



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 323106

(13) B1

(51) Int Cl.

C12N 9/62 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19983364	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	1998.07.21	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	1998.07.21	(30)	Prioritet	1997.07.24, EP, 97112688
(41)	Alm.tilgj	1999.01.25			
(45)	Meddelt	2007.01.02			
(73)	Innehaver	DSM IP Assets BV , Het Overloon 1, 6411TE HEERLEN, NL			
(72)	Oppfinner	Martin Lehmann, , Inzlingen, DE			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS , Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, NO			

(54) Benevnelse **Konsensusprotein**
(56) Anførte publikasjoner EP 422697

(57) Sammendrag

Det er beskrevet en fremgangsmåte ved fremstilling av et konaen us-protein, hvor fremgangsmåten omfatter de følgende trinn:

- minst tre, fortrinnsvis fire aminosyresekvenser blir samstillet ved hjelp av ethvert standard samstillingsprogram som er kjent innen faget;
- aminosyrer ved samme posisjon ifølge en slik samstilling sammenlignes med hensyn til deres evolusjonsmessige likheter med ethvert standardprogramm som er kjent innen faget, idet likhetsgraden som blir gitt av et slikt program som definerer den min te likhet mellom aminosyrene som blir brukt for bestemmelsen av en aminosyre av tilsvarende posisjoner blir satt til et mindre stringent tall og parameterne blir satt på en slik måte at det er mulig for programmet å bestemme fra kun 2 identiske aminosyrer ved en tilsvarende posisjon, en aminosyre for konsensus-proteinet, men dersom det blant de sammenlignede aminosyresekvenser finnes sekvenser som viser en mye større grad av likhet til hverandre enn de gjenværende sekvenser, så blir disse sekvenser representert ved sin konsensus-eksvens bestemt som definert på samme måte som i foreliggende fremgangsmåte for konsensus-sekvensen til konsensus-proteinet eller en vektverdi på 1 delt på antallet slike sekvenser blir tilegnet til hver av disse sekvenser,
- i det tilfelle hvor ingen felles aminosyre ved en bestemt posisjon blir definert av programmet. så blir enhver av aminosyrene, fortrinnsvis den hyppigst forekommende aminosyre av alle slike sekvenser valgt ut;
- når konsensus-sekvensen har blitt definert, blir en slik sekvens tilbaketranslatert til en DNA-sekvens, fortrinnsvis ved å bruke en kodonfremkvens-tabell til organismen hvori ekspresjonen skal finne sted;
- DNA-sekvensen syntetiseres ved metoder som er kjent innen faget og benyttes enten integrert i en passende ekspresjonsvektor eller som sådan for å transformere en passende vertscelle;
- den transformerte vertscelle dyrkes under passende betingelser og konsensusproteinet isoleres fra vertscellen eller dens dyrkningsmedium med metoder som er kjent innen faget.

Fytaser (*myo*-inositol heksakisfosfatfosfohydrolaser; EC 3.1.3.8) er enzymer som hydrolyserer fytat (*myo*-inositol heksakisfosfat) til *myo*-inositol og uorganisk fosfat og er kjent for å være verdifulle foradditiver.

- 5 En fytase ble først beskrevet i riskapsler i 1907 [Suzuki et al., Bull, Coll.Agr. Tokio Imp. Univ.7, 495 (1907)] og fytaser fra *Aspergillus*arter i 1911 [Dox og Golden, J. Biol. Chem. 10, 183-186 (1911)]. Fytaser har også blitt funnet i hvetekapsler, plantefrø, dyretarmer og i mikroorganismer [Howsen og Davis, Enzyme Microb. Technol. 5, 377-382 (1983), Lambrechts et al., Biotech. Lett. 14, 61-66 (1992), Shieh og Ware, Appl. Microbiol. 16, 1348-1351 (1968)].

- 15 Kloningen og ekspresjonen av fytasen fra *Aspergillus niger* (*ficuum*) har blitt beskrevet av Van Hartingsveldt et al., i Gene, 127, 87-94 (1993) og i Europeisk patentsøknad , publikasjonsnr. (EP)420 358 og fra *Aspergillus niger* var. *awamori* av Piddington et al., i Gene 133, 55-62 (1993).

- 20 Fra EP 0 422 697 er det kjent et gen som er i stand til å styre syntesen av et konsensus humant leukocytinterferon i en utvalgt vertsmikroorganisme.

Kloning, ekspresjon og opprensning av fytaser med forbedrede egenskaper har blitt beskrevet i EP 684 313.

- 25 Imidlertid siden det fremdeles er et fortsatt behov for ytterligere forbedrede fytaser, spesielt med hensyn til deres termostabilitet er det et mål for foreliggende oppfinnelse å fremskaffe en konsensusfytase ved den følgende prosess.

- 30 En fremgangsmåte for fremstilling av et konsensusprotein er en prosess med de følgende trinn:

- a) minst 3, fortrinnsvis 4 aminosyresekvenser av en definert proteinfamilie blir sammenlignet med ethvert standard sammenligningsprogram kjent innen faget;
- b) aminosyrer ved samme posisjon i henhold til en slik overensstemmelse blir sammenlignet med hensyn til deres evolusjonsmessige likhet med ethvert standardprogram som er kjent innen faget idet likhetsgraden som blir gitt av et slikt program som definerer den minste likhet av aminosyrene som blir brukt for bestemmelsen av en aminosyre av tilsvarende posisjoner blir satt til et mindre stringenstall og parameterne blir satt på en slik måte at det er mulig for programmet å bestemme fra kun to identiske aminosyrer ved en tilsvarende posisjon en aminosyre for konsensusproteinet, men, dersom det blant de sammenlignede aminosyresekvenser finnes sekvenser som viser en meget høyere grad av likhet til hverandre enn til de gjenværende sekvenser blir disse sekvenser representert ved sin konsensussekvens bestemt som definert på samme måte som i foreliggende fremgangsmåte for konsensussekvensen av konsensusproteinet eller en verdivekt på 1 delt med antallet av slike sekvenser blir tilegnet hver av disse sekvenser;
- c) i tilfelle ingen felles aminosyre ved en definert posisjon kan bli identifisert av programmet blir enhver av aminosyrene av alle sekvenser anvendt for sammenligningen fortrinnsvis den mest hyppige aminosyre av alle slike sekvenser valgt, eller en aminosyre blir valgt på basis av vurderingen gitt i eksempel 2;
- d) når konsensussekvensen har blitt definert, blir en slik sekvens tilbake-translatert til en DNA-sekvens, fortrinnsvis ved å bruke en kodonfrekvenstabell av organismen hvor ekspresjonen vil finne sted;
- e) DNA-sekvensen syntetiseres ved fremgangsmåter kjent innen faget og blir brukt enten integrert i en

passende ekspresjonsvektor eller i seg selv for å transformere en passende vertscelle;

- f) den transformerte vertscelle dyrkes under passende dyrkningsbetingelser og konsensusproteinet isoleres fra vertscellen eller dets dyrkningsmedium ved metoder kjent innen faget.

Fremgangsmåtettrinn b) kan også bli angitt som følger:

- b) aminosyrer ved samme posisjon i henhold til en slik overensstemmelse blir sammenlignet med hensyn til sin evolusjonsmessige likhet med ethvert standardprogram som er kjent innen faget idet graden av likhet som blir gitt av et slikt program blir satt ved lavest mulige verdi og aminosyren som er mest lik får minst halvdel av sekvensene som benyttes for sammenligningen valgt for den tilsvarende posisjon i aminosyresekvensen for konsensusproteinet.

Hele denne prosess kan bli observert i en prosess hvor en sekvens blir valgt fra et antall av høyt homologe sekvenser og kun de aminosyreresiduer blir erstattet som klart er forskjellige fra en konsensussekvens av denne proteinfamilie utregnet under moderate stringensbetingelser, mens ved alle posisjoner av sammenligningen hvor fremgangsmåten ikke er i stand til å bestemme en aminosyre under moderate stringente betingelser blir aminosyrene av den foretrukne sekvens valgt ut.

Den definerte proteinfamilie er familien av fytaser, spesielt hvor fytasene er av fungal opprinnelse.

Vertscellen er av eukaryotisk, spesielt fungal, fortrinnsvis *Aspergillus* eller gjær, fortrinnsvis *Saccharomyces* eller *Hansenula*-opprinnelse.

- Det er et mål for foreliggende oppfinnelse å fremskaffe et konsensusprotein som kan dannes og som fortrinnsvis er dannet ved slike fremgangsmåter og spesielt konsensusproteinet som har aminosyresekvensen vist i fig. 2
- 5 eller en variant derav. En "variant" refererer i sammenhengen av foreliggende oppfinnelse til et konsensusprotein med en aminosyresekvens som vist i fig. 2 hvorved en eller flere posisjoner aminosyrer har blitt sløffet, tillagt eller erstattet med en eller flere
- 10 andre aminosyrer med det forbehold at den resulterende sekvens blir et protein viss grunnleggende egenskaper lik enzymaktivitet (type av og spesifikk aktivitet), termostabilitet, aktivitet i et visst pH-område (pH-stabilitet) ikke i vesentlig grad har blitt endret.
- 15 "Signifikant" betyr i denne sammenheng at en fagmann ville si at egenskapene til varianten fremdeles kan være forskjellige, men ikke ville være innlysende i forhold til dem av konsensusproteinet med aminosyresekvensen ifølge fig. 2 i seg selv.
- 20 Et mutein refererer i sammenheng med foreliggende oppfinnelse til erstatninger av aminosyren i aminosyresekvensen av konsensusproteinene vist i fig. 2 som fører til konsensusproteiner med ytterligere forbedrede egenskaper, for eksempel aktivitet. Slike muteiner kan bli
- 25 definert og fremstilt på basis av innholdet gitt i Europeisk patentsøknad nr. 97810175.6, for eksempel Q50L, Q50T, Q50G, Q50L-Y51N eller Q50T-Y51N. "Q50L" betyr i denne sammenheng at ved posisjon 50 av aminosyresekvensen har aminosyren Q blitt erstattet med aminosyren L.
- 30 I tillegg er en matvare, fôr eller farmasøytisk sammensetning omfattende et konsensusprotein som definert ovenfor også et mål for foreliggende oppfinnelse.

I denne sammenheng betyr "minst 3 fortrinnsvis 3 aminosyresekvenser av en slik definert proteinfamilie" at 3,

35 4, 5, 6 - 12, 20, 50 eller enda flere sekvenser kan bli

brukt for overensstemmelsen og sammenligningen for å danne aminosyresekvensen til konsensusproteinet. "Sekvenser av en definert proteinfamilie" betyr at slike sekvenser folder seg til en tredimensjonal struktur

5 hvor α -heliksene, β -arkene og vendingene er ved samme posisjon slik at slike strukturer blir som kalt av fagmannen rommelig like. Videre karakteriserer disse sekvenser proteiner som viser samme type av biologisk aktivitet, for eksempel en definert enzymklasse, eksempelvis fytasene. Som kjent innen faget er den tredimensjonale struktur av en av slike sekvenser tilstrekkelig for å tillate modelleringen av strukturen av andre sekvenser hos en slik familie. Et eksempel på hvordan dette kan bli utført er gitt i referanseeksemplet i foreliggende sak. "Evolusjonsmessig likhet" refererer i denne sammenhengen til et skjema som klassifiserer aminosyrer med hensyn til sin strukturelle likhet som tillater at en aminosyre kan bli erstattet med en annen aminosyre med en minimal innvirkning på den

10 totale struktur slik dette blir foretatt for eksempel av programmer lik "PRETTY" som er kjent innen faget. Uttrykket "likhetsgraden gitt av et slikt program blir satt til et mindre stringenstall" betyr i denne sammenhengen at verdier for parameterne som bestemmer

15 graden av likhet i programmet blir valgt på en slik måte at det tillater programmet å definere en felles aminosyre for maksimum av posisjoner av hele aminosyresekvensen, for eksempel i tilfelle med programmet "PRETTY" en verdi på 2 eller 3 for THRESHOLD og en

20 verdi på 2 for PLURALITY kan bli valgt. Videre betyr "en gradsvekt på 1 delt med antallet slike sekvenser" i denne sammenhengen med at sekvensene som definerer en gruppe av sekvenser med en høyere grad av likhet som de andre sekvenser benyttet for bestemmelsen av konsensussekvensen kun bidrar til en slik bestemmelse med en

25 faktor som er lik 1 delt med antallet av alle sekvenser av denne gruppe.

Som nevnt tidligere dersom programmet ikke tillater å velge ut de mest like aminosyrer bør de hyppigst forekomne aminosyrer bli valgt ut, og skulle sistnevnte være umulig vil fagmannen velge en aminosyre fra alle
 5 sekvensene som benyttes for sammenligningen som er kjent innen faget for sin egenskap å forbedre termostabiliteten i proteiner som beskrevet for eksempel av

"Janeck, S. (1993), *Process Biochem.* 28, 435-445 eller Fersht, A.R. & Serrano, L. (1993), *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 75-83
 10 Alber, T. (1989), *Annu. Rev. Biochem.* 58, 765-798 eller Matthews, B.W. (1987), *Biochemistry* 26, 6885-6888. Matthews, B.W. (1991), *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 17-21.

15 Stabiliteten til et enzym er en kritisk faktor for mange industrielle anvendelser. Følgelig har en mengde forsøk som har lyktes i større eller mindre grad blitt foretatt for å forbedre stabiliteten, fortrinnsvis termostabiliteten av enzymer ved rasjonelle (van den Burg et al., 1998) eller irrasjonelle metoder (Akanuma et al., 1998). Kreftene som innvirker på termostabiliteten av et protein er de samme som dem som er ansvarlig for riktig folding av en peptidkjede (hydrofobiske interaksjoner, van der Waals interaksjoner, H-bindinger, saltbroer, konformasjonelle spenninger (Matthews, 25 1993)). Videre som vist av Matthews et al (1987) har frienergien til den ufoldede tilstand også en innvirkning på stabiliteten av et protein. Økning av proteinstabilitet betyr å øke antallet og styrken av gunstige interaksjoner og å minske antallet og styrken av ugunstige interaksjoner. Det har vært mulig å innføre disulfidbindinger (Sauer et al., 1986) og erstatte glysin med alaninresiduer eller å øke prolininnholdet for å redusere frienergien av den ufoldede tilstand (Margarit 30 et al, 1992; Matthews, 1987a). Andre grupper konsentrerte seg på viktigheten av ytterligere H-bindinger
 35

eller saltbroer for stabiliteten av et protein (Blaber et al., 1993) eller forsøkte å fylle hulrom i det indre av proteinet for å øke det indre hydrofobiske overflatearealet og van der Waals interaksjonene (Karpusas et al., 1989). Videre ble stabiliseringen av sekundære strukturelementer, spesielt α -helikser, for eksempel ved forbedret heliksavslutning også undersøkt (Munoz & Serrano, 1995).

Imidlertid finnes ingen rask og lovende strategi for å identifisere aminosyreerstatninger som vil øke stabiliteten, fortrinnsvis den termiske stabilitet hos et protein. Vanligvis er 3D-strukturen til et protein nødvendig for å finne beliggenhetene i molekylet hvor en aminosyreerstatning muligens vil stabilisere proteinets foldede tilstand. Alternative måter å omgå dette problem er enten å lete etter et homologt protein i en termo- eller hypertermofil organisme eller å påvise stabilitetsøkende aminosyreerstatninger med en tilfeldig mutagenesemetode. Sistnevnte lykkes muligens kun i 10^3 til 10^4 mutasjoner og er begrenset til enzymer for hvilke en rask utvelgelsesprosedyre er tilgjengelig (Arase et al., 1993; Risse et al., 1992). For alle disse metoder var suksess variabel og uforutsigbar og om den lyktes var termostabilitetsøkningene nesten alltid relativt små.

Her presenterer Søker en alternativ måte å forbedre termostabiliteten til et protein. Imanaka et al (1986) var blant de første til å bruke sammenligninger av homologe proteiner og øke stabiliteten til et protein. De benyttet en sammenligning av proteaser fra termofile organismer med homologe fra mesofile organismer for å øke stabiliteten av en mesofil protease. Serrano et al., (1993) benyttet sammenligningen av aminosyresekvensen fra to homologe mesofile RNAs til å konstruere en mer termostabil RNase. De muterte individuelle alle av residuene som var forskjellige mellom de to og kom-

binerte mutasjonene som øker stabiliteten i en multipell mutant. Pantoliano *et al.* (1989) og, spesielt, Steipe *et al.* (1994) antydte at de hyppigst forekomne aminosyrer ved hver posisjon av en sammenligning mellom
5 homologe proteiner tilfører den største mengde stabilitet til et protein. Steipe *et al.*, (1994) viste dette for et variabelt domene av et immunoglobulin, mens Pantoliano *et al.* (1989) lette etter posisjoner i primærsekvensen til et subtilisin hvor sekvensen av enzymet som ble valgt å bli forbedret for høyere stabilitet
10 var singulært divergent. Denne metode resulterte i erstatningen M50F som økte T_M av subtilisin med 1,8°C.

Steipe *et al* (1994) viste på et variabelt domene av et immunoglobulin at det er mulig å forutsi en stabiliserende mutasjon med mer enn 60% nøyaktighet kun ved å
15 bruke en statistisk metode som bestemmer det hyppigst forekomne aminosyreresiduum ved en gitt posisjon i dette domene. Det ble også antydte at denne metode ville gi nyttige resultater ikke bare for stabilisering
20 av variable domener hos antistoff, men også for domener hos andre proteiner. Imidlertid var det aldri nevnt at denne metode kunne bli utvidet til hele proteinet. Videre blir intet sagt angående programmet som blir brukt til å regne ut frekvensen av aminosyreresiduer ved en
25 spesiell posisjon eller hvorvidt skåringsmatriser ble benyttet som i foreliggende tilfelle.

DNA-sekvenser kan bli konstruert ved å starte fra genomiske eller cDNA-sekvenser som koder for proteiner, for eksempel fytaser kjent innen fagområdet [for sekvensin-
30 formasjon se referanser nevnt ovenfor, for eksempel EP 684 313 eller sekvens databaser, for eksempel lik Genbank (Intelligenetics, California, USA), European Bioinformatics Institute (Hinston Hall, Cambridge, GB), NBRF (Georgetown University, Medical Centre, Washington
35 DC, USA) og Vecbase (University of Wisconsin, Biotechnology Centre, Madison, Wisconsin, USA) eller beskrevet

i figurene ved metoder av in vitro mutagenese [se for eksempel Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Tress, New York]. En meget benyttet strategi for slik " seterettet mutagenese" som opprinnelig skissert av Hurchinson og Edgell [J. Virol. 8, 181 (1971), involverer sammenkobling av et syntetisk oligonukleotid som bærer den ønskede nukleotidsubstitusjon til et målområde av en enkeltkjedet DNA-sekvens hvor mutasjonen skal bli innført [for oversikt se Smith, Annu. Rev. Genet. 19, 423 (1985) og for forbedrede metoder se referanser 2 - 6 i Stanssen et al., Nucl. Acid. Res., 17, 4441-4454 (1989)]. En annen mulighet for å mutere en gitt DNA-sekvens som også er foretrukket er mutagenesen ved å bruke polymerasekjede-reaksjonen (PCR). DNA kan som utgangsmateriale bli isolert ved metoder kjent i faget og beskrevet for eksempel i Sambrook et al. (Molecular Cloning) fra de respektive stammer. For stammeinformasjon se for eksempel EP 684 313 eller enhver deponeringsinstitusjon indikert nedenfor. Aspergillus niger [ATCC 9142], Myceliphthora Thermophila [ATCC 48102], Talaromyces thermophilus [ATCC 20186] og Aspergillus fumigatus [ATCC 34625] har blitt redeponert i henhold til betingelsene i Budapest-konvensjonen ved American Type Culture Cell Collection under de henholdsvis følgende tilgangsnumre: ATCC 74337, ATCC 74340, ATCC 74338 og ATCC 74339. Det er imidlertid underforstått at DNA som koder for et konsensusprotein i samsvar med foreliggende oppfinnelse også kan bli fremstilt på syntetisk måte som beskrevet for eksempel i EP 747 483 eller eksemplene ved metoder kjent innen faget.

Når fullstendige DNA-sekvenser har blitt fremstilt kan de bli integrert i vektorer ved metoder kjent innen faget og for eksempel beskrevet i Sambrook et al. (s.a.) til å overuttrykke det kodede polypeptid i passende vertssystemer. Imidlertid vet fagmannen at også DNA-sekvensen i seg selv kan bli brukt til å transformere

de egnede vertssystemer for å oppnå overekspresjon av det kodede polypeptid. Passende vertssystemer er for eksempel muggsopp, lik *Aspergilli*, for eksempel *Aspergillus niger* ([ATCC 9142] eller *Aspergillus ficuum* 5 [NRRL 3135] eller lignende *Trichoderma*, for eksempel *Trichoderma reesei* eller gjær, lik *Saccharomyces*, for eksempel *Saccharomyces cerevisiae* eller *Pichia*, lik *Pichia pastoris* eller *Hansenula polymorpha*, for eksempel *H. polymorpha* (DSM5215) eller planter som beskrevet for 10 eksempel av Pen et al., *Bio/Technology* 11, 811-814 (1994). Fagmannen vet at slike mikroorganismer er tilgjengelig fra deponeringssteder, for eksempel the American Type Culture Collection (ATCC), Sentralbyrå for Schimmelcultures (CBS) eller Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) eller ethvert 15 annet deponeringssted som opplistet i journalen "Industrial Property" [(1991) 1, side 29-40]. Bakterier som kan bli brukt er for eksempel *E. coli*, *Bacilli* som for eksempel *Bacillus subtilis* eller *Streptomyces*, for 20 eksempel *Streptomyces lividans* (se for eksempel Anné og Mallaert i *FEMS Microbiol. Letters* 114, 121 (1993)). *E. coli* som ble brukt er *E. coli* K12 stammer, for eksempel M15 [beskrevet som DZ 291 av Villarejo et al. i *J. Bacteriol.* 120, 466-474 (1974)], HB 101 [ATCC nr. 33694] 25 eller *E. coli* SG 13009 [Gottesman et al., *J. Bacteriol.* 148, 265-273 (1981)].

Vektorer som kan bli brukt for ekspresjon i sopp er kjent innen faget som beskrevet for eksempel i EP 420 358, eller av Cullen et al. [*Bio/Technology* 5, 369-376 30 (1987)] eller Ward i *Molecular Industrial Mycology, Systems and Applications for Filamentous Fungi*, Marcel Dekker, New York (1991), Upshall et al, [*Bio/Technology* 5, 1301-1304 (1987)] Gwynne et al, [*Bio/Technology* 5, 71-79 (1987)], Punt et al, [*J. Biotechnol.* 17, 19-34 35 (1991)] og for gjær av Sreekrishna et al, [*J. Basic Microbiol.* 28, 265-278 (1988)], *Biochemistry* 28, 4117-4125 (1989), Hitzemann et al. [*Nature* 293, 717-722

(1981)] eller i EP 183 070, EP 183 071, EP 248 227, EP 263 311. Passende vektorer som kan bli brukt for ekspresjon i *E. coli* er nevnt, for eksempel av Sambrook et al [s.a.] eller av Fiers et al. i Proc. 8th Int. Biotechnology Symposium" [Soc. Franc. de Microbiol., Paris (Durand et al., eds), s. 680-697 (1988) eller av Bujard et al. i Methods in Enzymology, eds. Wu and Grossmann, Academic Press, Inc. Vol. 155, 416-433 (1987) og Stüber et al i Immunological Methods, eds. Lefkovits og Pernis, Academic Press, Inc., Vol. IV, 121-152 (1990).
 5 Vektorer som kan bli brukt for ekspresjon i Bacilli er kjent innen faget og beskrevet for eksempel i EP 405 370, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 439 (1984) av Yansura og Henner, Meth. Enzymol. 185, 199-228 (1990) eller EP 207 459. Vektorer som kan bli brukt for ekspresjon i *H. Polymorpha* er kjent innen faget og beskrevet for eksempel i Gellissen et al., Biotechnology 9, 291-295 (1991).

Enten bærer slike vektorer allerede regulatoriske elementer, for eksempel promotorer eller så kan DNA-sekvensene bli utformet til å inneholde slike elementer. Passende promotorelementer som kan bli brukt er kjent innen faget og er, for eksempel for *Trichoderma reesei* cbh1-[Haarki et al., Biotechnology 7, 596-600
 20 (1989) eller pkil-promotoren [Schindler et al., Gene 130, 271-275 (1993)], for *Aspergillus oryzae* amy-promotoren [Christensen et al., Abstr. 19th Lunteren Lectures på Molecular Genetics F23 (1987), Christensen et al., Biotechnology 6, 1419-1422 (1988), Tada et al.,
 30 Mol. Gen. Genet. 229, 301 (1991), for *Aspergillus niger* glaA-[Cullen et al., Bio/Technology 5, 369-376 (1987), Gwynne et al., Bio/Technology 5, 713-719 (1987), Ward i Molecular Industrial Mycology, Systems and Applications for Filamentous Fungi, Marcel Dekker, New York, 83-106
 35 (1991)], alcA-[Gwynne et al., Bio/Technology 5, 718-719 (1987)] sucl- [Boddy et al., Curr. Genet. 24 60-66 (1993)], aphA- [MacRae et al., Gene 71, 339-348

(1988), MacRae et al., *Gene* 132, 193-198 (1993)] *tpiA*-
 [McKnight et al., *Cell* 46, 143-147 (1986), Upshall et
 al., *Bio/Technology* 5, *Biotechnol.* 17, 19-37 (1991) og
 5 *pkiA*-promotoren [de Graaff et al., *Curr. Genet.* 22, 21-
 27 (1992)]. Passende promotorelementer som kan bli
 brukt for eksempel for ekspresjon i gjær er kjent innen
 faget og er, for eksempel *pho5*-promotoren [Vogel et
 al., *Mol. Cell. Biol.*, 2050-2057 (1989); Rudolf og Hin-
 nen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 1340-1344 (1987)] eller
 10 *gapp*-promotoren for ekspresjon i *Saccharomyces cerevi-*
siae og for *Pichia pastoris*, for eksempel *aox1*-promoto-
 ren [Koutz et al., *Yeast* 5, 167-177 (1989); Sreekrishna
 et al., *J. Basic Microbiol.* 28, 265-278 (1988)], eller
 FMD-promotoren [Hollenberg et al., EPA nr. 0299108] el-
 15 ler *MOX*-promotoren [Ledeboer et al., *Nucleic Acids Res.*
13, 3063-3082 (1985)] for *H. polymorfa*.

Når konsensus DNA-sekvensen som koder for aminosyresek-
 vensen i figur 2 har blitt uttrykt i en passende vertss-
 celle i et passende medium kan det kodede protein bli
 20 isolert enten fra mediet i tilfelle proteinet blir
 skilt ut i mediet eller fra vertsorganismen i tilfelle
 slike proteiner er til stede intracellulært ved frem-
 gangsmåter kjent innen faget for proteinopprensning
 eller beskrevet i tilfelle av en fytase, for eksempel i
 25 EP 420 358.

Når det er fremskaffet kan polypeptidet i figur 2
 ifølge foreliggende oppfinnelse blir særpreget med hen-
 syn til sine egenskaper som gjør dem anvendelige i ag-
 rikultur ethvert assay kjent innen faget og beskrevet
 30 av for eksempel Simons et al. [*Br. J. Nutr.* 64, 525-540
 (1990)], Schöner et al. [*J. Anim. Physiol. A. Anim.*
Nutr. 66, 248-255 (1991)], Vogt [*Arch. Geflügelk.* 56,
 93-98 (1992)], Jongbloed et al [*J. Anim. Sci.*, 70,
 1159-1168 (1992)], Perney et al. [*Poultry Sci.* 72, 2106-
 35 2114 (1993)], Farrell et al., [*J. Anim. Physiol.a.*
Anim. Nutr. 69, 278-283 (1993), Broz et al., [*Br.*

Poultry Sci. 35, 273-280 (1994)) og Dünghoef et al. [Animal Feed Sci. Technol. 49, 1-10 (1994) kan bli brukt.

5 Generelt kan polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse bli benyttet uten å være begrenset til et spesielt anvendelsesområde, for eksempel i tilfelle med fytaser for omdannelsen av inositolpolyfosfater, lik fytat til inositol og uorganisk fosfat.

10 Videre kan polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse bli brukt i en fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning eller sammensatt matvare eller for hvor komponentene av en slik sammensetning blir blandet med ett eller flere polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse. Følgelig er sammensatte matvarer
15 eller for eller farmasøytiske sammensetninger omfattende ett eller flere polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse også et mål for foreliggende oppfinnelse. Fagmannen kjenner fremgangsmåten for deres fremstilling. Slike farmasøytiske sammensetninger eller sammensatte matvarer eller for kan ytterligere omfatte ad-
20 ditiver eller komponenter som generelt blir brukt for slike formål og som er kjent innen faget.

Før foreliggende oppfinnelse blir beskrevet i større detalj blir en kort forklaring av tabellene og de med-
25 følgende figurer gitt nedenfor.

Tabell 1: Vektverdier av aminosyresekvensene av de anvendte fungale fytaser. Tabellen viser vektverdiene som benyttes for å regne ut konsensussekvensen av de fungale fytaser.

30 Tabell 2: Homologi av de fungale fytaser. Aminosyresekvensene av fytasene benyttet ved sammenstillingen ble sammenlignet med programmet GAP (GCG-programpakke, 9; Devereux et al., 1984) ved å bruke standard parame-

tere. Sammenligningen ble begrenset til den del av sekvensen som også ble brukt for sammenstillingen (se tekst til fig. 1) som manglet signalpeptidet som var relativt divergent. Tallene over og under diagonalen
 5 representerer henholdsvis aminosyreidentitetene og likhetene.

Tabell 3: Homologi av aminosyresekvensen av fungal konsensusfytase til fytasene benyttet for dets utregning. Aminosyresekvensene av alle fytaser ble sammenlignet med den fungale konsensus fytasesekvens ved å
 10 bruke programmet GAP (GCG-programpakke, 9,0). Igjen ble sammenligningen begrenset til den del av sekvensen som ble brukt i sammenstillingen.

Tabell 4: Primere benyttet for innføringen av enkle mutasjoner i fungal konsensusfytase. For innføringen av hver mutasjon var to primere inneholdende den ønskende mutasjon nødvendig (se eksempel 8). De endrede triplerter er uthevet i tykke bokstaver.
 15

Tabell 5: Temperaturoptimum og T_m -verdi for fungal konsensusfytase og fytasene fra *A. fumigatus*, *A. niger*,
 20 *A. nidulans*, og *M. thermophila*. Temperaturoptima ble tatt fra fig. 3. ^a T_m -verdiene ble bestemt med differensiell skanning kalorimetri som beskrevet i eksempel 10 og vist i fig. 7.

Figur 1: Utregning av konsensus fytasesekvensen fra samstillingen fra nesten alle kjente fungale fytase aminosyresekvenser. Bokstavene representerer aminosy-
 25 reresiduer i en-bokstavkode. De følgende sekvenser ble benyttet for sammenstillingen: *phyA* fra *Aspergillus terreus* 9A-1 (Mitchell et al., 1997; fra aminosyre
 30 (aa)27), *phyA* fra *Aspergillus terreus* cbs116,46 (van Loon et al., 1997; fra aa 27), *phyA* fra *Aspergillus niger* var. *awamori* (Piddington et al., 1993; fra aa27), *phyA* fra *Aspergillus niger* T213; fra aa27), *phyA*

fra *Aspergillus niger* stamme NRRL3135 (van Hartingsveldt et al., 1993; fra aa27), *phyA* fra *Aspergillus fumigatus* ATCC 13073 (Pasamontes et al., 1997b; fra aa25), *phyA* fra *Aspergillus fumigatus* ATCC32722 (van Loon et al., 1997, fra aa27), *phyA* fra *Aspergillus fumigatus* ATCC58128 (Van Loon et al., 1997; fra aa27), *phyA* fra *Aspergillus fumigatus* ATCC26906 (van Loon et al., 1997; fra aa27), *phyA* fra *Aspergillus fumigatus* ATCC32239 (van Loon et al., 1997; fra aa30), *phyA* fra *Aspergillus nidulans* (Pasamontes et al., 1997a; fra aa25), *phyA* fra *Talaromyces thermophilus* (Pasamontes et al., 1997a; fra aa24), og *phyA* fra *Myceliophthora thermophila* (Mitchell et al., 1997; fra aa19). Sammenstillingen ble regnet ut ved å bruke programmet PILEUP.

Beliggenheten av tomområdene ble finjustert for hånd. Aminosyrer med stor forbokstav i sammenstillingen ved en gitt posisjon tilhører aminosyrebeliggenheten som etablerer konsensusresiduet. Uthevet under den utregnede konsensussekvens er aminosyresekvensen av den endelige konstruerte fungale konsensusfytase (Fcp) vist. Tomområdene i den utregnede konsensussekvens ble fylt inn for hånd i henhold til prinsippene angitt i eksempel 2.

Figur 2: DNA-sekvens av det fungale konsensusfytasegen (fcp) og av primerne syntetisert for genkonstruksjon. Den utregnede aminosyresekvens (fig. 1) ble omdannet til et DNA-sekvens ved å bruke programmet BACKTRANSLATE (Devereux et al., 1984) og kodonfrekvenstabellen av høyt uttrykte gjærgener (GCG-programpakken, 9,0). Signalpeptidet av fytasen fra *A. terreus* cbs ble fusert til *N*-terminalen. De uthevede baser representerer sekvensene av oligonukleotidene som ble benyttet for å danne genet. Navnene på de respektive oligonukleotider er anmerket over eller under sekvensen. De understrekkede baser representerer start- og stoppkodonene til genet. Basene som er skrevet i uthevet skrift viser de to innførte *Eco* RI-seter.

Figur 3: Temperaturoptimum av fungal konsensusfytase og andre fytaser anvendt for å regne ut konsensussekvensen. For bestemmelsen av temperaturoptimum ble fytasestandardassayet utført ved en serie av temperaturer mellom 37 og 85°C. Fytasene som ble benyttet var rensset i henhold til eksempel 5. ▽, fungal konsensusfytase; ▼, *fumigatus* 13073 fytase □, *A.niger* NRRL3135 fytase; O, *A. nidulans* fytase; ■, *A. terreus* 9A-1 fytase; ●, *A. terreus* cbs fytase.

10 Figur 4 Den pH-avhengige aktivitetsprofil av fungal konsensusfytase og av mutantene Q50L, Q50T og Q50G. Fytaseaktiviteten ble bestemt ved å bruke standardassayet i passende buffere (se eksempel 9) ved forskjellige pH-verdier. Kurve a) viser en sammenligning av fungal konsensusfytase (●) med mutantene Q50L (▽), Q50T (▼) og Q50G (O) i prosentvis aktivitet. Kurve b) viser en sammenligning mellom fungal konsensusfytase (O) og mutant Q50L (●) og Q50T (▽) ved å bruke den spesifikke aktivitet av de rensede enzymer uttrykt i *H. poly-*
20 *morpha*.

Figur 5: Den pH-avhengige aktivitetsprofil av mutantene Q50L, Y51N og Q50T, Y51N sammenlignet med mutantene Q50T og Q50L av fungal konsensusfytase. Fytaseaktiviteten ble bestemt ved å bruke standardassayet i passende buffere (se eksempel 9) ved forskjellige pH-verdier. Kurve a) viser innvirkningen av mutasjonen Y51N (●) på mutant Q50L (O). Kurve b) viser innvirkningen av samme mutasjon (●) på mutant Q50T (O).

30 Figur 6: Substratspesifisitet av fungal konsensusfytase og dets mutanter Q50L, Q50T og Q50G. Skalpene representerer den relative aktivitet sammenlignet med aktiviteten med fytinsyre (100%) med en mengde av kjente naturlige og syntetiske fosforylerte forbindelser.

Figur 7: Differensiell skanning kalorimetri (DSC) av fungal konsensusfytase og dets mutant Q50T. Proteinprøvene ble konsentrert til ca. 50-60 mg/ml og dialysert i utstrakt grad mot 10 mM natriumacetat, pH 5.0.

- 5 En konstant oppvarmingshastighet på 10°C pr. min. ble tilført opp til 90°C. DSC av konsensusfytase Q50T (øvre kurve) ga en smeltetemperatur på 78,9°C, hvilken er nesten identisk med smeltepunktet for fungal konsensusfytase (78,1°C, nedre kurve).

10 **Eksempler.**

Referanseeksempel.

Homologimodellering av *A. fumigatus* og *A. terreus* cbs116,46 fytase.

- Aminosyresekvensene av *A. fumigatus* og *A. terreus* cbs116,46 fytase ble sammenlignet med sekvensen til *A. niger* NRRL 3135 fytase (se fig. 1) for hvilke den tre-dimensjonale struktur hadde blitt bestemt med røntgenstrålekrystallografi.

- 20 En multippel aminosyresekvens-sammenstilling av *A. niger* NRRL3135 fytase, *A. fumigatus* fytase og *A. terreus* cbs116,46 fytase ble regnet ut med programmet "PILEUP" (Programmeny for the Wisconsin Package, versjon 8, september 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison Wisconsin, USA 53711). De tredimensjonale modeller for *A. fumigatus* fytase og *A. terreus* cbs116,46 fytase ble bygget ved å bruke strukturen av *A. niger* NRRL3135 fytase som templat og ved å bytte ut aminosyrene av *A. niger* NRRL3135 fytase i henhold til sekvenssammenstillingen til aminosyrer av *A. fumigatus* og *A. terreus* cbs116,46 fytaser. Modellkonstruksjonen og energioptimalisering ble utført ved å bruke programmet Moloc (Gerber og Müller, 1995). C-alfa posisjoner ble holdt fast bortsett fra for nye innsetninger/dele-

sjoner og i løkkeområder som ligger fjernt fra det aktive sete.

Kun små forskjeller hos de modellerte strukturer i forhold til den opprinnelige krystallstruktur kunne bli observert i utvendige løkker. Videre ble forskjellige substratmolekyler som i hovedsak opptrer på nedbrytningsveien av fytinsyre (*myo*-inositol-heksakisfosfat) av *Pseudomonas sp. bacterium* fytase og, så langt det er bestemt av *A. niger* NRRL3135 fytase (Cosgrove, 1980) konstruert og satt inn i hulrommet til det aktive sete hos hver fytasestruktur. Hver av disse substrater ble orientert i en hypotetisk bindingstilstand foreslått for sure histidinofsfater (Van Etten, 1982). Den saksende fosfatgruppe ble orientert mot det katalytiske essensielle His 59 for å danne det kovalente fosfoenzymintermediat. Oksygenet av substrat fosfoesterbindingen som vil bli protonert av Asp 339 etter spalting ble orientert mot protondonoren. Konformasjonell avslapning av den gjenværende strukturelle del av substratene så vel som de omliggende aktive seteresiduer ble utført ved energioptimalisering med programmet Moloc.

Basert på de strukturelle modeller ble residuene som peker inn i det aktive setehulrom identifisert. Mer enn halvparten, (60%) av disse posisjoner var identiske mellom disse tre fytaser, mens kun enkelte posisjoner ikke var konserverte (se fig. 1). Denne observasjonen kunne bli utvidet til fire ytterligere fytasesekvenser (*A. nidulans*, *A. terreus* 9A1, *Talaromyces thermophilus*, *Myceliophthora thermophila*).

30 **Eksempel 1**

Sammenstilling av aminosyresekvensen av de fungale fytaser.

Sammenstillingen ble regnet ut ved å bruke programmet PILEUP fra the Sequence Analysis Package Release 9,0 (Devereux et al., 1984) med standardparameteren (gap creation penalty 12, gap extension penalty 4). Beliggenheten av mellomrommene ble finjustert ved å bruke en tekstbehandler. De følgende sekvenser (se fig. 1) uten signalsekvensen ble benyttet for utviklingen av sammenstillingen ved å starte med aminosyren (aa) nevnt nedenfor:

- 10 *phyA*-genet fra *Aspergillus terreus* 9A1, aa27 (Mitchell et al., 1997)
phA-genet fra *Aspergillus terreus* cbs116,46, aa27 (van Loon et al., 1997)
phyA-genet fra *Aspergillus niger* var. *awamoro*, aa27
15 (Piddington et al., 1993)
phyA-genet fra *Aspergillus niger* T213, aa27
phyA-genet fra *Aspergillus niger* stamme NRRL3135, aa27 (van Hartingsveldt et al., 1993)
phyA-genet fra *Aspergillus fumigatus* ATCC 13073, aa26
20 (Pasamontes et al., 1997)
phyA-genet fra *Aspergillus fumigatus* ATCC 32722, aa26 (van Loon et al., 1997)
phyA-genet fra *Aspergillus fumigatus* ATCC 58128, aa26 (van Loon et al., 1997)
25 *phyA*-genet fra *Aspergillus fumigatus* ATCC 26906, aa26 (van Loon et al., 1997)
phyA-genet fra *Aspergillus fumigatus* ATCC 32239, aa30 (van Loon et al., 1997)
phyA-genet fra *Aspergillus nidulans*, aa25 (Roche nr.
30 RI288, Pasamontes et al., 1997a)
phyA-genet fra *Talaromyces thermophilus* ATCC 20186, aa24 (Pasamontes et al., 1997a)
phyA-genet fra *Myceliophthora thermophila*, aa19 (Mitchell et al., 1997)
- 35 Tabell 2 viser homologien fra fytasesekvensene nevnt ovenfor.

Eksempel 2Utregning av aminosyresekvensen av fungal konsensus fytaser.

Ved å bruke den utarbeidede sammenstilling av eksempel
 5 1 som input, ble konsensussekvensen regnet ut med programmet PRETTY fra the Sequence Analysis Package Release 9,0 (Devereux et al., 1984). PRETTY skriver ut sekvenser med sine kolonner sammenstilt og kan vise en konsensussekvens for sammenstillingen. En verdivekt
 10 som tar hensyn til likheten mellom aminosyresekvensen av de sammenstilte fytaser ble tilegnet alle sekvenser. Verdivekten ble satt slik at de kombinerte verdier for alle fytaser fra en sekvensundergruppe (samme opprinnelige art, men forskjellige stammer), for eksempel aminosyresekvensene av alle fytaser fra *A. fumigatus* ble
 15 på utvelgelsen satt med en, og dette betyr at hver sekvens tilfører en verdi på 1 delt med antallet stamme-
 sekvenser (se tabell 1). På denne måte var det mulig å
 20 forhindre at meget like aminosyresekvenser, for eksempel av fytasene fra forskjellige *A. fumigatus*-stammer dominerer den utregnede konsensussekvens.

Programmet PRETTY ble startet med de følgende parametre: Flerparten som definerer antallet verdier under hvilke det ikke er noen konsensus ble satt til 2,0.
 25 Terskelverdien som bestemmer den plasserende matriseverdi nedenfor med et aminosyreresiduum kan ikke verdisettes for en samling av residuer var satt til 2. PRETTY benyttet Pretty Pep. Cmp konsensus vektmatrisen for peptider.

30 Ti posisjoner fra sammenstillingen (pos. 46, 66, 82, 138, 162, 236, 276, 279, 280, 308; fig. 1) for hvilke programmet ikke var i stand til å bestemme et konsensusresiduum ble innfylt for hånd i henhold til de følgende regler: dersom et hyppigst forekommende residuum

eksisterte, ble dette residuum valgt (138, 236, 280); dersom en prevalent gruppe av kjemisk like eller tilsvarende residuer forekom, ble den hyppigst forekomne, eller dersom ikke tilgjengelig, et residuum av denne gruppe valgt (46,66,82,162,276,308). Dersom det fantes verken et prevalent residuum eller en prevalent gruppe ble et av de forekomne residuer valgt i henhold til vanlig antagelse angående deres innvirkning på proteinstabiliteten (279). Åtte andre posisjoner (132, 170, 204, 211, 275, 317, 384, 447; fig. 1) ble ikke fylt med aminosyreresiduet valgt av programmet, men normalt med aminosyrer som opptrer med samme frekvens som residuene som ble valgt av programmet. I de fleste tilfeller ble en lett undervektsetting av de tre *A. niger* sekvenser (summen av vektverdiene : 0,99) fjernet med disse korreksjoner.

Tabell 3 viser homologien av den utregnede fungale konsensusfytase aminosyresekvens til fytasesekvensene benyttet for utregningen.

20 **Eksempel 3**

Omdannelse av den fungale konsensusfytase aminosyresekvens til en DNA-sekvens

De første 26 aminosyreresiduer av *A. terreus* cbs116,46 fytase ble benyttet som signalpeptid, og følgelig fuser til N-terminalen av alle konsensusfytaser. For denne strekning benyttet søker en spesiell metode for å regne ut den tilsvarende DNA-sekvens. Purvis et al, (1987) foreslo at inkorporeringen av sjeldne kodoner i et gen har en innvirkning på foldeeffektiviteten av proteinet. Følgelig ble i det minste fordelingen av sjeldne kodoner i signalsekvensen av *A. terreus* cbs116,46 som ble benyttet for den fungale konsensusfytase og som er meget viktig for sekresjonen av proteinet, men omdannet til *S. cerevisiae* kodonanvendelse

overført til den nye signalsekvens dannet for ekspre-
sjon i *S. cerevisiae*. For de gjenværende deler av pro-
teinet benyttet søker kodonfrekvenstabellen for høyt
uttrykte *S. cerevisiae*-gener funnet fra GCG-programpak-
5 ken til å oversette den utregnede aminosyresekvens til
en DNA-sekvens.

Den resulterende sekvens av *fcp*-genet er vist i fig.2.

Eksempel 4

Konstruksjon og kloning av de fungale konsensus fytase- 10 gener.

Den utregnede DNA-sekvens av fungal konsensus fytase
ble delt i oligonukleotider på 85 bp, alternativt ved å
bruke sekvensen til sense og antisensekjeden. Alle
oligonukleotider overlapper 20 bp med sitt foregående
15 og sitt følgende oligonukleotid av den motstående
kjede. Beliggenheten av alle primere innkjøpt av
Microsynth, Balgach (Sveits) og innskaffet i en PAGE-
renset form er angitt i fig. 2.

I tre PCR-reaksjoner omfattet de syntetiserte oligonuk-
20 leotider hele genet. For PCR, ble High Fidelity Kit
fra Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim, Mann-
heim, Tyskland) og termocykler The Protokol™ fra AMS
Biotechnology (Europa)Ltd., (Lugano, Sveits) benyttet.

Oligonukleotid CP-1 til CP-10 (Mix. 1, fig. 2) ble
25 blandet til en konsentrasjon på 0,2 pMol/μl for hver
oligonukleotid. En andre oligonukleotidblanding (Blan-
ding 2) ble fremstilt med CP-9 til CP-22 (0,2 pMol/μl
for hvert oligonukleotid). I tillegg ble fire korte
primere benyttet i PCR-reaksjonene:

CP-a: *EcoRI*

5'-TAT ATG AAT TCA TGG GCG TGT TCG TC-3'

CP-b: 5'-TGA AAA GTT CAT TGA AGG TTT C-3'

5 CP-c: 5'-TCT TCG AAA GCA GTA CAA GTA C-3'

CP-e: 5'-TAT ATG AAT TCT TAA GCG AAA C-3'

PCR-reaksjon a:

10µl Mix 1 (2,0 pmol av hver
oligonukleotid)
10 2 µl nukleotider (10mM hver nukleotid)
2 µl primer CP-a (10 pmol/µl)
2µl primer CP-c (10 pmol/µl)
10,0 µl PCR buffer
0,75 µl polymeraseblanding
15 73,25 µl H₂O

PCR-reaksjon b:

10 µl Mix 2 (2,0 pmol av hver
oligonukleotid)
2 µl nukleotider (10 mM hver nukleotid)
20 2 µl primer CP-b (10 pmol/µl)
2 µl primer CP-e (10 pmol/µl)
10,0 µl PCR buffer
0,75 µl polymeraseblanding (2,6 U)
73,25 µl H₂O

25 Reaksjonsbetingelser for PCR-reaksjon a og b:

trinn 1 2 min - 45°C
trinn 2 30 sek. 72°C
trinn 3 30 sek. 94°C
trinn 4 30 sek. 52°C
30 trinn 5 1 min 72°C

Trinn 3 til 5 ble gjentatt 40 ganger.

PCR-produktene (670 og 905 bp) ble renset med agarose-gelelektroforese (0,9% agarose) og en etterfølgende gelestraksjon (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen, Hil-

den, Tyskland). De rensede DNA-fragmenter ble benyttet for PCR-reaksjonen c.

PCR-reaksjon c:

5 6 µl PCR-produkt av reaksjon a (≈50 ng)

 6 µl PCR-produkt av reaksjon b (≈50 ng)

 2 µl primer CP-a (10 pmol/µl)

 2 µl primer CP-e (10 pmol/µl)

 10,0 µl PCR-buffer

10 0,75 µl polymeraseblanding (2,6 U)

 73,25 µl H₂O

Reaksjonsbetingelser for PCR-reaksjon c:

 trinn 1 2 min - 94°C

 trinn 2 30 sek - 94°C

15 trinn 3 30 sek - 55°C

 trinn 4 1 min - 72°C

Trinn 2 til 4 ble gjentatt 31 ganger.

Det resulterende PCR-produkt (1,4 kb) ble rensert som nevnt ovenfor, spaltet med *Eco* RI og ligert i en *Eco* RI-spaltet og defosforylert pBsk(-)-vektor (Stratagene, La Jolla, CA, USA). 1 µl av legeringsblandingen ble benyttet for å transformere *E. coli* XL-1 kompetente celler (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Alle standard fremgangsmåter ble utført som beskrevet av Sambrook et al (1987). Det konstruerte fungal konsensus fytasegen (*fcp*) ble bekreftet med sekvensering (plasmid pBsk⁻ *fcp*).

20

25

Eksempel 5

Ekspresjon av det fungale konsensus fytasegen *fcp* og dets varianter i *Saccharomyces cerevisiae* samt deres opprenskning fra deres kultursupernatant.

30

Et fungalt konsensus fytasegen ble isolert fra plasmi-
det pBsk⁻fc_p ligert i *Eco* RI-setene av ekspresjonskas-
setten hos *Saccharomyces cerevisiae* ekspresjonsvektor
pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) eller subklonet
5 mellom den forkortede GAPFL (glyseraldehyd-3-fosfatde-
hydrogenase) promotoren og *pho5*-terminatoren som
beskrevet av Janes et al. (1990). Den korrekte orien-
tering av genet ble undersøkt med PCR. Transformasjo-
nen av *S.cerevisiae*-stammer, for eksempel INVSc1 (In-
10 vitrogen, San Diego, CA, USA) ble foretatt ifølge Hin-
nen et al. (1978). Enkle kolonier som inneholder fytase-
segenet under kontroll av GAPFL-promotoren ble valgt ut
og dyrket i 5 ml seleksjonsmedium (SD-uracil, Sherman
et al., 1986) ved 30°C under kraftig risting (250 rpm)
15 i en dag. Prekulturen ble så tilsatt til 500 ml YPD-
medium (Sherman et al., 1986) og dyrket under de samme
betingelser. Innføring av *gal 1* promotoren ble fore-
tatt i henhold til forhandlers instruksjon. Etter 4
dagers inkubering ble cellemediet sentrifugert (7000
20 rpm, GS3 rotor, 15 min, 5°C) for å fjerne cellene og
supernatanten ble konsentrert med ultrafiltrering i
Amicon 8400 celler (PM30-membraner) og ultrafri-15
sentrifugalfilteranordninger (Biomax-30K, Millipore,
Bedford, MA, USA). Konsentratet (10 ml) ble avsaltet
25 på en 40 ml Sephadex G25 Superfine-kolonne (Pharmacia
Biotech, Freiburg, Tyskland), med 10 mM natriumacetat,
pH 5,0 som virker som elueringsbuffer. Den avsaltede
prøve ble brakt til 2 M (NH₄)₂SO₄ og satt direkte på en
1 ml Butyl Sepharose 4 Fast Flow hydrofobinteraksjon
30 kromatografikolonne (Pharmacia Biotech, Feiburg,
Tyskland) som ble eluert med en lineær gradient fra 2 M
til 0 M (NH₄)₂SO₄ i 10 mM natriumacetat, pH 5,0. Fytat
ble eluert i gjennombruddet, konsentrert og satt på en
120 ml Sephacryl S-300 gel filtrerings kromatografiko-
35 lonne (Pharmacia Biotech, Freiburg, Tyskland). Fungal
konsensusfytase og fungal konsensusfytase 7 eluerte som
en homogen symmetrisk topp og ble vist med SDS-PAGE å
være omtrentlig 95% ren.

Eksempel 6Ekspresjon av de fungale konsensus fytasegener *fcg* og dets varianter i *Hansenula polymorpha*

Fytase ekspresjonsvektorene benyttet for å transformere
 5 *H. polymorpha* ble konstruert ved å sette inn *EcoRI*-
 fragmentet av pBsk⁻*fcg* som koder for konsensus fytasen
 eller en variant i det multiple kloningssete av *H. po-*
lymorpha ekspresjonsvektoren pFPMT121 som er basert på
 en *ura3* seleksjonsmarkør og *FMD*-promotoren. Den 5'-
 10 ende av *fcg*-genet fuseres til *FMD*-promotoren, 3'-ende
 til *MOX* terminatoren (Gellissen et al., 1996; EP 0299
 108B). Den resulterende ekspresjonsvektoren blir be-
 tegnet pFPMT*fcg* og pBsk⁻*fcg*7.

De konstruerte plasmider ble formert i *E.coli*. Plas-
 15 mid-DNA ble rensert ved å bruke standard utføring av
 fremgangsmåtene innen faget. Ekspresjonsplasmidene ble
 transformert i *H. polymorpha*-stamme RP11 som er defisi-
 ente i orotidin-5'-fosfat dekarboksylase (*ura3*) ved å
 bruke fremgangsmåten for fremstilling av kompetente
 20 celler og for transformasjon av gjær som beskrevet i
 Gellissen et al, (1996). Hver transformasjonsblanding
 ble sådd ut på YNB (0,14% w/v Difco YNB og 0,5% ammoni-
 umsulfat) inneholdende 2% glukose og 1,8% agar og ble
 inkubert ved 37°C. Etter 4 til 5 dager ble individu-
 25 elle transformantkolonier plukket ut og dyrket i det
 flytende medium beskrevet ovenfor i 2 dager ved 37°C.
 Derpå ble en porsjon av denne kultur benyttet for å in-
 okulere ferske begre med YNB-medium inneholdende 2%
 glukose. Etter 7 ytterligere passasjer i selektivt me-
 30 dium integrerer ekspresjonsvektoren i gjærgenomet i
 multimer form. Derpå ble mitotisk stabile transforman-
 ter fremskaffet ved 2 ytterligere dyrkningstrinn i 3 ml
 ikke-selektivt flytende medium (YPD, 2% glukose, 10 g
 gjærekstrakt og 20 g pepton). For å fremskaffe gene-
 35 tisk homogene rekombinante stammer ble en porsjon fra

siste stabiliseringskultur sådd ut på en selektiv plate. Enkle kolonier ble isolert for analyse av fyta-
 seekspresjonen i YNB inneholdende 2% glyserol i stedet
 for glukose for å undertrykke *fmd*-promotoren. Opp-
 5 rensning av de fungale konsensusfytaser ble foretatt
 som beskrevet i eksempel 5.

Eksempel 7

Ekspresjon av de fungale konsensusgener *fcp* og dets va- rianter i *Aspergillus niger*

10 Plasmid pBsk⁻*fcp* eller det tilsvarende plasmid av en
 variant av *fcp*-genet ble benyttet som templat for inn-
 føringen av et Bsp HI-sete oppstrøms for startkodon av
 genene og et Eco RV-sete nedstrøms for stopp-kodonet.
 15 The Expand™ High Fidelity PCR Kit (Boehringer Mann-
 heim, Mannheim, Tyskland) ble brukt med de følgende
 primere:

Primer Asp-1:

Bsp HI

5'-TAT ATC ATG AGC GTG TTC GTC GTG CTA CTG TTC-3'

20 Primer Asp-2 for kloning av *fcp* og *fcp7*:

3'-ACC CGA CTT ACA AAG CGA ATT CTA TAG ATA TAT-5'

Eco RV

Reaksjonen ble utført som beskrevet av forhandler. Det
 PCR-amplifiserte *fcp*-genet hadde et nytt *Bsp* HI-sete
 25 ved startkodonet, innført med primer Asp-1, noe som re-
 sulterte i en erstatning av det andre aminosyreresi-
 duumglyserin ved serin. Derpå ble DNA-fragmentet spal-
 tet med *Bsp* HI og *Eco* RV og ligert i *Nco* I-sete ned-
 strøms for glukoamylasepromotoren av *Aspergillus niger*
 30 (*glaA*) og *Eco* RV-sete oppstrøms for *Aspergillus nidu-*
lans-tryptofan C terminator (*trpC*) (Mullaney et al.,

1985). Etter dette kloningstrinn ble genene sekvensert for å påvise mulige feil innført med PCR. De resulterende ekspresjonsplasmider som i hovedsak tilsvarende pGLAC-vektoren som beskrevet i eksempel 9 av EP 684 313 inneholdt orotidin-5'-fosfat dekarboksylasegenet (*pyr4*) av *Neurospora crassa* som en seleksjonsmarkør. Transformasjon av *Aspergillus niger* og ekspresjon av konsensus fytasegenene ble foretatt som beskrevet i EP 684 313. De fungale konsensus fytaser ble rensset som beskrevet i eksempel 5.

Eksempel 8

Konstruksjon av muteiner av fungal konsensus fytase

For å konstruere muteiner for ekspresjon i *A. niger*, *S. cerevisiae* eller *H. polymorpha* ble det tilsvarende ekspresjonsplasmid inneholdende det fungale konsensus fytasegenbenyttet som templat for seterettet mutagenese. Mutasjoner ble innført ved å bruke "quick exchangeTM site-directed mutagenesis kit" fra Stratagene (La Jolla, CA, USA) ved å følge forhandlers retningslinjer og ved å bruke de tilsvarende primere. Alle mutasjoner som ble foretatt og de tilsvarende primere er oppsummert i tabell 4. Kloner som inneholder den ønskede mutasjon ble identifisert med DNA-sekvensanalyse som kjent innen faget. Den muterte fytase ble bekreftet ved sekvensering av det fullstendige gen.

Eksempel 9

Bestemmelse av fytaseaktiviteten og av temperaturoptimum for konsensus fytasen samt dets varianter

Fytaseaktivitet ble bestemt i hovedsak som beskrevet av Mitchell et al., (1997). Aktiviteten ble målt i en assayblanding inneholdende 0,5% fytinsyre (≈ 5 mM), 200 mM natriumacetat, pH 5,0. Etter 15 min. inkubering ved

37°C ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av et likt volum 15% trikloreddiksyre. Det frigjorte fosfat ble mengdebestemt ved å blande 100 µl av assayblandingen med 900 µl H₂O og 1 ml 0,6 M H₂SO₄, 2% askorbinsyre og 5 0,5% ammoniummolybdat. Standardoppløsninger av kaliumfosfat ble benyttet som referanse. En enhet enzymaktivitet ble definert som mengden enzym som frigjør 1 µmol fosfat pr. min. ved 37°C. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved å bruke enzymekstinksjonskoeffisienten ved 10 280 nm utregnet ifølge Pace et al. (1995); fungal konsensus fytase, 1,101; fungal konsensus fytase 7, 1,068.

I tilfelle med pH-optimumskurver ble rensede enzymer fortynnet i 10 mM natriumacetat, pH 5,0. Inkuberinger ble startet ved å blande porsjoner av det fortyndede 15 protein med et likt volum 1% fytinsyre (≈10 mM) i en serie av forskjellige buffere: 0,4 M glysin/HCl, pH 2,5; 0,4 M acetat/NaOH, pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5; 0,4 M imidazol/HCl, pH 6,0, 6,5; 0,4 M Tris/HCl pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. Kontrollforsøk viste at pH 20 kun ble lite påvirket av blandingstrinnet. Inkuberingen ble utført i 15 min. ved 37°C som beskrevet ovenfor.

For bestemmelse av substratspesifisitetene for fytasene ble fytinsyre i assayblandingen erstattet med 5 mM konsentrasjoner av de respektive fosfatforbindelser. Ak- 25 tivitetsforsøkene ble utført som beskrevet ovenfor.

For bestemmelse av temperaturoptimum, ble enzym (100 µl) og substratoppløsning (100 µl) pre-inkubert i 5 min. ved den gitte temperatur. Reaksjonen ble startet ved tilsetning av substratoppløsningen til enzymet. 30 Etter 15 min. inkubering ble reaksjonen stoppet med trikloreddiksyre og mengden av frie fosfat bestemt.

pH-optimum av den opprinnelige fungale konsensus fytase var omkring pH 6,0 - 6,5 (70 U/mg). Ved innføring av Q50T-mutasjonen skiftet pH-optimum til pH 6,0 (130

- U/mg) mens erstatningen med et leucin ved samme posisjon resulterte i en maksimumsaktivitet omkring pH 5,5 (212 U/mg). Utbyttet av Q50G resulterte i en pH-optimum av aktiviteten over pH 6,0 (se fig. 4). Utbyttet av tyrosin ved posisjon 51 med asparagin resulterte i en relativ økning av aktiviteten under pH 5,0 (se fig. 5). Spesielt ved Q50L mutasjonen ble spesifisiteten for fytat av fungal konsensus fytase drastisk øket (se fig. 6).
- 10 Temperaturoptimum av fungal konsensus fytase (70°C) var 15-25°C høyere enn temperaturoptimum for villtypefytasene (45-55°C) noe som ble benyttet for å regne ut konsensussekvensen (se tabell 5 og fig. 3).

Eksempel 10

- 15 Bestemmelse av smeltepunktet med differensiell skanningkalorimetri (DSC)

For å bestemme utfoldingstemperaturen av de fungale konsensus fytaser ble differensiel skanning kalorimetri benyttet som tidligere publisert av Brugger *et al* (1997). Oppløsninger av 50-60 mg/ml homogen fytase ble benyttet for forsøkene. En konstant oppvarmingshastighet på 10°C/min ble tilført opp til 90°C.

25 De bestemte smeltepunkter viser klart den sterkt forbedrede termostabilitet av den fungale konsensus fytase sammenlignet med villtypefytasene. (se tabell 5 og fig. 7). Figur 7 viser smelteprofilen av fungal konsensus fytase og dets mutant Q50T. Dets vanlige smeltepunkt ble bestemt mellom 78 - 79°C.

Referanser:

- van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O. R., Venema & G., Eijsink, V. G. H. (1998). Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **95**, 2056-2060.
- Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N. & Oshima, T. (1998). Serial increase in the thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* by experimental evolution. *Prot. Sci.* **7**, 698-705.
- 10 Matthews, B. W. (1993). Structural and genetic analysis of protein stability. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 139-160.
- Serrano, L., Day, A. G. & Fersht, A. R. (1993). Stepwise mutation of barnase to binase. A procedure for engineering increased stability of proteins and an experimental analysis of the evolution of protein stability. *J. Mol. Biol.* **233**, 304-312.
- 15 Matthews, B. W. (1987a). Genetic and structural analysis of the protein stability problem. *Biochemistry* **26**, 6885-6888.
- 20 Sauer, R., Hehir, K., Stearman, R., Weiss, M., Jeitler-
Nilsson, A., Suchanek, E. & Pabo, C. (1986). An engineered intersubunit disulfide enhances the stability and DNA binding of the N-terminal domain of λ -repressor. *Biochemistry* **25**, 5992-5999.
- 25 Margarit, I., Campagnoli, S., Frigerio, F., Grandi, G.,
Fillipis, V. D. & Fontana, A. (1992). Cumulative stabilizing effects of glycine to alanine substitutions in *Bacillus subtilis* neutral protease. *Prot. Eng.* **5**, 543-550.

- Matthews, B. W., Nicholson, H. & Becktel, W. (1987). Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **84**, 6663-6667.
- 5 Blaber, M., Lindstrom, J. D., Gassner, N., Xu, J.,
Heinz, D. W. & Matthews, B. W. (1993). Energetic cost
and structural consequences of burying a hydroxyl group
within the core of a protein determined from Ala→Ser
and Val→Thr substitutions in T4 lysozyme. *Biochemistry*
10 **32**, 11363-11373.
- Karpusas, M., Baase, W. A., Matsumura, M. & Matthews,
B. W. (1989). Hydrophobic packing in T4 lysozyme probed
by cavity-filling mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*
86, 8237-8241.
- 15 Munoz, V. & Serrano, L. (1995). Helix design, predic-
tion and stability. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 382-386.
- Arase, A., Yomo, T., Urabe, I., Hata, Y., Katsube, Y. &
Okada, H. (1993). Stabilization of xylanase by random
mutagenesis. *FEBS Lett.* **316**, 123-127.
- 20 Risse, B., Stempfer, G., Rudolph, R., Schumacher, G. &
Jaenicke, R. (1992). Characterization of the stability
effect of point mutations of pyruvate oxidase from *Lac-
tobacillus plantarum*: protection of the native state by
modulation coenzyme binding and subunit interaction.
25 *Prot. Sci.* **1**, 1710-1718.
- Imanaka, T., Shibasaki, M. & Takagi, M. (1986). A new
way of enhancing the thermostability of proteases. *Nature*
324, 695-697.
- Pantoliano, M. W., Landner, R. C., Brian, P. N., Rol-
lence, M. L., Wood, J. F. & Poulos, T. L. (1987). Pro-
tein engineering of subtilisin BPN': enhanced stabili-

zation through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond. *Biochemistry* **26**, 2077-2082.

Steipe, B., Schiller, B., Plueckthun, A. & Steinbach, S. (1994). Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *J. Mol. Biol.* **240**, 188-192.

Mitchell, D. B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L. & van Loon, A. P. G. M. (1997) The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*, *Microbiology* **143**, 245-252.

van Loon, A. P. G. M., Simoes-Nunes, C., Wyss, M., Tomschy, A., Hug, D., Vogel, K. & Pasamontes, L. (1997). A heat resistant phytase of *Aspergillus fumigatus* with superior performance in animal experiments. Phytase optimization and natural variability. In *Proceedings book of the workshop on plant phytate and phytases*. Kluwer Academic Press.

Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. & van Loon, A. P. G. M. (1997) Cloning, purification and characterization of a heat stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1696-1700.

Pasamontes, L., Haiker, M., Henriquez-Huecas, M., Mitchell, D. B. & van Loon, A. P. G. M. (1997a). Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1353**, 217-223.

Piddington, C. S., Houston, C. S., Paloheimo, M., Cantrell, M., Miettinen-Oinonen, A. Nevalainen, H., & Rambosek, J. (1993) The cloning and sequencing of the

genes encoding phytase (*phy*) and pH 2,5-optimum acid phosphatase (*apf*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Gene* **133**, 55-62.

van Hartingsveldt, W., van Zeijl, C. M. F., Harteveld,
5 G. M., Gouka, R. J., Suykerbuyk, M. E. G., Luiten, R.
G. M., van Paridon, P. A., Selten, G. C. M., Veenstra,
A. E., van Gorcom, R. F. M., & van den Hondel, C. A. M.
J. J. (1993) Cloning, characterization and overexpres-
sion of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus*
10 *niger*. *Gene* **127**, 87-94.

Gerber, P. and Müller, K. (1995) Molocmolecular mode-
ling software. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **9**, 251-268.

Van Etten, R. L. (1982) Human prostatic acid phosphat-
15 es: a histidine phosphatase. *Ann. NY Acad. Sci.* **390**,
27-50.

Cosgrove, D. J. (1980) Inositol phosphates - their che-
mistry, biochemistry and physiology: studies in organic
chemistry, chapter 4. Elsevier Scientific Publishing
Company, Amsterdam, Oxford, New York.

20 Devereux, J., Haerberli, P. & Smithies, O. (1984) A
comprehensive set of sequence analysis programs for the
VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.

Purvis, I. J., Bettany, A. J. E., Santiago, T. C., Cog-
gins, J. R., Duncan, K., Eason, R. & Brown, A. J. P.
25 (1987). The efficiency of folding of some proteins is
increased by controlled rates of translation *in vivo*.
J. Mol. Biol. **193**, 413-417.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Mo-
lecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold
30 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Janes, M., Meyhack, B., Zimmermann, W. & Hinnen, A. (1990) the influence of GAP promoter variants on hiru-
dine production, average plasmid copy number and cell
growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **18**,
5 97-103.
- Hinnen, A., Hicks, J. B. & Fink, G. R. (1978) Transfor-
mation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-
1933.
- Sheman, J. P., Finck, G. R. & Hicks, J. B. (1986) Labo-
10 ratory course manual for methods in yeast genetics.
Cold Spring Harbor University.
- Gellissen, G., Piontek, M., Dahlems, U., Jenzelewski,
V., Gavagan, J. E., DiCosimo, R., Anton, D. I. &
Janowicz, Z. A. (1996) Recombinant *Hansenula polymorpha*
15 as a biocatalyst: coexpression of the spinach glycolate
oxidase (*GO*) and the *S. cerevisiae* catalase T (*CTT1*)
gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 46-54.
- Mullaney, E. J., Hamer, J. E., Roberti, K. A., Yelton,
M. M. & Timberlake, W. E. (1985) Primary structure of
20 the *trpC* gene from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen.*
Genet. **199**, 37-46.
- Pace, N. C., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray,
T. (1995). How to measure and predict the molar absorp-
tion coefficient of a protein. *Prot. Sci.* **4**, 2411-2423.
- 25 Brugger, R., Mascarello, F., Augem, S., van Loon, A. P.
G. M. & Wyss, M. (1997). Thermal denaturation of fungal
phytases and pH 2,5 acid phosphatase studied by diffe-
rential scanning calorimetry. In *Proceedings book on*
the workshop on plant phytate and phytase. Kluwer Aca-
30 demic Press.

Tabell 1

	<i>Aspergillus terreus</i> 9A-1 fytase:	0,50
	<i>Aspergillus terreus</i> cbs 116,46 fytase:	0,50
	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i> fytase:	0,3333
5	<i>Aspergillus niger</i> T213 fytase:	0,3333
	<i>Aspergillus niger</i> NRRL3135 fytase:	0,3333
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 13073 fytase:	0,20
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 32722 fytase:	0,20
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 58128 fytase:	0,20
10	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 26906 fytase:	0,20
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 32239 fytase:	0,20
	<i>Aspergillus nidulans</i> fytase:	1,00
	<i>Talaromyces thermophilus</i> ATCC 20186 fytase:	1,00
	<i>Myceliophthora thermophila</i> fytase:	1,00

Tabell 2

% identitet

	A. terreus 9A-1	A. terreus cbs-116,46	A. niger NRRL 3115	A. fumigatus 13073	A. nidulans	T. thermophilus	M. thermophila
A. terreus 9A-1		89,1	62,0	60,6	59,3	58,3	48,6
A. terreus cbs	90,7		63,6	62,0	61,2	59,7	49,1
A. niger NRRL 3135	67,3	68,9		66,8	64,2	62,5	49,4
A. fumigatus 13073	66,1	67,2	71,1		68,0	62,6	53,0
A. nidulans	65,0	66,7	69,0	73,3		60,5	52,5
T. thermophilus	63,8	64,5	68,9	68,1	67,4		49,8
M. thermophila	53,7	54,6	57,6	61,0	59,9	57,8	

% likhet

Tabell 3:

Fytase	Identitet [%]	Likhet [%]
<i>A. niger</i> T213	76,6	79,6
<i>A. niger</i> var <i>awamoni</i>	76,6	79,6
<i>A. niger</i> NRRL3135	76,6	79,4
<i>A. nidulans</i>	77,4	81,5
<i>A. terreus</i> 9A-1	70,7	74,8
<i>A. terreus</i> cbs116,46	72,1	75,9
<i>A. fumigatus</i> 13073	80,0	83,9
<i>A. fumigatus</i> 32239	78,2	82,3
<i>T. thermophilus</i>	72,7	76,8
	58,3	64,5
<i>M. thermophila</i>		

Tabell 4

Mutasjon	Primer sett
Q50L	<i>Ssp</i> BI 5'-CAC TTG TGG GGT TTG TAC AGT CCA TAC TTC TC-3' 5'-GAG AAG TAT GGA CTG TAC AAA CCC CAC AAG TG-3'
5	
Q50T	<i>Kpn</i> I 5'-CAC TTG TGG GGT ACC TAC TCT CCA TAC TTC TC-3' 5'-GA GAA GTA TGG AGA GTA GGT ACC CCA CAA GTG-3'
Q50G	5'-CAC TTG TGG GGT GGT TAC TCT CCA TAC TTC TC-3' 5'-GA GAA GTA TGG AGA GTA ACC ACC CCA CAA GTG-3'
10	
	<i>Kpn</i> I
Q50T-Y51N	5'-CAC TTG TGG GGT ACC AAC TCT CCA TAC TTC TC-3' 5'-GA GAA GTA TGG AGA GTT GGT ACC CCA CAA GTG-3'
	<i>Bsa</i> I
15 Q50L-Y51N	5'-CAC TTG TGG GGT CTC AAC TCT CCA TAC TTC TC-3' 5'-GA GAA GTA TGG AGA GTT GAG ACC CCA CAA GTG-3'

Tabell 5

fyttase	temperatur-optimum	T _m ^a
Konsensus fyttase	70°C	78,0°C
<i>A.niger</i> NRRL3135	55°C	63,3°C
<i>A.fumigatus</i> 13073	55°C	62,5°C
<i>A.terreus</i> 9A-1	49°C	57,5°C
<i>A.terreus</i> cbs	45°C	58,5°C
<i>A.nidulans</i>	45°C	55,7°C
<i>M.thermophila</i>	55°C	-

Patentkrav

1. Konsensusprotein
k a r a k t e r i s e r t v e d a t det har amino-
syresekvens som er vist i fig. 2 eller enhver variant
5 derav hvori variantenes grunnegenskaper slik som enzym-
aktivitet (type og spesifikk aktivitet), termostabili-
tet, aktivitet i et visst pH-område (pH-stabilitet)
ikke er betydelig endret.
2. Konsensusprotein ifølge krav 1,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d a t i aminosyre-
sekvensen fra fig. 2 har de følgende erstatninger blitt
utført: Q50L, Q50T, Q50G, Q50T-Y51N eller Q50L-Q51N.
3. Matvare, fôr eller farmasøytisk sammensetning
k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter
15 et konsensusprotein ifølge krav 1 eller 2.

	1				50
<i>A. terreus</i> 9A-1	KhsDCNSVDh	GYQCFPELSH	kWGLYAPYFS	LQDESPPFLD	VPEDChITfV
<i>A. terreus</i> cbs	NhsDCTSVDr	GYQCFPELSH	kWGLYAPYFS	LQDESPPFLD	VPDDChITfV
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	NqsTCDTVDQ	GYQCFSETSH	LWGQYAPFFS	LANESAISPD	VPAGC-VTFA
<i>A. niger</i> T213	NqsSCDTVDQ	GYQCFSETSH	LWGQYAPFFS	LANESVISPD	VPAGC-VTFA
<i>A. niger</i> NRRL3135	NqsSCDTVDQ	GYQCFSETSH	LWGQYAPFFS	LANESVISPE	VPAGC-VTFA
<i>A. fumigatus</i> 13073	GSkSCDTVDI	GYQCsPATSH	LWGQYSPFFS	LEDELSVSSK	LPKDC-ITLV
<i>A. fumigatus</i> 32722	GSkSCDTVDI	GYQCsPATSH	LWGQYSPFFS	LEDELSVSSK	LPKDC-ITLV
<i>A. fumigatus</i> 58128	GSkSCDTVDI	GYQCsPATSH	LWGQYSPFFS	LEDELSVSSK	LPKDC-ITLV
<i>A. fumigatus</i> 26906	GSkSCDTVDI	GYQCsPATSH	LWGQYSPFFS	LEDELSVSSK	LPKDC-ITLV
<i>A. fumigatus</i> 32239	GSkACDTVEI	GYQCsPGTSH	LWGQYSPFFS	LEDELSVSSD	LPKDC-VTFV
<i>A. nidulans</i>	QNHSCNTADG	GYQCFPNVSH	VWGQYSPYFS	IEQESAISeD	VPHGCeVTFV
<i>T. thermophilus</i>	DSHSCNTVEG	GYQCrPEISH	sWGQYSPFFS	LADQSEISPD	VPQNCkITfV
<i>M. thermophila</i>	ESRPCDTpDI	GFQCgTAISH	FWGQYSPYFS	VpSElDaS..	IPDDCeVTFa
Consensus	NSHSCDTVDG	GYQCFPEISH	LWGQYSPYFS	LEDESAISPD	VPDDC-VTFV
Consensus fytase	NSHSCDTVDG	GYQCFPEISH	LWGQYSPYFS	LEDESAISPD	VPDDCRVTFV

	51				100
<i>A. terreus</i> 9A-1	QVLARHGArS	PTHSKtKAYA	AtIAAIQKSA	TaFpGKYAFL	QSYNYSLDSE
<i>A. terreus</i> cbs	QVLARHGArS	PTDSKtKAYA	AtIAAIQKNA	TaLpGKYAFL	KSYNYSMGSE
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	QVLSRHGARY	PTESKgKkYS	ALIEEIQQNV	TtFDGKYAFL	KTYNYSLGAD
<i>A. niger</i> T213	QVLSRHGARY	PTESKgKkYS	ALIEEIQQNV	TtFDGKYAFL	KTYNYSLGAD
<i>A. niger</i> NRRL3135	QVLSRHGARY	PTDSKgKkYS	ALIEEIQQNA	TtFDGKYAFL	KTYNYSLGAD
<i>A. fumigatus</i> 13073	QVLSRHGARY	PTSSKsKkYK	kLVTAIQaNA	TdFKGKFAFL	KTYNYTLGAD
<i>A. fumigatus</i> 32722	QVLSRHGARY	PTSSKsKkYK	kLVTAIQaNA	TdFKGKFAFL	KTYNYTLGAD
<i>A. fumigatus</i> 58128	QVLSRHGARY	PTSSKsKkYK	kLVTAIQaNA	TdFKGKFAFL	KTYNYTLGAD
<i>A. fumigatus</i> 26906	QVLSRHGARY	PTSSKsKkYK	kLVTAIQaNA	TdFKGKFAFL	KTYNYTLGAD
<i>A. fumigatus</i> 32239	QVLSRHGARY	PTASKsKkYK	kLVTAIQKNA	TeFKGKFAFL	ETNYNYTLGAD
<i>A. nidulans</i>	QVLSRHGARY	PTESKsKAYS	GLIEAIQKNA	TsFwGQYAFL	ESYNYTLGAD
<i>T. thermophilus</i>	QLLSRHGARY	PTSSKtELYS	QLISrIQKTA	TaYKgyYAFL	KDYrYqLGAN
<i>M. thermophila</i>	QVLSRHGARA	PTIKRaaSYv	DLIDrIHhGA	IsYgPgYEFL	RTYDYTLGAD
Consensus	QVLSRHGARY	PTSSK-KAYS	ALIEAIQKNA	T-FKGKYAFL	KTYNYTLGAD
Consensus fytase	QVLSRHGARY	PTSSKSKAYS	ALIEAIQKNA	TAFKGKYAFL	KTYNYTLGAD

	101				150
<i>A. terreus</i> 9A-1	ELTPFGrNQL	rDlGaQFYeR	YNALTRhInP	FVRATDASRV	hESAeKFVEG
<i>A. terreus</i> cbs	NLTPFGrNQL	qDlGaQFYRR	YDTLTRhInP	FVRAADSSRV	hESAeKFVEG
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	DLTPFGEQEL	VNSGIKfYQR	YESLTRNIIP	FIRSSGSSRV	IASGEKfIEG
<i>A. niger</i> T213	DLTPFGEQEL	VNSGIKfYQR	YESLTRNIIP	FIRSSGSSRV	IASGEKfIEG
<i>A. niger</i> NRRL3135	DLTPFGEQEL	VNSGIKfYQR	YESLTRNIIVP	FIRSSGSSRV	IASGKKfIEG
<i>A. fumigatus</i> 13073	DLTPFGEQOL	VNSGIKfYQR	YKALARSVVP	FIRASGSDRV	IASGEKfIEG
<i>A. fumigatus</i> 32722	DLTPFGEQOL	VNSGIKfYQR	YKALARSVVP	FIRASGSDRV	IASGEKfIEG
<i>A. fumigatus</i> 58128	DLTPFGEQOL	VNSGIKfYQR	YKALARSVVP	FIRASGSDRV	IASGEKfIEG
<i>A. fumigatus</i> 26906	DLTAFGEQOL	VNSGIKfYQR	YKALARSVVP	FIRASGSDRV	IASGEKfIEG
<i>A. fumigatus</i> 32239	DLTPFGEQOM	VNSGIKfYQK	YKALAgSVVP	FIRSSGSDRV	IASGEKfIEG
<i>A. nidulans</i>	DLTIFGENQM	VDSGakFYRR	YKNLARKnTP	FIRASGSDRV	VASAEKfING
<i>T. thermophilus</i>	DLTPFGENQM	IQlGikfYnH	YKSLARNaVP	FVRCSGSDRV	IASGrIFIEG
<i>M. thermophila</i>	ELTRtGQQQM	VNSGIKfYRR	YRALARKsIP	FVRTAGqDRV	VhSAENfTOG
Consensus	DLTPFGENQM	VNSGIKfYRR	YKALARK-VP	FVRASGSDRV	IASAEKfIEG
Consensus fytase	DLTPFGENQM	VNSGIKfYRR	YKALARKIVP	FIRASGSDRV	IASAEKfIEG

	151				200
<i>A. terreus</i> 9A-1	FQTARqDDHh	ANpHQPSPrV	DVaIPEGSAY	NNTLEHSICT	AFES...STV
<i>A. terreus</i> cbs	FQNAARqGDFh	ANpHQPSPrV	DVVIPEGTAY	NNTLEHSICT	AFEA...STV
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	FQSTKlkDPr	AqpgQSSPKI	DVVISEASSs	NNTLDPGTCT	VFED...SEL
<i>A. niger</i> T213	FQSTKlkDPr	AqpgQSSPKI	DVVISEASSs	NNTLDPGTCT	VFED...SEL
<i>A. niger</i> NRRL3135	FQSTKlkDPr	AqpgQSSPKI	DVVISEASSs	NNTLDPGTCT	VFED...SEL
<i>A. fumigatus</i> 13073	FQqAKLADPG	A.TNRAAPAI	SVIIPSETF	NNTLDHGVCT	KFEA...SQL
<i>A. fumigatus</i> 32722	FQqAKLADPG	A.TNRAAPAI	SVIIPSETF	NNTLDHGVCT	KFEA...SQL
<i>A. fumigatus</i> 58128	FQqAKLADPG	A.TNRAAPAI	SVIIPSETF	NNTLDHGVCT	KFEA...SQL
<i>A. fumigatus</i> 26906	FQqAKLADPG	A.TNRAAPAI	SVIIPSETF	NNTLDHGVCT	KFEA...SQL
<i>A. fumigatus</i> 32239	FQqANVADPG	A.TNRAAPVI	SVIIPSETY	NNTLDHSVCT	NFEA...SEL
<i>A. nidulans</i>	FRKAQLhDHG	S..gQATPVV	NVIIPeIDGF	NNTLDHSTCV	SFEN...DEr
<i>T. thermophilus</i>	FQSAKVLDPH	SDkHDAPPTI	NVIIeEGPSY	NNTLDcGSCP	VFED...SSg
<i>M. thermophila</i>	FHSALLADRG	STvRPTiPyd	mVVIPETAGa	NNTLHNDICT	AFEEgpySTI

Consensus	FQSAKLADPG	S-PHQASPVI	NVIIPEGSY	NNTLDHGTCT	AFED---SEL
Consensus <i>fyase</i>	FQSAKLADPG	SOPHQASPVI	DVIIPEGSY	NNTLDHGTCT	AFED...SEL

	201				250
<i>A. terreus</i> 9A-1	GDDAvANFTA	VFAPAIaQRL	EADLPGVqLS	TDDVvNLmAM	CPFETVSITD
<i>A. terreus</i> cbs	GDDAADNFTA	VFAPAIakRL	EADLPGVqLS	ADDVvNLmAM	CPFETVSITD
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	ADTVEANFTA	TFAPSIQRL	ENDLSGVTLT	DTEVTyLMDM	CSFDTIScST
<i>A. niger</i> T213	ADTVEANFTA	TFAPSIQRL	ENDLSGVTLT	DTEVTyLMDM	CSFDTIScST
<i>A. niger</i> NRRL3135	ADTVEANFTA	TFVPSIQRL	ENDLSGVTLT	DTEVTyLMDM	CSFDTIScST
<i>A. fumigatus</i> 13073	GDEVAANFTA	lFAPDIRARa	EkHLPgVTLT	DEDVVsLMDM	CSFDTVARTS
<i>A. fumigatus</i> 32722	GDEVAANFTA	lFAPDIRARa	EkHLPgVTLT	DEDVVsLMDM	CSFDTVARTS
<i>A. fumigatus</i> 58128	GDEVAANFTA	lFAPDIRARa	EkHLPgVTLT	DEDVVsLMDM	CSFDTVARTS
<i>A. fumigatus</i> 26906	GDEVAANFTA	lFAPDIRARa	EkHLPgVTLT	DEDVVsLMDM	CSFDTVARTS
<i>A. fumigatus</i> 32239	GDEVEANFTA	lFAPAIRARI	EkHLPgVqLT	DDDVVsLMDM	CSFDTVARTA
<i>A. nidulans</i>	ADEIEANFTA	IMGPPiRkRL	ENDLPGIKLT	NENViyLMDM	CSFDTMARTA
<i>T. thermophilus</i>	GHDQAQEKFAk	qFAPAIIEKI	KDHLPgVDLA	vSDVpyLMDL	CPFETLARNh
<i>M. thermophila</i>	GDDAQDtyIS	TFAGPITARV	NANLPGANLT	DADTVaLMDL	CPFETVAsSS

Consensus	GDDAEANFTA	TFAPAIRARL	EADLPGVTLT	DEDVV-LMDM	CPFETVARTS
Consensus <i>fyase</i>	GDDVEANFTA	LFAPAIRARL	EADLPGVTLT	DEDVVYLMDM	CPFETVARTS

	251				300
<i>A. terreus</i> 9A-1DAhTLSPFC	DLFTaEWtq	YNYLlSLDKY	YGYGGGNPLG
<i>A. terreus</i> cbsDAhTLSPFC	DLFTaEWtq	YNYLlSLDKY	YGYGGGNPLG
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>vDTKLSPFC	DLFTHdEWih	YDYlQSLkKY	YGHGAGNPLG
<i>A. niger</i> T213vDTKLSPFC	DLFTHdEWih	YDYlRSLkKY	YGHGAGNPLG
<i>A. niger</i> NRRL3135vDTKLSPFC	DLFTHdEWIn	YDYlQSLkKY	YGHGAGNPLG
<i>A. fumigatus</i> 13073DASQLSPFC	QLFTHnEWkk	YNYLQSLGKY	YGYGAGNPLG
<i>A. fumigatus</i> 32722DASQLSPFC	QLFTHnEWkk	YNYLQSLGKY	YGYGAGNPLG
<i>A. fumigatus</i> 58128DASQLSPFC	QLFTHnEWkk	YNYLQSLGKY	YGYGAGNPLG
<i>A. fumigatus</i> 26906DASQLSPFC	QLFTHnEWkk	YNYLQSLGKY	YGYGAGNPLG
<i>A. fumigatus</i> 32239DASELSPFC	AIFTHnEWkk	YDYlQSLGKY	YGYGAGNPLG
<i>A. nidulans</i>HGTELSPEC	AIFTEkEWlq	YDYlQSLSKY	YGYGAGSPLG
<i>T. thermophilus</i>TDT.LSPFC	ALStQeEWqa	YDYlQSLGKY	YGNggGNPLG
<i>M. thermophila</i>	sdpatadagg	gNGrPLSPFC	rLFSEsEWra	YDYlQSVGKW

Consensus	-----	-DATELSPEC	ALFTE-EW--	YDYlQSLGKY	YGYGAGNPLG
Consensus <i>fyase</i>DATELSPEC	ALFTHDEWRQ	YDYlQSLGKY	YGYGAGNPLG

	301				350
<i>A. terreus</i> 9A-1	PVQGVGWaNE	LMARLTRAPV	HDHTCVNNTL	DASPATFPLN	ATLYADFSHD
<i>A. terreus</i> cbs	PVQGVGWaNE	LIARLTRSPV	HDHTCVNNTL	DANPATFPLN	ATLYADFSHD
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	PTQGVGYaNE	LIARLTHSPV	HDDTSSNHTL	DSNPATFPLN	STLYADFSHD
<i>A. niger</i> T213	PTQGVGYaNE	LIARLTHSPV	HDDTSSNHTL	DSNPATFPLN	STLYADFSHD
<i>A. niger</i> NRRL3135	PTQGVGYaNE	LIARLTHSPV	HDDTSSNHTL	DSSPATFPLN	STLYADFSHD
<i>A. fumigatus</i> 13073	PAQGIGFtNE	LIARLTRSPV	QDHTSTNsTL	vSNPATFPLN	ATMYVDFSHD
<i>A. fumigatus</i> 32722	PAQGIGFtNE	LIARLTRSPV	QDHTSTNsTL	vSNPATFPLN	ATMYVDFSHD
<i>A. fumigatus</i> 58128	PAQGIGFtNE	LIARLTRSPV	QDHTSTNsTL	vSNPATFPLN	ATMYVDFSHD
<i>A. fumigatus</i> 26906	PAQGIGFtNE	LIARLTRSPV	QDHTSTNsTL	vSNPATFPLN	ATMYVDFSHD
<i>A. fumigatus</i> 32239	PAQGIGFtNE	LIARLTNSPV	QDHTSTNsTL	DSDPATFPLN	ATIYVDFSHD
<i>A. nidulans</i>	PAQGIGFtNE	LIARLTQSPV	QDNTSTNHTL	DSNPATFPLD	rKLYADFSHD
<i>T. thermophilus</i>	PAQGVGFvNE	LIARMTSPV	QDYTTVNHTL	DSNPATFPLN	ATLYADFSHD
<i>M. thermophila</i>	PTQGVGFvNE	LLARLAqVPV	RDgTSTNRTL	DGDP rTFPLG	rPLYADFSHD

Consensus	PAQGVGF-NE	LIARLTHSPV	QDHTSTNHTL	DSNPATFPLN	ATLYADFSHD
Consensus <i>fyta</i>	PAQGVGFANE	LIARLTRSPV	QDHTSTNHTL	DSNPATFPLN	ATLYADFSHD

	351				400
<i>A. terreus</i> 9A-1	SNLVSIFWAL	GLYNGTAPLS	qTSVESVSQT	DGYAAAWTVP	FAARAYVEMM
<i>A. terreus</i> cbs	SNLVSIFWAL	GLYNGTKPLS	qTTVEDITrT	DGYAAAWTVP	FAARAYIEMM
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	NGIISILFAL	GLYNGTKPLS	TTTVENITQT	DGFSSAWTVP	FASRLYVEMM
<i>A. niger</i> T213	NGIISILFAL	GLYNGTKPLS	TTTVENITQT	DGFSSAWTVP	FASRLYVEMM
<i>A. niger</i> NRRL3135	NGIISILFAL	GLYNGTKPLS	TTTVENITQT	DGFSSAWTVP	FASRLYVEMM
<i>A. fumigatus</i> 13073	NSMVSIFFAL	GLYNGTEPLS	rTSVESaKEl	DGYSASWVVP	FGARAYFEtM
<i>A. fumigatus</i> 32722	NSMVSIFFAL	GLYNGTEPLS	rTSVESaKEl	DGYSASWVVP	FGARAYFEtM
<i>A. fumigatus</i> 58128	NSMVSIFFAL	GLYNGTEPLS	rTSVESaKEl	DGYSASWVVP	FGARAYFEtM
<i>A. fumigatus</i> 26906	NSMVSIFFAL	GLYNGTEPLS	rTSVESaKEl	DGYSASWVVP	FGARAYFEtM
<i>A. fumigatus</i> 32239	NGMIPIFFAM	GLYNGTEPLS	qTSeESTKES	NGYSASWAVP	FGARAYFEtM
<i>A. nidulans</i>	NSMISIFFAM	GLYNGTQPLS	mDSVESIQEm	DGYAASWTVP	FGARAYFELM
<i>T. thermophilus</i>	NTMTSIFaAL	GLYNGTAKLS	TTEIKSIEET	DGYSAAWTVP	FGGRAYIEMM
<i>M. thermophila</i>	NMMMGVLqAL	GaYDGVPELD	KTA r rDpEEL	GGYAASWAVP	FAARIYVEKM

Consensus	NSMISIFFAL	GLYNGTAPLS	TTSVESIEET	DGYAASWTVP	FGARAYVEMM
Consensus <i>fyta</i>	NSMISIFFAL	GLYNGTAPLS	TTSVESIEET	DGYSASWTVP	FGARAYVEMM

	401				450
<i>A. terreus</i> 9A-1	QC.....RAEKE	PLVRVLVNDR	VVPLHGCPID	KLGRCKrDAF
<i>A. terreus</i> cbs	QC.....RAEKQ	PLVRVLVNDR	VVPLHGCAVD	NLGRCKrDDF
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	QC.....QAEQE	PLVRVLVNDR	VVPLHGCPID	aLGRCTrDSF
<i>A. niger</i> T213	QC.....QAEQE	PLVRVLVNDR	VVPLHGCPID	aLGRCTrDSF
<i>A. niger</i> NRRL3135	QC.....QAEQE	PLVRVLVNDR	VVPLHGCPVD	aLGRCTrDSF
<i>A. fumigatus</i> 13073	QC.....KSEKE	PLVRALINDR	VVPLHGCDVD	KLGRCKLNDF
<i>A. fumigatus</i> 32722	QC.....KSEKE	PLVRALINDR	VVPLHGCDVD	KLGRCKLNDF
<i>A. fumigatus</i> 58128	QC.....KSEKE	SLVRALINDR	VVPLHGCDVD	KLGRCKLNDF
<i>A. fumigatus</i> 26906	QC.....KSEKE	PLVRALINDR	VVPLHGCDVD	KLGRCKLNDF
<i>A. fumigatus</i> 32239	QC.....KSEKE	PLVRALINDR	VVPLHGCAVD	KLGRCKLKDF
<i>A. nidulans</i>	QC.....E. KKE	PLVRVLVNDR	VVPLHGCAVD	KFGRCTLDDW
<i>T. thermophilus</i>	QC.....DDSDE	PVVRVLVNDR	VVPLHGCEVD	SLGRCKrDDF
<i>M. thermophila</i>	RCsggggggg	gggrQEKDE	eMVRVLVNDR	VMTLkGCGAD	ErGMCTLErF

Consensus	QC-----	-----QAEKE	PLVRVLVNDR	VVPLHGCAVD	KLGRCKLDDF
consensus <i>fyta</i>	QC.....QAEKE	PLVRVLVNDR	VVPLHGCAVD	KLGRCKRDDF

	451	471
<i>A. terreus</i> 9A-1	VAGLSFAQAG	GNWADCF~~~ ~
<i>A. terreus</i> cbs	VEGLSFARAG	GNWAECF~~~ ~
<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	VrGLSFARSG	GDWAECsA~~ ~
<i>A. niger</i> T213	VrGLSFARSG	GDWAECFA~~ ~
<i>A. niger</i> NRRL3135	VrGLSFARSG	GDWAECFA~~ ~
<i>A. fumigatus</i> 13073	VKGLSWARSG	GNWGECSF~~ ~
<i>A. fumigatus</i> 32722	VKGLSWARSG	GNWGECSF~~ ~
<i>A. fumigatus</i> 58128	VKGLSWARSG	GNWGECSF~~ ~
<i>A. fumigatus</i> 26906	VKGLSWARSG	GNWGECSF~~ ~
<i>A. fumigatus</i> 32239	VKGLSWARSG	GNSEQSFS~~ ~
<i>A. nidulans</i>	VEGLNFARSG	GNWkTCFT1~ ~
<i>T. thermophilus</i>	VrGLSFARqG	GNWEGCYAas e
<i>M. thermophila</i>	IESMAFARGN	GKWD1CFA~~ ~
Consensus	VEGLSFARSG	GNWAECFA-- -
Consensus <i>fyase</i>	VEGLSFARSG	GNWAECFA.. .

CP-1

Eco RI M G V F V V L L S I A T L F G S T
TATATGAATTCATGGGCGTGTTCGTCGCTACTGTCCATGCCACCTTGTCGGTTCCA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ATATACTTAAGTACCCGCACAAGCAGCAGCATGACAGGTAACGGTGAACAAGCCAAGGT

S G T A L G P R G N S H S C D T V D G G
CATCCGGTACCGCCTTGGGTCCTCGTGGTAATTCTCACTCTGTGACACTGTTGACGGTG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GTAGGCCATGGCGGAACCCAGGAGCACCATTAAGAGTGAGAACACTGTGACAACCTGCCAC

CP-2

CP-3

Y Q C F P E I S H L W G Q Y S P Y F S L
GTTACCAATGTTTCCCAGAAATTTCTCACTTGTGGGGTCAATACTCTCCATACTTCTCTT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CAATGGTTACAAAGGTTCTTTAAAGAGTGAACACCCAGTTATGAGAGGTATGAAGAGAA

E D E S A I S P D V P D D C R V T F V Q
TGAAGACGAATCTGCTATTTCTCCAGACGTTCCAGACGACTGTAGAGTTACTTTTCGTTT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ACCTTCTGCTTAGACGATAAAGAGGTCTGCAAGGTCTGCTGACATCTCAATGAAAGCAAG

CP-4

CP-5

V L S R H G A R Y P T S S K S K A Y S A
AAGTTTGTCTAGACACGGTGTAGATACCCAACCTTCTTCAAGTCTAAGGCTTACTCTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TTCAAACAGATCTGTGCCAGGATCTATGGGTTGAAGAAGATTGAGATTCCGAATGAGAC

L I E A I Q K N A T A F K G K Y A F L K
CTTTGATTGAAGCTATTCAAAGAACGCTACTGCTTTCAAGGGTAAGTACGCTTTCTTGA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GAACTAACTTCGATAAGTTTCTTGGCATGACGAAAGTCCCATTCATGCGAAAGAACT

CP-6

CP-7

T Y N Y T L G A D D L T P F G E N Q M V
AGACTTACAACACTACACTTTGGGTGCTGACGACTTGACTCCATTCGGTGAAAACCAAATGG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TCTGAATGTTGATGTGAAACCCACGACTGCTGAACTGAGGTAAGCCACTTTTGGTTTACC

N S G I K F Y R R Y K A L A R K I V P F
TTAACTCTGGTATTAAGTTCTACAGAAGATACAAGGCTTTGGCTAGAAAGATTGTTCCAT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
AATTGAGACCATAATTCAAGATGCTTCTATGTTCCGAAACCGATCTTTCTAACAAAGGTA

CP-8

CP-9

I R A S G S D R V I A S A E K F I E G F
TCATTAGACTTCTGGTCTGACAGAGTTATTGCTTCTGCTGAAAAGTTCATTGAAGGTT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AGTAATCTCGAAGACCAAGACTGTCTCAATAACGAAGACGACTTTTCAAGTAACTTCCAA

Q S A K L A D P G S Q P H Q A S P V I D
TCCAATCTGCTAAGTTGGCTGACCCAGGTTCTCAACCACACCAAGCTTCTCCAGTTATTG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
AGGTTAGACGATTCAACCGACTGGGTCCAAGAGTTGGTGTGGTTCGAAGAGGTTCAATAAC

CP-10

CP-11

V I I P E G S G Y N N T L D H G T C T A
ACGTTATTATTCCAGAAGGATCCGGTTACAACAACACTTTGGACCAGGTTACTTGTACTG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
TGCAATAATAAGGTTCTTCCATAGCCCAATGTTGTTGTGAAACCTGGTGCCATGAACATGAC

F E D S E L G D D V E A N F T A L F A F
661 CTTTCGAAGACTCTGAATTGGGTGACGACGTTGAAGCTAACTTCACTGCTTTGTTGCGCTC 720
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAAGCTTCTGAGACTTAACCCACTGCTGCAACTTCGATTGAAGTGACGAAACAAGCGAG
CP-12

A I R A R L E A D L P G V T L T D E D V
721 CAGCTATTAGAGCTAGATTGGAAGCTGACTTGCCAGGTGTTACTTTGACTGACGAAGACG 780
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGATAATCTCGATCTAACCTTCGACTGAACGGTCCACAATGAAACTGACTGCTTCTGC

CP-13
V Y L M D M C P F E T V A R T S D A T E
781 TTGTTTACTTTGATGGACATGTGTCCATTGCAAAGCTGTTGCTAGAAGCTTCTGACGCTACTG 340
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACAAATGAACTACCTGTACACAGGTAAGCTTTGACAACGATCTTGAAGACTGCGATGAC

L S P F C A L F T H D E W R Q Y D Y L C
841 AATGTCCTCCATTCTGTGCTTTGTTCACTCAGCAGGAATGGAGACAATACGACTACTTGC 900
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAACAGAGGTAAGACACGAAACAAGTGAGTGCTGCTTACCTCTGTTATGCTGATGAACG
CP-14

CP-15
S L G K Y Y G Y G A G N P L G P A Q G V
901 AATCTTTGGGTAAGTACTACGGTTACGGTCTGGTAACCCATTGGGTCCAGCTCAAGGTG 960
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAGAAACCCATTTCATGATGCCAATGCCACGACCATTGGGTAACCCAGGTGCGATTCCAC

G F A N E L I A R L T R S P V Q D E T S
961 TTGGTTTCGCTAACGAATTGATTGCTAGATTGACTAGATCTCCAGTTCAGACCACACTT 1020
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACCAAAGCGATTGCTTAACTAACGATCTAACTGATCTAGAGGTCAAGTTCGGTCTGAA
CP-16

CP-17
T N H T L D S N P A T F P L N A T L Y A
1021 CTACTAACACACTTTGGACTCTAACCCAGCTACTTTCCCATGAAACGCTACTTTGTACG 1080
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GATGATTGGTGTGAAACCTGAGATTGGGTGATGAAAGGGTAACCTGCGATGAAACATGC

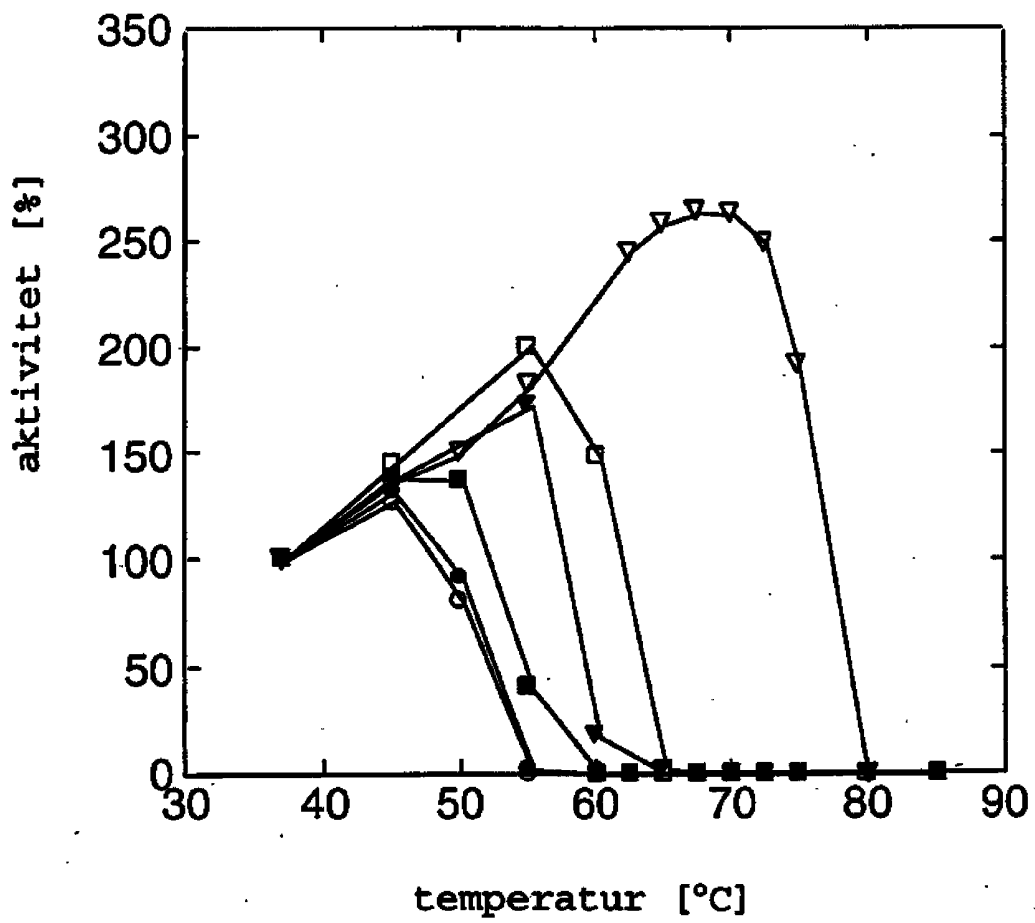
D F S H D N S M I S I F F A L G L Y -N G
1081 CTGACTTCTCTCAGCACAACCTCTATGATTTCTATTTCTTCGCTTTGGGTTTGTACAACG 1140
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTGAAGAGAGTGCTGTTGAGATACTAAAGATAAAGAAGCGAAACCCAAACATGTTGC
CP-18

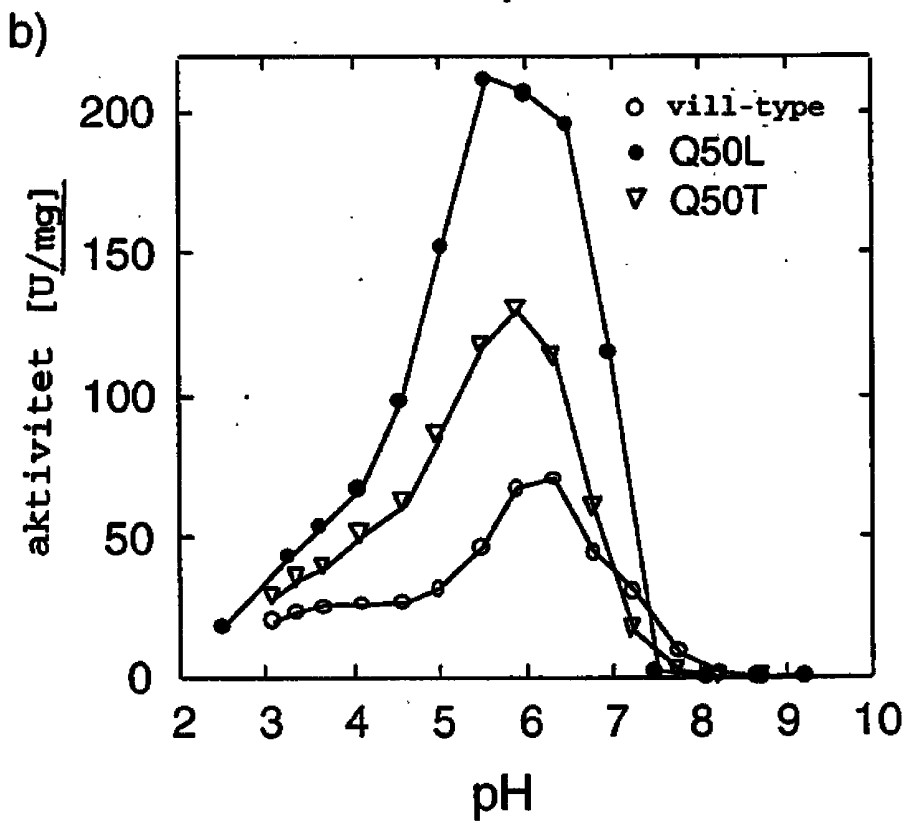
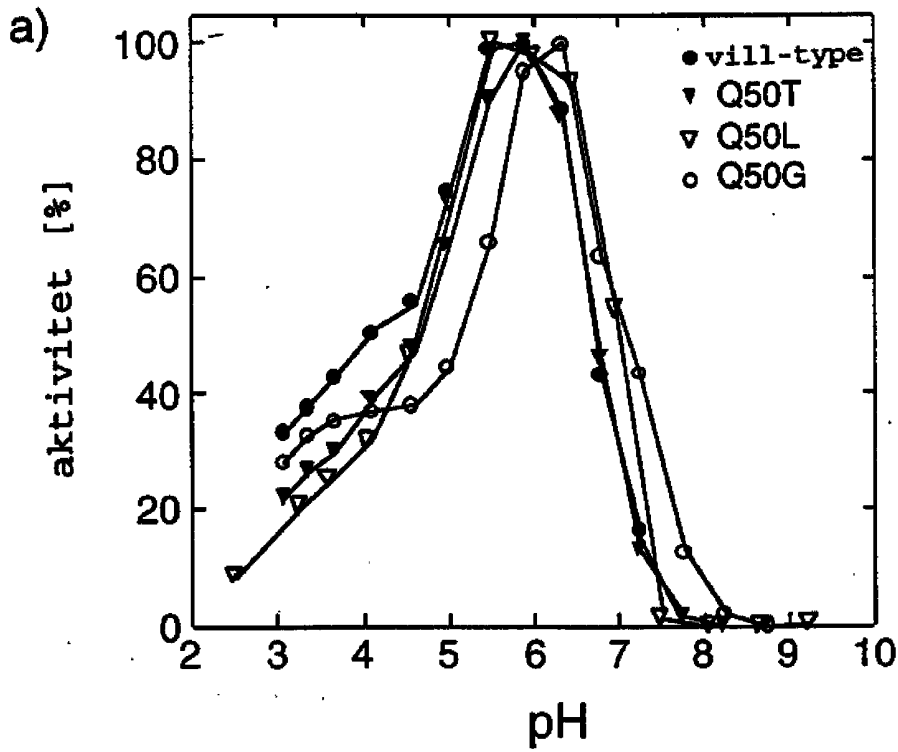
CP-19
T A P L S T T S V E S I E E T D G Y S A
1141 GTACTGCTCCATTGTCTACTACTTCTGTTGAATCTATTGAAGAACTGACGGTTACTCTG 1200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CATGACGAGGTAACAGATGATGAAGACAACCTAGATAACTTCTTTGACTGCCAATGAGAC

S W T V P F G A R A Y V E M M Q C Q A E
1201 CTTCTTGGACTGTTCCATTCCGGTCTAGAGCTTACGTTGAAATGATGCAATGTCAAGCTG 1260
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAGAACCTGACAAGGTAAGCCACGATCTCGAATGCAACTTTACTACGTTACAGTTTCGAC
CP-20

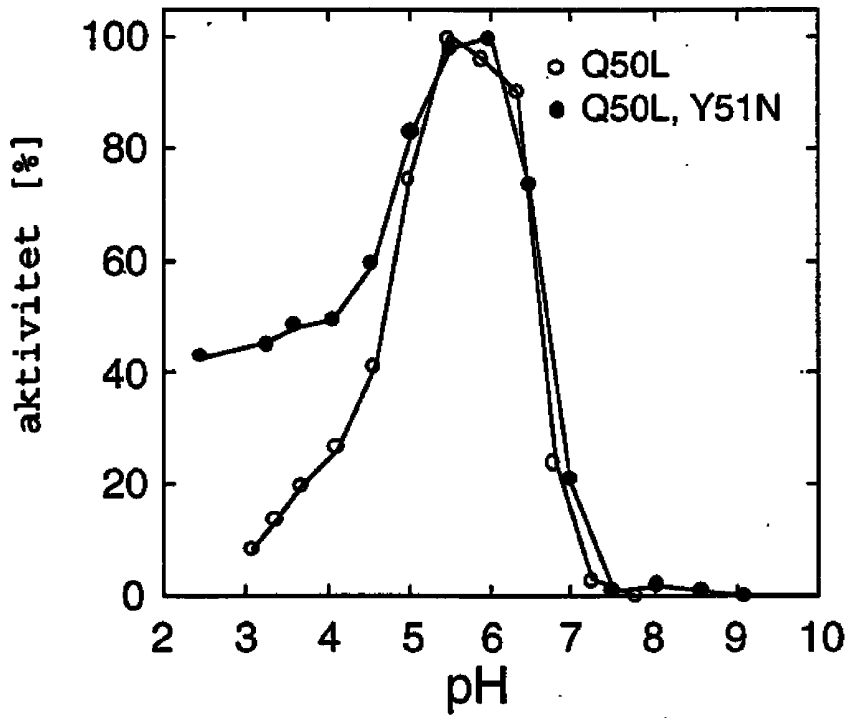
CP-21
K E P L V R V L V N D R V V P L H G C A
1261 AAAAGGACCATTGGTTAGAGTTTGGTTAACGACAGAGTTGTTCCATTGCACGGTTGTC 1320
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTCTTGGTAACCAATCTCAAACCAATTGCTGTCTCAACAAGGTAACGTGCCAACAC

V D K L G R C K R D D F V E G L S F A R
CTGTTGACAAGTTGGGTAGATGTAAGAGAGACGACTTCGTTGAAGGTTTGTCTTTCGCTA
1321 -----+-----+-----+-----+-----+ 1380
GACAACTGTTCAACCCATCTACATTCTCTGCTGAAGCAACTTCCAACAGAAAGCGAT
CP-22
S G G N W A E C F A * Eco RI
GATCTGGTGGTAACTGGGCTGAATGTTTCGCTTAAGAATTCATATA
1381 -----+-----+-----+-----+----- 1426
CTAGACCACCATTGACCCGACTTACAAAGCGAATTCTTAAGTATAT





a)



b)

