

Aspergillus fumigatus 来源植酸酶的 Q23L 和 Q23LG272E 突变研究 Mutation Research on Q23L and Q23LG272E in Phytase Derived from *Aspergillus fumigatus*

谷维娜¹ 杨培龙¹ 王亚茹¹ 罗会颖¹ 孟 昆¹ 伍宁丰² 姚 斌^{1*} 范云六²

GU Wei-Na¹, YANG Pei-Long¹, WANG Ya-Ru¹, LUO Hui-Ying¹, MENG Kun¹, WU Ning-Feng², YAO Bin^{1*} and FAN Yun-Liu²

1 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

2 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

1 Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

摘 要 *Aspergillus fumigatus* 来源的植酸酶具有热稳定性好、pH 作用范围广的优点, 但其比活性很低。设计的植酸酶 Q23L 突变能在 pH4.5 ~ 7.0 范围内大幅提高比活性, 但 pH 稳定性却显著下降, 为了进一步改良 Q23L 的 pH 稳定性, 在 Q23L 分子上加入了 G272E 突变。将原酶、突变酶 Q23L 和突变酶 Q23LG272E 分别在毕赤酵母 GS115 中表达, 表达酶经纯化后进行酶学性质比较分析, 结果表明, 突变酶 Q23L 的比活性比原酶显著提高, 在 pH5.5 比活性由 51u/mg 提高到 109u/mg, 但其 pH 稳定性, 尤其是在 pH3.0 ~ 4.0 酸性条件下的稳定性却显著降低, 低于 80%。突变酶 Q23LG272E 在 pH3.0 ~ 4.5 和 pH6.5 ~ 7.0 时的稳定性比 Q23L 有所提高, 恢复到原酶的水平, 而比活性基本维持在 Q23L 的水平。通过一级序列和三维结构比较, 分析了可能影响 Q23LG272E 酶学性质的因素, 为进一步研究植酸酶的结构与功能提供了材料。

关键词 植酸酶, 定点突变, 毕赤酵母

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0273-05

Abstract *Aspergillus fumigatus* wild-type phytase has many favorable properties, such as a good thermostability and a broad pH optimum. However, the specific activity of the enzyme is relative low. A *.fumigatus* Q23L phytase resulted in a remarkable increase in specific activity around pH4.5 ~ 7.0, but the pH stability of Q23L was lower than *A. fumigatus* wild-type phytase. To increase the pH stability of Q23L, the mutant Q23LG272E was constructed by site-directed mutagenesis with PCR. The gene of *A. fumigatus* wild-type phytase and the mutant genes encoding the Q23LG272E and the Q23L were correctly expressed in *Pichia pastoris* GS115. Enzymes were purified and their enzymatic properties were determined. The results revealed that the specific activity of the Q23L improved remarkably, which increased from 51u/mg of the wild type to 109u/mg at pH5.5. Meanwhile, the pH stability of Q23L decreased evidently, especially from pH3.0 to pH4.0. The pH stability of Q23LG272E in pH3.0 ~ 4.5 and pH6.5 ~ 7.0 has been improved compared with Q23L. The specific activity of Q23LG272E basically maintained at the level of Q23L. Analysis of 3-D structure and sequence similarity were used to reveal the presumable factors influencing the enzymatic properties of Q23LG272E and discussion for the relationship between structure and function of phytase was given.

Key words phytase, site-directed mutagenesis, *Pichia pastoris*

Received: September 1, 2006; Accepted: November 6, 2006.

This work was supported by the grants from the International S&T Cooperation Program of China(No. 2004DFA06800) and the National Basic Research Program of China(No. 2004CB719606).

* Corresponding author. Tel: + 86-10-68975126; Fax: + 86-10-68975127; E-mail: yaobin@ public3. bta. net. cn

国际科技合作重点项目计划(No. 2004DFA06800)和国家“ 973 ”项目(No. 2004CB719606)资助。

植酸酶(肌醇六磷酸酶)是能够将植酸(肌醇六磷酸)分解为肌醇和无机磷的一类酶的总称^[1],广泛存在于动物、植物、微生物中。植酸是谷物等作物中磷元素的主要贮存形式。由于单胃动物(如猪、家禽)消化道中缺少植酸酶,因而难以利用饲料谷物中的植酸磷。在饲料中添加无机磷,又造成磷源浪费、环境污染等多种问题。同时,植酸还是一种抗营养因子,它会与多种金属离子螯合形成不溶性复合物,降低了动物对营养元素的有效利用^[2]。在饲料中添加植酸酶能有效提高植酸磷的利用率,减少粪便中排除的磷对环境的污染,消除植酸的抗营养作用,增强动物对蛋白质和一些金属离子的吸收能力,其饲喂效果已得到了广泛的确证^[3,4]。此外在食品工业和医药工业,植酸酶也具有广阔的应用前景和潜在的巨大商业价值^[5]。

来源于烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)的植酸酶性质优良,如热稳定性好,在100℃处理20min后仍能保持90%的酶活性^[6],具有较宽的pH作用范围等,但缺点是比活性较低^[7]。Anderea等^[7]为了提高比活性将*A. fumigatus*植酸酶Q23突变为不同的氨基酸,其中Q23L在pH5.0时能将比活性提高最多,由原酶的26.5u/mg提高到92.1u/mg,但Q23L突变的pH稳定性比原酶有所降低。为了提高Q23L的pH稳定性,通过三维结构分析设计了G272E定点突变。第272位氨基酸是位于活性中心非保守的氨基酸,G突变成E,与空间位置邻近的K273形成离子键,巩固了活性中心的电离网,稳定了蛋白质的结构。本文报道突变酶的表达及部分性质研究,对植酸酶结构与功能的关系作进一步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

植酸酶基因(来源于*Aspergillus fumigatus*)由本实验室克隆保存(GenBank收录号:DQ916149)。大肠杆菌JM109、克隆质粒Bluescript SK均由本实验室保存。毕赤酵母GS115、载体pPIC9购自Invitrogen公司;限制酶及DNA回收试剂盒购自TaKaRa公司;T4 DNA连接酶购自Promega公司;引物由上海生工合成;植酸钠(肌醇六磷酸十二钠)购自Sigma公司;脱糖基化酶(Endo H),NEB公司;蛋白质分子量标准为上海生化所产品;其它化学试剂为国产分析纯。

1.2 培养基

BMGY培养基:酵母提取物10g/L,蛋白胨20g/L,酵母氮源(YNB)13.4g/L,生物素 4×10^{-4} g/L,甘油10mL,pH6.0。BMMY培养基:酵母提取物10g/L,蛋白胨20g/L,酵母氮源(YNB)13.4g/L,生物素 $4 \times$

10^{-4} g/L,甲醇5mL,pH6.0。

1.3 定点突变

设计引物如下(下划线为引入的突变核苷酸)。P1:at gaattc tccaagtctctgcgatacggtagacc(含EcoRI位点);P2:at cccggg tcaactaagcactctccccagttg(含SmaI位点);PQ23L-F:tctcatctatggggctgtactcgcattcttt;PQ23L-R:aaagaatggcgagtacaagccccatagatgaga;PG272E-F:taccttcagtccttggagaagtactacggctac;PG272E-R:gtagccgtagtacttctccaaggactgaaggta。

经过对酶分子的结构分析,确定突变位点G272E。设计突变引物,通过PCR方法进行定点突变获得突变基因。通过EcoRI和SmaI双酶切将突变基因q23l和q23lg272e克隆到Bluescript SK载体,电转化大肠杆菌JM109,通过蓝白斑筛选出重组菌落,提取重组质粒进行测序,得到序列正确重组质粒Bluescript SK-q23l,Bluescript SK-q23lg272e。

1.4 pPIC9-q23l、pPIC9-q23lg272e 重组表达载体的构建

将重组质粒Bluescript SK-q23l,Bluescript SK-q23lg272e用EcoRI和NotI进行双酶切,回收目的基因,定向插入到pPIC9的EcoRI和NotI位点之间,与信号肽编码序列形成正确的阅读框架。

1.5 重组植酸酶的表达及纯化

1.5.1 酵母的电击转化和筛选:将重组质粒pPIC9-q23l,pPIC9-q23lg272e用DraI酶切使之线性化,电击转化毕赤酵母GS115,挑取阳性转化子。转化及筛选方法见Invitrogen公司操作手册。

1.5.2 重组酵母的培养、诱导表达及检测:重组酵母在3mL BMGY培养基中于30℃摇床培养48h,离心收集菌体,加入1mL BMMY甲醇诱导培养基悬浮菌体,继续在30℃下诱导培养48h,取样检测各菌株上清液中的植酸酶活性,从中筛选出表达植酸酶的转化子。

1.5.3 重组植酸酶的纯化:挑选具有酶活性的重组酵母于200mL BMGY培养基中,30℃摇床培养48h,离心收集菌体,加入80mL BMMY甲醇诱导培养基,30℃继续诱导96h(每隔12h补加0.5%甲醇)后离心收集上清液,上清液透析脱盐后经pH8.5的HiTrap Q XL柱子纯化,平衡缓冲液为20mmol/L的Tris-HCl(pH8.5),洗脱液为含0.6mol/L NaCl的20mmol/L Tris-HCl(pH8.5),上样量0.5mL,0~20%洗脱5CV,流速2mL/min,得到电泳纯的目标蛋白。

1.6 重组植酸酶的脱糖基化

取9 μ L纯化蛋白进行脱糖基化处理,建立如下反应体系:9 μ L纯化蛋白+1 μ L 10 \times Glycoprotein 变

性缓冲液, 100℃反应 10min 后加 1.2μL 10 × G5 缓冲液、1μL Endo H 37℃反应 1h。

1.7 植酸酶活性的测定

测定方法见参考文献 [8]。酶活性单位定义: 在一定条件下, 每分钟释放出 1μmol 无机磷所需的酶量为一个酶活性单位 (IU)。酶活测定体系 pH6.0。

1.8 酶学性质的分析与比较

将纯化后的突变酶与原酶(同样经毕赤酵母表达并纯化)在不同的 pH(2.0 ~ 8.5)条件下进行酶促反应测定其最适 pH 值, 所用缓冲液为 0.1mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液, pH2.0, 2.5, 3.0, 3.5; 0.1mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液, pH4.0, 4.5, 5.0, 5.5; 0.1mol/L Tris-醋酸缓冲液, pH6.0, 6.5; 0.1mol/L Tris-盐酸缓冲液, pH7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 37℃测定酶活性。将酶液在不同 pH 缓冲液中于 37℃处理 1h, 在 37℃, pH6.0 的 Tris-醋酸缓冲液中测定酶活性研究酶的 pH 稳定性。在 pH6.0 的 0.1 mol/L Tris-醋酸缓冲液及不同温度(30℃ ~ 65℃)条件下测定酶活性以确定最适温度。酶促反应体系中加入终浓度为 1mmol/L 的不同金属离子及化学试剂, 在 37℃、pH6.0 条件下测定酶活性, 研究其对酶活性的影响。酶的比活单位定义为每毫克酶蛋白所表现出的酶活性单位 (IU)。通过考马斯亮蓝法测定样品酶液中的蛋白含量, 同时测得其植酸酶酶活性, 由此得到酶的比活性。

2 结果

2.1 定点突变

通过测序分析克隆到 Bluescript SK 载体上的突变基因, 确定突变位点与设计的目标位点一致。

2.2 重组表达载体的构建

构建的毕赤酵母表达载体示意图见图 1。

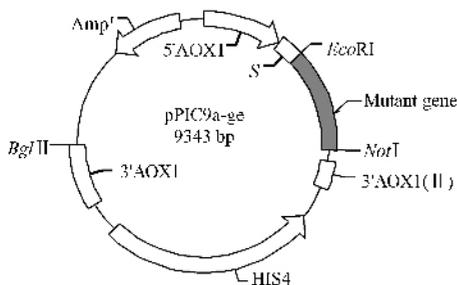


图 1 重组表达载体 pPIC9-*q23l* pPIC9-*q23lg272e* 的示意图

Fig.1 Physical map of recombinant expression plasmid pPIC9-*q23l* pPIC9-*q23lg272e*

2.3 重组植酸酶的表达及纯化

突变基因在毕赤酵母中得到表达, 随着甲醇诱导时间的延长, 发酵上清液中植酸酶酶活力显著增加, 酶蛋白不断积累。表达产物经分离纯化后, SDS-PAGE 表明已获得均一的酶蛋白(图 2)。

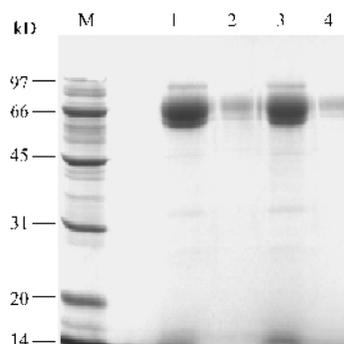


图 2 突变植酸酶纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of purified mutant phytases

1, 3: crude samples of *A. fumigatus* Q23L phytase and *A. fumigatus* Q23LG272E phytase; 2, 4: purified samples of *A. fumigatus* Q23L phytase and *A. fumigatus* Q23LG272E phytase.

2.4 重组植酸酶的脱糖基化

由于该植酸酶序列中含有 6 个潜在的糖基化位点, 使酵母表达的植酸酶产物的分子量发生变化, 酶经 Endoglycosidase H 脱糖基化处理后, 形成一条 48kD 的蛋白带, 与理论值相符(图 3), 另一条 29kD 的蛋白带为 Endo H。

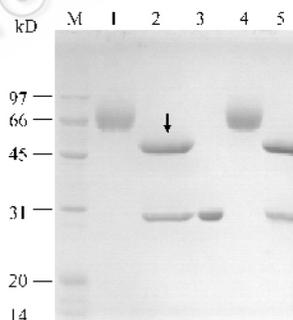


图 3 酵母表达突变酶脱糖基化前后的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE analysis of Q23L and Q23LG272E phytases before and after deglycosylation by Endo H

1: purified *A. fumigatus* Q23L phytase; 2: *A. fumigatus* Q23L phytase deglycosylated by Endo H; 3: Endo H; 4: purified *A. fumigatus* Q23LG272E phytase; 5: *A. fumigatus* Q23LG272E phytase deglycosylated by Endo H.

2.5 酶学性质的分析与比较

突变酶与原酶酵母表达后经同样方法进行纯化, 酶学性质测定结果表明, pH 稳定性方面, 如图 4 所示: Q23LG272E 在 pH3.0 ~ 4.5 和 pH6.5 ~ 7.0 时的稳定性比 Q23L 有所提高, 也高于原酶, 在 pH2.0 ~ 2.5 和 pH7.5 ~ 8.5 时比 Q23L 略低。在酶的比活性方面, Q23L 和 Q23LG272E 突变分别能在 pH4.5 ~ 7.0 和 pH5.0 ~ 7.0 范围内大幅提高比活性, Q23LG272E 在 pH7.0 时比活性比 Q23L 略有提高, 由 58u/mg 提高到 72u/mg, 在其余 pH 值时比 Q23L 略低。Q23L 和 Q23LG272E 最适 pH 值均为 6.0。Q23L 最适温度为 45℃, Q23LG272E 最适温度为 50℃。

表 1 突变酶 Q23L 和 Q23LG272E 与原酶的酶学性质比较
 Table 1 Comparison of enzyme properties of *A. fumigatus* Q23L phytase, *A. fumigatus* Q23LG272E phytase and *A. fumigatus* wild-type phytase

Properties of enzyme	Wild-type phytase	Q23L	Q23LG272E
Optimum temperature/°C	55	45	50
Optimum pH	5.5	6.0	6.0
Specific activity(IU/mg) pH5.5	51	109	100
Effect of metal ion and some reagents on enzyme activity	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺ inhibit EDTA activate	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺ inhibit Mg ²⁺ activate	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺ inhibit Mg ²⁺ activate

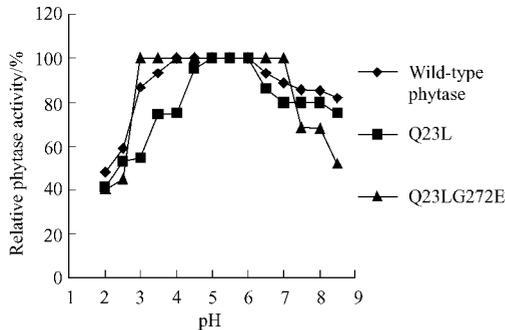


图 4 突变酶 Q23L 和 Q23LG272E 与原酶在不同 pH 条件下稳定性比较

Fig.4 Comparison of pH stability of *A. fumigatus* Q23L phytase, *A. fumigatus* Q23LG272E phytase and *A. fumigatus* wild-type phytase

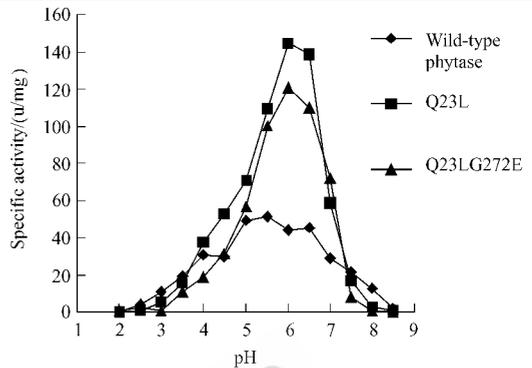


图 5 突变酶 Q23L 和 Q23LG272E 与原酶比活性的比较

Fig.5 Comparison of Specific activity of *A. fumigatus* Q23L phytase, *A. fumigatus* Q23LG272E phytase and *A. fumigatus* wild-type phytase

表 2 *A. fumigatus* 来源植酸酶与其它真菌来源的植酸酶第 272 位氨基酸比较
 Table 2 Comparison of *A. fumigatus* residue 272 with the analogous residues in other fungal phyAs having different levels of specific activity

Source of phytase	Residue number 272	Class of amino acid at residue 272	Specific activity [High (H) or Low (L)]
<i>A. niger</i> NRRL 3135	YLQSLK ²⁷² KYYGHHG	Basic	H
<i>A. terreus</i> 9A1	YL ²⁷² SLDKYYGYG	Acidic	H
<i>A. terreus</i> CBS116.46	YL ²⁷² SLDKYYGYG	Acidic	H
<i>P. lycii</i> CBS686.96	YYYDLD ²⁷² KYYGTG	Acidic	H
<i>A. fumigatus</i> ATCC 13073	YLQSL ²⁷² GKYYGYG	Neutral	L
<i>A. nidulans</i> Roche Nr. R1288	YLQSL ²⁷² SKYYGYG	Neutral	L
<i>M. thermophila</i> ATCC 48102	YLQSVG ²⁷² KWYGYG	Neutral	L



图 6 突变酶 Q23L(左)和 Q23LG272E(右)局部三维结构比较图
 Fig.6 Comparison of part of 3D structure of *A. fumigatus* Q23L phytase(left) and *A. fumigatus* Q23LG272E phytase(right)

3 讨论

Andrea^[7]对来源于 *A. niger*, *A. terreus* CBS 和 *A. fumigatus* 的植酸酶进行结构分析,认为 Q23 是一个位于活性中心但非保守的氨基酸,可能对酶的催

化性质有影响。将 Q 突变为不同氨基酸,结果 Q23L 突变在 pH5.0 时比活性提高最多。作者推测可能由于 Q23 位置靠近酶分子的催化部位,它与底物的磷酸基团易形成氢键,这样就影响了产物的释放,而突变后的氨基酸则减弱或丧失氢键形成,产物易于释放,于是比活性提高。Q23L 突变虽然能大幅提高比活性,但本研究表明 Q23L 突变的 pH 稳定性比原酶有所下降,在 pH2.0~4.5 和 pH6.5~8.5 时均比原酶低。为了提高 Q23L 的 pH 稳定性,设计 Q23LG272E 突变。在 <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html> 网站上完成突变酶的同源建模,应用 spdbv 软件对酶分子三维结构分析(图 6)推测 Q23LG272E 能提高稳定性的原因是: $\alpha 7$ 螺旋上的 Asp197Glu198 与空间位置临近的位于 $\alpha 9$ 螺旋上的 Lys273 有可能形成电网络,272 位的 G 突

变为 E, 则有可能和空间位置邻近的 273 位的 L 形成离子键, 巩固了电离网, 稳定了蛋白质的结构。本实验结果表明 Q23LG272E 突变能够提高 Q23L 的 pH 稳定性, 在 pH3.0 ~ 4.5 和 pH6.5 ~ 7.0 时的稳定性比 Q23L 高, 也高于原酶, 在 pH2.0 ~ 2.5 和 pH7.5 ~ 8.5 比 Q23L 略低(图 4)。蛋白质的三维结构是由离子键、疏水相互作用、氢键、范德华力这些弱相互作用力及二硫键所维持的, 任何能增加这些作用的变化都可以起到稳定蛋白质结构的作用。Q23LG272E 突变所形成的离子键稳定了酶蛋白的结构, 提高了 pH 稳定性。至于在 pH2.0 ~ 2.5 和 pH7.5 ~ 8.5 稳定性略低, 原因有待进一步研究。

A. fumigatus 植酸酶 G272 位于活性中心, 为非保守的氨基酸。Edward^[9]等人对来源于 *A. niger* NRRL 3135, *A. terreus* 9A1, *A. terreus* CBS 116.46, *P. lycii* CBS 686.96, *A. fumigatus* ATCC13073, *A. nidulans* Roche Nr. R1288, *M. thermophila* ATCC48102 的植酸酶序列进行比较分析发现第 272 为带电荷的氨基酸时, 酶的比活性就高; 当为中性氨基酸时, 比活性则低(表 2)。Anderea 等^[10]将 G272 突变为 L, 突变酶在 pH2.8 ~ 3.4 时酶活有所增加。本研究在 Q23L 的基础上将 G272 突变为 E, 结果比活性在 pH7.0 时比 Q23L 略有提高, 由 58u/mg 提高到 72 u/mg, 在其余 pH 值比 Q23L 略低, 但基本维持在 Q23L 的水平。分析 Q23LG272E 比活性略低的原因可能是由于 272 位氨基酸位于活性中心, 虽然为非保守的氨基酸, 但其侧链有可能参与底物的释放。G 突变为 E 导致侧链变大影响了活性中心电子云的排布, 而且较长的侧链会与底物形成氢键, 影响了产物的释放, 使比活性降低。此外 E 为带负电荷酸性氨基酸, 突变导致活性中心负电增加, 不利于与带负电的底物结合。近年来研究也表明比活性的提高涉及到许多氨基酸, 是由组成催化中心, 底物结合位点和其它结构的众多氨基酸的共同作用的结果, 仅靠一两个单点突变大幅提高比活性比较困难^[9, 11, 12]。Edward^[9]将 *A. niger* 植酸酶 K272 突变为 E、D、R、T, 结果 D、R、T 突变在 pH1 ~ 9 范围内比活性均降低, 仅 K272E 突变在 pH4.0 和 5.0 时提高了 56%, 19% 水解植酸的能力, 其余 pH 值均降低。E、D 同属酸性氨基酸, 但突变结果却不相同也说明了这个问题。

突变酶 Q23LG272E 的最适 pH 值为 6.0, 与 Q23L 一致, 在酸性和中性条件下比活性都很高, 在 pH3.0 ~ 7.0 时稳定性很好, 这使得突变酶作用范围更广, 不仅用于猪、鸡等家禽, 还可用于消化道呈中性的鱼类。虽然 Q23LG272E 在 pH7.5 ~ 8.5 稳定性略低, 但实际应用 pH 范围为酸性和中性, 因此对生

产应用影响不大。

本文原酶(即野生型 *A. fumigatus* 植酸酶)的比活性与 Anderea^[7]文章中野生型 *A. fumigatus* 植酸酶比活性有差异, 如在 pH5.0 时前者为 49.3u/mg, 后者为 26.5u/mg。差异可能是由表达的宿主菌不同造成的。本文采用的是毕赤酵母, Anderea 采用的是酿酒酵母。

总之, Q23LG272E 突变提高了 Q23L 在酸性和中性条件下的 pH 稳定性, 而且在 pH7.0 处提高了比活性, 为进一步研究植酸酶的结构与功能提供了优良的材料。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Van Etten RL. Human prostatic acid phosphatase: A histidine phosphatase. *Ann NY Acad Sci*, 1982, **390**: 27 - 51.
- [2] Yao B(姚斌), Fan YL(范云六). Molecular biology and gene engineering of phytase. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2000, **16**(1): 1 - 5.
- [3] Lei XG, Ku PK, Miller ER, et al. Supplementing corn-soybean meal diets with microbial phytase linearly improves phytate phosphorus utilization by weaning pigs. *J Anim Sci*, 1993a, **71**: 3359 - 3367.
- [4] Wodzinski RJ, Ullah AHJ. Phytase. *Adv Appl Microbiol*, 1996, **42**: 263 - 302.
- [5] Liao MX(廖明星), Gu ZX(顾振新). The newest studies and prospects about phytase gene-engineering and development. *Food Science*(食品科学) 2003, **24**(1): 155 - 159.
- [6] Luis P, Monika H, Markus W, et al. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environment Microbiology*, 1997, **63**(5): 1696 - 1700.
- [7] Anderea T, Michel T, Markus W, et al. Optimization of the catalytic properties of *Aspergillus fumigatus* phytase based on the three-dimensional structure. *Protein Science*, 2000, **9**: 1304 - 1311.
- [8] Yao B(姚斌), Zhang CY(张春义), Wang JH(王建华), et al. High level expression of bioactive phytase in *Pichia pastoris* yeast. *Science in China (Series C)*(中国科学 C 辑), 1998, **28**(3): 237 - 243.
- [9] Edward M, Catherine D, Taiwan K, et al. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **297**: 1016 - 1020.
- [10] Anderea T, Roland B, Martin L, et al. Engineering of phytase for improved activity at low pH. *Applied and Environment Microbiology*, 2002, **68**(4): 1907 - 1913.
- [11] Lehmann M, Lopez-Ulibarri R, Loch C, et al. Exchanging the active site between phytases for altering the functional properties of the enzyme. *Protein Science*, 2000, **9**: 1866 - 1872.
- [12] Anderea T, Markus W, Dirk K, et al. Active site residue 297 of *Aspergillus niger* phytase critically affects the catalytic properties. *FEBS Letters*, 2000, **472**: 169 - 172.