

P0102800



71.771/SZE

A2

KIVONAT

A jelen találmány élesztőgombában történő fitáz termelésre szolgáló eljárással kapcsolatos, melynek során fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódoló heterológ gént biztosítunk, és az említett gént élesztőgomba törzsben expresszáljuk.

16 D

2001.08.17.



71.771/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

A FITÁZ GÉNEK TÚLEXPRESSZÁLÁSA ÉLESZTŐ RENDSZEREKBEN

A jelen találmány a fitáz élesztőgombában való termelésére irányuló módszerrel, heterológ fitázt expresszáló élesztőgomba törzsekkel, és az élesztőgombák által termelt heterológ fitázzal kapcsolatos.

A monoészter foszfatázok egy specifikus csoportját alkotó fitázok a foszfát ("P") fitátból (myo-inozit hexafoszfát), az élelmezési vagy takarmányozási célra használt gabona fő foszfát tárolási formájából, való felszabadításának megindításához szükségesek (Reddy, N.R. et al., "Phytates in Legumes and Cereals," *Advances in Food Research*, 28:1 (1982)). Mivel az egyszerű gyomrú állatok, mint például a sertés és a baromfi csakúgy, mint az ember kis fitáz aktivitással rendelkeznek emésztőrendszerükben, csaknem az összes felvett fitát foszfát emészthetetlen. Ezért ezen állatok étrendjében szervesetlen foszfát kiegészítést kell alkalmazni, amely drága és nem megújuló tápanyag. Még kevésbé kívánatos módon, a hasznosítatlan fitát-foszfát kiürül ezen állatok trágyájával és foszfáttal szennyezi a környezetet (Cromwell, G.L. et al., "P- A Key Essential Nutrient, Yet a Possible Major Pollutant - Its



Central Role in Animal Nutrition," Biotechnology In the Feed Industry; Proceedings Altech 7th Annual Symposium, p. 133 (1991)). Továbbá a fitát kelátokat képez olyan esszenciális nyomelemekkel, mint például a cink, és tápanyaghiányos állapotokhoz, például növekedési és mentális visszamaradottsághoz, vezet olyan gyermekekben, akik főleg fitátmentesítés nélküli növényi eredetű élelmiszert fogyasztanak.

Az *Aspergillus niger* NRRL 3135 jelű törzséből két fitázt, Phy A és Phy B, klónoztak és szekvenáltak (Ehrlich, K.C. et al., "Identification and Cloning of a Second Phytase Gene (*phys*) from *Aspergillus niger* (*ficuum*)," Biochem. Biophys. Res. Commun., 195:53-57 (1993); Piddington, C.S. et al., "The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2,5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var *awamori*," Gene, 133:56-62 (1993)). Nemrégiben új fitáz géneket izoláltak *Aspergillus terreus*-ból és *Myceliophthora thermophila*-ból (Mitchel et al., "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 (1997)), *Aspergillus fumigatus*-ból (Pasamontes et al., "Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Heat-Stable Phytase from the Fungus *Aspergillus fumigatus*" Appl. Environ. Microbiol., 63:1696-1700 (1997)), *Emericella nidulans*-ból és *Talaromyces thermophilus*-ból (Pasamontes et al., "Cloning of the Phytase from *Emericella nidulans* and the Thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*," Biochem. Biophys. Acta., 1353:217-223 (1997)), és kukoricából (Maugenest et al., "Cloning and Characterization of a cDNA Encoding a Maize Seedling Phytase," Biochem. J. 322:511-517, (1997)).

Különböző típusú fitáz enzimeket izoláltak és/vagy tisztítottak *Enterobacter* sp. 4-ből (Yoon et al., "Isolation and Identification of Phytase-Producing Bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and Enzymatic



Properties of Phytase Enzyme., "Enzyme and Microbiol Technology 18:449-454 (1996)), *Klebsiella terrigena*-ból (Greiner et al., "Purification and Characterization of a Phytase from *Klebsiella terrigena*," Arch. Biochem. Biophys. 341:201-206 (1997)), és *Bacillus sp. DS11*-ből (Kim et al., "Purification and Properties of Thermostable Phytase from *Bacillus sp. DS11*," Enzyme and Microbial Technology 22:2-7 (1998)). Ezen enzimek tulajdonságait tanulmányozták, továbbá beszámoltak az *Aspergillus ficuum*-ból származó phy A kristályos szerkezetéről is (Kostrewa et al., "Crystal Structure of Phytase from *Aspergillus ficuum* at 2,5 Å Resolution," Nature Structure Biology 4:185-190 (1997)).

Hartingsveldt és munkatársai (Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*," Gene 127:87-94 (1993)) bejuttatták a *phy A* gént az *A. niger*-be és ezzel a fitáz aktivitás megtízszereződését érték el a vad típushoz képest. A sertések és baromfik étrendjének az ezen forrásból származó mikrobiális fitázzal való kiegészítése hatékonynak bizonyult a fitát-foszfát és a cink hasznosításának a fokozásában (Simons et al., "Improvement of Phosphorus Availability By Microbial Phytase in Broilers and Pigs," Br. J. Nutr., 64:525 (1990); Lei, X.G. et al., "Supplementing Corn-Soybean Meal Diets With Microbial Phytase Linearly Improves Phytase P Utilization by Weaning pigs" J. Anim. Sci., 71:3359 (1993); Lei, X.G. et al., "Supplementing Corn-Soybean Meal Diets With Microbial Phytase Maximizes Phytase P Utilization by Weaning Pigs" J. Anim. Sci., 71:3368 (1993); Cromwell, G.L. et al., "P-A Key Essential Nutrients, Yet a Possible Major Pollutant -- Its Central Role in Animal Nutrition (Biotechnology In the Feed Industry; Proceedings Alltech 7th Annual Symposium, p. 133 (1991)). Azonban a kereskedelmi forgalomban korlátozott mértékben rendelkezésre álló fitáz ára és az emzim aktivitásának a takarmányok pelletizálásakor alkalmazott hőkezeléssel szembeni instabilitása kizárják az állattartásban való gyakorlati



felhasználását (Jongbloed, A.W. et al., "Effect of Pelleting Mixed Feeds on Phytase Activity and Apparent Absorbability of Phosphorus and Calcium in Pigs", Animal Feed Science and Technology, 28:233-242 (1990)). Továbbá az *A. niger* által termelt fitáz feltehetően nem a legbiztonságosabb forrás az emberi fogyasztásra termelő élelmiszeripar számára.

Az élesztőgombákat hatékonyan fel lehet használni enzintermelésre, mialatt egyszerű és olcsó tápközegen szaporítják őket. Megfelelő jelszekvencia segítségével az élesztőgomba az enzimet kiválasztja a tápközegbe, ahonnan az kényelmesen kinyerhető. Egyes élesztőgomba expressziós rendszerek azzal a további előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, hogy jól elfogadottak az élelmiszeriparban, valamint az élelmiszeripari termékek biztonságos és hatékony előállítói.

A *Pichia pastoris* egy metilotróf élesztőgomba, mely képes a metanol egyedüli szénforrásként való metabolizálására. Ez a rendszer jól ismert a heterológ proteinek magas szintjeinek expresszáására való képességéről. Mivel eukarióta, a *Pichia* a magasabbrendű eukarióták expressziós rendszerei számos előnyös tulajdonságával, mint például a fehérje termelés, feltekeredés és poszt-transzkripciós módosítás, rendelkezik.

Ennél fogva igény van egy az élelmiszer- és takarmányipar számára fitázt gazdaságosan termelő, hatékony és egyszerű rendszer kifejlesztésére.

A jelen találmány olyan módszerrel kapcsolatos, mely élesztőgombában fitáz termelésére szolgál oly módon, hogy az élesztőgomba törzsbe egy fitáz/savanyú foszfatáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódoló heterológ gént juttatunk be és ezt a gént expresszáljuk.

A jelen találmány olyan proteinnel vagy polipeptiddel is kapcsolatos, mely fitáz aktivitással rendelkezik és az optimális aktivitás 57 - 65 °C



hőmérséklet tartományban és pH 2,5 - 3,5 értékek között vagy 5,5 pH értéken következik be. Az optimális pH 2,5 - 3,5 értékek között különösen lényeges a fitázhoz, mivel ez a pH érték található meg az állatok gyomrában.

A jelen találmány a továbbiakban biztosít egy olyan élesztőgomba sejtet, mely a fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódoló heterológ gént hordoz, mely funkcionálisan kapcsolódik a fitáz expressziójára képes promóterhez az élesztőgombában.

A jelen találmány egy másik aspektusa egy olyan vektor, mely a következőkkel rendelkezik: egy nem élesztőgomba szervezetből származó, fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódoló génnel; egy olyan promóterrel, mely élesztőgombában képes a transzkripció megindítására és mely a fitáz aktivitással rendelkező proteint kódoló génhez funkcionálisan kapcsolódik; valamint egy olyan replikációs origóval, mely képes a vektort az élesztőgombában fenntartani vagy képes a gazda genomjába való integrációra.

A jelen találmány olyan módszert is biztosít, mely fitáz aktivitással rendelkező protein vagy polipeptid termelésére szolgál. Egy izolált *appA* gén, mely a fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódolja a gazdasejtben expresszálódik.

A jelen találmány magába foglal egy olyan módszert, melynek során a fitátot inozittá és szervesetlen foszfáttá konvertáljuk. Az *appA* gén egy fitáz aktivitással rendelkező polipeptidből álló proteint expresszál a gazdasejtben. A proteint vagy polipeptidet ezután hozzuk érintkezésbe a fitáttal, hogy katalizálja a fitát inozittá és szervesetlen foszfáttá való konverzióját.

Az alábbiakban megadjuk a rajzok rövid leírását.

Az 1. ábra az IPTG-vel indukált fitáz génnel transzformált *E. coli* -ből előállított oldható protein SDS-PAGE analízisét mutatja. A sejteket 4 órán keresztül szaporítottuk a sejtek összegyűjtése előtt. 1. sor: marker;



2. és 3. sor: pEP1 transzformánsok (az expresszált protein körülbelül 55 kDa); 4. sor: a csak a pET25b(+) expressziós vektort tartalmazó transzformánsok.

A 2. ábra az *E. coli*-ban expresszált fitáz protein Western lenyomat analízisét mutatja. Az antitest az *A. niger* tisztított natív fitáza ellen termelődött. Minden sor 50 µg teljes intracelluláris proteint tartalmaz. Az 1. és 2. sor: rekombinánsok az indukció után és előtt. 3. és 4. sor: kontroll (csak expressziós vektor) az indukció után és előtt.

A 3. ábra az *E. coli*-ban levő PhyA mRNS-ének Northern lenyomat analízisének "scen" képe. Egy 1,4 kb méretű PhyA próbát használtunk. Az egyes sorok 20 µg teljes RNS-t tartalmaznak. Az 1. és 2. sorok: a kontroll sejtekből izolált RNS (csak az expressziós vektor) az indukció előtt és után. A 3. és 4. sor: a PhyA-t tartalmazó rekombinánsokból izolált RNS indukció előtt és után.

A 4. ábra az *E. coli* BL21 (DE3) törzsben levő fitáz (pEP1) indukált expressziójának idő lefutása. A sejteket akkor indukáljuk, amikor az OD600 elérte a 0,5 értéket. Az egyes időpontokban elkészített oldható protein mennyiségi meghatározását SDS-PAGE analízissel végezzük.

Az 5. ábra a fitáz transzformált *S. lividans* által 72 óra szaporítás után expresszált extracelluláris fitáz protein SDS-PAGE analízisét mutatja. A sejteket 15 percig centrifugáljuk 8.000 g értéken és a felülúszót gélelektroforézisnek vetjük alá. Az 1. sor: marker; 2. sor: kontroll csak az expressziós vektorral; 3. sor: pozitív telep, mely expresszálja a fitázt és a mérete körülbelül 57 kDa.

6. ábra az *S. lividans* által expresszált fitáz Western lenyomat analízisét mutatja, melynek során az *A. niger* tisztított, natív fitáza ellen termelt fitáz antitestet használunk. Az egyes sorokban 20 µg tápközeg (felülúszó) proteint használunk. 1. sor: felülúszó a vektorral transzformált kontroll sejtenyészetből; 2. sor: felülúszó a pozitív teleppel inokulált tenyészetből.

A 7. ábra az *S. cerevisiae* által expresszált extracelluláris fitáz SDS-PAGE analízisét mutatja. Az egyes sorokba 50 μ g tápközeg (felülúszó) proteint helyezünk. 1 - 3. sorok: a pozitív teleppel inokulált és az indukció után 5, 10 és 25 órákor összegyűjtött tenyészetből származó felülúszó sorrendben; 4 - 6. sor: a vektorral transzformált sejt tenyészetből származó és az indukció után 5, 10 és 25 órákor összegyűjtött felülúszók, sorrendben; 7. sor: Marker (kDa). Az expresszált fitáz körülbelül 110 kDa méretű (Western lenyomattal erősítettük meg).

A 8. ábra a pYPP1 szerkezettel transzformált *S. cerevisiae* által expresszált extracelluláris fitáz aktivitás idő lefutása galaktóz indukció után. Az aktivitást az összegyűjtött tápközeg felülúszójában elemeztük.

A 9. ábra a *S. cerevisiae* által expresszált extracelluláris fitáz Western lenyomat analízisét mutatja a deglikoziláció előtt és után (Endo H), az *A. niger* ben levő tisztított, natív fitáz ellen termelt fitáz antitest felhasználásával. 1. sor: előfestett SDS-PAGE standardek (kDa) a Bio-Rad-tól; 2 és 3. sor: deglikozilált 10 és 20 μ g fitáz protein, sorrendben; 4. sor: glikozilált fitáz (20 μ g protein).

A 10. ábra a transzformált *S. cerevisiae* sejtekből izolált teljes RNS Northern lenyomat analízise. 1. sor: kontroll (csak a pYES2 expressziós vektor); 2 és 3. sor: a pYPP1 transzformánsai.

A 11. ábra a *Pichia pastoris* Mut^S (KM71) és Mut(+)(X33) transzformánsok által termelt extracelluláris *phyA* fitáz aktivitásának idő lefutása indukció után.

A 12. ábra a KM71-ben (MUT^S) levő pPICZ α A-PhyA szerkezettel rendelkező *Pichia*-ban túlexpresszált fitáz SDS-PAGE analízisét mutatja. Az 1. sor: protein létra. 2. sor: az indukció után 108 órával gyűjtött 40 μ l felülúszó az AK1-ből (a telep 21,700 mU/ml extracelluláris fitázt mutat); 3. sor: egy a humán szérum albumint túlexpresszáló kontroll törzs (HAS, 6,7 kDa) 40 μ l felülúszója 1 g/L szinten; 4. sor: a KM71 kontroll felülúszója.



A 13. ábra az Endo H általi deglikoziláció hatását mutatja be a *Pichia*-ban levő expresszált fitáz termostabilitására. A fitáz aktivitást azután mérjük, hogy az enzimet 15 percig 37 vagy 80 °C hőmérsékleten melegítjük 0,2 M citrát pufferben, pH 5,5 értéken.

A 14. ábra a transzformált *Pichia pastoris* törzsek (KM71 és X33) által expresszált *phyA* mRNS Northern analízisének "scan" képét mutatja. Egy 1,3 kb *phyA* próbát használunk a lenyomatoláshoz. 1 és 2. sorok: a KM71 transzformánsai indukció előtt és után; 3 és 4. sorok: az X33 transzformánsai indukció után és előtt.

A 15. ábra a *Pichia* (X33) által expresszált extracelluláris fitáz optimális pH-ját mutatja. A következő puffereket használjuk az egyes pH értékekhez: 0,2 M glicin-HCl puffert a pH 1,5; 2,5; 3,5 értékekhez; 0,2 M nátrium citrát puffert a 4,5; 5,5; 6,5 pH értékekhez; és 0,2 M Tris-HCl puffert a 7,5 és 8,5 pH értékekhez.

A 16. ábra a *Pichia* (X33) által expresszált extracelluláris fitáz optimális hőmérsékletét mutatja. A vizsgálatot 0,2 M citrát pufferrel végezzük, pH 5,5 értéken.

A 17. ábra a *Pichia*-ban (X33) expresszált fitáz által szójababból felszabadított szabad foszfort mutatja. Öt g szójababot szuszpendálunk 25 ml 0,2 M citrát pufferben (pH 5,5) különböző mennyiségű enzimmel. Az inkubáció 4 órán keresztül tart 37 °C hőmérsékleten és meghatározzuk a felülúszóban levő felszabadult szabad foszfor mennyiségét.

A 18. ábra az *E. coli appA* gént tartalmazó öt *Pichia pastoris* transzformánsból származó extracelluláris fitáz aktivitás expressziójának idő lefutását mutatja.

A 19. ábra grafikusan ábrázolja a tápközeg pH és a *Pichia pastoris* fitáz aktivitás expresszió közötti kapcsolatot.

A 20. ábra a *Pichia pastoris*-ban túlexpresszált *E. coli* fitáz SDS-PAGE analízisét mutatja. 1. sor: protein létra; 2 - 4. sorok: a 23, 22 és 11



pozitív telepek tenyészetéből sorrendben gyűjtött felülúszók, 118 órával az indukció után.

A 21. ábra grafikusan ábrázolja a *Pichia pastoris* által túltermelt *E. coli* fitáz optimális pH értékeit.

A 22. ábra grafikusan ábrázolja *Pichia pastoris* által túltermelt *E. coli* fitáz optimális hőmérsékletét.

A 23. ábra a szójabab ételből a *Pichia pastoris*-ból származó túlexpresszált *E. coli* fitáz által felszabadított szabad foszfor mennyiségét mutatja 4 órával a kezelés után.

A következőkben megadjuk a találmány részletes leírását.

A jelen találmány élesztőgombában történő fitáz termelésére szolgál módszert. Ezen módszernek megfelelően, egy fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódoló heterológ gént expresszálunk egy élesztőgomba törzsben.

A fitát inozittá és szervesetlen foszforra való konverzióját katalizáló enzimeket széleskörben fitázokként ismerik. A fitáz termelő mikroorganizmusok közé tartoznak az olyan baktériumok, mint a *Bacillus subtilis* (Paver et al., J. Bacteriol. 151, 1102 (1982), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) és a *Pseudomonas* (Cosgrove, Austral. J. Biol. Sci. 23:1207 (1970), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak); élesztőgombák, mint a *Saccharomyces cerevisiae* (Nayini et al., Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 17:24 (1984), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak); és fonalasgombák, mint az *Aspergillus niger* (Yamada et al., Agric. Biol. Chem. 32:1275 (1986), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) és az *Aspergillus ficuum* (van Gorcom et al., European patent Application 89/202436, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak).



A fitázok endogén módon is jelen vannak számos növényi fajban. Loewus (In: Plant Biology vol. 9: "Inositol Metabolism in Plants" (eds. D.J. Morre, W.F. Boss, F.A. Loewus) 13 (1990); és Gellatly és munkatársai (Plant Physiology (supplement) 93:562 (1990), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak), említik a burgonya gumóból nyert fitáz cDNS klón izolálását és jellemzését. Gibson és munkatársai (J. Cell Biochem., 12C:L407 (1988) mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) és Christen és munkatársai (J. Cell Biochem., 12C:L402 (1988), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) említik a szójabab magjának csírázása során történő endogén fitáz szintézist.

Előnyösen, a fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet a sejt a tenyésztápközegbe szekretálja. Ez lehetővé teszi a magasabb expressziós szinteket és a termék könnyebb izolálását. A fitáz aktivitással rendelkező peptid vagy polipeptid a protein sejtől való kivételére képes jelszekvenciához kapcsolódik. Előnyösen a jelszekvencia lehasad a proteintről.

Egy előnyös megvalósulásban a fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódoló heterológ gént kereten belül illesztjük egy transzkripció erősítő elemmel.

A fitáz aktivitással rendelkező proteinek kódoló előnyös heterológ géneket egy bakteriális sejtől izoláljuk. Egy még előnyösebb gén a *phyA* gén az *Aspergillus niger* -ből származik. Az *Aspergillus niger* NRRL 3135 törzsből származó fitázt kódoló gént, a *phyA* gént, klónozták és szekvenálták (Piddington, C.S. et al., "The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2,5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*", Gene, 133:56-62 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Hartingsveldt és munkatársai a *phyA* gént bejuttatták az *A. niger*-be és tízszeres növekedést értek el a fitáz aktivitásban a vad típusú aktivitáshoz képest. (hartingveldt et al., "Cloning, Characterization and Overexpression of the



Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger* " Gene, 127:87-94 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak)

Egy másik előnyös heterológ gén az *E. coli appA* génje. A gén, melyet eredetileg *E. coli* periplazmás foszfoanhidrid-foszfohidroláz génként (*appA*) határoztak meg, 1298 nukleotidot tartalmaz (GenBank katalógusszám: M58708). Először azt találták, hogy a gén egy savanyú foszfatáz proteint kódol, melynek optimális pH értéke 2,5 (EcAP), az *E. coli*-ban. A savanyú foszfatáz egy 44.644 dalton molekulatömegű monomer. Az érett EcAP 410 aminosavat tartalmaz (Dassa, J., et al, "The Complete Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* Gene *appA* reveals Significant Homology Between pH 2,5 Acid Phosphatase and Glucose-1-Phosphatase", J. Bacteriology, 172:5497-5500 (1990), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Ostanin és munkatársai túlexpresszálták az *appA* gént az *E. coli* BL21 törzsben egy pT7 vektort használva és fitáz aktivitását megközelítően 400-szorosára növelték (440 mU/mg protein) (Ostanin, K. et al., "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of *Escherichia coli* Acid Phosphatase" J. Biol. Chem. 267:22830-36 (1992) mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Az *appA* gén termékéről korábban nem tudták, hogy fitáz aktivitással rendelkezik.

Az *appA* vagy *phyA* gén bármilyen prokarióta vagy eukarióta expressziós rendszerben expresszálnak. Egy sor gazda vektor rendszer használható a proteint kódoló szekvenciák expresszálására. Az előnyös vektorok közé tartoznak a virális vektorok, a plazmidok, a kozmidok vagy az oligonukleotidok. Elősorban a vektor rendszer kell kompatibilis legyen az alkalmazott gazdasejtekkel. A gazda-vektor rendszer magába foglalja az ezekre való korlátozás nélkül a következőket: bakteriofág DNS-sel, plazmid DNS-sel, vagy vagy kozmid DNS-sel transzformált baktériumot; mikroorganizmusokat, például élesztőgomba vektorokat tartalmazó élesztőgombákat; vírussal (például vaccinia vírussal, adenovírussal, stb.)

fertőzött emlős sejt rendszereket; vírussal (például baculovírussal) fertőzött rovar sejt rendszereket; és baktériummal fertőzött növényi sejteket. Ezen vektorok expressziós elemei változó erősségűek és specifitásúak. Az alkalmazott gazda-vektor rendszertől függően, bármilyen számú, megfelelő transzkripció és transzláció elem használható.

Az *appA* vagy a *phyA* expresszálasához való előnyös gazdák közé tartoznak a gomba sejteket, ideértve az élesztőgombákat vagy a fonalgombákat, ezek gazdasejtekként használhatók a jelen találmánnyal összhangban. Az előnyös élesztőgomba gazdasejtek magukba foglalják a *Saccharomyces cerevisiae* különböző törzseit. Más élesztőgombák, mint például a *Kluyveromyces*, *Torulaspora* és a *Schizosaccharomyces* szintén felhasználhatók. Egy előnyös megvalósulásban a protein túlexpresszálasára használt élesztőgomba törzs a *Saccharomyces cerevisiae*. Az előnyös fonalgomba gazdasejtek közé tartoznak az *Aspergillus* és a *neurospora*. Még előnyösebb *Aspergillus* törzs az *Aspergillus niger*.

A jelen találmány egy megint más előnyös megvalósulásában az élesztőgomba törzs egy metilotróf élesztőgomba törzs. A metilotróf élesztőgombák azok az élesztőgomba nemzetségek, melynek tagjai a metanolt képesek hasznosítani szénforrásként a fő celluláris funkciókhoz szükséges energia forrás termeléséhez, valamint tartalmazzák az alkohol-oxidáz expressziójához szükséges gént. Tipikus metilotróf élesztőgombák közé tartoznak a *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida* és *Karwinskia* nemzetség tagjai. Ezek az élesztőgomba nemzetségek a metanolt egyedüli szénforrásként képesek hasznosítani. Egy még előnyösebb megvalósulásban a metilotróf élesztőgomba törzs a *Pichia pastoris*.

A jelen találmány fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet is biztosít. A *Pichia*-ban expresszált PhyA és a kapott, termelt protein sokkal magasabb extracelluláris aktivitással (körülbelül 65 mU/ml)



rendelkezik. A fitáz aktivitási hozam megközelítően 30-szor nagyobb, mint a *phyA*-val transzformált *Saccharomyces cerevisiae*-ben tapasztalt, 21szer magasabb, mint a vad típusú *Aspergillus niger*-ben tapasztalt és 65000-szer nagyobb, mint a nem transzformált *Pichia*-ban tapasztalt fitáz aktivitás. Az expresszált fitáz optimális pH értéke 2,5 és 5,5 és az optimális hőmérséklet 60 °C. Hasonlóképpen, az *appA*-t *Pichia*-ban és a *Saccharomyces cerevisiae*-ben expresszálva olyan proteint kapunk, mely sokkal magasabb extracelluláris aktivitást mutat és sokkal előnyösebb optimális pH értéket: 2,5 - 3,5.

A jelen találmány előnyös megvalósulásában a fitáz aktivitással rendelkező protein vagy polipeptid optimális aktivitása 57 - 65 °C hőmérsékleten következik be. Egy még előnyösebb megvalósulásban a fitáz aktivitással rendelkező protein vagy polipeptid optimális aktivitásához való hőmérséklet intervallum 58 - 62 °C.

Egy megint más előnyös megvalósulásban a fitáz aktivitással rendelkező protein vagy polipeptid aktivitásának legalább 40 %-át megtartja a protein 15 percig 80 °C hőmérsékleten való melegítése után. Még előnyösebben a fitáz aktivitással rendelkező protein vagy polipeptid aktivitásának legalább 60 %-át megtartja a protein 15 percig 60 °C hőmérsékleten való melegítése után.

Tisztított proteint különböző módszerekkel nyerhetünk. A jelen találmány proteinjét vagy polipeptidjét előnyösen tisztított formában állítjuk elő (előnyösen legalább 80 %, még előnyösebben 90 % tisztaságban) hagyományos technikák segítségével. Tipikusan a jelen találmány proteinjét vagy polipeptidjét rekombináns gazdasejtek szaporító tápközegébe szekretáltatjuk. Másik lehetőségként a jelen találmány proteinje vagy polipeptidje megtermelődik, azonban nem szekretálódik a tenyésztápközegbe. Ilyen esetben a protein izolálásához a rekombináns plazmidot hordozó gazdasejtet szaporítjuk, szonikálással lizáljuk, melegítjük, vagy kémiai kezelésnek vetjük alá, és a homogenizátumot



centrifugáljuk a sejt hulladék eltávolítása céljából. Ezután a felülúszót sorozatos ammónium-szulfátos kicsapatsnak vetjük alá. A jelen találmány polipeptidjét vagy proteinjét tartalmazó frakciót gélszűrésnek vetjük alá egy megfelelő méretű dextrans vagy poliakrilamid oszlopon a proteinek szeparálása céljából. Ha szükséges a protein frakciót tovább lehet tisztítani HPLC-vel.

A jelen találmány biztosít egy olyan élesztőgomba törzset is, mely egy fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódoló heterológ génnel rendelkezik. A heterológ gén funkcionálisan kell kapcsolódjon a fitáz élesztőgombában való expressziójára képes promóterhez.

A jelen találmány egy megint más aspektusa egy vektor, mely a fitáz élesztőgombában való expressziójához való. A vektor egy nem élesztőgomba szervezetből származó gént hordoz, mely egy fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódol. A fitáz gén bármilyen vektorba klónozzható, mely autonóm módon replikálódik vagy integrálódik az élesztőgomba genomjába. Az autonóm módon replikálódó plazmidok kópia száma, például a Yep plazmidé lehet magas, azonban mitotikus stabilitásuk esetleg lehet nem kielégítő is (Bitter et al., "Expression and Secretion vectors for Yeast" Meth. Enzymol. 153:516-44 (1987), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Ezek tartalmazhatják az autonóm replikációért felelős 2 *mu*-plazmid szekvenciát és egy az *E. coli*-ban való replikációért felelős *E. coli* szekvenciát. A vektorok előnyösen tartalmaznak egy genetikai markert az élesztőgomba transzformánsok szelektálásához, valamint egy antibiotikum rezisztencia gént az *E. coli* -ban való szelekcióhoz. Az ARS és CEN szekvenciákat tartalmazó episzomális vektorok sejtenként egy kópiaként fordulnak elő, és ezek nem sokkal stabilabbak, mint a Yep vektorok. Integratív vektorokat használunk, amikor a DNS fragmentet egy vagy többszörös kópiaként integrálunk az élesztőgomba genomba. Ebben



az esetben, a rekombináns DNS stabil és nincs szükség szelekcióra (Struhl et al., "High-Frequency Transformation of Yeast: Autonomous Replication of Hybrid DNA Molecules" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1035-39 (1979); Powels et al., Cloning Vectors, I-IV. et seq. Elsevier (1985); Sakai et al., "Enhanced Secretion of Human Nerve Growth Factor from *Saccharomyces cerevisiae* Using an Advanced δ -Integration System", Biotechnology 9:1382-85 (1991), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Néhány vektor rendelkezik replikációs origóval, mely a szelektált gazdasejtben funkcionál. A megfelelő replikációs origók közé tartoznak a 2 μ , az ARS1 és a 25 μ M. A vektorok restrikciós endonukleáz helyekkel rendelkeznek a fúziós gének és a promóter szekvenciák és szelekciós markerek inzertálásához. A vektorok módosíthatók a restrikciós helyek eltávolításával vagy hozzáadásával, vagy más nem kívánt nukleotidok eltávolításával.

A fitáz gén bármilyen promóter ellenőrzése alá helyezhető (Stetler et al., "Secretion of Active, Full- and Half-length Human Secretory leukocyte protease Inhibitor by *Saccharomyces cerevisiae*" Biotechnology 7:55-60 (1989), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Választhatók konstitutív vagy szabályozott élesztőgomba promóterek is. Az élesztőgomba vektorokhoz való megfelelő promóter szekvenciák közé tartoznak többek között a metallothioneinhez, a 3-foszfo-glicerát-kinázhoz (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073 (1980), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) vagy más glikolitikus enzimekhez (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 (1968); and Holland et al., Biochem. 17:4900 (1978), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak), például az enolázhoz, a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázhoz, a hexokinázhoz, piruvát-dekarboxilázhoz, foszfo-fruktolinázhoz, glükóz-6-foszfát izomerázhoz, 3-foszfoglicerát mutázhoz, piruvát-kinázhoz, trióz-foszfát-izomerázhoz, foszfo-glükóz izomerázhoz és glükokinázhoz való promóterek. Az élesztőgombában történő alkalmazáshoz való megfelelő

vektorok és promóterek részletesen leírásra kerültek az EP A-73.657 szabadalomban (Hitzeman, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Másik alternatíva a glükóz-represszázó ADH2-promóter, melyet Russell és munkatársai (J. Biol. Chem. 258:2674 (1982) mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) és Beier és munkatársai (Nature 300:724 (1982) mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) írtak le.

Egy konstitutív vagy szabályozott élesztőgomba promóter is választható. Például a foszfoglicerát kináz (PGK), más, glikolitikus enzimeket kódoló gének és az alfa-faktor gén erős promóterei konstitutív preomóterek. Amikor konstitutív promótert használunk, a termék a sejtszaporodás alatt szintetizálódik. Az ADH2 promótert az etanol és a glükóz szabályozza, a GAL-1-10 és a GAL7 promótereket a galaktóz és glükóz, a PHO5 promótert a foszfát és a metallothionein promótert a réz. A hősokk promótereket, melyek közé a HSP150 promóter is tartozik, a hőmérséklet szabályozza. Hibrid promóterek szintén használhatók. Szabályozott promótert akkor használunk, amikor a kívánt termék folyamatos expressziója veszélyes a gazdasejt számára. Az élesztőgomba promóterek helyett egy erős prokarióta promóter, mint például a T7 promóter is használható, azonban ebben az esetben az élesztőgomba törzset transzformálni kell a megfelelő polimerázt kódoló génnel. A transzkripció terminálásához a HSP150 terminátor, vagy bármely más funkcionális terminátor alkalmazható. Itt a promótereket és a terminátorokat szabályozó elemeknek hívjuk. A jelen találmány nem korlátozódik egyetlen specifikus vektorra, promóterre, vagy terminátorra sem.

A vektor magába foglalhat egy szelektálható markert is. A szelektálható markerek gyakran rezisztencia gének, vagy olyan gének, melyek komplementálni képesek jól jellemzett metabolikus hiányokkal rendelkező élesztőgomba törzset, például triptofán vagy hisztidin

hiányos mutánsokat. Az előnyös szelektálható markerek közé tartoznak az URA3, LEU2, HIS3, TRP1, HIS4, ARG4 vagy az antibiotikum rezisztencia gének.

A vektor rendelkezhet egy bakteriális sejtben való replikációra képes replikációs origóval. A vektorok manipulálása bakteriális törzsekben sokkal hatékonyabb. Előnyös bakteriális replikációs origó a ColE1, az Ori vagy az oriT.

Az élesztőgombából, vagy fitáz génekből vagy más forrásokból származó vezető szekvenciák felhasználhatók az expresszált fitáz enzimek tenyésztápközegbe való szekréciójának elősegítéséhez. A jelen találmány nem korlátozódik egyetlen speciális vezető szekvenciára vagy jelpeptidre sem.

A megfelelő vezető szekvenciák magukba foglalják az élesztőgomba alfa-faktor vezető szekvenciát, melyet a fitáz direkt szekréciójához lehet alkalmazni. Az alfa-faktor vezető szekvenciát gyakran inzertálják a promóter szekvencia és a struktúr gén szekvencia közé (Kurjan et al., Cell 30:933 (1982); Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330 (1984); 4.546.082 számú US szabadalmi alkalmazás; és a 324.274 számú Európai Közzétett szabadalom, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak). Egy másik alkalmas vezető szekvencia a *S. cerevisiae* MF alfa 1 (alfa faktor), mely egy 165 aminosavnól álló prepro formából szintetizálódik, mely egy 19 aminosavból álló jel-vagy prepeptidet tartalmaz, és melyet egy 64 aminosavból álló "vezető" vagy propeptid követ, és mely körülölel három N-kötésű glikozilációs helyet, melyeket a (LysArg(Asp/Glu,Ala)2-3 alfa-faktor)4 követ (Kurjan et al., Cell. 30:933-43 (1982), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). A prepro MF alfa 1 ezen jel-vezető részét széleskörűen alkalmazzák a heterológ proteinek *Saccharomyces cerevisiae*-ben való szintéziséhez és szekréciójához. Az élesztőgombával homológ jel/vezető peptidek alkalmazása ismert a

4.546.082 számú US szabadalmi alkalmazásból, a 116.201, 123.294, 123.544, 163.529 és 123.298 számú Európai Szabadalmi Alkalmazásokból, valamint a 3614/83 számú Dán Szabadalmi Alkalmazásból, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. A 123.289 számú Európai Szabadalmi Alkalmazásban, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak, a *S. cerevisiae* a-faktor prekursor alkalmazását írták le, míg a WO 84/01153 szabadalomban, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak, a *Saccharomyces cerevisiae* invertáz jelpeptid hasznosítását, és a DK 3614/83 Német Szabadalmi Alkalmazásban, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak, az idegen proteinek szekréciójához való *Saccharomyces cerevisiae* PH05 jelpeptidet írták le.

A *Saccharomyces cerevisiae*-ből származó alfa-faktor jel-vezető (MF alfa 1 vagy MF alfa 2) felhasználható az expresszált heterológ proteinek élesztőgombában való szekréciós folyamatokban (4.546.082 számú US szabadalmi alkalmazás, 16.201, 123.294, 123.544 és 163.529 Európai Szabadalmi Alkalmazás, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak). Egy a *S. cerevisiae* MF alfa 1 jel/vezető szekvenciát kódoló DNS szekvencia a kívánt protein szekréciójához és feldolgozásához való gén 5' végéhez való fúzionálását mutatták be. Az élesztőgombában expresszált heterológ proteinek szekréciója biztosításához való egér nyál amiláz jelpeptid (vagy ennek egy mutánsa) alkalmazását mutatták be a WO 89/02463 és WO 90/10075 Közzétett PCT Alkalmazásokban, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak.

Az 5.726038 számú US szabadalmi alkalmazás leírja az élesztőgomba aszpartikus proteáz 3 jelpeptidjének használatát, mely az élesztőgombában expresszált proteinek javított szekréciójának biztosítására képes. Az élesztőgomba gazdákból történő rekombináns polipeptidek szekréciójának elősegítéséhez megfelelő más vezető



szekvenciák jól ismertek a tudomány e területén átlagosan képzett szakember számára. Egy vezető szekvencia módosítható a 3' végéhez közel oly módon, hogy egy vagy több restrikciós helyet tartsa meg. Ez elősegíti a vezető szekvencia struktúrájához való fúzióját.

Az élesztőgomba transzformációs eljárások jól ismertek a tudomány e területén átlagosan képzett szakember számára. Egy ilyen eljárást írtak le Hinnen és munkatársai (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929 (1978), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). A Hinnen és munkatársai szerinti eljárás Trp transzformánsokat szelektál egy szelektív tápközegbe, melyben a szelektív tápközeg 0,67 % élesztő nitrogén alapot, 0,5 % kazamínosavakat, 2 % glükózt, 10 µg/ml adenint és 20 µg/ml uracilt tartalmaz.

A gén fennartható a stabil expressziós vektorban, egy mesterséges kromoszómában, vagy az élesztőgomba gazdaséjt kromoszómájába való integrációval. A kromoszómába való integráció elvégezhető a fitáz gén egy vektorba való klónozásával, mely vektor egy élesztőgomba kromoszómába fog beépülni. A megfelelő vektorok közé tartoznak azok a nukleotid szekvenciák, melyek homológok az élesztőgomba kromoszómában levő nukleotid szekvenciákkal. Másik lehetőségként, a fitáz gén rekombináns helyek közé illeszthető, például transzponálható elemek közé, melyek a kromoszómába szállíthatják a gént.

A jelen találmány eljárást biztosít a fitáz előállítására oly módon, hogy egy izolált *appA* gént biztosít, mely egy fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódol, és a gént a gazdaséjtben expresszálnak. Előnyösen az *appA* gént *E. coli* -ból izoláljuk. Az előnyös gazdaséjtek közé tartoznak az élesztőgombák és a fonalas gombák. Az előnyös fonalasgombák az *Aspergillus niger* és az előnyös élesztőgombák a *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* és a *Schizosaccharomyces*, különösen a *Saccharomyces cerevisiae* részesül előnyben.



A fitát inozittá és szervesetlen foszforra történő konverziójának módszerét szintén biztosítjuk. Egy *appA* gént izolálunk egy szervezetből, a tudomány e területén jól ismert technikákat használva. Ezután a fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet expresszáljuk a génből egy gazdasejtben. A kapott proteint vagy polipeptidet összekeverjük vagy reagáltatjuk a fitáttal. Ez a technika különösen hasznos az élelmiszerben vagy állati takarmányban levő fitát kezelésére.

Az előnyös *appA* gént az *Escherichia coli* -ból izoláljuk.

Míg az élesztőgomba rendszerben termelt fitáz enzim ugyanolyan hatékonyan szabadítja fel a fitát-P-t a kukoricából és a szójából, mint a kereskedelembe beszerezhető fitát, ez jóval termotabilabbnak bizonyul. Ez a fitáz túlexpressziós rendszer az élesztőgombában felhasználható termotabil fitáz biztosításához, mely az élelmiszer és takarmány iparokban használható.

A következőkben példákkal illusztráljuk a jelen találmányt.

1. példa

Anyagok és módszerek a *PhyA E. coli* -ban, *S. lividans*-ban és egy *Saccharomyces* rendszerben való túlexpresszáására

Fitáz gén, gazda törzsek és expressziós plazmidok. A fitáz gént, *phyA*-t, Dr. E.J. Mullaney (USDA) volt olyan kedves rendelkezésünkre bocsátani. A gént (GenBank Katalógusszám:M94550) a pMD4.21 plazmidban tartjuk az *E. coli* HB101 törzsében. Az *Aspergillus niger* DNS 2,7 kb hosszúságú *SphI* fragmentje magába foglalja a deglikozilált fitáz kódoló régióját és annak 5' és 3' szomszédos szekvenciáit is. Az *Aureobasidium pullulans* aktív xilanáz génjének *Spxy* jelpeptid szekvenciáját tartalmazó plazmidot Dr. X.L. Li (University of Georgia)



biztosította. Az *E. coli* DH5 α törzset használjuk az összes rekombináns plazmid kezdeti gazdjaként. A *phyA* *E. coli*-ban való expresszálasához a pET25b(+) expressziós vektort (Novagen, Madison, WI) és a BL21 (DE3)pLysS expressziós gazdát használjuk. A *phyA* *S. lividans* TK24 törzsben való expresszálasához a pSES1 plazmidot (Jung E.D. et al., "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans*oglucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora fusca*" Appl. Environ. Microbiol., 59:3032-43 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) használjuk a hordozó plazmid (D. D.B. Wilsontól, Cornell University, és ő ezt Dr. D.A. Hopwoodtól (John Innes Institute, Norwich, England) kapta) megszerkesztéséhez. A *phyA* élesztőgombában való expresszálasához a pYES2 expressziós vektort és a *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 gazdát (Invitrogen, San Diego, CA) használjuk.

Plazmid kazetta szerkezetek és transzformációk. Az összes megszerkesztett plazmidot és a megfelelő gazdákat felsoroljuk az 1. táblázatban. A *phyA* gén 1,4 kb hosszúságú fragmentjét a pMD4,21 plazmidból amplifikáljuk két primert használva: upstream 5'- CGG AAT TCG TCA CCT CCG GAC T -3' (1. számú szekvencia) és downstream 5' - CCC AAG CTT CTA AGC AAA ACA CTC -3' (2. számú szekvencia). A kapott fragment tartalmazza az *Aspergillus niger* deglikozilált fitázát kódoló szekvenciát, a *PhyA*-t, és sorrendben upstream és downstream az EcoRI és HindIII restrikciós helyeket. A GeneClean II kittel (Bio101, Inc., LaJolla, CA) való tisztítás után a fragmentet a pET25b(+) plazmidba inzertáljuk és a kapott pEP1 (6893 bp hosszúságú) szerkezetet a BL21(DE3)pLysS-be transzformáljuk a DH5 α sejtekben való kezdeti megerősítés után. Az expresszió a T7 promóter szabályozása alatt áll, melyet a 21 aminosavat kódoló vezető szekvencia (pel B) és a *phyA* követ. A kontrollhoz csak a pET25b(+) vektorral transzformált vektort használjuk.



1. táblázat

Expressziós vektorok, szerkezetek és ezek vizsgálatban használt gazdatörzsei

Plazmid	Gazda	Leírás ¹	Referencia ²
pET25b (+)	<i>E. coli</i> DH5α és BL21 (DE3)pLysS	expressziós vektor	Novagen
pEP1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLysS	pET25bα(+)+ <i>phyA</i> gén	a jelen találmány
PSE2	<i>E. coli</i> DH5α és <i>S. lividans</i> TK24	expressziós vektor	Jung et al. ² , 1993
PSPP1	<i>E. coli</i> DH5α és <i>S. lividans</i> TK24	pSES2 + Spe2 + <i>phyA</i>	a jelen találmány
PYES2	<i>E. coli</i> DH5α és <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	expresszió vektor	Invitrogen
PYEP1	<i>E. coli</i> DH5α és <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	pYES2 + Spe2 + <i>phyA</i>	a jelen találmány
PYXP1	<i>E. coli</i> DH5α és <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	pYES2 + Spxy + <i>phyA</i>	a jelen találmány
PYPP1	<i>E. coli</i> DH5α és <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	pYES2 + Sphy + <i>phyA</i>	a jelen találmány

¹ Az Spe2 a *T. fusca* endonukleáz E2-jéhez való jelpeptid (Wilson, D.B., "Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases" Crit. Rev. Biotechnol. 12:45-63 (1992), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak); az Spxy az *A. pullulans* xilanázához való jelpeptid (Li and Ljungdahl, "Cloning, Sequencing and regulation of Xylanase Gene from the Fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2331-1", Appl. Environ. Microbiol., 60:3160-66 (1994); Li and Ljungdahl, "Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and Secretion of the Xylanase from *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Environ. Microbiol., 62:209-13 (1996), melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak); és Sphy az *A. niger* *phyA*-jához való jelpeptid (Hartingsveldt et al., "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene *phyA*) of *Aspergillus niger*", Gene 127:87-94 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak)

² Jung, E.D. et al., "DNA Sequences in *Streptomyces lividans* *oglucanase* Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora fusca*" Appl. Environ. Microbiol. 59:3032-43 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak).



Az *S. lividans*-ban a *phyA* expresszióhoz való plazmid megszerkesztését azzal kezdjük, hogy a pLT1 promótert és az Spe2 jelpeptidet tartalmazó fragmentet szinjetizáljuk (Lao, G. et al., "DNA Sequences of Three Beta-1,4-endoglucanase Genes From *thermomonospora fusca*" J. Bacteriol., 173:3397-407 (1991), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) PCR-raé. Egy upstream 5'-CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGC C - 3' (3. számú szekvencia) primer és egy downstream 5'-CCT AGA ACG GGA ATT CAT TGG CCG CC - 3' (4. számú szekvencia) primer sorrendben a PstI és EcoRI restriktációs helyeket tartalmazza. A fragmentet a pBW2 plazmidból amplifikáljuk (Jung, E.D. et al., DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* of an Exoglucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora fusca*" Appl. Environ. Microbiol. 59:3032-43 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) és ezután a PstI és EcoRI restriktációs enzimekkel emésztetjük, miközben a pEp szerkezetet és a pBluescript SK⁺ plazmidot (Stratagene, La Jolla, CA) sorrendben EcoRI és HindIII és PstI és HindIII restriktációs enzimekkel emésztetjük. A három emésztett fragmentet ezt követően GeneClean II kitet használva tisztítjuk és egy egyedüli rekombináns szerkezetbe ligáljuk, mely tartalmazza a kívánt PstI és KpnI (a pBluescript SK⁺ plazmidból) helyeket, a pLT1 promótert és az E2 endoglükánáz Spe2 vezető peptidjét (551 bp hosszúságú, Lao, G. et al., "DNA Sequences of Three Beta-1,4-endoglucanase Genes From *Thermomonospora fusca*" J. bacteriol. 173:3397-405 (1991), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) és a *phyA* gént (1365 bp). Miután a szerkezetet PstI és KpnI restriktációs enzimekkel emésztettük, a kapott fragmentet a pSES1 expressziós vektorba ligáljuk és egy hordozó plazmidot (pSPP1, 9131 bp) transzformálunk a gazda *S. lividans* protoplasztokba Hopwood és munkatársai szerint (Hopwood, D.A., et al., "Genetic Manipulation of *Streptomyces* A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich,

England (1985), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Hasonlóképpen, egy kontrollt is készítünk a gazda *S. lividans* pSES2 expressziós vektorral való transzformálásával.

A három különböző jelpeptid szekvenciával rendelkező három hordozó plazmidot úgy szerkesztjük meg, hogy az élesztőgomba rendszerben expresszálja a *phyA*-t (lásd a 2. táblázatot). Az első plazmid a pSPp1 plazmid egy HindIII-mal emésztett fragmentjéből származik, ideértve a pLT1 promótert, az Spe2 vezető szekvenciát és a *phyA* kódoló régió szekvenciát. A fragmentet a borjú bél alkalikus foszfátazzal kezelt pYES2 plazmid HindIII helyére ligáljuk és a plazmidot pYEP1 (7783 bp) plazmidnak nevezzük, miután annak helyes orinetációját megerősítettük. A második plazmid az Spxy-t, az *A. pullulans*-ból származó xilanáz gén jelpeptid szekvenciáját tartalmazza (Li, X.L. et al., "Cloning, Sequencing and Regulation of a Xylanase Gene From the Fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1" Appl. Environ. Microbiol. 60:3160-166 (1994); Li, X.L., et al., "Expression of *Aureobasidium pullulans* XynA in and Secretion of the Xylanase From *Saccharomyces cerevisiae*" Appl. Environ. Microbiol. 62:209-13 (1996), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak), és a *phyA* gén. Az Spxy-t *phyA*-val hasítjuk átfedő extenzióval (Horton, R.M., "In vitro Recombination and Mutagenesis of DNA SOEing Together Tailor-Made Genes", PCR Protocols: Current Methods and Applications, 251-61 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) két egymást követő PCR lépésben. Az egyik lépésben az Spxy szekvenciát amplifikáljuk a pCE4 (Li, X.L. et al., "Expression of *Aureobasidium pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase from *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Environ. Microbiol. 62:209-13 (1996), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) plazmidból egy upstream primert (5'-CCC AAG CTT GAT CAC ATC CAT TCA-3')(5. számú szekvencia) használva egy HindIII restrikciós hellyel (1. primer) és egy átfedő downstream primert (5'-CGG GGA CTG CTA GCG CAC GTT CGA T-3',



2. primer)(6. számú szekvencia) használva. A másik PCR-t azért végezzük el, hogy a pET1 plazmidból származó *phyA* gént kódoló régiót amplifikáljuk, egy átfedő upstream primert (5'-ATC GAA CGT GCG CTA GCA GCA GTC CCC G-3', 3. primer)(7. számú szekvencia) és egy downstream primert (5'-GCT CTA GAC TAA GCA AAA CAC TCC-3', 4. primer)(8. számú szekvencia) használva egy *XbaI* restrikciós helyel. A PCR második lépését azért végezzük el, hogy egyesítsük a fenti két PCR-ből létrehozott fragmentet, a két tisztított fragmentet templátként és 1. és 4. primerként használjuk. A kapott fragment *HindIII* és *XbaI* restrikciós helyeket tartalmaz és a pSES2 plazmidba klónozzuk. Ezt a plazmidot pYXP1 plazmidnak nevezzük (7219 bp hosszúságú). A harmadik plazmid a *phyA* gén *Sphy* jelpeptid szekvenciáját tartalmazza valamint a *phyA* kódoló régióját, a köztük levő intront kivéve (Hartingsveldt. W. van., et al., "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", Gene 127:87-94 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Két primer, ideértve egy 70 bp hosszúságú upstream primert, tartalmazza a manipulált *KpnI* restrikciós helyel rendelkező jelpeptidet és egy downstream primert, mely ugyanaz, mint amit a pYXP1 plazmid megszerkesztéséhez (4. primer) használtunk a pEP1 plazmidból származó kívánt fragment amplifikálásához. A PCR terméket *KpnI* és *XbaI* restrikciós enzimekkel emésztetjük és a pSES2 plazmidba klónozzuk, ez a pYPP1 (7176 bp hosszúságú) plazmidot eredményezi. Mind a három fenti szerkezetet *Saccharomyces cerevisiae*-be transzformáljuk Ito és munkatársai módszerét ("Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations", J. Bacteriol., 153:163-68 (1983), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) használva.

2. táblázat

Saccharomyces cerevisiae-ben a *phyA* expressziójához használt
jelpeptidek

Szerkezet méret (bp)	Peptid	Gén	Szervezet	Fitáz aktiv. ¹ (mPU/ml)
pYEP1 7783	Spe2 (93 bp)	Celluláz E2	T. fusca	,80
pYXP1 7219	Spxy (102 bp)	Xilanáz A	A. pullulans	ND
pYPP1 7176	Sphy (57 bp)	PhyA fitáz	A. niger	146
pSES1 ² 7224			S. cerevisiae	ND

ND = nem detektálható

¹ A fitáz aktivitást a sejtenyészeten Sabouraud-raffinóz tápközeg felülúszójában detektáljuk 15 órával a galaktóz hozzáadással történő indukálás után. Lásd a szöveget a fitáz egység definíciójához.

² A *Saccharomyces cerevisiae*-hez való expressziós vektor, kontrollként használtuk.

Szaporító tápközeg és a gén expresszió indukálása. Az *E. coli* rendszerben, a transzformánsokat 50 µg/ml ampicillint tartalmazó 50 ml LB tápközegben szaporítjuk 30 °C hőmérsékleten. Miután a tenyésztápközeg OD600 értéke eléri a 0,5 - 0,6 értéket, a fitáz gén expresszióját oly módon indukáljuk, hogy a tápközeghez IPTG-t (izopropil b-D-tiogalaktopiranozid) adunk 1 mM végső koncentrációban. Az indukció után három órával a sejteket 8000 x g értéken 15 percig tartó centrifugálással összegyűjtjük, 1 x PBS-ben mossuk és lizozimmal lizáljuk. A sejtek oldható és oldhatatlan frakcióit előállítjuk és az 500 µg



teljes proteint tartalmazó mintát (Lowry, O.H. et al., "Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent" J. Biol. Chem. 193:265-75 (1951), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) ugyanilyen térfogatú 2 x SDS pufferben szuszpendáljuk és SDS-PAGE-vel (Laemmli, U.K., "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature (London) 227:680-85 (1970), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) analizáljuk.

A rekombináns *S. lividans*-t TBS táplevesben szaporítjuk 5 µg/ml tiosztrepton jelenlétében 30 °C hőmérsékleten (Jung, E.D. et al., "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* of an Exoglucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora fusca*" Appl. Environ. Microbiol. 59:3032-43 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Hetvenkét óra inkubálás után a sejteket és a tápközeget összegyűjtjük és előkészítjük az SDS-PAGE analízishez (Wilson, D.B., "Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases", Crit. Rev. Biotechnol., 12:45-63 (1992), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak).

A *Saccharomyces cerevisiae* transzformánsait először uracil mentes Sabouraud-raffinóz (4 %) tápközegben (100 ml) szaporítjuk 48 órán keresztül, majd steril galaktózt adunk a tápközeghez (2 %) a fitáz expresszió indukálása céljából. A tápközeg mintáit és a sejteket különböző időpontokban gyűjtjük össze a Li és Ljungdahl ("Expression of *Aureobasidium pullulans xynA* in, and Secretion of the Xylanase from *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Environ. Microbiol., 62:209-13 (1996), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) által leírtak alapján. Amikor szükséges volt, az expresszált sejtek tenyészetek frakcióinak felülúszóját koncentrálnak Stirred Cells of Amicon-nal (Beverly, MA) YM10 membránokat (10.000 MW rés) használva. Más tápközegeket is ezek alapján tesztelünk.



Enzim protein és aktivitási vizsgálat. A különböző körülmények között expresszált fitáz protein mennyiségét az SDS-PAGE-val nyet specifikus sávok relatív denziometriával határozzuk meg, IS-1000 Digital Imaging System-et (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) használva. A tápközeg és sejt mintákban levő fitáz aktivitást a korábban leírtaknak megfelelően (Piddington, C.S. et al., "The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2,5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var *awamori*", Gene 133:56-62 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) határozzuk meg és a felszabadított szerves foszfátot Chen, P.S. és munkatársai módszerével ("Microdetermination of P" Anal. Chem.28:1756-58 (1956), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) analizáljuk. Egy fiáz egység (PU) az az enzim mennyiség, mely percenként egy μmol szerves foszfátot szabadít fel nátrium-fitátból 37 °C hőmérsékleten.

Western lenyomat (immunlenyomat) analízis. A fitáz transzformált *E. coli* sejtömeg oldható frakcióját és a *S. lividans* és *S. cerevisiae* transzformánsok tápközeg felülúszóját ugyanúgy gyűjtjük össze, mint az SDS-PAGE vizsgálatához. Az elektroforézis után, a proteineket Protan^R nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA) visszük át 20 mM Tris-HCl (pH 8,3), 20 % metanol, és 0,1 % SDS elegyében Mini Trans-Blot sejtet (Bio-Rad Laboratories) használva. A transzferálást egy éjszakán keresztül végezzük konstans 50 V értéken és a kezdeti puffer hőmérséklet 4 °C. Ezután a membránokat Western lenyomat analízisnek vetjük alá. Egy tisztított, natív *Aspergillus niger* fitáz elleni nyúl poliklonális IgG-t (melyet Dr. A.H. J. Ullah, USDA bocsátott rendelkezésünkre, 1:5000 hígítás) használunk első antitestként. A lenyomatolást egy torna-peroxidázzal konjugált második antitestet tartalmazó Immuno-Blot Assay Kit-et (Bio-Rad Laboratories) használva véglegesítjük.

Teljes RNS izolálás és analízis. A teljes RNS-t TRIzol™ Reagenssel (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) izoláljuk *E. coli* és *Saccharomyces cerevisiae* transzformánsokból sorrendben 3 és 15 órával az indukció után. A 10 µg/sáv mennyiségű RNS mintákat ezután formaldehid agarózos (1,5 % tömeg/térf.) gélelektroforézissel szeparáljuk, majd Hybond membránokra (National Labnet, Woodbridge, NJ) (Davis, et al., "Basic Methods in Molecular Biology, 2nd Ed., Appleton and Lange, Norwalle, Ct. (1994), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) visszük. A pEP1 plazmidban levő 1,4 kb hosszúságú EcoRI-HindIII fragmentet előállítjuk és random primelve jelöljük ³²P-vel egy DNS jelölő kitet használva, majd a lenyomatolt RNS membránokkal hibridizáltatjuk hibridizációs kemencében (Hybaid, Middlesex, UK). A hibridizált membránokat szkrínéljük Fuji Imaging Plate-en és Bio-Imaging Analyzer-rel (Kohshin Graphic Systems, Fuji, Japan) analizáljuk.

2. példa

A *PhyA* expressziója *E. coli* -ban

Az indukció után 4 órával, egy specifikus sávot (körülbelül 55 kDa) látunk az oldható sejt frakció SDS-PAGE-jében (12,5 %), az egyetlen expressziós vektorral transzformált kontrollhoz képest (lásd az 1. és 2. ábrákat). Ez a sáv ezen frakció teljes oldható protein mennyiségének 3,8 %-át képviseli. Ennek megfelelően, a northern lenyomatolás a *phyA* mRNS túlexpresszálását mutatja ezekben a fitáz gén transzformánsokban és még nyoma sincs a kontroll sejtekben (lásd a 3. ábrát).

A fitáz protein expresszió optimalizálásához az időlefutást és az expresszióra hatással levő tényezőket vizsgáljuk. Ezen tényezők közé tartoznak az inkubációs hőmérséklet (30 és 37 °C), a tápközeg pH (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, és 9,0), az anaerobiozis (steril ásványi olajat adunk a

szaporodó sejtek tetejére), a tápközegben levő szerves foszfát szint (Dassa, E., et al., "The Acid Phosphatase with Optimum pH of 2,5 os *Escherichia coli* " J. Biol. Chem. 257:6669-76 (1982), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak), és a nátrium-fitát (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 és 0,5 mM). Az eredmények azt jelzik, hogy a fitáz protein expressziója az idővel arányosan lineárisan akkumulálódik az indukció utáni első hat órában (lásd a 4. ábrát). Ezután az expresszió viszonylag változatlan marad, bár a bakteriális sejtek továbbra is szaporodnak. Csak a tápközeg pH és nátrium-fitát koncentráció befolyásolja szignifikánsan a fitáz protein expressziót. A maximális protein pH 6 értéken és 0,3 mM nátrium-fitát mellett mutatkozik, mely esetben a fitáz protein az összes protein 3,8 %-áról 9,6 %-ára nőtt.

Nem detektálunk fitáz aktivitást extracellulárisan vagy intracellulárisan. Ez talán nem is teljesen váratlan, mivel az *Aspergillus niger*-ből származó natív fitáz egy 70 - 80 kDa méretű glükoprotein (Hartingsveldt et al., "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*" Gene 127:87-94 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). A jelen találmány *E. coli* rendszerében expresszált protein mérete megközelítően 55 kDa. Feltehetően, a protein glikozilációjának hiánya és más a szekréció során szükséges post-transzlációs módosítások akadályozzák meg a fitáz aktivitást.

3. példa

A *PhyA* expressziója *S. lividans*-ban

Heterológ géneket expresszáltak *S. lividans*-ban és a kapott termék enzimatis aktivitás révén a tápközegbe szekretálódott (Ghangas, G.S. et al., "Cloning of the *Thermomonospora fusca* Endoglucanase E2 Gene in *Streptomyces Lividans*: Affinity Purification and Fuctional Domains of the Cloned Gene Product" Appl. Environ. Microbiol., 54:2521-26 (1988); Wilson, D.B., "Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases" Crit. Rev. Biotechnol., 12:45-63 (1992); Jung, E.D. et al., "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces Lividans* of an Exoglucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora fusca*" Environ. Microbiol., 59:3032-43 (1993), melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak). Hasonlóképpen, a *phyA* gént *S. lividans*-ban expresszáljuk és a protein a tápközegbe expresszálódik, ahogy azt az SDS-PAGE analizált tápközeg mintában látható specifikus sáv mutatja (lásd az 5. és 6. ábrát). Ez azt sugallja, hogy a *T. fusca* EC endoglükánáz génből származó jelpeptid képes a fitáz proteint a sejtől kivezetni. Ez a protein 57 kDa méretű és a tápközegben levő összes protein 16,2 %-át képviseli. A tápközeg pH értékének 6,0 értékre való változtatása és 0,3 mM nátrium-fitát tápközeghez való hozzáadása az összes protein 20,3 %-ára javítja a protein hozamot. Miután a fitáz protein ilyen magas szinten expresszálódik a tápközegbe, ez könnyen tisztítható és hatékonyan használható számos célra, például fitáz antitestek termelésére. Ismét nem detektálunk fitáz aktivitást sem a tápközegben sem a lizált sejtekben. Bár a protein mérete enyhén megnő (2-3 %) az *E. coli*-ban expresszált proteinéhez képest, az ezen expressziós rendszerben bekövetkező fitáz protein glikozilációja következtében, még így sem detektálunk fitáz aktivitást.



4. példa

A phyA expressziója Saccharomyces cerevisiae-ben

Három különböző jelpeptidet használunk a sejtből való expresszált protein kivezetési képességének összehasonlításához. A fitáz aktivitás lényegesen megnő a Sabouraud-raffinóz tápközegben szaporodó pYEP1 és pYPP1 transzformánsokban, azonban a pYXP1 transzformánsokban nem. A látható fitáz proteint az SDS-PAGE az indukció után 20 órával kimutatja (7. ábra).

A pYEP1 és pYPP1 transzformánsok expresszióját három különböző tenyésztápközegben határozzuk meg: Sabouraud-raffinóz (Li, X.L., et al., "Expression of *Aureobasidium pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*" Appl. Environ. Microbiol., 62:209-13 (1996), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak), Sabouraud-glicerol és egy módosított általános célú YEPD tápközeget használunk. A pYEP1 transzformánsok esetében hasonló fitáz aktivitás expresszáldott a Sabouraud-raffinóz és Sabouraud-tápközegen, azonban YEPD tápközegben nem detektálunk aktivitást. Ezzel szemben a pYPP1 transzformánsokkal tenyésztett tápközeg fitáz aktivitása nagymértékben változik a különböző típusú tápközegektől függően. Az aktivitás 375 mU/ml értékre nő, amikor Sabouraud-glicerol tápközeget használunk. Az aktivitás tovább nő 1675 mU/ml értékre, amikor a tápközeget YEPD-re változtatjuk (lásd a 3. táblázatot). Míg az YEPD tápközeg sokkal olcsóbb, mint a Sabouraud-raffinóz tápközeg, a fitáz hozam több, mint tízszeresére nő. Így a feltételezett fonalgomba fitáz génből származó jelpeptid éri el a leghatékonyabb extracelluláris fitáz aktivitásbeli expressziót. Majdnem az összes termelt proteint az YEPD tápközegbe szekretálja, azonban nagyon



kevés aktivitást detektálunk az élesztőgomba sejtekben. Ezen rendszerben a fitáz expresszió idő lefutását a 8. ábrán mutatjuk be.



3. táblázat

A különböző tápközegekben a pYPP1 transzformánssal elért expresszált fitáz aktivitás

	Óra az indukció után (mPU/ml) ⁻¹		
Tápközeg	0	10	15
Sabouraud-raffinóz	22	136	146
Sabouraud-glicerol	6	174	375
YEPD	18	1238	1675

⁻¹ A fitáz aktivitást a három tápközeg sejtenyészete felülúszójában detektáljuk 0, 10 és 15 órával a galaktóz hozzáadással történő indukció után. Lásd a szöveget a fitáz egység meghatározásához.

Számos mikroorganizmus, ideértve a bacilusokat, az élesztőgombákat és a fonalasgombákat, rendelkezik fitáz aktivitással, míg az *Aspergillus niger* NRRL3135 törzse termeli a legmagasabb aktivitást (340 mU/ml, Shieh, T.R. et al., "Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase", Appl. Environ. Microbiol., 16:1348-51 (1968), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). A *Schwanniomyces castelli* CBS 2863 rendelkezik a legmagasabb fitáz aktivitással 21 élesztőgomba törzs között (140 mU/ml, Lambrechts, C., et al., "utilization of Phytase by Some Yeasts", Biotechnology Letters, 14:61-6 (1992), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Egyértelmű, hogy a pYPP1 plazmiddal transzformált rekombináns élesztőgomba törzs a jelen találmányban sokkal nagyobb fitáz aktivitást termel (1675 mU/ml), mint az *Aspergillus niger* (4-szeres) és a *S. castelli* CBS 2863 (11-szeres). Maximális fitáz termelés érhető el a rendszerben, ha az inkubálási körülményeket optimalizáljuk és módosítjuk a plazmid kazettákat (Demolder, J.W. et al., "Efficient Synthesis of Secreted Murine Interleukin-2 by *Saccharomyces cerevisiae*: Influence of 3'-Untranslated



Regions and Codon Usage" Gene 111:207-13 (1992), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak).

A *Saccharomyces cerevisiae*-ben a magas szintű fitáz aktivitás expresszió legnagyobb valószínűséggel a kielégítő fitáz protein glikozilációnak és az élesztőgomba más post-transzlációs módosításainak tulajdonítható. Miután a tápközeg felülúszót koncentráltuk és SDS-PAGE analízisnek vetettük alá, egy megközelítően 110 kDa méretű (Lásd a 7. és 9. ábrákat) méretű sávot detektálunk, mely nagyobb, mint az *Aspergillus niger*-ből származó natív protein mérete (Hartingsveldt, W. van, et al., "Cloning, Chracterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*" Gene 127:87-94 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). A northern lenyomat analízis megerősítette a *phyA* mRNS túlexpresszióját (lásd a 10. ábrát). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az élesztőgomba rendszer hatékony az extracelluláris fitáz enzim aktív túlexpresszáálásában. Az élesztőgomba rendszernek számos előnye van a bakteriális és más, például az *Aspergillus niger* (Hartingsveldt, W. van, et al., "Cloning, Chracterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger* " Gene 127:87-94 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) rendszerrel szemben. Ez a post-transzlációs módosításokat ideértve a megfelelő feltekeredést, glikolizációt, diszulfid kötés képződést és proteolízist visz végbe a protein endoplazmás retikulumon és sejtmembránon keresztüli transzlokációja alatt. A proteinek szekrécióját elősegítik a protein prkurzorok N-terminális régiójánál levő hidrofób rövid jelpeptidek (Li, X.L., et al., "Expression of *Aureobasidium pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*" Appl. Environ. Microbiol. 62:209-13 (1996), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Az élesztőgomba sejtek által szekretált proteinek védettek az aggregációval és a proteáz degradációval szemben. A legfontosabb, hogy



a *Saccharomyces cerevisiae* által termelt enzim proteinek könnyen tisztíthatók, mivel az élesztőgomba csak kevés proteint szekretál. Az élesztőgomba termékek emberek és állatok esetében jól ismert biztonságos alkalmazását tekintve, ez a rendszer nagy lehetőségeket rejt a humán élelmiszeripar és az állati takarmányipar számára.

5. példa

A *Saccharomyces cerevisiae*-ben túlexpresszált PhyA fitáz tulajdonságai

A pYPP1 plazmid transzformánsaiból származó túlexpresszált fitázt koncentráljuk és tulajdonságainak vizsgálataihoz használjuk (lásd a 4. táblázatot). Az enzim két optimális pH tartományt mutat: 2 - 2,5 és 5,0 - 5,5. Azonban a 2 - 2,5 pH értékek közötti enzimatis aktivitás csupán 60 %-os az 5 - 5,5 pH értékeken mutatott aktivitáshoz képest. Nem detektálunk aktivitást sem pH 1, sem pH 8 értéken. Az optimális pH egyértelműen ugyanaz, mint az *A. niger*-ből származó fitázé (Simons et al., "Improvement of Phosphorus Availability by Microbial Phytase in Broilers and Pigs," Br. J. Nutr., 64:525 (1990), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) így az emésztőcsatornában a fitát-foszfor hidrolízisben aktív funkciót várunk tőle. Az enzim optimális hőmérséklete 60 °C, míg a piacon kapható kurrens másik terméké, melyet a Gist-Brocades gyárt, 55 °C (BASF, 1996). Az aktivitás több, mint 80 %-a 50 - 55 °C között marad, azonban egy kis aktivitás detektálható 75 - 80 °C hőmérsékleten is. Az enzim 15 percig 37 és 80 °C hőmérséklete való melegítésével a jelen találmány expresszált élesztőgomba fitázának maradék aktivitása sorrendben 100 és 63 %, és a BASF Gist-Brocades fitázé sorrendben 100 és 52 %. A két különböző forrásból származó enzim közötti különbségek bármely adott hőmérsékleten szignifikánsak



(lásd az 5. táblázatot). Így az élesztőgomba fitáz sokkal hőstabilabbnak tűnik, mint a jelenleg kapható fitáz termékeké.

4. táblázat

Az élesztőgombában túlexpresszált fitáz jellemzői¹

Optimális pH ²									
pH	1,0	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0	5,5	6,0	8,0
RA %	,5 ^e	59,7 ^c	64,8 ^c	48,1 ^d	81,0 ^b	100 ^a	95,0 ^a	66,3 ^c	,8 ^e
	±,2	±3	±6	±4	±5	±1	±6	±1	±4
Optimális hőmérséklet ³									
°C	25	37	45	50	55	60	75	80	
RA %	24,2 ^e	44,6 ^d	63,9 ^c	83,6 ^b	89,8 ^b	100 ^a	,6 ^f	,9 ^f	
	±,8	±3	±8	±2	±4	±4	±,1	±,2	

RA = relatív aktivitás

¹ Az adatok a relatív aktivitás $\pm$ standard deviáció (n=4) átlagai. Az egy sorban levő átlagok, ha eltérő felső indexes betűkkel rendelkeznek különbözőek (P<0,05). A statisztikai analízises rendszer általános lineáris modelljét (1988) használjuk a fő kezelési hatások (mint randomizált teljes tervek) analíziséhez és Bonferroni T-tesztet használunk a többszörös kezelések fő összehasonlításához. A szignifikancia szint P<0,05.

² Az aktivitást 37 °C hőmérsékleten vizsgáljuk (lásd a szöveget a fitáz egység meghatározásához). Különböző puffereket használtunk: 0,2 mM glicin-HCl puffert pH 1,0 - 3,5; 0,2 mM nátrium-citrát puffert pH 4,0 - 6,5; és 0,2 mM Tris-HCl puffert a pH 7 értékek fölött.

³ Az optimális hőmérsékletet pH 5,5 értéken határozzuk meg (0,2 mM nátrium-citrát pufferben).

5. táblázat

Az élesztőgombában túlexpresszált fitáz és az *A. niger*^{1,2} által termelt

Gist-Brocades fitáz termostabilitásának összehasonlítása



Relatív aktivitás, %	37 °C	80 °C
Élesztőgomba fitáz	100 ^a ±1	63 ^b ±1
<i>A. niger</i> fitáz	100 ^x ±3	52 ^y ±2
P ³ <		,03

¹ Az adatok a relatív aktivitás ± standard deviáció (n=4) átlagai. Az egy sorban levő átlagok, ha eltérő felső indexes betűkkel rendelkeznek különbözőek (P<0,05). A statisztikai analízises rendszer általános lineáris modelljét (1988) használjuk a fő kezelési hatások (mint randomizált teljes tervek) analizálásához és Bonferroni T-tesztet használunk a többszörös kezelések fő összehasonlításához. A szignifikancia szint P<0,05.

² Az enzimet 15 percig különböző hőmérsékleten melegítjük a 37 °C hőmérsékleten és pH 5,5 értéken való reagáltatás előtt.

³ A két fitáz aktivitása közötti t-teszt szignifikanciája (P értékét) az egyes hőmérsékleti beállításoknál.

Bár nem világos milyen összefüggés van a termotabilitásban bekövetkező ilyen javulás és a különböző poszt-transzlációs módosítások (feltekeredés, hasítás, glikoziláció, stb)(Li, X.L. et. al., "Expression of *Aureobasidium Pullulans XynA* in and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*," Appl. Environ. Microbiol., 62:209-13 (1996), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) között, az kétségtelenül előnyös ha sokkal termotabilabb fitáz enzimmel rendelkezünk, ami remélhetőleg rezisztens a takarmány pelletizálás alatti hővel szemben, ami a jelenlegi Gist-Brocades fitázok problémája.

6. példa

Az expresszált élesztőgomba fitázokkal megvalósított kukorica, szója és búza darából származó fitát-P in vitro hidrolízis

Az expresszált élesztőgomba fitáz ugyanolyan hatékonyan szabadít fel fitát-P-t kukorica és szójabab takarmányból, mint a Gist-Brocades fitáz a egység aktivitás alapján (lásd a 6. táblázatot). Ahogy vártuk, a fitát-P hidrolízise az idő és az aktivitási dózis függvénye. Az expresszált élesztőgomba fitáz hatékonyan szabadítja fel a fitát-P-t búzadarából is, ami azt jelzi, hogy nagy lehetőségekkel rendelkezik a kenyér fermentációban. Mivel az ezen vizsgálatban használt búzadara sokkal több belső fitáz aktivitást tartalmaz, mint az általánosságban használt búzaliszt, arra számítunk, hogy az expresszált élesztőgomba fitáz sokkal jobban javítja a liszt fitáz-P hidrolízist és erősebben befolyásolja a nyomelem felszabadulást, ha a sütőiparban használjuk (Hall, M.N. et al., "The Early days of Yeast Genetics" Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak).



6. táblázat

A kukorica, szójabab takarmányból (SBM) és buzadarából a túlexpresszált élesztőgomba fitáz és az *A. niger* fonalgomba fitáz által in vitro felszabadított szabad foszfor¹

Ég. fitáz	0	100	250	500	1000	250
(PU/kg)						(fg. fitáz)
Szabad foszfor (mg/g)						
Kukorica:						
1 óra	,23 ^d ± ,03	0,64 ^c ± ,08	1,14 ^b ± ,18	1,46 ^a ± 0,4	1,54 ^a ± ,04	1,16 ^b ± ,15
4 óra	,36 ^c ± ,02	1,26 ^b ± ,04	1,60 ^a ± ,03	1,66 ^a ± ,06	1,72 ^a ± ,04	1,68 ^a ± ,04
SBM:						
1 óra	,68 ^d ± ,01	1,18 ^{cd} ± ,02	1,62 ^c ± ,18	2,48 ^b ± ,32	3,13 ^a ± ,19	1,68 ^c ± ,2
4 óra	,73 ^d	1,67 ^c	2,69 ^b	3,41 ^a	3,71 ^a	2,78 ^b
B.dara:						
1 óra	3,56 ± ,39		4,11 ± ,64	4,67 ² ± ,05		
4 óra	5,63 ± ,5		6,02 ± ,48	6,38 ² ± ,07		

Ég. = élesztőgomba; fg. = fonalgomba

¹ Minden 5 g mintát 20 ml 0,2 mM nátrium-citárt pufferben áztatunk 37°C hőmérsékleten 1 vagy 4 órán keresztül. A felülúszót 15 percig 8000x g értéken való centrifugálással nyerjük ki. A Whatman 541 szűrőpapíton való átengedés után a mintát szabad P vizsgálatnak vetjük alá Chen, P.S. et al. módszerét használva ("Microdetermination of P" Anal. Chem. 28:1756-58 (1956), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). A táblázatban szereplő adatok a relatív aktivitás ± standard eltérés (n=4). A Statisztikai Analízises rendszer Általános Lineáris Modelljét (1988) használjuk a 6 kezelési hatások elemzéséhez, ahogy randomizált teljes tervek és Bonferroni t-tesztet használtunk a többszörös kezelések 6 összehasonlításához. A szignifikancia szinteket P<0,05-re állítjuk. Szignifikáns deifferencia van az 1. és 4. órás adatok között minden takarmánynál minden enzim dózisonál, ahogy azt a t-tesztel megállapítottuk. Az eltérő felső indexszel rendelkező átlagok egy adott sorban különbözőek (P<0,05).

² n=2.

Az *Aspergillus niger* fitáz (*PhyA*) túlexpresszálasát *Escherichia coli*-ban *Streptomyces lividans*-ban és *Saccharomyces cerevisiae*-ben hasonlítjuk össze, hogy hatékony és egyszerű rendszert nyerjünk a fitáz gazdaságos termeléséhez. Egy 55 kDa méretű, oldható intracelluláris proteint (mely a teljes oldható protein 9,6 %-át képviseli) expresszálunk *E. coli*-ban a pET25b(+) rendszert használva. Egy 57 kDa méretű extracelluláris proteint (a tenyésztápközegben levő teljes protein 20,3 %-át képviseli) expresszálunk *S. lividans*-ban a pLT1 promótert és az endoglükánáz E2 *SpeI* vezető peptidjét tartalmazó hordozó vektort használva. Nem mutattunk ki növekedést a fitáz aktivitásban egyik expressziós rendszerben sem, feltehetően a glikoziláció és más szükséges poszt-transzlációs módosítás hiányának köszönhetően. Ezzel szemben nagy extracelluláris fitáz aktivitás jött létre a *PhyA* génnel transzformált *S. cerevisiae*-ben. Három különböző jelpeptidet és három különböző tenyésztápközeget hasonlítottunk össze, hogy megállapítsuk a legjobb expressziós vektort és körülményeket. A *phyA* génből származó Sphy jelpeptid és YEPD tenyésztápközeg használata eredményezi a legnagyobb extracelluláris fitáz aktivitást. A túlexpresszált fitáz az élesztőgombában megközelítően 110 kDa, két pH optimummal rendelkezik: 2,0 - 2,5 és 5,5 - 6,0 és optimális hőmérséklete 60 °C.

7. példa

A *phyA* *Pichiában* való expresszálasához való módszerek és anyagok

Gazda és vektor. Egy EasySelect™ *Pichia* Expression Kit-et vásároltunk az Invitrogene-től (San Diego, CA). A kit gazdákat és vektorokat biztosít a gén extracelluláris vagy intracelluláris expresszálasához, a Mut⁺ vagy Mut^S törzsekben (a metanol hasznosítás normális vagy lassú). Az X33 törzset Mut⁺ törzsként használjuk és a

KM71 törzset Mut^S törzsként. Két vektort használunk, a pPICZ B-t (3,3 kb) és a pPICZ α A-t (3,6 kb), mindkettő az AOX1-et használja promóterként.

Az expressziós vektorok megszerkesztése. A különböző jelpeptidek *Pichia* rendszerben való PhyA expresszióra kifejtett hatásának összehasonlításához két szerkezetet készítettünk. Az elsőt, az 1,4 kb méretű EcoRI-KpnI fragmentet, mely az érett fitáz proteint kódoló PhyA szekvenciát tartalmazza, a pPICZ α A vektorba ligáljuk. Ebben a plazmidban (pPICZ α -phyA) a PhyA-t egy alfa-faktor vezeti, egy nagy általánosságban használt jelpeptid, mely a *Saccharomyces cerevisiae*-ből származik. A másodikat, a pYPP1 1,4 kb méretű KpnI-XbaI fragmentjét a vektorba ligáljuk (a phyA kódoló régióját saját jelpeptidje vezeti, mely nagyon hatékony az expresszált fitáz *Saccharomyces cerevisiae*-ben való szekretálásában).

Transzformáció és expresszió. A megerősített szerkezeteket PmeI-gyel linearizáljuk és GS115-be és KM71-be transzformáljuk EasyCompTM-mel, melyet a kit biztosít. NeocinTM-et használunk a pozitív telepek szelektálására. Miután az egyedüli teleppel inokuláljuk a 10 ml MGY tenyésztápközeget és az OD₆₀₀=2-6 érték eléréséig szaporítjuk 30 °C hőmérsékleten, majd a sejteket centrifugálással összegyűjtjük és 0,5 % metanolt tartalmazó 10 ml MMY tenyésztápközegben reszuszpendáljuk. A mintákat minden 12. vagy 24. órában összegyűjtjük az indukció után. A sejteket a felülúszótól elkülönítjük és üveggyöngyökkel lizáljuk, feltárási pufferben. A felülúszóban és a sejtekben levő fitáz aktivitást a korábbiakban leírtak szerint végezzük. SDS-PAGE és Western lenyomat technikát használunk az expresszált protein méretének és relatív mennyiségének meghatározásához.



8. példa

PhyA fitáz aktivitás a *Pichia*-ban

A *phyA*-hoz jelpeptidként alfa faktort használó expressziós szerkezetet két *Pichia* törzsbe transzformáljuk. A KM71 egy metanolt hasznosító lassú törzs, míg az X33, egy a metanolt hatékonyan használó vad típusú *Pichia*. A szkrínélést és az inkubálást 10 ml rázólabdikokban végezzük 29 - 30 °C hőmérsékleten. A KM71 transzformánsokhoz 20 kivett telep közül tizenkilenc 6 egység/ml tenyészet felülúszó értéknél nagyobb extracelluláris fitáz aktivitással rendelkezik 24 órával az indukció után. A 13-as számú telep mutatja a legnagyobb aktivitást az indukálás után 108 órával 26 egység/ml értékkel. Az X33 transzformánsai esetében az összes telep (20-ból 20) 10 egység/ml értéknél nagyobb aktivitást mutat 24 órával az indukció után. Az egyik telep (#101) 65 egység/ml felülúszó értékű aktivitást mutat. A fitáz expresszió idő lefolyás vizsgálatát KM71 és X33 törzsek esetében a 11. ábrán foglaljuk össze. Ezen két törzs metanol hasznosításbeli különbözőségei, és ezért fitáz expresszióbeli képességeik ellenére azt találtuk, hogy az alfa-faktort az élesztőgomba sejtek megfelelően dolgozzák fel. Emellett, majdnem az összes expresszált protein a tenyésztápközegbe szekretálódik, miután a teljes aktivitás nem több, mint 5 %-a expresszálódik intracellulárisan.

A szerves foszfor és a tenyésztápközeg pH értékének fitáz expresszióra kifejtett hatását BMGY és BMMY tenyésztápközegben vizsgáljuk az X33 *phyA* rekombinánsát (#101) használva. Az 50 mM foszfátot tartalmazó tenyésztápközeg eredményezi a legmagasabb fitáz aktivitást, 66 egység/ml 168 órával az indukció után. A tápközegbe 50 mM foszfátot helyezve, vizsgáltuk az ezen puffer különböző pH értékeinek (3, 4, 5, 6, 7) expresszióra kifejtett hatását is. Amikor a pH érték 6, ez az X33 transzformáns 75 egység fitáz/ml felülúszó aktivitást mutat. A protein

koncentrációra és az SDS-PAGE analízisre alapozva a fitáz protein expresszió hozamot 3 - 4 mg/ml érték közöttinek becsültük.

9. példa

A *Pichia*-ban expresszált PhyA fitáz tulajdonságai

Az expresszált fitáz molekula mérete és deglikozilációja. Miután a *phyA* transzformánssal inkubált tenyésztápközeg felülúszóját SDS-PAGE analízisnek vetjük alá, egy erős, körülbelül 95 kDa méretű sáv látható (12. ábra). Majdnem ez az egyetlen láthatóvá tett protein a felülúszóban. Az expresszált fitáz hatékonyan reagál a tisztított, natív *A. niger* fitáz ellen termelt a nyúl poliklonális antitesttel. Ez azt jelzi, hogy az expresszált fitáz immunoreaktivitása lényegében azonos az *Aspergillus niger*-ből származó natív fitázéval. A méretet 50 kDa-ra csökkentjük deglikozilációval, Endo H-t használva. A *phyA* antitest a deglikozilált fitázzal is reagál. Ezenkívül, a natív körülmények között végrehajtott deglikoziláció a fitáz aktivitást körülbelül 15 %-kal csökkenti, ami azt jelzi, hogy a glikoziláció lényeges a fitáz aktivitásokhoz. Ezenkívül, a glikoziláció hatással van az enzimek termostabilitásával (13. ábra).

Northern lenyomat analízis. Ahogy azt a 14. ábrán bemutatjuk, egy 1,3 kb hosszúságú *phyA* DNS próba hibridizálódott a KM71 törzsből (#13) és az X33 törzsből (#101) származó indukált transzformánsok mRNS-ével. Választ figyeltünk meg a transzformánsoknál az indukció előtt is. Feltehetően, a *phyA* ezen rendszerben való expressziója nem szabályozódik szigorúan a transzkripció szintjén.

Optimális pH, hőmérséklet és fitát-foszfor hidrolízis. Az *A. niger* fitázhoz hasonlóan, az expresszált fitáz két pH optimummal rendelkezik, 2,5 és 5,5 (15. ábra). Az expresszált fitáz optimális hőmérséklete 60 °C (16. ábra). Amikor az expresszált fitázt szója mintákkal inkubáljuk 100,

200, 400, 800, mU/g minta koncentrációban 37 °C hőmérsékleten, foszfor szabadult fel a fitáz dózissal egyenes arányban (17. ábra).

10. példa

Anyagok és módszerek az *E. coli appA* gén *Saccharomyces cerevisiae*-ben való túlexpresszálasához

Gén és protein. Ez a gén, melyet eredetileg *E. coli* periplazmás foszfoanhidrid-foszfohidrolázként (*appA*) határoztak meg, 1298 nukleotidot tartalmaz (GeneBank katalógusszám: M58708). Először azt találták, hogy a gén egy 2,5 pH optimummal rendelkező savanyú foszfatáz proteint kódol az *E. coli*-ban. A savanyú foszfatáz egy 44.644 dalton molekulatömegű monomer. Az érett EcAP 410 aminosavat tartalmaz (Dassa, J. et al., "The Complete Nucleotide Sequence of the Escherichia coli Gene *appA* Reveals Significant Homology Between pH 2,5 Acid Phosphatase and Glucose-1-Phosphatase" J. Bacteriology, 172:5497-5500 (1990), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Ostanin, K., és munkatársai ("Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia coli Acid Phosphatase" J. Biol. Chem., 267:22830-36 (1992), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) az *appA*-t túlexpresszálták *E. coli* BL21-ben pT7 vektort használva és annak savanyú foszfatázos aktivitását körülbelül 400-szorosára (440 mU/mg protein) növelik.

A gén és a gazda *E. coli* CU 1869 (No.47092) törzset az ATCC-től vettük. A gént, egy 1,3 kb hosszúságú inzertet, az *E. coli* BL21 (No 87441) törzsbe transzformálunk a pAPPA1 vektort használva (Ostanin, K. et al., "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia coli Acid Phosphatase" J. Biol. Chem., 267:22830-36 (1992), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak).

Gazda és vektor. Az *appA* gén *Saccharomyces cerevisiae*-ben való túlexpresszálasához való vektor a pYES2 és a gazda az INVScI (Invitrogen, San Diego, CA).

Az expressziós vektor megszerkesztése. Először egy 1,3 kb hosszúságú XbaI fragmentet izolálunk a pAPPA1 vektorból. Ez a fragment tartalmazza az *appA* gént saját jelpeptidjével. A pYES2 plazmid XbaI helyére való ligálás után, a szerkezetet (PYES2-*appA*) *Saccharomyces cerevisiae*-be transzformáljuk. Azonban a fitáz aktivitás nem nő sem az extra-, sem az intracelluláris részekben a kontrollokhoz képest. A pAPPA1 és pYPP1 plazmidokat (PhyA és jelpeptidje a pYES2 plazmidban) kotranszformáljuk az élesztőgomba törzsbe. Ismét nincs a pAPPA1-nek köszönhető fitáz aktivitásbeli növekedés a tenyésztápközegben vagy az élesztőgomba sejtekben.

Két primert szintetizálunk az *appA* gén kódoló régiójával rendelkező PhyA gén jelpeptidjének megszerkesztéséhez. Az egyik, a PhyA jelpeptidet és egy KpnI helyet az 5' végen tartalmazó 80 bp hosszúságú primer: GGG GTA CCA TGG GCG TCT CTG CTG TTC TAC TTC CTT TGT ATC TCC TGT CTG GAG TCA CCT CCG GAC AGA GTG AGC CGG AG (9. számú szekvencia). A másik primer 24 bp hosszúságú és egy EcoRI helyet tartalmaz, a 3' végen: GGG AAT TCA TTA CAA ACT GCA GGC (10. számú szekvencia). A PCR-t 25 cikluson keresztül futtatjuk, 1 percig 95 °C hőmérsékleten denaturálást végzünk, 1 percig 58 °C hőmérsékleten anneálást és 1 percig 72 °C hőmérsékleten lánc bővítést. Egy 1,3 kb hosszúságú fragmentet amplifikálunk, emésztünk, majd a pYES2 plazmidba ligáljuk. Miután az inzertet retsrikciós térképezéssel megerősítjük, a szerkezetet (pYES2-SphyA-*appA*) INVScI-be transzformáljuk lítium-acetátos módszerrel.

Expresszió. A szelektált transzformánsokat YEPD tenyésztápközegbe inokuláljuk. Az expressziót a tenyészethez OD600 = 2



érték elérése utáni galaktóz hozzáadással indukáljuk a korábban leírtak szerint. A sejteket 15 vagy 20 órával az indukció után összegyűjtjük.

Aktivítási vizsgálat. A savanyú foszfatáz aktivitást 37 °C hőmérsékleten vizsgáljuk 25 mM glicin-HCl pufferben (pH 2,5), szubsztrátként *p*-nitrofenil-foszfátot használva (törzsoldat 250 mM). 1,7 ml mennyiségű reakció puffert adunk 0,1 ml mintához. Öt percre 37 °C hőmérsékletű vízfürdőben való inkubálás után, 0,2 ml előmelegített küvettába helyezzük és 2 percen keresztül inkubáljuk egy 37 °C hőmérsékletű spektrofotométeres kamrában. A felszabadított *p*-nitrofenolt folyamatosan olvassuk le 5 percre 405 nm hullámhosszon az enzimatis aktivitás kiszámításához.

In vitro vizsgálat. A szójabab takarmányt (5,0 g) 20 ml 20 mM citrát pufferben (pH 5,5) szuszpendáljuk, összekeverjük 200 mU fitázzal, 37 °C hőmérsékleten 4 órán keresztül inkubáljuk folyamatos rázatás mellett. A jégen való, 10 percre tartó hűtés után az anyagot centrifuga csőbe helyezzük és 15 percre 15.000 x g értéken centrifugáljuk. A felülúszót használjuk a szabad foszfor mennyiségének meghatározásához.

11. példa

A Saccharomyces cerevisiae-ben a túlexpresszált *E. coli appA* génből eredő fitáz aktivitás mennyiségi meghatározása

Az *appA* túlexpresszált *E. coli*-ban (pAPPA1) az intracelluláris savanyú foszfatáz aktivitás 440 mU/mg protein. Példa nélküli, hogy 4900 mU/mg protein értéknél nagyobb intracelluláris fitáz aktivitást találtunk a transzformált törzsben. Azonban csupán minimális fitáz aktivitást tapasztaltunk a kontrollban (BL21). Így, ez a savanyú foszfatáz gén fitázt is kódol. Az *appA* gén szekvenciát összevetjük a *PhyA* gén



szekvenciájával és azt találtuk, hogy a két gén 23 %-os azonosságot mutat.

Az INVScI pYES2-Sphy-appA szerkezettel (melyet a PhyA jelpeptid vezet) való transzformálása extracelluláris fitáz aktivitást eredményez a felülúszóban, mely 2000-szer nagyobb, mint a vad típusú vagy az *appA* gént, valamint a saját jelpeptidjét tartalmazó transzformánsok extracelluláris fitáz aktivitása (lásd a 7. táblázatot).

7. táblázat

Extracelluláris fitáz aktivitás a különböző jelpeptidekkel rendelkező *appA* gén transzformánsaiban

Szerkezet	Jel	Aktivitás (mU/ml)	Aktivitás (mU/mg protein)
PYES-appA	appA	Nem detektálható	Nem detektálható
pYES2-SphyA- appA	Phy	1,158	445

A tenyésztápközeg (YEPD) szervesetlen foszfor és fitát tartalmának, pH értékének és hőmérsékletének hatását a pYES2-Sphy-A-appA általi fitáz aktivitás expresszióra a 8. táblázatban mutatjuk be. A legmagasabb fitáz aktivitás 2.286 mU/ml (633 mU/mg protein) optimális körülmények között.



8. táblázat

A YEPD tápközegben a különböző körülmények hatása a pYES2-Sphy A-appA fitáz aktivitás expresszióra élesztőgombában

Tápközeg körülmények	Aktivitás (mU/ml)
Foszfor, mg/100 ml	
0	1402
1	714
5	722
10	456
Nátrium-fitát, g/100 ml	
0	870
0,1	1019
1,0	1748
pH	
5,0	892
7,0	996
8,0	2286
Hőmérséklet, °C	
25	312
30	1036
37	996

Az élesztőgomba transzformánsok által termelt túlexpresszált extracelluláris fitáz aktivitás termotabilitása nagyobb, mint a pAPPA1 plazmiddal transzformált *E. coli* által termelt intracelluláris fitáz (lásd a 9. táblázatot). Az extracelluláris fitáz 15 percig 80 °C hőmérsékletre való melegítése 30 %-os fitáz aktivitás veszteséget jelent, míg majdnem a teljes fitáz aktivitás elvész az *E. coli* ból, ugyanilyen körülmények között.



9. táblázat

A melegítés hatása a különböző eredetű fitázok aktivitására (80 °C hőmérséklet, 15 perc)

Fitáz	Relatív aktivitás melegítés után, %
<i>appA E. coli</i> ban	0,1
<i>appA S. cerevisiae</i> -ben	69
PhyA <i>S. cerevisiae</i> -ben	66
BASF fitáz	50

Az *E. coli*, az élesztőgombában túlexpresszált AppA, és a BASF fitázok (200 mU) szójabab étrendből származó foszfor felszabadításra kifejtett hatásának összehasonlítását a 10. táblázatban mutatjuk be. Az eredmények azt jelzik, hogy mind a három eredetű fitáz hatékonyan szabadítja fel a fitát-foszfort a szójabab étrendből.

10. táblázat

A szójabab étrendből különböző eredetű fitázokkal felszabadított szabad foszfor

Fitáz	Foszfor (mg/g)
<i>appA E. coli</i> -ban	1,11
<i>appA S. cerevisiae</i> -ben	0,69
BASF	0,87

Amikor az *E. coli appA* (savanyú foszfatáz) gén *Saccharomyces cerevisiae*-ben expresszálódik, olyan extracelluláris fitáz aktivitást eredményez a tenyésztápközegben, ami több, mint 2000-szer nagyobb, mint a kontroll termelése. A túlexpresszált fitáz hatékonyan szabadítja fel a fitát-foszfort a szójabab étrendből és úgy látszik, sokkal termotabilabb,



mint a jelenleg a kereskedelemben beszerezhető fitáz vagy az *E. coli*-ban, ugyanezen gén (*appA*) által termelt intracelluláris fitáz.

12. példa

A Pichia pastoris-ban egy savanyú foszfatázt/fitázt kódoló *E. coli appA* gén túlexpresszáálásához való módszerek és anyagok

Gén és protein. Az *appA* gént és a gazda *E. coli* törzset (CU 1867, No. 47092) az ATCC-től szereztük. A gént, egy 1,3 kb hosszúságú inzertet, az *E. coli* BL21 törzsbe (No. 87441) transzformáljuk a pAPPA1 vektort (Ostanin, K. et al., "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis and Mechanism of Escherichia coli Acid Phosphatase" J. Biol. Chem., 267:22830-36 (1992), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) használva.

Gazda és vektor. Egy EasySelect™ *Pichia* Expression Kit-et szereztünk az Invitrogene-től (San Diego, CA). A kit gazdát és vektorokat biztosít a gén egy vad-típusú törzsben (X33) való extracelluláris vagy intracelluláris expressziójához. Két vektort használunk, a pPICZ B-t (3,3 kb) és a pPICZαA-t (3,6 kb), mindkettő az AOX1-et használja promóterként.

Az expressziós vektor megszerkesztése. Két primert használunk a pAPPA1 plazmidból származó *appA* gén amplifikálásához és két restrikciós helyet, EcoRI és KpnI, hozunk létre sorrendben az 5' és 3' végeken.

Upstream primer: GGA ATT CCA GAG TGA GCC GGA (11. számú szekvencia)

Downstream primer: GGG GTA CCT TAC AAA CTG CAC G (12. számú szekvencia)



Templát: az ATCC 87441-ből izolált pAPPA1 DNS

A PCR-t 30 cikluson keresztül hajtjuk végre, 1 percig 94 °C hőmérsékleten denaturációt, 1 percig 55 °C hőmérsékleten anneálást, és 1 percig 72 °C hőmérsékleten lánc kibővítést végezve. Egy 1.245 bázispár hosszúságú fragmentet amplifikálunk, EcoRI és KpnI enzimekkel emésztetjük és a pPICZ B plazmidba (3,3 kb) és a pPICZ α A plazmidba (3,6 kb) ligáljuk. A ligálást restrikciós térképezéssel erősítjük meg a szerkezetek DH5 α -ba való transzformálása után.

A szerkezet *Pichia*-ba (X33) való transzformálása. Az egyes transzformációkhoz 100 μ g plazmid DNS-t állítunk elő és linearizálunk PmeI-gyel való emésztéssel. A linearizáció után a DNS-t tisztítjuk és 10 μ l steril, deionizált vízben reszuszpendáljuk. Valójában a DNS mennyiségének a felét használjuk az egyes transzformációkhoz. Elektroporációt és EasyComp kémiai kitet (Invitrogene) használunk a DNS X33-ba való transzformálásához. Az elektroporáció esetében egy Electro Cell manipulátort (ECM 600, Gentromics, BTX Instrument Division, San Diego, CA) és 2 mm-es küvettát használunk. Az ellenállás 186 Ohm, a terhelés 1,5 kilovolt és az aktuális terhelési idő megközelítően 7 milliszekundum. Az elektroporált sejteket tenyésztápközeg ml mennyiségenként 100 mg Zeocint tartalmazó YPD agar lemezekben inkubáljuk 30 °C hőmérsékleten 2-4 napig a telep növekedéshez. A kémiai transzformáció esetében a sejteket YPDS agar lemezekben szaporítjuk, mely tenyésztápközeg ml-enként 100 mg Zeocint tartalmaz. Az elektroporációhoz hasonlóan a kémiai módszer alacsonyabb transzformációs hatékonyságot mutat.

Expresszió. Az egyedüli telepeket 10 ml MGY tenyésztápközegbe (30 ml-es kémcső) inokuláljuk és OD600 = 5-6 érték eléréséig szaporítjuk 28-30 °C hőmérsékleten rázós inkubáltorban (200 rpm fordulatszám). A sejteket centrifugálással (2000 rpm) összegyűjtjük és 0,5 % metanolt



tartalmazó 10 ml BMMY tenyésztápközegebe reszuszpendáljuk az expresszió indukálása céljából. 200 ml mennyiségű mintákat veszünk minden 12. vagy 14. órában az indukció után. Metanolt (100 %) adunk hozzá 100 µl mennyiségben minden 24. órában a tápközegeben a 0,5 - 1 %-os koncentráció fenntartása érdekében.

Analízis. A sejteket szeparáljuk a tenyésztápközegtől (felülúszó) és üveggyöngyökkel feltárási pufferben lizáljuk. A felülúszó extracelluláris fitáz aktivitását és a lizált sejtek intracelluláris fitáz aktivitását a korábban leírtak (0,2 M citrát puffer, pH 5,5, 37 °C hőmérséklet, 10 mM nátrium-fitátot használva) szerint vizsgáljuk. A savanyú foszfatáz aktivitást 37 °C hőmérsékleten vizsgáljuk 25 mM glicin-HCl pufferben (pH 2,5) *p*-nitrofenil-foszfátot használva szubsztrátként (törzsoldat 250 mM). 1,7 ml reakció puffert adunk 0,1 ml mintához. A felszabadult *p*-nitrofenolt folyamatosan olvassuk le 5 percig 4,5 nm hullámhosszon az enzimatis aktivitás kiszámításához. SDS-PAGE-t (12%) végzünk, hogy meghatározzuk az expresszált protein méretét és viszonylagos mennyiségét. Az expresszált fitáz optimális pH értékét és hőmérsékletét az eredményekben leírtak szerint határozzuk meg.

In vitro vizsgálat. A szójabab takarmányt (5,0 g) 20 ml 20 mM citrát pufferben (pH 5,5) szuszpendáljuk és különböző mennyiségű fitázzal keverjük össze, majd 37 °C hőmérsékleten 4 órán keresztül inkubáljuk folyamatos rázatás mellett. A jégen való 10 percig tartó hűtés után az anyagot centrifuga csöbe helyezzük és 15 percig 15.000 x g értéken centrifugáljuk. A felülúszót használjuk a szabad foszfor mennyiségének meghatározásához.

13. példa

Az *E. coli appA* gént túlexpresszálo *Pichia pastoris* utáni telep fitáz aktivitás szkrínelés



A vad típusú *Pichia* X33 minimális fitáz aktivitással rendelkezik intracellulárisan (<0,03 U/mg protein) vagy extracellulárisan (<0,05 U/ml). A pPICZB plazmidba (az α faktor nélkül és feltehetően intracelluláris fitázt termel) inzertált *appA* génnel transzformált X33 sejtek nem mutatnak semmilyen fitáz aktivitásbeli növekedést (extracelluláris, 0,2 U/ml és intracelluláris, 0,05 U/ml protein).

Az X33 sejtek pPIZ α A-*appA* szerkezettel (melyet az α -faktor jelpeptidje vezet) való transzformálása extracelluláris fitáz aktivitást termel a tenyésztápközegbe. Kezdetben 72 telepet szkríneltünk. Csupán két telep rendelkezik <1 U/ml értéknél magasabb aktivitással az indukció után 40 órával. A telepek többségének aktivitása 10 - 20 U/ml az indukció után 40 órával. Mind a 70 telep >80 U/ml fitáz aktivitással rendelkezik az indukció után 118 órával. Az ezideig detektált legmagasabb fitáz aktivitás 215 U/ml az indukció után 192 órával (lásd a 11. táblázatot).



11. táblázat

Az extracelluláris fitáz aktivitás értékei pPIZ α A-appA szerkezettel transzformált X33 telepekben indukció után 40 és 118 órával

A telepek száma	Az indukció után 40 órával	Az indukció után 118 órával
2	<1 U/ml	
6	1 - 10 U/ml	
36	11 - 20 U/ml	
28	> 20 U/ml	
70		>80 U/ml

A 215 U fitáz aktivitás/ml értéken expresszálo transzformánsokban meglevő fitáz és savanyú foszfatáz aktivitásokat a vad típusú X33 értékeihez hasonlítjuk (az indukció után 192 órával)(lásd a 12. táblázatot). Majdnem az összes expresszált fitáz protein szekretálódik a sejtekből, ami azt jelzi, hogy az α -faktor nagyon hatékony jelpeptid a fitáz szekrécióhoz.

12. táblázat

Fitáz és savanyú foszfatáz aktivitás a pPIZ α A-appA transzformánsokban és a vad típusú X33-ban az indukció után 192 órával

	Vad típusú X33		pPIZ α A-appA transzformánsok	
	Extracelluláris	Intracelluláris	Extracelluláris	Intracelluláris
	<u>U/ml</u>	<u>U/mg protein</u>	<u>U/ml</u>	<u>U/mg protein</u>
Fitáz	0,05	0,03	215	0,5
Savanyú foszfatáz	0,01	0,002	5,88	0,9

Az ugyanezen savanyú foszfatáz *appA* génnel rendelkező *E. coli* transzformánsok 5 U/mg protein intracelluláris fitáz aktivitással rendelkeznek (Ostanin et al., "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis and Mechanism of Escherichia coli Acid Phosphatase", J. Biol. Chem., 267:22830-36 (1992), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). A *PhyA* gén *A.niger* -be történő transzformálása 7,6 U/ml extracelluláris aktivitást eredményez (Hartinsveldt et al., "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger* ," Gene 127:87-94 (1993), mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak). Ezen eredményekkel összehasonlítva, a *Pichiá*-ban található fitáz expressziós rendszer nagyon hatékony expressziós rendszer.

14. példa

A fitáz expresszió idő lefutása

Lineáris növekedés figyelhető meg a tenyésztápközegben levő extracelluláris fitáz aktivitásban az összes kiválasztott telep esetében 192 óra ideig, indukció után. A 18. ábra öt kiválasztott telep aktivitás változásait mutatja be az indukció után 24 - 163 órával.

15. példa

A tenyésztápközeg pH értékének hatása a fitáz expresszióra (a #23 telep aktivitása 136 U/ml a 186. órában)

0,1 M foszfát pufferelt tenyésztápközeget használva, a különböző pH értékek hatását a transzformánsokban megfigyelhető extracelluláris fitáz termelésre a puffer nélküli kontroll tenyésztápközeggel (pH 7,0) való összehasonlítással állapítjuk meg. A pH 6 értékre pufferelt tenyésztápközeg eredményezi a legmagasabb fitáz aktivitást (lásd a 19. ábrát).

16. ábra

Az expresszált extracelluláris fitáz mérete

SDS-PAGE analízist használva (12 % gél) egy világos sávot észleltünk a három különböző teleppel inokulált tenyészet tápközeg felülúszójában (lásd 20. ábra). A méret körülbelül 55 kDa, feltehetően részben glikozilált. Mivel az expresszált protein majdnem csak a látható sávot képviseli a felülúszóban, megfelelőnek tűnhet az enzim termék összegyűjtése a fáradságos tisztítási lépés elvégzése nélkül.



17. példa

Az expresszált extracelluláris fitáz optimális pH értéke és hőmérséklete
(#23 telep)

Az expresszált fitáz optimális pH értéke 2,5 - 3,5 (lásd a 21. ábrát). Ez jelentősen eltér az *A. niger*-ből (BASF) vagy más expressziós rendszereinkből származó *phyA* fitázokétól. A fitáz funkciókhoz ideális a gyomor pH értéke.

Az expresszált enzim optimális hőmérséklete 60 °C (lásd a 22. ábrát).

18. példa

Az expresszált fitáz szójabab ételből történő fitát-foszfor hidrolízisre
kifejtett hatása

Ez a túlexpresszált *E. coli* fitáz (#23 telep) hatékonyan hidrolizálja a fitát-foszfort szójabab ételből (lásd a 23. ábrát). A szabad foszfor felszabadítása a keverékben lineáris 0 - 800 mU fitáz/g takarmány értékek között.

19. példa

A *Pichia pastoris* expresszált *E. coli* AppA fitázának hatása a fitát foszfor
biológiai elérhetőségre választási malacok esetében

A *Pichia* által termelt expresszált *E. coli* fitáz sertés étrendben való tápértékének meghatározásához ezen új fitáz hatékonyságát a szervetlen foszforéhoz vagy a kereskedelemben beszerezhető mikrobiális

fitázokéhoz hasonlítjuk (Natuphos™, BASF Corp., Mt. Olive, NJ). Negyvennyolc választási malacot választunk egyszerre többet ellő anyadisznótól a Cornell Swine Research Farm-ról. A malacokat 21 napos korban választjuk el és kereskedelmi tápon tartjuk 28 napig. Ezután az állatokat ólanként kettesével hat ólban helyezük el és a kezelést véletlenszerűen osztjuk el. A sertések két hétig szokhatták a kukorica-szójabab alapú takarmányt (13. táblázat).

13. táblázat
A sertések kísérleti takarmányának összetétele

Összetevők	+C % étrend	-C % étrend	YP % étrend	MP % étrend
Kukorica	60,5	61,57	61,07	61,07
Tejsavó	3	3	3	3
protein koncentrátum				
SBM 44%	30	30	30	30
Kukoricaolaj	3	3	3	3
Mész	0,8	0,93	0,93	0,93
Di-kalcium- foszfát	1,2	0	0	0
Vitamin és	0,5	0,5	0,5	0,5
Ásványi anyag Premix				
ECAP premix	0	0	0,5	0
MP premix	0	0	0	0,5
Só	0,5	0,5	0,5	0,5
CSP 250	0,5	0,5	0,5	0,5
Összesen	100	100	100	100
CP	20,6	20,6	20,6	20,6
Ca	0,73	0,47	0,47	0,47
P(összes)	0,6	0,39	0,39	0,39

Megjegyzés: Minden premix kukoricát használ hordozóként.

A Vitamin és Ásványi anyag premix: 2,540 IU A vit., 660 IU D vit., 15 IU E vit., 2,2 mg K vit.

3,3 mg riboflavin, 13,2 mg pantoténsav, 17,6 mg niacin, 110,1 mg kolin, 1,98 ug B-12

37,4 mg Mn, 0,6 mg I, 10 mg Cu, 0,3 mg Se, 100 mg Zn, és 100 mg Fe/kg takarmányként

Ezután minden ól megkapja a négy kezelési étrend egyikét. A pozitív kontroll (+C) csoport alap étrendet kap dikálcium-foszfáttal kiegészítve. A negatív kontroll (-C) csoport csak az alap étrendet kapja. Az élesztőgomba fitázos csoport (YP) expresszált *E. coli* fitázzal (1200 U/kg takarmány) kiegészített étrendet kap. A mikrobás fitázos csoport

(MP) alapétrendet kap BASF fitázzal (1200 U/kg takarmány) kiegészítve. A sertések szabadon hozzáférnek a takarmányhoz és a vízhez. Az egyes sertések testtömeg gyarapodását hetente jegyezzük fel. Az egyes ketrecek napi takarmányfelvételét naponta jegyezzük fel. Az egyes setésekből hetente veszünk vérmintát a plazma szövetlen foszfor koncentrációjának megállapítása céljából. A testtömeget (BW), az átlagos napi tömeggyarapodást (ADG), az átlagos takarmány felvételt (ADFI) és a takarmány/gyarapodás arányt (F:G) valamint a plazma szövetlen foszfor koncentrációját (PP) a 14. táblázatban mutatjuk be.



14. táblázat

A sertések PP, BW, ADG, ADFI és F:G értékei az étrendi fitáz hatására

	+C	-C	YP	MP
<u>Kiindulási</u>				
PP	12,99	13,02	13,07	13,54
BW	11,54	11,63	12	11,5
<u>1. Hét</u>				
PP	10,83 ^A	6,48 ^C	8,59 ^B	8,35 ^B
BW	14	13,83	14,29	13,92
ADG	,351	,316	,327	,345
ADFI	,700	,684	,697	,697
F:G	2,04	2,20	2,18	2,13
<u>2. Hét</u>				
PP	9,76 ^A	5,64 ^C	8,72 ^B	7,84 ^B
BW	18,04	17,42	17,83	17,71
ADG	,578	,512	,506	,542
ADFI	,833	,855	,784	,837
F:G	1,46 ^B	1,67 ^A	1,56 ^{AB}	1,55 ^{AB}
<u>3. Hét</u>				
PP	11 ^A	6,26 ^C	8,64 ^B	8,13 ^B
BW	22,58	21,17	22	22,21
ADG	,649 ^A	,536 ^B	,595 ^{AB}	,643 ^{AB}
ADFI	1,166	1,02	1,001	1,003
F:G	1,8	1,92	1,71	1,36
<u>4. Hét</u>				
PP	10,94 ^A	6,31 ^C	9,65 ^B	9,2 ^B
BW	27,54	25,29	27,79	27,38
ADG	,708 ^{AB}	,589 ^B	,827 ^A	,738 ^{AB}
ADFI	1,395 ^A	1,049 ^B	1,309 ^A	1,273 ^{AB}
F:G	1,98	1,87	1,59	1,73

¹Az azonos sorokban levő eltérő betűkkel jelölt számok szignifikánsan eltérőek. A különbség analízisét Bonferroni (DUNN) T teszttel végezzük el alfa=0,05 és df=20.

Ezenkívül, súlyos foszfor hiány lépett fel a negatív kontroll csoportban a négy hetes kísérlet végére. Azonban nem volt foszfor hiány jel a másik három csoportban. Egyértelmű, hogy a *Pichia* által expresszált *E. coli* fitáz legalább olyan hatékonynak, ha nem hatékonyabbnak bizonyult, mint a kereskedelmi mikrobiális fitáz, a fitát-foszfor biológiai



elérhetőségének javításában a kukorica szójabab takarmányos étrend során választási malacoknál. Ez felhasználható a szerves foszfor kiegészítés helyett választási malacok esetében.

20. példa

A Pichia pastoris által expresszált *E. coli* AppA fitáz hatásai a vas (Fe) és fitát-foszfor biológiai elérhetőségére választási malacoknál

A *Pichia* által túlexpresszált *E. coli* fitáz étrendi fitát-kötött Fe biológiai elérhetőségére kifejtett hatásának meghatározásához választott malacoknál, 20 anémiás malacot (21 napos, 7,3 g hemoglobin (Hb/dl vér) használunk. A malacokat vashiányos takarmánnyal etetjük 7 napig, majd anyagcsere ketrecekbe helyezük 28 napos korban. A malacokat ezután a kísérleti étrenden tartjuk 35 napos kortól 5 héten keresztül. A kísérleti étrend a következő: Fe-hiányos alap étrend (-C, hozzáadott szerves foszforral), Fe-kiegészített étrend (+C), Fe- és foszfor-hiányos étrend expresszált *E. coli* fitázzal (YP) kiegészítve vagy kereskedelmi mikrobiális fitázzal (BASF, MP; 1200 U/kg takarmány) kiegészítve. A testtömeget (BW), a tömörített sejt térfogatot (PCV), Hb-t, és a plazma szerves foszfor koncentrációját (PP) hetente határozzuk meg. Az eredményeket a 15. táblázatban mutatjuk be.



15. táblázat

A setések PCV, Hb, BW és PP értékei az étrendi fitáz hatására

	+C	-C	YP	MP
<u>Kezdeti</u>				
PCV	25	25	26	24
Hb	7,73	7,22	7,85	7,08
BW	8,14	8,27	8,17	7,45
PP	7,92	7,76	7,21	7,36
<u>1. Hét</u>				
PCV	25	26	29	27
Hb	7,62	8,3	8,77	7,88
BW	9,44	8,84	9,63	8,57
PP	8,41	8,45	8,48	8,22
<u>2. Hét</u>				
PCV	29	26	30	28
Hb	8,6	7,24	8,93	8,27
BW	12,32	10,13	11,91	10,84
PP	10,28 ^a	9,05 ^{ab}	8,89 ^{ab}	8,22 ^a
<u>3. Hét</u>				
PCV	36 ^a	29 ^b	34 ^a	33 ^a
Hb	11,55 ^a	8,2 ^b	10,84 ^a	9,96 ^{ab}
BW	16,77 ^a	13 ^b	15,62 ^{ab}	14,62 ^{ab}
PP	12,14 ^a	11,37 ^{ab}	10,25 ^{bc}	9,71 ^c
<u>4. Hét</u>				
PCV	39	34	38	36
Hb	12,99 ^a	10,11 ^b	12,27 ^a	11,35 ^{ab}
BW	21,36 ^a	17,37 ^b	19,44 ^{ab}	18,56 ^{ab}
PP	10,19 ^a	9,34 ^{ab}	9,49 ^{ab}	8,8 ^b
<u>5. Hét</u>				
PCV	40	38	40	39
Hb	13,52 ^a	12,24 ^b	13,64 ^a	13,13 ^{ab}
BW	26,53	22,59	24,27	23,43
PP	9,27 ^a	8,95 ^{ab}	8,79 ^{ab}	8,02 ⁿ

¹Az értékek átlagok (n=5). Az átlagok ugyanazon a soron belül, eltérő indexben szereplő betűkkel, szignifikáns különbséget jelöl (P < 0,10).



Következtetésként, a *Pichia* által túlexpresszált *E. coli* fitáz legalább olyan hatékony, mint a BASF fitáz a fitát-foszfor és Fe hasznosítás javításában a kukorica-szója étrendben választási malacoknál.

Bár az előnyös megvalósulásokat bemutattuk és részletesen leírtuk a tudomány e területén átlagosan képzett szakember számára egyértelmű lesz, hogy a különböző módosítások, hozzáadások, helyettesítések és más hasonló változtatás megvalósíthatók a jelen találmány szellemétől való eltávolodás nélkül, ezért ezeket az alábbiakban szereplő igénypontokkal meghatározott találmány körébe tartozónak tekintjük.

SZEKVENCIA LISTA

<110> Cornell Research Foundation, Inc.

<120> A FITÁZ GÉNEK TÚLEXPRESSZÁLÁSA ÉLESZTŐGOMBA
RENDSZEREKBEN

<130> 19603/1341

<140>

<141>

<150> 09/104,769

<151> 1998-06-25

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 1

cggaattcgt cacctccgga ct

22

<210> 2

<211> 24

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 2

cccaagcttc taagcaaaac actc

24

<210> 3

<211> 22

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 3

cagctatgac catgattacg cc

22

<210> 4

<211> 26

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 4

cctagaacgg gaattcattg gccgcc

26

<210> 5

<211> 24

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 5

cccaagcttg atcacatcca ttca

24

<210> 6

<211> 25

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<220>

<400> 6

cggggactgc tagcgcacgt tcgat

25

<210> 7

<211> 28

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 7

atcgaacgtg cgctagcagc agtccccg

28

<210> 8

<211> 24

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 8

gctctagact aagcaaaaca ctcc

24

<210> 9

<211> 80

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 9



ggggtacat gggcgtctct gctgttctac ttctttgta tctcctgtct ggagtcacct 60
ccggacagag tgagccggag 80

<210> 10

<211> 24

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 10

gggaattcat tacaaactgc aggc 24

<210> 11

<211> 21

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 11

ggaattccag agtgagccgg a 21

<210> 12

<211> 22

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Mesterséges szekvencia leírása: Primer a
PCR Amplifikáláshoz és Klónozáshoz

<400> 12

ggggtacctt acaaactgca cg

22



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Élesztőgombában történő fitáz termelésére szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy

egy olyan heterológ gént biztosítunk, mely fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódol, és az említett gént élesztőgomba törzsben expresszáljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a proteint, vagy polipeptidet egy jelpeptid vezeti, a sejt a tenyésztápközegbe szekretálja, vagy csak intracellulárisan expresszálódik.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a protein vagy a polipeptid a tenyésztápközegbe szekretálódik és koncentrációja a 300 egység/ml értéket meghaladja.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódoló heterológ gént úgy illesztjük be, hogy egy transzkripció erősítő elemmel kereten belül legyen.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ gént egy stabil vektor hordozza.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ gént egy mesterséges kromoszóma hordozza.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ gént egy élesztőgomba törzs kromoszómájába integráltuk.



8. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ gént növényi sejtekből izoláljuk.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ gént fonalagomba sejtekből izoláljuk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ gén az *Aspergillus niger* egy *phyA* génje.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzset a *Saccharomyces*, a *Kluyveromyces*, a *Torulaspora*, és a *Schizosaccharomyces* nemzetségeket magába foglaló csoportból szelektáljuk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba *Saccharomyces cerevisiae*-t jelent.

13. A 10. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzs egy metilotróf élesztőgomba törzset jelent.

14. A 9. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a metilotróf élesztőgomba törzs a *Pichia pastoris*-t jelenti.

15. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ gént bakteriális sejtekből izoláljuk.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ gén az *Escherichia coli* *appA* génje.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzset a *Saccharomyces*, a *Kluyveromyces*, a *Torulaspora*, és a *Schizosaccharomyces* nemzetségeket magába foglaló csoportból szelektáljuk.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzs *Saccharomyces cerevisiae*-t jelent.

19. A 15. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzs egy metilotróf élesztőgomba törzset jelent.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a metilotróf élesztőgomba törzs a *Pichia pastoris*-t jelenti.

21. Egy protein vagy egy polipeptid azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással termeljük.

22. A 21. igénypont szerinti protein vagy polipeptid azzal jellemezve, hogy a protein vagy a polipeptid egy jelpeptidet tartalmaz.

23. A 21. igénypont szerinti protein vagy polipeptid azzal jellemezve, hogy a heterológ gén az *Aspergillus niger phyA* génje.

24. A 21. igénypont szerinti protein vagy polipeptid azzal jellemezve, hogy a heterológ gén az *Escherichia coli appA* génje.

25. A 21. igénypont szerinti protein vagy polipeptid azzal jellemezve, hogy fitáz aktivitással rendelkezik, az 57 - 56 °C hőmérsékleti határok között és pH 2,5 - 3,5 vagy 5 - 5,5 értékek között.



26. A 25. igénypont szerinti protein vagy polipeptid azzal jellemezve, hogy az optimális aktivitás hőmérséklet intervalluma 58 - 62 °C között van.

27. A 21. igénypont szerinti fitáz aktivitással rendelkező protein vagy polipeptid azzal jellemezve, hogy a protein legalább 40 %-os aktivitást tart meg a protein 15 percig 90 °C hőmérsékleten végzett melegítése után.

28. A 27. igénypont szerinti protein vagy polipeptid azzal jellemezve, hogy a protein 40 % és 60 % közötti aktivitást tart meg a protein 15 percig 90 °C hőmérsékleten végzett melegítése után.

29. A 21. igénypont szerinti fitáz aktivitással rendelkező protein vagy polipeptid azzal jellemezve, hogy a protein legalább 60 %-os aktivitást tart meg a protein 15 percig 60 °C hőmérsékleten végzett melegítése után.

30. Egy élesztőgomba törzs azzal jellemezve, hogy magába foglal egy heterológ gént, mely egy fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódol, és mely funkcionálisan kapcsolódik a fitáz élesztőgombában való expressziójára képes promóterhez.

31. A 30. igénypont szerinti élesztőgomba törzs azzal jellemezve, hogy a heterológ gén az *Aspergillus niger phyA* génjét jelenti.

32. A 31. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzset a *Saccharomyces*, a *Kluyveromyces*, a



Torulaspora, és a *Schizosaccharomyces* nemzetségeket magába foglaló csoportból szelektáljuk.

33. A 32. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba *Saccharomyces cerevisiae*-t jelent.

34. A 31. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzs egy metilotróf élesztőgomba törzset jelent.

35. A 34. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a metilotróf élesztőgomba törzs a *Pichia pastoris*-t jelenti.

36. A 30. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ gén az *Escherichia coli appA* génje.

37. A 36. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzset a *Saccharomyces*, a *Kluyveromyces*, a *Torulaspora*, és a *Schizosaccharomyces* nemzetségeket magába foglaló csoportból szelektáljuk.

38. A 37. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzs *Saccharomyces cerevisiae*-t jelent.

39. A 36. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzs egy metilotróf élesztőgomba törzset jelent.

40. A 39. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a metilotróf élesztőgomba törzs a *Pichia pastoris*-t jelenti.

41. Egy vektor azzal jellemezve, hogy

egy nem élesztőgomba szervezetből származó gént tartalmaz, mely fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet kódol;

egy fitáz aktivitással rendelkező peptidet kódoló génhez funkcionálisan kapcsolt promótert tartalmaz, az említett promóter képes élesztőgombában a transzkripció megindítására; és

egy replikációs origót tartalmaz, mely képes a vektort az élesztőgombában megtartani.

42. A 41. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy egy szelektálható markert tartalmaz.

43. A 42. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy a szelektálható markert az URA3-at, LEU2-öt, TRP1-et, HIS3-at, HIS4-et, ARG4-et és egy antibiotikum rezisztencia gént tartalmazó csoportból szelektáljuk.

44. A 41. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy a továbbiakban még tartalmaz egy replikációs origót, mely képes bakteriális sejtben replikálódni.

45. A 44. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy a replikációs origót a ColE1-et, Ori-t és oriT-t magába foglaló csoportból szelektáljuk.

46. A 41. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy a heterológ gént egy bakteriális sejtől izoláljuk.

47. A 46. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy a heterológ gén az *Aspergillus niger* *phyA* génje.

48. A 46. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy a heterológ gén az *Escherichia coli appA* génje.

49. Eljárás fitáz aktivitással rendelkező protein vagy polipeptid termelésére azzal jellemezve, hogy

egy izolált *appA* gént biztosítunk, mely fitáz aktivitással rendelkező protein vagy polipeptidet kódol és

az említett gént a gazdasejtben expresszáljuk.

50. A 49. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az *appA* gént az *Escherichia coli* -ból izoláljuk.

51. A 49. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a gazdasejt egy élesztőgomba törzs vagy egy fonalas gomba.

52. Az 51. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a fonalas gomba az *Aspergillus niger* -t jelenti.

53. Az 51. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzset a *Saccharomyces*, a *Kluyveromyces*, a *Torulaspora* és a *Schizosaccharomyces* nemzetségekből szelektáljuk.

54. Az 53. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az élesztőgomba törzs a *Saccharomyces cerevisiae*-t jelenti.

55. A 49. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a jelpeptiddel vezetett proteint vagy polipeptidet a sejt a tenyésztápközegebe szekretálja, vagy csak intracellulárisan expresszálja.



56. A fitát inozittá és szervesen foszforra történő konvertálására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy

egy *appA* gént biztosítunk;

az említett génből egy gazdasejtben expresszáljuk a fitáz aktivitással rendelkező proteint vagy polipeptidet; és

a proteint vagy polipeptidet fitáttal reagáltatjuk a fitát inozittá és szervesen foszforra történő konverziójának katalizálása céljából.

57. Az 56. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a fitát az élelmiszerben, vagy a takarmányban van.

58. Az 56. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az *appA* gént *Escheichia coli* -ból izoláljuk.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám

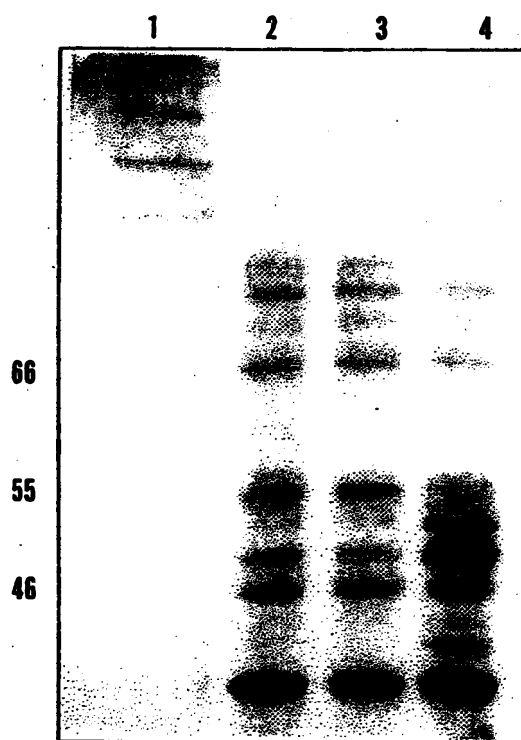
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szakpatentiroda tagja
H-1062 Budapest, Alkotmány út 113.
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323

80 + 23 = 103 *adl*

of D

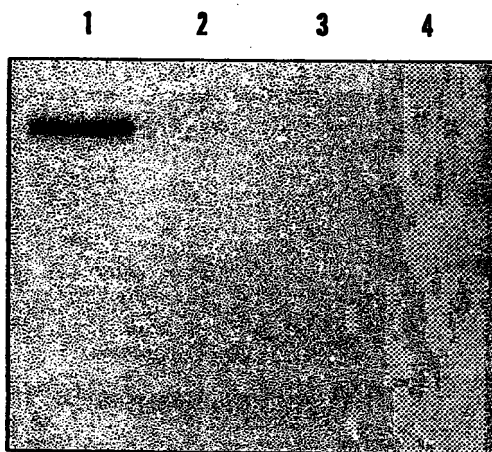
2001. 08. 13.

1/23



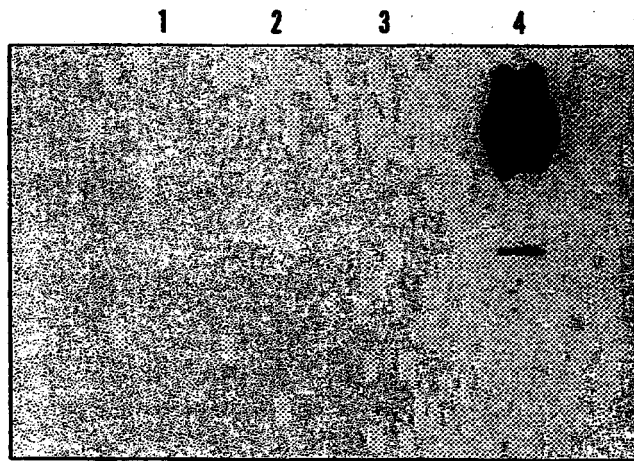
1. ábra

2/23



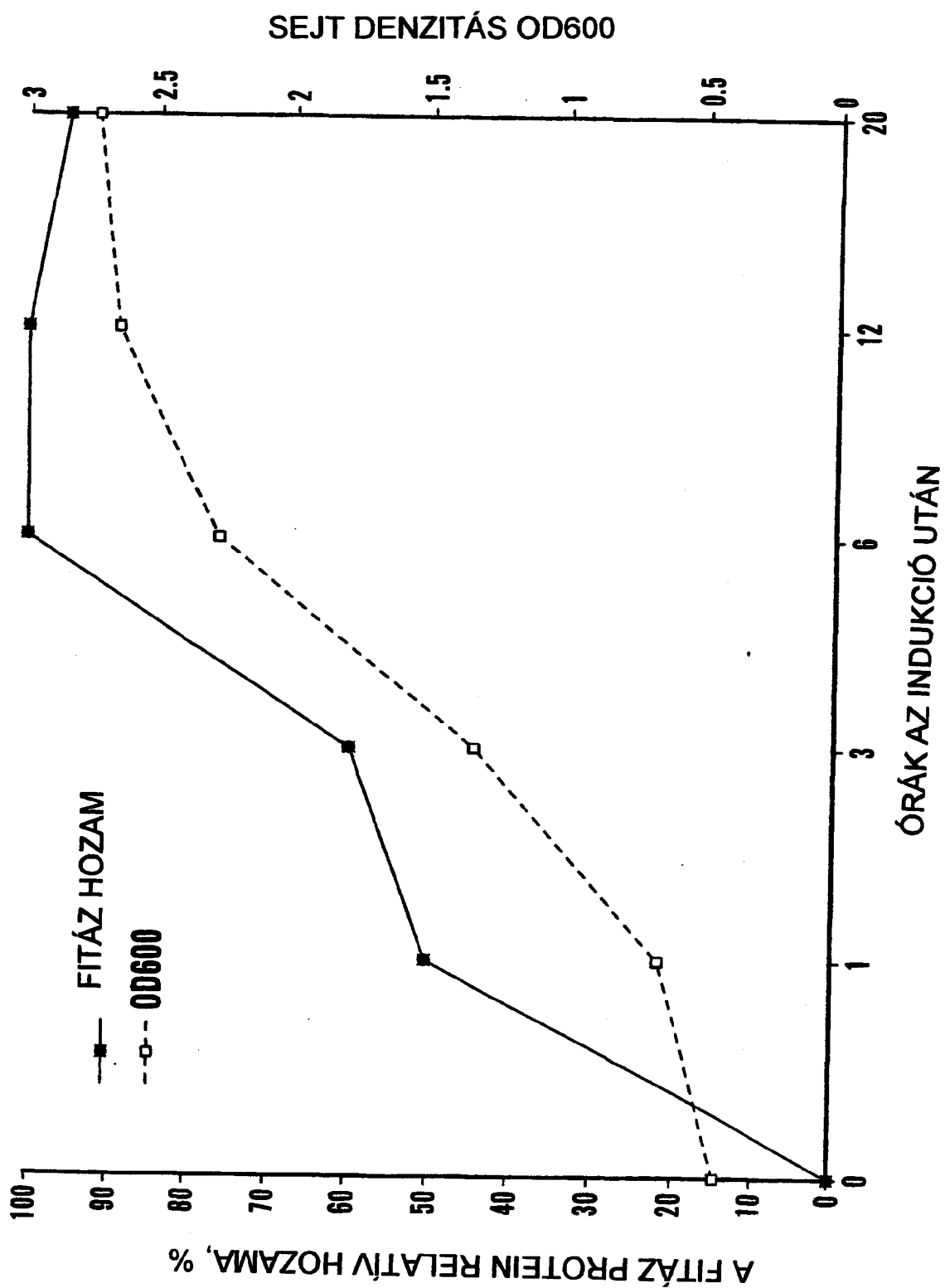
2. ábra

3/23



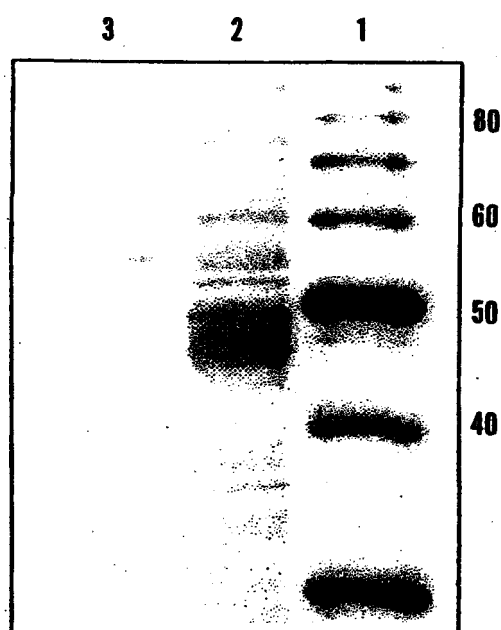
3. ábra

4/23



4. ábra

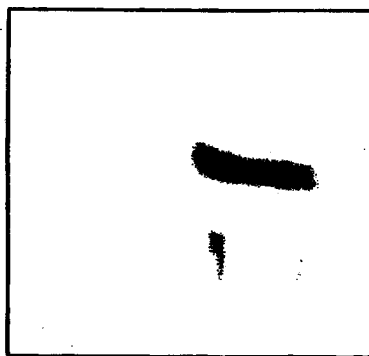
5/23



5. ábra

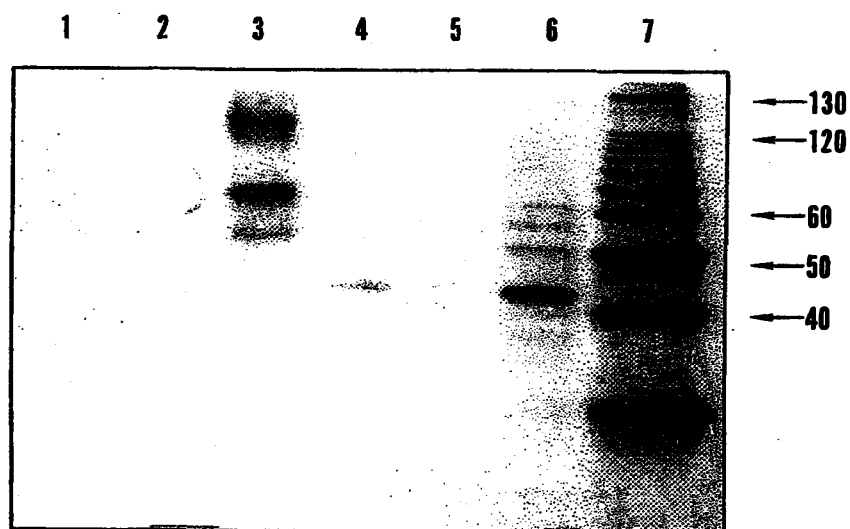
6/23

1 2



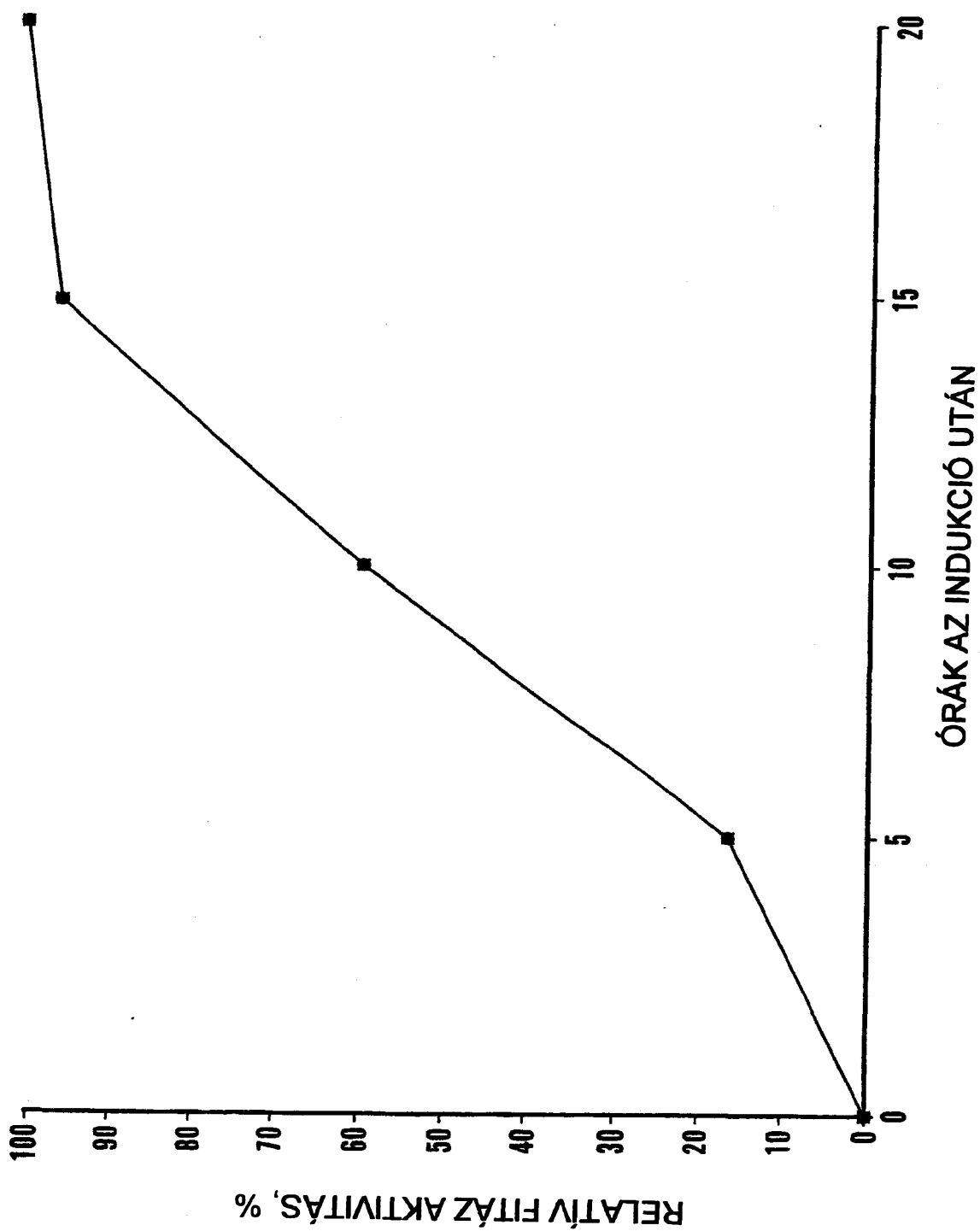
6. ábra

7/23



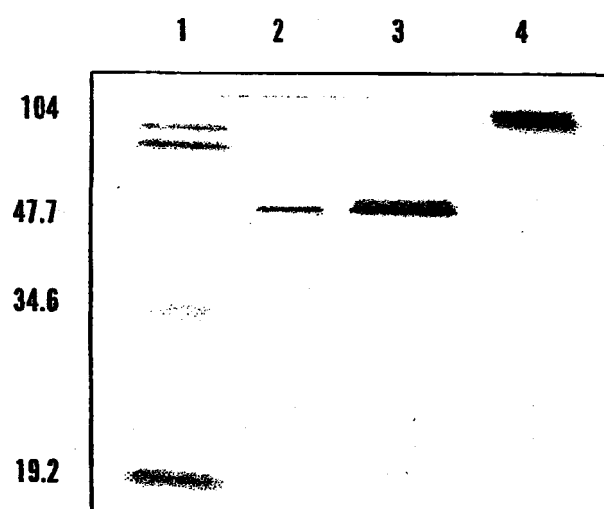
7. ábra

8/23



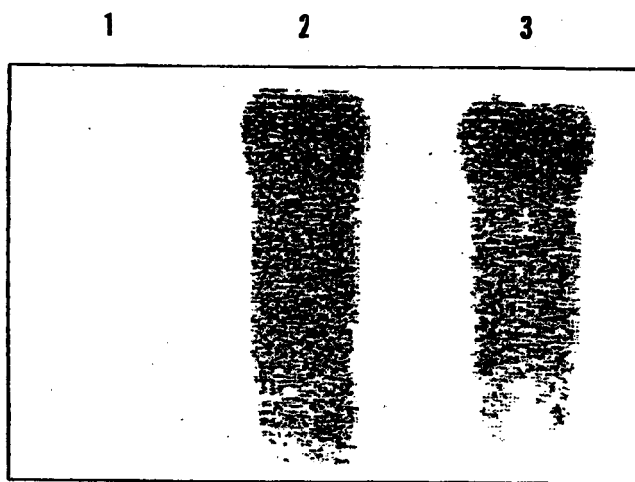
8. ábra

9/23



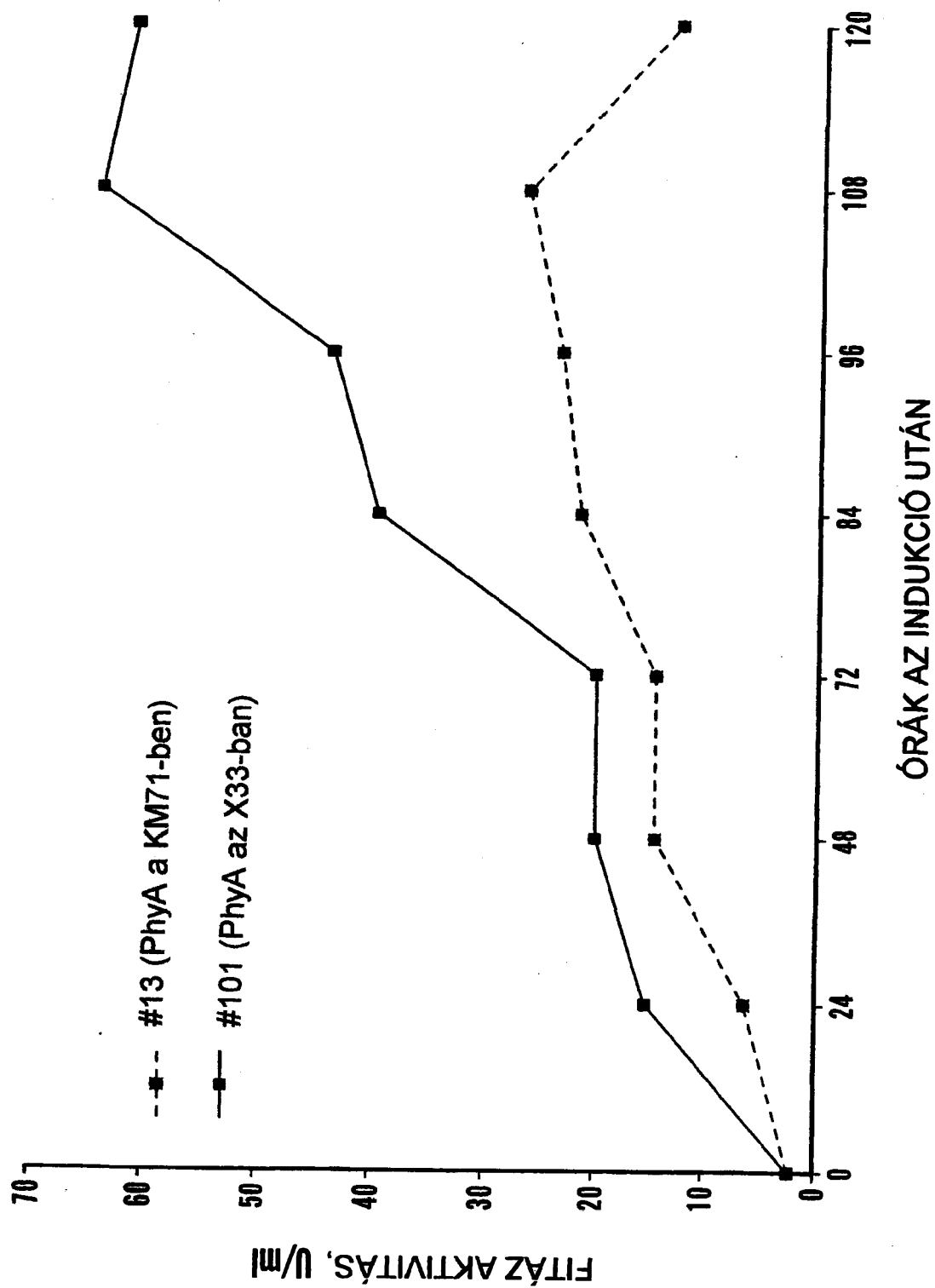
9. ábra

10/23



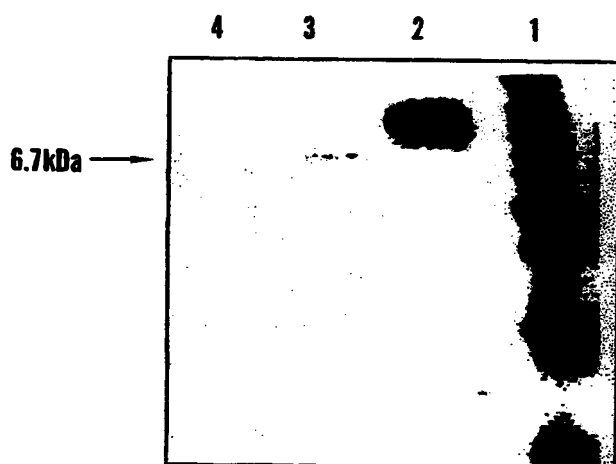
10. ábra

11/23



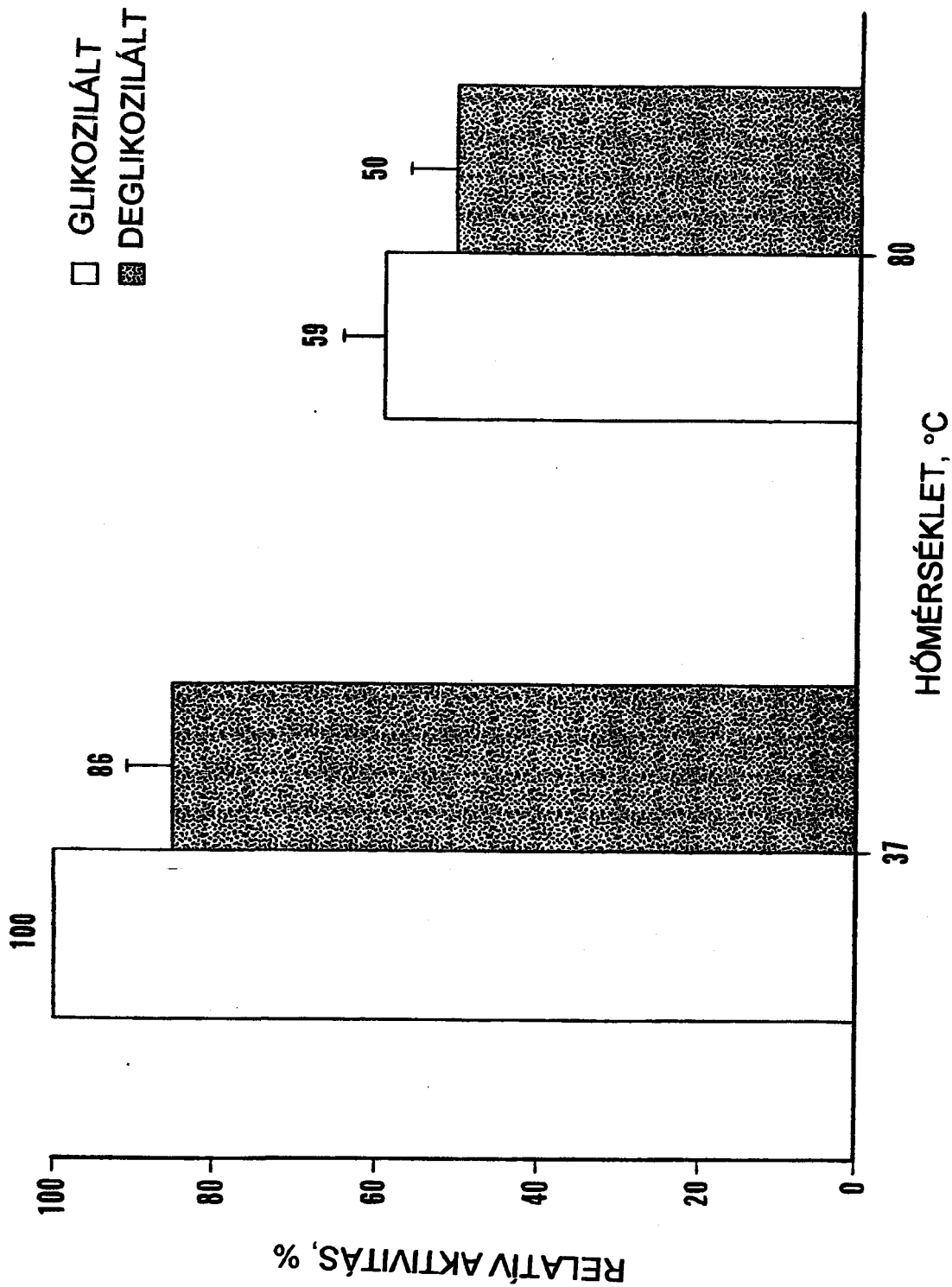
11. ábra

12/23



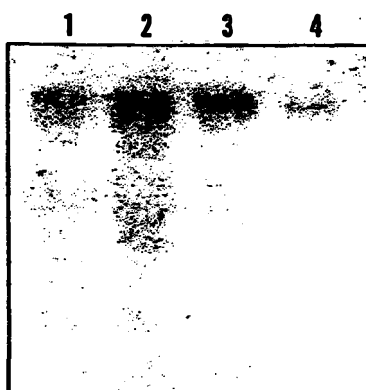
12. ábra

13/23



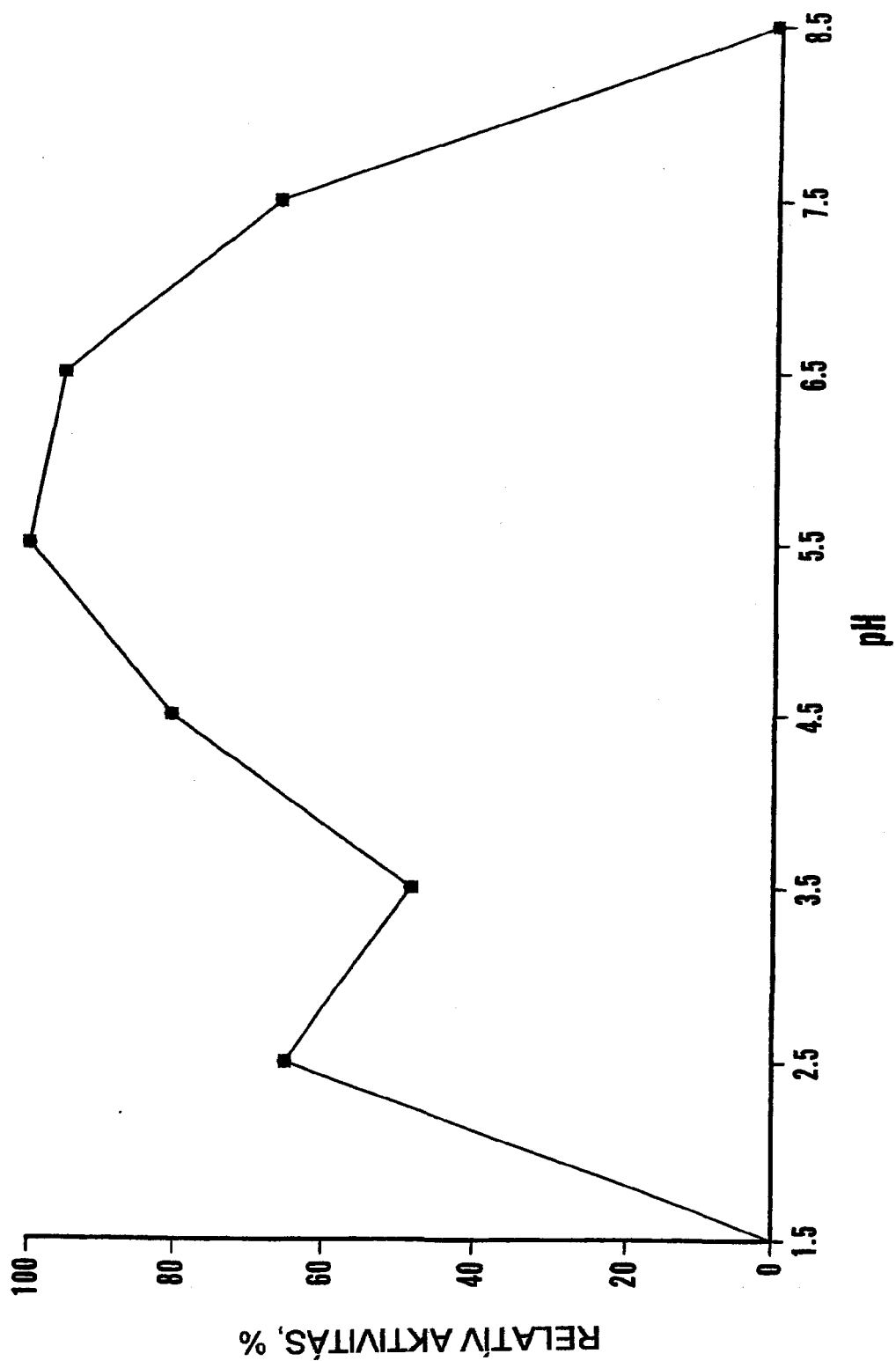
13. ábra

14/23



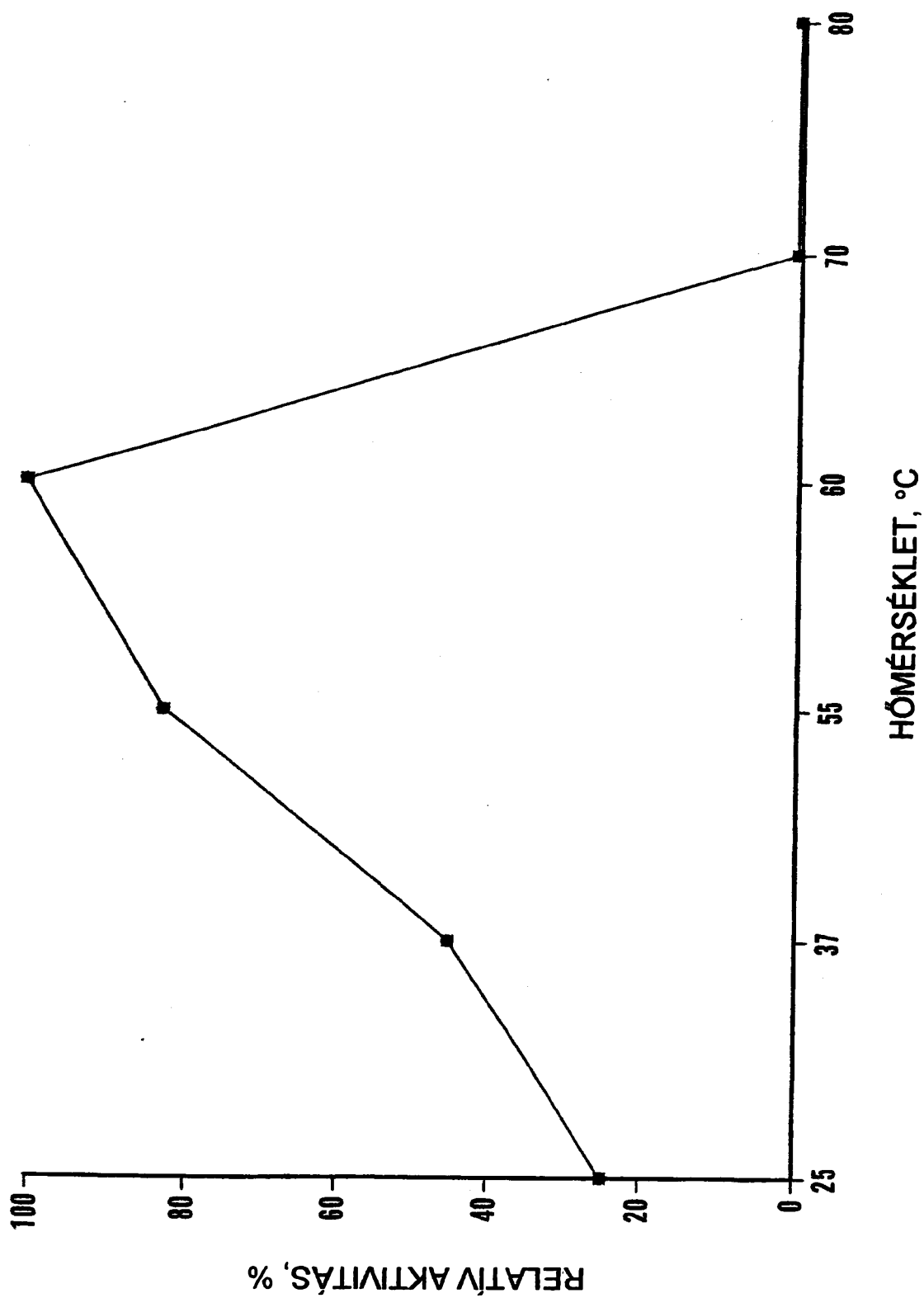
14. ábra

15/23



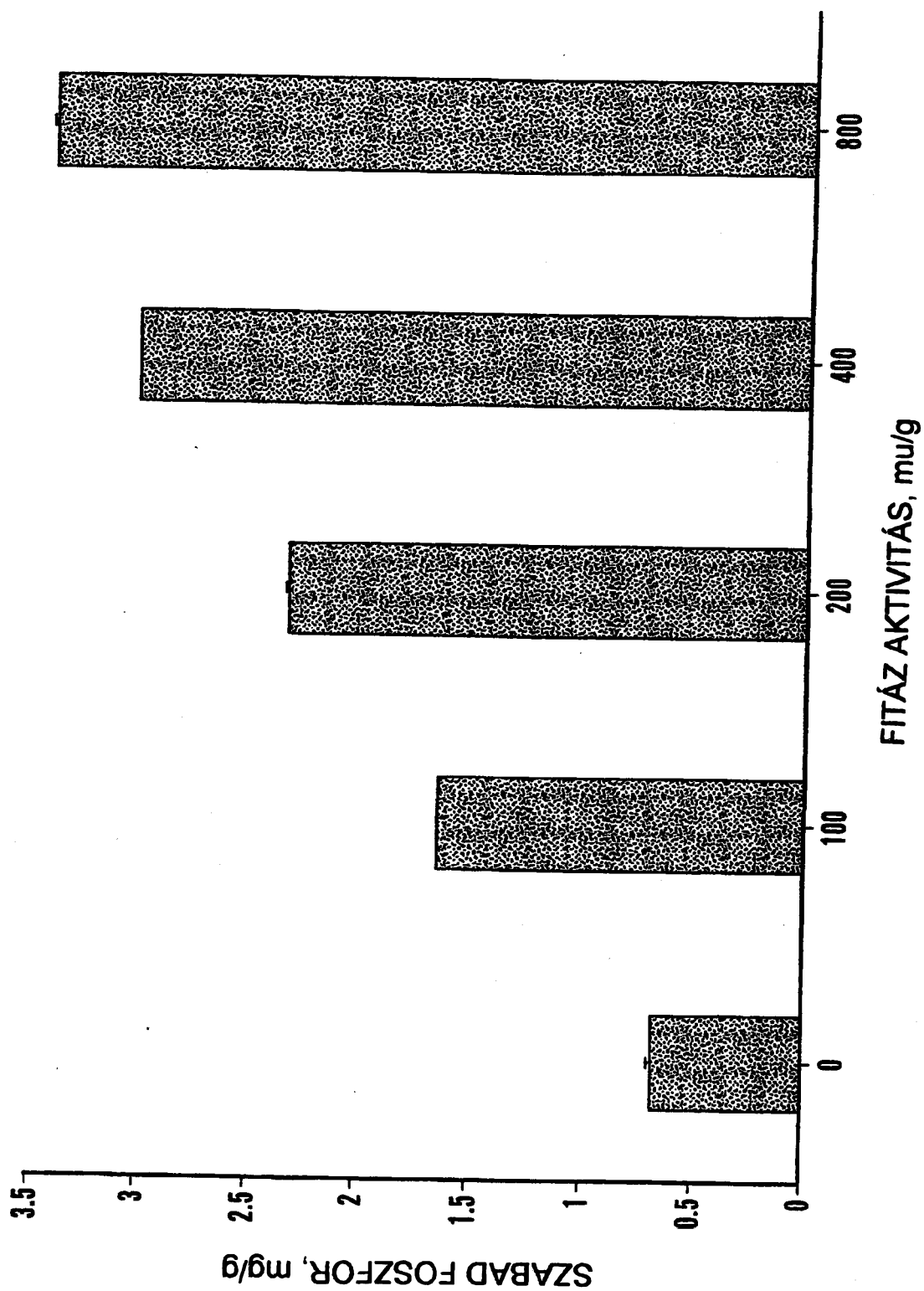
15. ábra

16/23



16. ábra

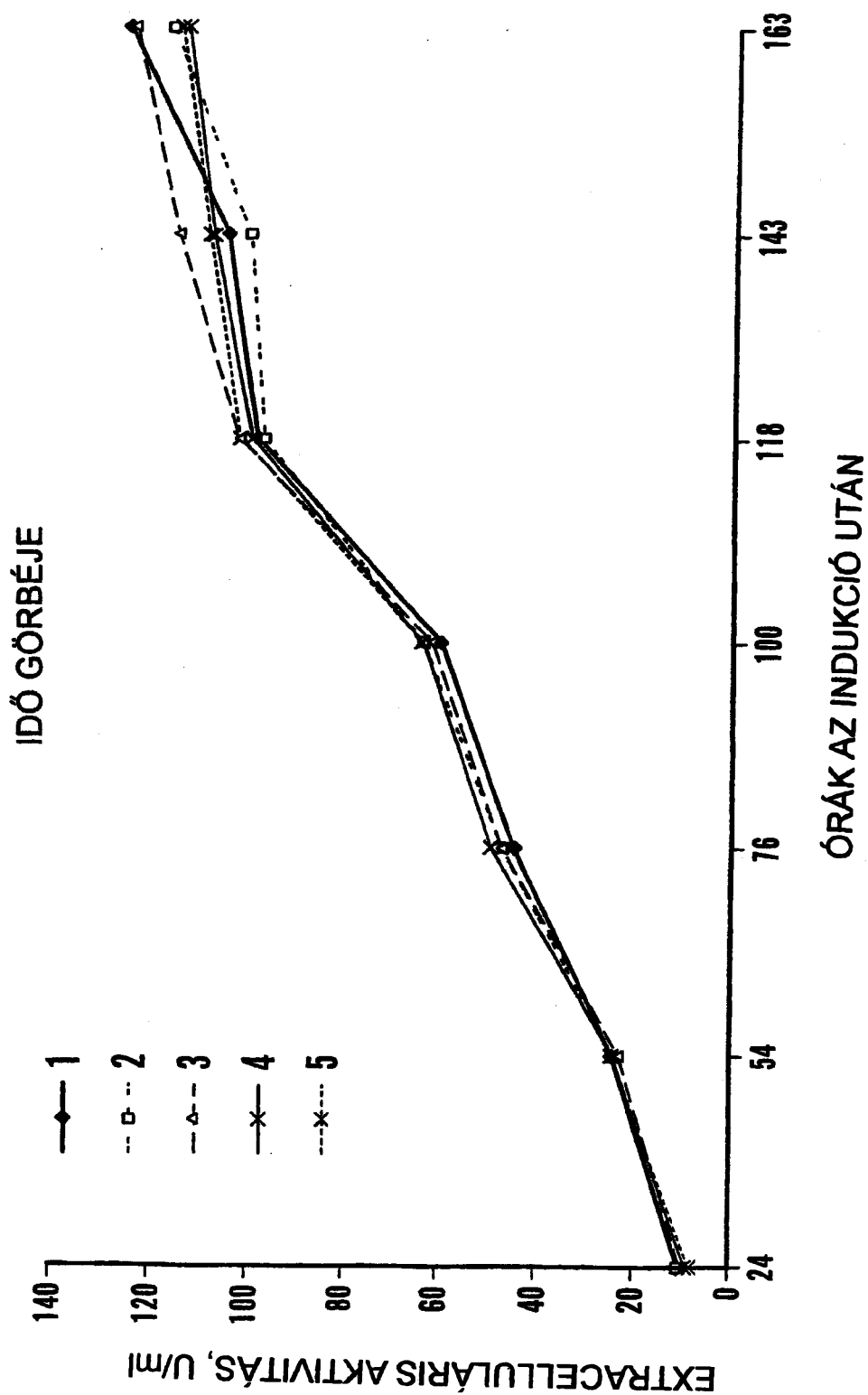
17/23



17. ábra

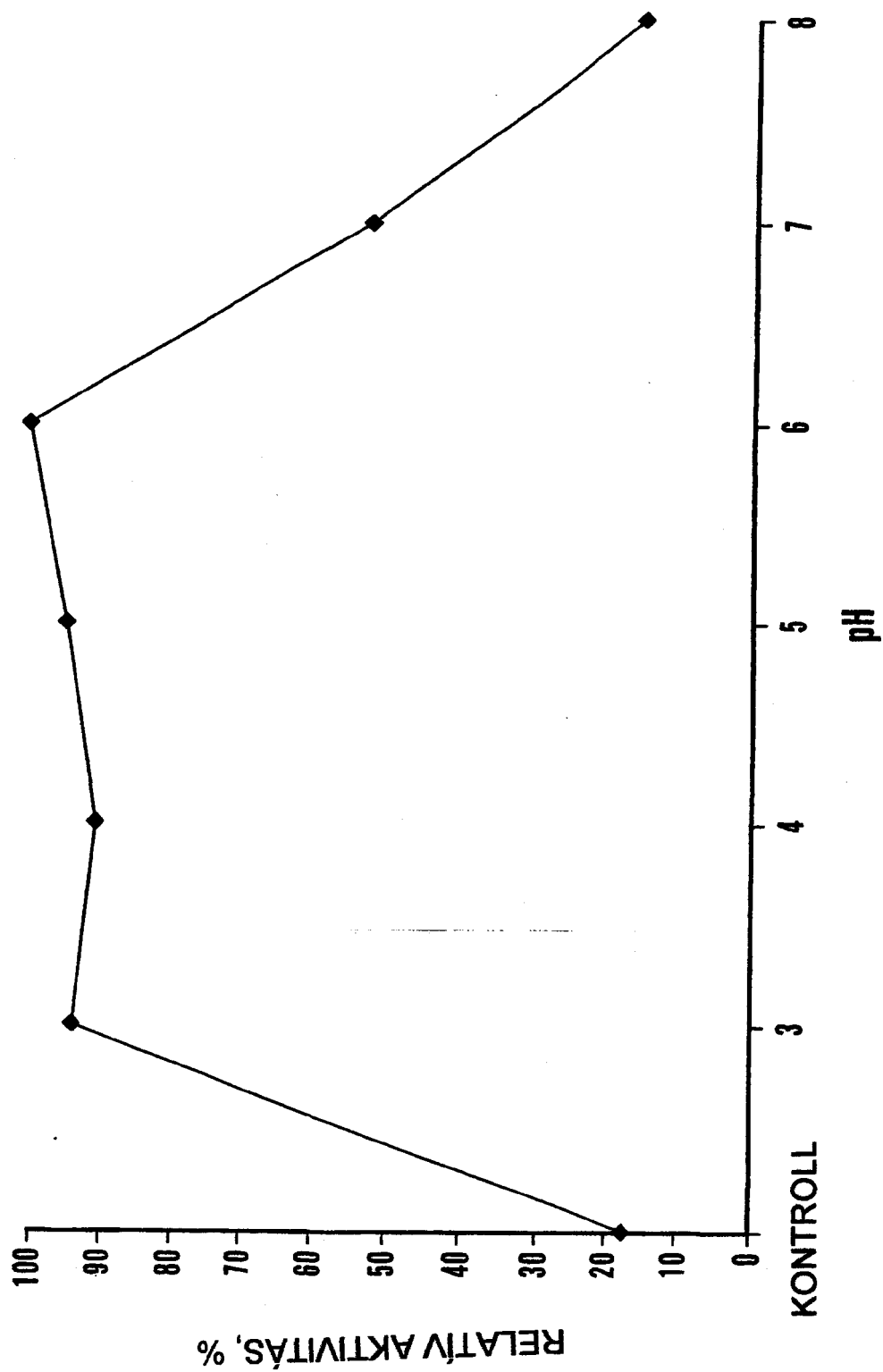
18/23

E. COLI FITÁZT TARTALMAZÓ 5 TRANSZFORMÁNS



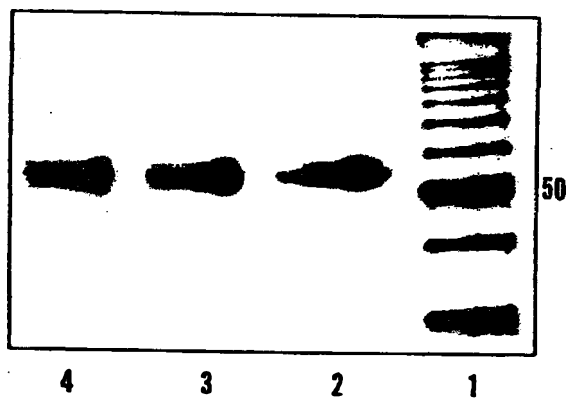
19/23

AZ EXPRESSZIÓHOZ OPTIMÁLIS PUFFERELT TÁPKÖZEG pH



19. ábra

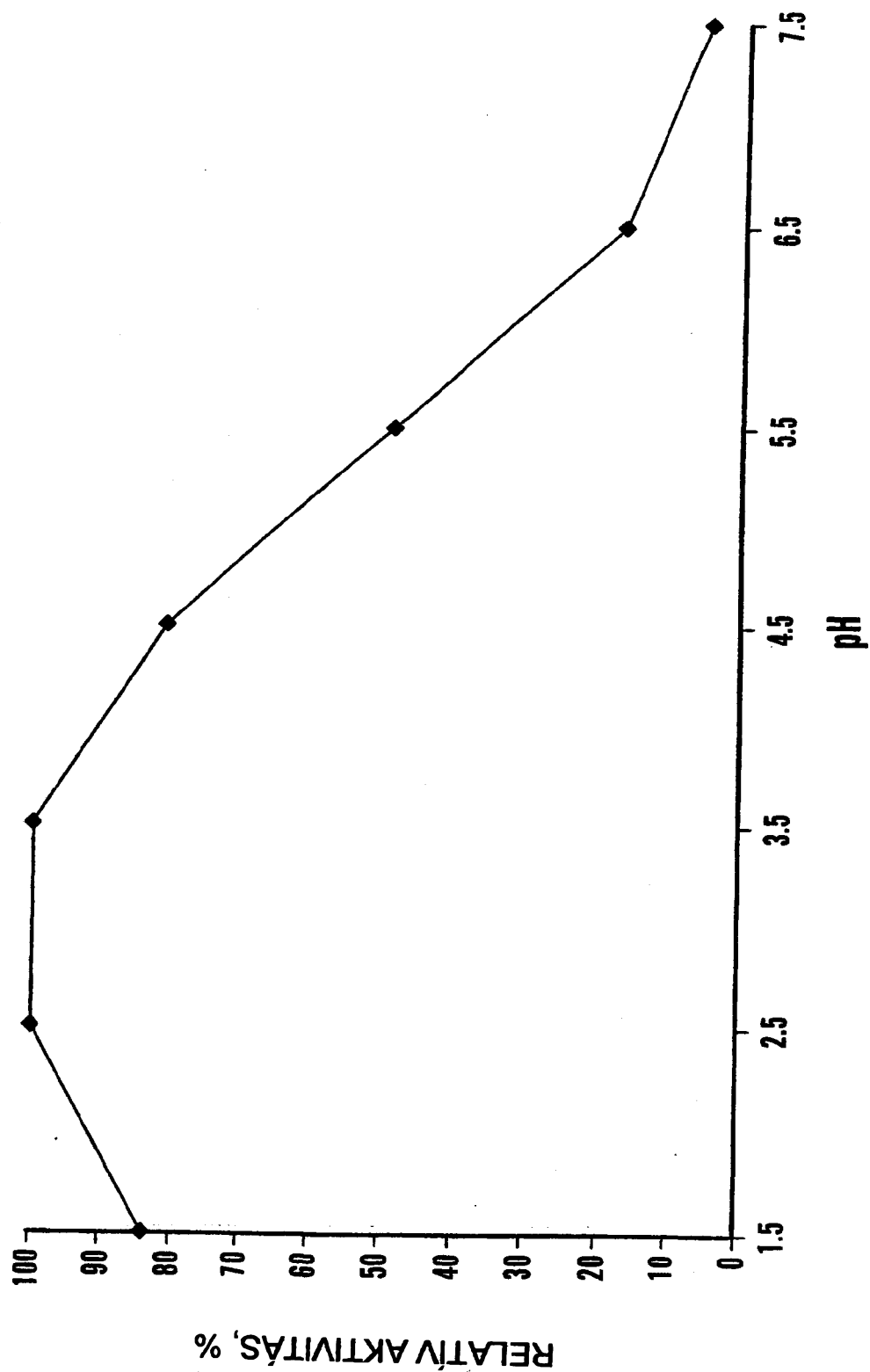
20/23



20. ábra

21/23

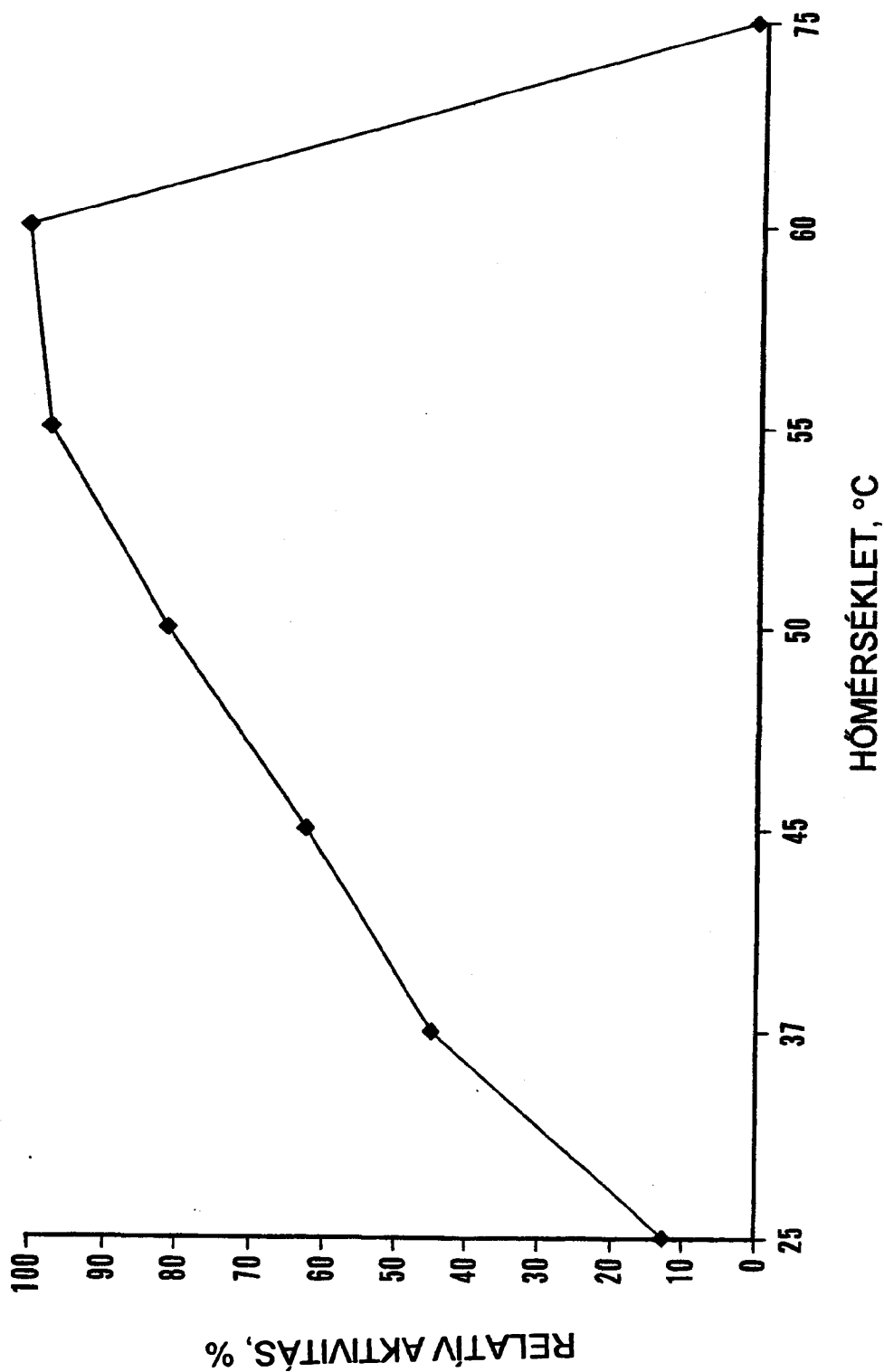
AZ EXPRESSZÁLT E. COLIFITÁZ OTIMÁLIS pH-JA



21. ábra

22/23

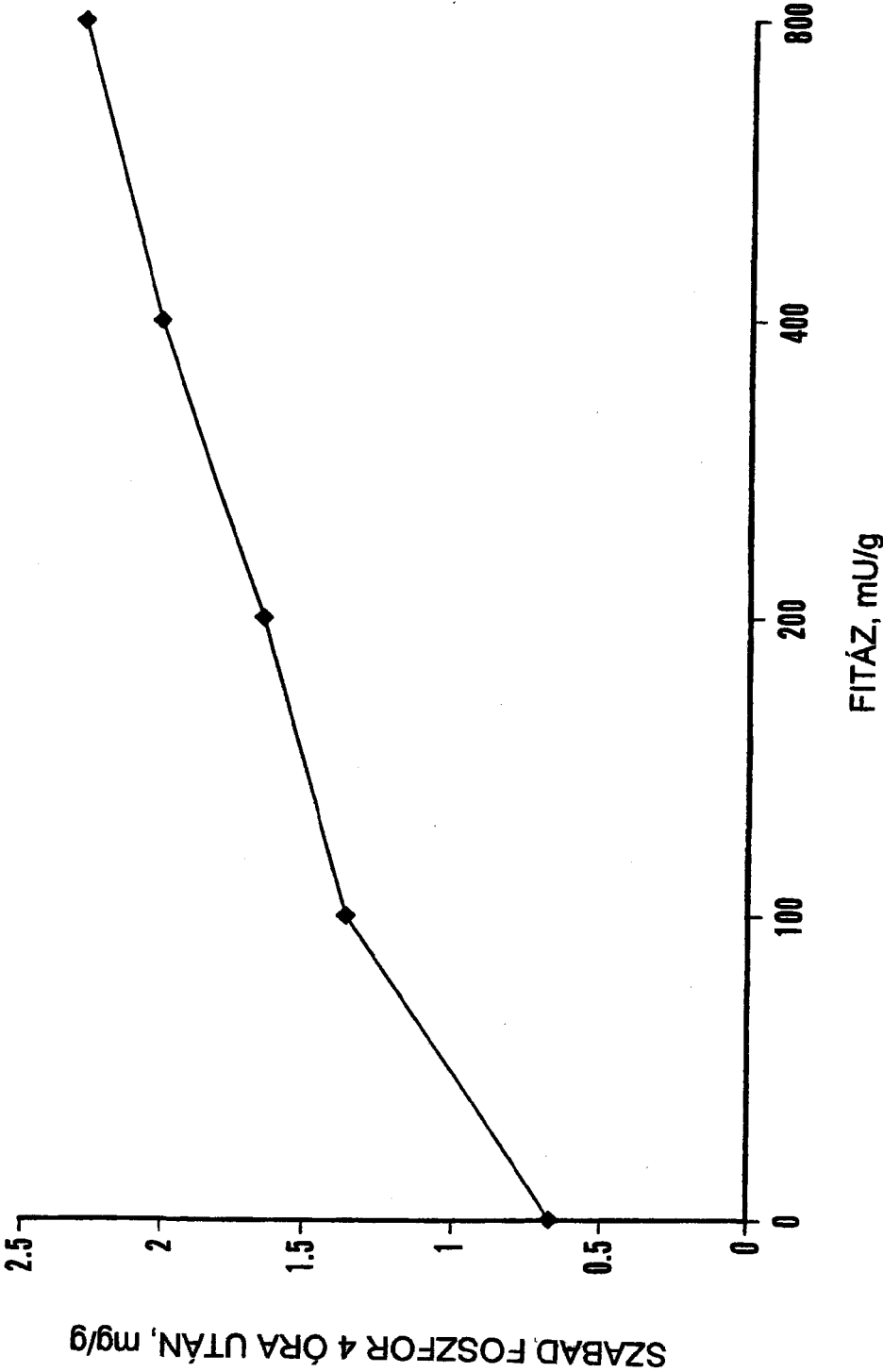
AZ EXPRESSZÁLT E. COLI FITÁZ OPTIMÁLIS HŐMÉRSÉKLETE



22. ábra

23/23

AZ EXPRESSZÁLT E. COLI FITÁZ ÁLTAL FELSZABADÍTOTT SZABAD
FOSZFOR



23. ábra