

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.06.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.06.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/104769**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.04.2002**
(Věstník č. 4/2002)
(86) PCT číslo: **PCT/US99/14106**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/67398**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4805

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/55

C 12 N 9/16

(71) Přihlašovatel:

**CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC., Ithaca,
NY, US;**

(72) Původce:

Lei Xingen, Ithaca, NY, US;

(74) Zástupce:

Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nadexprese genů fytasy v kvasinkových
systémech**

(57) Anotace:

Předmětem řešení je produkce fytasy v kvasinkách a kvasinkové kmeny, které exprimují heterologní fytasu. Dále je tato heterologní fytasa ve vynálezu popsána.

CZ 2000 - 4805 A3

14.01.02

PV 6010-4805

3269

Mad

Ověřte exprese genů fytasy v kvasinkových systémech

Oblast techniky

Předmětem předkládaného vynálezu je produkce fytasy v kvasinkách. Kvasinkové kmeny, které exprimují heterologní fytasu a heterologní fytasu produkovanou kvasinkami.

Dosavadní stav techniky

Fytasy je specifická skupina monoester fosfatas, která je potřebná k počátečnímu uvolnění fosfátu („P“) z fytinu (myo-inositolhexafosfátu). Fytin je hlavní zásobní formou P v potravinách a jídlech obsahujících obilniny (Reddy N.R. et al, „Phytates in Legumes and Cereals.“ Advances in Food Research, 28:1 (1982)). Protože živočichové s jednoduchým žaludkem jako např. prase a drůbež či také člověk mají v gastrointestinálním traktu jen malou fytasovou aktivitu, je téměř všechen přijatý fytinový fosfát nestráven. To vede k potřebě doplňování anorganického fosfátu pomocí drahých a neobnovitelných živin dodávaných do stravy těchto zvířat. Nežádoucí je též znečišťování přírodního prostředí fosfáty vyměšovaným nestráveným fytinovým fosfátem skrze hnůj výše uvedených zvířat (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)). Na fytin se dále váží esenciální stopové prvky jako je zinek, čímž fytin způsobuje výživové nedostatky jako jsou růstová a mentální retardace u dětí přijímajících hlavně rostlinou stravu, ze které nebyl odstraněn fytin.

Dvě fytasy - *phyA* a *phyB* z *Aspergillus niger* NRRL3135 byly klonovány a sekvenovány (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)). Nedávno byly izolovány nové geny fytasy z *Aspergillus terreus* a

Myceliophthora thermophila (Mitchell 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* (Pasamotes 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* a *Talaromyces thermophilus* (Pasamontes et al. „Cloning of the Phytase from *Emericella nidulans* and the Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus*." Biochim. Biophys. Acta 1353: 217 - 223 (1997) a kukuřice (Maugenest et al. „Cloning and Characterization of cDNA Encoding a Maize Seedling Phytase." Biochem. J. 322: 511 - 517 (1997)).

Různé typy fytas byly izolovány a (nebo) purifikovány z *Enterobacter* sp.4 (Yoon et al. „Isolation and Identification of Phytase-Producing Bacterium. *Enterobacter* sp. 4 and Enzymatic Properties of Phytase Enzyme." Enzyme and Microbial Technology 18: 449-454 (1996)), *Klebsiella terrigena* (Greiner et al. „Purification and Characterization of Phytase from *Klebsiella terrigena*." Arch. Biochem. Biophys. 341: 201-206 (1997)) a *Bacillus* sp. DS11 (Kim et al. „Purification and Properties of the Thermostable Phytase from *Bacillus* sp. DS11." Enzyme and Microbial Technology 22: 2-7 (1998)). Vlastnosti těchto enzymů byly studovány. Dále byla popsána krystalografická struktura phy A z *Aspergillus ficuum* (Kostrewa et al. „Crystal Structure of Phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å Resolution." Nature Structure Biology 4: 185-190 (1997)).

Hartingsveldt a spolupracovníci vnesli gen phy A do *A. niger* a dosahli tak desetinásobného zvýšení phytasové aktivity oproti divokému kmeni („Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus Niger*." Gene 127: 87-94 (1993)). Dodatečná mikrobiální fytasa z takového zdroje obsažená v potravě prasat a drůbeže se ukázala efektivní při zvyšování využití fytinového fosforu a zinku (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 Meals Diets With Microbial Phytase Linearly Improves Phytate P Utilization by Weaning Pigs." J. Anim. Sci. 71: 3359 (1993); Lei

X.G. et al. „Supplementing Corn-Soybean Meals Diets With Microbially Phytase Maximizes Phytate P Utilization by Weaning Pigs.“ J. Anim. Sci. 71: 3368 (1993); Cromwell G.L. et al. „P-A Key essential Nutrient. Yet a Possible Major Pollutant and its Central Role in Animal Nutrition.“ Biotechnology In the Feed Industry: Proceedings Alltech 7th Annual Symposium. P. 133 (1991)). Avšak náklady na dostupné komerční zdroje fytasy a nestabilní aktivita enzymu během zahřívání při granulování krmiva předem brání praktickému využití v agroprůmyslu (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)). Kromě toho není zřejmě fytasa produkovaná *A. niger* tím nejbezpečnějším zdrojem pro výrobu potravin určených člověku.

Kvasinky mohou být použity k efektivní produkci enzymu, protože rostou na jednoduchém a levném médiu. S vhodnou signální sekvencí může být enzym sekretován do média a poté výhodně izolován. Některé kvasinkové expresní systémy mají další výhodu v tom, že jsou dobře přijímány v potravinovém průmyslu a jsou bezpečným a efektivním producentem potravinových výrobků.

Pichia pastoris je metylotrofní kvasinka schopná metabolizovat metanol jako výhradní zdroj uhlíku. Tento systém je dobře známý pro svou způsobilost exprese vysokých hladin heterologních proteinů. Protože je to eukaryotní systém, má *Pichia* mnoho výhod vyšších eukaryotních expresních systémů jako jsou správné „zpracování“ proteinů (protein processing), sbalení a posttranskripční modifikace.

Je tedy zřejmé, že je zde potřeba vyvinout účinný a jednoduchý systém k ekonomické produkci fytasy pro aplikace v průmyslu potravin a krmiv.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je metoda produkce fytasy v kvasinkách vnesením heterologního genu kódujícího protein nebo polypeptid s fytasafosfatasovou aktivitou nebo aktivitou kyselých fosfatasy do kvasinkového vlákna a exprese tohoto genu.

Předmětem předkládaného vynálezu jsou také proteiny a polypeptidy mající fytasovou aktivitu s teplotním optimem v rozmezí 57–65°C při pH od 2,5 do 3,5 či při 5,5. Zvláště důležité pro fytasu je pH optimum 2,5 až 3,5, protože toto je pH v žalúdku zvířat.

Vynález dále zajišťuje kvasinkové buňky nesoucí heterologní gen, který kóduje protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou a který je funkčně propojen s promotorem schopným exprese fytasy v kvasince.

Ještě dalším aspektem vynálezu je vektor mající gen z jiného organismu než kvasinky, který kóduje protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou, promotor, který je schopný inicializace transkripce v kvasinkách funkčně spojený s genem kódujícím peptid s fytasovou aktivitou a s počátkem replikace schopným udržet vektor v kvasinkách nebo schopným integrace do hostitelského genomu.

Vynález též zahrnuje metodu produkce proteinu nebo polypeptidu majících fytasovou aktivitu. Izolovaný gen *appA*, který kóduje protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou, je exprimován v hostitelské buňce.

Vynález také zahrnuje metodu konverze fytinu na inositol a anorganický fosfát. Gen *appA* exprimuje protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou v hostitelské buňce. Fytin se poté naváže na protein nebo polypeptid. Po navázání je katalyzována přeměna fytinu na inositol a anorganický fosfát.

Popis obrázků na výkresech

Obrázek 1: Analýza rozpustného proteinu pomocí SDS-PAGE připraveného z *E. coli* transformované genem kódujícím fytasu a indukovaným IPTG. Buňky byly kultivovány 4 hodiny a poté sklizeny. Dráha 1: Markery; dráha 2 a 3: transformanty pEP1 (exprimovaný protein měl molekulovou hmotnost asi 55 kDa); dráha 4: transformant transformovaný pouze expresním vektorem pET25b(+).

Obrázek 2: Analýza exprimovaného proteinu (fytasy) v *E. coli* pomocí Western blotu. Protilátky byly připraveny proti purifikované nativní fytase z *A. niger*. Každá jamka obsahovala 50 µg celkových vnitrobuněčných proteinů. Dráha 1 a 2: Rekombinantní buňky po a před indukcí. Dráha 3 a 4: kontrola (pouze expresní vektor) po a před indukcí.

Obrázek 3: Obraz analýzy mRNA *PhyA* z *E.coli* pomocí Northern blotu. K analýze byla použita sonda *PhyA* o velikosti 1,4 kb. Každá jamka obsahovala 20 µg celkové RNA. Dráha 1 a 2: RNA izolovaná z kontrolních buněk (pouze s expresním vektorem) po a před indukci.

Obrázek 4: Časová závislost indukované exprese fytasy (pEP1) v *E.coli* BL21(DE3). Buňky byly indukovány ve chvíli, kdy absorbance OD₆₀₀ dosáhla 0,5. V každém časovém bodě byl připraven vzorek rozpustných proteinů a kvantifikován pomocí SDS-PAGE analýzy.

Obrázek 5: SDS-PAGE analýza exprimované extracelulární fytasy ve fytasou transformované *S.lividans* po 72 hodinovém růstu. Buňky byly odstředovány 15 minut při 8000 x g. Supernatant byl poté analyzován pomocí gelové elektroforézy. Dráha 1: Markery; dráha 2: kontrola obsahující pouze expresní vektor; dráha 3: pozitivní kolonie exprimující fytasu – molekulová hmotnost byla přibližně 57 kDa.

Obrázek 6: Analýza fytasy exprimované v *S. lividans* pomocí Western blotu. Při Western blotu byly použity protilátky připravené proti purifikované nativní fytase z *A. niger*. Každá jamka obsahovala 20 µg proteinů z kultivačního média (supernatantu). Dráha 1: Supernatant z kontrolní buněčné kultury transformované vektorem; dráha 2: Supernatant z kultury inokulované pozitivními koloniemi.

Obrázek 7: Analýza extracelulární fytasy exprimované *S. cerevisiae* pomocí SDS-PAGE. Každá z jamek obsahovala 50 µg proteinů z kultivačního média (supernatantu). Dráha 1 až 3: Supernatant z kultury inokulované pozitivní kolonií a zklizené 5, 10 a 25 hodin po indukci. Dráha 4 až 6: Supernatant z kontrolní kultury transformované vektorem a zklizené 5, 10 a 25 hodin po indukci. Dráha 7: Markery (kDa). Molekulová hmotnost exprimované fytasy byla přibližně 110 kDa (potvrzeno pomocí Western blotu).

Obrázek 8: Časová závislost extracelulární fytasové aktivity exprimované *S. cerevisiae* transformované konstruktem pYPP1 po indukci galaktosou. Aktivita byla analyzována v supernatantu z nasbíraného média.

Obrázek 9: Analýza extracelulární fytasy exprimované *S. cerevisiae* pomocí Western blotu a po deglykosilaci (Endo H). Při analýze byly použity protilátky připravené proti nativní purifikované fytase z *A.niger*. Dráha 1: Barevné SDS-PAGE standardy

(kDa) od firmy Bio-Rad. Dráha 2 a 3: fytasa - deglykosilovaný protein - 10 a 20 µg. Dráha 4: glykosilovaná fytasa (20µg proteinu).

Obrázek 10: Nothern blot celkové RNA izolované z transformovaných buněk *S. cerevisiae*. Dráha 1: Kontrola (pouze s expresním vektorem pYES2). Dráha 2 a 3: Transformanty pYPP1.

Obrázek 11: Časová závislost extracelulární *phyA* fytasové aktivity produkované transformanty *Pichia pastoris* Mut^s (KM71) a MUT+ (X33) po indukci.

Obrázek 12: Analýza fytasy overexprimované v *Pichia* pomocí SDS-PAGE. K transformaci byl použit konstrukt pPICZαA-PhyA ve vektoru KM71 (MUT^s). Dráha 1: proteinový žebříček. Dráha 2: 40 µl supernatantu AK1 (kolonie vykazovaly aktivitu extracelulární fytasy 21700 mU/ml). Kolonie byly sbírány 108 hodin po indukci. Dráha 3: 40 µl supernatantu kontrolního kmene overexprimujícího lidský serumalbumin (HAS. 6.7 kDa) na hladině 1g/l. Dráha 4: 40 µl supernatantu kontroly KM71.

Obrázek 13: Vliv deglykosilace (s použitím Endo H) na termostabilitu exprimované fytasy v *Pichia*. Enzym byl zahříván 15 minut při 37° nebo 80°C, při pH 5,5 v 0,2 M citrátovém pufru.

Obrázek 14: Nothern analýza exprimované *phyA* mRNA transformovaným kmenem *Pichia pastoris* (KM71 a X33). Pro blotting byla použita sonda *phyA* o velikosti 1,3 kb. Dráha 1 a 2: transformant KM71 před a po indukci. Dráha 3 a 4: transformant X33 po a před indukci.

Obrázek 15: pH optimum extracelulární fytasy exprimované *Pichia* (X33). Pro pH 1,5, 2,5, 3,5, byl použit pufr 0,2 M glycin-HCl. Pro pH 4,5, 5,5, 6,5 byl použit 0,2 M citrát sodný a pro pH 7,5 a 8,5 byl použit pufr 0,2 M Tris-HCl.

Obrázek 16: Teplotní optimum extracelulární fytasy exprimované *Pichia* (X33). Stanovení bylo provedeno v 0,2 M citrátovém pufru při pH 5,5.

Obrázek 17: Uvolnění volného fosforu ze soji fytasou exprimovanou v *Pichia* (X33). Pět gramů soji bylo rozptýleno v 25 ml 0,2 M citrátu, pH 5,5 s různým množstvím enzymu. Směs byla inkubována čtyři hodiny při 37°C. Poté bylo stanoveno množství uvolněného volného fosfátu.

Obrázek 18: Časová závislost exprese aktivity extracelulární fytasy pěti transformantů *Pichia pastoris* obsahujících gen *appA*.

Obrázek 19: Závislost exprese aktivity fytasy *Pichia pastoris* na pH média.

Obrázek 20: Analýza fytasy z *E.coli* overexprimované v *Pichia pastoris* pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Dráha 1: Proteinový žebříček. Dráha 2 až 4: Supernatant sebraný z kultur pozitivních kolonií 23, 22, 11 ve 118 hodině po indukci.

Obrázek 21: pH optimum fytasy z *E. coli* overexprimované v *Pichia pastoris*.

Obrázek 22: Teplotní optimum fytasy z *E. coli* overexprimované v *Pichia pastoris*.

Obrázek 23: Množství volného fosfátu uvolněného ze sojové moučky fytasou z *E. coli* overexprimovanou v *Pichia pastoris* po čtyřech hodinách působení.

Detailní popis vynálezu

Předkládaný vynález zajišťuje metodu produkce fytasy v kvasinkách. Podle této metody je heterologní gen kódující protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou exprimován v kvasinkách.

Enzym, který katalyzuje konverzi fytínu na inositol a anorganický fosfát je obecně známý jako fytasa. Mezi mikroorganismy produkující fytasu patří bakterie jako např. *Bacillus subtilis* (Paver et al., J. Bacteriol. 151, 1102 (1982), který je zde zahrnut odkazem) a *Pseudomona* Cosgrove, Austral. J.Biol. Sci. 23: 1207 (1970), který je zde zahrnut odkazem), dále kvasinky jako např. *Sacharomyces cerevisiae* (Nayini et al., Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 17: 24 (1984), který je zde zahrnut odkazem) a houby jako např. *Aspergillus terreus* (Yamada et al., Agric Biol. Chem. 32: 1275 (1986), který je zde zahrnut odkazem) a *Aspergillus ficuum* (van Gorcom et al., European Patent Application 89/202.436, který je zde zahrnut odkazem).

Fytasy jsou také endogenně přítomny v mnoha rostlinných druzích. Loewus (Plant Biology vol.9: Inositol Metabolism in Plnts (eds. D.J. Morre, W.F.Boss, F.A. Loewus), 13 (1990)) a Gellatly se spolupracovníky (Plant Physiology (supplement) 93: 562 (1990), které jsou zde zahrnuty odkazem) popisují izolaci a charakterizaci klonu cDNA fytasy získaného z bramborových hlíz. Gibson a spolupracovníci (J. Cell Biochem., 12C: L407 (1988)) a Christen se spolupracovníky (

J. Cell Biochem., 12C: L402 (1988), které jsou zde zahrnuty odkazem) popsali syntézu endogenní fytasy během klíčení semen soji.

Je upřednostňováno, pokud je protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou sekretován do kultivačního média. To poté umožňuje vyšší expresi a snadnější izolaci produktu. Protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou je spojen se signálním sekvencí zajišťující směrování proteinu ven z buňky. Je dále upřednostňováno, pokud je signální sekvence vyštěpena z proteinu.

V upřednostňovaném provedení je heterologní gen, kódující protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou svázán v jediném rámci s transkripčním zesilujícím elementem.

Upřednostňované heterologní geny kódující protein s fytasovou aktivitou jsou izolovány z bakteriálních buněk. Jedním z výhodnějších genů je gen *PhyA* z *Aspergillus niger*. Gen kódující fytasu - *phyA* z *Aspergillus niger* NRRL3135 byl klonován a sekvenován (Piddington, C.S. et al., The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) z *Aspergillus niger* var. *Awamori*, Gene, 133: 56-62 (1993), který je zde zahrnut odkazem). Hartingsveldt se spolupracovníky vnesl gen *phyA* do *A. niger*. Výsledkem bylo desetinásobné zvýšení fytasové aktivity v porovnání s divokým kmenem (Hartingsveldt et al., Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*, Gene 27: 87-94 (1993), který je zde zahrnut odkazem).

Dalším vhodným heterologním genem je gen *appA* z *E.coli*. Gen, původně nazývaný jako gen kódující periplasmickou fosfoanhydridfosforylasu z *E. coli* (*appA*) obahuje 1298 nukleotidů (GeneBank accession number: M58708). Na počátku bylo zjištěno, že tento gen kóduje v *E.coli* kyselou fosfatasu s pH optimem 2,5 (EcAP). Kyselá fosfatasa je monomer s molekulovou hmotností 44644 daltonů. Zralý EcAP obsahuje 410 aminokyselin (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), který je zde zahrnut odkazem). Ostanin se spolupracovníky overexprimoval *appA* v *E. coli* BL21 s použitím vektoru pT7 a aktivita kyselé fosfatasy se zvýšila přibližně 400 krát (440mU/mg protein) (Ostanin, K. et al.,

Overexpression, Site-Directed Mutagenesis and Mechanism of Escherichia Coli Acid Phosphatase, J. Biol. Chem., 267: 22830-36 (1992), který je zde zahrnut odkazem). Nebylo známo, že produkt genu *appA* má fytasovou aktivitu.

Geny *appA* nebo *phyA* mohou být exprimovány v jakémkoliv prokaryotickém nebo eukaryotickém expresním systému. Může být použito mnoho různých hostitelských systémů a mnoho různých vektorů k expresi sekvence či sekvencí kódujících tento protein. S výhodou bude vektor obsahovat virový vektor, plasmid, kosmid nebo oligonukleotid. V první řadě musí být vektor kompatibilní s použitou hostující buňkou. Systém host vektor zahrnuje přinejmenším následující: bakterie transformované bakteriofagovou DNA, plasmidovou DNA nebo kosmidovou DNA; mikroorganismy jako např. kvasinky obsahující kvasinkové vektory; savčí buněčné systémy infikované viry (např. vakcinovým virem, adenoviry atd.); hmyzí buněčný systém infikovaný viry (např. bakulovirem) a rostlinné buňky infikované bakteriemi. Expresní elementy těchto vektorů se liší ve své síle a specifitě. V závislosti na použitém systému vektoru a hostitelského organismu je možné použít jakýkoliv z mnoha translačních prvků.

Výhodným hostitelským organismem k expresi *appA* nebo *phyA* jsou houby včetně kvasinek a filamentárních hub. Tyto mohou být využity jako hostitelské buňky v souvislosti s předkládaným vynálezem. Upřednostňované hostitelské buňky zahrnují rozličné kmeny *Saccharomyces cerevisiae*. Též mohou být použity další kvasinky jako např. *Kluyveromyces*, *Torulaspora* a *Schizosaccharomyces*. Ve výhodném uspořádání jsou pro overexpresi proteinu použity buňky *Saccharomyces cerevisiae*. Mezi filamentárními houbami jsou nejvhodnějšími hostitelskými buňkami buňky *Aspergillus* a *Neurospora*. Z kmenů *Aspergillus* je nejvhodnější kmenem *Aspergillus niger*.

V jiném výhodném uspořádání předkládaného vynálezu jsou kvasinkové kmeny methylotrófní. Methylotrófní kvasinky jsou tím druhem kvasinek, které jsou schopny používat methanol jako zdroj uhlíku k produkci potřebných zdrojů energie. Takovýto zdroj energie musí vystačit na udržení buněčných funkcí. Dále musí tyto kvasinky obsahovat gen pro expresi alkoholoxidasy. Typické methylotrófní kvasinky zahrnují členy druhů *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida*

a *Karwinskia*. Tyto druhy kvasinek mohou používat methanol jako výhradní zdroj uhlíku. Nejvýhodnějším methyloτροφním kvasinkovým kmenem je *Pichia pastoris*.

Předkládaný vynález zahrnuje také protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou. PhyA je exprimován v *Pichia* a výsledný protein má mnohem vyšší extracelulární aktivitu (okolo 65 mU/ml). Výtěžek aktivity fytasy byl přibližně 30 krát vyšší než výtěžek aktivity z buněk *Saccharomyces cerevisiae* transformovaných genem phyA, jedenadvacetkrát vyšší než z divokého kmene *Aspergillus niger* a 65000 krát vyšší než z netransformovaných buněk *Pichia*. pH optimum exprimované fytasy bylo 2,5 a 5,5 a teplotní optimum bylo 60°C. Podobně gen appA exprimovaný v *Pichia* a *Saccharomyces cerevisiae* vedl k proteinu majícímu mnohem vyšší extracelulární aktivitu a pH optimum (od 2,5 do 3,5), které je více požadováno.

V preferovaném uspořádání vynálezu je protein nebo polypeptid mající fytasovou aktivitu, přičemž teplotní optimum je v rozmezí 57°C až 65°C. Ještě výhodnější uspořádání zahrnuje protein nebo polypeptid mající fytasovou aktivitu, přičemž teplotní optimum je v rozmezí 58°C až 62°C.

V ještě dalším vhodném uspořádání je protein nebo polypeptid mající takovou fytasovou aktivitu, že po zahřívání proteinu po dobu 15 minut a teplotě 80°C zůstává tato fytasová aktivita alespoň na úrovni 40% původní aktivity. Ještě výhodnější uspořádání zahrnuje protein nebo polypeptid mající takovou fytasovou aktivitu, že po zahřívání proteinu po dobu 15 minut a teplotě 60°C zůstává tato fytasová aktivita alespoň na úrovni 60% původní aktivity.

Purifikovaný protein může být získán několika metodami. Protein nebo polypeptid předkládaného vynálezu je přednostně produkován v purifikované formě (přednostně o čistotě přinejmenším 80%, lépe o čistotě přinejmenším 90%) konvenčními technikami. Běžně je protein nebo polypeptid předkládaného vynálezu sekretován do růstového média rekombinantních hostitelských buněk. Nebo je protein nebo polypeptid předkládaného vynálezu produkován, ale není sekretován do růstového média. V těchto případech je třeba k izolaci proteinu nejdříve namnožit hostitelské buňky nesoucí rekombinantní plasmid. Poté jsou tyto buňky lysovány sonikací, teplem nebo chemickým ošetřením a homogenát je zcentrifugován tak, aby byly odstraněny zbytky buněk.

Supernatant je poté podroben sekvenčnímu srážení síranem amonným. K separaci proteinu je dále frakce obsahující protein nebo polypeptid předkládaného vynálezu podrobena gelové filtraci přes kolonu naplněnou vhodně velkým dextranem nebo polyakrylamidem. V případě potřeby je možné frakci s požadovaným proteinem dále purifikovat pomocí HPLC.

Předkládaný vynález dále zahrnuje kvasinkové kmeny mající heterologní gen kódující protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou. Heterologní gen by měl být funkčně spojený s promotorem schopným zajistit expresi fytasy v kvasinkách.

Dalším aspektem vynálezu je vektor k expresi fytasy v kvasinkách. Takový vektor nese gen z jiného než hostitelského organismu, kódující protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou. Gen kódující fytasu může být klonován do jakéhokoliv vektoru, který se autonomně replikuje nebo je integrován do genomu kvasinky. Počet kopií autonomně se replikujícího plasmidu např. plasmidu YEp může být vysoký, ale mitotická stabilita kvasinek může být nedostatečná (Bitter et al., Expression and Secretion Vectors for Yeas, Meth. Enzymol. 153: 516 - 44 (1987), který je zde zahrnut odkazem). Mohou obsahovat plasmidovou sekvenci 2-mu zodpovědnou za autonomní replikaci a sekvenci *E. coli* zodpovědnou za replikaci v *E. coli*. Je vhodné, aby v *E. coli* vektor obsahoval genetický marker pro selekci kvasinkových transformantů a gen kódující rezistenci na antibiotika vhodnou k selekci. Epizomové vektory obsahující sekvence ARS a CEN se vyskytují pouze v jedné kopii na buňku a jsou stabilnější než vektory YEp. V případě, že jsou fragmenty DNA integrovány v jedné či více kopiích do genomu kvasinky se používají integrující se vektory. V tomto případě je rekombinantní DNA stabilní a není třeba selekce (Struhl et al., High-Frequency Transformation of Yeast: Autonomous Replication of Hybrid DNA Molecules, Proc. Natl. Acad. Sci USA 76: 1035 - 39 (1979); Powel 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), které jsou zde zahrnuty odkazy). Některé vektory mají počátek replikace, který je funkční ve vybraných hostitelských buňkách. Přiměřený počátek replikace zahrnuje 2 μ , ARS1 a 25 μ M. Vektory nesou místa pro

restrikční endonukleasy pro inzerci fúzních genů, promotorových sekvencí a selekčních markerů. Vektory mohou být modifikovány vyjmutím či přidáním restrikčních míst nebo vyjmutím jiných nechtěných nukleotidů.

Gen pro fytasu může být umístěn pod kontrolu jakéhokoli promotoru (Stetler et al., Secretion of Active, Full- and Half-length Human Secretory Leukocyte Protease Inhibitor by *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology 7: 55 - 60 (1989), který je zde zahrnut odkazem). Lze si vybrat konstitutivní nebo regulovaný promotor. Vhodné promotory pro kvasinkové vektory jsou mezi jinými promotor pro metalothionein, 3-fosfoglyceratkinasu (Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980, který je zde zahrnut odkazem) nebo další glykolytické enzymy (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149 (1968); Holland et al., Biochem 17: 4900 (1978), které jsou zde zahrnuty odkazem) jako např. enolasu, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasu, hexokinasu, pyruvatdekarboxylasu, fosfofruktokinasu, glukosa-6-fosfátisomerasu, 3-fosfoglyceratmutasu, pyruvátkinasu, triosofosfatisomerasu, fosfoglukosaisomerasu a glukokinasu. Další vhodné vektory a promotory pro použití při expresi v kvasinkách jsou dále popsány v EP A-73,657 (Hitzeman), který je zde zahrnut odkazem. Jinou alternativou je použití promotoru ADH2 reprimovaného glukosou, který byl popsán Russellem a spolupracovníky (J. Biol. Chem. 258: 2674 (1982)) a dále Beierem a spolupracovníky (Nature, 300: 724 (1982), které jsou zde zahrnuty odkazem).

Je možné vybrat regulovaný nebo konstitutivní kvasinkový promotor. Silné promotory genů jako např. fosfoglyceratkinasy (PKG), dalších genů kódujících glykolytické enzymy a genu pro alfa-faktor jsou konstitutivní. V případě že je použit konstitutivní promotor, je produkt syntetizován během buněčného růstu. Promotor ADH2 je regulovaný etanolem a glukozou, promotory GAL-1-10 a GAL7 jsou regulovány galaktosou a glukosou, promotor PHO5 fosfátem, promotor metalothioninu mědí. Promotory proteinů tepelného šoku, mezi které patří i promotor HSP150 jsou regulovány teplotou. Mohou být použity také hybridní promotory. Regulované promotory jsou používány tam, kde je kontinuální exprese požadovaného produktu zhoubná pro hostitelské buňky. Místo kvasinkových promotorů je možné použít silné prokaryotické promotory jako je promotor T7. V tomto případě

však musí být kvasinkový kmen transformován genem kódujícím odpovídající polymerasy. Pro ukončení transkripce jsou používány terminátory HSP150 nebo jakýkoliv funkční terminátor. Zde jsou promotory a terminátory nazývány kontrolními elementy (či prvky). Předkládaný vynález není omezen na jakýkoliv specifický vektor, promotor či terminátor.

Vektor též může obsahovat selekční marker. Selekční markery jsou většinou geny kódující rezistenci na antibiotika nebo geny schopné komplementovat (doplnit) kvasinkové kmeny mající dobře popsanou metabolickou poruchu, jako jsou např. tryptofan nebo histidin deficientní mutanty. Mezi vhodné selekční markery patří URA3, LEU2, HIS3, TRP1, HIS4, ARG4 nebo geny rezistence na antibiotika.

Vektor může mít také počátek replikace schopný replikace v bakteriální buňce. Manipulace s vektory je efektivnější v bakteriálních kmenech. Vhodným bakteriálním počátkem replikace jsou ColE1, Ori nebo oriT.

Zaváděcí sekvence z kvasinky nebo z genu pro fytasu či jiného zdroje může být použita k podpoře sekrece exprimované fytasy do média. Předkládaný vynález není omezen na žádný specifický typ zaváděcí sekvence nebo signálního peptidu.

Mezi vhodné kvasinkové zaváděcí sekvence patří zaváděcí sekvence alfa faktoru, která může být použita k přímé sekreci fytasy. Zaváděcí sekvence alfa faktoru je často umístěna mezi sekvencí promotoru a sekvencí strukturního genu (Kurjan et al., Cell 30: 933 (1982); Bitter et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 81: 5330 (1984); U.S. Patent No. 4.546.082; European published patent application No. 324.274, které jsou zde zahrnuty odkazem). Další vhodnou zaváděcí sekvencí je *S. cerevisiae* MF alpha 1. Alfa-faktor je syntetizován jako (pre) struktura 165 aminokyselin obsahujících signální 19 aminokyselinový prepeptid následující „zaváděcí“ („leader“) - peptidem o 64 aminokyselinách. Ten obsahuje tři N-glykosilační místa následovaná (LysArg(Asp/Glu, Ala)2-3 alpha-factor)4 (Kurjan et al., Cell 30: 933 - 43 (1982), který je zde zahrnut odkazem). Signální (zaváděcí) část preproMF alpha 1 je široce využívána k dosažení syntézy a sekrece heterologních proteinů v *S. cerevisiae*. Použití signálních (zaváděcích) peptidů homologních ke kvasinkám je známé z U.S. Patent No. 4,546,082, evropské patentové přihlášky č.

(European Patent Application No.) 116,201; 123,294; 123,544; 163,529 a 123,289 a DK Patent Application No. 3614/83, který je zde zahrnut odkazem. V evropské patentové přihlášce č. (European Patent Application No.) 123,289, která je zde zahrnuta odkazem, je popsáno použití prekursoru α -faktoru ze *S. cerevisiae*. Použití signálního peptidu invertasy ze *Saccharomyces cerevisiae* je popsáno v WO 84/01153, který je zde zahrnut odkazem. Ukázka použití signálního peptidu PH05 ze *Saccharomyces cerevisiae* k sekreci cizích proteinů je v německé patentové přihlášce (German Patent Application) DK 3614/83, která je zde zahrnuta odkazem.

Signální (zaváděcí) sekvence α -faktoru ze *Saccharomyces cerevisiae* (MF α 1 nebo MF α 2) může být též použita k sekrečnímu procesu exprimovaných heterologních proteinů v kvasinkách (americký patent č. (U.S. Patent No. 4,546,082, evropské patentové přihlášky č. (European Patent Application No.) 16,201; 123,294; 123,544 a 163,529, které jsou zde zahrnuty odkazem). Použití fúzního proteinu sekvence DNA kódující signální (zaváděcí) sekvenci *S. cerevisiae* MF α 1 a 5'konce genu požadovaného sekretovaného proteinu bylo ukázáno. Dále bylo předvedeno další zpracování takto dosaženého proteinu. Použití myšího signálního peptidu ze slinné amylasy (nebo mutanty tohoto) k dosažení sekrece heterologních proteinů exprimovaných v kvasinkách bylo popsáno v publikovaných PCT aplikacích č. (Published PCT Application Nos.) WO 89/02463 a WO 90/10075, které jsou zde zahrnuty odkazem.

Americký patent č. (U.S. Patent No.) 5,726,038 popisuje použití signálního peptidu z kvasinkové aspartátkinasy 3, který je schopen zajistit zvýšenou sekreci proteinů exprimovaných v kvasinkách. Další zaváděcí sekvence vhodné k usnadnění sekrece rekombinantních polypeptidů z hostitelských kvasinek jsou známy znalým oboru. Zaváděcí sekvence může být modifikována blízko 3' konce zavedením jedné či více restričních míst. To usnadní fúzi zaváděcí sekvence se strukturním genem.

Protokoly pro transformaci kvasinek jsou známy znalým oboru. Jeden nich je popsán Hinnenem a spolupracovníky (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929 (1978), který je zde zahrnut odkazem. V protokolu Hinnema a spolupracovníků jsou selektovány Trp transformanty

v selekčním médiu, které obsahuje 0,67% základního kvasinkového dusíkového roztoku, 0,5% kyseliny kasaminové, 2% glukosu, 10µg/ml adeninu a 20µg/ml uracilu.

Gen může být udržován na stabilním expresním vektoru, umělém chromozomu nebo integrací do chromozomu hostitelské kvasinky. Integrace do chromozomu může být dosažena klonováním genu fytasy do vektoru, který rekombinuje do kvasinkového chromozomu. Vhodné vektory mohou obsahovat nukleotidové sekvence, které jsou homologní k nukleotidovým sekvencím v kvasinkovém chromozomu. Nebo může být gen kódující fytasu umístěn mezi rekombinantní místa, jako jsou transpozomy, které mohou vnést gen do chromozomu.

Předkládaný vynález dále zahrnuje metodu produkce fytasy zajištěním izolovaného genu *appA*, který kóduje protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou a expresí tohoto genu v hostitelské buňce. Gen *appA* je přednostně izolován z *Escherichia coli*. Vhodné hostitelské buňky zahrnují kvasinky a filamentární houby. Vhodná filamentární houba je *Aspergillus niger* a vhodné kvasinky jsou *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* a *Schizosaccharomyces*, a zvláště pak kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae*.

Předkládaný vynález dále zahrnuje metodu konverze fytinu na inositol a anorganický fosfát. Gen *appA* je izolován z organismu s použitím technik známých znalým oboru. Protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou je poté exprimován v hostitelské buňce podle tohoto genu. Výsledný protein nebo polypeptid je poté dán dohromady s fytinem. Tato technika je zvláště užitečná k ošetření fytinu v potravinách nebo krmivech.

Vhodný gen *appA* je izolován z *Escherichia coli*.

Fytasa produkovaná v kvasinkovém systému uvolňuje fytinový fosfor z kukuřice a soji stejně efektivně jako dnes komerčně dostupné fytasy. Oproti nim je však termostabilnější. Tento systém overexprese v kvasinkách produkující fytasu může být použit k produkci termostabilní fytasy, kterou lze použít v potravinářském průmyslu a průmyslu krmiv.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 - Materiál a metody pro overexpresi *phyA* v *E.coli*, *S.lividans* a v systému s použitím *Saccharomyces*.

Gen kódující fytasu, hostitelské kmeny a expresní plasmidy. Gen kódující fytasu byl laskavě darován Dr. E.J. Mulaneyem z USDA. Gen (GenBank Accession number M94550) byl obsažen v plasmidu pMD4.21 v kmeni HB101 *E.coli*. Fragment SphI o velikosti 2,7 kb z DNA *A. niger* obsahoval kódující oblast deglykosilované fytasy a její 5' a 3' „flanking“ sekvence. Plasmid obsahující signální peptidovou sekvenci - Spxy - genu pro xylanasu z *Aureobasidium pullulans* (GenBank Accession number U10298) byl laskavě darován Dr. X.L.Li z University of Georgia. Kmen DH5 *E.coli* byl použit jako počáteční hostitel pro všechny rekombinantní plasmidy. K účelům exprese *phyA* v *E.coli* byly použity expresní vektor pET25b(+) (Novagen, Madison, WI) a expresní hostitel BL21(DE3)pLysS. Pro expresi *phyA* v *S. lividans* TK24 byl použit plasmid pSES1 (Jung. E.D. et al., DNA sequences and expression in *Streptomyces lividans* of endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*, Appl. Environ. Microbiol. 59: 3032 - 43 (1993), který je zde zahrnut odkazem) ke konstrukci přenosového (shuttle) plasmidu (od Dr. D.B. Wilsona z Cornell University a on jej obdržel od Dr. D.A. Hopwooda z John Innes Institute, Norwich, England). K expresi *phyA* v kvasinkách byl použit expresní vektor pYES2 a hostitelský kmen *S. cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

Konstrukce plasmidových kazet a transformace. Všechny konstruované plasmidy a korespondující hostitelé jsou vyjmenovány v tabulce 1. 1,4 kb fragment PCR genu *phyA* byl amplifikován z pMD4, 21 za použití dvou primerů: proti směru 5'-CGG AAT TCG TCA CCT CCG GAC T - 3' (SEQ ID No.1) a po směru 5'-CCC AAG CTT CTA AGC AAA ACA CTC - 3' (SEQ ID No.2). Výsledný fragment obsahoval sekvenci kódující deglykosilovanou fytasu z *A.niger*, *PhyA* a restrikční místa *EcoRI* and *HindIII* po směru i proti směru. Po přečištění s pomocí kitu Geneclean II (Bio101, Inc., La Jolla, CA, USA) byl fragment vnesen do pET25b(+) a výsledný konstrukt pEP1 (6893 bp) byl transformován do BL21(DE3)pLysS, po počátečním ověření, v buňkách DH5α. Exprese byla pod kontrolou promotoru T7 po kterém následovala zaváděcí sekvence (pel B) kódující 21 aminokyselin a *phyA*. Hostitelské buňky transformované pouze vektorem pET25(+) byly použity jako kontrola.

Tabulka 1. Expresní vektory, konstrukty a jejich hostitelské kmeny použité v této studii

Plasmid	Hostitel	Popis ¹	Literatura ²
pET25b(+)	<i>E. coli</i> DH5α a BL21 (DE3)pLyss	Expresní vektor	Novagen
pEP1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLyss	pET25bα(+) + gen <i>phyA</i>	Tato publikace
PSES2	<i>E. coli</i> DH5α a <i>S. lividans</i> TK24	Expresní vektor	Jung et al. ² , 1993
PSPP1	<i>E. coli</i> DH5α a <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	pSES2+Spe2+phyA	Tato publikace
PYES2	<i>E. coli</i> DH5α a <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	Expresní vektor	Invitrogen
PYEP1	<i>E. coli</i> DH5α a <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	pYES2+Spe2+phyA	Tato publikace
PYXP1	<i>E. coli</i> DH5α a <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	pYES2+Spxy+phyA	Tato publikace
PYPP1	<i>E. coli</i> DH5α a <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	pYES2+Sphy+phyA	Tato publikace

1 Spe2 je signálním peptidem pro endonukleazu E2 z *T. fusca* (Wilson, D.B. Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases, Crit. Rev. Biotechnol. 12: 45-63 (1992), který je zde zahrnut odkazem; Spxy je signální peptid pro xylanasu z *A. pullulans* (Li and Ljungdahl, Cloning, Sequencing and Regulation of a Xylanase Gene from the Fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2331-1, Appl. Environ. Microbil., 60: 3160 - 66 (1994); Li and Ljungdahl, Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and Secretion of Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., 62: 209-13 (1996), které jsou zde zahrnuty odkazem; Sphy je signální peptid pro *phyA* z *A. niger* (Hartingsveldt et al., „Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus Niger*.” Gene 127: 87-94 (1993), který je zde zahrnut odkazem).

2 Jung. E.D. et al., DNA sequences and expression in *Streptomyces lividans* of endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*, Appl. Environ. Microbiol. 59: 3032 - 43 (1993), který je zde zahrnut odkazem.

Konstrukce plasmidu pro expresi *phyA* v *S. lividans* začala PCR syntézou fragmentu obsahujícího pLT promotor a signální peptid Spe2 (Lao, G. et al., „DNA Sequences of Three Beta-1,4-endoglucanase genes From *Thermomonospora fusca*” J. Bacteriol, 173: 3397 - 407 (1991), který je zde zahrnut odkazem).

Primery (primer proti směru: 5'-CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGC C-3' (SEQ ID NO.3), primer po směru: 5'-CCT AGA ACG GGA ATT CAT TGG

CCG CC-3' (SEQ ID No.4)) obsahovaly restriční místa *Pst*I a *Eco*R1. Fragment byl amplifikován z pBW2 (Jung. E.D. et al., DNA sequences and expression in *Streptomyces lividans* of endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*, Appl. Environ. Microbiol. 59: 3032 - 43 (1993), který je zde zahrnut odkazem) a poté štěpen pomocí *Pst*I a *Eco*R1. Konstrukt pEP1 a plasmid pBluescript SK⁺ (Strategene, La Jolla, CA, USA) byl oproti tomu štěpen v jednom případě *Eco*R1 a *Hind*III a v druhém případě *Pst*I a *Hind*III. Tři rozštěpené fragmenty byly poté purifikovány s použitím kitu Geneclean II a ligovány do jednoho rekombinantního konstrukt, který obsahoval požadovaná restriční místa *Pst*I a *Kpn*I (z pBluescript SK⁺), promotor pLT1, zaváděcí sekvenci endonukleasy E2 Spe2 (551 bp, Lao, G. et al., „DNA Sequences of Three Beta-1,4-endoglucanase genes From *Thermomonospora fusca*“ J. Bacteriol, 173: 3397 - 407 (1991), který je zde zahrnut odkazem) a gen *phyA* (1365 bp). Po rozštěpení konstrukt pomocí *Pst*I a *Kpn*I byl výsledný fragment vnesen do expresního vektoru pSES1 a vzniklý přenosový plasmid (pSPP1, 9131 bp) byl transformován do hostitelských protoplastů *S. lividans* podle Hopwooda a spolupracovníků (Hopwood, D.A., et al., Genetic Manipulation of *Streptomyces* - A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, England (1985), který je zde zahrnut odkazem). Stejně byla připravena kontrola transformací *S. lividans* expresním vektorem pSES2.

Byly připraveny tři různé přenosové plasmidy se třemi signálními peptidovými sekvencemi za účelem exprese *phyA* v kvasinkovém systému (viz tabulka 2). První plasmid vycházel z fragmentu pSPp1 štěpeného *Hind*III a obsahoval promotor pLT, zaváděcí sekvenci Spe2 a sekvenci kódující oblasti *phyA*. Fragment byl ligován do místa *Hind*III pYAS2 ošetřeného telecí střešní alkalickou fosfatase. Po ověření správné orientace byl výsledný plasmid nazván pYEP1 (7783 bp). Druhý plasmid obsahoval zaváděcí peptidovou sekvenci Spxy pro gen kódující xylanasu v *A. pullulans* (Li, X.L. et al., „Cloning, Sequencing and Regulation of a Xylanase Gene from the Fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2331-1“, Appl. Environ. Microbiol., 60: 3160 - 66 (1994); Li, X.L. et al., „Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and Secretion of Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*“, Appl. Environ. Microbiol.,

62: 209-13 (1996), které jsou zde zahrnuty odkazem) a gen *phyA*. Spxy byl spojen s *phyA* pomocí překrývajících se prodloužených konců (Horton, R.M., „In Vitro Recombination and Mutagenesis of DNA: SOEing Together Tailor-Made Genes“, PCR Protocols: Current Methods and Applications, 251-61 (1993), který je zde zahrnut odkazem) ve dvou následných PCR reakcích. První byla amplifikace sekvence Spxyz pCE4 (Li, X.L. et al., „Expression of *Aureobasidium pullulans xynA* in, and Secretion of Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*“, Appl. Environ. Microbiol., 62: 209-13 (1996), které jsou zde zahrnuty odkazem) s použitím protisměrného primeru (5'-CGC GGA CTG CTA GCG CAC GTT CGA T-3', primer 2) (SEQ ID No.6). Další PCR reakcí byla amplifikace kódující oblasti *phyA* z pEP1 s použitím přesahujícího protisměrného primeru (5'-ATC GAA CGT GCG CTA GCA GTC CCC G-3', primer 3) (SEQ ID No. 7) a primeru po směru ((5'-GCT CTA GAC TAA GCA AAA CAC TCC-3', primer 4) (SEQ ID no. 8) s restrikčním místem *Xba*I. Cílem druhého PCR kroku bylo spojení dvou fragmentů vytvořených ve výše uvedených dvou PCR reakcích. K tomu byly využity, jako templatů, dva purifikované fragmenty a primery 1 a 4. Výsledný fragment obsahoval restrikční místa *Hind*III a *Xba*I a poté byl klonován do pSES2. Takto vzniklý plasmid byl pojmenován pYXP1 (7219 bp). Třetí plasmid obsahoval signální peptidovou sekvenci *Sphy* genu *phyA* a kódující oblast *phyA* s tím, že byl vyjmut intron mezi nimi (Hartingsveldt et al., Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*, Gene 27: 87-94 (1993), který je zde zahrnut odkazem). Dva primery - 70bp protisměrný primer obsahoval signální peptid s restrikčním místem *Kpn*I a primer po směru, který byl stejný s primerem použitým při konstrukci pYXP (primer4) - byly použity k amplifikaci požadovaného fragmentu z pEP1. Produkt PCR reakce byl štěpen *Kpn*I a *Xba*I a klonován do pSES2. Výsledný plasmid byl nazván pYPP1 (7176 bp). Všechny výše uvedené konstrukty byly transformovány do *S. cerevisiae* metodou podle Ita a spolupracovníků (Ito et al., „Transformation of Intact Yeast Cells Trated with Alkali Cations“ J. Bacteriol, 153: 163 - 68 (1983), který je zde zahrnut odkazem).

Tabulka 2. Signální peptidy použité k expresi *phyA* v *S. cerevisiae*

Konstrukt a jeho velikost (bp)	Peptid	Gen	Organismus	Aktivita fytasy ¹ (mPU/ml)
pYEP1 7783	Spe (93 bp)	Cellulasa E2	<i>T. fusca</i>	0,80
pYXP1 7219	Spxy (102 bp)	Xylanasa A	<i>A. pullulans</i>	Nedetekována
pYPP1 7176	Sphy (57 bp)	PhyA Fytasa	<i>A. niger</i>	146
pSES1 ² 7224			<i>S. cerevisiae</i>	Nedetekována

1 Aktivita fytasy byla detekována v supernatantu buněčné kultury Sabouraud-rafinosového média 15 hodin po indukci (indukováno bylo přidáním galaktosy). Definice jednotky aktivity fytasy -viz následující text.

2 Expresní vektor pro *S. cerevisiae* použitý jako kontrola.

Růstová média a indukce genové exprese. V systému *E. coli* byly transformanty pěstovány v 50ml LBD média obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu při 30°C. Jakmile veličina OD600 média dosáhla hodnoty 0,5 až 0,6 byla indukována genová exprese fytasy přidáním IPTG (isopropyl b-D-thiogalaktopyranosid) do média tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mM. Tři hodiny po indukci byly buňky odstředěny při 800 x g, 15 min. Poté byly promyty 1 x PBS a lyzovány lysozymem. Byly připraveny rozpustná a nerozpustná buněčná frakce a vzorky obsahující 500 µg celkových proteinů (Lowry, O.H. et al., „Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent“ J. Biol. Chem. 193: 265-75 (1951), který je zde zahrnut odkazem) byly resuspendovány ve stejném objemu 2xSDS pufru a analyzovány pomocí SDS-PAGE (Laemmli, U.K., „Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4“ Nature (London) 227: 680-85 (1970), který je zde zahrnut odkazem).

Rekombinantní *S. lividans* byly pěstovány v TSB polévce s thiostreptonem (5 µg/ml) při 30°C (Jung. E.D. et al., DNA sequences and expression in *Streptomyces lividans* of endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*, Appl. Environ. Microbiol. 59: 3032 - 43 (1993), který je zde zahrnut odkazem). Po 72 hodinách inkubace byly buňky a médium sklizeno a připraveno pro analýzu pomocí SDS-PAGE (Wilson, D.B. Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases, Crit. Rev. Biotechnol. 12: 45-63 (1992), který je zde zahrnut odkazem).

Transformanty *S. cerevisiae* byly zpočátku pěstovány po dobu 48 hodin ve 4% Sabouraud-rafinosovém médiu (100ml) bez uracilu. Sterilní galaktosa (2%) byla poté přidána k indukci exprese fytasy. Vzorky média a buněk byly odebírány v různou dobu a extracelulární i intracelulární vzorky byly připraveny podle popisu Li a Ljungdahla (Li and Ljungdahl, Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and Secretion of Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., 62: 209-13 (1996), který je zde zahrnut odkazem). V případě potřeby byl supernatant z frakce expresní buněčné kultury zakoncentrován pomocí koncentrátoru a s použitím membrán YM10 (MW cutoff - 10000) od firmy Amicon (Beverly, MA, USA). Ostatní média byla testována podobně.

Stanovení aktivity proteinu. Množství exprimované fytasy za rozdílných podmínek bylo kvantifikováno pomocí relativní densitometrie (s použitím přístroje IS-1000 Digital Imaging System, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) specifických proužků na SDS-PAGE. Aktivita fytasy ve vzorcích média a buněk byla stanovena tak, jak již bylo popsáno (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), který je zde zahrnut odkazem) a uvolněný anorganický fosfát byl stanoven podle metody Chena a spolupracovníků (Chen, P.S., et al., „Microdetermination of P”, Anal. Chem. 28: 1756 - 58 (1956), který je zde zahrnut odkazem). Jednotka fytasové aktivity byla definována jako množství enzymu, které uvolní jeden μmol anorganického fosfátu z fytínu sodného za minutu při 37°C.

Analýza pomocí imunoblotu (Wester blotu). Rozpustná frakce z buněčné hmoty fytasou transformovaných buněk *E.coli* a supernatant z média transformantů *S. lividans* a *S.cerevisiae* byla připravena jako pro SDS-PAGE. Po elektroforéze byly proteiny přeneseny na nitrocelulosovou membránu (Protran nitrocellulose membrane, Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA) v 20mM Tris-HCl (pH 8,3), 20% metanolu a 0,1% SDS s použitím Mini Trans-Blot cell, Bio-Rad Laboratories, USA). Přenos byl prováděn přes noc při konstantním napětí 50V a počáteční teplotě pufru 4°C. Membrána byla poté analyzována pomocí Western blotu. Králičí polyklonální protilátky

IgG (laskavě poskytnuty Dr. A.H:J. Ullahem z USDA, ředění 1:5000) proti purifikované nativní fytase z *A. niger* byly použity jako první protilátky. Blot byl zakončen s použitím kitu Immuno-Blot Assay Kit (Bio-Rad Laboratories), který obsahoval sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou.

Izolace a analýza celkové RNA. Celková RNA z transformantů *E. coli* a *S. cerevisiae* byla izolována TRIzol™ Reagentem (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) za 3 respektive 15 hodin po inkubaci. Vzorky RNA (10 µg na dráhu) byly poté separovány pomocí formaldehydové agarosové (1,5%, hm/obj) gelové elektroforézy a dále přeneseny na membránu Hyblot (National Labnet, Woodbridge, NJ, USA) (Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, 2nd Ed., Appleton and Lange, Norwalle, Ct. (1994), který je zde zahrnut odkazem). Byl připraven fragment o velikosti 1,4 kb *EcoRI-HindIII* v plasmidu pEP1 a poté značen pomocí náhodného primeru ³²P s použitím kitu na značení DNA. Následovala purifikace přes kolonu G-50 (Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA) a poté hybridizace s blotovanou RNA na membráně v hybridizační pícce (Hybaid, Middlesex, UK). Hybridizované membrány byly zviditelněny pomocí Fuji Imaging Plate a analyzovány Bio-Imaging analyzátozem (Kohshim Graphic Systems, Fuji, Japan).

Příklad 2 - Expres *phyA* v *E.coli*.

Čtyři hodiny po indukci byl na SDS-PAGE (12,5%) zřetelný specifický proužek (okolo 55 kDa) rozpustné buněčné frakce při srovnání s kontrolním transformovaným expresním vektorem (obr. 1 a 2). Tento proužek reprezentoval 3,8% celkových rozpustných proteinů dané frakce. Ve shodě s tím ukázala nothern analýza overexpresi mRNA *phyA* v transformantech s genem pro fytasu. V kontrolních buňkách nebyl pozorován žádný signál (obr. 3).

Ve snaze optimalizovat expresi fytasy byl studován vliv různých faktorů na expresi a také časová závislost exprese. Mezi tyto faktory patří: teplota inkubace (30 a 37°C), pH média (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 a 9,0) anaerobicita (přidání sterilního minerálního oleje na povrch rostoucích buněk), hladina anorganického fosfátu v médiu (Dassa, E. et al., „The Acid Phosphatases with Optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*“ J. Biol. Chem. 257: 6667 – 76 (1982), který

je zde zahrnut odkazem) a koncentrace fytínu sodného (0,01, 0,2, 0,3, 0,4 a 0,5 mM). Výsledky ukázaly, že exprese fytasy byla lineární v závislosti na čase po prvních šest hodin od indukce (obr. 4). Poté zůstávala exprese relativně nezměněna, ačkoliv bakteriální buňky dále rostly. Z ostatních faktorů pouze pH a koncentrace fytinu významně ovlivňovaly expresi fytasy. Maxima proteinu bylo dosaženo při pH 6,0 a koncentraci fytinu sodného 0,3 mM. Za těchto podmínek se zvýšil obsah fytasy z 3,8 na 9,6% celkových rozpustných proteinů.

Fytasová aktivita nebyla detekována ani v extracelulární ani v intracelulární frakci. Toto zjištění nebylo úplně neočekávané, protože nativní fytasa z *A. niger* je glykoprotein o velikosti 70 - 80 kDa (Hartingsveldt et al., Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*, Gene 27: 87-94 (1993), který je zde zahrnut odkazem). V této studii měl protein exprimovaný v systému *E. coli* velikost přibližně 55 kDa. Zřejmě chybějící glykosilace proteinu a další nezbytné posttranslační modifikace během sekrece byly příčinou chybějící fytasové aktivity.

Příklad 3 Exprese *phyA* v *S. lividans*.

Heterologní geny byly exprimovány v *S. lividans* a výsledné produkty s enzymatickou aktivitou byly sekretovány do média (Ghangas, G.S. et al., „Cloning of the *Thermomonospora Fusca* Endoglucanase E2 Gene in *Streptomyces Lividans*: Affinity Purification and Functional 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 endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*, Appl. Environ. Microbiol. 59: 3032 - 43 (1993), které jsou zde zahrnuty odkazem). Podobně byl gen *phyA* exprimován v *S. lividans* a protein byl sekretován do média, jak je vidět na proužcích při analýze vzorků média metodou SDS-PAGE (obr. 5 a 6). Znamená to, že signální peptid z genu pro endonukleasu E2 z *T. fusca* byl schopen zajistit sekreci proteinu ven z buňky. Tento

protein měl velikost 57 kDa a reprezentoval 16,2% celkových proteinů v médiu. Změna pH média na 6,0 a přidání 0,3 mM fytinu sodného do média zvýšila výtěžnost proteinu na 20,3 % celkových proteinů. Protože byl protein (fytasa) sekretován do média v tak vysokých hladinách, mělo by být snadné jej purifikovat a účinně použít k mnoha účelům, jako je například produkce protilátek proti fytase. Zvýšená fytasová aktivita však opět nebyla nalezena ani v médiu ani v lyzovaných buňkách. Ačkoliv se velikost proteinu vůči proteinu exprimovanému v *E. coli* o trochu zvýšila (2-3%), stále zde nebyla, zřejmě z důvodů glykosilace fytasy v tomto expresním systému, nalezena žádná fytasová aktivita.

Příklad 4 - Exprese *phyA* v *S. cerevisiae*

Tři rozdílné signální peptidy byly použity ke srovnání účinnosti při zajišťování sekrece expresních proteinů ven z buněk (viz tabulka 2). Aktivita fytasy se značně zvýšila, jestliže byly transformanty pYEP1 a pYPP1 pěstovány v Sabouraud-rafinosovém médiu, nezvýšila se však při stejném pěstování u transformantu pYXP1. Proužek fytasy byl zřetelný na SDS-PAGE elektroforeze po 20 hodinách od indukce (obr. 7).

Exprese transformantů pYEP1 a pYPP1 byla stanovena ve třech různých typech média: Sabouraud-rafinosovém (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), který je zde zahrnut odkazem), Sabouraud-glycerolovém a modifikovaném obecném YEPD médiu. U transformantu pYEP1 byla podobná fytasová aktivita exprimovaná v Sabouraud-rafinosovém médiu a Sabouraudově médiu. V médiu YEPD však nebyla detekována žádná fytasová aktivita. Naproti tomu, u transformantu pYPP1 se aktivita fytasy velmi lišila v závislosti na médiu. Aktivita se zvýšila až na hodnotu 375 mU/ml, jestliže bylo použito Sabouraud-glycerolové médium. V médiu YEPD se aktivita dále zvýšila až na 1675 mU/ml (viz. Tabilka 3). Ačkoliv je médium YEPD oproti Sabouraud-rafinosovému médiu o hodně levnější, výtěžek fytasy se v něm zvýšil více než desetkrát. V tomto uspořádání tedy

předpokládáný signální peptid z houbového genu pro fytasu dosáhl nejúčinnější exprese extracelulární fytasové aktivity. Téměř všechny produkovaný protein byl sekretován do YEPD média, protože velmi málo aktivity bylo detekováno v kvasinkových buňkách. Časová závislost exprese fytasy v tomto systému je znázorněna na obr. 8.

Tabulka 3 Aktivita fytasy exprimovaná transformantem s pYPP1 v různých typech média

Médium	Počet hodin po indukci (mPU/ml) ¹		
	0	10	15
Sabouraud-rafinosovéu	22	136	146
Sabouraud-glycerolové	6	174	375
YEPD	18	1238	1675

1 Aktivita fytasy byla detekována v supernatantu tří médií buněčných kultur po 0, 10 a 15 hodinách po indukci přidáním galaktosy. Definice jednotky fytasové aktivity viz text.

Různé druhy mikroorganismů včetně bakterií, kvasinek a filamentárních hub vykazují fytasovou aktivitu. Kmen *A. niger* NRRL3135 však produkuje aktivitu nejvyšší - 340 mU/ml (Shieh, T.R. et al., „Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase“, Appl. Environ. Microbiol. 16: 1348 - 51 (1968), který je zde zahrnut odkazem). Mezi jedenadvaceti kvasinkovými kmeny má nejvyšší fytasovou aktivitu *Schwanniomyces castelli* - 140 mU/ml (Lambrechts, C. et al., „Utilization of Phytate by Some Yeast“, Biotechnology Letters 14: 61 - 6 (1992), který je zde zahrnut odkazem. Je zřejmé, že rekombinantní kvasinkový kmen transformovaný pYPP1 popisovaný v této studii tvořil mnohem vyšší fytasovou aktivitu (1675 mU/ml) než má *A. niger* (4x) a *S. castelli* CBS 2863 (11x). Maximální tvorba fytasy může být v daném systému dosažena optimalizací inkubačních podmínek a modifikací plasmidové kazety (Demolder, J.W. et al., „Efficient Synthesis of Secreted Murine Interleukon-2 by *Saccharomyces Cerevisiae*: Influence of 3'-Untranslated Regions and Codon Usage“. Gene: 111: 207 - 13 (1992), který je zde zahrnut odkazem).

Vysoká hladina exprese funkční fytasy v *S. cerevisiae* byla způsobena zřejmě dostatečnou glykosilací fytasového proteinu a dalšími post-translačními modifikacemi ve kvasinkách. Po zakoncentrování supernatantu média a analýze za pomoci SDS-PAGE byl zřetelný proužek o velikosti přibližně 110 kDa (viz obr. 7 a 9), což je více než velikost nativního proteinu z *A. niger* (Hartingsveldt et al., Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*, Gene 27: 87-94 (1993), který je zde zahrnut odkazem). Specifická overexprese *phyA* mRNA byla potvrzena northern analýzou (obráz. 10). Tento výsledek ukazuje, že kvasinkový systém je účinný při overexpresi aktivní extracelulární fytasy. Kvasinkový systém má několik výhod před bakteriemi nebo dalšími systémy jako např. *A. niger* (Hartingsveldt et al., Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*, Gene 27: 87-94 (1993), který je zde zahrnut odkazem). Ten provádí během translokace proteinu přes endoplasmatické retikulum a buněčnou membránu post-translační modifikace včetně správného sbalení, glykosilace, tvorby disulfidických vazeb a proteolysy. Sekrece proteinu je ulehčena krátkým hydrofobním signálním peptidem na N-konci prekurzorů proteinu. (Li, X.L. et al., „Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and Secretion of Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*“, Appl. Environ. Microbiol., 62: 209-13 (1996), který je zde zahrnut odkazem). Proteiny sekretované kvasinkami jsou chráněny proti agregaci a degradaci proteasami. Nejdůležitější však je, že lze enzym tvořený *S. cerevisiae* snadno purifikovat, protože ta sekretuje normálně pouze několik proteinů. Vezmeme-li v úvahu dobře známou bezpečnost produkce kvasinek pro lidi i zvířata, zdá se, že tento systém má velký potenciál v potravinářském průmyslu a průmyslu krmiv.

Příklad 5 - Vlastnosti PhyA fytasy overexprimované v *Saccharomyces cerevisiae*

Fytasa overexprimovaná transformanty s plasmidem pYPP1 byla zakoncentrována a použita ke studiu jejích vlastností (viz. tabulka

4). Enzym měl dvě pH optima: 2 až 2,5 a 5,0 až 5,5. V oblasti 2 až 2,5 však byla aktivita enzymu pouze 60% oproti aktivitě enzymu v oblasti 5 až 5,5. Při pH 1 nebo 8 nebyla detekována žádná aktivita. pH optimum bylo prakticky stejné jako pH optimum fytasy z *A. niger* (Simons et al.: „Improvement of Phosphorus Availability By Microbilab Phytase in Broilers and Pigs.“ Br. J. Nutr. 64: 525 (1990), který je zde zahrnut odkazem), což znamená, že aktivní funkce hydrolýzy fytinu v gastrointestinálním traktu lze zcela určitě předpokládat. Teplotní optimum enzymu bylo 60°C, zatímco momentálně nejběžnější fytasa na trhu, vyráběná firmou Gist-Brocades, má teplotní optimum 55°C (BASF, 1996). Při 50 až 55°C stále zůstává více než 80% aktivity, při 75 až 80°C však byla detekována již pouze malá aktivita. Při zahřátí exprimované kvasinkové fytasy, která je popsána v tomto vynálezu, na 15 minut a 37°C respektive 80°C je zbytková aktivita 100% respektive 63%. Fytasa BASF Gist-Brocades z stejného uspořádání měla po zahřátí zbytkovou aktivitu 100% respektive 52%. Rozdíly mezi těmito dvěma enzymy při kterékoliv teplotě byly signifikantní (viz tabulka 5). Zdá se tedy, že je kvasinková fytasa teplotně stabilnější než současná, komerčně dostupná, fytasa.

Tabulka 4 Charakteristika fytasy overexprimované v kvasinkách¹

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

¹ Data reprezentují průměr relativní aktivity ± standardní odchylka (n=4). Průměry s různými horními indexy jsou rozdílné (P<0,05). K analýze vlivů ošetření byl použit obecně lineární model statistické analýzy (1988) - Benferroniho t-test a celkově náhodné uspořádání pro porovnání průměrů při násobném ošetření. Hladina významnosti byla nastavena na P<0,05.

2 Aktivita byla stanovena při 37°C (definice jednotky aktivity fytasy - viz text). Byly použity rozdílné pufrы: 0,2mM glycin-HCl pro pH 1,0 až 3,5; 0,2 mM citrát sodný pro pH 4,0 až 6,5 a 0,2 mM Tris-HCl pro pufrы nad 7.

3. Teplotní optimum bylo stanoveno při pH 5,5 (0,2 mM citrát sodný).

Tabulka 5 Porovnání termostability overexprimované fytasy v kvasinkách a výroku Gist-Brocades fytase z *A. niger*^{1,2}

Relativní aktivita, %	37°C	80°C
Kvasinková fytasa	100 ^a ±1	63 ^b ±1
Fytasa z <i>A. niger</i>	100 ^a ±3	52 ^y ±2
p ³ <		0,3

1. Data reprezentují průměr relativní aktivity ± standardní odchylka (n=3). Průměry s různými horními indexy jsou rozdílné (P<0,05). K analýze vlivů ošetření byl použit obecně lineární model statistické analýzy (1988) - Benferroniho t-test a celkově náhodné uspořádání pro porovnání průměrů při násobném ošetření. Hladina významnosti byla nastavena na P<0,05.

2. Enzym byl zahříván po 15 minut při různé teplotě před reakcí při 37°C a pH 5,5.

3. Významnost (hodnota P) t-testu mezi aktivitou dvou fytas při každé z nastavených teplot

Ačkoliv je nejasné jak se takovéto zvýšení termostability vztahuje k různým post-translačním modifikacím (sbalení, štěpení, glykosilace) (Li, X.L. et al., „Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and Secretion of Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*“, Appl. Environ. Microbiol., 62: 209-13 (1996), který je zde zahrnutý odkazem), je jistě výhodou mít termostabilnější fytasu, která je snad odolnější vůči teplotě během granulování krmiva, což je problém se současnou Gist-Brocades fytasou.

Příklad 6 - In vitro hydrolýza fytínu z kukuřice, soji a mleté pšenice expresní kvasinkovou fytasou

Exprimovaná kvasinková fytasa uvolňovala fytinový fosfát z kukuřice a sojové moučky stejně efektivně jako fytasa Gist-Brocades jestliže se porovnání vztáhlo na jednotku aktivity (viz

tabulka 6). Jak lze předpokládat, byla hydrolýza fytinu závislá na čase a množství aktivity. Exprimovaná kvasinková fytasa byla také účinná při uvolňování fytinového fosfátu z pšeničné mouky což znamená její možné velké využití při kvašení chleba. Protože hrubě mletá pšenice použitá v této studii obsahovala o hodně vyšší množství své vlastní fytasové aktivity než obsahuje běžně používaná pšeničná mouka, je případný efekt expresní kvasinkové fytasy na zvýšení hydrolýzy fytinu, při použití v pekárnách, o hodně vyšší. Vliv by využití kvasinkové fytasy mělo i na uvolňování stopových prvků (Hall, m.N. et al., „The Early Days of Yeast Genetics“ Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993), který je zde zahrnutý odkazem).

Tabulka 6 Volný fosfát uvolněný z kukuřice, sojové moučky (SM) a hrubě mleté pšenice (HMP) overexprimovanou kvasinkovou fytasou a houbovou fytasou z *A.niger* in vitro¹

Kvasinková fytasa (PU/kg)	0	100	250	500	1000	250 (houbová fytasa)
Volný fosfát (mg/g)						
Kukuřice: 1 hod.	0,23 ^d ±0,03	0,64 ^c ±0,8	1,14 ^b ±0,18	1,46 ^a ±0,04	1,54 ^a ±0,04	1,16 ^b ±0,15
4 hod.	0,36 ^c ±0,02	1,26 ^b ±0,04	1,60 ^a ±0,03	1,66 ^a ±0,06	1,72 ^a ±0,04	1,68 ^a ±0,04
SM: 1 hod.	0,68 ^d ±0,01	1,18 ^{cd} ±0,02	1,62 ^c ±0,18	2,48 ^b ±0,32	3,13 ^a ±0,19	1,68 ^c ±0,2
4 hod.	0,73 ^d ±	1,67 ^c	2,69 ^b	3,41 ^a	3,71 ^a	2,78 ^b
HMP: 1 hod.	3,56±0,39		4,11±0,64	4,67 ² ±0,05		
4 hod.	5,63±5		6,02±0,48	6,38 ² ±0,07		

1 Každý vzorek (5g) byl míchán ve 20 ml pufru (0,2 mM citrát sodný) při teplotě 37°C po dobu jedné nebo čtyř hodin. Supernatant byl připraven centrifugací při 800 g a 15 minut. Po přefiltrování přes filtrační papír Whatman 541 bylo v takto vzniklém vzorku stanoveno uvolňování volného fosfátu podle metody Chena a spolupracovníků (Chen, P.S. et al., „Microdetermination of P.“ Anal. Chem., 28: 1756 - 58 (1956), který je zde zahrnutý odkazem). Data reprezentují průměr relativní aktivity ± standardní odchylka (n=4). Průměry s různými horními indexy jsou rozdílné (P<0,05). K analýze vlivů ošetření byl použit obecně lineární model statistické analýzy (1988) - Benferroniho t-test a celkově náhodné uspořádání pro porovnání průměrů při násobném ošetření. Hladina významnosti byla nastavena

na $P < 0,05$. U všech zkoumaných plodin existují významné rozdíly mezi první a čtvrtou hodinou při jakémkoliv množství enzymu (jak bylo dokázáno pomocí t -testu. Průměry v řádcích s rozdílným písmenem v horním indexu se liší ($P < 0,05$)).

2 n=2

Byly porovnány overexprese fytasy *Aspergillus niger* (*phyA*) v *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans* a *Saccharomyces cerevisiae* za účelem vývoje účinného a jednoduchého systému k ekonomické produkci fytasy. Vnitrobuněčný protein o velikosti 55 kDa a reprezentující 9,6% celkových rozpustných proteinů byl exprimován v *E.coli* s použitím systému s pET25b(+). Extracelulární protein o velikosti 57 kDa, reprezentující 20,3% celkových proteinů v médiu byl exprimován v *S. lividans* s použitím přenosového plasmidu obsahujícího promotor pLT1 a zaváděcí sekvenci SpeII endonukleasy E2. Ani v jednom z výše uvedených expresních systémů nebyla detekována zvýšená aktivita fytasy, pravděpodobně proto, že protein nebyl glykosilová či jinak post-translačně modifikován. Naproti tomu byla produkována vysoká fytasová aktivita v *S. cerevisiae* transformované genem *phyA*. Tři různé zaváděcí sekvence a tři různá média byla srovnávána s cílem nalézt nejlepší expresní vektor a nejlepší podmínky. Použití signálního peptidu Sphy z genu *phyA* v kombinaci s YEPD médiem dávalo nejvyšší extracelulární fytasovou aktivitu. Fytasa overexprimovaná ve kvasinkách měla velikost přibližně 110 kDa a dvě pH optima: 2,0 až 2,5 a 5,5 až 6,0. Teplotní optimum bylo 60°C.

Příklad 7 - Materiál a metody pro expresi *phyA* v *Pichia*

Hostitel a vektor. Byl zakoupen EasySelect™ *Pichia* Expression kit od firmy Invitrogen (San Diego, CA). Kit obsahuje hostitele a vektory potřebné k expresi genu buď intracelulárně nebo extracelulárně v kmenech Mut⁺ nebo Mut^s (Metanol je využíván normálně či málo (s-slow)). X33 byl použit jako kmen Mut⁺ a kmen KM71 byl použit jako Mut^s. Byly použity dva vektory: pPICZB (3,3 kb) a pPICZαA (3,6 kb). Oba používaly promotor AOX1.

Konstrukce expresního vektoru. Vliv různých signálních peptidů na expresi *PhyA* v systému *Pichia* byl sledován na dvou připravených konstruktech. První konstrukt byl připraven ligací fragmentu 1,5 kb velkého *EcoRI*-*KpnI*, obsahujícího sekvenci *PhyA* kódující funkční fytasu do *pPICZαA*. V tomto plasmidu (*pPICZα-phyA*) byl *phyA* zaváděn alfa-faktorem - velmi široce používaným signálním peptidem z *Saccharomyces cerevisiae*. Druhý konstrukt byl připraven ligací 1,4 kb velkého fragmentu *KpnI*-*XbaI* *pYPP1* do vektoru (kódující oblast *phyA* byla zaváděna svým vlastním signálním peptidem. Který byl velmi účinný při sekreci exprimované fytasy v *Saccharomyces cerevisiae*).

Transformace a exprese. Ověřené konstrukty byly linearizovány *PmeI* a transformovány do GS115 a KM71 pomocí *EasyComp*TM dodávaným v kitu. K selekci pozitivních kolonií byl použit *Neocin*TM. Jednotlivé kolonie byly inokulovány do 10 ml MGY média a pěstovány při 30°C do doby, kdy *OD*₆₀₀ bylo 2-6. Poté byly buňky zcentrifugovány a resuspendovány v 10 ml MMY média obsahujícího 0,5% metanolu. Vzorky byly sbírány 12 a 24 hodin po indukci. Buňky byly odděleny od supernatantu a lysovány pomocí skleněných kuliček v homogenizačním pufru. Aktivita fytasy v supernatantu a v buňkách byla stanovena tak, jak již bylo popsáno. Ke zjištění velikosti a relativního množství exprimovaného proteinu byly provedeny SDS-PAGE a Western blot.

Příklad 8 - *PhyA* fytasová aktivita v *Pichia*

Expresní konstrukt s použitím alfa - faktoru jako signálního peptidu pro *phyA* byl transformován do dvou kmenů *Pichia*. KM71 je pomalý kmen využívající metanol, kdežto X33 je divoký typ využívající metanol účinně. Skrýning a inkubace byly prováděny v 10 ml lahvíčkách při 29-30°C. U transformace KM71 mělo po indukci a 24 hodinách 19 kolonií z dvaceti extracelulární fytasu vyšší než 6 jednotek/ml supernatantu. Kolonie číslo 13 vykazovala nejvyšší aktivitu (26 jednotek/ml) po té co byla inkubována 108 hodin. Všechny kolonie transformantů X33 (20 z 20) vylazovaly více než 10 jednotek/ml poté, co byly indukovány 24 hodin. Jedna z kolonií

(číslo 101) produkovala fytasovou aktivitu s hodnotou 65 jednotek /ml supernatantu. Časové závislosti exprese fytasy v KM71 a X33 byly sumarizovány na obr. 11. Navzdory rozdílnosti těchto dvou kmenů ve využívání metanolu a proto též ve schopnosti exprese fytasy, bylo zjištěno, že alfa-faktor je korektně užíván v kvasinkových buňkách. Vedle toho téměř všechen exprimovaný protein byl sekretován do média, protože v buňce nebylo nalezeno více než 5% celkové exprimované aktivity.

Byl studován vliv anorganického fosfátu a pH média na expresi fytasy v médiích BMGY a BMMY. K pokusům bylo použito *phyA* rekombinantního kmenu X33 (číslo 101). Médium obsahující 50 mM fosfát produkovalo, 168 hodin po indukci, nejvyšší aktivitu fytasy - 66 jednotek /min. Byl studován vliv různého pH tohoto pufru (3,4,5,6,7 a 8) na expresi. Jestliže bylo pH 6, pak transformant X33 produkoval 75 jednotek/ml supernatantu. Na základě koncentrace proteinů a SDS-PAGE analýzy byl odhadnut výtěžek exprese fytasy na cca 3 až 4 mg/ml.

Příklad 9 - Vlastnosti *PhyA* fytasy exprimované v *Pichia*

Molekulová hmotnost a deglykosilace expresní fytasy. Silný proužek okolo molekulové hmotnosti 95 kDa byl dobře znatelný na SDS-PAGE supernatantu připraveného z média, které bylo inokulováno transformantem z genu *phyA* (obr. 12). Byl to téměř jediný zřetelný protein v supernatantu. Exprimovaná fytasa reagovala dobře s králičními protilátkami připravenými proti purifikované nativní fytase z *A. niger*. To značí, že imunoreaktivita exprimované fytasy byla v podstatě stejná jako imunoreaktivita nativní fytasy z *A. niger*. Po použití Endo H se snížila velikost fytasy deglykosilací na 50 kDa. Protilátky proti *phyA* reagovaly také s deglykosilovanou fytasou. Deglykosilace provedená za nativních podmínek navíc snížila aktivitu fytasy o 15%, z čehož vyplývá, že glykosilace byla důležitá pro aktivitu fytasy. Glykosilace dále ovlivnila termostabilitu enzymů (obr. 13).

Nothern analýza. Jak je vidět z obrázku 14, sonda *phyA* DNA o velikosti 1,3 kb hybridizovala s mRNA indukovaných transformantů jak

z KM71 (č.13) a X33 (č.101). Signál daly také transformanty před indukcí. Pravděpodobně nebyla exprese *phyA* v tomto systému kontrolována striktně na hladině transkripce.

pH a teplotní optimum a hydrolýza fytínu. Stejně jako je tomu u fytasy z *A. niger*, má expresní fytasa dvě pH optima - 2,5 a 5,5 (obr. 15). Teplotní optimum exprimované fytasy bylo 60°C (obr. 16). Jestliže byla expresní fytasa inkubována se sojovými vzorky při aktivitách 100, 200, 400, 800, mU/g a teplotě 37°C, byla produkce fosfátu lineární v závislosti na množství fytasy (obr. 17).

Příklad 10 Materiál a metody pro overexpresi genu *appA* z *E.coli* v *Sacharomyces cerevisiae*.

Gen a protein. Tento gen, původně definovaný jako gen periplasmatické fosfoanhydridfosfohydrolasa z *E. coli* obsahuje 1298 nukleotidů (GeneBank accession number: M58708). Nejdříve bylo zjištěno, že gen kóduje kyselou fosfatasu s pH optimem 2,5 (EcAP) v *E. coli*. Kyselá fosfatasa je monomer s molekulovou hmotností 44644 daltonů. Zralé EcAP obsahuje 410 aminokyselin (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), který je zde zahrnutý odkazem). Ostanin se spolupracovníky overexprimoval *appA* v *E. coli* BL21 vektorem pT7 a zvýšil tak její kyselou fosfatasovou aktivitu přibližně 400x (440 mU/mg proteinů) (Ostanin, K. et al., „Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia coli Acid Phosphatase“, J. Bio. Chem., 267: 22830 - 36 (1992), který je zde zahrnutý odkazem).

Gen a hostitel - kmen CU1869 (No. 47092) *E. coli* byly zakoupeny od ATCC. Gen, insert 1,3 kb, byl transformován do kmene BL21 (no. 87441) *E. coli* s použitím expresního vektoru pAPPAl (Ostanin, K. et al., „Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia coli Acid Phosphatase“, J. Bio. Chem., 267: 22830 - 36 (1992), který je zde zahrnutý odkazem).

Hostitel a vektor. Vektor pro overexpresi genu *appA* v *Saccharomyces cerevisiae* byl pYES2 a hostitel byl INVScI (Invitrogen, San Diego, CA. USA).

Konstrukce expresního vektoru. Na začátku byl izolován fragment XbaI 1,3 kb velký z pAPPAl. Tento fragment obsahoval gen

appA se svým vlastním signálním peptidem. Poté, co byl tento fragment ligován do místa *XbaI* *pYES2*, byl takto vzniklý konstrukt (*pYES2-appA*) transformován do *Saccharomyces cerevisiae*. Fytasová aktivita však nebyla zvýšena ani v extra- ani v intra - buněčných částech v porovnání s kontrolou. *pAPPAl* a *pYPP1* (*PhyA* a jeho signální peptid v *pYES2*) byly kotransformovány do kvasinkového kmene. Ovšem, znovu nebyla pozorována vyšší aktivita kvůli *pAPPAl* v médiu nebo v kvasinkových buňkách.

Dva primery byly syntetizovány za účelem spojení signálního peptidu genu *PhyA* s kódující oblastí genu *appA*. Jeden, 80 bp dlouhý, obsahoval signální peptid *PhyA* a místo *KpnI* na 5' konci: GGG GTA CCA TGG GCG TCT CTG TTC TAC TTC CTT TGT ATC TCC TGT CTG GAG TCA CCT CCG GAC AGA GTG AGC CGG AG (SEQ ID No.9). Druhý primer byl dlouhý 24 bp s *EcoRI* místem na 3' konci: GGG ATT TCA TTA CAA ACT GCA GGC (SEQ ID No. 10). PCR proběhlo ve 25 cyklech, v režimu - 1 min. denaturace při 95°C - 1 min. annealing při 58°C a 1 min. prodloužení řetězce při 72°C. Fragment 1,3 kb byl amplifikován, štěpen a ligován do *pYES2*. Poté, co byl insert potvrzen restrikcčním mapováním, byl konstrukt (*pYES2-SphyA-appA*) transformován do *INVScI* litiem acetátovou metodou.

Expres. Vyselektované transformanty byly inokulovány do YEPD média. Expres byla indukována přidáním galaktosy do kultury poté, co OD_{600} dosáhla 2 tak, jak to bylo popsáno dříve. Buňky byly sklizeny 15 až 20 hodin po indukci.

Stanovení aktivity. Kyselá fosfatasová aktivita byla stanovena při 37°C ve 25 mM glycin-HCl pufru (pH 2,5) s použitím *p*-nitrofenylfosfátu jako substrátu (zásobní roztok - 250mM). 1,7 ml reakčního pufru bylo přidáno do 0,1 ml vzorků. Po pětiminutové inkubaci ve vodní lázni při 37°C bylo přidáno 0,2 ml vytemperovaného substrátu a zamícháno. Reakční roztok byl přenesen do vytemperované kyvety, která byla přímo v držáku spektrofotometru, a v ní byl inkubován při 37°C 2 minuty. Množství uvolněného *p*-nitrofenolu bylo sledováno průběžně po dobu 5 min., při vlnové délce 405nm. Z výsledků se poté vypočetla enzymová aktivita.

In vitro studie. Sojová moučka (5,0 g) byla rozmíchána ve 20 ml 20mM citrátového pufru, pH 5,5 a dále smíchána s 200 mU fytasy a inkubována při 37°C po dobu 4 hodin za neustálého míchání. Po

ochlazení ledem po dobu 10 min. byla suspenze přenesena do centrifugačních zkumavek a centrifugována po dobu 15 min. při 15000 x g. V supernatantu byly stanoveny volné fosfáty.

Příklad 11 - Kvantifikace aktivity fytasy z overexprimovaného genu *E. coli appA* v *Saccharomyces cerevisiae*.

Intracelulární aktivita kyselé fosfatasy v genem *appA* overexprimované *E. coli* (pAPPAl) byla 440 mU/mg proteinů. Nebývale vysoká však byla nalezena fytasova aktivita v transformovaném kmeni (větší než 4900 mU/mg proteinů). V kontrole (BL21) bylo pouze minimální množství fytasové aktivity. To znamená, že tento gen pro kyselou fosfatasu také kódoval fytasu. Sekvence *appA* genu byla srovnána se sekvencí genu *PhyA* a bylo zjištěno že tyto dva geny sdílí 23% identity.

Transformace INVScI konstruktem pYES2-Sphy-*appA* (se zaváděcím signálním peptidem z *PhyA*) vedlo k produkci fytasové aktivity v supernatantu, která byla 2000 krát větší než aktivita divokého typu nebo aktivita transformantu obsahujícího gen *appA* se svým vlastním signálním peptidem (viz tabulka 7.)

Tabulka 7. Extracelulární fytasová aktivita v transformantech s genem *appA* s různými signálními peptidy

Konstruk	Signální peptid	Aktivita (mU/ml)	Aktivita (mU/mg proteinů)
PYES-	<i>appA</i>	Nedetekovatelná	Nedetekovatelná
pYES2-SphyA- <i>appA</i>	<i>PhyA</i>	1,158	445

Vliv koncentrace anorganického fosfátu, fytinu, pH a teploty média (YEPD) na expresi fytasové aktivity pYES2-Sphy-A-*appA* je ukázán v tabulce 8. Nejvyšší fytasová aktivita za optimálních podmínek byla 2,286 mU/ml (633 mU/mg proteinů).

Tabulka 8. Vliv vlastností média YEPD na expresi fytasové aktivity pYES2-Sphy-A-appA v kvasinkách

Vlastnosti média	Aktivita (mU/ml)
Fosfor, mg/100ml	
0	1402
1	714
5	722
10	456
Fytinát sodný, g/100ml	
0	870
0,1	1019
1,0	1748
pH	
5,0	892
7,0	996
8,0	2286
Teplota, °C	
25	312
30	1037
37	996

Teplotní stabilita overexprimované extracelulární fytinové aktivity produkované kvasinkovými transformanty byla vyšší než fytasy vnitrobuněčné produkované *E. coli* transformované pAPPA1 (viz. Tabulka 9). Zahřátí extracelulární fytasy na 80°C a 15 minut vedlo k 30% ztrátě fytasové aktivity, kdežto téměř veškerá fytasová aktivita byla ztracena jestliže stejným podmínkám byla vystavena fytasa z *E. coli*.

Tabulka 9. Vliv zahřívání (80°C, 15 min.) na aktivitu fytas z různých zdrojů

Fytasa	Relativní aktivita po zahřátí (%)
<i>appA</i> v <i>E. coli</i>	0,1
<i>appA</i> v <i>S. cerevisiae</i>	69
PhyA v <i>S. cerevisiae</i>	66
fytaśa BASF	50

Srovnání fytas (200 mU) z *E. coli*, overexprimované AppA v kvasinkách a BASF co do schopnosti uvolňovat fosfát ze sojové moučky je ukázáno v tabulce 10. Výsledky naznačují, že fytasy ze všech tří různých zdrojů uvolňují fytinové fosfáty ze sojové moučky účinně.

Tabulka 10. Volné fosfáty uvolněné ze sojové moučky fytasami ze tří různých zdrojů.

Fytasa	Fosfor (mg/g)
<i>appA</i> v <i>E. coli</i>	1,11
<i>appA</i> v <i>S. cerevisiae</i>	0,69
BASF	0,87

Jestliže byl gen *E.coli appA* (kyselá fosfatasa) exprimován v *Saccharomyces cerevisiae* produkoval extracelulární fytasovou aktivitu v médiu jež byla více než 2000 krát vyšší než kontrola. Overexprimovaná fytasa účinně uvolňovala fytinové fosfáty ze sojové moučky a zdá se, že je termostabilnější než v současné době dostupná komerční fytasa nebo vnitrobuněčná fytasa produkvaná v *E. coli* stejným genem (*appA*).

Příklad 12 - Metody a materiál pro overexpresi genu *E. coli* *appA* kódujícího kyselou fosfatasu / fytasu v *Pichia pastoris*

Gen a protein. Gen *appA* a hostitel, kmen *E. coli* CU1867 (No. 47092) byly obdrženy z ATCC. Gen, insert 1,3 kb, byl transformován do kmene BL21 (no. 87441) *E. coli* s použitím expresního vektoru pAPPA1 (Ostanin, K. et al., „Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia coli Acid Phosphatase“, J. Bio. Chem., 267: 22830 - 36 (1992), který je zde zahrnutý odkazem).

Hostitel a vektor. Byl zakoupen EasySelect™ *Pichia* Expression kit od firmy Invitrogen (San Diego, CA). Kit obsahuje hostitele a vektory potřebné k expresi genu buď intracelulárně nebo extracelulárně v divokém kmeni (X33). Byly použity dva vektory: pPICZB (3,3 kb) a pPICZαA (3,6 kb). Oba používaly promotor AOX1.

Konstrukce expresního vektoru. Dva primery byly použity k amplifikaci genu *appA* z pAPPA1 a dvě restriční místa EcoRI a KpnI byly zhotoveny na 5' a 3' koncích.

Primer proti směru: GGA ATT CCA GAG TGA GCC GGA (SEQ ID No. 11)

Primer po směru: GGG GTA CCT TAC AAA CTG CA G (SEQ ID No. 12)

Templát: pAPPA1 DNA izolovaná z ATCC 87441

PCR byla provedena ve 30 cyklech za následujícího uspořádání: 1 min. denaturace při 94°C, 1 min. annealing při 55°C a 1 min. prodlužování řetězce při 72°C. Fragment o velikosti 1245 parů bazí byl amplifikován, štěpen EcoRI a KpnI a ligován (16°C přes noc) do pPICZ B (3,3 kb) a do pPICZαA (3,6 kb). Ligace byla potvrzena restričním mapováním po transformaci konstruktů do DH5α.

Transformace konstruktů do *Pichia* (X33). Pro každou transformaci bylo připraveno 100 µg plasmidové DNA a poté linearizován štěpením s Pmel. Po linearizaci byla DNA purifikovaná a resuspendována v 10 µl sterilní deionizované vody. Ke každé transformaci byla poté použita polovina této DNA. K transformaci DNA do X33 byly použity elektroporace a kit EasyComp chemical kit (Invitrogen). V případě elektroporace byly použity 2mm kyvety a Cell Manipulator (ECM 600, Gentromics, BTX Instrument division, San Diego, CA 92121). Odpor byl 186 Ohm, nabíjecí napětí 1,5 kilovoltů a

skutečná doba nabíjení byla přibližně 7 milisekund. Elektroporované buňky byly inkubovány na YPD agarových plotnách obsahujících 100 mg Zeocinu/ml při 30°C dva až čtyři dny dokud nevyrostly kolonie. V případě chemické transformace byly buňky pěstovány na YPDS agarových plotnách obsahujících 100 mg Zeocinu/ml. Chemická metoda měla v porovnání s elektroporací nižší transformační účinnost.

Expresce. Jednotlivé kolonie byly inokulovány do 10 ml média MGY (30 ml zkumavky) a pěstovány při 28-30°C v rotačním inkubátoru (200 otáček z minutu) (16-18 hodin) dokud hodnota OD_{600} nedosáhla 5-6. Buňky byly poté odstředěny (2000 ot./min) a resuspendovány v 10 ml média BMMY (obsahujícího 0,5% metanolu) k indukci exprese. Vzorky (200 μ l) byly sbírány každých 12 nebo 24 hodin po indukci. Metanol (100%) byl přidán v množství 100 μ l každých 24 hodin za účelem udržení jeho koncentrace v médiu na hladině 0,5 - 1% v médiu.

Stanovení. Buňky byly odděleny z média (supernatant) a lysovány s pomocí skleněných kuliček v homogenizačním pufru. Extracelulární fytasová aktivita v supernatantu a vnitrobuněčná fytasová aktivita v lysovaných buňkách byla stanovena tak jak je popsáno dříve (0,2 M citrátový pufr, pH 5,5, při teplotě 37°C a s použitím 10 mM fytátu sodného). Kyselá fosfatasová aktivita byla stanovena při 37°C ve 25 mM glycin-HCl pufru (pH 2,5) s použitím *p*-nitrofenylfosfátu jako substrátu (zásobní roztok - 250mM). 1,7 ml reakčního pufru bylo přidáno do 0,1 ml vzorků. Množství uvolněného *p*-nitrofenolu bylo sledováno průběžně po dobu 5 min., při vlnové délce 405nm. Z výsledků se poté vypočetla enzymová aktivita. Byla provedena SDS-PAGE (12%) s cílem stanovit velikost a relativní množství exprimovaného proteinu. pH optimum a teplotní optimum exprimované fytasy byly stanoveny tak, jak bylo popsáno ve výsledcích.

In vitro studie. Sojová moučka (5,0 g) byla rozmíchána ve 20 ml 20mM citrátového pufru, pH 5,5 a dále smíchána s 200 mU fytasy a inkubována při 37°C po dobu 4 hodin za neustálého míchání. Po ochlazení ledem po dobu 10 min. byla suspenze přenesena do centrifugačních zkumavek a centrifugována po dobu 15 min. při 15000 x g. V supernatantu byly stanoveny volné fosfáty.

Příklad 13 - Sledování fytasové aktivity v koloniích *Pichia pastoris* overexprimujících gen *E. coli appA*.

Divoký typ *Pichia* X33 tvoří jak extracelulárně ($< 0,03$ U/mg proteinů) tak i intracelulárně ($< 0,05$ U/ml) minimální množství fytasové aktivity. Buňky X33 transformované *appA* genem vneseným do pPICZB (bez α - faktoru a tedy by tvořily vnitrobuněčnou fytasu) nevykázaly žádné zvýšení aktivity fytasy (extracelulární aktivita 0,2 U/ml a intracelulární aktivity 0,05 U/mg proteinů).

Transformace buněk X33 konstruktem pIZ α A-*appA* (se zaváděcí sekvencí α -faktoru) vedla k tvorbě extracelulární fytasové aktivity v médiu. Na začátku bylo sledováno 72 kolonií. Pouze dvě kolonie měly po 40 hodinách od indukce aktivitu <1 U/ml. Většina kolonií měla za 40 hodin od indukce aktivitu v rozmezí 10 až 20 U/ml. Všech 70 kolonií mělo za 118 hodin od indukce fytasovou aktivitu >80 U/ml. Nejvyšší aktivita fytasy, dosud detekovaná, byla 215 U/ml ve 192 hodině po indukci (viz tabulka 11).

Tabulka 11 - Oblast extracelulární fytasové aktivity v koloniích X33 transformovaných pIZ α A-*appA* 40 a 118 hodin po indukci.

Počet kolonií	40 hodin po indukci	118 hodin po indukci
2	<1 U/ml	
6	1-10 U/ml	
36	11-20 U/ml	
28	>20 U/ml	
70		80 U/ml

Aktivity fytasy a kyselé fosfatasy v transformantu, který exprimuje 215 U fytasové aktivity na ml byly porovnány s aktivitami divokého typu X33 (192 hodin po indukci) (viz tabulka 12). Téměř všechna exprimovaná fytasa byla sekretována z buněk, což znamená, že α -faktor byl velmi účinným signálním peptidem při sekreci fytasy.

Tabulka 12 Aktivita fytasy a kyselá fosfatasy

	Divoký typ X33		pPIZ α A-appA transformant	
	Extracelulární U/ml	Intracelulární U/mg bílkoviny	Extracelulární U/ml	Intracelulární U/mg bílkoviny
Fytasa	0,05	0,03	215	0,5
Kyselá fosfatasa	0,01	0,002	5,88	0,9

Transformanty *E. coli* genem pro kyselou fosfatasu *appA* z *E. coli* měly intracelulární aktivitu fytasy 5 U/mg proteinů (Ostanin, K. et al., Overexpression, Site-Directed Mutagenesis and Mechanism of Escherichia Coli Acid Phosphatase, J. Biol. Chem., 267: 22830-36 (1992), který je zde zahrnut odkazem).

Transformant s genem *PhyA* v *A. niger* tvořil extracelulární aktivitu 7,6 U/ml (Hartingsveldt et al., Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*, Gene 27: 87-94 (1993), který je zde zahrnut odkazem). Ve srovnání s těmito výsledky je expresní systémem fytasy v *Pichia* velmi účinným expresním systémem.

Příklad 14 Časová závislost exprese fytasy

Aktivita extracelulární fytasy v médiu se zvyšovala lineárně u téměř všech selektovaných kolonií až do 192 hodin po indukci. Obrázek 18 shrnuje změny aktivit pěti kolonií v čase 24 až 163 hodin po indukci.

Příklad 15 Vliv pH média na expresi fytasy (kolonie č. 23, aktivita 136 U/ml ve 186hodině)

Byl studován vliv rozdílných pH média na tvorbu extracelulární fytasy u transformantů. K pokusům byly použity 0,1 M fosfáty pufrovaná média. Jako kontrola bylo použito médium bez pufru

(pH 7,0). V médiu pufrovaném na pH 6,0 se tvořila nejvyšší fytasová aktivita (viz obr. 19).

Příklad 16 Velikost exprimované extracelulární fytasy

Na SDS-PAGE (12% gel) byl jasně zřetelný proužek u vzorku supernatantu média kultury inokulované třemi rozdílnými koloniemi (viz. obr.20). Velikost byla okolo 55 kDa, pravděpodobně byl protein částečně glykosilovaný. Protože expresní protein reprezentoval většinu viditelných proteinů v supernatantu, bylo by praktické získávat enzym bez potřeby dlouhé purifikace.

Příklad 17 pH optimum a teplotní optimum expresní extracelulární fytasy (kolonie č. 23)

pH optimum expresní fytasy bylo 2,5 až 3,5 (viz obr. 21). To je významně odlišné od obou fytas - fytasy *phyA* i fytasy z *A. niger* (BASF) nebo od našich dalších expresních systémů. Toto pH optimum je ideální pro její funkci v podmínkách pH žaludku.

Teplotní optimum exprimovaného enzymu bylo 60°C (viz obr. 22).

Příklad 18 Vliv expresní fytasy na hydrolýzu fytinu a uvolnění fosfátu ze sojové moučky

Tato overexprimovaná *E. coli* fytasa (kolonie č. 23) účinně hydrolyzuje fytin a uvolňuje tak fosfát ze sojové moučky (viz obr. 23). Uvolňování volného fosfátu ve směsi bylo lineární od 0 do 800 mU fytasy / g krmiva.

Příklad 19 Vliv expresní *E. coli* AppA fytasy exprimované *Pichia pastoris* na biologickou dostupnost fytinového fosfátu u prasat odstavených od kojení

Ke zjištění nutriční hodnoty expresní *E.coli* fytasy exprimované *Pichia* při krmení prasat byla tato nová fytasa porovnávána s přidáváním anorganického fosfátu či s komerčně dostupným mikrobiálním systémem (NatuphosTM, BASF Corp., Mt. Olive, NJ, USA). Čtyřicet osm mladých, právě od kojení odstavených prasátek, bylo vybráno mezi prasnicemi, které porodily více mláďat na Cornellově výzkumné prasečí farmě (Cornell Swine Research Farm). Prasátka byla odstavena ve 21 dnu a krmena komerčním krmivem do 28 dne. Poté byla přendána po dvou do ohrádek a náhodně bylo mezi nimi zvoleno ošetření. Prasátka si zvykala dva týdny na kukuřično-sojovou základní stravu (tabulka 13).

Tabulka 13 Složení experimentální stravy pro prasata

Složka	+C %stravy	-C %stravy	YP %stravy	MP %stravy
Kukuřice	60,5	61,57	61,07	
Syrovátkový bílkovinný koncentrát	3	3	3	3
SBM 44%	30	30	30	30
Kukuřičný olej	3	3	3	3
Limeta	0,8	0,93	0,93	0,93
Fosforečnan vápenatý	1,2	0	0	0
Vitamíny a minerální látky	0,5	0,5	0,5	0,5
směs ECAP	0	0	0,5	0
směs MP	0	0	0	0,5
Sůl	0,5	0,5	0,5	0,5
CSP 250	0,5	0,5	0,5	0,5
Celkem	100	100	100	100
CP	20,6	20,6	20,6	20,6
Ca	0,73	0,47	0,47	0,47
P _{celkový}	0,6	0,39	0,39	0,39

Pozn.: Všechny směsi používají kukuřici jako nosič
 Doplnkové vitamíny a minerální látky: 2540 MJ (mezinárodních jednotek-IU)
 Vit. A, 660 MJ Vit. D, 15 MJ Vit. E, 2,2 mg Vit K,
 3,3 mg riboflavinu, 13,2 mg kyseliny pantotheové, 17,6 mg niacinu, 110,1 mg
 cholinu, 1,98 µg B-12,
 37,4 mg Mn, 0,6 mg I, 10 mg Cu, 0,3 mg Se, 100 mg Zn a 100 mg Fe na kg
 stravy.

Poté každá ohradka dostávala jednu ze čtyř strav. Skupina „pozitivní kontrola“ (+C) dostávala základní stravu doplňovanou fosforečnanem vápenatým. Skupina „negativní kontrola“ (-C) dostávala pouze základní stravu. Skupina „kvasinková fosfatasa“ (YP) dostávala základní stravu doplňovanou expresní *E. coli* fytasou v množství 1200

U/kg krmiva. Skupina „mikrobiální fytasa“ (MP) dostávala základní stravu doplňovanou fytasou BASF v množství 1200 U/kg krmiva. Prasátka měla volný přístup k potravě a vodě. Přírůstek váhy jednotlivých prasátek byl zaznamenáván týdně. Sežrané krmivo za den u každé ohrádky bylo také zaznamenáváno. Vzorky krevní plasmy každého z prasat byly odebírány týdně ke stanovení hladiny anorganického fosfátu v krvi. V tabulce 14 jsou výsledky tělesné váhy (body weight - BW), průměrného denního přírůstku (average daily gain - ADG), průměrného denního příjmu (average feed intake - ADFI), poměru krmivo/přírůstek (feed/gain - F:G) a anorganického fosfátu v plasmě (plasma inorganic phosphorus - PP).

Tabulka 14 Celkové hodnoty PP, BW, ADG, ADFI a F:G prasat v závislosti na stravě a obsahu fytasy.

	+C	-C	YP	MP
Počáteční stav				
PP	12,99	13,02	13,07	13,54
BW	11,54	11,63	12	11,5
1. týden				
PP	10,83 ^A	6,48 ^C	8,59 ^B	8,35 ^B
BW	14	13,83	14,29	13,92
ADG	0,351	0,316	0,327	0,345
ADFI	0,700	0,684	0,697	0,697
F:G	2,04	2,20	2,18	2,13
2. týden				
PP	9,76 ^A	5,64 ^D	8,72 ^B	7,84 ^C
BW	18,04	17,42	17,83	17,71
ADG	0,578	0,512	0,506	0,542
ADFI	0,833	0,855	0,784	0,837
F:G	1,46 ^B	1,67 ^A	1,56 ^{AB}	1,55 ^{AB}
3. týden				
PP	11 ^A	6,26 ^C	8,64 ^B	8,13 ^B
BW	22,58	21,17	22	22,21
ADG	0,649 ^A	0,536 ^B	0,595 ^{AB}	0,643 ^{AB}
ADFI	1,166	1,02	1,001	1,003
F:G	1,8	1,92	1,71	1,36
4. týden				
PP	10,94 ^A	6,31 ^C	9,65 ^B	9,2 ^B
BW	27,54	25,29	27,79	27,38
ADG	0,708 ^{AB}	0,589 ^B	0,827 ^A	0,738 ^{AB}
ADFI	0,1,395 ^A	1,049 ^B	1,309 ^A	1,273 ^{AB}
F:G	1,98	1,87	1,59	1,73

1 Čísla ve stejném řádku, která nesdílí společné písmeno jsou významně odlišná. Analýza rozdílů byla provedena pomocí Bonferroniho (Dunnovým) T-testem, kde alfa=0,05 a df=20

Ke konci čtyřtýdenního experimentu byl pozorován velký nedostatek fosfátu u skupiny negativní kontrola. U všech ostatních tří skupin nebyly pozorovány náznaky nedostatku fosfátu. Je zřejmé, že ve zlepšení biologické dostupnosti fosfátu z fytinu kukuřično-sojové moučkové stravy pro prasata byla expresní *E.coli* fytasa

exprimovaná *Pichia* stejně, ne-li více, účinná jako komerční mikrobiální fytasa. Může tedy nahradit, u od kojení odstavených prasat, doplňování stravy anorganickým fosfátem.

Příklad 20 Vliv expresní *E. coli* AppA fytasy exprimované v *Pichia pastoris* na biologickou dostupnost železa (Fe) a fytinového fosfátu u prasat odstavených od kojení

Ke zjištění vlivu expresní *E.coli* fytasy exprimované *Pichia* na biologickou dostupnost ve stravě obsaženého, na fytin vázaného Fe, pro, od kojení odstavená, prasata, bylo vybráno dvacet anemických prasat (stáří 21 dní, 7,3 g hemoglobinu (Hb)/ dl krve). Prasata byla krmena sedm dní krmivem s nedostatkem Fe a poté byla ve věku 28 dní umístěna do metabolických klecí. Poté byla ve věku 35 dní krmena experimentální stravou po dobu pěti týdnů. Experimentální strava byla následující: základní strava s nedostatkem Fe (-C, s přidáním anorganickým fosfátem), strava s dodávaným Fe (+C), strava s nedostatkem Fe a fosfátu a s expresní *E. coli* fytasou (YP) nebo s komerční mikrobiální fytasou (BASF, MP, USA) v množství 1200 U/kg krmiva. Týdně byly stanovovány: tělesná váha (BW), objem sedimentovaných buněk (PCV), Hb a anorganický fosfát v plasmě (PP). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 15.

Tabulka 15 Celkové hodnoty PCV, Hb, BW a PP prasat v závislosti na stravě a obsahu fytasy.

	+C	-C	YP	MP
Počáteční stav				
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
1. týden				
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
2. týden				
PCV	29	26	30	28
Hb	8,6	7,34	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
3. týden				
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
4. týden				
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
5. týden				
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

1 Hodnoty jsou průměry kde n=5. Průměry ve stejném řádku, které nesdílejí společné písmeno v horním indexu jsou významně rozdílné ($P < 0,10$)

E. coli fytasa overexprimovaná v *Pichia* byla, ve zvyšování fytinového fosfátu a využití Fe z kukuřično-sojové moučkové stravy

14.01.02

pro od kojení odstavená prasata, přinejmenším stejně účinná jako fytasa BASF.

Ačkoliv jsou zde hlavní body vynálezu detailně popsány a vykresleny, je těm, kteří jsou znalí oboru zřejmé, že se mohou vyskytnout různé modifikace, doplňky, náhrady apod. bez toho, aby byl opuštěn duch vynálezu a jsou tak tyto stále pokládány za část vynálezu, jak je definovaný v patentových nárocích.

Seznam sekvencí

<110> Cornell Research Foundation, Inc.
 <120> Overexprese genů fytasy v kvasikových systémech
 <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> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 1
 cggaattcgt cacctccgga ct 22

<210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 2
 cccaagcttc taagcaaaac actc 24

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 3
 cagctatgac catgattacg cc 22

<210> 4
 <211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 4

cctagaacgg gaattcattg gccgcc

26

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 5

cccaagcttg atcacatcca ttca

26

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 6

cggggactgc tagcgccgt tcgat

25

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 7

atcgaacgtg cgctagcagc agtccccg

28

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 8

gctctagact aagcaaaaca ctcc

24

<210> 9

<211> 80

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 9

ggggtaccat gggcgtctct gctgtttctac ttcttttcta tctcctgtct ggagtcacct 60
ccggacagag tgagccggag 80

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 10

gggaattcat tacaaactgc aggc

24

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 11

ggaattccag agtgagccgg a

21

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer pro PCR amplifikaci a klonování

<400> 12

ggggtacctt acaaactgca cg

14.01.02

PV2000-4805

3269

P A T E N O V Ě N Á R O K Y

1. Metoda produkce fytasy v kvasinkách zahrnující: zajištění heterologního genu, který kóduje protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou a exprese řečeného genu v kvasinkových kmenech.
2. Metoda dle nároku 1, kde je protein nebo polypeptid zaváděn signálním peptidem a sekretován buňkou do růstového média nebo pouze exprimován vnitrobuněčně.
3. Metoda dle nároku 2, kde je protein nebo polypeptid sekretován do růstového média a má koncentraci vyšší než 300 jednotek/ml.
4. Metoda dle nároku 1, kde je heterologní gen, který kóduje protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou, spojen do jednoho rámce s transkripčním zesilovacím prvkem.
5. Metoda dle nároku 1, kde je heterologní gen nesen stabilním vektorem.
6. Metoda dle nároku 1, kde je heterologní gen nesen umělým chromozomem.
7. Metoda dle nároku 1, kde je heterologní gen integrován do chromozomu kvasinkového kmene.
8. Metoda dle nároku 1, kde je heterologní gen izolován z rostlinných buněk.
9. Metoda dle nároku 1, kde je heterologní gen izolován z houbových buněk.
10. Metoda dle nároku 9, kde heterologní gen je gen *phyA* z *Aspergillus niger*.

11. Metoda dle nároku 1, kde je kvasinkový kmen vybrán ze skupiny obsahující *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* a *Schizosaccharomyces*.
12. Metoda dle nároku 11, kde kvasinkový kmen je *Saccharomyces cerivesia*.
13. Metoda dle nároku 10, kde kvasinkový kmen je metylotrofní kvasinkový kmen.
14. Metoda dle nároku 9, kde metylotrofní kvasinkový kmen je *Pichia pastoris*.
15. Metoda dle nároku 1, kde je heterologní gen izolován z bakteriálních buněk.
16. Metoda dle nároku 15, kde heterologní gen je gen *appA* z *Escherichia coli*.
17. Metoda dle nároku 16, kde je kvasinkový kmen vybrán ze skupiny obsahující *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* a *Schizosaccharomyces*.
18. Metoda dle nároku 17, kde kvasinkový kmen je *Saccromyces cerivesia*.
19. Metoda dle nároku 15, kde kvasinkový kmen je metylotrofní kvasinkový kmen.
20. Metoda dle nároku 19, kde metylotrofní kvasinkový kmen je *Pichia pastoris*.
21. Protein nebo polypeptid produkovaný metodou dle nároku 1.
22. Protein nebo polypeptid dle nároku 21, kde protein nebo polypeptid obsahuje signální peptid.

23. Protein nebo polypeptid dle nároku 21, kde heterologní gen je gen *phyA* z *Aspergillus niger*.
24. Protein nebo polypeptid dle nároku 21, kde heterologní gen je gen *appA* z *Escherichia coli*.
25. Protein nebo polypeptid dle nároku 21 mající fytasovou aktivitu s optimální aktivitou v oblasti teplot 57-65°C a pH 2,5 -3,5 nebo 5-5,5.
26. Protein nebo polypeptid dle nároku 25, kde teplotní oblast pro optimální aktivitu je 58 - 62°C.
27. Protein nebo polypeptid dle nároku 21, mající fytasovou aktivitu, kde si protein po zahřátí na 90°C a dobu 15 minut zachová alespoň 40% své aktivity.
28. Protein nebo polypeptid dle nároku 27, kde si protein po zahřátí na 90°C a dobu 15 minut zachová mezi 40% a 60% své aktivity.
29. Protein nebo polypeptid dle nároku 21, mající fytasovou aktivitu, kde si protein po zahřátí na 60°C a dobu 15 minut zachová alespoň 60% své aktivity.
30. Kvasinkový kmen obsahující heterologní gen, který kóduje protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou, a který je funkčně spojen s promotorem schopným exprese fytasy v kvasinkách.
31. Kvasinkový kmen dle nároku 30, kde heterologní gen je gen *phyA* z *Aspergillus niger*.
32. Kvasinkový kmen dle nároku 31, kde je kvasinkový kmen vybrán ze skupiny obsahující *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* a *Schizosaccharomyces*.

33. Kvasinkový kmen dle nároku 32, kde kvasinkový kmen je *Saccharomyces cerevisiae*.
34. Kvasinkový kmen dle nároku 31, kde kvasinkový kmen je metylotrofní kvasinkový kmen.
35. Kvasinkový kmen dle nároku 34, kde metylotrofní kvasinkový kmen je *Pichia pastoris*.
36. Kvasinkový kmen dle nároku 30, kde heterologní gen je gen *appA* z *Escherichia coli*.
37. Kvasinkový kmen dle nároku 36, kde je kvasinkový kmen vybrán ze skupiny obsahující *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* a *Schizosaccharomyces*.
38. Kvasinkový kmen dle nároku 37, kde kvasinkový kmen je *Saccromyces cerivesia*.
39. Kvasinkový kmen dle nároku 36, kde kvasinkový kmen je metylotrofní kvasinkový kmen.
40. Kvasinkový kmen dle nároku 39, kde metylotrofní kvasinkový kmen je *Pichia pastoris*.
41. Vektor obsahující gen z jiného organismu než jsou kvasinky, který kóduje protein nebo polypeptid s fytoaktivitou, promotor funkčně spojený s genem kódujícím peptid s fytoaktivitou, a kde je řečený promotor schopný iniciace transkripce v kvasinkách a dále obsahuje počátek replikace schopný udržet vektor v kvasinkách.
42. Vektor dle nároku 41, který dále obsahuje selekční marker.
43. Vektor dle nároku 42, kde je selekční marker vybrán ze skupiny zahrnující *URA3*, *LEU2*, *TRP1*, *HIS3*, *HIS4*, *ARG4* a geny rezistence k antibiotikům.

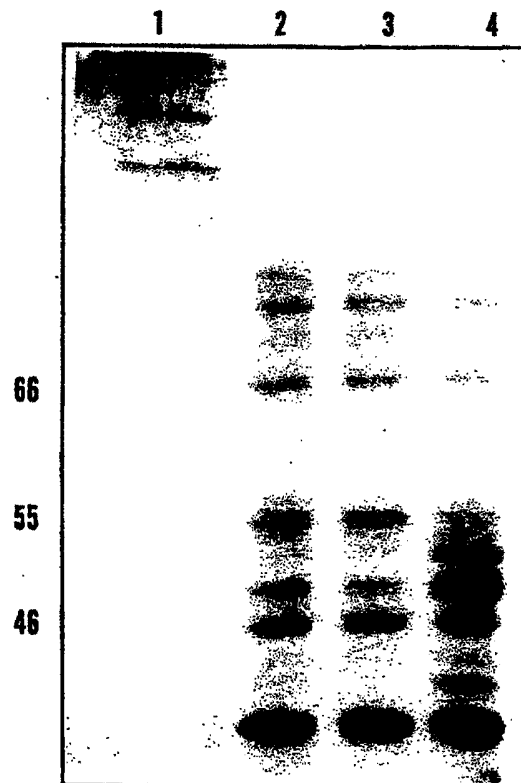
44. Vektor dle nároku 41, který dále obsahuje počátek replikace schopný replikace v bakteriální buňce.
45. Vektor dle nároku 44, kde počátek replikace je vybrán ze skupiny zahrnující *ColE1*, *Ori* a *oriT*.
46. Vektor dle nároku 41, kde je heterologní gen izolován z bakteriální buňky.
47. Vektor dle nároku 46, kde heterologní gen je gen *phyA* z *Aspergillus niger*.
48. Vektor dle nároku 46, kde heterologní gen je gen *appA* z *Escherichia coli*.
49. Metoda produkce proteinu nebo polypeptidu majícího fytasovou aktivitu a zahrnující: zajištění izolovaného genu *appA*, který kóduje protein nebo polypeptid s fytasovou aktivitou a dále expresi řečeného genu v hostitelské buňce.
50. Metoda dle nároku 49, kde je gen *appA* izolován z *Escherichia coli*.
51. Metoda dle nároku 49, kde je hostitelskou buňkou kvasinkový kmen nebo filamentární houba.
52. Metoda dle nároku 51, kde je filamentární houbou *Aspergillus niger*.
53. Metoda dle nároku 51, kde je kvasinkový kmen vybrán ze skupiny obsahující *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* a *Schizosaccharomyces*.
54. Metoda dle nároku 51, kde kvasinkový kmen je *Saccharomyces cerevisiae*.

55. Metoda dle nároku 49, kde je protein nebo polypeptid zaváděn signálním peptidem a sekretován buňkou do růstového média nebo pouze exprimován vnitrobuněčně.
56. Metoda konverze fytinu na inositol a anorganický fosfát zahrnující: zajištění genu *appA*; expresi proteinu nebo polypeptidu s fytasovou aktivitou z řečeného genu v hostitelské buňce a kontakt proteinu nebo polypeptidu s fytinem za účelem katalýzy konverze fytinu na inositol a anorganický fosfát.
57. Metoda dle nároku 56, kde je fytin obsažen v potravinách nebo krmivech.
58. Metoda dle nároku 56, kde je gen *appA* izolován z *Escherichia coli*.

14-01-02

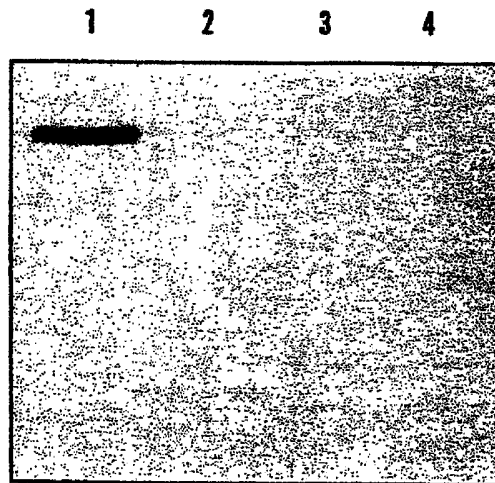
PV2000-4805

3269



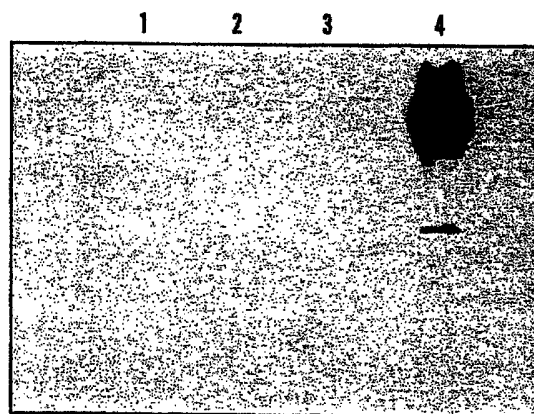
Obr.1

14-0102

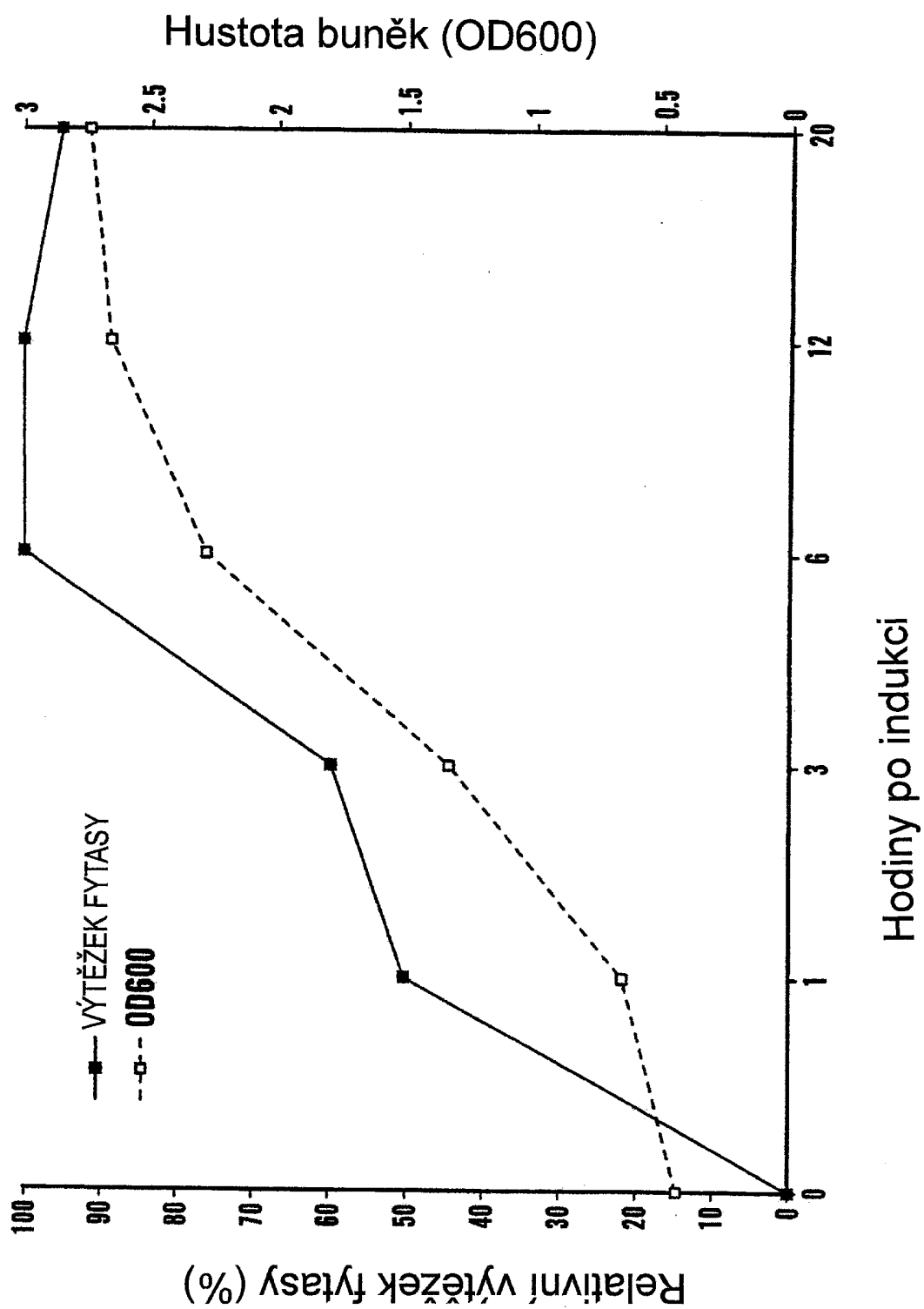


Obr.2

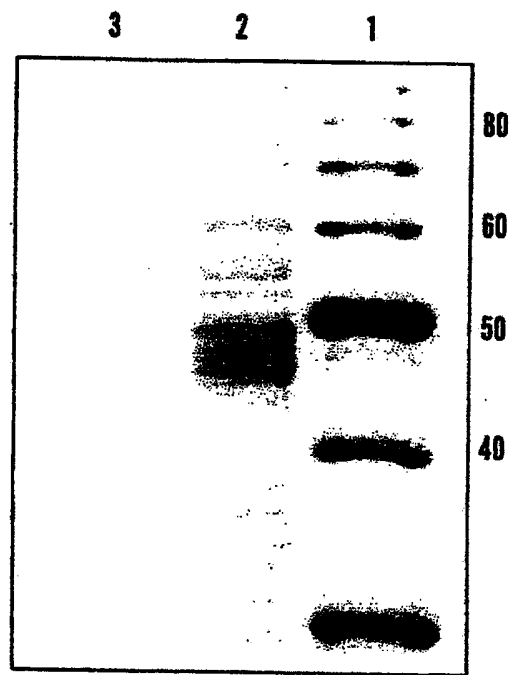
14-0102



Obr.3

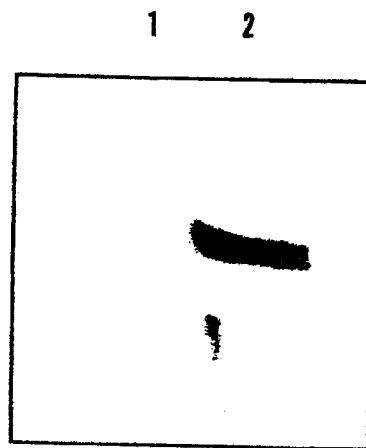


Obr.4



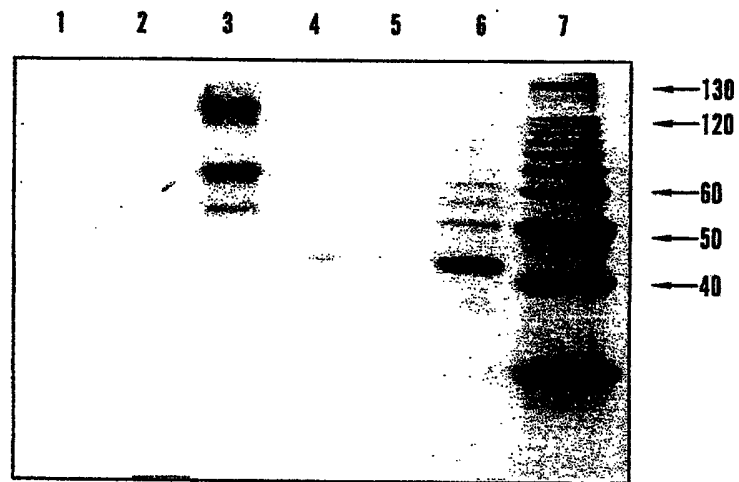
Obr.5

14-0102

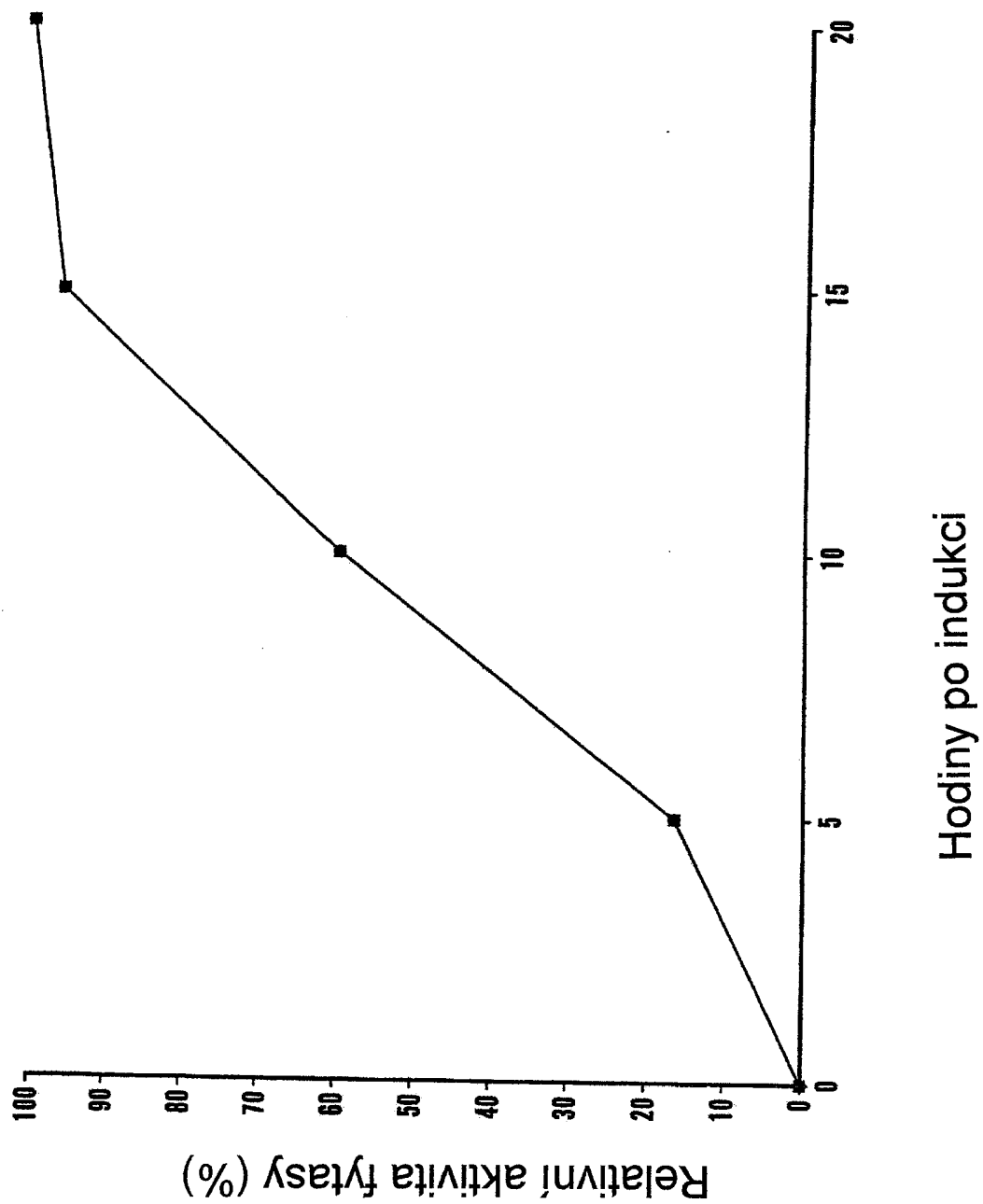


Obr.6

14-0102

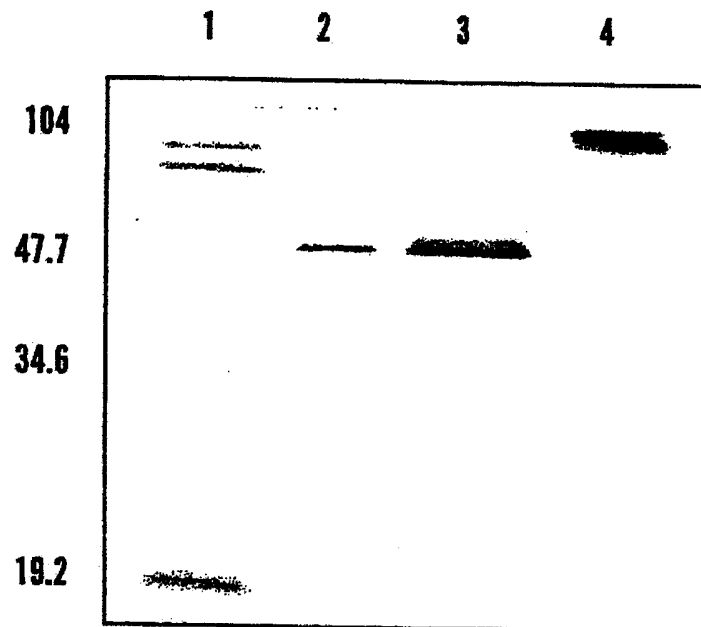


Obr.7



Obr.8

14-0102



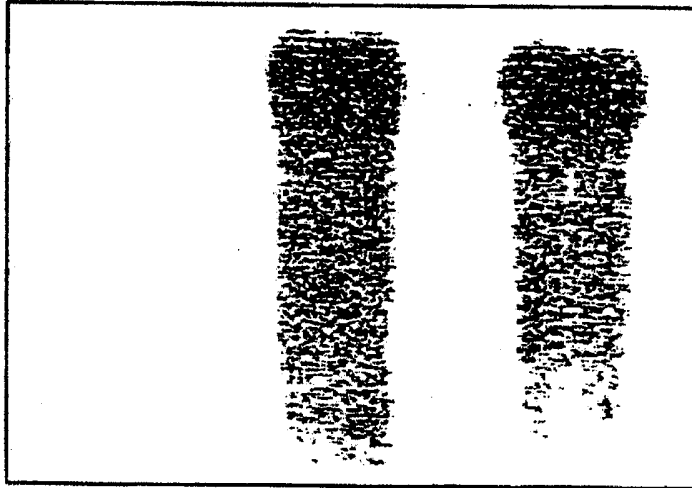
Obr.9

14-0102

1

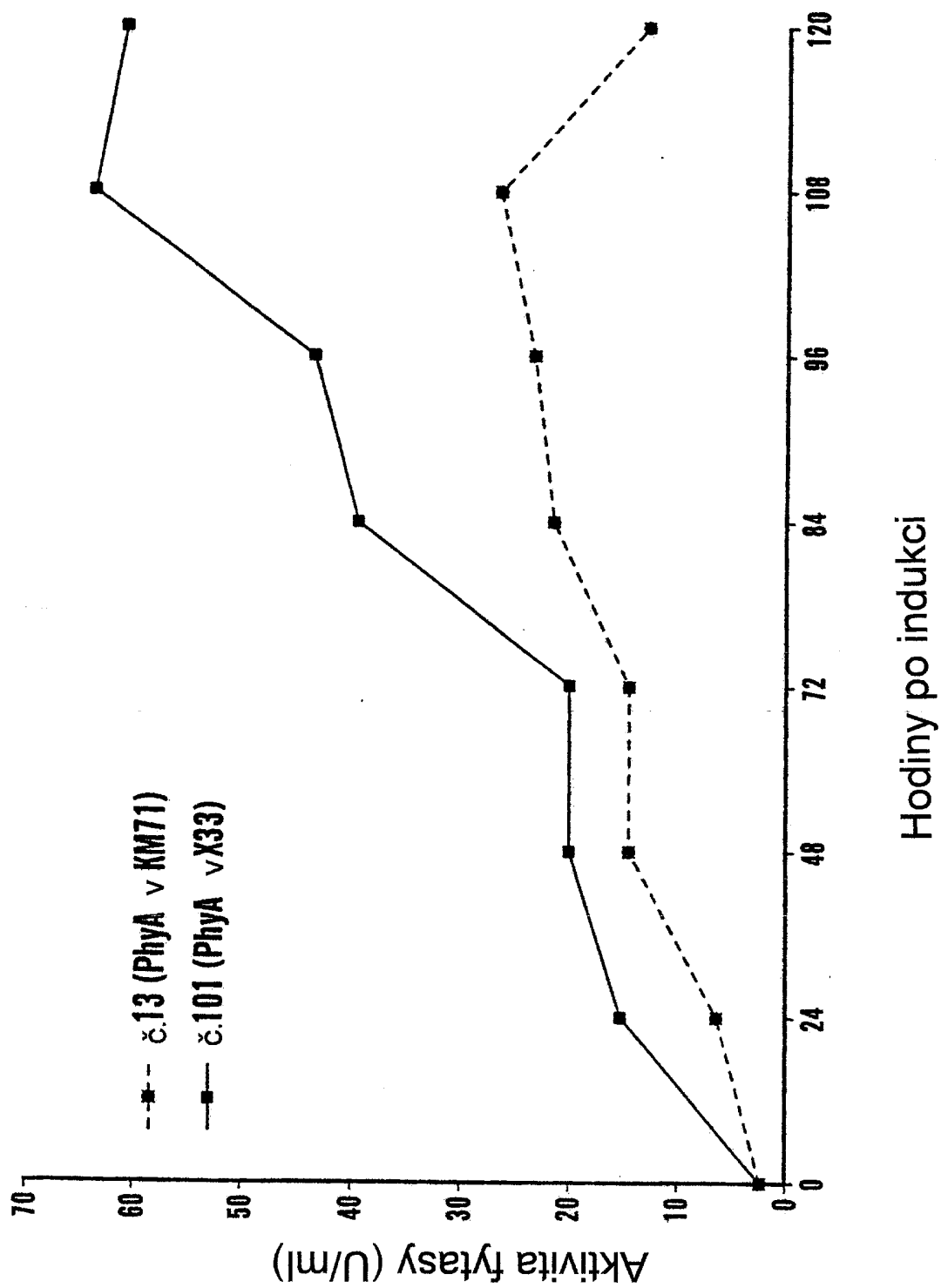
2

3



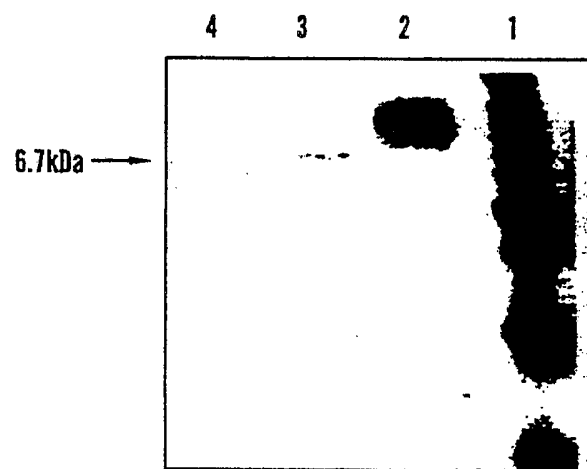
Obr.10

14.01.02

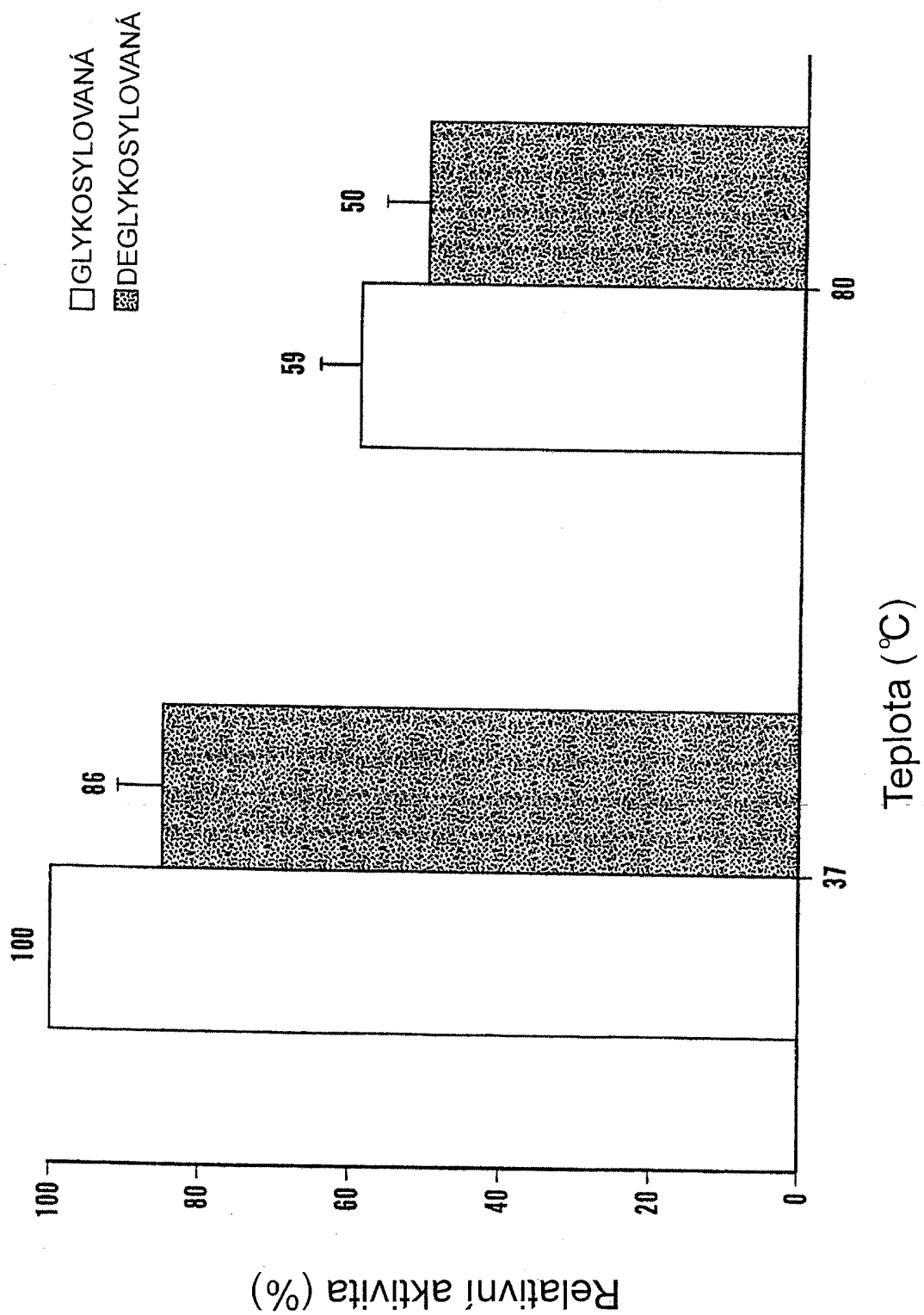


Obr.11

14-01-02

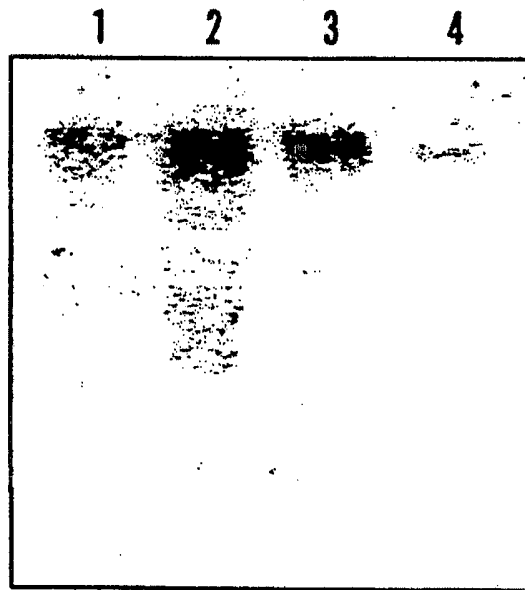


Obr.12



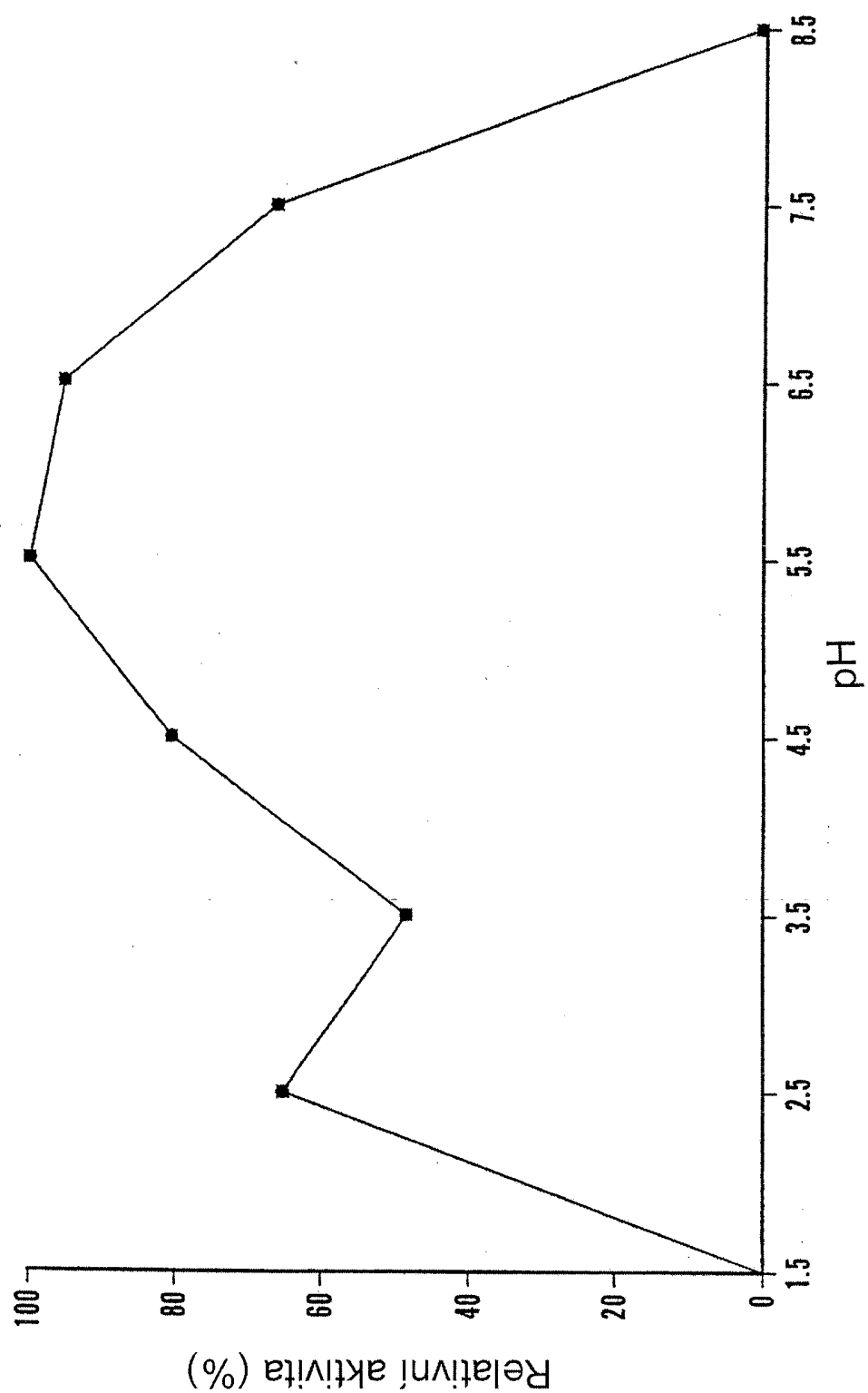
Obr.13

14-0102



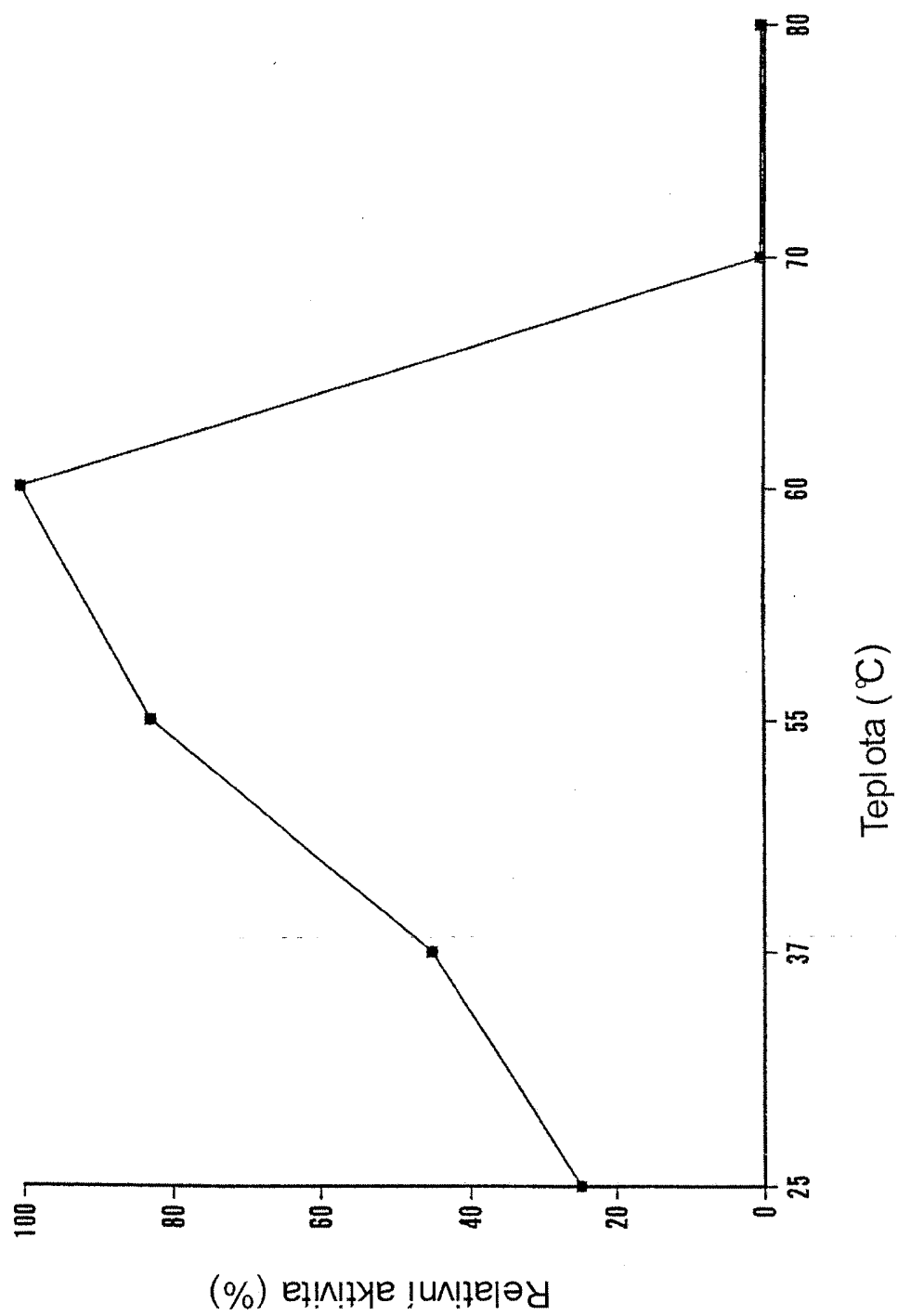
Obr.14

14.01.02

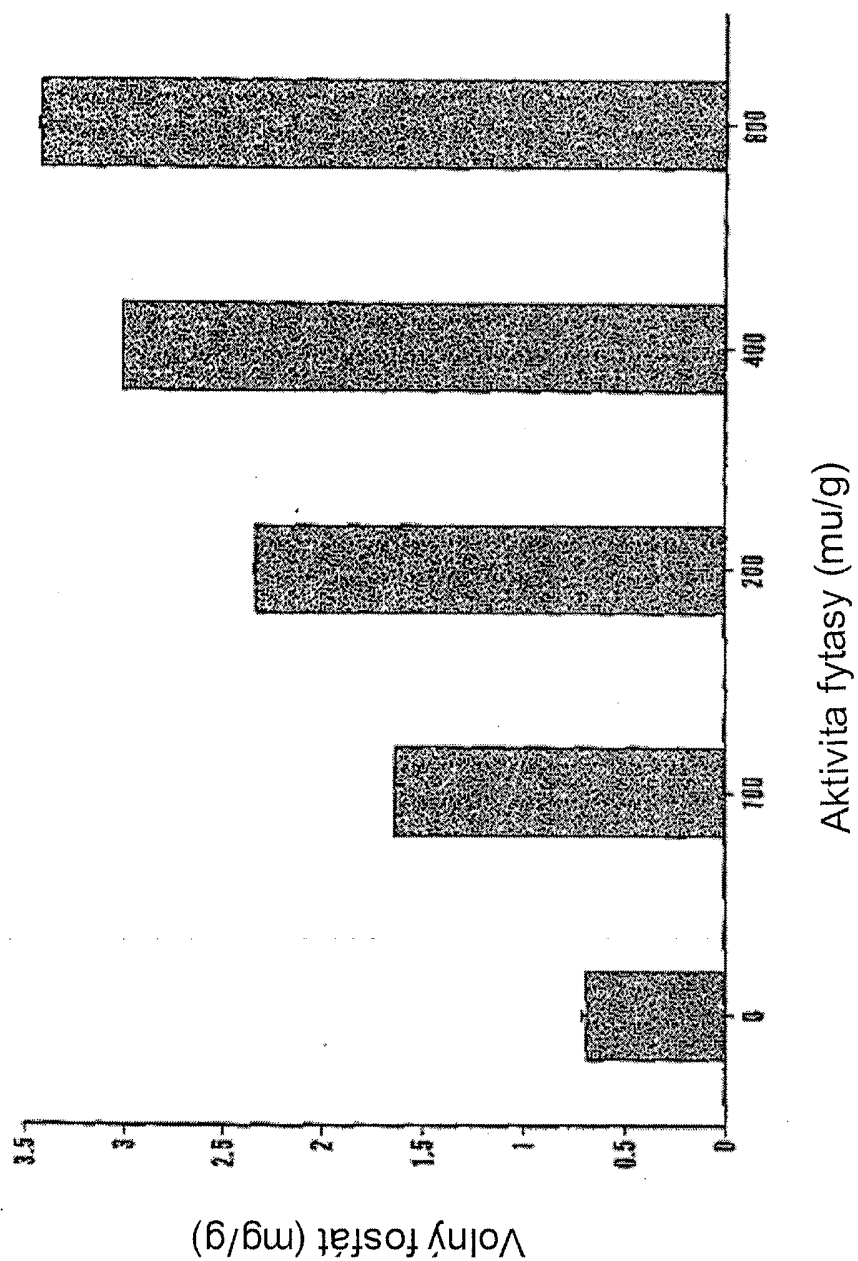


Obr.15

14.01.02

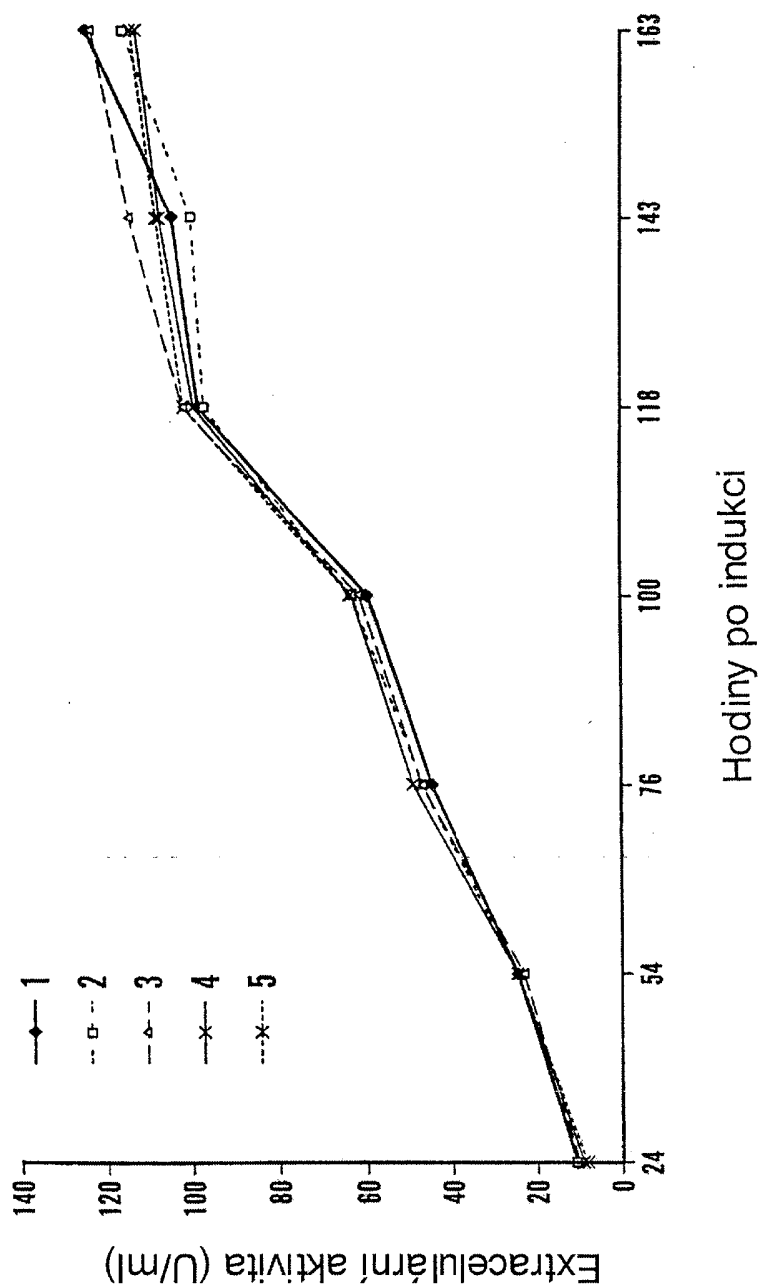


Obr.16



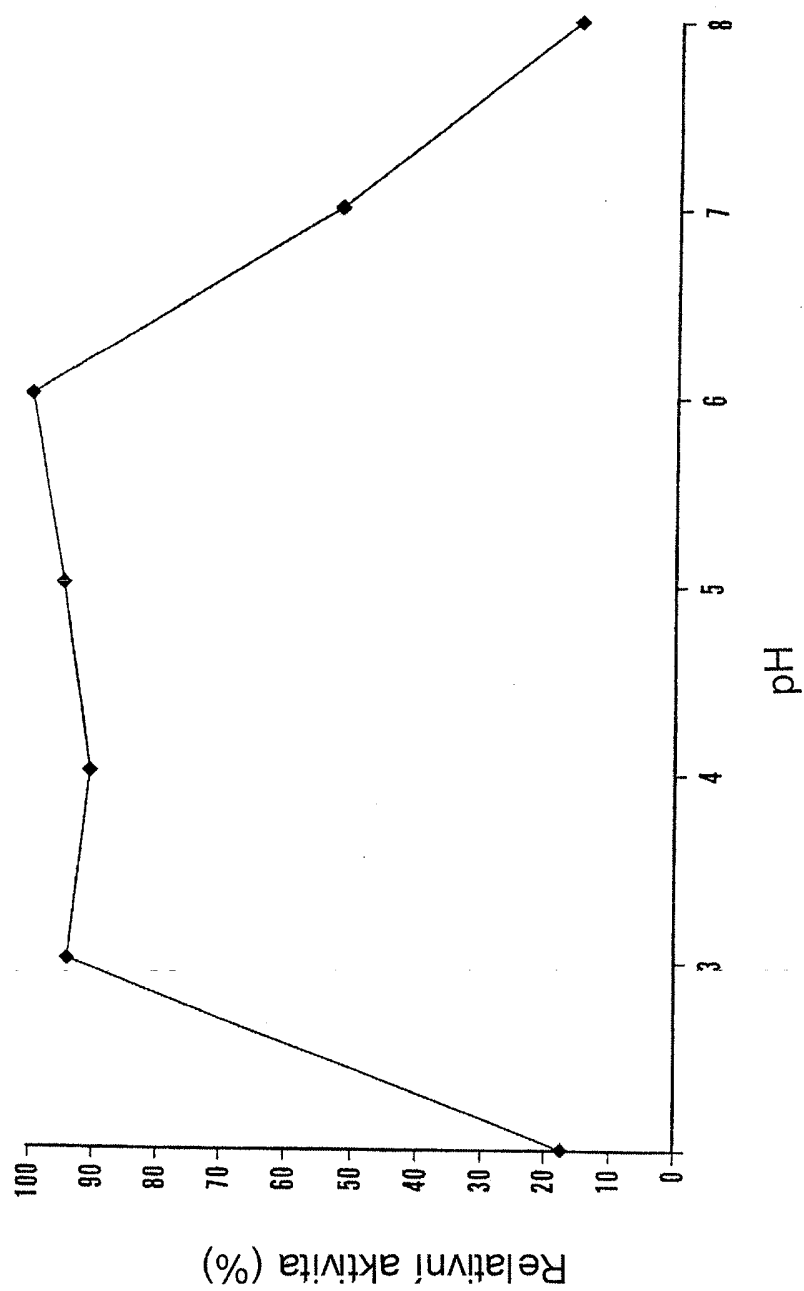
Obr.17

Časová závislost pěti transformantů obsahujících fytasu z E.coli



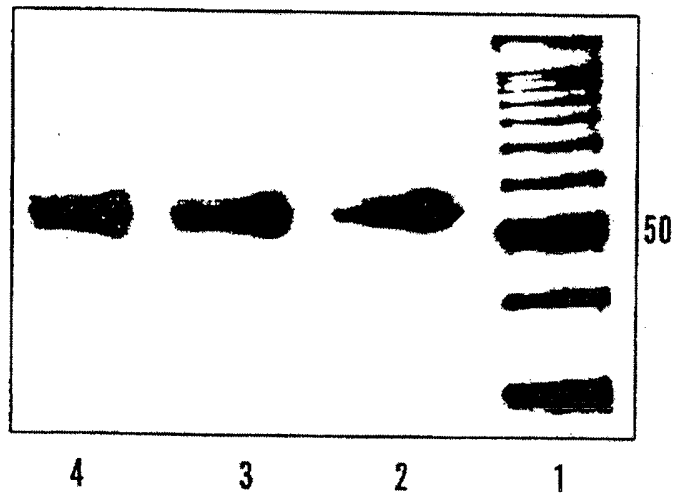
Obr.18

Optimální pH pufru pro expresi



Obr.19

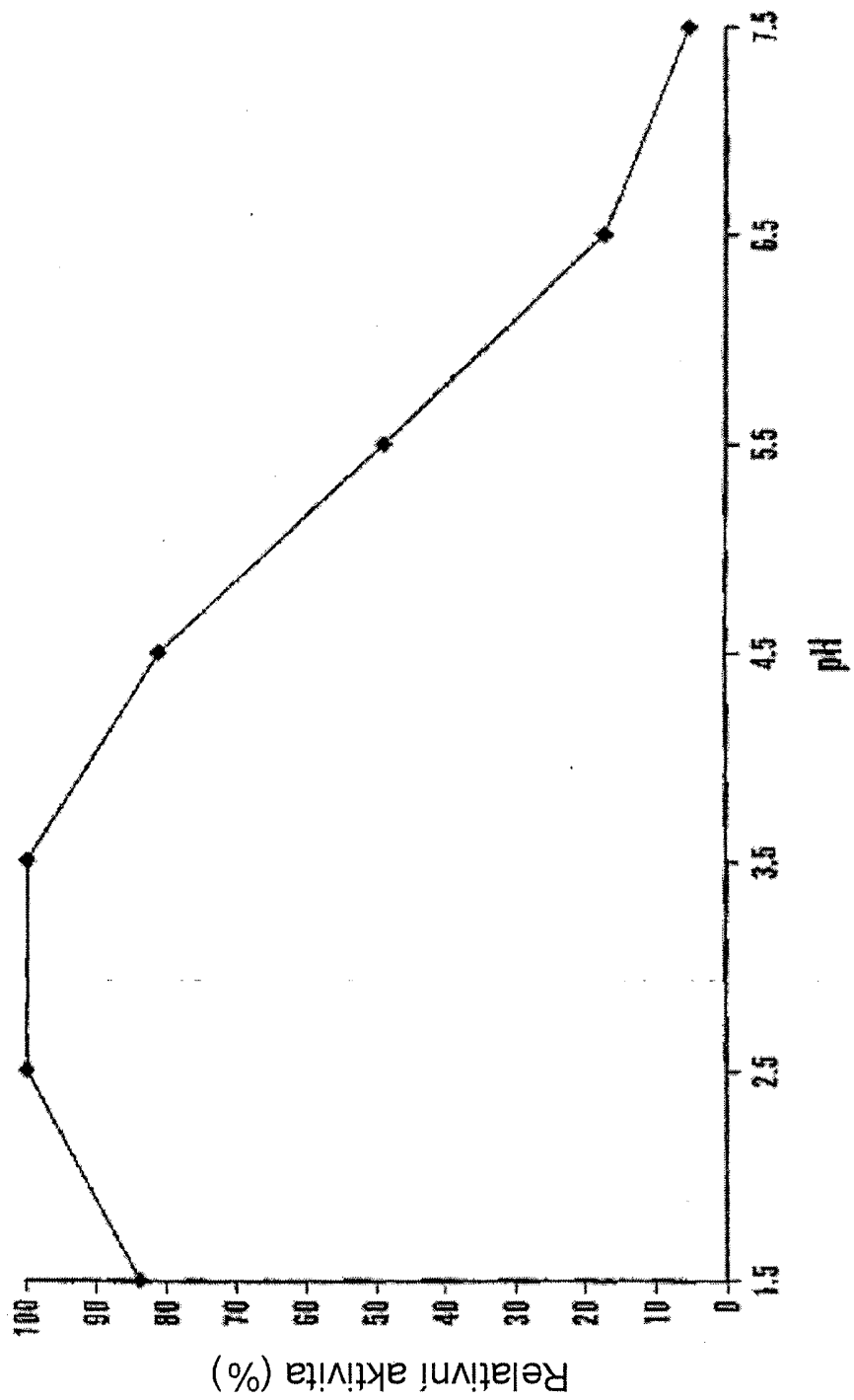
14-0102



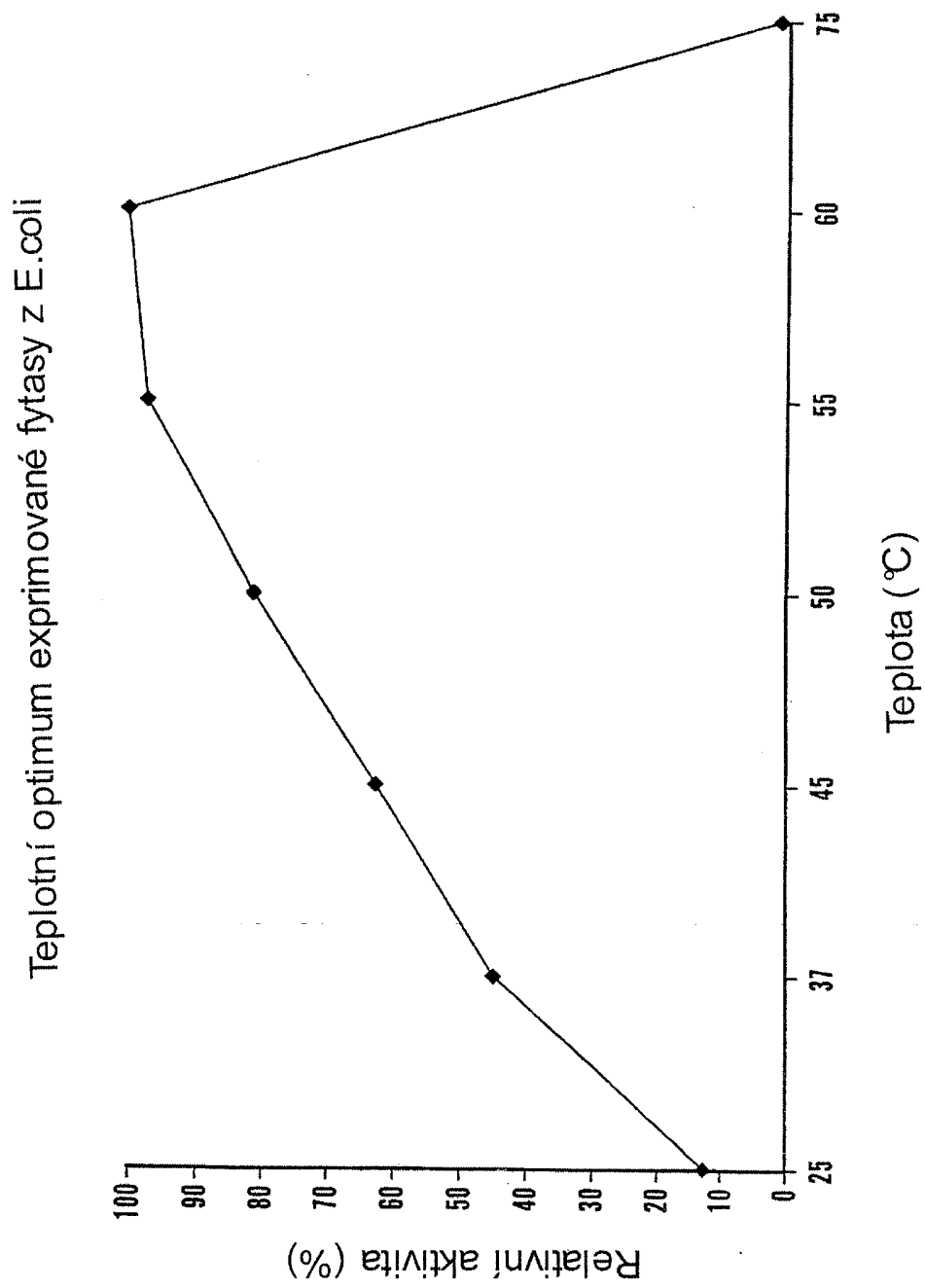
Obr. 20

14.01.02

pH optimum exprimované fytasy z *E. coli*

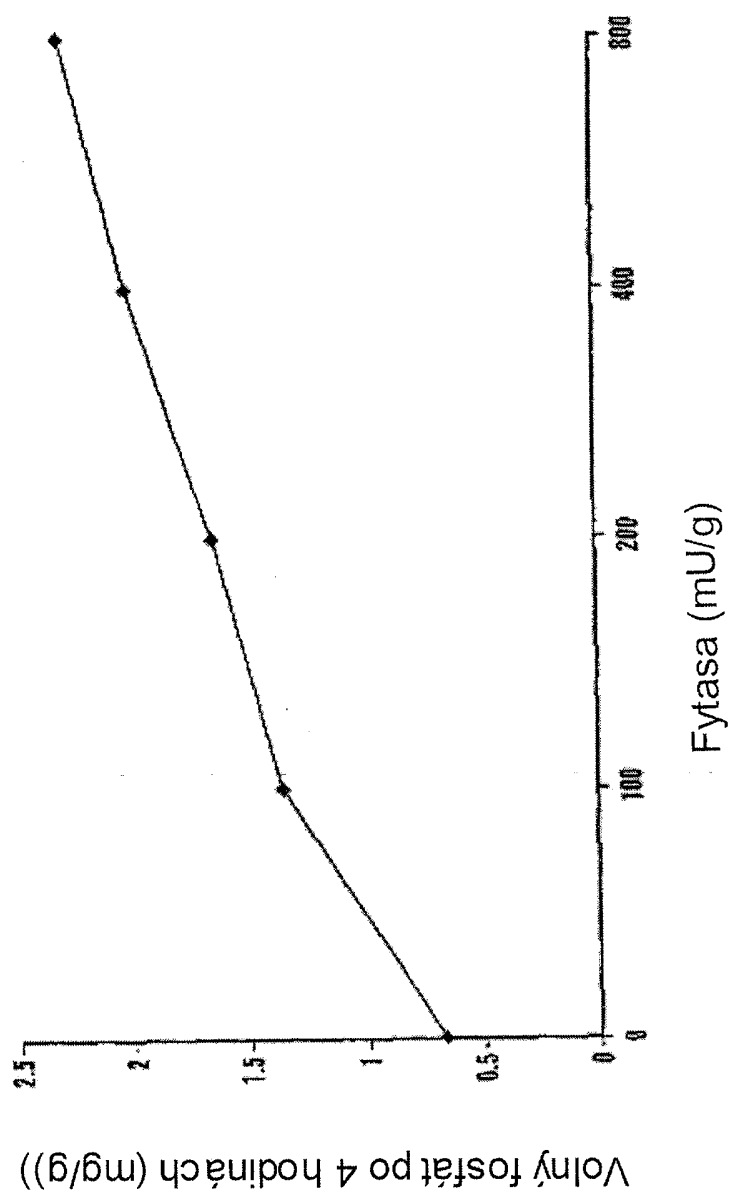


Obr.21



Obr.22

Volný fosfát uvolněný expresní fytasou z *E.coli*



Obr.23