

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092569** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.07.08

(51) Int. Cl. *C12N 9/16* (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.30

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ФИТАЗЫ**

(31) **201810540167.5**

(32) **2018.05.30**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2019/089212**

(87) **WO 2019/228441 2019.12.05**

(71) Заявитель:

**НАНЬЦЗИН БЕСТЗАЙМ БИО-
ЭНЖИНИРИНГ КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

Бай Айсн, Ли Фэн (CN)

(74) Представитель:

**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)**

(57) Настоящее изобретение раскрывает термостабильную фитазу, полученную путем введения по меньшей мере одной дисульфидной связи в последовательность аминокислот фитазы *Escherichia coli* (кишечной палочки) дикого либо мутированного типа, в результате чего улучшаются характеристики фитазы, в частности ее термостабильность, стабильность при выпаривании и гранулировании по сравнению с существующей фитазой дикого либо мутированного типа; ее термостабильность значительно превышает в том числе и термостабильность существующих на сегодняшний день модифицированных образцов с введенной дисульфидной связью.

A1

202092569

202092569

A1

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ФИТАЗЫ

Область техники

Настоящее изобретение относится к отрасли белковой инженерии, а именно к фитазе грамотрицательных бактерий, в частности к фитазе кишечной палочки, термостабильность которой повышается после введения одной либо нескольких дисульфидных связей.

Предыдущий уровень техники

Фитаза (Phytase), или мио-инозитол-гексафосфат-фосфогидролаза (myo-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolase), относится к ортофосфорной-моноэфир фосфогидролазе, катализирует гидролиз фитиновой кислоты с образованием менее фосфорилированных производных инозитола и неорганического фосфата, в некоторых случаях может гидролизировать фитиновую кислоту до свободного инозитола. Фитиновая кислота в наибольших количествах присутствует в семенах зерновых культур, бобовых и маслосемян, где ее содержание может достигать 1-3%, что составляет 60-80% от общего количества фосфора растения, однако содержащийся в фитиновой кислоте фосфор не может усваиваться напрямую, требуя предварительного гидролиза в желудочно-кишечном тракте для высвобождения неорганического фосфата. Исследования показали, что моногастричные животные (свиньи, курицы, утки, гуси и пр.) ввиду недостатка фитазы очень слабо усваивают содержащийся в фитиновой кислоте фосфор. В то же время мощная электроотрицательность фитиновой кислоты приводит к тому, что ее соединение с двухвалентными или трехвалентными катионами, такими как Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2++} и пр., образует нерастворимые соли, препятствующие усвоению минеральных веществ в тонкой кишке. Помимо этого, с белками, аминокислотами и жирными кислотами она образует комплексные соединения, оказывающие влияние на их усвоение, а ее комплексные соединения с пепсином, химотрипсином и трипсином снижают активность пищеварительных ферментов. Таким образом, добавление фитазы в корма для моногастричных животных способно повысить усваиваемость содержащегося в кормах фосфора, понизить содержание фосфора в экскрементах животных, а также повысить усвоение белков и энергетической ценности кормов.

Фитаза выступает в качестве добавки для кормов, предварительно добавляется в кормовое сырье, проходит высокотемпературную обработку (70-95°, время обработки 30-120 секунд), после чего полученный корм используется для кормления животных. В связи с этим для повышения эффективности фитазы необходимо повысить ее устойчивость к

относительно высоким температурам, другими словами, добиться ее высокой термостабильности. Главными источниками фитазы для коммерческого использования являются аспергилл черный (*Aspergillus niger*, согласно описанию US5436156), кишечная палочка (*Escherichia coli*, согласно описанию US7432098), цитробактер (*Citrobacter braakii*, согласно описанию US20100261259), бруцелла (*Buttiauxella sp.*, согласно описанию US8143046) и пр. Ввиду того, что данные фитазы происходят из разных источников, они обладают различными характеристиками устойчивости к температуре и кислоте. Нильсон (Nielsen) и др. провели сравнение характеристик фитаз для коммерческого использования (J Agric Food Chem. 2015, 63 (3): 943-50), по результатам которого наилучшие характеристики продемонстрировала фитаза, полученная из кишечной палочки. Описанный в тексте продукт фитазы кишечной палочки является мутантным, модифицированным с помощью белковой инженерии, и обладает более высокой термостабильностью. US8540984, US9765313, US7432098 и US8877478 описывают мутантную фитазу с улучшенной термостабильностью, полученную в результате отбора после случайного или сайт-специфического мутагенеза фитазы кишечной палочки, а в заявках на патенты US20130017185 и US20170240872 упоминается возможность повышения термостабильности фитазы путем введения в третичную структуру белка фитазы кишечной палочки определенных дисульфидных связей.

В данной отрасли есть необходимость представить больше типов термостабильной фитазы.

Содержание изобретения

Автор настоящего изобретения обнаружил, что достичь цели по улучшению термостабильности фитазы можно путем введения одной или нескольких дисульфидных связей в определенные положения последовательности аминокислот фитазы кишечной палочки дикого типа (например, фитазы, последовательность которой более чем на 85% идентична последовательности фитазы кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1) или мутантной фитазы кишечной палочки (например, фитазы, последовательность которой более чем на 75% идентична последовательности мутантной фитазы кишечной палочки, описанной в SEQ ID NO:2).

В некоторых вариантах осуществления в определенные положения последовательности аминокислот мутантной фитазы кишечной палочки, последовательность которой более чем на 85% идентична фитазе кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1, вводится одна или несколько дисульфидных связей, представленных в Таблице 1. В некоторых предпочтительных вариантах

осуществления в определенные положения последовательности аминокислот фитазы кишечной палочки, последовательность которой более чем на 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% либо 99% идентична фитазе кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1, вводится одна или несколько дисульфидных связей, представленных в Таблице 1.

В других вариантах осуществления в определенные положения последовательности аминокислот мутантной фитазы кишечной палочки, последовательность которой более чем на 75% идентична фитазе кишечной палочки мутированного типа, описанной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:79 либо SEQ ID NO:99, вводится одна или несколько дисульфидных связей, представленных в Таблице 1. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления в определенные положения последовательности аминокислот мутантной фитазы кишечной палочки, последовательность которой более чем на 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична фитазе кишечной палочки мутированного типа, описанной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:79 либо SEQ ID NO:99, вводится одна или несколько дисульфидных связей, представленных в Таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет мутации, по меньшей мере, в одном из положений по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1, : 1, 25, 30, 36, 37, 38, 39, 46, 55, 60, 62, 65, 69, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 85, 101, 108, 109, 111, 114, 116, 118, 120, 123, 126, 127, 133, 137, 138, 139, 141, 142, 146, 151, 157, 159, 161, 173, 176, 178, 180, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 204, 211, 233, 235, 245, 253, 255, 267, 276, 282, 283, 284, 286, 287, 288, 291, 295, 297, 311, 315, 317, 318, 327, 341, 354, 363, 367, 369, 370, 380, 382, 383, 385, 391, 402, 408. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет мутации, по меньшей мере, в одном из положений по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: 25, 46, 62, 70, 73, 74, 75, 76, 114, 137, 142, 146, 159, 173, 204, 255, 282, 283, 284. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет мутации, по меньшей мере, в одном из положений по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: 25, 46, 62, 70, 73, 74, 75, 76, 114, 137, 142, 146, 159, 173, 204, 255.

В некоторых конкретных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет мутации в следующих положениях по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: 46, 62,

73, 75, 146, 159, 204, 255. В некоторых других конкретных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет мутации в следующих положениях по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: 25, 46, 62, 70, 73, 75, 114, 137, 142, 146, 159, 255. В некоторых конкретных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет мутации в следующих положениях по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1,,: 46, 62, 70, 73, 74, 75, 76, 146, 159, 173, , 255, 282, 283, 284. В некоторых других конкретных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет мутации в следующих положениях по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: 25, 46, 62, 70, 73, 74, 75, 114, 137, 142, 146, 159, 173, 255, 282, 283, 284.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет, по меньшей мере, одну из следующих модификаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: Q1S, Q1V, Q1N, A25F, Q30K, A36K, W37F, P38Y, T39D, W46E, I55V, H60S, H60Q, Q62W, R65H, D69N, G70E, A73P, A73D, A73E, K74D, K74P, K74L, K74N, K75C, K75Q, G76T, C77A, Q79L, Q79R, Q79A, Q79G, Q79F, S80P, I85V, A101L, C108A, A109D, A109E, A109G, A109F, A109P, THIS, T111D, T111Q, T114H, T116A, T118R, T118S, S120R, P123E, N126Y, P127V, P127L, C133A, N137V, N137E, N137S, N137P, A138V, A138H, A138D, A138P, N139P, N139A, N139H, T141R, T141E, T141G, T141A, D142R, S146E, S146R, S151P, G157R, G157Q, G157N, G157L, G157A, R159Y, T161P, P173Y, P173S, N176P, N176K, C178A, K183R, Q184S, D185N, D185L, E186V, E186A, S187P, C188A, S189T, N204C, V211W, G233E, G235Y, T245E, Q253V, Y255D, R267A, H282N, P283G, P284T, K286F, Q287Y, A288E, A288R, A288V, V291I, T295I, V297T, G311S, E315G, E315S, N317L, W318Y, T327Y, L341Y, L341V, F354Y, K363A, K363L, S367F, N369P, T370P, A380P, A380R, A380T, C382A, E383S, R385S, R385V, R385T, C391A, E402R, E402T, E402D, E402P, E402N, C408A. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет, по меньшей мере, одну из следующих модификаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75C, K75Q, G76T, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, P173S, N204C, Y255D, H282N, P283G, P284T. В некоторых еще более предпочтительных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет, по меньшей мере, одну из следующих модификаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого

типа, описанной в SEQ ID NO:1: A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75C, K75Q, G76T, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, P173S, N204C, Y255D.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет, по меньшей мере, одну из следующих модификаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: W46E, Q62W, A73P, K75C, S146E, R159Y, N204C, Y255D. В некоторых других вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет, по меньшей мере, одну из следующих модификаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K75C, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, Y255D. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет, по меньшей мере, одну из следующих модификаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, G76T, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T. В некоторых других вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет, по меньшей мере, одну из следующих модификаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T.

В некоторых конкретных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет следующие модификации по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: W46E, Q62W, A73P, K75C, S146E, R159Y, N204C, Y255D. В некоторых других конкретных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет следующие модификации по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K75C, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, Y255D. В некоторых конкретных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет следующие модификации по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, G76T, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T. В некоторых других конкретных вариантах осуществления вышеуказанная фитаза кишечной палочки мутированного типа имеет следующие модификации по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1: A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T.

Говоря конкретно, автор настоящего изобретения обнаружил, что введение в

последовательность фитазы кишечной палочки дикого типа, описанной в SEQ ID NO:1, или последовательность фитаз кишечной палочки мутированных типов, описанных в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:79 либо SEQ ID NO:99, одной или нескольких дисульфидных связей, представленных в таблице 1, позволяет повысить ее термостабильность.

Таблица 1. Наименования и положения дисульфидных связей (нумерация положений аминокислот приведена в соответствии с нумерацией положений аминокислот SEQ ID NO:1)

Наименование	Положение
A	P34/Q174
B	A56/G103
C	Y57/L366
D	Y61/L366
E	Q82/S296
F	L128/D203
G	V140/E262
H	T156/T191
I	E165/T245
J	T191/A210
K	S196/V211
L	A264/G312
M	E315/A380
N	G322/T356
O	Q346/L393
P	Q349/M390

В некоторых вариантах осуществления вводимые в фитазу кишечной палочки дикого либо мутированного типов одна либо несколько дисульфидных связей должны выбираться, по меньшей мере, из одного из вышеуказанных (A), (B), (C), (D), (E), (J), (M) или (O), при этом (C) и (D) не должны выполняться одновременно.

В некоторых вариантах осуществления вводимая в фитазу кишечной палочки дикого либо мутированного типов одна дисульфидная связь должна выбираться из вышеуказанных (A), (B), (C), (D), (E), (J), (M) или (O).

В некоторых вариантах осуществления при введении в фитазу кишечной палочки дикого либо мутированного типов одновременно нескольких дисульфидных связей предпочтительно одновременное введение дисульфидных связей, указанных в (B)+(O),

(C)+(O), (M)+(O), (B)+(D)+(O) или (D)+(M)+(O); еще более предпочтительно одновременное введение дисульфидных связей, указанных в (B)+(O) или (C)+(O).

Для целей настоящего изобретения понятие «введение» дисульфидных связей никоим образом не ограничивает способ их образования. К примеру, под «введением» дисульфидных связей может подразумеваться замена аминокислотных остатков в соответствующих положениях в последовательности фитазы, куда вводятся дисульфидные связи, на аминокислотные остатки, способные образовать дисульфидные связи (включая, к примеру, цистеиновые остатки Cys, гомоцистеиновые остатки Hcy и пр.); либо введение в соответствующем положении аминокислотных остатков, способных образовывать дисульфидные связи. Такая замена и/или введение может производиться, к примеру, общеизвестным в данной области методом сайт-направленного мутагенеза. Термин «введение» также включает образование вышеуказанных дисульфидных связей в результате естественной мутации одного либо нескольких аминокислотных остатков.

Для получения таких рекомбинантных мутантных образцов в качестве организма-носителя для экспрессии могут применяться бактерии, такие как кишечная палочка (*Escherichia coli*), грибы, такие как дрожжи (дрожжи Пихия (*Pichia pastoris*), Схизосахаромицеты (*Schizosaccharomyces pombe*) и пр.), мицелиальные грибы (такие как аспергилл черный (*Aspergillus niger*), *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* и пр.), а также растения (такие как кукуруза, соевые бобы, пшеница и пр.).

Экспрессия и получение вышеописанных мутантных образцов могут быть реализованы уже известными техническими методами. В журнале «*Applied and Environmental Microbiology*» (2004, 3041-3046) описана экспрессия фитазы кишечной палочки и ее мутантного образца в кишечной палочке, в журнале «*Journal of Biotechnology*» 175 (2014, 1-6) описана экспрессия фитазы кишечной палочки и ее мутантного образца в дрожжах Пихия, в патенте CN107353327 описана экспрессия фитазы и ее мутантного образца в аспергилле черном.

Для получения вышеописанных мутаций возможно применение общепринятого сайт-направленного мутагенеза к нуклеотидной последовательности образца дикого типа, также допустим синтез генов *de novo*. Активаторы и терминаторы вводятся в клетку организма-носителя, при благоприятных условиях культивирования происходит экспрессия. Вышеописанный метод является распространенным в данной области.

Под «фитазой дикого типа» понимается микроорганизм, существующий в естественных условиях, например, обнаруженная в естественной среде фитаза, экспрессирующая в клетке кишечной палочки.

Под «мутантной» либо «мутированного типа» - понимается мутация одного или

многих (нескольких) аминокислотных остатков с ферментативной активностью фитазы в одном или многих (нескольких) положениях, то есть замены, инерции и/или делеции полипептида. Под заменой подразумевается использование вместо одной аминокислоты в определенном положении другой аминокислоты; под делецией подразумевается исключение аминокислоты в определенном положении; под инерцией подразумевается добавление 1-5 аминокислот в соседнее положение к аминокислоте в определенном положении. Мутация фитазы дикого типа также подразумевает замену, инерцию либо делецию аминокислоты, по меньшей мере, в одном положении, предпочтительно произведение замены аминокислоты, по меньшей мере, в одном положении, как например, A25F, замена аланина в положении 25 фитазы дикого типа на фенилаланин.

Под «(B)+(O)», «B+O» либо «п. (B) + п. (O)» понимается модификация фитазы дикого либо мутированного типа путем введения двух дисульфидных связей, а именно образование одной дисульфидной связи между двумя положениями, описанными в пункте (B), и второй – между двумя положениями, описанными в пункте (O). Аналогичную интерпретацию имеет описание в изобретении пунктов со знаком «+»: п. (C) + п. (O), п. (M) + п. (O), п. (B) + п. (D) + п. (O) и п. (D) + п. (M) + п. (O).

Под определением «идентичность последовательности» подразумевается сравнение последовательностей и, в случае необходимости, восполнение недостающей последовательности с целью достижения максимального процента совпадения последовательностей при условии, что никакие консервативные замены не рассматриваются в качестве совпадающей части последовательности, и процентное соотношение аминокислотных остатков в полученной последовательности совпадает с аминокислотным остатком определенной пептидной или полипептидной последовательности. Сравнение последовательностей и измерение процентного совпадения аминокислотных последовательностей могут осуществляться множеством способов в пределах данной технической области, к примеру, с помощью общедоступных программных продуктов BLAST, BLAST-2, ALIGN либо Megalign (DNASTAR). Технический персонал данной области может определить подходящие параметры измеряемых соотношений, в том числе любые алгоритмы расчетов, необходимые для получения максимального процентного соотношения всей длины сравниваемых последовательностей.

Основываясь на данном открытии, настоящая заявка предлагает следующие технические решения.

1. Термостабильная фитаза, отличающаяся тем, что в последовательность аминокислот фитазы *Escherichia coli* (кишечной палочки) дикого либо мутированного

типа вводится, по меньшей мере, одна введенная дисульфидная связь; последовательность аминокислот фитазы кишечной палочки дикого типа представлена в SEQ ID NO:1; фитаза кишечной палочки мутированного типа содержит мутацию, по меньшей мере, в одном положении по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1; при этом, введенная дисульфидная связь выбрана из следующих:

(A) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 34 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 174 в SEQ ID NO:1;

(B) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 56 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 103 в SEQ ID NO:1;

(C) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 57 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 366 в SEQ ID NO:1;

(D) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 61 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 366 в SEQ ID NO:1;

(E) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 82 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 296 в SEQ ID NO:1;

(F) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 128 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 203 в SEQ ID NO:1;

(G) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 140 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 262 в SEQ ID NO:1;

(H) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 156 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 191 в SEQ ID NO:1;

(I) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 165 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 245 в SEQ ID NO:1;

(J) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 191 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 210 в SEQ ID NO:1;

(K) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 196 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 211 в SEQ ID NO:1;

(L) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 264 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 312 в SEQ ID NO:1;

(M) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 315 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 380 в SEQ ID NO:1;

(N) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 322 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 356 в SEQ ID NO:1;

(O) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 346 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 393 в SEQ ID NO:1;

(P) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 349 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 390 в SEQ ID NO:1;

при условии, что:

пункты (C) и (D) не выполняются одновременно;

пункты (H) и (J) не выполняются одновременно.

2. Термостабильная фитаза по п.1, при этом фитаза кишечной палочки мутированного типа содержит мутацию, по меньшей мере, в одном из следующих положений по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1: 1, 25, 30, 36, 37, 38, 39, 46, 55, 60, 62, 65, 69, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 85, 101, 108, 109, 111, 114, 116, 118, 120, 123, 126, 127, 133, 137, 138, 139, 141, 142, 146, 151, 157, 159, 161, 173, 176, 178, 180, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 204, 211, 233, 235, 245, 253, 255, 267, 276, 282, 283, 284, 286, 287, 288, 291, 295, 297, 311, 315, 317, 318, 327, 341, 354, 363, 367, 369, 370, 380, 382, 383, 385, 391, 402, 408.

3. Термостабильная фитаза по п.2, при этом фитаза кишечной палочки мутированного типа содержит, по меньшей мере, одну из следующих мутаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1: Q1S, Q1V, Q1N, A25F, Q30K, A36K, W37F, P38Y, T39D, W46E, I55V, H60S, H60Q, Q62W, R65H, D69N, G70E, A73P, A73D, A73E, K74D, K74P, K74L, K74N, K75C, K75Q, G76T, C77A, Q79L, Q79R, Q79A, Q79G, Q79F, S80P, I85V, A101L, C108A, A109D, A109E,

A109G, A109F, A109P, THIS, T111D, T111Q, T114H, T116A, T118R, T118S, S120R, P123E, N126Y, P127V, P127L, C133A, N137V, N137E, N137S, N137P, A138V, A138H, A138D, A138P, N139P, N139A, N139H, T141R, T141E, T141G, T141A, D142R, S146E, S146R, S151P, G157R, G157Q, G157N, G157L, G157A, R159Y, T161P, P173Y, P173S, N176P, N176K, C178A, K183R, Q184S, D185N, D185L, E186V, E186A, S187P, C188A, S189T, N204C, V211W, G233E, G235Y, T245E, Q253V, Y255D, R267A, H282N, P283G, P284T, K286F, Q287Y, A288E, A288R, A288V, V291I, T295I, V297T, G311S, E315G, E315S, N317L, W318Y, T327Y, L341Y, L341V, F354Y, K363A, K363L, S367F, N369P, T370P, A380P, A380R, A380T, C382A, E383S, R385S, R385V, R385T, C391A, E402R, E402T, E402D, E402P, E402N, C408A.

4. Термостабильная фитаза по п.3, при этом фитаза кишечной палочки мутированного типа содержит любую из следующих комбинаций мутаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1:

W46E, Q62W, A73P, K75C, S146E, R159Y, N204C, Y255D;

A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K75C, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, Y255D;

W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, G76T, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T; и

A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T.

5. Термостабильная фитаза по п. 4, при этом фитаза кишечной палочки мутированного типа содержит любую из следующих комбинаций мутаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1:

W46E, Q62W, A73P, K75C, S146E, R159Y, N204C, Y255D;

A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K75C, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, Y255D; и W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, G76T, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T.

6. Термостабильная фитаза по п. 3, при этом последовательность аминокислот фитазы кишечной палочки мутированного типа представлена в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:79 либо SEQ ID NO:99.

7. Термостабильная фитаза по любому из пп.1-6, при этом дисульфидная связь выбрана, по меньшей мере, из одной из (A), (B), (C), (D), (E), (J), (M) либо (O), при условии, что (C) и (D) не выполняются одновременно.

8. Термостабильная фитаза по п. 7, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет не менее чем двум или трем из следующих пунктов: (A), (B), (C), (D), (E),

(J), (M) и (O), при условии, что (C) и (D) не выполняются одновременно.

9. Термостабильная фитаза по п. 7, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (A), (B), (C), (E), (J) или (M).

10. Термостабильная фитаза по п. 7, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет, по меньшей мере, пункту (D) или пункту (O).

11. Термостабильная фитаза по п. 10, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет пункту (D).

12. Термостабильная фитаза по п. 10, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет пункту (O).

13. Термостабильная фитаза по п. 7, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (B) и (O); (C) и (O); (D) и (O); (M) и (O); (B), (D) и (O); или (D), (M) и (O).

14. Термостабильная фитаза по п. 13, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (B) и (O).

15. Термостабильная фитаза по п. 13, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (C) и (O).

16. Термостабильная фитаза по п. 13, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (M) и (O).

17. Термостабильная фитаза по п. 13, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (B), (D) и (O).

18. Термостабильная фитаза по п. 13, при этом последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (D), (M) и (O).

19. Термостабильная фитаза по любому из пп. 1-18,, содержащая, по меньшей мере, одну введенную дисульфидную связь, при этом дисульфидная связь выбрана из следующих:

(i) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 31 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 176 в SEQ ID NO:1;

(ii) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 31 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 177 в SEQ ID NO:1;

(iii) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 52 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 99 в SEQ ID NO:1;

(iv) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком,

соответствующим положению 59 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 100 в SEQ ID NO:1;

(v) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 91 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 46 в SEQ ID NO:1;

(vi) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 141 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 200 в SEQ ID NO:1;

(vii) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 162 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 248 в SEQ ID NO:1;

(viii) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 205 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 257 в SEQ ID NO:1;

при условии, что пункты (i) и (ii) не выполняются одновременно.

20. Термостабильная фитаза по п.1, при этом термостабильная фитаза включает любую из следующих аминокислотных последовательностей: SEQ ID NOs:4-40, SEQ ID NOs:80-88 и SEQ ID NOs:100-108.

21. Термостабильная фитаза по любому из предыдущих пунктов, при этом термостабильная фитаза получена из дрожжей *Pichia* (Pichia) либо аспергилла черного (*Aspergillus niger*) посредством гетерологической экспрессии.

22. Термостабильная фитаза по любому из предыдущих пунктов, при этом аминокислотные остатки, способные к формированию дисульфидных связей, являются цистеиновыми либо гомоцистеиновыми остатками.

23. Полинуклеотид, кодирующий термостабильную фитазу по любому из пп. 1-22.

24. Полинуклеотид по п. 23, кодирующая последовательность которого кодон-оптимизирована для экспрессии в дрожжах *Pichia* либо аспергилле черном.

25. Полинуклеотид по п. 23, включающий любую из следующих нуклеотидных последовательностей: SEQ ID NOs:41-77, SEQ ID NOs:90-98 и SEQ ID NOs:110-118.

26. Клетка организма-носителя, включающая полинуклеотид по любому из пп. 23-25 .

27. Клетка организма-носителя по п. 26, при этом данная клетка организма-носителя является грибковой, бактериальной либо растительной клеткой.

28. Клетка организма-носителя по п. 27, при этом данная клетка является дрожжевой клеткой либо клеткой мицелиальных грибов.

29. Клетка организма-носителя по п.28, при этом данная клетка является клеткой дрожжей *Пихия* либо *аспергила* черного.

30. Способ повышения термостабильности фитазы, включающий модификацию последовательности аминокислот либо кодирующей нуклеотидной последовательности в интересующей фитазе, в результате чего из выбранной последовательности аминокислот фитазы, по меньшей мере, в одном из следующих пунктов (A)-(P) может образоваться дисульфидная связь между аминокислотными остатками в двух положениях:

(A) положение, соответствующее положению 34 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 174 в SEQ ID NO:1;

(B) положение, соответствующее положению 56 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 103 в SEQ ID NO:1;

(C) положение, соответствующее положению 57 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 366 в SEQ ID NO:1;

(D) положение, соответствующее положению 61 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 366 в SEQ ID NO:1;

(E) положение, соответствующее положению 82 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 296 в SEQ ID NO:1;

(F) положение, соответствующее положению 128 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 203 в SEQ ID NO:1;

(G) положение, соответствующее положению 140 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 262 в SEQ ID NO:1;

(H) положение, соответствующее положению 156 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 191 в SEQ ID NO:1;

(I) положение, соответствующее положению 165 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 245 в SEQ ID NO:1;

(J) положение, соответствующее положению 191 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 210 в SEQ ID NO:1;

(K) положение, соответствующее положению 196 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 211 в SEQ ID NO:1;

(L) положение, соответствующее положению 264 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 312 в SEQ ID NO:1;

(M) положение, соответствующее положению 315 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 380 в SEQ ID NO:1;

(N) положение, соответствующее положению 322 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 356 в SEQ ID NO:1;

(O) положение, соответствующее положению 346 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 393 в SEQ ID NO:1;

(P) положение, соответствующее положению 349 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 390 в SEQ ID NO:1;

при условии, что:

пункты (C) и (D) не выбираются одновременно;

пункты (H) и (J) не выбираются одновременно.

31. Способ по п. 30, при этом модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в интересующей фитазе, по меньшей мере, в одном из пунктов (A), (B), (C), (D), (E), (J), (M) или (O) может образоваться дисульфидная связь между аминокислотными остатками в двух положениях, при условии что (C) и (D) не выбираются одновременно.

32. Способ по п. 31, при этом модификация приводит к тому, что из выбранных из последовательности аминокислот в более двух, трех пунктах из: (A), (B), (C), (D), (E), (J), (M) и (O), может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях, при условии что (C) и (D) не выбираются одновременно.

33. Способ по п. 31, при этом модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (A), (B), (C), (E), (J) или (M) может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

34. Способ по п. 31, при этом модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот, по меньшей мере, в (D) или (O) может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

35. Способ по п. 34, при этом модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (D) может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

36. Способ по п. 34, при этом модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (O) может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

37. Способ по п. 31, при этом модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (B) и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

38. Способ по п. 31, при этом модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (C) и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

39. Способ по п. 31, при этом модификация приводит к тому, что из

последовательности аминокислот в (M) и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

40. Способ по п.31, при этом модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (B), (D)и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

41. Способ по п. 31, при этом модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (D), (M) и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

42. Способ по любому из пп. 30-41, при этом интересующая фитаза получена из кишечной палочки, а также имеет последовательность аминокислот, по меньшей мере, на 75% идентичную последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:79 либо SEQ ID NO:99.

43. Способ по п. 42, при этом интересующая фитаза является фитазой кишечной палочки дикого типа и предпочтительно имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:1.

44. Способ по п. 42, при этом интересующая фитаза является фитазой кишечной палочки мутированного типа и предпочтительно имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:79 либо SEQ ID NO:99.

45. Способ по любому из пп. 30-44, при этом модифицированная фитаза включает последовательность аминокислот, выбранную из следующих комбинаций, либо ее кодирующая нуклеиновая кислота включает код, выбранный из нуклеотидных последовательностей следующих последовательностей аминокислот: SEQ ID NOs:4-40, SEQ ID NOs:80-88 и SEQ ID NOs:100-108.

46. Способ по любому из пп. 30-45, при этом данный способ включает в себя получение фитазы с модифицированной последовательностью аминокислот, а также ее размещение в среде, допускающей образование дисульфидных связей.

47. Способ по п. 46, при этом получаемая фитаза с модифицированной последовательностью аминокислот включает экспрессию кодирующего данную фитазу полинуклеотида в клетке организма-носителя.

48. Способ по п. 47, при этом клетка организма-носителя является грибковой клеткой, предпочтительно дрожжевой клеткой либо клеткой мицелиальных грибов, наиболее предпочтительно клеткой дрожжей *Пихия* либо аспергилла черного.

Полезный эффект настоящего изобретения

Настоящее изобретение предлагает введение в фитазу либо ее мутантную форму

одной или нескольких дисульфидных связей, в частности нескольких дисульфидных связей одновременно.

Настоящее изобретение заключается в введении в фитазу дикого либо мутированного типа, по меньшей мере, одной дисульфидной связи, что приводит к повышению остаточной активности в 2-9 раз по сравнению с фитазой дикого типа. Таким образом, техническое решение настоящего изобретения позволяет повысить ферментативную активность фитазы, особенно в отношении термостабильности, стабильности при выпаривании и гранулировании, которые значительно превосходят характеристики существующих на сегодняшний день фитаз дикого либо мутированного типов; характеристика ее термостабильности значительно превышает в том числе и термостабильность существующих на сегодняшний день модифицированных образцов с введенной дисульфидной связью.

Описание изображений

Рис. 1 Плазмидный профиль pPIC9K-WT.

Рис. 2 Сравнение результатов измерения термостабильности образцов дикого типа и мутантного типа, модифицированного путем введения дисульфидной связи.

Рис. 3 Сравнение результатов измерения термостабильности образцов APPA-M1 и мутантного типа.

Рис. 4 Сравнение результатов измерения термостабильности образцов APPAan-WT и мутантного типа.

Рис.5 Сравнение результатов измерения термостабильности образцов APPA-M2 и мутантного типа.

Конкретные варианты осуществления

Вариант осуществления 1. Создание мутантной формы с введением дисульфидной связи, экспрессия в дрожжах *Pichia* образцов дикого и мутированного типов.

Имеется публикация 3D структуры фитазы кишечной палочки (см. Lim D et al, Nat Struct Biol. 2000, 7(2): 108-13). На основании 3D структуры, описанной в документе PDB ID 1DKO, проект предлагает введение следующих дисульфидных связей.

Наименование	Положение
A	R34C/Q174C
B	A56C/G103C
C	Y57C/L366C
D	Y61C/L366C

E	Q82C/S296C
F	L128C/D203C
G	V140C/E262C
H	T156C/T191C
I	E165C/T245C
J	T191C/A210C
K	S196C/V211C
L	A264C/G312C
M	E315C/A380C
N	G322C/T356C
O	Q346C/L393C
P	Q349C/M390C
Q	T33C/L170C
R	I55C/A99C
S	A268C/N309C
T	I85C/G97C
U	P123C/T130C
V	A226C/M360C
W	W243C/P324C
X	W347C/M390C
Y	I348C/F396C

Последовательность аминокислот в фитазе дикого типа представлена в SEQ ID NO:1, нуклеотидная последовательность экспрессии в дрожжах *Pichia* представлена в SEQ ID NO:78. В качестве вектора экспрессии выступает pPIC9K, в качестве сигнального пептида используется альфа-фактор *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессионная плазмида фитазы дикого типа pPIC9K-WT показана на рис. 1.

В целях создания указанных в приведенной выше таблице мутантных форм были по отдельности сконструированы праймеры для ПЦР, представленные в таблице ниже.

Наименование дисульфидной связи	Положение дисульфидной связи	Праймер
A	P34C/Q174C	A-F1 GATGTCACCTgtGACGCTTGGCCAACCTGGA- F2 AACTTCCCAtgtTCAAACCTTGTGCTTGAAG A-R1 CCAAGCGTCacaGGTGACATCTTGCATAAG A-R2 CAAGTTTGAacaTGGGAAGTTAAGAACTCT
B	A56C/G103C	B-F1 GAGCTCATTtgtTACTTGGGTCACTACCAA B-F2 TTCGCCGCctgtCTTGCTCCTGACTGTGCC B-R1 ACCCAAGTAacaAATGAGCTCACCACCTCT B-R2 AGGAGCAAGacaGGCGGCGAAGGCTTCACC
C	T57C/L366C	C-F1 CTCATTGCTtgtTTGGGTCACTACCAAAGAC- F2 AAGACTCCAtgtTCTTTGAACACGCCTCCA C-R1 GTGACCCAAacaAGCAATGAGCTCACCACC C-R2 GTTCAAAGAacaTGGAGTCTTGTCTCTCAT
D	T61C/L366C	D-F1 TTGGGTCACtgtCAAAGACAGCGTCTTGTT D-F2 AAGACTCCAtgtTCTTTGAACACGCCTCCA D-R1 CTGTCTttgacaGTGACCCAAGTAAGCAAT

		D-R2 GTTCAAAGAacaTGGAGTCTTGTCTCTCAT
E	Q82C/S296C	E-F1 CAATCTGGTtgtGTAGCTATTATTGCTGAC E-F2 TTGCCCACTtgtGTCTTGTTTCATTGCCGGT E-R1 AATAGCTACacaACCAGATTGTGGACAACC E-R2 GAACAAGACacaAGTGGGCAAGGTAACACC
F	L128C/D203C	F-F1 TTCAACCCTtgtAAGACTGGTGTTTGCCA F-F2 GTCTCCGCCtgtAACGTCTCTTTGACCGGT F-R1 ACCAGTCTTacaAGGGTTGAACAATGGATC F-R2 AGAGACGTTacaGGCGGAGACCTTCAACTC
G	V140C/E262C	G-F1 aacGCTAACTgtACTGACGCTATCTTGTC G-F2 AGAACTCCAtgtGTTGCTAGATCCAGAGCC G-R1 AGCGTCAGTacaGTTAGCGTTGTCCAATTG G-R2 TCTAGCAAcacATGGAGTTCTCTGCAGCAA
H	T156C/T191C	H-F1 GCTGACTTCtgtGGTCACAGACAGACTGCC H-F2 TGTTCCCTTgtCAAGCATTACCATCTGAGH- R1 tctGTGACCacaGAAGTCAGCAATGGATCC H-R2 TAATGCTTGacaCAAGGAACAGGATTCGTC
I	E165C/T245C	I-F1 GCCTTCAGAtgtTTGGAAAGAGTTCTTAAC I-F2 CAATGGAACtgtTTGTTGTCCTTGACACAAC I-R1 TCTTTCCAAacaTCTGAAGGCAGTCTGTCT I-R2 GGACAACAAacaGTTCCATTGGTGAGAGTC
J	T191C/A210C	J-F1 TGTTCCCTTgtCAAGCATTACCATCTGAG J-F2 TTGACCGGTtgtGTCAGCTTGGCTTCCATG J-R1 TAATGCTTGacaCAAGGAACAGGATTCGTC J-R2

		CAAGCTGACacaACCGGTCAAAGAGACGT
K	S196C/V211C	K-F1 GCATTACCA ^{tgt} GAGTTGAAGGTCTCCGCC K-F2 ACCGGTGCT ^{tgt} AGCTTGGCTTCCATGTTG K-R1 CTTCAACTCacaTGGTAATGCTTGAGTCAA K-R2 AGCCAAGCTacaAGCACCGGTCAAAGAGAC
L	A264C/G312C	L-F1 CCAGAGgTT ^{tgt} AGATCCAGAGCCACCCCA L-F2 AATCTCGGC ^{tgt} GCTTTGGAGTTGAACTGG L-R1 TCTGGATCTacaAAcCTCTGGAGTTCTCTG L-R2 CTCCAAAGCacaGCCGAGATTTGCCAAGTT
M	E315C/A380C	M-F1 GGTGCTTTG ^{tgt} TTGAACTGGACTCTTCCT M-F2 TTGACCTTG ^{tgt} GGATGTGAAGAGAGAAAT M-R1 CCAGTTCAAacaCAAAGCACCGCCGAGATT M-R2 TTCACATCCacaCAAGGTCAATTTGACTTC
N	G322C/T356C	N-F1 ACTCTTCCT ^{tgt} CAACCTGATAACACTCCA N-F2 GTCTTCCAA ^{tgt} TTGCAGCAGATGAGAGAC N-R1 ATCAGGTTGacaAGGAAGAGTCCAGTTCAA N-R2 CTGCTGCAAacaTTGGAAGACCAACGAAAC
O	Q346C/L393C	O-F1 GATAACTCT ^{tgt} TGGATTCAGGTTTCGTTG O-F2 ATGTGTTCC ^{tgt} GCTGGTTTCACTCAAATC O-R1 CTGAATCCAacaAGAGTTATCAGATAGTCT O-R2 GAAACCAGCacaGGAACACATACCCTGAGC
P	Q349C/M390C	P-F1 CAATGGATT ^{tgt} GTTTCGTTGGTCTTCCAA P-F2 GCTCAGGGT ^{tgt} TGTTCCCTTGGCTGGTTTC P-R1 CAACGAAACacaAATCCATTGAGAGTTATC P-R2 CAAGGAACAacaACCCTGAGCATTTCTCTC
Q	T33C/L170C	Q-F1 CAAGATGTc ^{tgt} CCAGACGCTTGGCCAACC Q-F2 GAAAGAGTT ^{tgt} AACTTCCCACAAtcaAAC

		Q-R1 AGCGTCTGGacaGACATCTTGCATAAGTTG Q-R2 TGGGAAGTTacaAACTCTTTCCA ACTCTCT
R	I55C/A99C	R-F1 GGTGAGCTCtgtGCTTACTTGGGTCACTAC R-F2 ACAGGTGAAtgtTTCGCCGCCGGTCTTGCT R-R1 CAAGTAAGCacaGAGCTCACCACTCTAGG R-R2 GGCGGCGAAacaTTCACCTGTCTTACGGGT
S	A268C/N309C	S-F1 AGATCCAGAtgtACCCCATTTGTTGGACTTG S-F2 AACTTGGCAtgtCTCGGCCGGTGCTTTGGAG S-R1 CAATGGGGTacaTCTGGATCTAGCAAcCTC S-R2 ACCGCCGAGacaTGCCAAGTTAGTATCGTG
T	I85C/G97C	T-F1 CAAGTAGCTtgtATTGCTGACGTCGACGAA T-F2 CGTAAGACAgtGAAGCCTTCGCCGCCGGT T-R1 GTCAGCAATacaAGCTACTTGACCAGATTG T-R2 GAAGGCTTCACaTGTCTTACGGGTTCTTTC
U	P123C/T130C	U-F1 TCTCCAGAtgtTTGTTCAACCCTTTGAAG U-F2 CCTTTGAAGtgtGGTGTTCGCCAATTGGAC U-R1 GTTGAACAAacaATCTGGAGAAGAAGTGTC U-R2 GCAAACACCacaCTTCAAAGGGTTGAACAA
V	A226C/M360C	V-F1 CTGCAACAAtgtCAAGGTATGCCTGAGCCA V-F2 TTGCAGCAGtgtAGAGACAAGACTCCACTG V-R1 CATACTTGacaTTGTTGCAGAAGAAAGAT V-R2 CTTGTCTCTacaCTGCTGCAAAGTTTGAA
W	W243C/P324C	W-F1 TCTCACCAATGtAACACCTTGTTGTCCTTG W-F2 CCTGGTCAAtgtGATAA CACTCCACCAGGT W-R1 CAAGGTGTTacaTTGGTGAGAGTCGGTGAT W-R2 AGTGTTATCacaTTGACCAGGAAGAGTCCA
X	W347C/M390C	X-F1 AACTCTCAAgtATTCAGGTTTCGTTGGTC X-F2 GCTCAGGGTtgtTGTTCCCTTGCTGGTTTC

		X-R1	AACCTGAATaCATTGAGAGTTATCAGATAG
		X-R2	CAAGGAACAacaACCCTGAGCATTTCTCTC
Y	I348C/F396C	Y-F1	TCTCAATGGtgtCAGGTTTCGTTGGTCTTC
		Y-F2	TTGGCTGGTtgtACTCAAATCGTTAACGAA
		Y-R1	CGAAACCTGacaCCATTGAGAGTTATCAGA
		Y-R2	GATTTGAGTacaACCAGCCAAGGAACACAT

Для введения 25 дисульфидных связей А-У в качестве матрицы выбирается плаزمид рPIC9K-WT, в качестве пары для введения используются F1/R2 и F2/R1, отдельно проводится две ПЦР-амплификации с использованием ДНК-полимеразы Phusion® High-Fidelity DNA (New England Biolabs, номер товара M0530L) в соответствии с описанием, приведенным в руководстве по ее применению. После завершения амплификации для расщепления матрицы применяется эндонуклеаза DpnI (New England Biolabs), после чего с помощью Gibson Assembly® Master Mix Kit (New England Biolabs, номер товара E2611) производится рекомбинация участков, в результате секвенирования подтверждается факт получения мутантной плазмиды. Согласно вышеприведенной таблице наименований дисульфидных связей мутантным плазмидам присваиваются наименования от рPIC9K-A до рPIC9K-Y.

Для экспрессии фитазы и мутантных форм выполняются действия в отношении дрожжей *Pichia* GS115 и плазмиды, описанные в руководстве по применению *Pichia* expression kit (Invitrogen). Подробный порядок действий следующий: после 48-часового культивирования при температуре 30°C штаммов дрожжей *Pichia* GS115 в культурной среде YPD (1% экстракт дрожжей, 2% белка, 2% глюкозы и 1,5% агара), отбирается и клонируется в жидкую питательную среду 4mL YPD (1% экстракт дрожжей, 2% белка, 2% глюкозы), культивируется на 200 об/мин в течение 12 часов при температуре 30°C, после чего переносится в колбу Эрленмейера с жидкой питательной средой 30mL YPD и культивируется в течение 4-5 часов при температуре 30°C на 220 об/мин. Когда показатель OD600 достигнет 1,1-1,3, осуществляется 2-минутное центрифугирование культурной среды при 4 градусах на 9000 об/мин. 4 мл бактериальной массы отдельно собирается в стерилизационные трубки EP, аккуратно удаляется надосадочная жидкость, с помощью стерилизационной фильтровальной бумаги абсорбируется оставшаяся надосадочная жидкость, после чего с помощью предварительно охлажденной 1 мл стерильной воды осуществляется повторное суспендирование бактериальной массы, а также 2-минутное центрифугирование при температуре 4°C на 9000 об/мин и удаление надосадочной жидкости. Затем происходит повторение вышеописанных шагов, с

помощью предварительно охлажденного 1 мл сорбитола (1mol/L) производится повторное суспендирование бактериальной массы, после чего проводится двухминутное центрифугирование при температуре 4°C на 9000 об/мин, удаление надосадочной жидкости, повторное суспендирование бактериальной массы в 100-150 мкл предварительно охлажденного сорбитола (1mol/L), на данном этапе изготовление компетентного препарата завершено. С помощью BglII осуществляется линейризация экспрессионной плазмиды pPIC9K-WT и оставшихся 25 мутантных форм дисульфидных связей, линейризованные фрагменты после очистки и сбора трансформируются способом электропорации в вышеописанную компетенцию дрожжей Пихия GS115, смесь равномерно распределяется на панели MD, инверсивно культивируется в течение 2-3 дней при температуре 30°C, все колонии бактерии смываются с панели стерилизованной водой, после чего наносятся на панель YPD (0,5-8 мг/мл) с различной плотностью содержания генетицина и производится отбор мультикопийных трансформантов. Рекомбинантные штаммы дрожжей Пихия, отобранные с панели MD, имеют наименования: APPA-WT и APPA-A, APPA-B, APPA-C, APPA-D, APPA-E, APPA-F, APPA-G, APPA-H, APPA-I, APPA-J, APPA-K, APPA-L, APPA-M, APPA-N, APPA-O, APPA-P, APPA-Q, APPA-R, APPA-S, APPA-T, APPA-U, APPA-V, APPA-W, APPA-X и APPA-Y. Вышеописанные полученные клоны отдельно переносятся в питательную среду VMGY и культивируются в шейкере в течение 24 часов при температуре 30°C на 250 об/мин, после чего переносятся в питательную среду VMMY и продолжают культивироваться при температуре 30°C на 250 об/мин с ежедневным добавлением 0,5% метанола, после индуцированной экспрессии на протяжении 120 часов проводится 10-минутное центрифугирование на 9000-12000 об/мин в целях удаления бактериальной массы и получения ферментированной надосадочной жидкости, содержащей фитазу APPA-WT и ее 25 мутантных форм. Результаты SDS-PAGE показали, что мутантные формы APPA-S, APPA-X и APPA-Y не экспрессировали, остальные 22 мутантные формы экспрессировали.

Вариант осуществления 2. Измерение термостабильности

Ферментативная активность фитазы определяется согласно документу GBT 18634-2009. 23 образца, полученных согласно варианту осуществления 1, разбавляют водой до 100 ед/мл. 9 мл воды отдельно предварительно нагревается в колориметрической пробирке 25 мл на водяной бане при постоянной температуре 80°C, с помощью пипетки отбирается по 1 мл образца фитазы, быстро помещается в соответствующие пробирки, осуществляется быстрое 3-минутное перемешивание смесителем. Образцы быстро охлаждаются до комнатной температуры, разбавляются водой, измеряется остаточная активность каждого из образцов. Измеряется степень сохранения ферментативной

активности после обработки при различных температурах (ферментативная активность до термической обработки принимается за 100%), показатели термостабильности показаны в Таблице 2. Некоторые мутантные формы продемонстрировали хорошую термостабильность, наилучшую термостабильность продемонстрировали образцы APPA-B, APPA-C, APPA-D, APPA-M, APPA-O и APPA-P, по сравнению с APPA остаточная активность повысилась на 20-25%, примерно в 3-4 раза. Вышеописанные результаты показывают, что введение дисульфидных связей оказывает значительное влияние на мутантные формы, часть образцов оказались в том числе не способными к обычной экспрессии, к примеру APPA-S, APPA-X и APPA-Y. Введение некоторых дисульфидных связей привело к снижению термостабильности, к примеру APPA-Q и APPA-V, которые продемонстрировали термостабильность значительно ниже по сравнению с фитазой дикого типа. Часть дисульфидных связей оказались благоприятными для стабильности структуры фермента, к примеру формы с APPA-A по APPA-P способны повысить термостабильность образцов дикого типа.

Вариант осуществления 3. Введение дисульфидных связей в мутантные формы и измерение их стабильности

Nov9X является мутантной формой фитазы дикого типа с превосходным показателем термостабильности (согласно описанию US7432098), модифицированной путем введения 8 мутаций в форму дикого типа, конкретная последовательность описана в SEQ ID NO:2. На основе Nov9X проводится последующая мутация, последовательность которой описана в SEQ ID NO:3, с наименованием APPA-M1, которая позволяет дополнительно повысить ее термостабильность. Определяется способность мутантных форм дисульфидных связей, описанных в варианте осуществления 1, развиваться в мутантной фитазе и повышать ее термостабильность. Согласно варианту осуществления 1 в APPA-M1 вводятся дисульфидные связи D, O, а также комбинации B+O, C+O, D+O, M+O, B+D+O и D+M+O, мутантные формы последовательно именуются APPA-M1-D, APPA-M1-O, APPA-M1-BO, APPA-M1-CO, APPA-M1-DO, APPA-M1-MO, APPA-M1-BDO и APPA-M1-DMO. Одновременно согласно описаниям US20170240872 и US20130017185 в APPA-M1 вводятся две наиболее благоприятные из каждого варианта осуществления мутантные дисульфидные связи, далее соответственно именуемые US20170240872-A, US20170240872-B, US20130017185-B и US20130017185-C. Для экспрессии каждого мутанта используются дрожжи Пихия, после чего согласно описанному в варианте осуществления 2 способу определяется термостабильность, образцы с разными параметрами инкубируются в течение 3 минут при температуре 85 градусов. Результат показан на рис. 3, дисульфидные связи D и O продемонстрировали

повышение термостабильности в мутантных формах, при этом введение дисульфидной связи О в APPA-M1 привело к значительному повышению термостабильности по сравнению с образцом дикого типа APPA-WT, диапазон повышения достигает 35,5%. При комбинированном введении APPA-M1-CO и APPA-M1-DO была продемонстрирована аналогичная APPA-M1-O термостабильность. Другие комбинации мутаций, такие как APPA-M1-BO, APPA-M1-MO, APPA-M1-BDO и APPA-M1-DMO, показали еще выше термостабильность, наивысший показатель остаточной активности фермента 77,2% продемонстрировала APPA-M1-BO, превысившая показатель APPA-M1 в 2-2,5 раза, что свидетельствует о явной термостабильности и позволяет прогнозировать благоприятное воздействие на кормовые гранулы. Вышепредставленные результаты показывают, что подходящие комбинации позволяют получить более термостабильные мутации. Измеренная данным способом стабильность US20170240872-A и US20170240872-B превысила APPA-M1 на 1,1-8,7%, стабильность US20130017185-B и US20130017185-C – на 5,0-14,8%. Очевидно, что предложенное автором изобретения введение дисульфидных связей продемонстрировало более эффективный результат.

Вариант осуществления 4. Экспрессия в аспергилле черном фитазы кишечной палочки дикого типа и мутантной фитазы с введенной дисульфидной связью

Согласно описанию из патента CN107353327 осуществляется экспрессия фитазы кишечной палочки дикого типа (SEQ ID NO:1) и мутированного типа (с А по Р), фитаза дикого типа именуется APPAan-WT, мутантная фитаза именуется соответственно в порядке от APPAan-A до APPAan-P. После получения надосадочной жидкости из шейкера в соответствии с вариантом осуществления 2 производится измерение термостабильности, образцы с разными параметрами инкубируются в течение 3 минут при температуре 85 градусов. Результат показан на рис. 4. Нами обнаружено, что при экспрессии в аспергилле черном фитаза дикого типа продемонстрировала большую стабильность, чем при экспрессии в дрожжах Пихия, что вероятно обусловлено различной конфигурацией гликозилирования. Эксперимент также показал, что мутант APPAan-P не экспрессирует, мутант APPAan-G продемонстрировал практически аналогичную WT термостабильность, а термостабильность APPAan-H заметно снизилась. Остальные 13 мутаций продемонстрировали очевидное повышение характеристик стабильности в диапазоне от 5% до 20,5%. В то же время нами было обнаружено, что диапазон повышения термостабильности отличается от диапазона мутаций при экспрессии в дрожжах Пихия. Вышепредставленные результаты показывают, что 16 мутантных форм экспрессируют, по меньшей мере, в одной клетке-носителе и значительно повышают стабильность по сравнению с образцом дикого типа, а введение вышеописанных подходящих комбинаций

сульфидных связей позволяет получить мутацию с еще более высокой термостабильностью.

Вариант осуществления 5. Результаты измерений термостабильности мутантной фитазы с введенными дисульфидными связями

Nov9X является мутантной формой фитазы дикого типа с превосходным показателем термостабильности (согласно описанию US7432098), модифицированной путем введения 8 мутаций в форму дикого типа, конкретная последовательность описана в SEQ ID NO:2. В последовательность Nov9X согласно документальным материалам (Improving specific activity and thermostability of Escherichia coli phytase by structure – based rational design) продолжается введение сайтов гликозилирования в последовательности, описываемой SEQ ID NO:79, полученный образец именуется APPA-M2, у которого происходит дальнейшее повышение термостабильности. Определяется способность мутантных форм дисульфидных связей, описанных в варианте осуществления 1, развиваться в мутантной фитазе APPA-M2 и повышать ее термостабильность. В соответствии со способом варианта осуществления 1 в APPA-M2 вводятся дисульфидные связи В, С, D, М, О и комбинации дисульфидных связей В+О, D+О, М+О, С+О, полученные мутанты соответственно именуются APPA-M2-B, APPA-M2-C, APPA-M2-D, APPA-M2-M, APPA-M2-O, APPA-M2-BO, APPA-M2-DO, APPA-M2-MO и APPA-M2-CO, последовательность аминокислот в каждой мутантной форме определяется согласно SEQ ID NOs:80-88, соответствующая нуклеотидная последовательность определяется согласно SEQ ID NOs:90-98. Для экспрессии мутаций используется аспергилл черный, после чего проводятся измерения термостабильности в соответствии со способом варианта осуществления 2. Результат показан на рис. 5, все использованные в эксперименте дисульфидные связи значительно повысили термостабильность мутантных образцов, наилучший результат продемонстрировала связь С+О, ферментативная активность которой после термоустойчивой обработки составила 84,5%, что говорит о высокой термостабильности и позволяет прогнозировать благоприятное воздействие на кормовые гранулы. Вышепредставленные результаты показывают, что подходящие комбинации позволяют создать более термостабильные мутации. Вышеприведенные результаты также показывают, что предложенное автором изобретения введение дисульфидных связей в последовательность мутантной фитазы по-прежнему исключительно эффективно.

Автор изобретения также попробовал продолжить введение сайтов гликозилирования в последовательность Nov9X, данная последовательность описана SEQ ID NO:99, с наименованием APPA-M3, которая также способна повышать термостабильность. Согласно варианту осуществления 1 в APPA-M3 вводятся

дисульфидные связи В, С, D, М, О и комбинации В+О, D+О, М+О, С+О, полученные мутанты соответственно именуется APPA-M3-B, APPA-M3-C, APPA-M3-D, APPA-M3-M, APPA-M3-O, APPA-M3-BO, APPA-M3-DO, APPA-M3-MO и APPA-M3-CO, последовательность аминокислот каждого мутанта определяется согласно SEQ ID NOs:100-108, а соответствующая нуклеотидная последовательность – SEQ ID NOs:110-118. Для экспрессии мутантов используется аспергилл черный, измерения стабильности проводятся в соответствии с вариантом осуществления 2. Было обнаружено, что мутант с введенной дисульфидной связью, как и АММА-M2, имеет хорошие показатели термостабильности и также позволяет прогнозировать благоприятное воздействие на кормовые гранулы.

Различные модификации и варианты описанных способов в настоящем изобретении очевидны для специалистов в данной области техники и не выходят за рамки настоящего изобретения. Несмотря на то, что в настоящем изобретении приводятся обобщенные описания частных вариантов осуществления, следует понимать, что область защиты заявленного настоящего изобретения никоим образом не ограничивается данными конкретными предпочтительными вариантами осуществления. Фактически, различные очевидные для специалистов в данной области мутации и модификации фитазы дикого типа, используемые для достижения технических эффектов настоящего изобретения, включаются в объем формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Термостабильная фитаза, отличающаяся тем, что в последовательность аминокислот фитазы *Escherichia coli* (кишечной палочки) дикого либо мутированного типа вводится, по меньшей мере, одна введенная дисульфидная связь; последовательность аминокислот фитазы кишечной палочки дикого типа представлена в SEQ ID NO:1; фитаза кишечной палочки мутированного типа содержит мутацию, по меньшей мере, в одном положении по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1,

при этом, введенная дисульфидная связь выбрана из следующих:

(A) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 34 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 174 в SEQ ID NO:1;

(B) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 56 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 103 в SEQ ID NO:1;

(C) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 57 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 366 в SEQ ID NO:1;

(D) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 61 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 366 в SEQ ID NO:1;

(E) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 82 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 296 в SEQ ID NO:1;

(F) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 128 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 203 в SEQ ID NO:1;

(G) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 140 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 262 в SEQ ID NO:1;

(H) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 156 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 191 в SEQ ID NO:1;

(I) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком,

соответствующим положению 165 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 245 в SEQ ID NO:1;

(J) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 191 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 210 в SEQ ID NO:1;

(K) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 196 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 211 в SEQ ID NO:1;

(L) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 264 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 312 в SEQ ID NO:1;

(M) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 315 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 380 в SEQ ID NO:1;

(N) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 322 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 356 в SEQ ID NO:1;

(O) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 346 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 393 в SEQ ID NO:1;

(P) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 349 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 390 в SEQ ID NO:1;

при условии, что:

пункты (C) и (D) не выполняются одновременно;

пункты (H) и (J) не выполняются одновременно.

2. Термостабильная фитаза по п. 1, отличающаяся тем, что фитаза кишечной палочки мутированного типа содержит мутацию, по меньшей мере, в одном из следующих положений по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1: 1, 25, 30, 36, 37, 38, 39, 46, 55, 60, 62, 65, 69, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 85, 101, 108, 109, 111, 114, 116, 118, 120, 123, 126, 127, 133, 137, 138, 139, 141, 142, 146, 151, 157, 159, 161, 173, 176, 178, 180, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 204, 211, 233, 235, 245, 253, 255, 267, 276, 282, 283, 284, 286, 287, 288, 291, 295, 297, 311, 315, 317, 318, 327, 341, 354, 363, 367, 369, 370, 380, 382, 383, 385, 391, 402, 408.

3. Термостабильная фитаза по п. 2, отличающаяся тем, что фитаза кишечной

палочки мутированного типа содержит, по меньшей мере, одну из следующих мутаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1: Q1S, Q1V, Q1N, A25F, Q30K, A36K, W37F, P38Y, T39D, W46E, I55V, H60S, H60Q, Q62W, R65H, D69N, G70E, A73P, A73D, A73E, K74D, K74P, K74L, K74N, K75C, K75Q, G76T, C77A, Q79L, Q79R, Q79A, Q79G, Q79F, S80P, I85V, A101L, C108A, A109D, A109E, A109G, A109F, A109P, THIS, T111D, T111Q, T114H, T116A, T118R, T118S, S120R, P123E, N126Y, P127V, P127L, C133A, N137V, N137E, N137S, N137P, A138V, A138H, A138D, A138P, N139P, N139A, N139H, T141R, T141E, T141G, T141A, D142R, S146E, S146R, S151P, G157R, G157Q, G157N, G157L, G157A, R159Y, T161P, P173Y, P173S, N176P, N176K, C178A, K183R, Q184S, D185N, D185L, E186V, E186A, S187P, C188A, S189T, N204C, V211W, G233E, G235Y, T245E, Q253V, Y255D, R267A, H282N, P283G, P284T, K286F, Q287Y, A288E, A288R, A288V, V291I, T295I, V297T, G311S, E315G, E315S, N317L, W318Y, T327Y, L341Y, L341V, F354Y, K363A, K363L, S367F, N369P, T370P, A380P, A380R, A380T, C382A, E383S, R385S, R385V, R385T, C391A, E402R, E402T, E402D, E402P, E402N, C408A.

4. Термостабильная фитаза по п. 3, отличающаяся тем, что фитаза кишечной палочки мутированного типа содержит любую из следующих комбинаций мутаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1:

W46E, Q62W, A73P, K75C, S146E, R159Y, N204C, Y255D;

A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K75C, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, Y255D;

W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, G76T, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T; и

A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T.

5. Термостабильная фитаза по п. 4, отличающаяся тем, что фитаза кишечной палочки мутированного типа содержит любую из следующих комбинаций мутаций по сравнению с фитазой кишечной палочки дикого типа, представленной в SEQ ID NO:1:

W46E, Q62W, A73P, K75C, S146E, R159Y, N204C, Y255D;

A25F, W46E, Q62W, G70E, A73P, K75C, T114H, N137V, D142R, S146E, R159Y, Y255D;

и

W46E, Q62W, G70E, A73P, K74N, K75Q, G76T, S146E, R159Y, P173S, Y255D, H282N, P283G, P284T.

6. Термостабильная фитаза по п. 3, отличающаяся тем, что последовательность

аминокислот фитазы кишечной палочки мутированного типа представлена в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:79 либо SEQ ID NO:99.

7. Термостабильная фитаза по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что дисульфидная связь выбрана, по меньшей мере, из одной из (A), (B), (C), (D), (J), (M) либо (O), при условии, что (C) и (D) не выполняются одновременно.

8. Термостабильная фитаза по п. 7, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет не менее чем двум или трем из следующих пунктов: (A), (B), (C), (D), (E), (J), (M) и (O), при условии, что (C) и (D) не выполняются одновременно.

9. Термостабильная фитаза по п. 7, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (A), (B), (C), (E), (J) или (M).

10. Термостабильная фитаза по п. 7, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет, по меньшей мере, пункту (D) или пункту (O).

11. Термостабильная фитаза по п. 10, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет пункту (D).

12. Термостабильная фитаза по п. 10, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет пункту (O).

13. Термостабильная фитаза по п. 7, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (B) и (O); (C) и (O); (D) и (O); (M) и (O); (B), (D) и (O); или (D), (M) и (O).

14. Термостабильная фитаза по п. 13, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (B) и (O).

15. Термостабильная фитаза по п. 13, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (C) и (O).

16. Термостабильная фитаза по п. 13, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (M) и (O).

17. Термостабильная фитаза по п. 13, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (B), (D) и (O).

18. Термостабильная фитаза по п. 13, отличающаяся тем, что последовательность аминокислот удовлетворяет пунктам (D), (M) и (O).

19. Термостабильная фитаза по любому из пп. 1-18, содержащая, по меньшей мере, одну введенную дисульфидную связь, отличающаяся тем, что дисульфидная связь выбрана из следующих:

(i) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 31 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 176 в SEQ ID NO:1;

(ii) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 31 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 177 в SEQ ID NO:1;

(iii) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 52 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 99 в SEQ ID NO:1;

(iv) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 59 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 100 в SEQ ID NO:1;

(v) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 91 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 46 в SEQ ID NO:1;

(vi) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 141 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 200 в SEQ ID NO:1;

(vii) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 162 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 248 в SEQ ID NO:1;

(viii) дисульфидная связь, образованная между аминокислотным остатком, соответствующим положению 205 в SEQ ID NO:1, и аминокислотным остатком, соответствующим положению 257 в SEQ ID NO:1;

при условии, что пункты (i) и (ii) не выполняются одновременно.

20. Термостабильная фитаза по п. 1, отличающаяся тем, что термостабильная фитаза включает любую из следующих аминокислотных последовательностей: SEQ ID NOs:4-40, SEQ ID NOs:80-88 и SEQ ID NOs:100-108.

21. Термостабильная фитаза по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что термостабильная фитаза получена из дрожжей Пихия (*Pichia*) либо аспергилла черного (*Aspergillus niger*) посредством гетерологической экспрессии.

22. Термостабильная фитаза по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что аминокислотные остатки, способные к формированию дисульфидных связей, являются цистеиновыми либо гомоцистеиновыми остатками.

23. Полинуклеотид, отличающийся тем, что он кодирует термостабильную фитазу по любому из пп. 1-22.

24. Полинуклеотид по п. 23, отличающийся тем, что его кодирующая последовательность кодон-оптимизирована для экспрессии в дрожжах Пихия либо

аспергиле черном.

25. Полинуклеотид по п. 23, отличающийся тем, что он включает в себя любую из следующих нуклеотидных последовательностей: SEQ ID NOs:41-77, SEQ ID NOs:90-98 и SEQ ID NOs:100-118.

26. Клетка организма-носителя, отличающаяся тем, что она включает в себя полинуклеотид по любому из пп. 23-25.

27. Клетка организма-носителя по п. 26, отличающаяся тем, что данная клетка организма-носителя является грибковой, бактериальной либо растительной клеткой.

28. Клетка организма-носителя по п. 27, отличающаяся тем, что данная клетка является дрожжевой клеткой либо клеткой мицелиальных грибов.

29. Клетка организма-носителя по п. 28, отличающаяся тем, что данная клетка является клеткой дрожжей Пихия либо аспергила черного.

30. Способ повышения термостабильности фитазы, отличающийся тем, что данный способ включает в себя модификацию последовательности аминокислот либо кодирующей нуклеотидной последовательности в интересующей фитазе, в результате чего из выбранной последовательности аминокислот фитазы, по меньшей мере, в одном из следующих пунктов (A)-(P) может образоваться дисульфидная связь между аминокислотными остатками в двух положениях:

(A) положение, соответствующее положению 34 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 174 в SEQ ID NO:1;

(B) положение, соответствующее положению 56 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 103 в SEQ ID NO:1;

(C) положение, соответствующее положению 57 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 366 в SEQ ID NO:1;

(D) положение, соответствующее положению 61 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 366 в SEQ ID NO:1;

(E) положение, соответствующее положению 82 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 296 в SEQ ID NO:1;

(F) положение, соответствующее положению 128 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 203 в SEQ ID NO:1;

(G) положение, соответствующее положению 140 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 262 в SEQ ID NO:1;

(H) положение, соответствующее положению 156 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 191 в SEQ ID NO:1;

(I) положение, соответствующее положению 165 в SEQ ID NO:1, и положение,

соответствующее положению 245 в SEQ ID NO:1;

(J) положение, соответствующее положению 191 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 210 в SEQ ID NO:1;

(K) положение, соответствующее положению 196 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 211 в SEQ ID NO:1;

(L) положение, соответствующее положению 264 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 312 в SEQ ID NO:1;

(M) положение, соответствующее положению 315 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 380 в SEQ ID NO:1;

(N) положение, соответствующее положению 322 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 356 в SEQ ID NO:1;

(O) положение, соответствующее положению 346 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 393 в SEQ ID NO:1;

(P) положение, соответствующее положению 349 в SEQ ID NO:1, и положение, соответствующее положению 390 в SEQ ID NO:1;

при условии, что:

пункты (C) и (D) не выбираются одновременно;

пункты (H) и (J) не выбираются одновременно.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в интересующей фитазе, по меньшей мере, в одном из пунктов (A), (B), (C), (D), (E), (J), (M) или (O) может образоваться дисульфидная связь между аминокислотными остатками в двух положениях, при условии что (C) и (D) не выбираются одновременно.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из выбранных из последовательности аминокислот в более двух, трех или во всех пунктах из: (A), (B), (C), (D), (E), (J), (M) и (O), может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях, при условии что (C) и (D) не выбираются одновременно.

33. Способ по п. 31, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (A), (B), (C), (E), (J) или (M) может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

34. Способ по п. 31, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот, по меньшей мере, в (D) или (O) может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из

последовательности аминокислот в (D) может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (O) может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

37. Способ по п. 31, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (B) и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

38. Способ по п. 31, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (C) и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

39. Способ по п. 31, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (M) и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

40. Способ по п. 31, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (B), (D) и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

41. Способ по п. 31, отличающийся тем, что модификация приводит к тому, что из последовательности аминокислот в (D), (M) и (O) по отдельности может образоваться дисульфидная связь между остатками аминокислот в двух положениях.

42. Способ по любому из пп. 30-41, отличающийся тем, что интересующая фитаза получена из кишечной палочки, а также имеет последовательность аминокислот, по меньшей мере, на 75% идентичную последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:79 либо SEQ ID NO:99.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что интересующая фитаза является фитазой кишечной палочки дикого типа и предпочтительно имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:1.

44. Способ по п. 42, отличающийся тем, что интересующая фитаза является фитазой кишечной палочки мутированного типа и предпочтительно имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:79 либо SEQ ID NO:99.

45. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что модифицированная фитаза включает последовательность аминокислот, выбранную из следующих комбинаций, либо ее кодирующая нуклеиновая кислота включает код, выбранный из нуклеотидных последовательностей следующих последовательностей аминокислот: SEQ

ID NOs:4-40, SEQ ID NOs:80-88 и SEQ ID NOs:100-118.

46. Способ по любому из пп. 30-45, отличающийся тем, что данный способ включает в себя получение фитазы с модифицированной последовательностью аминокислот, а также ее размещение в среде, допускающей образование дисульфидных связей.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что получаемая фитаза с модифицированной последовательностью аминокислот включает экспрессию кодирующего данную фитазу полинуклеотида в клетке организма-носителя.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что клетка организма-носителя является грибковой клеткой, предпочтительно дрожжевой клеткой либо клеткой мицелиальных грибов, наиболее предпочтительно клеткой дрожжей *Pichia* либо *аспергилла* черного.

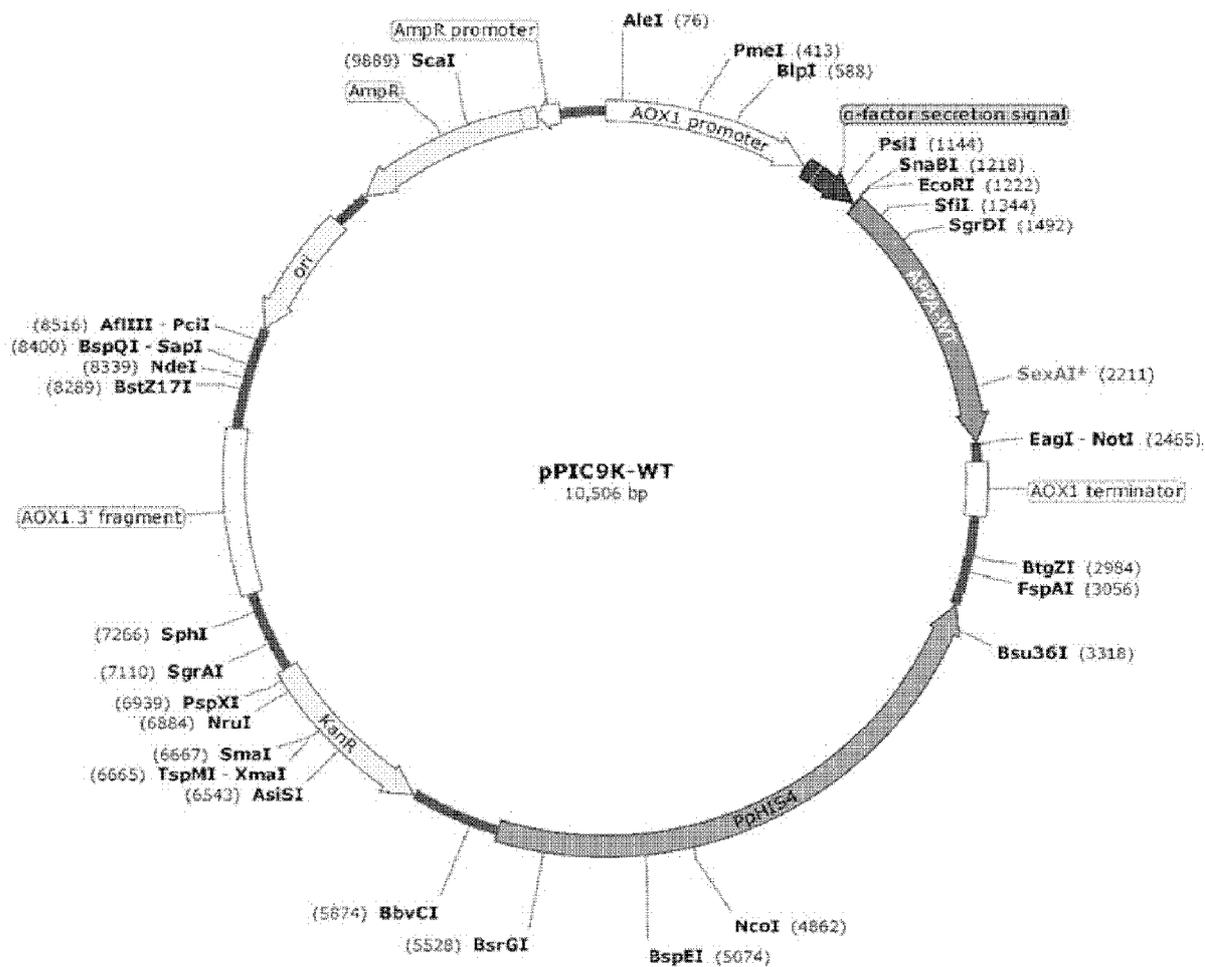


Рис. 1

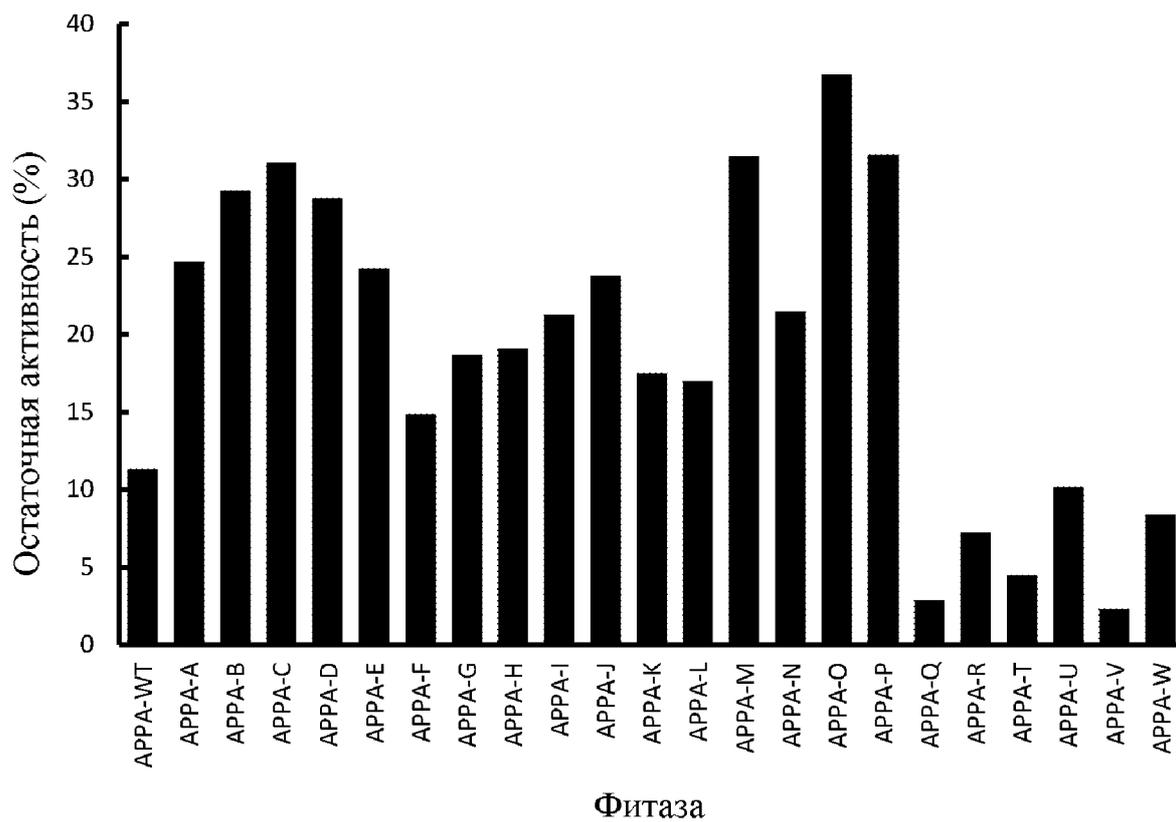


Рис. 2

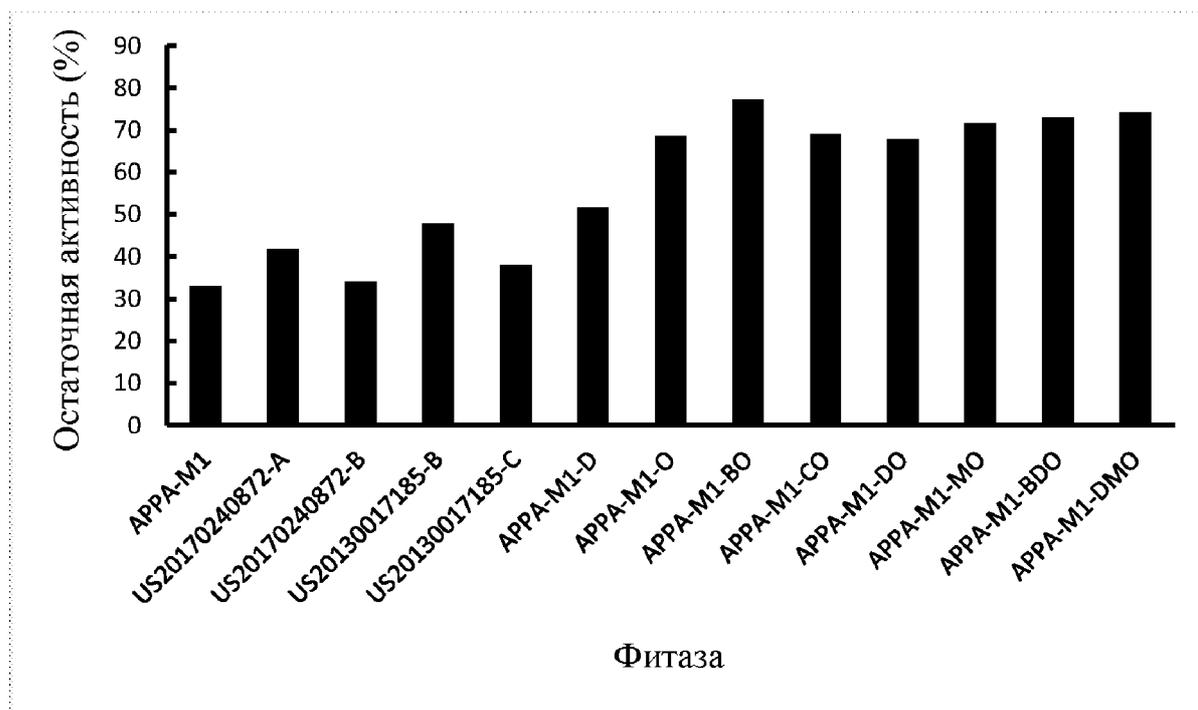


Рис. 3

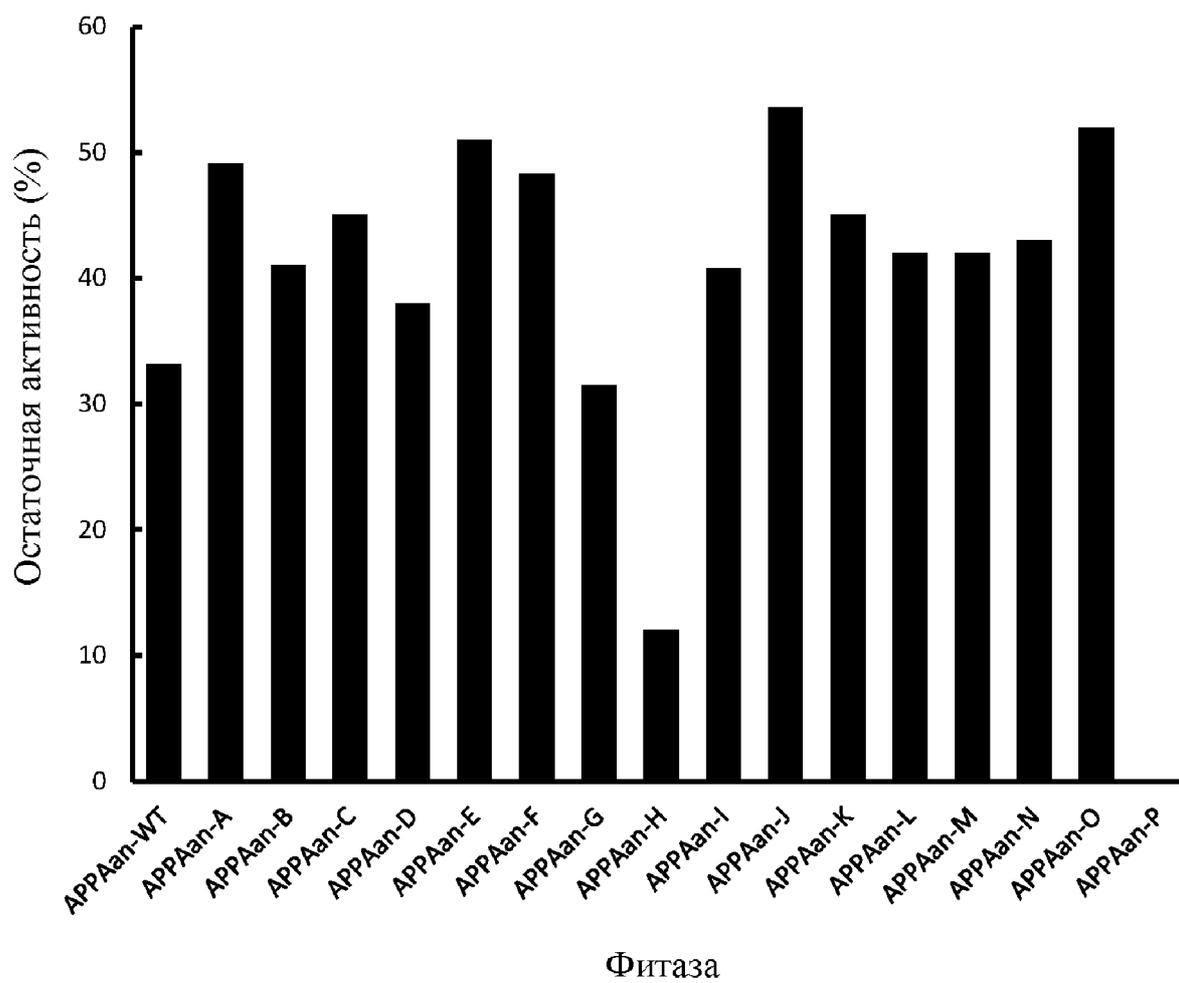


Рис. 4

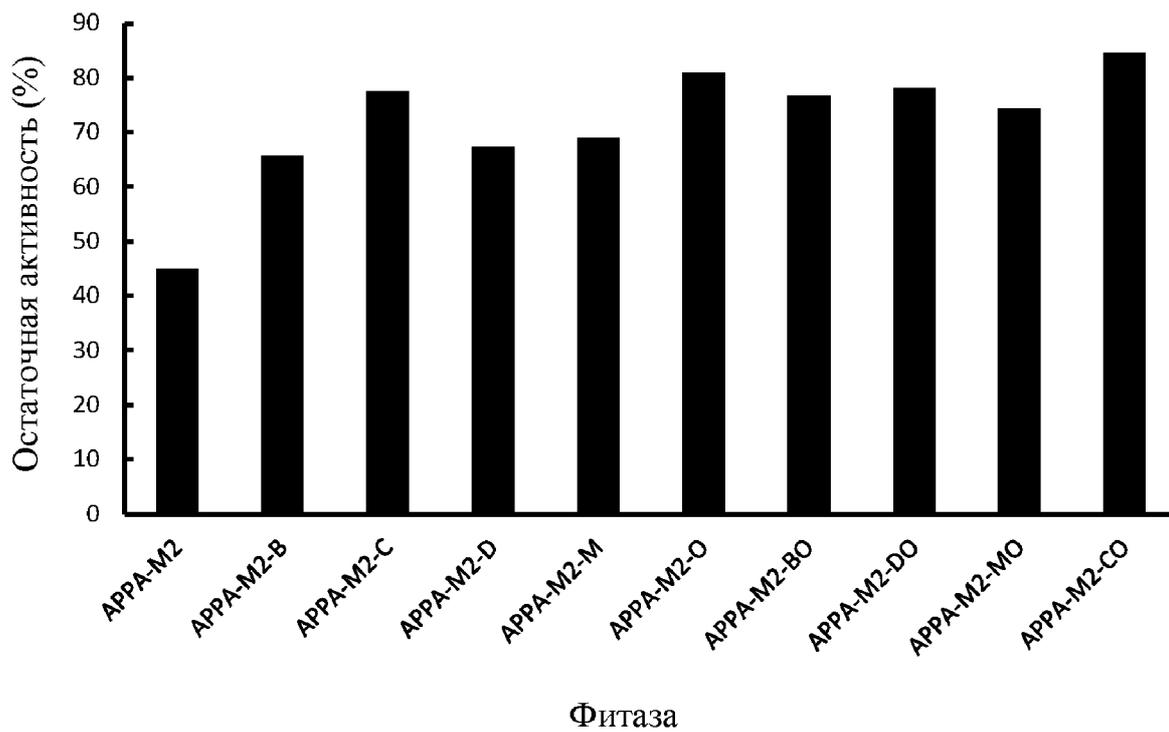


Рис.5