

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491318 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.10

(51) Int. Cl. *A23C 11/08* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.21

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МОЛОЧНЫЕ БЕЛКИ, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) 2021904275

(32) 2021.12.24

(33) AU

(86) PCT/IB2022/062639

(87) WO 2023/119200 2023.06.29

(71) Заявитель:
МИРУКУ ЛИМИТЕД (NZ)

(72) Изобретатель:

Асеведо Фани Алехандра, Сингх
Харджиндер (NZ), Асор Маи Шамир,
Шосейов Олед, Абрамсон Мирон (IL)

(74) Представитель:

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

(57) В изобретении предложены модифицированные молочные белки, в которых по меньшей мере одна потенциально фосфорилированная аминокислота заменена на отрицательно заряженную аминокислоту. Модифицированные молочные белки демонстрируют по меньшей мере одно из: улучшенной способности связывать кальций, улучшенной способности образовывать мицеллу, измененной изоэлектрической точки (pI), измененной термической стабильности и измененного дзета-потенциала при экспрессии в гетерологичной системе экспрессии по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии. В изобретении также предложены клетки, ткани, растения, части растений и семена, экспрессирующие модифицированные молочные белки. В изобретении также предложены способы получения и применения модифицированных белков. В изобретении также предложены пищевые или питьевые продукты или ингредиенты, содержащие модифицированные молочные белки.

A1

202491318

202491318

A1

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МОЛОЧНЫЕ БЕЛКИ, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки на изобретения

Содержание Австралийской предварительной заявки на патент № 2021904275, поданной 24 декабря 2021 года, включено здесь путем ссылки.

Область изобретения

Изобретение относится к области модифицированных белков, рекомбинантно полученных клеток-хозяев, растительных клеток и растений, и применение белков, в частности в пищевой промышленности и производстве напитков.

Предшествующий уровень техники

Устойчивое и полезное для здоровья поступление белка представляет собой одну из определяющих проблем нашего времени. Одним из ключевых вопросов является переход от животного белка к более экологичным растительным и другим альтернативным белкам. Последнее в основном обусловлено восприятием потребителей в отношении питания, здоровьем, благополучием животных, устойчивостью производства продуктов питания и продовольственной безопасностью. Этот процесс диверсификации поступления белка должен обеспечить более высокую доступность для человека высококачественных белков либо путем превращения растительных белков в желаемые пищевые продукты (которые напоминают функциональность и пищевую ценность животного продукта), или путем частичной замены животных белков растительными или путем производства животных белков без использования животных (например, с помощью рекомбинантных технологий, выращивания *in vitro*). Эти варианты обеспечат диетический белок для растущего населения с меньшим воздействием на окружающую среду и по доступной стоимости.

Существует большой интерес к рекомбинантно производимым молочным белкам. Тем не менее, с целью повышения потребительской привлекательности этих молочных белков, не содержащих животных компонентов, эти белки должны имитировать вкус, запах, ощущения, физические и питательные свойства молока и молочных продуктов.

Казеин и фракции белка молочной сыворотки могут быть отделены и выделены из молока в промышленном масштабе. Они включают казеины и казеинаты, концентраты и изоляты белка молочной сыворотки, и гидролизованные белки. Эти белковые ингредиенты обладают функциональными свойствами, которые придают желаемые структурные или другие свойства конечному продукту, и по этой причине находят многочисленные применения в традиционных молочных продуктах и в других продуктах питания.

Например, казеины представляют собой амфифильные молекулы с хорошо сбалансированным распределением гидрофильных и гидрофобных доменов, что позволяет использовать их в пищевых продуктах, где требуется включение масла/воды/воздуха в непрерывную систему, таких как медицинские и питательные напитки, имитации сыров, заправки для салатов, майонез, ликеры, меренги, суфле, взбитые сливки, кондитерские изделия, бисквиты и т.п. Из-за их способности образовывать жесткие, индуцированные путем нагревания необратимые гели, продукты белка молочной сыворотки нашли множество применений в пищевых продуктах, включающих, например, мясные продукты, молочные десерты, колбасы, хлеб и торты.

Были предприняты усилия для экспрессии таких молочных белков в гетерологичных системах. Например, на сегодняшний день большое внимание сосредоточено на производстве рекомбинантного β -лактоглобулина путем его экспрессии в *E. coli*, дрожжах и в *Trichoderma reesei* для использования в пищевых продуктах такими компаниями, как Perfect Day Inc.

Также известно производство рекомбинантных белков на основе белка животных с использованием трансгенных растений, например, при производстве молочных белков. Тем не менее, пригодность этих известных рекомбинантных белков для производства конечных пищевых продуктов, которые имитируют молочные белки животного происхождения по функциональности, вкусу и “опыту”, не ясна. Таким образом, использование известных подходов может привести к получению рекомбинантных белков, обладающих менее желательными характеристиками, для использования в качестве заменителя молочных продуктов в производстве продуктов питания и напитков.

Например, фосфорилирование казеина не происходит в трансгенных растениях, экспрессирующих рекомбинантный бета-казеин (Philip et al., 2001, Processing and localization of bovine β -casein expressed in transgenic soybean seeds under control of a soybean lectin expression cassette. Plant Science, 161(2), pp.323-335). Принимая во внимание то, что фосфорилирование играет существенную функциональную роль для связывания казеином кальция и образования мицелл, некоторые из таких существующих подходов рекомбинантной экспрессии молочных белков очевидно не являются оптимальными. Кроме того, при экспрессии молочных белков в дрожжах фосфорилирование приводит к энергетической нагрузке, поскольку оно потребляет молекулы аденозинтрифосфата (АТФ (АТР)), что приводит к низкой производительности.

Кроме того, существующие подходы к рекомбинантной экспрессии молочных белков в гетерологичных системах могут привести к измененной и потенциально нежелательной изоэлектрической точке в зрелом экспрессируемом белке вследствие

отсутствия групп фосфорилирования на группировках серина. Фосфорилирование аминокислот добавляет белку отрицательно заряженные группы, что снижает изоэлектрическую точку (pI) белка. Например, pI природного бета-казеина составляет 4,62, в то время как pI нефосфорилированного бета-казеина составляет выше 5. Последнее, в свою очередь, составляет проблему для некоторых промышленных применений экспрессированных белков, таких как проблемы, основанные на осаждении белка, сворачивании и ферментативной активности при конкретном pH (*Okigbo, L.M., Richardson, G.H., Brown, R.J. u Ernstrom, C.A., 1985. Interactions of calcium, pH, temperature, and chymosin during milk coagulation. Journal of Dairy Science, 68(12), pp,3135-3142*).

Таким образом, задача изобретения заключается в том, чтобы предложить альтернативный подход к производству рекомбинантного молока или молочных белков, который облегчал бы проблемы существующих подходов и/или по меньшей мере предоставлял бы обществу полезный выбор.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В изобретении предложен новый подход к экспрессии молочных белков в гетерологичных системах. Этот подход охватывает модификацию молочных белков путем замены потенциально фосфорилированных аминокислот в молочных белках на отрицательно заряженные аминокислоты. Модифицированные молочные белки, включающие отрицательно заряженные аминокислоты, имитируют фосфорилированные молочные белки, таким образом, способствуя образованию мицелл и ассоциированным преимуществам. Кроме того, замена потенциально фосфорилированных аминокислот в молочных белках на отрицательно заряженные аминокислоты обеспечивает возможность для направленной манипуляции с pI зрелых экспрессируемых молочных белков, тем самым обеспечивая рекомбинантно экспрессируемые молочные белки, обладающие улучшенными свойствами по сравнению с рекомбинантно экспрессируемыми молочными белками в соответствии с предшествующим уровнем техники. Кроме того, отрицательный заряд облегчает связывание с ионом Ca^{2+} , что является важным для питательной ценности, а также функциональности белка.

Модифицированный молочный белок

В первом аспекте изобретения предложен модифицированный молочный белок, в котором по меньшей мере одна потенциально фосфорилированная аминокислота заменена на отрицательно заряженную аминокислоту.

Сайт-мишень фосфорилирования

В одном из воплощений потенциально фосфорилированная аминокислота выбрана из серина (S) и треонина (T). В одном из воплощений потенциально фосфорилированная

аминокислота представляет собой серин (S). В еще одном воплощении потенциально фосфорилированная аминокислота представляет собой треонин (T).

В одном из воплощений экспериментально продемонстрировано, что потенциально фосфорилированная аминокислота является фосфорилированной.

В еще одном воплощении прогнозируют, что потенциально фосфорилированная аминокислота является фосфорилированной. В одном из воплощений прогнозирование осуществляют с использованием подходящего программного обеспечения для анализа последовательности.

Отрицательно заряженная аминокислота

В одном из воплощений отрицательно заряженная аминокислота выбрана из аспартата (D) и глутамата (E). В одном из воплощений отрицательно заряженная аминокислота представляет собой аспартат (D). В еще одном воплощении отрицательно заряженная аминокислота представляет собой глутамат (E).

Свойства модифицированного молочного белка

Связывание кальция

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии способен связывать кальций.

В еще одном воплощении модифицированный молочный белок обладает улучшенной способностью связывать кальций по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

Способность образовывать мицеллы

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии способен образовывать мицеллу.

В еще одном воплощении модифицированный молочный белок обладает улучшенной способностью образовывать мицеллу по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

Модифицированная pI

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии имеет измененную pI по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии имеет увеличенную pI по сравнению с

немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии имеет уменьшенную pI по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В некоторых воплощениях, модифицированный молочный белок имеет изоэлектрическую точку (pI), идентичную или похожую на pI для немодифицированного молочного белка.

В одном из воплощений pI модифицированного молочного белка составляет в пределах +/-1,0, +/-0,9, предпочтительно +/-0,8, +/-0,7, предпочтительно +/-0,6, предпочтительно +/-0,5, предпочтительно +/-0,4, предпочтительно +/-0,3, предпочтительно +/-0,2, предпочтительно 0,1 единицы по сравнению с немодифицированным молочным белком.

Термическая стабильность

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии имеет измененную термическую стабильность по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии имеет увеличенную термическую стабильность по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии имеет уменьшенную термическую стабильность по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

Дзета-потенциал

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии имеет измененный дзета-потенциал по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии имеет увеличенный дзета-потенциал по

сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В предпочтительном воплощении модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии имеет уменьшенный дзета-потенциал по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

Молочные белки

В одном из воплощений немодифицированный молочный белок представляет собой белок казеин.

В одном из воплощений белок казеин выбран из α 1-казеина, α 2-казеина, β -казеина и κ -казеина. В одном из воплощений белок казеин представляет собой коровий A2 β -казеин. В одном из воплощений коровий A2 β -казеин содержит пролин (P) в 67 позиции своей аминокислотной последовательности.

Сходство с известными молочными белками

В одном из воплощений модифицированный молочный белок имеет по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, предпочтительно по меньшей мере 92%, предпочтительно по меньшей мере 93%, предпочтительно по меньшей мере 94%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 96%, предпочтительно по меньшей мере 97%, предпочтительно по меньшей мере 98%, предпочтительно по меньшей мере 98% идентичность аминокислотной последовательности с известным молочным белком вышеописанного типа.

В одном из воплощений, помимо модификаций, произведенных при продуцировании модифицированного молочного белка, модифицированный молочный белок в другом отношении является таким же как немодифицированный молочный белок.

В альтернативном воплощении модифицированный молочный белок включал дополнительные модификации по сравнению с немодифицированным молочным белком.

Полинуклеотид, кодирующий модифицированный молочный белок

В еще одном аспекте изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий модифицированный молочный белок в соответствии с изобретением.

Конструкция

В еще одном аспекте изобретения предложена конструкция, содержащая полинуклеотид, кодирующий модифицированный молочный белок в соответствии с изобретением.

В одном из воплощений конструкция содержит:

а) промоторную последовательность,

б) полинуклеотид, кодирующий молочный белок, полученный из растений, или аналог молочного белка в соответствии с изобретением и
в) терминирующую последовательность.

В одном из воплощений конструкция включает последовательность, кодирующую сигнальный или транзитный пептид, нацеливающий молочный белок, полученный из растений, на желаемый субклеточный компартмент.

В одном из воплощений промотор представляет собой промотор, предпочтительный для семян.

Клетка-хозяин

В еще одном аспекте изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или конструкцию в соответствии с изобретением.

Предпочтительно, клетка-хозяин является гетерологичной в отношении видов, из которых получен немодифицированный молочный белок.

В предпочтительном воплощении клетка-хозяин представляет собой растительную клетку.

Организм-хозяин

В еще одном аспекте изобретения предложен организм-хозяин, содержащий полинуклеотид или конструкцию в соответствии с изобретением.

Предпочтительно, организм является гетерологичным в отношении видов, из которых получен немодифицированный молочный белок.

В предпочтительном воплощении организм представляет собой растение.

Часть растения, ткань, побег или потомство

В еще одном аспекте изобретения предложена часть растения, ткань, побег или потомство растения, содержащие полинуклеотид или конструкцию в соответствии с изобретением.

В предпочтительном воплощении часть растения представляет собой семя.

В предпочтительном воплощении растительная ткань представляет собой ткань семени.

Способ продуцирования модифицированного молочного белка

В еще одном аспекте изобретения предложен способ получения модифицированного молочного белка в соответствии с изобретением, включающий экспрессию полинуклеотида, кодирующего модифицированный молочный белок, или модифицированного молочного белка в соответствии с изобретением, в клетке-хозяине или организме.

В одном из воплощений способ включает стадию трансформирования клетки-хозяина или организма полинуклеотидом.

Предпочтительно, клетка-хозяин является гетерологичной в отношении видов, из которых получен немодифицированный молочный белок.

В предпочтительном воплощении клетка-хозяин представляет собой растительную клетку.

Предпочтительно, организм является гетерологичным в отношении видов, из которых получен немодифицированный молочный белок.

В предпочтительном воплощении организм представляет собой растение

В предпочтительном воплощении модифицированный молочный белок экспрессируется в семени растения.

В еще одном воплощении модифицированный молочный белок экспрессируется в ткани семени растения.

В одном из воплощений трансформация является временной. В еще одном воплощении трансформация является стабильной.

В еще одном воплощении способ включает стадию модификации полинуклеотида таким образом, чтобы он кодировал модифицированный молочный белок.

В еще одном воплощении способ включает стадию тестирования экспрессируемого модифицированного молочного белка в отношении по меньшей мере одного из:

- а) способности связывать кальций,
- б) способности образовывать мицеллу,
- в) рI,
- г) термической стабильности, и
- д) дзета-потенциала.

В еще одном воплощении модифицированный молочный белок выбран на основе по меньшей мере одного из (а)-(д).

В еще одном воплощении способ включает стадию очистки модифицированного молочного белка из клетки-хозяина или организма.

В еще одном воплощении в изобретении предложен модифицированный молочный белок, полученный способом в соответствии с изобретением.

Продукт, содержащий модифицированный молочный белок в соответствии с изобретением

В еще одном аспекте изобретения предложен пищевой или питьевой продукт или ингредиент, содержащий один или более чем один модифицированный молочный белок в соответствии с изобретением.

Предпочтительно, пищевой или питьевой продукт или ингредиент выбран из молока, сливки, шоколада, масла, сыра, ферментированного йогурта, мороженого, детской питательной смеси, белковых напитков, заварного крема, простокваши, сухого молока, маргарина, концентратов и изолятов белка молочной сыворотки, концентратов или изолятов молочного белка и гидролизованных молочных белков.

Применение модифицированного молочного белка в соответствии с изобретением.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение модифицированного молочного белка в соответствии с изобретением при приготовлении пищевого или питьевого продукта или ингредиента.

Способ приготовления пищевого или питьевого продукта или ингредиента

В еще одном аспекте изобретения предложен способ приготовления пищевого или питьевого продукта или ингредиента, включающий стадию обработки или включения модифицированного молочного белка в соответствии с изобретением, или полученного при помощи способа в соответствии с изобретением, в пищевой или питьевой продукт или ингредиент.

Предпочтительно, пищевой или питьевой продукт или ингредиент выбран из молока, сливок, шоколада, масла, сыра, ферментированного йогурта, мороженого, детской питательной смеси, белковых напитков, заварного крема, простокваши, сухого молока, маргарина, концентратов и изолятов белка молочной сыворотки, концентратов или изолятов молочного белка и гидролизованных молочных белков.

Заменитель молочного продукта

В предпочтительном воплощении пищевой или питьевой продукт представляет собой заменитель молочного продукта.

В одном из воплощений заменитель молочного продукта выбран из заменителя молока, заменителя сливок, заменителя сливок для взбивания, заменителя майонеза, заменителя мороженого, заменителя сыра и заменителя йогурта.

В одном из воплощений заменитель молочного продукта содержит по меньшей мере один дополнительный компонент, выбранный из по меньшей мере одного эмульгатора, по меньшей мере одного стабилизатора, по меньшей мере одного ароматизатора, по меньшей мере одного красителя, по меньшей мере одного консерванта, по меньшей мере одного подсластителя, по меньшей мере одного питательного соединения (т.е. витамина, минерального соединения, антиоксиданта, биологически активного вещества или другого источника дополнительной питательной ценности).

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к модифицированным молочным белкам, которые могут сохранять благоприятные свойства, такие как способность связывать кальций, способность образовывать мицеллы, желаемая изоэлектрическая точка (pI), термическая стабильность и дзета-потенциал, при экспрессии в гетерологичных клетках-хозяевах и организмах.

Модифицированные молочные белки могут быть получены без использования животных и демонстрируют широкое разнообразие применений, в частности, в пищевой промышленности и производстве напитков.

Молочные белки

Термины “молочный белок(молочные белки)” и “белок(белки) молока” могут быть использованы взаимозаменяемо.

Молоко содержит две основные группы белков, а именно казеины и белки молочной сыворотки. Существуют четыре типа казеинов, обозначенных как α 1-казеин, α 2-казеин, β -казеин и κ -казеины, которые составляют, соответственно, приблизительно 37, 10, 35 и 12% всего казеина. Каждый из четырех казеинов демонстрирует изменчивость в степени фосфорилирования и гликозилирования. Все казеины являются фосфорилированными: большинство молекул α 1-казеина содержат 8 остатков PO_4 , но некоторые содержат 9; α 2-казеин содержит 10, 11, 12 или 13 моль PO_4 /моль; β -казеин обычно содержит 5 моль PO_4 /моль, но иногда 4 моль PO_4 /моль; κ -казеин содержит 1 моль PO_4 /моль. κ -казеин представляет собой единственный казеин, который обычно гликозилирован и содержит галактозу, галактозамин и N-ацетилнейраминовую кислоту. Дополнительная гетерогенность в казеинах происходит из-за возникновения генетического полиморфизма, который обусловлен либо заменами, или, редко, делециями аминокислот в казеинах из-за мутаций, вызывающих изменения в последовательностях оснований в генах.

По сравнению с типичными глобулярными белками структуры казеинов достаточно уникальны. Интересной особенностью всех казеинов является амфифильность первичных структур. Все казеины имеют области, которые являются кислотными, основными или нейтральными и гидрофильными или гидрофобными. Казеины по сравнению с типичными глобулярными белками, которые имеют в основном α -спиральные и β -складчатые структуры, содержат меньше вторичных структур. Все основные казеины также взаимодействуют друг с другом с образованием различных комплексов отличающихся размеров и форм. Казеины связывают кальций, и степень связывания напрямую связана с количеством остатков фосфосерина в молекуле.

Молочные белки, в частности белки казеины, используются в широком разнообразии функциональных и питательных применений и имеют ряд свойств, которые делают их особенно подходящими для получения и включения в вещества, подходящие для

использования в пищевой промышленности. Они представляют собой эффективные инкапсулирующие вещества, обладающие пленкообразующими и эмульгирующими свойствами, которые позволяют им действовать в качестве стабилизаторов в системах, основанных на эмульсии, действуют в качестве носителей других веществ, и могут быть легко приготовлены в сухом состоянии.

В качестве ингредиентов в пищевых продуктах молочные белки приносят ряд органолептических свойств в пищевые продукты и потребляющему их человеку, включая индуцирование насыщения, улучшенные ощущения во рту, вязкость и структуру, аромат, и они действуют в качестве субстратов для других корригентов и ароматических соединений в мультиингредиентных композициях.

Описанные здесь способы предназначены воспроизводить некоторые или все из этих свойств в модифицированном молочном белке, устраняя необходимость в продукции животного молочного белка или обеспечивая альтернативу такому белку.

Таблица 1. Примеры белков молока или молочных белков, известных в области техники

Молочный белок	Источник	Тип	Идентификационный №	SEQ ID NO
α 1-казеин	Коровий	Белок	P02662	6
α 1-казеин	Коровий	ДНК (кодирующая последовательность (к.п.))	X00564	7
α 2-казеин	Коровий	Белок	P02663	8
α 2-казеин	Коровий	ДНК (к.п.)	M16644	9
A1 β -казеин	Коровий	Белок	P02666	10
A1 β -казеин	Коровий	ДНК (к.п.)	X06359	11
A2 β -казеин	Коровий	Белок	P02666	1
A2 β -казеин	Коровий	ДНК (к.п.)	M15132	5
к-казеин	Коровий	Белок	P02668	12
к-казеин	Коровий	ДНК (к.п.)	X00565	13
α 1-казеин	Козий	Белок	P18626	14
α 1-казеин	Козий	ДНК (к.п.)	X59836	15
α 2-казеин	Козий	Белок	P33049	16
α 2-казеин	Козий	ДНК (к.п.)	X65160	17
A2 β -казеин	Козий	Белок	P33048	18

A2 β -казеин	Козий	ДНК (к.п.)	AN001195	19
κ -казеин	Козий	Белок	P02670	20
κ -казеин	Козий	ДНК (к.п.)	D14373	21
α 1-казеин	Овечий	Белок	P04653	22
α 1-казеин	Овечий	ДНК (к.п.)	X03237	23
α 2-казеин	Овечий	Белок	P04654	24
α 2-казеин	Овечий	ДНК (к.п.)	X03238	25
β -казеин	Овечий	Белок	P11839	26
β -казеин	Овечий	ДНК (к.п.)	X16482	27
κ -казеин	Овечий	Белок	P02669	28
κ -казеин	Овечий	ДНК (к.п.)	X51822	29
α 1-казеин	Верблюжий	Белок	O97943	30
α 1-казеин	Верблюжий	ДНК (к.п.)	AJ012628	31
α 2-казеин	Верблюжий	Белок	O97944	32
α 2-казеин	Верблюжий	ДНК (к.п.)	AJ012629	33
β -казеин	Верблюжий	Белок	Q9TVD0	34
β -казеин	Верблюжий	ДНК (к.п.)	AJ012630	35
κ -казеин	Верблюжий	Белок	P79139	36
κ -казеин	Верблюжий	ДНК (к.п.)	Y10082	37

Источник немодифицированных молочных белков

Немодифицированные белки молока или молочные белки для применения в изобретении могут быть получены из любого подходящего источника.

В одном из воплощений немодифицированные белки молока или молочные белки для применения в изобретении могут быть получены из источника, выбранного из организмов овцы, оленя, верблюда, козы, человека и коровы.

В предпочтительном воплощении немодифицированные белки молока или молочные белки для применения в изобретении получены из организма коровы.

Фосфорилирование молочных белков

В нативных молочных белках фосфорилирование казеинов представляет собой важную посттрансляционную модификацию, происходящую после синтеза полипептидных цепей под действием белковых киназ. Сайты фосфорилирования Ser или Thr киназ коровы, распознают трипептидную последовательность Ser/Thr-X-Glu/SerP/Asp, где X представляет остаток любой аминокислоты, и P указывает на фосфорилирование (Fang *et al.*, J. Dairy Sci.

99:8168-8177). Эта посттрансляционная модификация позволяет казеинам взаимодействовать и связываться с фосфатом кальция с образованием казеиновых мицелл.

Коровьи киназы, вовлеченные в фосфорилирование, отсутствуют в растениях и других организмах, отличающихся от коров, таких как *E. coli* (Simons, G., van den Heuvel, W., Reynen, T., Frijters, A., Rutten, G., Slangen, C.J., Groenen, M., de Vos, W.M. and Siezen, R.J., 1993. *Overproduction of bovine β -casein in Escherichia coli and engineering of its main chymosin cleavage site. Protein Engineering, Design and Selection, 6(7), pp.763-770*). Кроме того, для процесса фосфорилирования киназами требуется АТФ (АТР) (аденозинтрифосфат), что, таким образом, является энергетически неэффективным, и может влиять на рост модифицированного организма.

Настоящее изобретение относится к данному аспекту путем замены Ser и/или Thr на Asp или Glu. Как Asp, так и Glu представляют собой отрицательно заряженные боковые цепи с рН выше 3,5, и обеспечивают сайты связывания для положительно заряженных ионов кальция. См. фиг. 2.

Сайты фосфорилирования

Настоящее изобретение охватывает замену потенциально фосфорилированных аминокислот на отрицательно заряженные аминокислоты.

Некоторые фосфорилированные аминокислоты в молочных белках подтверждены экспериментально. Они включают, например, Ser15, Ser17, Ser18, Ser19, и Ser35 в коровьем бета-казеине (Huppertz et al., 2018. *The caseins: Structure, stability, and functionality. In Proteins in food processing pp. 49-92*), как указано на фиг. 1. Дополнительные сайты фосфорилирования могут быть подтверждены в других молочных белках тем же самым путем. Альфа-S1-казеин фосфорилирован по Ser41, Ser45, Ser47, Ser64, Ser66, Ser67, Ser68, Ser75 и Ser115. Альфа-S2-казеин фосфорилирован по Ser8, Ser9, Ser10, Ser16, Ser56, Ser57, Ser58, Ser61, Ser129 и Ser131 (Huppertz, T., Fox, P.F. and Kelly, A.L., 2018. *The caseins: Structure, stability, and functionality. In Proteins in food processing pp. 49-92*). Существуют другие варианты фосфорилирования, основанные на отличающемся полиморфизме в казеинах.

Потенциально фосфорилированные аминокислоты также включают остатки Ser и Thr в консенсусной трипептидной последовательности Ser/Thr-X-Glu, которая легко может быть идентифицирована специалистом в данной области техники в последовательностях молочного белка.

Другие потенциальные сайты фосфорилирования могут быть идентифицированы с использованием алгоритмов предсказания фосфорилирования путем моделирования на компьютере, таких как алгоритм NetPhos algorithm <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

(Blom et al., 1999; Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology*, 294(5), pp.1351-1362.). Пример последнего приведен для коровьего бета-казеина в примерах в соответствии с настоящим изобретением и проиллюстрирован на фиг. 1.

Количество сайтов фосфорилирования, замененных на отрицательно заряженные аминокислоты.

В одном из воплощений по меньшей мере 1, предпочтительно по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3, предпочтительно по меньшей мере 4, предпочтительно по меньшей мере 5, предпочтительно по меньшей мере 6, предпочтительно по меньшей мере 7, предпочтительно по меньшей мере 8, предпочтительно по меньшей мере 9, предпочтительно по меньшей мере 10, предпочтительно по меньшей мере 11, предпочтительно по меньшей мере 12, предпочтительно по меньшей мере 13, предпочтительно по меньшей мере 14, предпочтительно по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 16, предпочтительно по меньшей мере 17, предпочтительно по меньшей мере 18, предпочтительно по меньшей мере 19, предпочтительно по меньшей мере 20 сайтов фосфорилирования или потенциальных сайтов фосфорилирования заменены на отрицательно заряженную(ые) аминокислоту/ы.

В еще одном воплощении не более чем 20, предпочтительно более чем 19, предпочтительно более чем 18, предпочтительно более чем 17, предпочтительно более чем 16, предпочтительно более чем 15, предпочтительно более чем 14, предпочтительно более чем 13, предпочтительно более чем 12, предпочтительно более чем 11, предпочтительно более чем 10, предпочтительно более чем 9, предпочтительно более чем 8, предпочтительно более чем 7, предпочтительно более чем 6, предпочтительно более чем 5, предпочтительно более чем 4, предпочтительно более чем 3, предпочтительно более чем 2, предпочтительно более чем 1 сайт(ы) фосфорилирования или потенциальный(е) сайт(ы) фосфорилирования заменен(ы) на отрицательно заряженную(ые) аминокислоту(ы).

Сходство модифицированного молочного белка с известными немодифицированными молочными белками

В одном из воплощений модифицированные молочные белки в соответствии с изобретением имеют по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, предпочтительно по меньшей мере 92%, предпочтительно по меньшей мере 93%, предпочтительно по меньшей мере 94%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 96%, предпочтительно по меньшей мере 97%, предпочтительно по меньшей мере 98%, предпочтительно по меньшей мере 99%

идентичность аминокислотной последовательности с известным молочным белком, включая без ограничения перечисленные в таблице 1 выше.

Идентичность полипептидной последовательности может быть определена следующим образом. Заявленную полипептидную последовательность сравнивают с полипептидной последовательностью-кандидатом, используя BLASTP (из набора программ BLAST, версия 2.2.5 [Nov 2002]) в bl2seq, который является общедоступным на интернет-сайте NCBI во Всемирной паутине по адресу <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>. Используются параметры по умолчанию bl2seq, за исключением того, что фильтрация областей низкой сложности должна быть отключена.

Идентичность полипептидной последовательности также может быть рассчитана по всей длине перекрытия между полинуклеотидной последовательностью-кандидатом и заявленной полинуклеотидной последовательностью с использованием программ глобального выравнивания последовательностей. EMBOSS-needle (доступна по <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) и GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. *Computer Applications in the Biosciences* 10, 227-235), как обсуждалось выше, также являются подходящими программами глобального выравнивания последовательностей для расчета идентичности полипептидных последовательностей.

Предпочтительный способ расчета % идентичности полипептидной последовательности основан на выравнивании последовательностей, сравниваемых с использованием Clustal X (Jeanmougin et al., 1998, *Trends Biochem. sci.* 23, 403-5.)

Свойства модифицированных молочных белков

Связывание кальция

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии способен связывать кальций.

Способность связывать кальций может быть измерена, например, путем пламенной фотометрии.

Способность модифицированного молочного белка в соответствии с изобретением связывать кальций может быть оценена при помощи способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, таких как, например, пламенная фотометрия, АЭС-ИСП (ICP-AES) (атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой), атомная абсорбционная спектроскопия, способ изотермической титрационной калориметрии (например, Luo et al 2020. Deciphering calcium-binding behaviors of casein phosphopeptides by experimental approaches and molecular simulation. *Food & Function*, 11(6), pp.5284-5292; Canabady-Rochelle, L.S. and Mellema, M., 2010. Physical–chemical comparison

of cow's milk proteins versus soy proteins in their calcium-binding capacities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 366(1-3), pp.110-112).

В некоторых воплощениях модифицированный молочный белок имеет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 55%, предпочтительно по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 65%, предпочтительно по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 100%, предпочтительно по меньшей мере 105%, предпочтительно по меньшей мере 110%, предпочтительно по меньшей мере 115%, предпочтительно по меньшей мере 120%, предпочтительно по меньшей мере 125% способности связывать кальций немодифицированным молочным белком.

В дополнительных воплощениях модифицированный молочный белок имеет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 55%, предпочтительно по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 65%, предпочтительно по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 100%, предпочтительно по меньшей мере 130%, предпочтительно по меньшей мере 135%, предпочтительно по меньшей мере 140%, предпочтительно по меньшей мере 145%, предпочтительно по меньшей мере 150%, предпочтительно по меньшей мере 155%, предпочтительно по меньшей мере 160%, предпочтительно по меньшей мере 165%, предпочтительно по меньшей мере 170%, предпочтительно по меньшей мере 175%, предпочтительно по меньшей мере 180%, предпочтительно по меньшей мере 185%, предпочтительно по меньшей мере 190%, предпочтительно по меньшей мере 195%, предпочтительно по меньшей мере 200% способности связывать кальций немодифицированным молочным белком, когда модифицированный молочный белок и немодифицированный молочный белок экспрессируются в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В предпочтительном воплощении гетерологичная система экспрессии представляет собой растительную систему экспрессии.

Усиленная способность образовывать мицеллы

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии, способен образовывать мицеллу.

Способность модифицированного молочного белка в соответствии с изобретением образовывать мицеллы можно оценить при помощи способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, динамическое рассеяние света, способы микроскопии (сканирующая электронная микроскопия) (например, Chu, B., Zhou, Z., Wu, G. and Farrell Jr, H.M., 1995. Laser light scattering of model casein solutions: effects of high temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, 170(1), pp.102-112; Dalgleish, D.G., Spagnuolo, P.A. and Goff, H.D., 2004. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14(12), pp.1025-1031).

В некоторых воплощениях модифицированный молочный белок имеет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 55%, предпочтительно по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 65%, предпочтительно по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 100%, предпочтительно по меньшей мере 105%, предпочтительно по меньшей мере 110%, предпочтительно по меньшей мере 115%, предпочтительно по меньшей мере 120%, предпочтительно по меньшей мере 125% мицеллообразующей способности немодифицированного молочного белка.

В дополнительных воплощениях модифицированный молочный белок имеет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 55%, предпочтительно по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 65%, предпочтительно по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 100%, предпочтительно по меньшей мере 130%, предпочтительно по меньшей мере 135%, предпочтительно по меньшей мере 140%, предпочтительно по меньшей мере 145%, предпочтительно по меньшей мере 150%, предпочтительно по меньшей мере 155%, предпочтительно по меньшей мере 160%, предпочтительно по меньшей мере 165%, предпочтительно по меньшей мере 170%, предпочтительно по меньшей мере 175%, предпочтительно по меньшей мере 180%, предпочтительно по меньшей мере 185%, предпочтительно по меньшей мере 190%, предпочтительно по меньшей мере 195%, предпочтительно по меньшей мере 200% мицеллообразующей способности немодифицированного молочного белка, когда модифицированный молочный белок и

немодифицированные молочный белок экспрессируются в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В предпочтительном воплощении гетерологичная система экспрессии представляет собой систему экспрессии, основанной на растительной клетке или растении.

Модифицированная pI

В одном из воплощений модифицированный молочный белок при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии, имеет измененную pI по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

Предпочтительно, модифицированный молочный белок имеет изоэлектрическую точку (pI), идентичную или похожую на немодифицированный молочный белок.

В одном из воплощений pI модифицированного молочного белка составляет в пределах +/-1,0, предпочтительно +/-0,9, предпочтительно +/-0,8, +/-0,7, предпочтительно +/-0,6, предпочтительно +/-0,5, предпочтительно +/-0,4, предпочтительно +/-0,3, предпочтительно +/-0,2, предпочтительно 0,1 единиц по сравнению с немодифицированным молочным белком.

В одном из воплощений модифицированный и немодифицированный молочный белок экспрессируются в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

В предпочтительном воплощении гетерологичная система экспрессии представляет собой систему экспрессии, основанную на растительной клетке или растении.

pI модифицированного молочного белка в соответствии с изобретением может быть оценена при помощи способов, хорошо известных специалистам в данной области техники (например, Righetti, P.G., 2000. Isoelectric focusing: theory, methodology and application. Elsevier; Righetti, P.G., 2004. Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing. Journal of chromatography A, 1037(1-2), pp.491-499).

Способы получения полинуклеотидов в соответствии с изобретением

Способы получения полинуклеотидов (которые могут быть использованы для экспрессии белков и аналогов в соответствии с изобретением) хорошо известны специалистам в данной области техники и включают применение способов клонирования и рекомбинантной ДНК. Эти способы могут включать модификацию существующего полинуклеотида, кодирующего молочный белок. В качестве альтернативы, полинуклеотид может быть синтезирован полностью при помощи способов, обычно используемых специалистами в данной области техники, и имеющихся в продаже в виде сервиса от многочисленных хорошо известных поставщиков (например, GeneArt, Thermo Fisher Scientific).

Полинуклеотиды в соответствии с изобретением, кодирующие модифицированные молочные белки в соответствии с изобретением, могут быть оптимизированы по кодам для того, чтобы напоминать использование кодонов клетки или организма, в котором экспрессируются модифицированные молочные белки. Кодоны могут быть оптимизированы с использованием известных инструментов (таких как www.genewiz.com). Последнее может приводить в результате к улучшенной экспрессии генов и увеличенной эффективности трансляции с учетом частоты кодонов в хозяине.

Способы получения конструкций и векторов

Генетические конструкции в соответствии с настоящим изобретением содержат одну или более чем одну полинуклеотидную последовательность в соответствии с изобретением и/или полинуклеотид, кодирующий полипептиды в соответствии с изобретением, и могут быть полезны для трансформации, например, бактериальных, грибковых организмов, организмов насекомых, млекопитающих или растительных организмов. Предполагается, что генетические конструкции в соответствии с изобретением включают определенные здесь экспрессионные конструкции.

Способы получения и использования генетических конструкций и векторов хорошо известны в области техники и в общем описаны в Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, 1987).

Способы получения клеток-хозяев, содержащих полинуклеотиды, конструкции или векторы

В изобретении предложена клетка-хозяин, которая содержит генетическую конструкцию или вектор в соответствии с изобретением.

Клетки-хозяева, содержащие генетические конструкции, такие как экспрессионные конструкции, в соответствии с изобретением полезны в способах, известных в области техники (например, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, 1987) для рекомбинантной продукции полипептидов в соответствии с изобретением. Такие способы могут включать культивирование клеток-хозяев в подходящей среде в условиях, подходящих для или способствующих экспрессии полипептида в соответствии с изобретением. Экспрессирующийся рекомбинантный полипептид, который возможно может быть секретирован в культуру, затем может быть выделен из среды, клеток-хозяев или культуральной среды при помощи способов, хорошо известных в данной области техники (например, Deutscher, Ed, 1990, *Methods in Enzymology*, Vol 182, *Guide to Protein Purification*).

Способы получения растительных клеток и растений, содержащих конструкции и векторы

В изобретении также предложены растительные клетки, которые содержат генетическую конструкцию в соответствии с изобретением, и растительные клетки, модифицированные таким образом, чтобы изменять экспрессию полинуклеотида или полипептида в соответствии с изобретением, или используются в способах в соответствии с изобретением. Растения, содержащие такие клетки, также образуют аспект в соответствии с изобретением.

Способы трансформации растительных клеток, растений и их фрагментов полипептидами описаны в Draper *et al.*, 1988, Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual, Blackwell Sci. Pub. Oxford, p. 365; Potrykus and Spangenburg, 1995, Gene Transfer to Plants. Springer-Verlag, Berlin.; и Gelvin *et al.*, 1993, Plant Molecular Biol. Manual. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. Dordrecht. Обзор трансгенных растений, включая способы трансформации, предложены в Galun and Breiman, 1997, Transgenic Plants. Imperial College Press, London.

Способы генетической манипуляции с растениями

Имеется ряд стратегий трансформации растений (например, Birch, 1997, Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol, 48, 297; Hellens *et al.*, 2000, Plant Mol Biol 42: 819-32; Hellens *et al.*, Plant Meth 1: 13). Например, могут быть разработаны стратегии для увеличения экспрессии полинуклеотида/полипептида в растительной клетке, органе и/или на конкретной стадии развития, на которой/когда он обычно экспрессируется, или для эктопической экспрессии полинуклеотида/полипептида в клетке, ткани, органе и/или на конкретной стадии развития, на которой/когда он обычно не экспрессируется. Экспрессируемый полинуклеотид/полипептид может быть получен из видов растений, которые могут быть трансформированы или могут быть получены из различных видов растений.

Генетические конструкции для экспрессии генов в трансгенных растениях как правило включают промоторы для стимулирования экспрессии одного или более чем одного клонированного полинуклеотида, терминатора и селективной маркерной последовательности для обнаружения присутствия генетической конструкции в трансформированном растении.

Промоторы, подходящие для использования в конструкциях в соответствии с данным изобретением, функциональны в клетке, ткани или органе однодольного растения или двудольного растения и включают промоторы, специфические для клетки, ткани и органа, промоторы, специфические для клеточного цикла, временные промоторы, индуцируемые промоторы, конститутивные промоторы, которые активны в большинстве

растительных тканей, и рекомбинантные промоторы. Выбор промотора будет зависеть от временной и пространственной экспрессии клонированного полинуклеотида, что является желательным. Промоторы могут представлять собой такие промоторы, которые обычно ассоциированы с представляющим интерес трансгеном, или промоторы, которые получены из генов других растений, вирусов и патогенных для растений бактерий и грибов. Специалисты в данной области техники без излишнего экспериментирования в состоянии выбрать промоторы, которые подходят для использования в модификации и модулировании характеристик растения с использованием генетических конструкций, содержащих полинуклеотидные последовательности в соответствии с изобретением. Примеры конститутивных промоторов растений включают промотор CaMV 35S, промотор нопалинсинтазы и промотор октопинсинтазы и промотор Ubi 1 из кукурузы. Растительные промоторы, которые активны в конкретных тканях, реагируют на внутренние сигналы развития или внешние абиотические или биотические стрессы, описаны в научной литературе. Примеры промоторов описаны, например, в WO 02/00894 и WO2011/053169, которые включены здесь путем ссылки.

Предпочтительные регуляторные последовательности (промоторы, сигнальные/транзитные пептиды и терминаторы) включают последовательности, ассоциированные с запасными белками семян. Подходящие запасные белки семян включают без ограничения глицинин (соя), вицилин, конвицилин, легумин (горох), круциферин, напин (канола), пататин (картофель).

В некоторых воплощениях используемые промоторы представляют собой предпочтительные промоторы семян. В одном из воплощений предпочтительный промотор семян выбран из перечисленных в таблице 2 ниже.

Таблица 2: Предпочтительные промоторы семян

Источник	Промотор	SEQ ID NO:
Brassica napus	Круциферин A	47
Phaseolus vulgaris	Фазеолин	48
Glycine max	Глицинин G1	49
Glycine max	Глицинин G4	50
Glycine max	Глицинин G2	51

Glycine max	Промотор α -субъединицы бета-52 конглицинина	

Экспрессионные конструкции в соответствии с изобретением также предпочтительно включают сигнальный или транзитный пептид, конденсированный с N-концом растительного молочного белка или аналогом для того, чтобы направлять его к органелле хранения (вакуоль для хранения, эндоплазматический ретикулум (ЭР (ER)), апопласт и т.п.). Сигнал удерживания по C-концу также может быть включен при нацеливании на некоторые из органелл для хранения.

Примеры терминаторов, которые обычно используются в генетических конструкциях для трансформации растений, включают, например, терминатор 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV), терминаторы нопалинсинтазы или октопинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens*, терминатор гена зеина *Zea mays*, терминатор аденозиндифосфат (АДФ (ADP))-глюкозопирофосфорилазы *Oryza sativa* и терминатор PI-II *Solanum tuberosum*.

Селектируемые маркеры, обычно используемые при трансформации растений, включают ген неомицина фототрансферазы II (NPT II), который придает устойчивость к канамицину, ген *aadA*, который придает устойчивость к спектиномицину и стрептомицину, ген фосфинотрицин ацетилтрансферазы (ген *bar*) для устойчивости к Ignite (AgrEvo) и Basta (Hoechst), и ген гигромицина фосфотрансферазы (*hpt*) для устойчивости к гигромицину.

Следующие типичные публикации, раскрывающие протоколы генетической трансформации, которые могут быть использованы для генетической трансформации следующих видов растений: рис (Alam *et al.*, 1999, Plant Cell Rep. 18, 572); яблоко (Yao *et al.*, 1995, Plant Cell Reports 14, 407-412); кукуруза (патенты США №№ 5177010 и 5981840); пшеница (Ortiz *et al.*, 1996, Plant Cell Rep. 15, 1996, 877); помидор (патент США № 5159135); картофель (Kumar *et al.*, 1996 Plant J. 9, 821); маниок (Li *et al.*, 1996 Nat. Biotechnology 14, 736); салат-латук (Michelmores *et al.*, 1987, Plant Cell Rep. 6, 439); табак (Horsch *et al.*, 1985, Science 227, 1229); хлопок (патенты США №№ 5 846 797 и 5004863); злаковые травы (патенты США №№ 5187073 и 6020539); мята перечная (Niu *et al.*, 1998, Plant Cell Rep. 17, 165); цитрусовые растения (Pena *et al.*, 1995, Plant Sci, 104, 183); тмин обыкновенный (Krens *et al.*, 1997, Plant Cell Rep, 17, 39); банан (патент США № 5792935); соя (патенты США №№ 5416011; 5569834; 5824877; 556304455 и 5968830); ананас (патент США № 5952543); тополь (патент США № 4795855); в целом однодольные растения (патенты США №№ 5591616 и 6037522); капуста декоративная (патенты США №№ 5188958; 5463174 и 5750871); зерновые растения (патент США № 6, 074, 877); груша (Matsuda *et al.*, 2005, Plant Cell Rep. 24(1):45-51); слива (Ramesh *et al.*, 2006 Plant Cell Rep. 25(8):821-8; Song and Sink 2005 Plant

Cell Rep. 2006 ;25(2):117-23; Gonzalez Padilla *et al.*, 2003 Plant Cell Rep.22(1):38-45); земляника (Oosumi *et al.*, 2006 Planta. 223(6):1219-30; Folta *et al.*, 2006 Planta Apr 14; PMID: 16614818), роза (Li *et al.*, 2003), малина (Graham *et al.*, 1995 Methods Mol Biol. 1995;44:129-33), помидор (Dan *et al.*, 2006, Plant Cell Reports V25:432-441), яблоко (Yao *et al.*, 1995, *Plant Cell Rep.* **14**, 407–412), канола (*Brassica napus* L.).(Cardoza and Stewart, 2006 Methods Mol Biol. 343:257-66), сафлор (Orlikowska *et al.*, 1995, Plant Cell Tissue and Organ Culture 40:85-91), райграсс (Altpeter *et al.*, 2004 Developments in Plant Breeding 11(7):255-250), рис (Christou *et al.*, 1991 Nature Biotech. 9:957-962), кукуруза (Wang *et al.*, 2009 In: Handbook of Maize pp. 609-639) и *Actinidia eriantha* (Wang *et al.*, 2006, Plant Cell Rep. 25,5: 425-31). В изобретении также рассматривается трансформация других видов. В научной литературе имеются подходящие способы и протоколы.

Полинуклеотиды в соответствии с изобретением и кодируемые ими растительные молочные белки и аналоги также для удобства могут быть экспрессированы и тестированы путем временной экспрессии в листьях трансгенных растений, таких как *Nicotian benthamiana*, с использованием инфильтрации агробактерий (Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. and Angenon, G. (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Sci. 122, 101-108).

Растительные клетки и растения

Растительные клетки и растения, в которых экспрессируются модифицированные молочные белки, могут быть получены из любых видов растений.

В одном из воплощений растительная клетка или растение происходят из видов голосеменных растений.

В еще одном воплощении растительная клетка или растение происходят из видов покрытосеменных растений.

В еще одном воплощении растительная клетка или растение происходят из видов двудольных растений.

В еще одном воплощении растительная клетка или растение происходят из видов однодольных растений.

В одном из воплощений растение или растительная клетка без ограничения выбрана из: сои, табака, гороха, нута, сои, люпина, стручковой фасоли, чечевицы или любых других бобовых растений, тапиоки, риса, ячменя, пшеницы, овса, кукурузы, помидора, картофеля, канолы, рапса масличных, подсолнечника, сафлора, кокоса, миндаля и конопли.

Очистка модифицированных молочных белков в соответствии с изобретением

После временной или стабильной трансформации растительных клеток или растений экспрессированные модифицированные молочные белки в соответствии с

изобретением могут быть очищены с использованием одного или более чем одного способа, такого как без ограничения способы мицеллообразования или щелочная экстракция/изоэлектрическое осаждение. Используемый способ выделения будет выбран в зависимости от пригодности каждого способа для источника растительного белка и от того, каким образом способы экстракции могут влиять на функциональные свойства продуцируемых белков. При выборе способа выделения белка, который будет использоваться, должны быть приняты во внимание соображения растворимости, рН, способности связывать воду, температуры и структурной целостности, вместе с окончательным желаемым использованием модифицированного молочного белка.

После экстракции и выделения белка белки могут быть очищены с использованием избирательных способов осаждения, центрифугирования и/или фильтрования.

Применение модифицированных молочных белков в соответствии с изобретением в пищевых продуктах и напитках

Впоследствии выделенные модифицированные молочные белки могут быть использованы в качестве ингредиентов в пищевых продуктах и напитках, обладающих одной или многими функциональными характеристиками, присущими натуральному молоку и молочным белкам. Такие продукты могут включать без ограничения молоко, масло, пахту, сыр, сливки, мороженое, молочную сыворотку, казеин, йогурт, сухое молоко, смеси для младенцев или молочные продукты для домашних питомцев и животных.

Полное раскрытие всех заявок на изобретения, патентов и публикаций заявок на изобретения, приведенных выше и ниже, если таковые имеются, включено здесь путем ссылки.

Когда в предшествующем описании изобретения делались ссылки на целые числа или компоненты, имеющие их известные эквиваленты, эти целые числа включены здесь таким образом, как если бы они были изложены индивидуально.

Следует отметить, что различные изменения и модификации раскрытых здесь предпочтительных в настоящее время воплощений будут понятны специалистам в данной области техники. Такие изменения и модификации могут быть осуществлены, не отступая от сущности и объема изобретения и, не уменьшая его сопутствующие преимущества. Таким образом, предполагается, что такие изменения и модификации будут включены в настоящее изобретение.

В данном описании изобретения, когда ссылаются на описания патентов, другие внешние документы или другие источники информации, тогда это осуществляют, как правило, с целью обеспечения контекста для обсуждения особенностей изобретения. Если специально не указано иное, то ссылку на такие внешние документы не следует

рассматривать как признание того, что такие документы или такие источники информации в любой юрисдикции представляют собой предшествующий уровень техники, или образуют часть общих знаний в данной области техники.

Используемый в данном описании изобретения термин “содержащий” означает “состоящий по меньшей мере частично из”. При интерпретации каждого утверждения в данном описании, включающего термин “содержащий”, могут также присутствовать признаки, отличные от этого или тех, которые предваряются этим термином. Родственные термины, такие как “содержать и “содержит”, должны быть интерпретированы тем же самым образом. В некоторых воплощениях термин “содержащий” (и родственные термины, такие как “содержат” и “содержит”) может быть заменен на “состоящий из” (и родственные термины “состоят” и “состоит”).

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 демонстрирует последовательность молочного белка коровьего бета-казеина (A2). Экспериментально проверенные фосфосерины выделены жирным шрифтом. Другие потенциальные сайты фосфорилирования, выявленные в результате анализа заявителем, выделены путем подчеркивания.

Фиг. 2 демонстрирует сравнение между фосфосерином (серин, как правило, фосфорилирован в коровьих молочных белках, как здесь обсуждается), аспарагиновой кислотой и глутаминовой кислотой).

Фиг. 3 схематично демонстрирует представленную структуру конструкций, используемых для экспрессии модифицированных молочных белков в соответствии с изобретением в растениях. Дополнительная подробная информация приведена в примере 2.

Фиг. 4(A) демонстрирует типичные образцы листьев, трансформированные бета-казеинами, слитыми с вакуолярным сигнальным пептидом; дорожка 1 - положительный контроль (бета-казеин 0,5 мкг), дорожка 2-4: дикий тип (ДТ (WT)); дорожка M: белковый стандарт; дорожка 5-9: экстракт из листьев, трансформированных конструкциями, соответственно, 1, 3, 5 и 7. Полосы, соответствующие бета-казеинам, отмечены стрелкой.

Фиг. 4 (B) демонстрирует типичные образцы листьев, трансформированные бета-казеинами, слитыми с сигнальным пептидом апопласта с сайтом удерживания в ЭР по С-концу белков; дорожка 1 - положительный контроль (бета-казеин 0,5 мкг), дорожка 2-3: экстракт из листьев, трансформированных конструкциями 2 и 4; дорожка M: белковый стандарт; дорожка 4-6: ДТ; дорожка 7: экстракт из листьев, трансформированных конструкцией 6; дорожка 8-9: экстракты из листьев, трансформированных конструкцией 8. Полосы, соответствующие бета-казеинам, отмечены стрелкой.

Фиг. 5 демонстрирует анализ при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия ЭФПААГ-ДсNa (SDS-PAGE) (окрашивание кумасси) конструкции белка β -казеина (BC1, BC2, BC3, BC4 и BC5) и положительного контроля (сигма β -казеин-1 мкг). Черная стрелка - ожидаемый размер бета-казеина. Белая стрелка - продукты деградации казеина.

Фиг.6 демонстрирует круговой дихроизм (КД (CD)) [мГрад] как функцию длины волны для КД в дальнем УФ диапазоне для различных β -казеинов при 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95°C. А. положительный контроль - белок бета-казеин, полученный в Sigma (C6905); В. нативный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC1); С. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC2); D. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC3). Е. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC4). F. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC5).

Фиг. 7 демонстрирует КД [мГрад] как функцию длины волны для КД в дальнем УФ диапазоне для различных β -казеинов при 5°C, 95°C и 5°C после инкубации при 95°C. А. положительный контроль белок бета-казеин, полученный в Sigma (C6905); В. нативный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC1); С. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC2); D. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC3). Е. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC4). F. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC5).

Фиг.8 демонстрирует общий белок в 100 мкл как функцию рН, измеренной для аналогов β -казеина. Подгонка представлена серыми и черными линиями, соответственно, для супернатанта и осадков. А. положительный контроль белок бета-казеин, полученный в Sigma (C6905); В. Нативный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC1); С. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC2); D. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC3). Е. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC4). F. модифицированный бета-казеин, экспрессируемый в *E. coli* (BC5).

Примеры

Пример 1. Конструирование модифицированных белков в соответствии с изобретением

Введение

Последовательность молочного белка коровьего бета-казеина (A2) продемонстрирована на фиг. 1.

Коровий бета-казеин имеет экспериментально подтвержденные сайты фосфорилирования по Ser15, Ser17, Ser18, Ser19 и Ser35 (как обозначено жирным шрифтом

на фиг. 1). Из них первые четыре образуют центр фосфорилирования (Huppertz et al., 2018; The caseins: Structure, stability, and functionality. In *Proteins in food processing* pp. 49-92).

Отрицательные заряды, полученные от фосфосеринов, играют важную функциональную роль для образования казеиновых мицелл. Казеины удерживаются вместе путем комбинирования гидрофобных взаимодействий между белковыми молекулами и электростатических взаимодействий между богатыми фосфосерином областями α - и β -казеинов и кальцием с образованием кальций-фосфатных связей. Кроме того, богатые фосфосерином остатки играют фундаментальную роль в обеспечении правильной функции казеинов, что неразрывно связано со стабилизацией эмульсии β -казеинами.

Тем не менее, фосфорилирование казеина не осуществляется в трансгенных растениях (и другие системах, отличающихся от коровьих), экспрессирующих рекомбинантный бета-казеин (Philip et al., 2001, Processing and localization of bovine β -casein expressed in transgenic soybean seeds under control of a soybean lectin expression cassette. *Plant Science*, 161(2), pp.323-335).

Изобретение заявителя охватывает замену фосфорилированных аминокислот на отрицательно заряженные аминокислоты с использованием способов конструирования белка.

Фиг. 2 демонстрирует сравнение между фосфосерином (серин, как правило, фосфорилирован в коровьих молочных белках, как обсуждается выше), аспарагиновой кислотой и глутаминовой кислотой).

Отрицательно заряженные аминокислоты аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота имеют способность связывать положительно заряженный кальций. Такое связывание кальция представляет собой ключевое требование функции молочного белка.

Таким образом, в изобретении предложены модифицированные молочные белки, которые при экспрессии в гетерологичных системах экспрессии, включают отрицательно заряженные аминокислоты вместо фосфорилированных аминокислот, обеспечивая рекомбинантно экспрессируемые модифицированные молочные белки, которые воспроизводят функциональность эндогенно экспрессируемых молочных белков.

Для выявления большего количества потенциальных сайтов фосфорилирования дополнительно к экспериментально известным сайтам фосфосерина, компьютерное прогнозирование фосфорилирования осуществлено с использованием алгоритма NetPhos <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> (Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S., 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology*, 294(5), pp.1351-1362). Заявитель применил этот подход к зрелому пептиду бета-казеину (A2) (UniProt, идентификационный № P02666 -SEQ ID NO: 1).

Были идентифицированы дополнительные потенциальные сайты фосфорилирования, как указано при помощи подчеркнутого шрифта на фиг. 1.

Конструирование модифицированного молочного белка

Сконструированы несколько отличающихся модифицированных последовательностей белка бета-казеина, в которых один или более чем один сайт фосфорилирования или потенциальный сайт фосфорилирования заменен на отрицательно заряженные аминокислоты для того, чтобы привести к существенным функциям, оцениваемым в пищевой промышленности и производстве напитков, и, в частности:

- Имитация фосфорилирования до различных уровней для того, чтобы обеспечить различные свойства связывания кальция и образования мицелл при поддержании природной изоэлектрической точки, и
 - Модификация изоэлектрической точки (например) для:
 - уменьшения потребности в ферментах во время производства сыра,
 - обеспечения свертывания казеинов и отделения от белков молочной сыворотки во время приготовления творога,
 - облегчения производства молочных напитков при более низком pH, и
 - облегчения свертывания при более высоком pH с образованием полутвердых гелеобразных молочных альтернативных продуктов.

Модифицированные последовательности продемонстрированы в таблице 3 ниже, указывая на: произведенные модификации, прогнозируемую изоэлектрическую точку и обоснование в рамках конструирования.

Изоэлектрическую точку белка прогнозировали при помощи компьютерного моделирования с использованием интернет-сайта IPC2.0: <http://www.ipc2-isoelectric-point.org/>. (Kozlowski, L.P., 2021. IPC 2,0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants. Nucleic Acids Research).

Таблица 3: Конструирование модифицированного молочного белка

SEQ ID NO:	Последовательность белка	Замены аминокислот по сравнению с природным бета-казеином	Рассчитанная изоэлектрическая точка	Обоснование
1	RELEELNVPGEIVESLSSEESI TRINKKIEKFQSEEQQTEDEL QDKINPFAQTQSLVYPPFGPI NSLPQNIPLTQTPVVVPPFLQ PEVMGVSKVKEAMAPKHKE MPFPKYVVEPFTESQSLTLTD VENLHLPLLLQSWMHQPHQ		5,11	Природный бета-казеин

	PLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVL PVPQKAVPYPQRDMPIQAFLL YQEPVLPVVRGPFPIIV			
2	RELEELNVPGEIVESLDSDEES ITRINKKIEKFQDEEQQTETE LQDKIHFAQTQSLVYPPFGPI PNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFL QPEVMGVSKVKEAMAPKHK EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTD VENLHLPLLLQSWMHQPHQ PLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVL PVPQKAVPYPQRDMPIQAFLL YQEPVLPVVRGPFPIIV	S17D, S19D, S35D	4,88	Замена 3 из 5 экспериментально подтвержденных остатков S на остатки D для того, чтобы дать возможность для связывания кальция и образованию мицелл при экспрессии в гетерологичных системах
3	RELEELNVPGEIVEDLEDEEES ITRINKKIEKFQDEEQQTETE LQDKIHFAQTQSLVYPPFGPI PNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFL QPEVMGVSKVKEAMAPKHK EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTD VENLHLPLLLQSWMHQPHQ PLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVL PVPQKAVPYPQRDMPIQAFLL YQEPVLPVVRGPFPIIV	S15D, S17E, S18D, S19E, S35D	4,8	Замена всех 5 экспериментально подтвержденных остатков S на остатки D или E для того, чтобы дать возможность для связывания кальция и образованию мицелл при экспрессии в гетерологичных системах
4	RELEELNVPGEIVEDLDDDEE SITRINKKIEKFQDEEQQTED ELQDKIHFAQTQSLVYPPFGP IPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFL QPEVMGVSKVKEAMAPKHK EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTD VENLHLPLLLQSWMHQPHQ PLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVL PVPQKAVPYPQRDMPIQAFLL YQEPVLPVVRGPFPIIV	S15D, S17D, S18D, S19D, S35D	4,77	Замена всех 5 экспериментально подтвержденных остатков S на остатки D для того, чтобы обеспечить возможность связывания кальция и образования мицелл при экспрессии в гетерологичных системах, и для уменьшения

					изоэлектрической точки
38	RELEELNVPGEIVEDLEDEEES ITRINKKIEKFQDEEQQDEDE LQDKIHFAQDQSLVYPPFGPI PNSLPQNIPLTQTPVVVPPFL QPEVMGVSKVKEAMAPKHK EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTD VENLHLPLLLQSWMHQPHQ PLPPDVMFPPQSVLELDQEKV LPVPQKAVPYPQRDMPIQAF LYQEPVLGPVRGPFPIIV	S15D, S17E, S18D, S19E, S35D, T41D, T55D, T154D, S164E, S166D, S168E	4,57		Замена всех 5 экспериментально подтвержденных остатков S на остатки D/E и дополнительные предсказанные фосфорилированные сайты S/T, замененные на D/E, для того, чтобы дать возможность для связывания кальция при экспрессии в гетерологичных системах, и для уменьшения изоэлектрической точки
41	RPKHPIKHQGLPQEVNENLL RFFVAPFPEVFGKEKVNELSK DIGSESTEDQAMEDIKQM EAESISSEEIVPNSVEQKHIQK EDVPSERYLGYLEQLLRLKKY KVPQLEIVPNSAEERL HSMKEGIHAQQKEPMIGVNQ ELAYFYPELFRQFYQLDAYPS GAWYYVPLGTQYTDAPSF DIPNPIGSENSEKTTMPLW		4,88		Коровий (Bos taurus) α 1-казеин: природный
42	RPKHPIKHQGLPQEVNENLL RFFVAPFPEVFGKEKVNELSK DIGDEDTEDQAMEDIKQMEA ESIDESEEIVPNSVEQKHIQKE DVPSERYLGYLEQLLRLKKY KVPQLEIVPNSAEERLHSMKE GIHAQQKEPMIGVNQELAYFY PELFRQFYQLDAYPSGAWYY VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGS ENSEKTTMPLW	S46D, S48D, S64D, S66D, S67E	4,70		Коровий (Bos Taurus) α 1-казеин: частичная замена остатков фосфорилирования в двух основных центрах фосфорилирования
43	RPKHPIKHQGLPQEVNENLL RFFVAPFPEVFGKEKVNELDK DIGDEDTEDQAMEDIKQMEA EDIDEDEEIVPNSVEQKHIQKE DVPSERYLGYLEQLLRLKKY KVPQLEIVPNSAEERLHSMKE	S41D, S46D, S48D, S64D, S66D, S67E, S68D	4,58		Коровий (Bos Taurus) α 1-казеин: все остатки фосфорилирования в двух основных

	GIHAQQKEPMIGVNLQELAYFY PELFRQFYQLDAYPSGAWYY VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGS ENSEKTTMPLW				центрах фосфорилировани я, модифицированн ые до D/E
44	RPKHPIKHQGLPQEVNENLL RFFVAPFPEVFGKEKVNELDK DIGDEDEDQAMEDIKQMEA EDIDEDEEIVPNDVEQKHIQKE DVPSERYLGYLEQLRLKKY KVPQLEIVPNDAEERLHSMKE GIHAQQKEPMIGVNLQELAYFY PELFRQFYQLDAYPSGAWYY VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGS ENSEKTTMPLW	S41D, S48D, S66D, S68D, S115D	S46D, S64D, S67E, S75D,	4,51	Коровий (Bos Taurus) α 1-казеин – все остатки фосфорилировани я, модифицированн ые до D/E
45	QEQNQEQPIRCEKDERFFSDKI AKYIPIQYVLSRYPSYGLNYY QQKPVALINNQLPYPYAKP AAVRSPAQLQWQVLSNTVP AKSCQAQPTTMARHPHPLSF MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAS GEPTSTPTIEAVESTVATLEAS PEVIESPPEINTVQVTSTAV			5,86	Коровий (Bos Taurus) нативный каппа-казеин
46	QEQNQEQPIRCEKDERFFSDKI AKYIPIQYVLSRYPSYGLNYY QQKPVALINNQLPYPYAKP AAVRSPAQLQWQVLSNTVP AKSCQAQPTTMARHPHPLSF MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAD GEPTSTPTIEAVESTVATLEAD PEVIESPPEINTVQVTDATV	S127D, S166D	S149D,	5,15	Коровий (Bos Taurus) каппа- казеин Замена 3 остатков фосфорилировани я на другие остатки D/E

Пример 2 - Временная экспрессия модифицированных молочных белков в растениях табаке

Все кодирующие последовательности в этой работе были оптимизированы для экспрессии в желаемом растении (например, табаке, сое, канола, овсе и т.п.). Оптимизированные последовательности генов химически синтезировали с желаемыми сигнальными пептидами, промоторами и терминаторами для создания “экспрессионной кассеты”.

Полноразмерные экспрессионные кассеты (промотор, кодирующая область и терминатор) клонировали в множественном сайте клонирования (HindIII) вектора для трансформации растения pCAMBIA0390 (Hajdukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P., 1994. *The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant molecular biology*, 25(6), pp.989-994).

Все белковые конструкции были слиты для транзита пептида, HIS-меткой и сайтом энтерокиназы (DDDDK) от N-конца белка.

Для идентификации сигнального пептида, наиболее эффективного для хранения/накопления бета-казеина, конструкции сначала временно экспрессировали в растениях *N. tabacum* cv. Samsun. Два транзитных пептида тестировали в конъюгации с белковыми:

1) Ген вакуолярной сигнальной последовательности ячменя для предшественника тиолпротеазы алеураина (Uniprot идентификационный № P05167) MAHARVLLALAVLATAAVAVASSSSFADSNPIRPVTDRAASTLAQL (SEQ ID NO:39).

2) Апопластическая сигнальная последовательность апопласта *Arabidopsis thaliana* эндо-1,4-бета-глюканазы (Uniprot идентификационный № Q9CAC1) MARKSLIFPVILLA VLLFSPPIYS (SEQ ID NO:40). Сайт удерживания в ЭР (KDEL) сливали с С-концом сконструированных белков.

В общей сложности было синтезировано восемь бинарных векторов, отличающихся по конструкции белка бета-казеина и сигнального пептида (смотри фиг. 3 в отношении схематически представленной структуры на таблицу 4 в отношении перечня конструкций).

Таблица 4: Перечень конструкций бета-казеина для временной экспрессии

Конструкция №	Сигнальный пептид	Конструкция белка
1	Вакуоль	SEQ ID NO: 1
2	Апопласт+ сайт удерживания в ЭР	SEQ ID NO: 1
3	Вакуоль	SEQ ID NO: 2
4	Апопласт+ сайт удерживания в ЭР	SEQ ID NO: 2
5	Вакуоль	SEQ ID NO: 3
6	Апопласт+ сайт удерживания в ЭР	SEQ ID NO: 3
7	Вакуоль	SEQ ID NO: 4
8	Апопласт+ сайт удерживания в ЭР	SEQ ID NO: 4

Бинарные векторы трансформировали в *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Растения *N. tabacum* cv. Samsun выращивали в теплице в течение 7 недель. Затем листья собирали и шприцем инфильтрировали различными *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, каждый из которых был трансформирован одним из восьми бинарных векторов.

Экспрессии различных конструкций белка бета-казеина проверяли через 5 суток после инокуляции с помощью вестерн-иммуоблоттинга.

Кратко, свежие листья измельчали с помощью буфера для экстракции (50 mM Tris HCl pH = 7,5, 50 mM NaCl). После центрифугирования супернатант собирали, нагревали до 80°C и инкубировали с гранулами Ni-NTA. Элюирование из гранул осуществляли с использованием 250 mM имидазола в буфере для экстракции. Выделенные белки осаждали с использованием ацетона и наносили в ЭФПААГ-ДсNa. Бета-казеин обнаруживали с использованием антител против бета-казеина (кроличье поликлональное антитела против казеина ab166596 и козье антитело против кроличьего IgG H&L (HRP) ab205718, Abcam).

Фиг. 4(А) демонстрирует типичные образцы листьев, трансформированные бета-казеинами, слитыми с вакуолярным сигнальным пептидом; дорожка 1 - положительный контроль (бета-казеин 0,5 мкг), дорожка 2-4: дикий тип (ДТ (WT)); дорожка М: белковый стандарт; дорожка 5-9: экстракт из листьев, трансформированных конструкциями, соответственно, 1, 3, 5 и 7. Полосы, соответствующие бета-казеинам, отмечены стрелкой.

Фиг. 4 (В) демонстрирует типичные образцы листьев, трансформированные бета-казеинами, слитыми с сигнальным пептидом апопласта с сайтом удерживания в ЭР по С-концу белков; дорожка 1 - положительный контроль (бета-казеин 0,5 мкг), дорожка 2-3: экстракт из листьев, трансформированных конструкциями 2 и 4; дорожка М: белковый стандарт; дорожка 4-6: ДТ; дорожка 7: экстракт из листьев, трансформированных конструкцией 6; дорожка 8-9: экстракты из листьев, трансформированных конструкцией 8. Полосы, соответствующие бета-казеинам, отмечены стрелкой.

Бета-казеины с вакуолярным сигнальным пептидом приводили к низкой экспрессии (смотри фиг. 4А). Значительно более высокие уровни бета-казеинов накапливались, когда казеин был нацелен против ЭР (смотри фиг. 4В).

Пример 3 Определение характеристик модифицированных белков бета-казеинов

Трансформация в *E. coli*

Для определения характеристики различных конструкций белка бета-казеина, авторы изобретения клонировали гены, кодирующие различные бета-казеины, перечисленные в таблице 1, между сайтами NcoI и XhoI вектора pET28a (+), добавляя N-концевую гекса-гистидиновую метку. В общей сложности были получены 5 векторов и трансформированы в штамм *E. coli* BL21 (DE3). Трансформированные BL21 (DE3) инкубировали при 37°C с образованием единичных колоний. Одна из выращенных единичных колоний была выбрана для выращивания в течение ночи в 10 мл среды Луриа-Бертани (ЛБ (LB)), содержащей 50 мкг/мл канамицина при 37°C. 9,5 мл стартовой культуры

выращивали в 0,5 л среды ЛБ (в контейнере объемом 2 л), дополненной 50 мкг/мл канамицина, до достижения ОП600 0,5-0,6. Синтез белка индуцировали 0,4 мМ β -d-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ (IPTG)) в течение 2 ч при 37°C. Образцы центрифугировали при 4°C при 8000 об./мин в течение 10 мин, осадки хранили при -80°C. Бактериальные клетки были названы BC1, BC2, BC3, BC4 и BC5 на основе последовательности бета-казеина (SEQ ID NO 1-4 и 42, соответственно).

Выделение и обнаружение бета-казеина

Бактериальные клетки ресуспендировали (BC1, BC2, BC3, BC4 и BC5) в 40 мл охлажденного лизирующего буфера (50 мМ Трис pH 7,5, 1% Tween, 2 мМ бета-меркаптоэтанол, ингибитор протеазы (AB-ab270055-10, Abcam). Затем клетки разрушали с использованием Sonicator (Sonicos vibra cell, Labotal) и центрифугировали в течение 20 минут при 4°C, 12000 об./мин. Супернатант нагревали в течение 30 мин при 80°C и снова центрифугировали в течение 20 мин при 12000 об./мин, затем pH супернатанта доводили до pH=5 с использованием HCl. Осадки ресуспендировали с 10 мл 50 мМ Трис HCl с pH 7,5. Ресуспендированные осадки наносили на колонку Ni-NTA (Sephagrose Ni-NTA 4 мл) и отделяли с использованием 250 мМ имидазола. Образцы несвязавшихся, промытых и отличающихся фракций наносили в ЭФПААГ-ДсNa. Белки окрашивали с использованием красителя Кумасси синего (фиг. 5). Замена серинов на аспартат и глутамат оказывала влияние на стабильность белка: BC2, который содержит трехточечные замены серина на аспартат, ведет себя как природный казеин (BC1), в то же время при пяти заменах аминокислот серина на аспартат или аспартат и глутамат (BC3 и BC4) была более высокая пропорция деградированного белка, чем у природного бета-казеина. Интересно то, что BC5, который содержал модификации 11 аминокислот, продемонстрировал самую высокую стабильность белка.

Термостабильность и вторичная структура рекомбинантных бета-казеинов

Исследовали изменение кругового дихроизма (миллиградусы) в зависимости от длины волны в дальнем УФ диапазоне для β -казеина при десяти различных температурах. Эксперименты КД в дальнем УФ диапазоне проводили с 17-20 мкМ (0,4-0,5 мг/мл) β -казеина в 50 мМ Tris-HCl, pH=7,5, 0,1% Tween 20, 2 мМ β ME. Последовательные измерения в дальнем УФ диапазоне (190-260 нм) проводили с перекрывающимися образцами при 5-95°C с интервалами 10°C. Для всех протестированных конструкций белка бета-казеина авторы изобретения обнаружили сдвиг вверх при 200 нм и сдвиг вниз при 210-230 нм при повышенных температурах (фиг. 6). Этот результат предполагает увеличение α -спиральных структур при нагревании белка. Аналогичное сохранение протяженных структур и при высоких температурах ранее обнаружили для β -казеина Graham et al. (1984).

В другой серии экспериментов исследовали структурное изменение и восстановление после нагревания до 95°C и обратного охлаждения до 5°C. Все пять рекомбинантных аналогов β-казеина и коровьего бета-казеина стабильны при 95°C и поддерживают свою структуру после нагревания и охлаждения (фиг. 7). В целом, хотя аминокислотный состав белков казеинов был широко изменен, замены остатков серина и треонина на аспарат и глутамат не изменяли термическое поведение белка.

Введенные отрицательно заряженные аминокислоты уменьшают осаждение бета-казеина вследствие рН

Оценивали осаждение β-казеина при различных значениях рН. Корректирование буферов осуществляли с использованием концентрированных растворов 0,1 М моногидрата лимонной кислоты и 0,2 М Na₂HPO₄. Образцы 2,5 мкг шести рекомбинантных аналогов β-казеина и коровьего бета-казеина в 100 мкл готовили путем разбавления концентрированных растворов 1 мкг/мкл в бидистиллированной воде (БДВ (DDW)) в различных буферах. Растворы инкубировали в течение 30-60 мин и центрифугировали при 12000 об./мин в течение 20 мин для разделения растворимых и нерастворимых фракций.

Для определения общего количества белка проводили анализ по Брэдфорду (поглощение по Брэдфорду при 595 нм измеряли с помощью планшетного ридера Synergy H1-Biotek). Измеряли образцы каждого супернатанта и осадки каждого белка в трех параллелях при различных значениях рН, и количество белка рассчитывали с использованием калибровочной кривой для коровьего сывороточного альбумина (БСА (BSA)) (фиг. 8). Данные подгоняли к нормальному распределению (Уравн. 1) с использованием программного обеспечения “Origin”. Представлены результаты подгонки (таблица 5).

$$\text{Уравн. 1: } y = y_0 + Ae^{-\frac{(x-x_c)^2}{2w^2}}$$

y_0 -Смещение; A -Амплитуда; x_c -центр; w -ширина

BC3 и BC4 не осаждались ни при каком рН, по-видимому, из-за относительно высоких протеолитических примесей в белковых образцах. Природный бета-казеин (BC1) осаждался при самом высоком рН (4,44), в то время как все модифицированные белки (BC 2 и 5) осаждались при более низком рН (4,25-4,28).

Таблица 5: Точки осаждения аналогов бета-казеина вследствие рН

Белок	рН для осаждения
BC1-контроль	4,44 ± 0,06
BC2	4,28 ± 0,01
BC5	4,25 ± 0,02

Усиленное связывание кальция модифицированными молочными белками

Для измерения связывания кальция с бета-казеинами использовали способ изотермической титрационной калориметрии (ИТК (ИТС)). Различные белки казеины инкубировали с 10 мМ CaCl₂ или β-трикальций фосфате в течение 1 часа при комнатной температуре. После инкубации белки подвергали диализу в течение ночи (буфер для диализа: 50 мМ Tris HCl с pH=7,5, 0,1% Tween-20, 2 мМ бета-меркаптоэтанол, коктейль ингибиторов протеаз; образец: объемное соотношение буфера для диализа по меньшей мере 1:500). Бета-казеины титровали с использованием буфера для диализа + этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТК (EGTA)) (0,5 мМ титрование ЭГТК в 25 мкМ β-казеине из различных источников). Измерения осуществляли с помощью MicroCal PEAQ-ITC.

Кривые калориметрического титрования продемонстрировали незначительное, если вообще имеющееся, выделение тепла или потребление тепла для реакции между BC1 (природный бета-казеин) и CaCl₂. BC3 и BC5 потребляли тепло при реакции с CaCl₂, указывая на эндотермическую связывание Ca²⁺ с модифицированными бета-казеинами.

Пример 4 - Самоассоциация и образование мицелл модифицированными молочными белками

Могут быть определены свойства самоассоциации рекомбинантных аналогов β-казеина, коровьего бета-казеина и дефосфорилированного бета-казеина. Как правило, самоассоциация β-казеина относится к процессу, при котором мономеры β-казеина спонтанно образуют мицеллы путем баланса гидрофобных и электростатических взаимодействий. Динамическое светорассеяние (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, оборудованный держателем ячейки малого объема с контролем температуры) может быть использовано для контроля изменений размера частиц, что является важным показателем агрегации белка (Crowley et al., 2019).

Известно, что на самоассоциацию β-казеина влияет концентрация белка, pH и температура или присутствие кальция (Li et al., 2019). Можно определить то, каким образом рекомбинантные модифицированные β-казеины подвергаются самоассоциации в диапазоне концентраций белка, температуры и концентраций ионов кальция. Можно ожидать то, что введение отрицательных зарядов остатками аспартата и глутамата увеличит связывание кальция, как указано в предыдущем примере, и, таким образом, будет способствовать агрегации бета-казеина в присутствии кальция. Критическая концентрация мицелл (ККМ (СМС)) модифицированных белков β-казеина, коровьего бета-казеина и дефосфорилированного бета-казеина может быть определена при помощи флуоресцентной спектрофотометрии с использованием пирена в качестве флуоресцентного зонда, как было

описано недавно (Song et al, 2023). ККМ определяют как концентрацию белка, выше которой образуются небольшие агрегаты. Отношение интенсивности (I1/I3) первого и третьего вибронного пика в спектре эмиссии пирена изменяется в зависимости от гидрофобности окружающей среды, на которую влияет агрегация β -казеина. Когда β -казеин представляет собой мономер, тогда пирен подвергается воздействию водной окружающей среды раствора β -CN, и I1/I3 является высоким. Тем не менее, пирен входит в гидрофобный микрорегион агрегатов из водной фазы, когда образуются агрегаты, и, таким образом, I1/I3 значительно уменьшается. Концентрация β -CN, соответствующая этому изменению, представляет собой величину ККМ. Как правило, чем ниже величина ККМ белка, тем легче будет агрегировать белок (Li et al., 2019). Также будет определено влияние температуры и добавления кальция на ККМ. Полученные знания позволят разрабатывать белковые агрегаты/мицеллы из рекомбинантных аналогов β -казеина, имеющие различные размеры частиц и стабильность.

Пример 5 - Получение молока без компонентов животного происхождения с использованием модифицированных молочных белков

Свойства самоассоциации и эмульгирования модифицированных бета-казеинов могут быть использованы для получения молока без компонентов животного происхождения и имитации аромата и вкусовых ощущений коровьего молока. В принципе, ожидается, что модифицированные рекомбинантные бета-казеины, обладающие способностью связывать кальций, похожей на природный бета-казеин, будут самоассоциироваться в агрегаты при критической концентрации мицелл (ККМ (СМС)), концентрации кальция, рН и температуре, определенных в примере 4. Путем выбора условий самоассоциации модифицированных бета-казеинов при рН \sim 6,7 (рН молока) возможно обеспечить образование мицеллярных суспензий/агрегатов, к которым могут быть добавлены другие ингредиенты, такие как сахара, минеральные вещества и капли жира.

Превосходные эмульгирующие свойства коровьего бета-казеина хорошо признано и относятся к количеству масла, которое может быть эмульгировано при помощи единицы массы белка (Atamer et al., 2017). Мономерные модифицированные бета-казеины могут быть использованы в качестве эмульгаторов для приготовления эмульсии масло-в-воде с использованием гомогенизации (приблизительно 200 бар (20000 кПа)). Затем мицеллярные суспензии могут быть смешаны с эмульсиями масло-в-воде и другими водорастворимыми ингредиентами путем смешивания с высоким усилием сдвига для получения продукта, напоминающего молоко. Для сравнения эффективности модифицированных бета-казеинов можно приготовить молоко без компонентов животного происхождения с использованием

коровьего бета-казеина (от Sigma Aldrich) с последующим анализом физико-химических свойств конечного продукта, таких как pH, вязкость, цвет и физическая стабильность (размер частиц и дзета-потенциал).

Типичный состав коровьего молока представляет собой 3,2% белка, 3,3% жира, 5,3% лактозы и 0,7% минеральных веществ (Haug et al., 2007). Таким образом, состав молока без компонентов животного происхождения может быть приготовлен с такой же композицией, что и коровье молоко, как изложено в таблице 6 ниже:

Таблица 6. Теоретический состав питательных веществ молока без компонентов животного происхождения.

Компоненты	Процентная доля (%)
Мономерный бета-казеин	0,1
Мицеллярный бета-казеин	3,1
Кокосовое масло	3,3
Минеральные соли (включая соли кальция)	0,7
Тростниковый сахар	5,3
Гидрофосфат калия	0,05
Фосфат натрия	0,05
Вода	87,4

Другие модифицированные молочные белки в соответствии с изобретением, включающие без ограничения белки в Таблице 3 и другие, описанные здесь, могут, безусловно, быть экспрессированы, проверены и обработаны, как здесь описано, включая описанные в примерах 2-5.

ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ:

Blom et al., 1999; Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S., 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology*, 294(5), pp.1351-1362

Graham et al., 1984; Graham, E. R. B., Malcolm, G. N. and McKenzie, H. A., 1984. On the isolation and conformation of bovine β -casein A1. *International Journal of Biological Macromolecules* 6.3, pp.155-161.

Huppertz et al., 2018; Huppertz, T., Fox, P.F. and Kelly, A.L., 2018. The caseins: Structure, stability, and functionality. In *Proteins in food processing* pp. 49-92

Kozłowski LP (2021); Kozłowski, L.P., 2021. IPC 2.0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants. *Nucleic Acids Research*.

Philip et al., 2001; Philip, R., Darnowski, D.W., Maughan, P.J. and Vodkin, L.O., 2001. Processing and localization of bovine β -casein expressed in transgenic soybean seeds under control of a soybean lectin expression cassette. *Plant Science*, 161(2), pp.323-335

Li, M., Auty, M. A. E., Crowley, S. V., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A., & Brodkorb, A. (2019). Self-association of bovine beta-casein as influenced by calcium chloride, buffer type and temperature. *Food Hydrocolloids*, 88, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.035>

Song, S., Lin, Y, Zhang, Y, Luo, Y and Guo, H. (2023). The self-association properties of partially dephosphorylated bovine beta-casein, *Food Hydrocolloids*, Volume 134, 1-11.

Haug, A., Høstmark, A.T. & Harstad, O.M. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids Health Dis* 6, 25 (2007). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>

Atamer, Z., Post, A. E., Schubert, T., Holder, A., Boom, R. M., & Hinrichs, J. (2017). Bovine β -casein: Isolation, properties and functionality. A review. *International Dairy Journal*, 66, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.010>

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный молочный белок, в котором по меньшей мере одна потенциально фосфорилированная аминокислота заменена на отрицательно заряженную аминокислоту.

2. Модифицированный молочный белок по п. 1, в котором потенциально фосфорилированная аминокислота выбрана из серина (S) и треонина (T).

3. Модифицированный молочный белок по любому из пп. 1-2, в котором отрицательно заряженная аминокислота выбрана из аспартата (D) и глутамата (E).

4. Модифицированный молочный белок по любому из пп. 1-3, который при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии демонстрирует по меньшей мере одно из следующих:

- а) способность связывать кальций, и
- б) способность образовывать мицеллы.

5. Модифицированный молочный белок по любому из пп. 1-4, который при рекомбинантной экспрессии в гетерологичной системе экспрессии демонстрирует по меньшей мере одно из следующих:

а) улучшенную способность связывать кальций по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии,

б) улучшенную способность образовывать мицеллу по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии,

в) измененную рI по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии,

г) измененную термическую стабильность по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии,

д) измененный дзета-потенциал по сравнению с немодифицированным молочным белком, когда он рекомбинантно экспрессируется в той же самой гетерологичной системе экспрессии.

6. Модифицированный молочный белок по любому из пп. 1-5, который, за исключением описанных модификаций, в остальном имеет ту же последовательность, что и немодифицированный молочный белок.

7. Полинуклеотид, кодирующий модифицированный молочный белок по любому из пп. 1-6.

8. Экспрессионная конструкция, содержащая полинуклеотид по п. 7.

9. Клетка-хозяин, растительная клетка, организм, растение, часть растения, растительная ткань, побег, потомство или семя, содержащие по меньшей мере одно из:

а) молочный белок по п. 1,

б) полинуклеотид по п. 7 и

в) конструкцию по п. 8.

10. Клетка-хозяин, растительная клетка, организм или растение по п. 9, которые являются гетерологичными относительно видов, из которых получен немодифицированный молочный белок.

11. Способ получения модифицированного молочного белка по любому из пп. 1-10, включающий экспрессию полинуклеотида, кодирующего модифицированный молочный белок, в клетке-хозяине, растительной клетке, организме, растении, части растения, растительной ткани, побеге, потомстве или семени.

12. Способ по п. 11, включающий стадию тестирования экспрессируемого модифицированного молочного белка в отношении по меньшей мере одного из:

а) способности связывать кальций,

б) способности образовывать мицеллу,

в) рI,

г) термической стабильности, и

д) дзета-потенциала.

13. Способ по п. 12, где модифицированный молочный белок выбран на основе по меньшей мере одного из (а)-(д).

14. Способ по любому из пп. 1-13, включающий стадию очистки модифицированного молочного белка из клетки-хозяина, растительной клетки, организма, растения, части растения, растительной ткани, побега, потомства или семени.

15. Модифицированный молочный белок, полученный способом по любому из пп. 1-14.

16. Пищевой или питьевой продукт или ингредиент, содержащий один или более чем один модифицированный молочный белок по любому из пп. 1-15, или полученный способом по любому из пп. 1-15.

17. Способ получения пищевого или питьевого продукта или ингредиента, включающий стадию переработки или включения модифицированного молочного белка по

любому из пп. 1-16 или полученного способом по любому из пп. 1-16 в пищевой или питьевой продукт или ингредиент.

18. Применение модифицированного молочного белка по любому из пп. 1-17 или полученного способом по любому из пп. 1-17 в приготовлении пищевого или питьевого продукта или ингредиента.

19. Пищевой или питьевой продукт или ингредиент, полученный способом по п. 17.

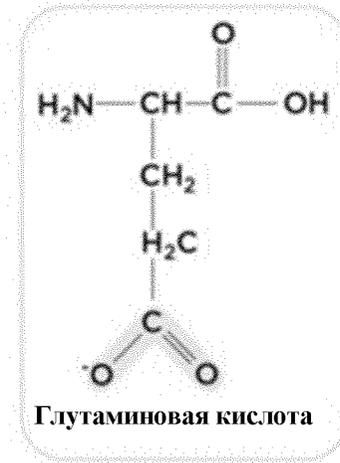
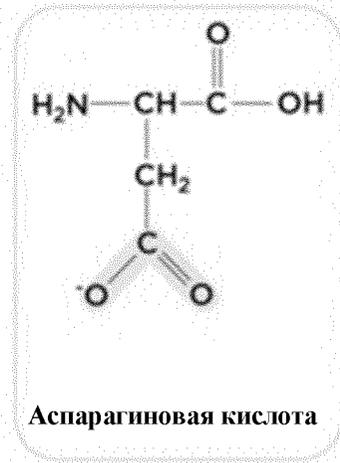
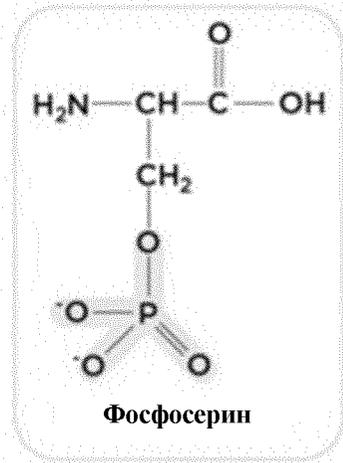
20. Пищевой или питьевой продукт или ингредиент по п. 16 или 19, выбранный из молока, сливок, шоколада, сливочного масла, сыра, ферментированного йогурта, мороженого, детской питательной смеси, белковых напитков, заварного крема, простокваши, сухого молока, маргарина, концентратов и изолятов белка молочной сыворотки, концентратов или изолятов молочного белка и гидролизованных молочных белков.

21. Пищевой или питьевой продукт или ингредиент по п. 16 или 19, представляющий собой заменитель молочного продукта.

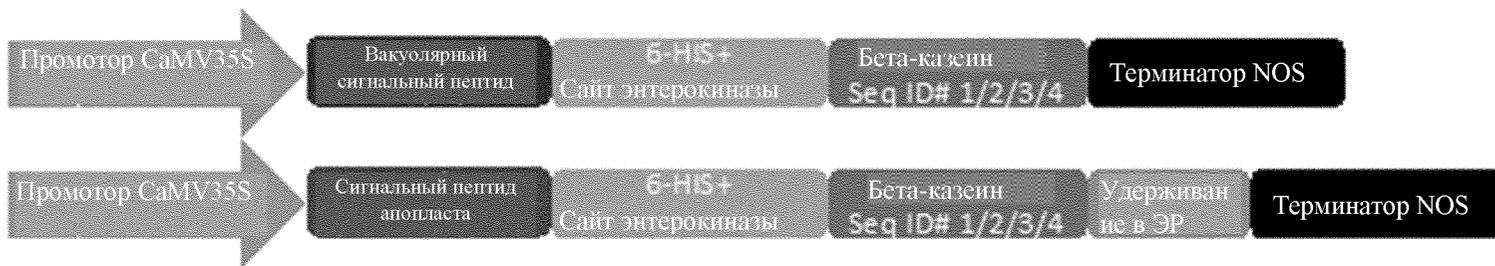
22. Пищевой или питьевой продукт или ингредиент по п. 16 или 19, представляющий собой заменитель молочного продукта, выбранный из заменителя молока, заменителя сливок, заменителя сливок для взбивания, заменителя майонеза, заменителя мороженого, заменителя сыра и заменителя йогурта.

RELEELNVPGEIVE**SLSSSE**ESITRINKKIEKFQ**SEEQQQ**TEDELQDKIH 50
PFAQTQSLVYPPFGPIPN**SLPQNIPPLTQT**PVVVPPFLQPEVMGVSKVKE 100
AMAPKHKEMPFPKYVVEPFTESQ**SLTLT**DVENLHLPLPLLQSWMHQPHQP 150
LPPTVMFPPQSVLS**SLSQ**SKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGP 200
VRGPFPIIV

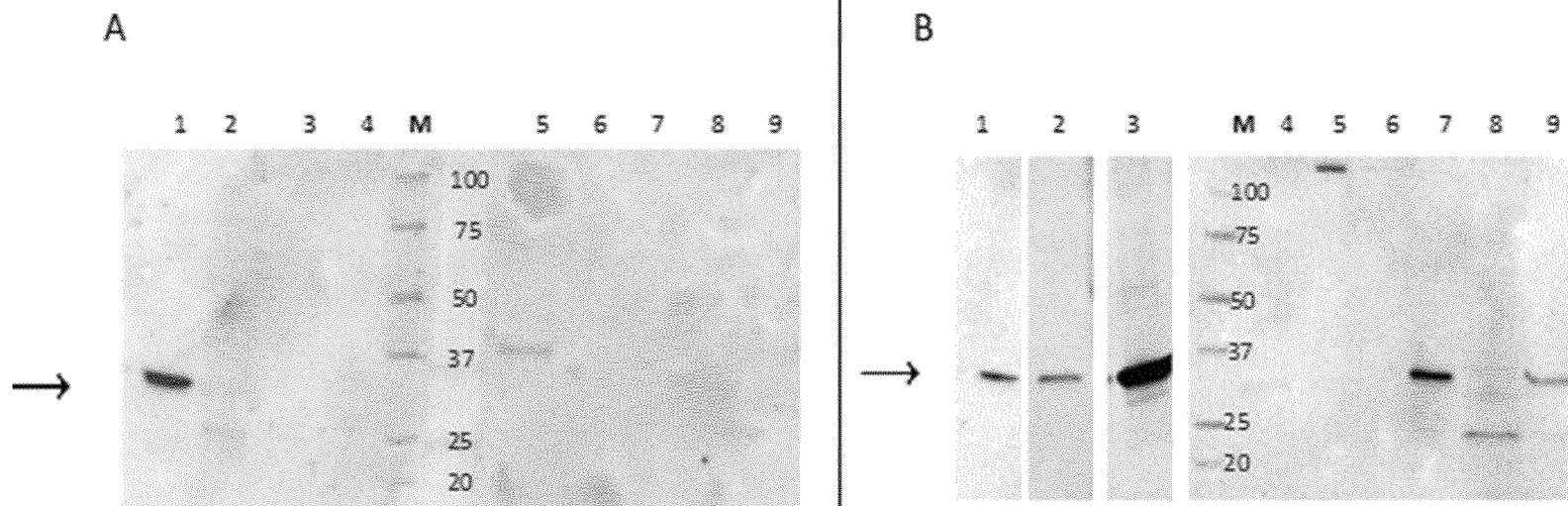
Фиг. 1



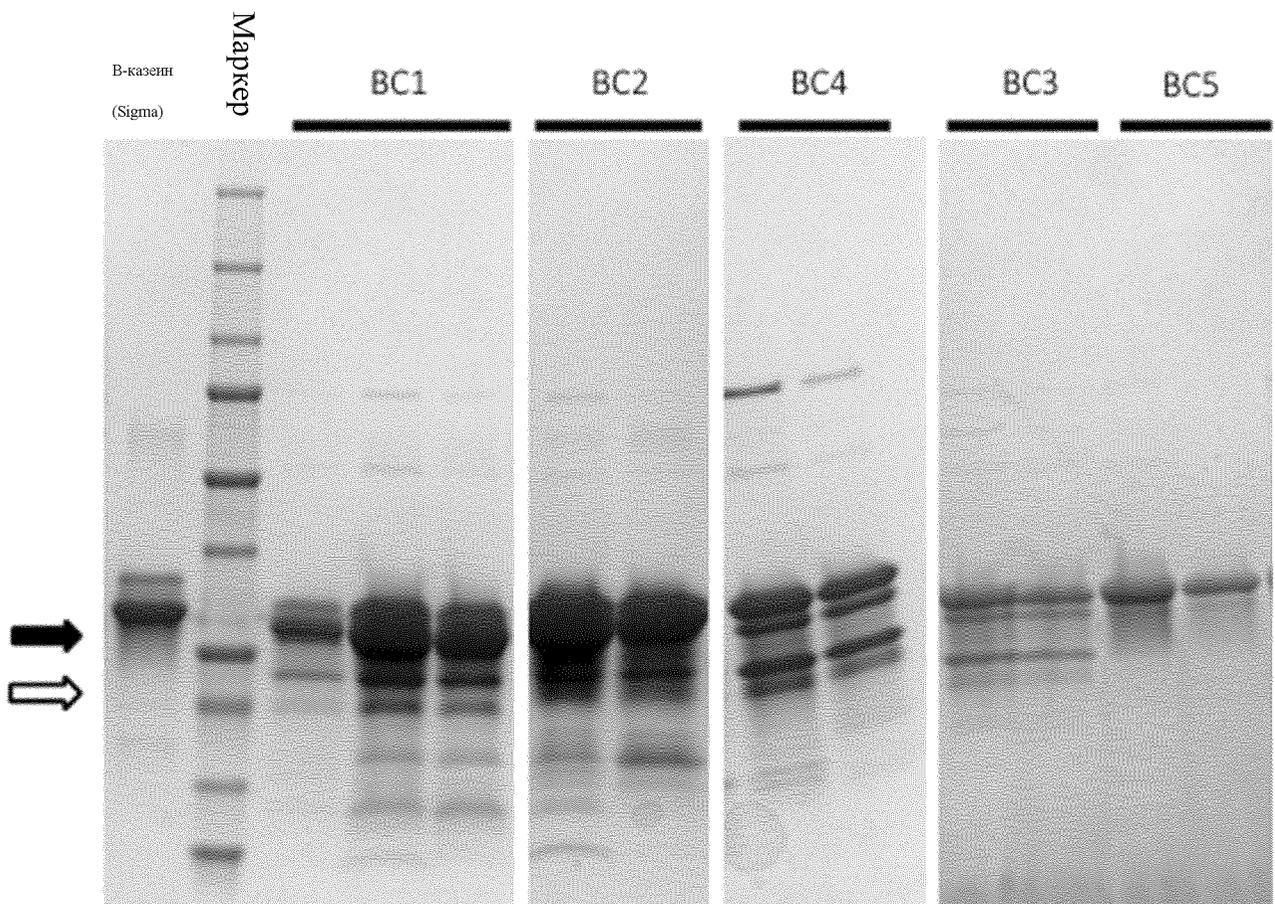
Фиг. 2



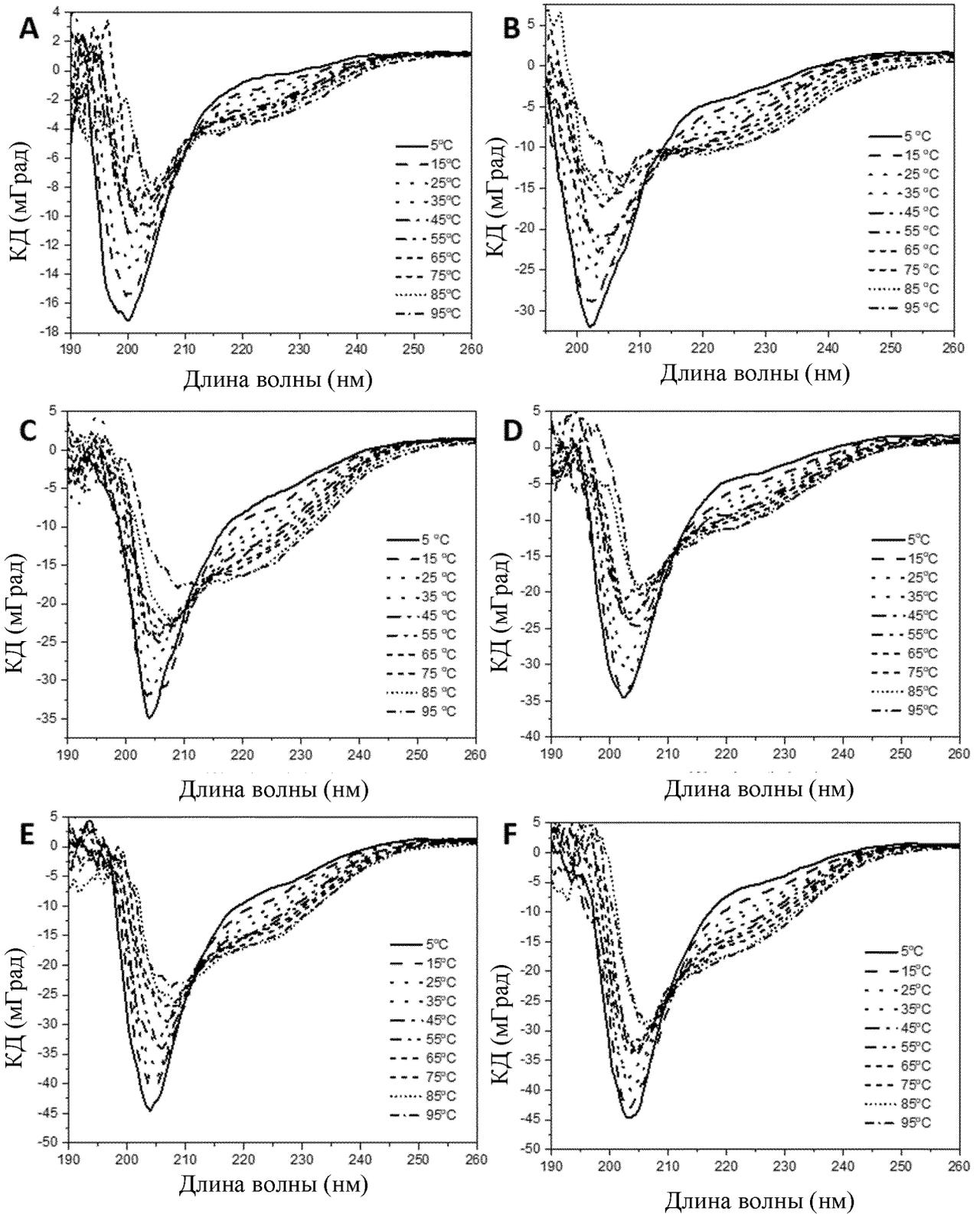
Фиг. 3



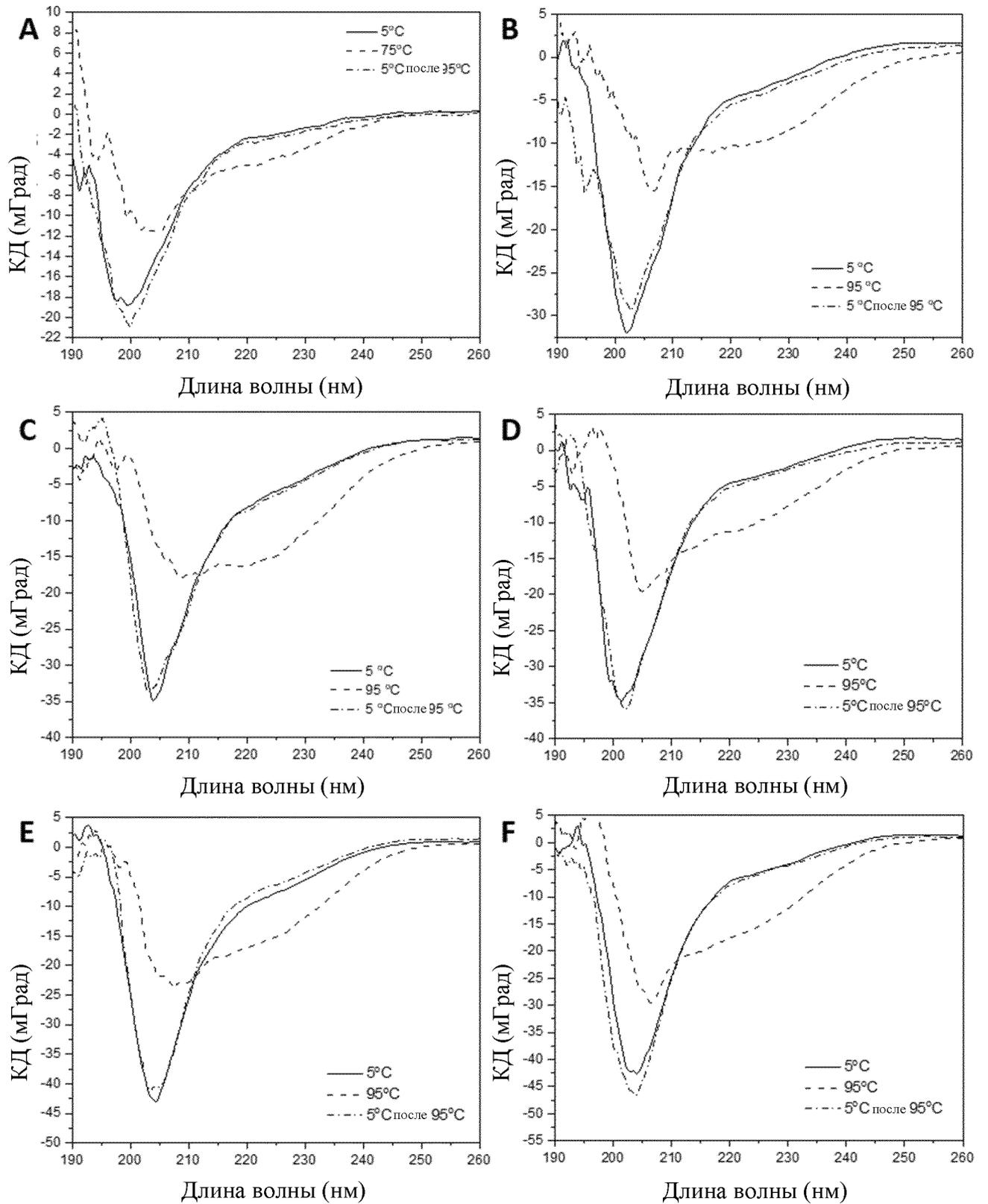
Фиг. 4



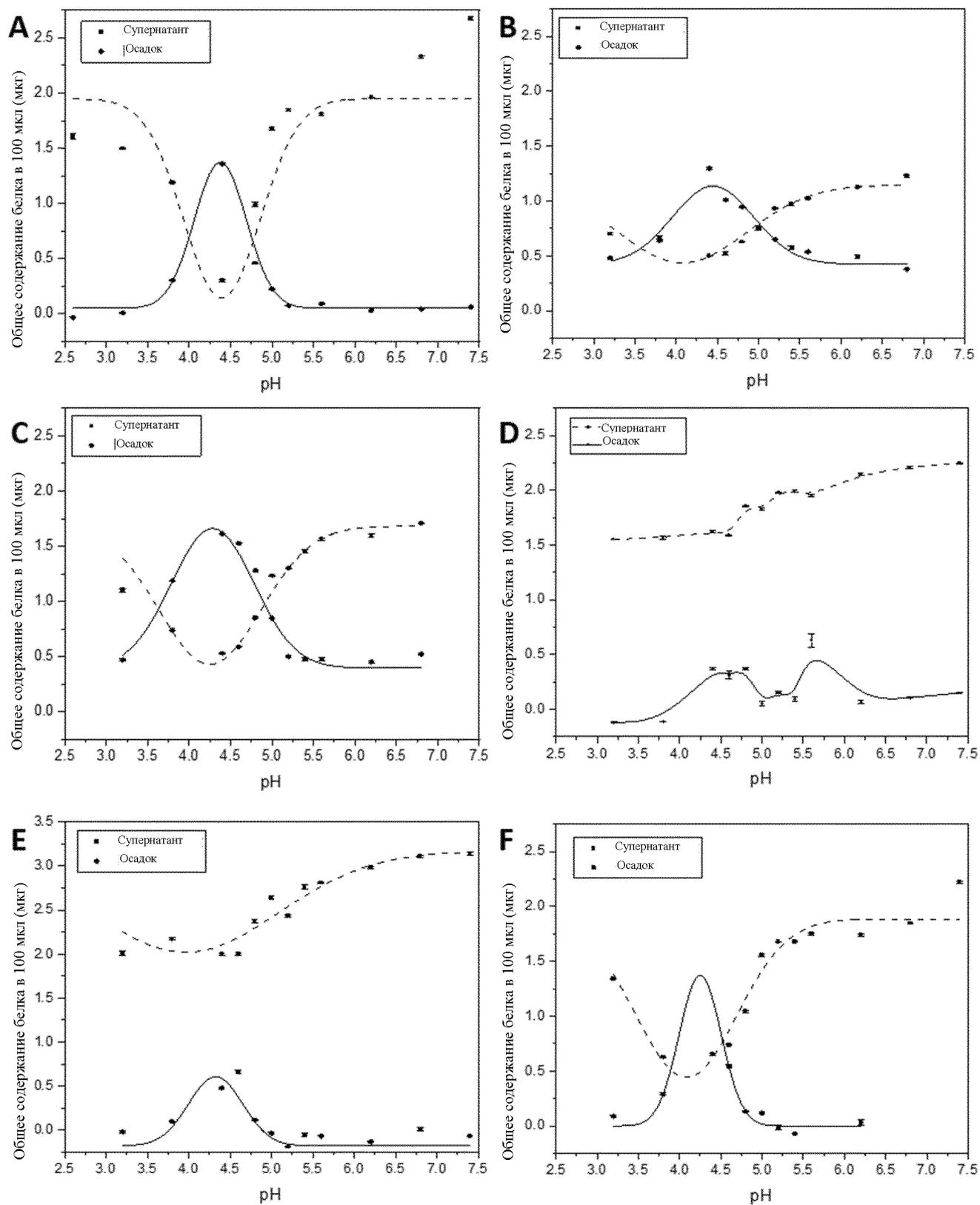
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8