

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048035**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.22

(21) Номер заявки
202092612

(22) Дата подачи заявки
2019.05.06

(51) Int. Cl. **C11B 3/00** (2006.01)
A23D 9/013 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ДЕГУММИРОВАНИЯ МАСЛА**

(31) **18171015.3**

(32) **2018.05.07**

(33) **EP**

(43) **2021.02.17**

(86) **PCT/EP2019/061538**

(87) **WO 2019/215078 2019.11.14**

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

(72) Изобретатель:
**Чжа Ин, Зайн Арьен, Бейлевелд
Виллем (NL)**

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

(56) **US-A1-2016289658
WO-A1-2011051322
WO-A1-9818912**

(57) Изобретение относится к способу уменьшения количества интактных фосфолипидов в триацилглицеридном масле, который включает инкубацию указанного масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы А1 и содержащим полипептид, по меньшей мере на 80% идентичный зрелой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

048035

B1

048035

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к способу уменьшения количества фосфолипидов в триацилглицеридных маслах с использованием фермента, обладающего активностью фосфолипазы A1.

Уровень техники

Неочищенные растительные масла, полученные путем прессования или экстракции растворителями, представляют собой смесь триацилглицеридов, фосфолипидов, стероидных спиртов, токоферолов, свободных жирных кислот, содержащих металлы микропримесей и других компонентов, содержащихся в незначительных количествах. При переработке соевого масла плоды сои (бобы) вначале очищают от оболочки и дробят, получая жирный соевый лепесток, который экстрагируют гексаном; в результате получается экстракционное ("лепестковое") масло. В другом широко известном варианте переработки соевых бобов перед экстракцией их подвергают экспандированию. Масло из экспандированной сои обычно получается с более высоким выходом, но в нем содержится больше фосфолипидов. При изготовлении масла из других растительных источников, например рапса, плоды/семена вначале прессуют, в результате чего получается первая фракция масла. Жмых, оставшийся после прессования, можно обработать растворителем, и получится экстракционная фракция масла. Объединяя фракцию, полученную прессованием, и экстракционную фракцию объединяют, что дает неочищенное масло; так поступают в случае рапса (как технического, так и пищевого) и подсолнечника.

Чтобы получить высококачественное пищевое растительное масло, из неочищенного продукта желательнее удалить фосфолипиды, свободные жирные кислоты и микропримеси, содержащие металлы. В промышленности для этого чаще всего применяют гидротермическую, кислотную или щелочную рафинацию и ферментативное дегуммирование. Как правило, основные потери при дегуммировании растительного масла приходятся на удаление фосфолипидов. У фосфолипидов в молекуле имеются как гидрофильные функциональные группы, так и липофильная часть, состоящая из углеродной цепи глицерина и жирнокислотных остатков; в силу такой химической структуры фосфолипиды являются отличными природными эмульгирующими агентами. Для ослабления эмульгирующей способности нужно подвергнуть фосфолипиды гидролизу, превратив в лизофосфолипиды или глицерофосфаты. Фосфолипиды в растительных маслах представлены в основном фосфатидилхолином (PC), фосфатидилэтаноламином (PE), фосфатидилинозитом (PI) и фосфатидной кислотой (PA).

Для ферментативного дегуммирования, или ферментативной рафинации применяют различные способы, используя ферменты с фосфолипазной активностью, например, фосфолипазы A1, A2, C (включая фосфолипазу C, расщепляющую фосфатидилинозит).

В публикации WO9705219 описывается способ снижения содержания компонентов, в состав которых входит фосфор, в растительных маслах с использованием смеси фосфолипаз из *Aspergillus niger*, содержащей активность фосфолипаз A2 и/или A1, а также лизофосфолипазную активность.

В Европейском патенте № 0575133 обсуждаются фосфолипаза A1 (PLA1) из штаммов *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus niger* и их использование для получения лизофосфолипидов из фосфолипидов, например, животного, растительного или микробного происхождения. В Европейском патенте № 0575133 описывается, что остаточная активность фосфолипазы A1 из *A. niger*, сохраняющаяся после тепловой обработки при температуре 70°C, составляет лишь 30% от остаточной активности этого фермента после тепловой обработки при температуре 50°C и 60°C. Фосфолипаза A1 из *A. oryzae* полностью инактивируется после тепловой обработки при температуре 70°C. В указанной работе не обсуждается способ ферментативного дегуммирования какого-либо съедобного масла.

В патенте США № 20160289658 описывается фосфолипаза из *Talaromyces leucettanus*. Этот фермент обладает относительно высокой термостабильностью и имеет более высокую активность при температуре 70°C, чем имеющийся в продаже ферментный препарат Lecitase Ultra.

В публикации WO2011/051322 описывается фосфолипаза из *Aspergillus fumigatus*, катализирующая гидролиз фосфолипидов в соевом масле при температуре 55°C и 60°C.

Нужны усовершенствованные способы снижения содержания фосфолипидов в триацилглицеридных маслах с использованием фосфолипаз, активных в широком диапазоне температур.

Раскрытие изобретения

Данное изобретение относится к способу уменьшения количества интактных фосфолипидов в триацилглицеридных маслах, включающему инкубацию масла с полипептидом, имеющим активность фосфолипазы A1, причем указанная фосфолипаза A1 содержит полипептид, который по меньшей мере на 80% идентичен зрелой аминокислотной последовательности, обозначаемой в настоящем документе SEQ ID NO: 1. Было обнаружено, что фосфолипаза A1, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична зрелой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, в широком диапазоне температур, а именно от 55°C до 70°C, способна за 4 ч сократить количество фосфолипидов, исходно присутствовавших в триацилглицеридном масле, по меньшей мере на 85%. В способе, описанном в настоящем документе, фосфолипаза A1 - фермент, осуществляющий гидролиз по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или по меньшей мере 90% того количества интактных фосфолипидов, которое исходно присутствует в триацилглицеридном масле, в результате инкубации с указанным маслом в количестве 0,28 активного белка на 1 кг масла при температуре 55°C, 60°C, 65°C и 70°C в течение 4 ч.

Определения.

Термин "зрелый полипептид/зрелая аминокислотная последовательность" в настоящем документе относится к конечной форме полипептида, которая получается после трансляции матричной РНК с образованием полипептидной цепи и посттрансляционных модификаций последней. Посттрансляционные модификации включают процессинг N-концевой части полипептидной цепи, укорочение C-концевой части, гликозилирование, фосфорилирование и отщепление лидерных последовательностей, например сигнальных пептидов, пропептидов и/или препропептидов

Фосфолипиды включают глицерофосфолипиды. В настоящем документе под фосфолипидом понимается интактный фосфолипид, в котором к молекуле глицерина присоединены сложноэфирной связью два остатка жирных кислот и один остаток фосфорной кислоты. Фосфолипиды также можно назвать диацилглицеридами, содержащими фосфатную группу.

В лизофосфолипидах к молекуле глицерина присоединена только одна ацильная группа (остаток жирной кислоты) и остаток фосфорной кислоты. Лизофосфолипид образуется в результате отделения ацильной группы от молекул фосфолипида под действием фосфолипазы A1 и/или фосфолипазы A2.

Термины "триацилглицеридное масло" и "триглицеридное масло" в настоящем документе употребляются взаимозаменяемо. Триацилглицеридные масла используются как съедобные и как технические (служат для получения биодизельного топлива).

Термины "идентичность последовательностей" и "гомология последовательностей" в настоящем документе употребляются взаимозаменяемо. Чтобы определить степень идентичности/гомологии (в процентах) двух аминокислотных последовательностей, их выравнивают для оптимального сравнения. Для наилучшего выравнивания двух последовательностей можно как бы вносить разрывы в ту или иную из них. Выравнивание проводят по всей длине сравниваемых последовательностей. Также можно делать частичное выравнивание, сравнивая отрезки нуклеотидных/аминокислотных последовательностей длиной около 20, около 50, около 100 или более нуклеотидов/аминокислотных остатков. Степень идентичности двух последовательностей - это выраженное в процентах отношение количества совпадающих положений (то есть положений полипептидной или полинуклеотидной цепи, занимаемых одинаковыми аминокислотными остатками/нуклеотидами) к общему числу аминокислотных остатков/нуклеотидов в сравниваемых последовательностях (целиком или на данном отрезке). Для выполнения выравнивания и вычисления степени идентичности используют алгоритм Нидлмана и Вунша (Needleman S.B. and Wunsch C.D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Этот алгоритм годится как для аминокислотных, так и для нуклеотидных последовательностей. Он входит в компьютерную программу NEEDLE. Для задач данного изобретения использовалась программа NEEDLE из пакета EMBOSS (версия 2.8.0 или следующие, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice P. Longden I. and Bleasby A. *Trends in Genetics* 16, (6) pp.276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). В случае полипептидов для матрицы аминокислотных замен использовали EBLOSUM62. Брали следующие параметры: штраф на внесение делеции 10; штраф на продолжение делеции 0,5. Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что все эти параметры в некоторой степени влияют на результаты, но общая степень идентичности (в процентах) двух сравниваемых последовательностей при использовании различных алгоритмов существенно не меняется. После выравнивания последовательностей с помощью программы NEEDLE, как описано выше, рассчитывается степень идентичности искомой последовательности и последовательности по данному изобретению следующим образом: число соответственных положений в выравненных последовательностях, занятых в обеих последовательностях одинаковыми аминокислотными остатками/нуклеотидами делится на суммарную длину выравненного участка за вычетом суммарного числа делеции. Степень идентичности последовательностей по этому определению получают в программе NEEDLE по опции NOBRIEF; в выходной информации этой программы она отмечена надписью "longst-identity" ("наиболее протяженная идентичность").

Аминокислотные последовательности белков, описанные в настоящем документе, можно далее использовать как искомые последовательности для поиска в общедоступных базах данных, например, с целью выявить других членов того же семейства белков или родственные последовательности. Такой поиск осуществляют с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) согласно работе Altschul S.F. et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных полинуклеотидам по данному изобретению, с помощью BLAST осуществляют, используя программу NBLAST при следующих параметрах: вес = 100, длина слова = 12. Поиск аминокислотных последовательностей, гомологичных полипептидам по данному изобретению, с помощью BLAST осуществляют, используя программу XBLAST при следующих параметрах: вес = 50, длина слова = 3. Для выравнивания с делециями в целях сравнения последовательностей используют программу Gapped BLAST, как описано в работе Altschul S.F. et al, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно брать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. также главную страницу сайта Национального центра биотехнологической информации США по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Термин "вариант" в настоящем документе относится к полипептидам либо к полинуклеотидам. Варианты включают последовательности с заменами, вставками, делециями, укорочениями, перестановка-

ми и/или инверсиями в одном или более местах по сравнению с референсной последовательностью. Варианты можно создать путем различных типов мутагенеза - сайт-направленного (в том числе сайт-насыщающего), сканирующего (например, аланин-сканирующего), инсерционного, случайного, а также путем направленной эволюции и различными другими рекомбинантными методами, известными специалистам в данной области техники. Кроме того, можно синтезировать искусственные варианты генов известными в данной области техники методами.

Осуществление изобретения

Данное изобретение относится к способу уменьшения количества интактных фосфолипидов в триацилглицеридных маслах, включающему инкубацию масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы A1, который содержит полипептид, по меньшей мере на 80% идентичный зрелой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Полипептид, обладающий фосфолипазной активностью, который по меньшей мере на 80% идентичен зрелой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, - это полипептид, способный снижать или снижающий по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или по меньшей мере на 90% количество фосфолипидов, исходно присутствующих в указанном масле, при инкубации масла с этой фосфолипазой A1, взятой в количестве 0,28 мг активного белка на 1 кг масла, при температуре 55°C, 60°C, 65°C и/или 70°C в течение 4 ч, например в ходе способа, описанного в настоящем документе.

Полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A1, в способе снижения содержания интактных фосфолипидов в триацилглицеридном масле, как описано в настоящем документе - это полипептид, способный уменьшать или уменьшающий по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84% или по меньшей мере на 85% количество фосфолипидов, исходно присутствующих в указанном масле, при инкубации масла с этой фосфолипазой A1, взятой в количестве 0,1 - 0,4 мг, например 0,2 - 0,3 или 0,28 мг активного белка на 1 кг масла, при температуре 55°C, 60°C, 65°C и/или 70°C в течение 4 ч. Указанное масло может содержать также лимонную кислоту в концентрации 500 1/10⁻⁶ (ppm) и 3% (мас./мас.) воды.

Было обнаружено, что полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A1, в способе, описанном в настоящем документе, способен уменьшать или уменьшает по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или по меньшей мере на 90%, например от 85% до 99%, например от 86% до 98%, например от 87% до 97%, например от 88% до 96%, например на 89%-95%, например на 90%-94% количество фосфолипидов, исходно присутствующих в указанном масле, в диапазоне температур 55°C-70°C. Фосфолипазу A1, описанную в настоящем документе, инкубируют с указанным маслом при температуре от 55°C до 70°C в течение 4 ч.

В одном из воплощений данного изобретения способ для уменьшения количества интактных фосфолипидов, описанный в настоящем документе, - это способ, в котором количество интактных фосфолипидов уменьшается по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или по меньшей мере на 90%, например от 85% до 99%, например от 86% до 98%, например от 87% до 97%, например от 88 до 96%, например от 89% до 95%, например от 90% до 94% от того количества интактных фосфолипидов, которое было в указанном масле исходно. Было обнаружено также, что количество интактных фосфолипидов в масле уменьшалось при температуре 55°C, 60°C, 65°C и/или при температуре 70°C после инкубации масла с фосфолипазой A1, взятой в количестве 0,1-0,4 мг активного белка на 1 кг масла, например 0,28 мг активного белка на 1 кг масла, в течение 4 ч.

Компоненты масла, содержащие фосфор, например фосфолипиды, лизофосфолипиды и эфиры фосфорной кислоты, можно определять методом ядерного магнитного резонанса с ³¹P (³¹P-ЯМР) и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), например, так, как описано в настоящем документе в разделе "Материалы и методы".

В настоящем документе в словосочетании "полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A1", имеется в виду фермент имеющий номер E.C.3.1.1.32 по международной иерархической классификации. Фермент фосфолипаза A1 расщепляет фосфолипидную молекулу в положении SN1, в результате чего образуются лизофосфолипид и жирная кислота. Фосфолипаза A1, описанная в настоящем документе, также расщепляет лизофосфолипидную молекулу в положении SN1 в результате чего образуются глицерофосфат и жирная кислота. В настоящем документе термин "фосфолипаза A1" и словосочетание "полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A1" употребляются взаимозаменяемо. Описанный в настоящем документе полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A1, не имеет активности фосфолипазы A2.

В способе, описанном в настоящем документе, при инкубации масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы A1, происходит превращение содержащихся в масле фосфолипидов в лизофосфолипиды и свободные жирные кислоты. В способе, описанном в настоящем документе, при инкубации масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы A1, может также происходить превращение содержащихся в масле фосфолипидов и/или лизофосфолипидов в лизофосфолипиды и/или глицерофосфаты и свободные жирные кислоты.

В способе, описанном в настоящем документе, инкубация масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы A1, осуществляется при pH от 2 до 8, например от 3 до 7, например от 4 до 6.

В способе, описанном в настоящем документе, инкубация масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы A1, осуществляется в присутствии кислоты. Предпочтительно способ уменьшения количества интактных фосфолипидов в триацилглицеридном масле, описанный в настоящем документе, включает добавление кислоты в таком количестве, что ее концентрация в масле составляет от 100 ppm до 1000 ppm, например от 200 ppm до 900 ppm, например от 300 ppm до 800 ppm, например от 400 ppm до 600 ppm. Кислоты, пригодные для способа, описанного в настоящем документе, включают лимонную, фосфорную, уксусную, виннокаменную и/или янтарную кислоты или любые подходящие их смеси.

Обычно в способе, описанном в настоящем документе, используется вода. Указанный способ включает добавление воды к маслу в таком количестве, что ее содержание в масле составляет 0,5-5% (мас./мас.), например 1-4% (мас./мас.), например 2-3% (мас./мас.).

Инкубация масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы A1, осуществляется при температуре от 40°C до 75°C, например при температуре от 45°C до 70°C, например при 50-65°C.

В способе, описанном в настоящем документе, съедобное масло инкубируют с фосфолипазой A1 в течение подходящего периода времени, составляющего от 0,5 до 10 ч, например от 1 до 8 ч или от 2 до 6 ч.

Масло инкубируют с соответствующим количеством фосфолипазы A1, которое должно быть таким, чтобы через 4 ч инкубации при температуре от 55°C до 70°C удалялось по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, или по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, или по меньшей мере 95% исходного количества интактных фосфолипидов, содержавшегося в триацилглицеридном масле. Количество фосфолипазы A1, добавляемое в масло, составляет 0,02-3 мг активного белка, обладающего активностью PLA1, на 1 кг масла, например 0,05-1 мг активного белка PLA1 на 1 кг масла, например 0,1-0,8 мг активного белка PLA1 на 1 кг масла, например 0,15-0,5 мг активного белка PLA1 на 1 кг масла, например 0,2-0,4 мг активного белка PLA1 на 1 кг масла.

Источником фосфолипазы A1 может быть любой подходящий организм, например грибы. Пригодные для этого грибы включают филаментные грибы, например из родов *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, и дрожжи, например из родов *Pichia* и *Saccharomyces*, например виды *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Talaromyces emersonii*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*. Полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A1, может происходить, например, из *Aspergillus niger*.

Фосфолипаза A1, используемая в способе, описанном в настоящем документе, содержит полипептид, по меньшей мере на 80% идентичный зрелой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; степень идентичности этого полипептида и последовательности SEQ ID NO: 1 может составлять, например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере 99%. Полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A1, может содержать зрелую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (или состоять из этой последовательности). Зрелая аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 1 содержит аминокислотные остатки с 30-го по 298-й последовательности SEQ ID NO: 1 (или состоит из них). Зрелая аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 1 может также содержать аминокислотные остатки с 29-го по 297-й SEQ ID NO: 1, например с 28-го по 296-й SEQ ID NO: 1, например с 31-го по 298-й SEQ ID NO: 1, например с 32-го по 297-й SEQ ID NO: 1 (или состоять из них). Указанная зрелая аминокислотная последовательность также может содержать еще один или более аминокислотных остатков на С-конце последовательности SEQ ID NO: 1.

Фосфолипаза A1, используемая в способе, описанном в настоящем документе, может быть природным полипептидом или же его вариантом.

Фосфолипазу A1 могут продуцировать любые подходящие клетки-хозяева, пригодные для образования в них описанного в настоящем документе полипептида, обладающего активностью фосфолипазы A1; это могут быть прокариотические либо эукариотические клетки. Из эукариотических клеток могут быть пригодны клетки млекопитающих, насекомых, растений или грибов.

Из клеток грибов по данному изобретению пригодны, например, клетки филаментных грибов и дрожжей, например клетки представителей родов *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, например видов *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* или *Trichoderma viride*. Известные в данной области техники молекулярно-биологические методы получения клеток-продуцентов для целей данного изобретения осуществляют по руководству Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

Клетки-хозяева, способные продуцировать фосфолипазу A1, по данному изобретению культивируют в пригодной для этой цели ферментационной среде, создающей возможность экспрессии фосфолипазы A1. Специалистам в данной области техники должно быть известно, как получить полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A1, в зависимости от специфики клеток-хозяев. Нужная для этого ферментационная среда, как правило, содержит источники азота и углерода. Обычно pH ферментационной среды, пригодной по данному изобретению, составляет от 4 до 8. Для культивирования клеток-хозяев обычно подходит температура от 25°C до 60°C. Из ферментационной среды выделяют фосфолипазу A1 при помощи известных в данной области техники методов, например, путем центрифугирования, фильтрации и/или ультрафильтрации.

В способе по данному изобретению фосфолипаза А1 может быть представлена композицией, содержащей описанную в настоящем документе фосфолипазу А1, например водной либо нежидкой композицией, содержащей фосфолипазу А1, описанную в настоящем документе. Этой композицией может быть ферментационная среда, из которой клетки и/или другие компоненты удалены, например путем центрифугирования, фильтрации или ультрафильтрации.

Фосфолипаза А1 также может быть представлена чистой или изолированной/выделенной фосфолипазой А1, то есть полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы А1, отделенным от по меньшей мере одного компонента, например другого полипептидного материала, с которым он изначально объединен.

Фосфолипиды, содержащиеся в триацилглицеридном масле, включают фосфатидную кислоту (РА), фосфатидилэтаноламин (РЕ), фосфатидилинозит (PI) и фосфатидилхолин (РС). Обнаружено, что в результате применения способа, описанного в настоящем документе, содержание или количество этих четырех фосфолипидов в триацилглицеридном масле уменьшается.

В одном из воплощений данного изобретения описанный в настоящем документе способ включает этап добавления кислоты в масло. Пригодные для этого кислоты включают лимонную, фосфорную, уксусную, виннокаменную и/или янтарную кислоты и любые их подходящие смеси.

В другом воплощении данного изобретения предлагаемый способ включает добавление в масло соединений, создающих щелочную реакцию среды. Для этого пригодны, например, гидроксид калия или гидроксид натрия, силикат натрия, карбонат натрия, карбонат кальция, бикарбонат натрия, аммиак, цитрат натрия или любые их подходящие смеси.

Кислоту, воду или защелачивающие вещества можно добавлять на любом подходящем для этого этапе способа уменьшения количества интактных фосфолипидов в триацилглицеридном масле, описанного в настоящем документе. Добавление указанных агентов может происходить до, в процессе или после инкубации масла с фосфолипазой. Предпочтительно кислоту, воду и/или защелачивающий агент добавляют до инкубации масла с фосфолипазой А1. Добавление защелачивающего агента можно осуществлять до или после добавления кислоты, например защелачивающий агент добавляют после добавления кислоты.

Способ уменьшения количества интактных фосфолипидов в триацилглицеридном масле, описанный в настоящем документе, может также включать этап предварительной обработки масла в присутствии кислоты и/или защелачивающего агента. Для этого берут те кислоты и/или защелачивающие агенты, которые указаны выше. Предварительная обработка масла включает его инкубацию с кислотой и/или защелачивающим веществом при температуре от 50°C до 75°C, например при температуре от 55°C до 70°C. Предварительная обработка масла продолжается от 1 минуты до 2 ч, например от 5 мин до 1 ч, например от 10 мин до 40 мин.

В одном из воплощений данного изобретения способ, описанный в настоящем документе, также включает инкубацию масла с ферментом, обладающим активностью фосфолипазы С, которая имеет активность фосфатидилинозит-фосфолипазы С, и/или с ферментом, обладающим активностью фосфолипазы А2.

Фосфолипаза С (PLC) - это фермент, имеющий номер ЕС 3.1.4.3 по международной иерархической классификации, который расщепляет молекулу фосфолипида по связи, образованной фосфорной кислотой и ОН-группой глицерина, с образованием диглицерида и производного фосфата, например холинфосфата или этаноламинфосфата. Фосфолипаза С обсуждается, например, в публикациях WO2005/086900, WO2012/062817 или WO2016/162456. Фосфолипаза С может быть представлена полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, описанную также на стр. 196 публикации WO2005/086900. Фосфолипаза С может быть представлена полипептидом, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

Фосфолипаза С также может быть фосфатидилинозит-фосфолипазой С (PI-PLC). Предпочтительным субстратом PI-PLC является фосфатидилинозит, но она расщепляет и другие фосфолипиды, например фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Бактериальная фосфатидилинозит-фосфолипаза С относится к номеру ЕС 4.6.1.13 по международной иерархической классификации. Пригодный для данного изобретения фермент PI-PLC описан, например, в публикации. WO2011/046812. Пригодный по данному изобретению фермент PI-PLC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, которая соответствует последовательности SEQ ID NO: 8 из публикации WO2011/046812. Фосфатидилинозит-фосфолипаза С может быть представлена полипептидом, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

Фосфолипаза А2 (PLA2) отделяет от молекулы фосфолипида остаток жирной кислоты, связанный со вторым углеродным атомом глицеринового скелета; этот фермент имеет номер ЕС 3.1.1.4 по международной иерархической классификации. Фосфолипазой А2 в способе по данному изобретению может служить, например, PLA2 из поджелудочной железы свиньи, которая экспрессируется в подходящих клетках-хозяевах, например в клетках представителей рода *Aspergillus*, например вида *Aspergillus niger*.

Способ, описанный в настоящем документе, может также включать отделение компонентов, содержащих фосфор, от масла. Компоненты масла, содержащие фосфор, можно отделить любым подходящим для этого методом, известным в данной области техники, например, путем центрифугирования. Компоненты триацилглицеридного масла, содержащие фосфор, включают фосфолипиды, лизофосфолипиды и глицерофосфаты.

В способе снижения содержания фосфолипидов в съедобном масле, который описан в настоящем документе, может быть представлено или использовано любое пригодное триацилглицеридное масло. Это может быть неочищенное съедобное масло или съедобное масло, прошедшее рафинацию путем гидратации. Термин "неочищенное масло" (называемое также нерафинированным) относится к маслу, полученному из сырья путем прессования или экстракции. Неочищенное масло может быть представлено растительным маслом, животным жиром, рыбным жиром или маслом, полученным из водорослей. Для данного изобретения можно использовать любое пригодное растительное масло, например соевое, рапсовое (как техническое, так и пищевое), подсолнечное, пальмовое, пальмоядровое, кокосовое, кунжутное, оливковое, рисовое, хлопковое, кукурузное, ореховое (например, миндальное, арахисовое, из грецких орехов) и их смеси. Процесс уменьшения количества интактных фосфолипидов в триацилглицеридном масле можно также назвать дегуммированием масла, или рафинацией масла.

Неочищенное растительное масло содержит от 1 ppm до 2000 ppm атомов фосфора. Их количество отражает количество фосфолипидов.

В настоящем документе также описывается триацилглицеридное масло, содержащее полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A1, который включает полипептид, по меньшей мере на 80% идентичный зрелой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Триаилглицеридное масло можно получать способом, описанным в настоящем документе. Все описанные в настоящем документе воплощения этого способа применимы к триаилглицеридному маслу, описанному в настоящем документе.

Масло, описанное в настоящем документе может содержать также полипептид, обладающий активностью фосфолипазы C; полипептид, обладающий активностью фосфатидилинозит-фосфолипазы C (PI-PLC) и/или полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A2. Масло, описанное в настоящем документе, может также содержать полипептид, обладающий активностью фосфолипазы C, который по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3; полипептид, обладающий активностью фосфатидилинозит-фосфолипазы C, который по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 и/или фосфолипазу A2 из поджелудочной железы свиньи.

Чертежи

На чертеже представлено схематическое изображение плазмиды pGBTOPPLA-1, которую использовали для экспрессии фосфолипазы A1 *A. niger*.

Примеры

Материалы и методы.

Молекулярно-биологические методы.

Молекулярно-биологические методы, известные специалистам в данной области техники, осуществляли согласно руководству Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Полимеразную цепную реакцию (PCR) проводили на термоциклере с помощью высокоточной полимеразы Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes OY, Эспоо, Финляндия) согласно инструкциям производителя.

Ферменты.

Использовали следующие имеющиеся в продаже готовые препараты ферментов и смеси ферментов:

Purifine® PLC/PI-PLC - содержит фосфолипазу C (SEQ ID NO 3) и фосфатидилинозит-фосфолипазу C (SEQ ID NO: 4) (производство DSM);

Purifine® 3G - содержит фосфолипазу C (SEQ ID NO: 3), фосфатидилинозит-фосфолипазу C (SEQ ID NO: 4) и фосфолипазу A2 из поджелудочной железы свиньи (производство DSM);

Lecitase® Ultra - фосфолипаза A *Fusarium oxysporum* (производство Novozymes, Sigma Aldrich);

Rohalase® PL-XTRA - фосфолипаза A *Aspergillus fumigatus* (производство AB Enzymes).

Получение штаммов.

Был получен штамм *A. niger* (депонирован в Центральном бюро микологических коллекций Нидерландов под номером CBS 513.88), имеющий делецию в гене, кодирующем глюкоамилазу (*ΔglaA*) и делецию в гене протеазы *perA*, согласно методу, описанному в Европейском патенте № 0635574 B1 и в работе van den Hombergh J.P. et al. (1997) *Eur. J. Biochem.* 247(2): 605-13). Затем из штамма *A. niger* с *ΔglaA* и *ΔperA*, получили штамм *A. niger*, не продуцирующий щавелевую кислоту, согласно методу, описанному в публикации WO2004/070022. В результате получили штамм *A. niger*, имеющий делеции в генах *glaA* (глюкоамилаза), *perA* (кислая аспаратная протеаза) и *oahA* (оксалоацетат-ацетилгидролаза), то есть *ΔglaA*, *ΔperA*, *ΔoahA*.

Получение штаммов *Aspergillus niger*, продуцирующих фосфолипазу А1.

Для экспрессии в штамме *A. niger* (Δ glaA, Δ repA, Δ oahA) взяли фосфолипазу А1 (PLA1) *A. niger* (кодирующая ее нуклеотидная последовательность представлена SEQ ID NO: 2, аминокислотная последовательность - SEQ ID NO: 1).

Ген, кодирующий PLA1, был получен синтетическим путем и клонирован в экспрессионном векторе *A. niger* pGBTOP-12, как описано в публикациях WO 98/46772 и WO 99/32617, под контролем промотора гена глюкоамилазы. В результате был получен экспрессионный вектор *A. niger* pGBTOPPLA-1 (чертеж); при этом применяли те же методы, которые описаны в публикациях WO 98/46772 и WO 99/32617.

Штамм, продуцирующий фермент PLA1, получали путем ко-трансформации штамма *A. niger* (Δ glaA, Δ repA, Δ oahA) вектором pGBAAS-1, содержащим селективируемый маркер - ген amdS, и вектором pGBTOPPLA-1 и последующего отбора трансформированных клеток. В результате трансформации и противоотбора (как описано в публикациях WO98/46772 и WO99/32617), с последующим отбором штаммов были получены штаммы, продуцирующие белок PLA1. Из всех трансформированных pGBTOPPLA-1 клеток с фенотипом (Δ glaA, Δ repA, Δ oahA) был выбран один штамм, эффективно продуцировавший фосфолипазу А1; из этого образца путем перепечатавания получили одноштаммовый инокулят, названный штаммом PLA1-1. Штамм PLA1-1 использовали как продуцент фермента PLA1 в дальнейших экспериментах.

Культивирование *A. niger* во встряхиваемых колбах для продуцирования фосфолипазы А1.

Получали свежие споры штамма PLA1-1 *A. niger*. В четыре 100-миллилитровые встряхиваемые колбы, содержащие по 20 мл ферментационной среды 1 [состав ферментационной среды 1: 10% (мас./об.) порошкового кукурузного экстракта Corn Steep Solids; 1% (мас./об.) гидратной глюкозы; 0,1% (мас./об.) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,05% (мас./об.) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,025% (мас./об.) пеногаситель (производство Basildon Chemical Company, Ltd.); pH 5,8]. вносили по 10^7 спор. Эти предварительные культуры инкубировали при температуре 34°C и скорости вращения 170 об/мин в течение 16-24 ч. Из предварительных культур отбирали по 10-15 мл и при температуре 34°C и перемешивании со скоростью 170 об/мин вносили в 500-мл встряхиваемые колбы с перегородками, содержащими по 100 мл ферментационной среды 2 следующего состава: 15% (мас./об.) мальтоза; 6% (мас./об.) соевый пептон Vacto Soytone; 1,5% (мас./об.) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1% (мас./об.) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,1% (мас./об.) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% (мас./об.) L-аргинин; 8% (мас./об.) полисорбат-80 (Tween-80); 2% (мас./об.) пеногаситель (производство Basildon Chemical Company, Ltd.); 2% (мас./об.) 2-(N-морфолино)этансульфонат (MES); pH 5,1. Через 7 суток культивирования клетки убивали, для чего добавляли в культуру бензоат натрия (3,5 г/л) и держали при температуре 30°C в течение 6 ч. Затем в культуру вносили CaCl_2 (10 г/л) и перлит C25 (45 г/л), после чего фильтровали в один прием через фильтровальные салфетки и фильтры DE60/EKS P и K250 (производство Pall). Материал на фильтре промывали стерильной водой (1,1 л), очищенной в системе MilliQ. После этого проводили стерильную фильтрацию, используя фильтры 0,22 мкм GP Express PLUS (производство Millipore). Полученный фильтрат, содержащий PLA, использовали в экспериментах, описанных в разделе "Примеры".

Определение активности фосфолипазы А1(PLA1).

Готовили следующие растворы.

1. Раствор субстратов - 1 г L- α -фосфатидилхолина яичного желтка (Sigma P3556, Звейндрахт, Нидерланды) в 2%-ном растворе октилфенолэтоксилата (Triton X-100);
2. Буферный раствор - 0,2 М ацетатный, pH 4.5;
3. Раствор для прекращения реакции - 1 М HCl

Смешивали 500 мкл раствора 1 и 300 мкл раствора 2 и приводили смесь к температуре 37°C. Начинали реакцию, добавляя 100 мкл раствора фермента с активностью 0,05-1,0 Ед/мл. Инкубировали 10 мин при температуре 37°C, после чего реакцию останавливали, добавляя 100 мкл раствора 3. Для контроля инкубировали субстрат без образца в течение 10 мин при температуре 37°C, затем добавляли 100 мкл реагента, прекращающего реакцию, и после этого 100 мкл образца. Определяли содержание свободных жирных кислот в опыте и в контроле при помощи диагностического набора Wako HR series NEFA-HR (2) diagnostic kit (http://www.wakodiagnosics.com/r_nefa.html) согласно инструкции на листке-вкладыше. Рассчитывали активность по формуле

$$U/mL = \frac{\Delta FFA \times Vt \times df}{Vs \times t},$$

где U/mL - ферментативная активность (Ед/мл);

Δ FFA - изменение содержания свободных жирных кислот (FFA в образце - FFA в контроле), мкмоль/мл;

Vt - суммарный объем после прекращения реакции (1 мл);

Vs - объем образца (0,1 мл);

t - продолжительность инкубации (10 мин);

df - кратность разведения образца.

1 Ед ферментативной активности - это количество фермента, при котором за 1 мин образуется 1 мкмоль свободных жирных кислот в условиях эксперимента.

Определение активности фосфолипазы С (PLC).

Состав раствора субстрата: 10 мМ нитрофенилфосфорилхолин (pNP) (артикул N83020; Melford Laboratories Ltd, Ипсуич, Великобритания); буферный раствор 100 мМ 3-морфолинопропансульфонат (MOPS) (pH 7,3); 0,2% Triton X-100; 1 мМ ZnSO₄. Смешивали 40 мкл образца (с активностью от 0,03 до 0,1 Ед/мл) и 960 мкл раствора субстрата. Инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали, добавляя 1000 мкл реагента для прекращения реакции, содержащего 1 М трис-(гидроксиметил)аминометана (TRIS) и 50 мМ этилендиаминтетраацетата (EDTA) с pH 10, доведенного с помощью 0,5 М раствора NaOH. Для контроля реагент, прекращающий реакцию, добавляли до ферментного образца. Определяли оптическую плотность (OD) образцов и контролей на длине волны 405 нм.

Для калибровки готовили растворы pNP концентрацией 0-0,5-1,0-2,0-2,9-4,0 мМ в указанном выше буферном растворе. По 40 мкл каждого из стандартных растворов смешивали с 960 мкл раствора субстрата и 1000 мкл реагента, прекращающего реакцию. Определяли оптическую плотность (OD) растворов на длине волны 405 нм. Используя линейную регрессию, рассчитывали наклон калибровочной кривой.

Ферментативную активность рассчитывали по формуле

$$U/mL = \frac{\Delta Abs \times df}{t \times slope}$$

где U/mL - ферментативная активность (Ед/мл);

ΔAbs - ($A_{образца}$ - $A_{контроля}$);

df - кратность разведения образца;

slope - наклон калибровочной кривой по образованию пара-нитрофенола, (мл/мкмоль);

t - продолжительность инкубации (30 мин).

1 Ед ферментативной активности - это количество фермента, при котором за 1 мин образуется 1 мкмоль лора-нитрофенола в условиях эксперимента (pH 7,3; 37°C).

Определение активности фосфатидилинозит-фосфолипазы (PI-PLC).

Состав раствора субстрата: раствор N-метилморфолина 4-метилумбеллиферилмио-инозитол-1-фосфата (BioSynth M-571; Брюссель, Бельгия) концентрацией 20 мМ в буферном растворе (200 мМ фосфата натрия; pH 7,5), содержащий 0,1% Triton X-100. Раствор субстрата (140 мкл) приводили к температуре 37°C. Начинали реакцию, добавляя 10 мкл образца с активностью от 0,2 Ед/мл до 1,0 Ед/мл. Инкубировали при температуре 37°C, определяя изменение поглощения (по сравнению с контролем) на длине волны 380 нм. Мерой ферментативной активности служил наклон (ΔOD /время) линейной части кривой.

Для калибровки готовили стандартные растворы 4-метилумбеллиферона концентрацией 0-1,0-2,0-3,0-4,0-5,0 мМ в фосфатном буферном растворе (200 мМ) По 10 мкл каждого стандартного раствора смешивали с 140 мкл субстрата. Измеряли оптическую плотность (OD) на длине волны 380 нм. Используя линейную регрессию, рассчитывали наклон калибровочной кривой.

Ферментативную активность рассчитывали по формуле

$$U/mL = (\Delta Abs/min_{sample} - \Delta Abs/min_{blanc}) \times df/S$$

где U/mL - ферментативная активность (Ед/мл);

$\Delta Abs/min_{sample}$ - изменение поглощения образца в 1 мин;

$\Delta Abs/min_{blanc}$ - изменение поглощения контроля в 1 мин;

df - кратность разведения образца;

S - наклон калибровочной кривой для 4-метилумбеллиферона (мл/мкмоль).

1 Ед ферментативной активности - это количество фермента, при котором за 1 мин из 18,7 мМ раствора 4-метилумбеллиферилмио-инозитол-1-фосфата образуется 1 мкмоль 4-метилумбеллиферона в условиях эксперимента (pH 7,3; 37°C).

Количественное определение содержания фосфолипидов, лизофосфолипидов и глицерофосфатов методом ядерного магнитного резонанса с фосфором-31 (³¹P-ЯМР).

Отвешивали точное количество масла (500-1000 мг) в подходящую емкость, добавляли 10 г холодного ацетона и тщательно перемешивали. Смесь масла с ацетоном держали при температуре 4°C в течение по меньшей мере 30 мин, после чего центрифугировали 10 мин со скоростью 3000 об/мин. Полученную жидкую фазу отбрасывали. Осадок суспендировали в 500 мкл буферного раствора (содержащего 25 г/л дезоксихолиевой кислоты; 5,84 г/л EDTA; 10,9 г/л TRIS, pH доводили до 9,0 с помощью KOH), и добавляли 50 мкл раствора, служившего внутренним стандартом (содержащего 10 г/л триизопропилфосфата в буферном растворе для экстракции).

Одномерные спектры (ID P³¹ЯМР) регистрировали с помощью спектрометра Bruker Avance III HD (рабочая частота ³¹P 161,97 МГц), оснащенного криозондом, охлаждаемым жидким азотом; температура образца 300K. Использовали инвертирующий затвор 13C (ZGIG) программы импульсов с развязкой от протонов Waltz16; регистрировали 4 скана до начала записи и по 128 сканов на спектр, используя 90-градусный импульс; время выборки спада свободной индукции 3,37 с; релаксационная задержка 11,5 с.

Концентрации аналита рассчитывали относительно триизопропилфосфата.

Для холинфосфата и этаноламинфосфата. вводили поправочный коэффициент, чтобы учесть неполную релаксацию.

Количественное определение диацилглицеролов (DAG) в маслах.

Группы нейтральных липидов разделяли путем нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC); диглицериды определяли путем детекции по светорассеянию испарённого образца (ELSD), используя модификацию метода Cd 11d-96, официально одобренного Американским обществом олеохимии (AOCS). Содержание аналитов выражали в процентах (мас./мас.).

Пример 1. Дегуммирование неочищенных соевого и рапсового масел при температуре 55-70°C с использованием фосфолипазы A1.

Использовали два варианта неочищенного соевого масла от американских предприятий по переработке масличных семян и два варианта неочищенного рапсового масла от европейских производителей. Отвешивали 10 г масла, помещали в колбу и нагревали до температуры 70°C, затем добавляли лимонную кислоту (в виде 50%-ного раствора) до конечной концентрации лимонной кислоты в масле 500 ppm. Колбу с маслом и лимонной кислотой инкубировали при температуре 70°C в течение по меньшей мере 30 мин.

После этого смесь приводили к нужной температуре (55, 60, 65 и 70°C) и поддерживали ее. Когда температура стабилизировалась, в масло подмешивали фермент PLA1, полученный, как описано выше, в количестве 0,28 мг активного белка на 1 кг масла (1,25 единиц активности фосфолипазы A на 1 г) и воду с помощью диспергатора Ultra Tuxta; конечная концентрация воды в масле составляла 3% (мас./мас.). Реакция продолжалась 4 ч, при этом масло перемешивали с помощью магнитной мешалки (скорость вращения 800 об/мин). По истечении этих четырех часов отбирали образцы и определяли содержание фосфолипидов (PL), а именно фосфатидной кислоты (PA), фосфатидилхолина (PC), фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилинозита (PI), методом ³¹P-ЯМР, как описано выше.

Результаты, представленные в табл. 1-4 ниже, показывают, что фосфолипаза A1, описанная в настоящем документе, снижает содержание всех четырех указанных фосфолипидов (PA, PC, PE и PI). За 4 ч фосфолипазной реакции при температурах 55°C, 60°C, 65°C и 70°C происходил гидролиз более 85% суммарного количества фосфолипидов (PL), исходно присутствовавших в масле.

Таблица 1

Содержание фосфолипидов в неочищенном соевом масле (вариант А) до и после инкубации с фосфолипазой A1

Неочищенное соевое масло А					
	РА	РС	РЕ	PI	Суммарное содержание PL
	мкмоль/100 г масла				
Момент времени 0	207,0	901,0	603,2	499,7	2211,0
55°C, 4 ч	15,5	28,7	18,7	19,6	82,4
60°C, 4 ч	18,5	47,3	20,0	27,7	113,5
65°C, 4 ч	17,9	46,3	21,6	26,1	111,9
70°C, 4 ч	31,6	81,4	23,8	43,7	180,5

Таблица 2

Содержание фосфолипидов в неочищенном соевом масле (вариант В) до и после инкубации с фосфолипазой A1

Неочищенное соевое масло В					
	РА	РС	РЕ	PI	Суммарное содержание PL
	мкмоль/100 г масла				
Момент времени 0	179,9	450,5	374,0	285,1	1289,5
55°C, 4 ч	14,7	21,4	17,7	13,4	67,2
60°C, 4 ч	<10	15,2	19,0	<10	34,2
65°C, 4 ч	19,3	27,8	19,3	17,5	83,9
70°C, 4 ч	18,2	29,7	21,4	17,5	86,7

Таблица 3

Содержание фосфолипидов в неочищенном рапсовом масле (вариант А) до и после инкубации с фосфолипазой А1

Неочищенное рапсовое масло А					
	РА	РС	РЕ	РІ	Суммарное содержание PL
мкмоль/100 г масла					
Момент времени 0	477,4	762,3	334,0	444,2	2017,9
55°С, 4 ч	43,7	29,2	29,8	21,2	123,8
60°С, 4 ч	49,3	41,3	31,0	24,2	145,8
65°С, 4 ч	58,8	42,2	29,7	24,2	154,9
70°С, 4 ч	63,5	53,4	22,0	32,7	171,5

Таблица 4

Содержание фосфолипидов в неочищенном рапсовом масле (вариант В) до и после инкубации с фосфолипазой А1

Неочищенное рапсовое масло В					
	РА	РС	РЕ	РІ	Суммарное содержание PL
мкмоль/100 г масла					
Момент времени 0	500,9	350,1	247,3	235,0	1333,2
55°С, 4 ч	18,5	<10	18,2	<10	36,7
60°С, 4 ч	24,2	<10	16,0	<10	40,3
65°С, 4 ч	27,7	11,0	18,2	<10	56,8
70°С, 4 ч	84,4	26,3	13,7	17,6	142,0

Пример 2. Сравнение эффективности PLA1 и готового препарата фосфолипазы А при температуре 55°С.

Неочищенное соевое масло и соевое масло, дегуммированное путем гидратации, предоставлялись американскими предприятиями по переработке масличных семян. Отвешивали 10 г масла в подходящую емкость, нагревали до 70°С, затем добавляли лимонную кислоту (в виде 50%-ного раствора) до конечной концентрации цитрата в масле 500 ppm. Сосуд с маслом, обработанным лимонной кислотой, инкубировали при температуре 70°С в течение по меньшей мере 30 мин, после чего температуру доводили до 55°С и поддерживали на этом уровне.

Когда температура стабилизировалась, в смесь масла с лимонной кислотой прибавляли воду и 25 ppm фермента PLA1, полученного, как описано выше, и перемешивали с помощью диспергатора Ultra Turrax. Конечная концентрация воды в смеси составляла 3% (мас./мас.).

В том случае, когда масло с лимонной кислотой, приведенное к температуре 55°С, обрабатывали готовыми ферментными препаратами с активностью фосфолипазы А, в смесь масла и лимонной кислоты сначала добавляли раствор NaOH (2М) до конечной концентрации 138 ppm NaOH, а после этого 25 ppm ферментного препарата с водой и перемешивали диспергатором Ultra Turrax; конечная концентрация воды составляла 3% (мас./мас.).

Масло с лимонной кислотой, водой и ферментом инкубировали в течение 4 ч при температуре 55°С, перемешивая магнитной мешалкой со скоростью 800 об/мин. После этого отбирали образцы и методом ³¹P-ЯМР (см. выше) определяли в них содержание фосфолипидов, а именно фосфатидной кислоты (РА), фосфатидилхолина (РС), фосфатидилэтаноламина (РЕ) и фосфатидилинозита (РІ); содержание лизофосфолипидов, а именно лизо-фосфатидной кислоты (LPA), лизо-фосфатидилхолина (LPC), лизо-фосфатидилэтаноламина (LPE) и лизо-фосфатидилинозита (LPI); и глицерофосфатов, а именно глицеролфосфатидной кислоты (GPA), глицеролфосфатидилхолина (GPC), глицеролфосфатидилэтаноламина (GPE) и глицеролфосфатидилинозита (GPI).

Результаты, представленные в табл. 5 и 6, показывают, что при использовании для обработки соевого масла фосфолипазой А1, описанной в настоящем документе, за 4 ч инкубации с этим ферментом, взятым в концентрации 25 ppm, при температуре 55°С как в неочищенном масле, так и в масле, прошедшем рафинацию путем гидратации, содержание фосфолипидов (фосфатидной кислоты, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозита) было меньше, чем при использовании готовых ферментных препаратов Lecitase® Ultra и Rohalase® PL-XTRA, в условиях, оптимальных для каждого из указанных ферментов. Также результаты, представленные в табл. 5 и 6, показывают, что при температуре 55°С фосфолипаза А1, описанная в настоящем документе, проявляет активность лизофосфолипазы, превращая указанные четыре лизофосфолипида в соответствующие глицерофосфаты, причем эта актив-

ность имеет место как в неочищенном соевом масле, так и в масле, прошедшем рафинацию путем гидратации, и превышает таковую готовых ферментных препаратов Lecitase® Ultra и Rohalase® PL XTRA. Поскольку эмульгирующая способность глицерофосфатов ниже, чем лизофосфолипидов, превращение лизофосфолипидов в глицерофосфаты увеличивает эффективность отделения масла от фосфолипидной фракции на этапе центрифугирования.

Таблица 5

Содержание фосфолипидов, лизофосфолипидов и глицерофосфатов в неочищенном соевом масле до и после инкубации с различными фосфолипазами в течение 4 ч при температуре 55°C

Неочищенное соевое масло													
	PA	PC	PE	PI	Сум- марное содер- жание PL	LPA	LPC	LPE	LPI	GPA	GPC	GPE	GPI
мкмоль/100 г масла													
Момент времени 0	250	561	543	344	1699	106	132	83	<	<	<	<	<
PLA1	<	57	<	<	57	204	478	389	265	140	228	164	87
Lecitase® Ultra	<	101	52	149	302	257	525	403	173	57	62	73	<
Rohalase®P L- XTRA	114	201	163	121	599	245	517	382	255	<	48	<	

< - Не обнаружено.

Таблица 6

Содержание фосфолипидов, лизофосфолипидов и глицерофосфатов в соевом масле, прошедшем рафинацию путем гидратации, до и после инкубации с различными фосфолипазами в течение 4 ч при температуре 55°C

Соевое масло после рафинации путем гидратации													
	PA	PC	PE	PI	Сум- марное содер- жание PL	LPA	LPC	LPE	LPI	GPA	GPC	GPE	GPI
мкмоль/100 г масла													
Момент времени 0	123	191	134	100	547	<	59	<	<	<	<	<	<
PLA1	<	<	<	<	0	93	148	99	71	41	72	48	<
Lecitase® Ultra	<	<	<	52	52	107	179	110	75	<	<	<	<
Rohalase® PL XTRA	<	<	<	<	0	96	155	97	85	<	<	<	<

< - Не обнаружено.

Пример 3. Сравнение эффективности обработки неочищенного соевого масла ферментом PLA1 по данному изобретению и готовыми ферментными препаратами с активностью фосфолипазы А при температурах 55, 60 и 65°C.

Использовали неочищенное соевое масло, предоставленное американскими предприятиями по переработке масличных семян. Отвешивали 10 г масла в подходящую емкость, нагревали до 70°C, затем добавляли лимонную кислоту (в виде 50%-ного раствора) до конечной концентрации цитрата в масле 500 ppm. Сосуд с маслом и лимонной кислотой инкубировали при температуре 70°C в течение по меньшей мере 30 мин.

После этого температуру доводили до 55°C, 60°C и 65°C и поддерживали на указанных уровнях. Когда температура стабилизировалась, в смесь масла с лимонной кислотой прибавляли воду и 0,25 мг активного белка PLA1, полученного, как описано выше, на 1 кг масла и перемешивали с помощью диспергатора Ultra Tuptax. Конечная концентрация воды в смеси составляла 3% (мас./мас.).

В случае обработки масла с лимонной кислотой готовыми ферментными препаратами с активностью фосфолипазы А Lecitase® Ultra или Rohalase® PL-XTRA в смесь добавляли сначала раствор NaOH (2M) до конечной концентрации 138 ppm NaOH, чтобы создать условия, оптимальные для этих ферментных препаратов, а после этого воду и ферментный препарат в количестве 0,25 мг активного белка на 1 кг масла и перемешивали диспергатором Ultra Tuptax; конечная концентрация воды составляла 3% (мас./мас.).

Ферментативная реакция продолжалась 4 ч при перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 800 об/мин. После этого отбирали образцы и методом ³¹P-ЯМР (см. выше) определяли в них содержание фосфолипидов, а именно фосфатидной кислоты (PA), фосфатидилхолина (PC), фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилинозита (PI).

Результаты, представленные в табл. 7-9, показывают, что через 4 ч инкубации неочищенного соевого масла с фосфолипазой A1 A.niger (PLA1), описанной в настоящем документе, при температурах 55°C,

60°C и 65°C содержание фосфолипидов (фосфатидной кислоты, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозита) было меньше, чем при использовании готовых ферментных препаратов Lecitase® Ultra и Rohalase® PL-XTRA, в условиях, оптимальных для каждого их указанных ферментов.

Таблица 7

Содержание фосфолипидов в неочищенном соевом масле до и после инкубации с различными фосфолипазами в течение 4 ч при температуре 55°C

Неочищенное соевое масло, 55°C					
	PA	PC	PE	PI	Суммарное содержание PL
	мкмоль/100 г масла				
Момент времени 0	215	506	459	315	1495
PLA1	14	20	18	13	65
Lecitase® Ultra	<	101	52	149	302
Rohalase® PL XTRA	22	68	42	35	167

< - Не обнаружено.

Таблица 8

Содержание фосфолипидов в неочищенном соевом масле до и после инкубации с различными фосфолипазами в течение 4 ч при температуре 60°C

Неочищенное соевое масло, 60°C					
	PA	PC	PE	PI	Суммарное содержание PL
	мкмоль/100 г масла				
Момент времени 0	215	506	459	315	1495
PLA1	<	15	19	<	34
Lecitase® Ultra	101	448	406	295	1250
Rohalase® PL XTRA	23	71	48	31	174

< - Не обнаружено.

Таблица 9

Содержание фосфолипидов в неочищенном соевом масле до и после инкубации с различными фосфолипазами в течение 4 ч при температуре 65°C

Неочищенное соевое масло, 65°C					
	PA	PC	PE	PI	Суммарное содержание PL
	мкмоль/100 г масла				
Момент времени 0	215	506	459	315	1495
PLA1	19	28	19	17	84
Rohalase® PL XTRA	25	84	46	34	189

Пример 4. Сравнение эффективности обработки соевого масла, прошедшего рафинацию путем гидратирования, ферментом PLA1 по данному изобретению и готовыми ферментными препаратами с активностью фосфолипазы А при температурах 55, 60 и 65°C.

Использовали соевое масло, прошедшее рафинацию путем гидратации, которое было предоставлено американскими предприятиями по переработке масличных семян. Отвешивали 10 г масла в подходящую емкость, нагревали до 70°C, затем добавляли лимонную кислоту (в виде 50%-ного раствора) до конечной концентрации цитрата в масле 500 ppm. Сосуд с маслом и лимонной кислотой инкубировали при температуре 70°C в течение по меньшей мере 30 мин.

После этого температуру доводили до 55°C, 60°C и 65°C. Когда температура стабилизировалась, в смесь масла с лимонной кислотой прибавляли воду и фермент PLA1, полученный, как описано выше, в количестве 0,25 мг активного белка на 1 кг масла и перемешивали с помощью диспергатора Ultra Turrax. Конечная концентрация воды в смеси составляла 3% (мас./мас.).

В случае обработки масла с лимонной кислотой готовыми ферментными препаратами с активностью фосфолипазы А Lecitase® Ultra или Rohalase® PL-XTRA в смесь добавляли сначала раствор NaOH (2 М) до конеч-

ной концентрации 138 ppm NaOH, чтобы создать условия, оптимальные для этих ферментных препаратов, а после этого воду и ферментный препарат в количестве 0,25 мг активного белка на 1 кг масла и перемешивали диспергатором Ultra Tugaх; конечная концентрация воды составляла 3% (мас./мас.).

Ферментативная реакция продолжалась 4 ч при перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 800 об/мин. После этого отбирали образцы и методом ³¹P-ЯМР (см. выше) определяли в них содержание фосфолипидов, а именно фосфатидной кислоты (РА), фосфатидилхолина (РС), фосфатидилэтаноламина (РЕ) и фосфатидилинозита (РІ).

Результаты, представленные в табл. 10-12, показывают, что через 4 ч инкубации соевого масла, прошедшего рафинацию путем гидратации, с фосфолипазой А1 (PLA1), описанной в настоящем документе, при температуре 55°C-65°C содержание фосфолипидов (фосфатидной кислоты, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозита) меньше, чем при использовании готового ферментного препарата Lecitase® Ultra; препарат Rohalase® PL-XTRA тоже обеспечивал низкий уровень фосфолипидов при температурах 60°C и 65°C. В этих опытах соблюдались условия, оптимальные для каждого из указанных ферментов.

Таблица 10

Содержание фосфолипидов в соевом масле, прошедшем рафинацию путем гидратации, до и после инкубации с различными фосфолипазами в течение 4 ч при температуре 55°C

Соевое масло после рафинации путем гидратации, 55 °С					
	РА	РС	РЕ	РІ	Суммарное содержание PL
	мкмоль/100 г масла				
Момент времени 0	228	132	155	146	661
PLA1	25	<	9	<	34
Lecitase® Ultra	18	<	15	20	53
Rohalase® PL-XTRA	26	<	11	<	36

< - Не обнаружено.

Таблица 11

Содержание фосфолипидов в соевом масле, прошедшем рафинацию путем гидратации, до и после инкубации с различными фосфолипазами в течение 4 ч при температуре 60°C

Соевое масло после рафинации путем гидратации, 60°C					
	РА	РС	РЕ	РІ	Суммарное содержание PL
	мкмоль/100 г масла				
Момент времени 0	228	155	146	132	661
PLA1	46	<	12	<	58
Lecitase® Ultra	30	79	67	57	232
Rohalase® PL-XTRA	22	<	11	<	33

< - Не обнаружено.

Таблица 12

Содержание фосфолипидов в соевом масле, прошедшем рафинацию путем гидратации, до и после инкубации с различными фосфолипазами в течение 4 ч при температуре 65°C

Соевое масло после рафинации путем гидратации, 65 °С					
	РА	РС	РЕ	РІ	Суммарное содержание PL
	мкмоль/100 г масла				
Момент времени 0	228	155	146	132	661
PLA1	58	17	14	14	102
Lecitase® Ultra	188	62	90	78	418
Rohalase® PL-XTRA	20	<	<	<	20

< - Не обнаружено.

Пример 5. Дегуммирование масла с использованием комбинации ферментов PLC/PIPLC и PLA1.

Использовали неочищенные соевое и рапсовое масла, как описано в примере 1. Отвешивали 10 г масла в подходящую емкость и нагревали до температуры 70°C. Проводили предварительную обработку масла, а именно добавляли в него лимонную кислоту (в виде 50%-ного раствора) до конечной концентрации цитрата 500 ppm. Подготовленное таким образом масло инкубировали при температуре 70°C в течение по меньшей мере 30 мин, после чего добавляли в него NaOH до концентрации 138 ppm. Затем приводили температуру к 55°C и поддерживали ее на этом уровне.

Смесь, включавшую фосфолипазу A1, полученную, как описано выше в настоящем документе, и ферментный препарат Purifine PLC/PI-PLC вместе с водой добавляли в масло и перемешивали с помощью диспергатора Ultra Turrax. PLA1 брали в количестве 0,28 мг активного белка на 1 кг масла, препарат Purifine PLC/PI-PLC в количестве 0,013 единиц активности фосфолипазы C на 1 г масла и 0,05 единиц активности фосфотидилинозит-фосфолипазы C на 1 г масла; конечная концентрация воды составляла 3% (мас./мас.).

Ферментативная реакция продолжалась 4 ч при перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 800 об/мин. После этого отбирали образцы и методом ³¹P-ЯМР (см. выше) определяли в них содержание фосфолипидов, а именно фосфатидной кислоты (PA), фосфатидилхолина (PC), фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилинозита (PI). Также определяли диглицериды (DAG) методом HPLC.

Результаты, представленные в табл. 13 и 14 ниже, показывают, что при использовании PLA1 одновременно с PLC/PI-PLC содержание интактных фосфолипидов в масле снижается значительно, чем при использовании только PLC/PI-PLC. Через 4 ч инкубации масла с комбинацией ферментов PLA1+PLC/PI-PLC оказывалось гидролизованным более 90% фосфолипидов. При использовании PLA1 одновременно с PLC/PI-PLC образование диглицеридов (DAG) сокращалось, но их содержание снижалось только на 5-15% от общего количества образовавшихся DAG без предварительной обработки масла.

Таблица 13

Содержание фосфолипидов в неочищенном соевом масле до и после инкубации с фосфолипазой C (PLC), фосфотидилинозит-фосфолипазой C (PI-PLC) и фосфолипазой A1 (PLA1) при температуре 55°C

Неочищенное соевое масло							
		PA	PC	PE	PI	Суммарное содержание PL	Δ-DAG
		мкмоль/100 г масла					%
							(масса/масса)
Момент времени 0		210	547	455	328	1541	
2 ч	PLC/PI-PLC, без предварительной обработки масла	187	≤	116	≤	303	0,76
	PLC/PI-PLC + PLA1, без предварительной обработки масла	65	≤	≤	≤	65	
	PLC/PI-PLC, с предварительной обработкой масла	188	50	195	≤	433	0,63
	PLC/PI-PLC + PLA1, с предварительной обработкой масла	≤	61	48	≤	109	
4 ч	PLC/PI-PLC + PLA1, без предварительной обработки масла	≤	≤	≤	≤	≤	0,68
	PLC/PI-PLC + PLA1, с предварительной обработкой масла	≤	41	50	≤	91	0,12

< - Не обнаружено.

Таблица 14

Содержание фосфолипидов в неочищенном рапсовом масле до и после инкубации с фосфолипазой С (PLC), фосфотидилинозит-фосфолипазой С (PI-PLC) и фосфолипазой А1 (PLA1) при температуре 55°C

Неочищенное рапсовое масло							
		PA	PC	PE	PI	Суммарное содержание PL	Δ-DAG
		мкмоль/100 г масла					% (масса/масса)
Момент времени 0		524	718	345	404	1992	
2 ч	PLC/PI-PLC, без предварительной обработки масла	563	222	286	≤	1070	0,71
	PLC/PI-PLC + PLA1, без предварительной обработки масла	327	0	70	≤	397	
	PLC/PI-PLC, с предварительной обработкой масла	584	354	301	72	1312	0,55
	PLC/PI-PLC + PLA1, с предварительной обработкой масла	191	49	42	≤	282	
4 ч	PLC/PI-PLC + PLA1, без предварительной обработки масла	233	≤	≤	≤	233	0,68
	PLC/PI-PLC + PLA1, с предварительной обработкой масла	98	≤	60	≤	158	0,44

< - Не обнаружено.

Пример 6. Рафинация масла с использованием ферментного препарата Purifine® 3G и фосфолипазы А1.

Использовали два варианта (С и D) неочищенного соевого масла, предоставленные американскими предприятиями по переработке масличных семян. Отвешивали 10 г масла в подходящую емкость и нагревали до температуры 60°C.

Готовый ферментный препарат Purifine® 3G и белок PLA1 из *A. niger*, полученный, как описано выше в настоящем документе, одновременно или последовательно добавляли вместе с водой в масло. Смесь масла с ферментами перемешивали с помощью диспергатора Ultra Turrax. В том случае, когда Purifine® 3G и PLA1 добавляли вместе, предварительную обработку масла не делали. В случае последовательного добавления ферментов сначала вносили в масло Purifine® 3G и инкубировали 2 ч, после чего добавляли лимонную кислоту до конечной концентрации 500 ppm и затем вносили PLA1.

Purifine® 3G брали в количестве 0,013 единиц активности фосфолипазы С на 1 г масла и 0,05 единиц активности фосфатидилинозит-фосфолипазы С на 1 г масла (150-200 ppm); PLA1 брали 0,28 мг либо 0,56 мг активного белка на 1 кг масла. Конечная концентрация воды составляла 3% (мас./мас.).

Ферментативная реакция продолжалась 4 ч при перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 800 об/мин. Через 2 и 4 ч инкубации при температуре 60°C отбирали образцы и методом ³¹P-ЯМР (см. выше) определяли в них содержание фосфолипидов (PL), а именно фосфатидной кислоты (PA), фосфатидилхолина (PC), фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилинозита (PI). Также определяли диглицериды (DAG) методом HPLC, как говорилось выше.

Результаты, представленные в табл. 15 и 16 показывают, что при сочетании препарата Purifine® 3G с фосфолипазой А1 происходит гидролиз большего количества фосфолипидов, нежели при использовании одного только Purifine® 3G. В некоторых случаях (например, с неочищенным соевым маслом С) не требуется предварительной обработки масла для того, чтобы комбинация препаратов Purifine® 3G и PLA1 в достаточной степени снизила уровень фосфора. При использовании Purifine® 3G вместе с PLA1 сокращалось образование диглицеридов (DAG), а именно их суммарное количество было на 5-15% меньше, чем после инкубации масла с Purifine® 3G, взятым в отдельности.

Таблица 15

Содержание фосфолипидов в неочищенном соевом масле С до и после инкубации с ферментным препаратом Purifine® 3G и фосфолипазой А1 при температуре 60°C без предварительной обработки масла

Неочищенное соевое масло С							
		PA	PC	PE	PI	Суммарное содержание PL	Δ-DAG
		мкмоль/100 г масла					%
							(масса/масса)
Момент времени 0		328	1067	775	592	2763	0
2 ч	Purifine® 3G	242	90	356	160	847	1,16
	Purifine®3G+ PLA1 (0,28 мг активного белка на 1 кг масла)	96	<	57	<	152	1,01
	Purifine®3G+ PLA1 (0,56 мг активного белка на 1 кг масла)	59	<	<	<	59	0,91
4 ч	Purifine®3G+ PLA1 (0,28 мг активного белка на 1 кг масла)	53	<	<	<	53	1,01
	Purifine®3G+ PLA1 (0,56 мг активного белка на 1 кг масла)	<	<	<	<	0	0,86

< - Не обнаружено.

Таблица 16

Содержание фосфолипидов в неочищенном соевом масле D до и после инкубации с ферментным препаратом Purifine® 3G и фосфолипазой А1 (в количестве 0,28 мг активного белка на 1 кг масла во всех опытах) при температуре 60°C

Неочищенное соевое масло D							
		PA	PC	PE	PI	Суммарное содержание PL	Δ-DAG
		мкмоль/100 г масла					%
							(масса/масса)
Момент времени 0		376	571	591	308	1846	
2 ч	Purifine® 3G	222	119	228	<	569	0,56
	Purifine® 3G + PLA1 (одновременное добавление)	252	69	191	64	576	0,50
	Purifine® 3G + лимонная кислота (500 ppm) + PLA1 (последовательное добавление)	245	74	217	72	609	0,52
4 ч	Purifine® 3G	159	78	162	<	399	0,63
	Purifine® 3G + PLA1 (одновременное добавление)	199	<	128	<	327	0,62
	Purifine® 3G + лимонная кислота (500 ppm) + PLA1 (последовательное добавление)	<	<	<	<	<	0,58

< - Не обнаружено.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения количества интактных фосфолипидов в триацилглицеридном масле, который включает инкубацию указанного масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы А1 и содержащим полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

2. Способ по п.1, в котором указанный полипептид способен по меньшей мере на 85% уменьшать количество интактных фосфолипидов, исходно присутствующих в триацилглицеридном масле, в результате инкубации этого масла с фосфолипазой А1, взятой в количестве 0,28 мг активного белка на 1 кг масла, при температуре 55, 60, 65 и/или 70°C в течение 4 ч.

3. Способ по п.1 или 2, в котором фосфолипиды включают фосфатидную кислоту, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозит и/или фосфатидилхолин.

4. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий этап добавления кислоты, воды и/или защелачивающего агента в масло, в котором этап добавления кислоты, воды и/или защелачивающего агента осуществляется до инкубации масла с фосфолипазой.

5. Способ по любому из пп.1-4, дополнительно включающий инкубацию масла с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы С, с полипептидом, обладающим активностью фосфатидилинозит-фосфолипазы С и/или с полипептидом, обладающим активностью фосфолипазы А2.

6. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий выделение из масла компонентов, содержащих фосфор.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором масло является неочищенным или прошедшим рафинацию путем гидратации.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором масло является растительным, животным, рыбным или полученным из водорослей.

9. Триацилглицеридное масло, содержащее полипептид, который обладает активностью фосфолипазы A1 и включает полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

10. Масло по п.9, которое дополнительно содержит полипептид, обладающий активностью фосфолипазы C, полипептид, обладающий активностью фосфатидилинозит-фосфолипазы C, и/или полипептид, обладающий активностью фосфолипазы A2.

