

# 弗氏柠檬酸杆菌植酸酶的分离合化及其酶学性质研究

罗会颖, 石鹏君, 李江, 王亚茹, 姚斌\*

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)

**摘要:** 从弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)中分离纯化了一种植酸酶并进行了酶学性质研究, 其反应最适 pH 为 4.0~4.5, 最适温度为 40°C, 在 37°C 下以植酸钠为底物的  $K_m$  值为 0.85nmol/L,  $V_{max}$  为 0.53IU(mg·min), 具有较好的抗胰蛋白酶的能力。酶蛋白的分子量大小约为 45kDa, 成熟酶蛋白 N 端序列为 QCAPEGYQLQQLVMM。

**关键词:** 弗氏柠檬酸杆菌; 植酸酶; 酶学性质

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)01-0139-04

植酸大量存在于植物种子和花粉中, 是植物磷元素的主要贮存形式<sup>[1]</sup>。单胃动物由于胃肠道内缺少分解植酸的酶而不能有效的利用植酸磷, 从而造成磷源浪费、环境污染等很多问题。植酸酶(肌醇六磷酸酶)属于单酯水解酶, 能够将植酸分解为肌醇和动物可利用的无机磷。植酸酶作为一种单胃动物的饲料添加剂, 其饲喂效果已经在全世界范围内得到了广泛的证实<sup>[2,3]</sup>。它可以提高植物性饲料磷的利用率, 同时能消除植酸所引起的抗营养作用, 降低粪便中磷的含量, 从而减少环境中磷的积累污染, 有利于保护生态环境<sup>[3,4]</sup>。

植酸酶广泛存在于动物、植物和微生物中。但由于动物和植物中植酸酶含量极低难以分离纯化, 且其酶学性质不适合在单胃畜的胃肠道中发挥作用。因而从应用的角度出发, 植酸酶的研究逐渐转向微生物来源的植酸酶。目前植酸酶已经成为饲料添加剂和酶制剂研究的热点, 在它的分子生物学和基因工程的研究上都取得了大量进展<sup>[4-6]</sup>, 现研究主要集中在(1)性质更为优良的植酸酶的筛选、分离(2)通过蛋白质工程、基因工程进行酶学性质的改良(3)通过重组微生物反应器高效表达植酸酶, 提高发酵效价, 以进一步降低其生产成本<sup>[7,8]</sup>。性质各异的植酸酶筛选分离是进一步进行基因克隆和高效表达的基础, 同时也为研究植酸酶结构与功能关系, 进而指导植酸酶蛋白质工程、酶分子改良提供材料和信息。从 1968 年起, 人们已经陆续从包括细菌、真菌等几十种微生物中分离得到植酸酶, 并对其生理生化性质进行了较为详细的研究<sup>[4-6]</sup>。

本文报道了一种来源于柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)的新植酸酶分离纯化和酶学性质研究, 此酶具有最适反应温度较低、抗胰蛋白酶的特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株: 柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)为中国农业科

学院饲料所微生物工程室分离、保存。

**1.1.2 试剂和仪器:** 胰蛋白酶(Tryptone)、酵母粉(Yeast extract)为英国 Oxoid 公司产品; 其余试剂为国产分析纯。立式冷冻离心机购自 Sorvall 公司; 蛋白电泳仪、AKTA FPLC 蛋白纯化系统、电洗脱仪均购自 Amersham pharmacia biotech 公司; 超滤膜包购自 Sartorius 公司。

**1.1.3 培养基和培养条件:** 菌株培养使用 LB 培养基(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl), pH7.0, 1.034 × 10<sup>5</sup> Pa 高压下蒸气灭菌 20min。挑取菌株接种于 LB 液体培养基, 8 层纱布封口, 30°C、220r/min 摇瓶培养 24h。

### 1.2 粗酶液的制备

培养物离心去上清, 菌体用去离子水洗涤一次, 加入用缓冲液 A (50mmol/L Tris-HCl, pH7.5) 配置的 40% 蔗糖, 按菌体湿重与蔗糖 1:10 (W/V) 的比例加入, 混合 20min, 14000r/min 离心 15min, 小心弃掉上清。用与蔗糖等体积的缓冲液 B (50mmol/L Tris-HCl, 2mmol/L MgSO<sub>4</sub>, pH7.5) 重悬, 放置 10min, 12000r/min 离心 10min, 得到的溶液即为粗酶液。酶活性测定方法参见文献 [8], 酶活性测定体系 pH 值为 4.5。酶活性单位定义为: 在一定条件下, 每分钟释放出 1mol 无机磷所需的酶量为一个酶活性单位 (IU)。

### 1.3 酶的分离纯化

**1.3.1 离子交换层析:** 将提取的粗酶液用 60%~80% 饱和硫酸铵沉淀过夜, 5000r/min 离心 10min, 收集沉淀, 用适量的缓冲液 A 溶解, 过 5kDa 膜包浓缩并去除硫酸铵和一部分分子量小的杂蛋白。将浓缩液上 DEAE 阴离子柱。加样 0.5mL, 先用 pH8.0 的 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液平衡柱子, 然后用相同缓冲液配制的 0~1mol/L NaCl 梯度洗脱, 流速为 1mL/min, 分部收集, 每管 1mL。对收集管中的溶液进行酶活性测定及蛋白电泳分析。

**1.3.2 凝胶层析:** 经离子交换层析后得到的样品进一步进行分子筛 Superdex™ HR 10/30 预装柱纯化, 加样 0.5mL, 用

基金项目: 国家 863 计划 (2003AA214030); 国家 973 项目 (2004CB719606)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-68975126; Fax: 86-10-68975127; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

作者简介: 罗会颖 (1973-) 女, 河北人, 助理研究员, 研究方向为酶的分子生物学与基因工程。E-mail: huiyingluo@tom.com

其他作者: 黄火青, 袁铁铮, 柏映国

收稿日期: 2005-05-08; 接受日期: 2005-05-18; 修回日期: 2005-10-08

pH8.0、20mmol/L Tris-Cl 缓冲液洗脱,流速 0.4mL/min,分步收集,每管 1mL。对收集管中的溶液进行酶活性测定及蛋白电泳分析。

**1.3.3 电洗脱:**经分子筛得到的有酶活性的收集样通过聚丙烯酰胺 (PAGE) 非变性凝胶电泳将样品中的蛋白各组分分离,取边上一条电泳道的凝胶染色,以此作为对照切下对应的未染色蛋白带,在电洗脱仪上将蛋白洗脱下来,经酶活性测定确定目的蛋白。得到电泳纯的酶蛋白。

#### 1.4 酶学性质研究

**1.4.1 最适 pH 及 pH 稳定性:**经纯化的植酸酶在不同 pH (2.0~10.0) 下进行酶促反应以测定其最适 pH,所用缓冲液为 pH1.0~3.0 的 0.1mol/L 甘氨酸-盐酸系列缓冲液, pH3.5~5.5 的醋酸-醋酸钠系列缓冲液, pH6.0~6.5 的 Tris-醋酸缓冲液, pH7.0~8.5 的 Tris-HCl 缓冲液及 pH9.0~10.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。在 37℃ 下测定酶活性。将酶液在不同 pH 值的缓冲液中于 37℃ 下处理 1h,在 37℃、pH4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液(0.1mol/L)条件下测定酶活性以研究酶的 pH 稳定性。

**1.4.2 酶反应最适温度及热稳定性:**最适温度的测定在 pH4.5、0.1mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液体系及不同温度(20℃~80℃)下进行酶促反应。耐温性测定为在不同温度(60℃、70℃、80℃)下将酶液分别处理 30min,再进行酶活性测定。

**1.4.3 不同金属离子及相关化学试剂对植酸酶活性的影响:**在酶促反应体系中加入不同的金属离子及化学试剂,研究其对酶活性的影响,各种物质终浓度为 1mmol/L。在 37℃、pH4.5 条件下测定酶活性。

**1.4.4 植酸酶反应初速度的测定和  $K_m$  值及  $V_{max}$  的测定:**取

8 支试管,每管都加好底物、缓冲液,在 37℃ 预热 3min,用同一管已稀释好的酶液依次加样,依次在酶作用 1min、3min、5min、7min、10min、15min、20min、30min 时测定酶活性,然后算出酶活性与反应时间的比值,在一定时间内比值保持稳定,则在此时间内酶作用为一级反应,此时间即可确定为测  $K_m$  值和  $V_{max}$  的反应时间。用不同浓度的植酸钠为底物,在 pH4.5、0.1mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液体系中,37℃ 下测定酶活性,计算相应的反应速度,利用米氏方程双倒数法求得  $K_m$  值及  $V_{max}$ 。

**1.4.5 植酸酶抗胃蛋白酶和抗胰蛋白酶的能力:**用 pH2.0 的 Gly-HCl 缓冲液配制 0.1mg/mL 胃蛋白酶, pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制 0.1mg/mL 胰蛋白酶。取 0.5mL 植酸酶酶液分别加入 0.5mL 胃蛋白酶和胰蛋白酶混合,蛋白酶/植酸酶 (W/W)≈0.1,37℃ 处理 120min,不同处理时间取样测定酶活性。

#### 1.5 成熟蛋白 N 端氨基酸序列测定

由上海基康公司对纯化的蛋白进行 N 端序列测定。

## 2 结果和分析

### 2.1 植酸酶的纯化

对纯化过程的离子交换层析、凝胶层析、电洗脱各步分别进行酶活性测定及蛋白浓度测定,蛋白质浓度的测定通过 280nm 光吸收法,蛋白质浓度 (mg/mL) = (1.45 ×  $A_{280}$ ) - (0.74 ×  $A_{260}$ ),结果见表 1。纯化完成后,比活性从粗酶液的 0.32IU/mg 提高到 13.20IU/mg,纯化倍数为 41.3 倍,回收率为 9.3%。SDS-PAGE 结果(图 1)表明,纯化后的植酸酶蛋白仅有 1 条单一的条带,分子量约为 45kDa。

表 1 植酸酶纯化

Table 1 Purification of phytase from *Citrobacter freundii*

Enzyme sample	Volume /mL	Protein concentration (mg/mL)	Total activity /IU	Specific activity (IU/mg)	Recovery /%
Cell extracts	1000	1.01	326.0	0.32	100.0
Anion exchange chromatography	20	2.65	216.0	4.05	66.0
Size chromatography	44	0.10	50.7	11.37	15.5
Gel elution	2.5	0.90	30.4	13.20	9.3

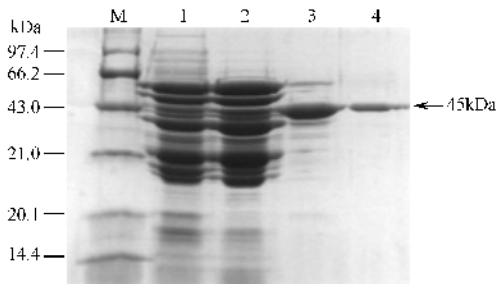


图 1 植酸酶的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE analysis of phytase

M. Standard protein molecular weight; 1. Cell extracts; 2. Phytase after anion exchange chromatography; 3. Phytase after size chromatography; 4. Phytase after gel elution.

### 2.2 植酸酶的酶学性质研究

**2.2.1 植酸酶的最适 pH 及 pH 稳定性:**纯化后的植酸酶在

不同 pH 的缓冲体系、37℃ 下测定的酶活性结果表明,植酸酶的最适 pH 为 4.0~4.5。植酸酶在一系列不同 pH 的缓冲液中 37℃ 下处理 1h 后,再在最适 pH 下测定酶活性,结果表明,在 pH5.0~7.0 之间保持 90% 以上的酶活性。

**2.2.2 酶反应最适温度及热稳定性:**酶反应最适温度测定结果表明,植酸酶最适温度为 40℃。酶的热稳定性实验表明,在 60℃、70℃ 下保温 4min 后,酶活性完全消失,说明此酶的热稳定性较差。

**2.2.3 不同金属离子和化学试剂对植酸酶酶活性的影响:**在酶促反应体系中加入不同的化学试剂,然后分别测定酶活性。结果表明:EDTA 基本不影响该植酸酶酶活性, $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  对酶活性有轻微的抑制作用。 $Zn^{2+}$  对酶促反应有显著的抑制作用,而 SDS 则完全抑制了其植酸酶活性(表 2)。

表 2 各种金属离子和化学试剂对植酸酶活性的影响

Table 2 Effect of various chemicals and metal ions on the activity of phytase

Metal ions and chemicals	Relative activity/%	Metal ions and chemicals	Relative activity/%
CK	100	Cu <sup>2+</sup>	78.2
K <sup>+</sup>	98.6	Fe <sup>2+</sup>	88.8
Mg <sup>2+</sup>	98.5	Fe <sup>3+</sup>	87.3
Zn <sup>2+</sup>	18.7	EDTA	100.9
Ca <sup>2+</sup>	95.6	SDS	0
Cr <sup>3+</sup>	88.6		

2.2.4 植酸酶反应初速度的测定:测定植酸酶的反应初速度,结果在 0~30min 内酶活性与反应时间的比值均保持稳定,其反应初速度为  $1.01 \times 10^{-3} \text{ IU}(\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$

2.2.5 植酸酶的  $K_m$  值及  $V_{max}$  的测定:根据以上所测定的植酸酶的反应初速度,确定测其  $K_m$  值及  $V_{max}$  时的反应时间为 10min。按照米氏方程,采用双倒数做图法,绘制重组植酸酶的动力学曲线,求出  $K_m$  和  $V_{max}$ 。结果表明此植酸酶的  $K_m = 0.85 \text{ nmol/L}$ ,  $V_{max} = 0.53 \text{ IU}(\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$

2.2.6 植酸酶抗胃蛋白酶和抗胰蛋白酶的能力:植酸酶用胰蛋白酶处理 20min 后,剩余酶活性达到 80%,60min 后剩余酶活性在 70%,延长到 120min 后,剩余酶活性也还有近 50%。用胃蛋白酶处理 5min 后,酶活性完全消失。说明植酸酶具有较好的抗胰蛋白酶水解能力,基本不具有抗胃蛋白酶水解的能力。

### 2.3 成熟蛋白 N 端氨基酸序列

经氨基酸序列测定,纯化后的植酸酶成熟蛋白 N 端氨基酸序列为:QCAPEGYQLQQVLM。M。

## 3 讨论

由于此植酸酶为胞内酶,且含量较低,杂蛋白量大,纯化较困难,最终的酶蛋白回收率仅为 9.3%。在经过阴离子交换层析和分子筛层析后,还存在少量的杂蛋白,进一步通过电洗脱的方法纯化,纯化后的酶蛋白无论在变性电泳和非变性电泳上均呈单一条带,达到了电泳纯。电洗脱的缺点之一是回收率低,尤其是蛋白分子量较大时,该研究中此步骤的回收率仅有 60%;另一缺点是如无前期根据不同性质进行的层析柱纯化,进行电洗脱往往难以得到纯蛋白。但在本研究中,经过阴离子交换层析和分子筛层析后,已经去掉了 99% 的杂蛋白,在这种情况下,电洗脱也不失为一种有效的方法。

从纯化的成熟蛋白 N 端测定的 15 个氨基酸序列来看,其与目前报道的植酸酶无同源性,而与来源于 *E. coli*<sup>[9]</sup>、*Shigella flexneri*<sup>[10]</sup>、*Salmonella*<sup>[11,12]</sup>、*Enterobacter*(GenBank 收录号 CAH04131) 中的葡萄糖-1-磷酸酶有同源性,与前三者有 3 个氨基酸不同,同源性为 80%,与后者有 5 个氨基酸的差异,同源性为 67%。2003 年 Kim 等<sup>[13]</sup>报道了从 *Citrobacter braakii* 分离的植酸酶,2004 年 Zimin 等在 GenBank 中直接注册了一个来源于 *Citrobacter freundii* 的植酸酶基因(GenBank 收录

号 AY390262),但它们的 N 端序列与此酶的 N 端无同源性。

从此酶的酶学性质来看,与目前报道的植酸酶相比有一些特殊的地方(1)它的最适温度仅为 40℃,而目前报道的植酸酶和实际应用的植酸酶基本上是中温酶,如现在广泛应用的曲霉来源植酸酶 PHYA<sup>[14-16]</sup>、大肠杆菌等细菌来源植酸酶 APPA 等<sup>[8,17,18]</sup>,其最适温度为 50~60℃。从应用的角度来说,植酸酶的作用场所是在动物的胃肠道,其温度在 37~40℃,与此酶的最适温度相适应。(2)具有一定的抗胰蛋白酶的能力,曲霉来源的植酸酶和细菌来源的大部分植酸酶一般对胃蛋白酶和胰蛋白酶很敏感,而大肠杆菌来源的植酸酶虽有较好的胃蛋白酶抗性<sup>[8]</sup>,但胰蛋白酶抗性较差。目前唯一报道对胰蛋白酶具有良好抗性的也是来源于 *Citrobacter* 的植酸酶<sup>[13]</sup>,但从酶的 N-端氨基酸序列来看,与本研究分离的植酸酶无同源性。(3)最适 pH 较低,在酸性条件下维持较高的活性,更适用于在猪饲料中应用。这些特点一方面使其具有一定的应用潜力,另外作为基因材料可用于植酸酶的蛋白质工程研究,了解结构与功能的关系,并获得性质更为优良的植酸酶突变体。

## 参 考 文 献

- [1] Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytases in legumes and cereals. *Adv Food Rev*, 1982, **28**: 1-92.
- [2] Nelson TS, Shieh TR, Wodzinski RJ, et al. The availability of phytate phosphorus in soya bean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poult Sci*, 1968, **47**: 1842-1848.
- [3] Nelson TS, Shieh TR, Wodzinski RJ, et al. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J Nutr*, 1971, **101**: 1289-1293.
- [4] Lei XG, Porres JM. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(21): 1787-1794.
- [5] Vohra A, Satyanarayana T. Phytase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2003, **23**(1): 29-60.
- [6] 姚斌,范云六. 植酸酶的分子生物学与基因工程. *生物工程学报*, 2000, **16**(1): 1-5.
- [7] Yao B, Zhang CY, Wang JH, et al. High-level expression of bioactive phytase in *Pichia pastoris* yeast. *Science in China (Series C)*, 1998, **28**(3): 237-243.
- [8] 罗会颖,姚斌,袁铁铮,等. 来源于 *Escherichia coli* 的高比活植酸酶基因的高效表达. *生物工程学报*, 2004, **20**(1): 78-84.
- [9] Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, **277**(5331): 1453-1474.
- [10] Jin Q, Yuan Z, Xu J, et al. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insight into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K-12 and O157. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(20): 4432-4441.
- [11] McClelland M, Sanderson KE, Clifton SW, et al. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet*, 2004, **36**(12): 1268-1274.

- [ 12 ] Deng W , Liou SR , Plunkett III G , et al . Comparative genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* , 2003 , **185** ( 7 ) : 2330 - 2337 .
- [ 13 ] Kim HW , Kim YO , Lee JH , et al . Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii* . *Biotechnol Lett* , 2003 , **25** ( 15 ) : 1231 - 1234 .
- [ 14 ] Piddington CS , Houston CS , Paloheimo M , et al . The cloning and sequencing of the genes encoding phytase( *phy* ) and pH2.5-optimum acid phosphatase( *aph* ) from *Aspergillus niger* var. *awamori* . *Gene* , 1993 , **133** : 55 - 62 .
- [ 15 ] Wyss M , Brugger R , Kronenberger A , et al . Biochemical characterization of fungal phytases ( myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolases ) catalytic properties. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** : 367 - 373 .
- [ 16 ] Ullah AH , Sethumadhavan K . *PhyA* gene product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. *Biochem Biophys Res Commun* , 2003 , **303** ( 2 ) : 463 - 468 .
- [ 17 ] Greiner R , Konietzny U , Jany K . Purification and characterization of two phytase from *Escherichia coli* . *Arch Biochem Biophys* , 1993 , **303** : 107 - 113 .
- [ 18 ] Palacios MC , Haros M , Rosell CM , et al . Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus* : regulation and biochemical properties. *J Appl Microbiol* 2005 , **98** ( 1 ) : 229 - 237 .

## Purification and properties of *Citrobacter freundii* phytase

LUO Hui-ying , SHI Peng-jun , LI Jiang , WANG Ya-ru , YAO Bin\*

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

**Abstract** : Phytase ( myo-inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisphosphate phosphohydrolase , EC 3.1.3.26 ) catalyses the step-wise hydrolysis of phytic acid ( myo-inositol hexakisphosphate ). Phytases are of great commercial importance due to their usage as supplement of food and animal feed , which can cater to nutrition demands and alleviate environmental problems , has been approved by many countries . Although acid phytases have been extensively studied , information regarding the phytases from *Citrobacter* is limited . In the work presented , a phytase was separated from *Citrobacter freundii* . After steps of electrophoretic homogeneity by successive ammonium sulfate between 60% and 80% saturation precipitation , DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography and gel filtration through Superdex HR 10/30 , final gel elution resulted in a 41.3-fold purification and yield of 9.3% . Gel elution is an effective method to purify the protein which contaminated with a few other proteins . The purified preparations were used in subsequent characterization studies . Based on SDS-PAGE analysis , the molecular weight of the purified phytase was calculated to be approximately 45.0kDa in monomeric form . The pure enzyme has an optimum pH of 4.0 ~ 4.5 . It was found stable between pH5.0 ~ 7.0 , about 90% of the enzyme activity was retained at 37°C for 60min . The phytase has an optimum temperature of 40°C which was lower than that of other phytases from *Aspergillus* or *E. coli* ( average 50 ~ 60°C ) and was close to the temperature of gastrointestinal tract in animals ( 37 ~ 40°C ) . Thus the enzyme is a promising candidate for animal feed applications . Activity of the purified phytase was influenced by changing the reaction temperature . Data showed that the enzyme retained its activity over a long period when stored at 4°C , whereas thermal inactivation studies indicated that the enzyme lost 100% activity after treatment at 60°C for 4min . The  $K_m$  values of the phytase for dodecasodium phytate at 37°C was 0.85nmol/L with a  $V_{max}$  0.53IU( mg · min ) . Phytase activity was strongly inhibited by SDS ,  $Zn^{2+}$  and moderately inhibited by  $Cu^{2+}$  ,  $Cr^{3+}$  ,  $Fe^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  . Activity was not significantly affected by EDTA ,  $K^+$  ,  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  . The phytase has excellent resistance to trypsin , but not pepsin . The N-terminal amino acids sequence of the phytase protein was determined as QCAPEGYQLQQVLM which exhibited about 80% homology to Glucose-1-phosphatases from *E. coli* , *Shigella flexneri* and *Salmonella* , whereas it did not show apparent sequence similarity with any other phytase listed in the databases . Initial characterization of the purified enzyme suggested that it is a potential candidate for use as an animal feed supplement .

**Keywords** : *Citrobacter freundii* ; Phytase ; Enzyme properties

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 2003AA214030 ) ; The National Basic Research Program ( 2004CB719606 )

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

Other authors : HUANG Huo-qing , YUAN Tie-zheng , BAI Ying-guo

Received 3 May 2005 / Accepted 18 May 2005 / Revised 3 October 2005

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn