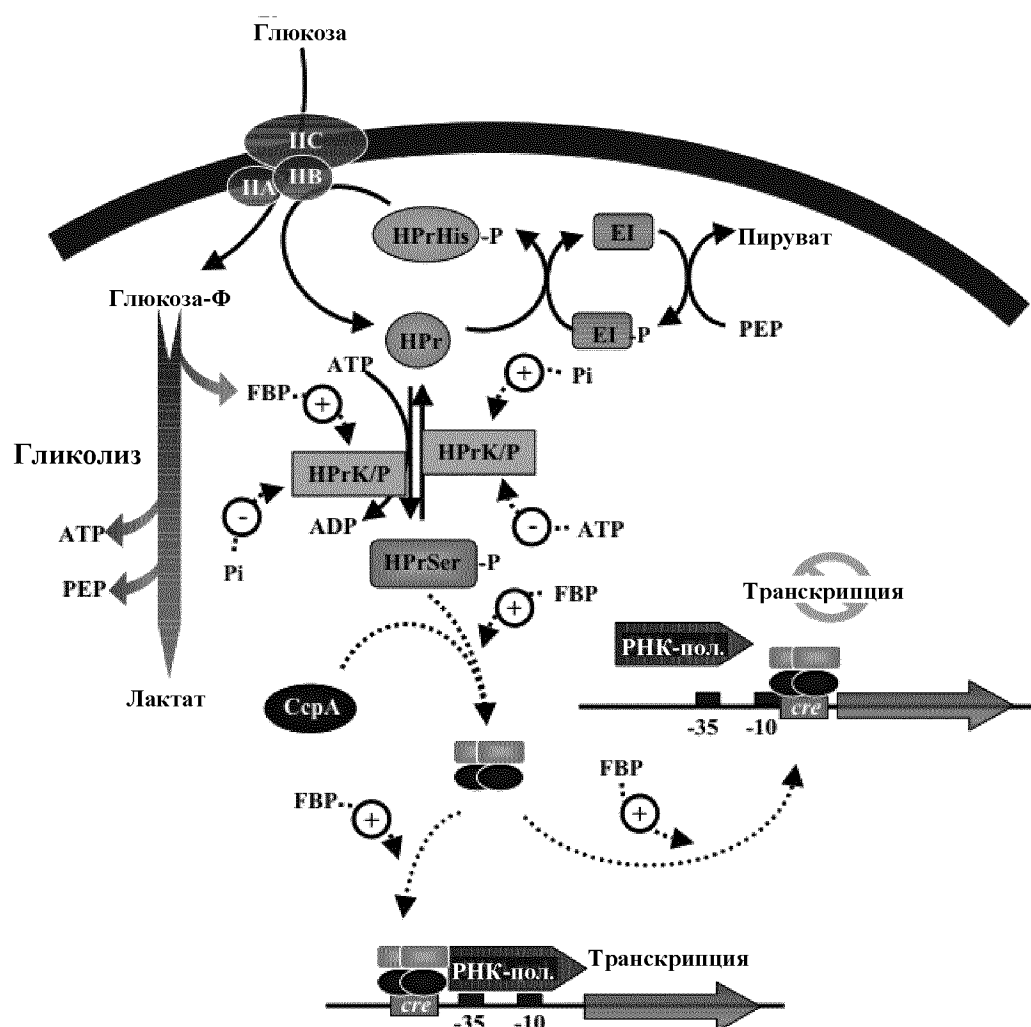
DSM 28889



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг.4

