

来源于柠檬酸杆菌的高比活植酸酶基因在毕赤酵母中的高效表达

黄火清, 罗会颖, 柏映国, 王亚茹, 姚 斌*

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)

摘 要 柠檬酸杆菌(*Citrobacter braakii*)来源的植酸酶是目前报道的比活最高的植酸酶。按照毕赤酵母(*Pichia pastoris*)对密码子的选择偏向性,对来源于柠檬酸杆菌的高比活植酸酶基因 *AppA* 进行了密码子优化改造。改造后的基因 *AppA*(*m*)按正确的阅读框架融合到毕赤酵母表达载体 pPIC9 的 α -因子信号肽编码序列 3' 端,通过电击转化得到重组转化子。通过 PCR 验证, *AppA*(*m*)已整合在酵母染色体上。SDS-PAGE 分析和表达产物的研究表明,植酸酶得到了高效分泌表达,在 5L 发酵罐中植酸酶蛋白表达量达到 3.2mg/mL 发酵液,发酵效价达到每毫升发酵液 1.4×10^7 IU 以上,高于目前报道的各种植酸酶基因工程菌株的发酵效价。

关键词 :高比活植酸酶 ;基因改造 ;毕赤酵母 ;高效表达

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)06-0945-06

植酸酶(EC3.1.3.8, *myo*-inositol hexaphosphate phosphohydrolase)是一种可以将植酸降解为肌醇和磷酸的酶,目前已广泛的应用在单胃动物饲料中。植酸酶的应用可提高植酸磷的利用率,减少粪便中磷的排放量,从而降低环境中的磷污染,并可减少植酸的抗营养作用^[1]。

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^[2~4]。目前研究的重点主要集中在性质优良的植酸酶的筛选、分离、酶学性质的改良以及通过重组微生物反应器进行高效表达等方面的研究^[5,6]。其中高比活植酸酶的研究正在成为植酸酶研究的热点之一。已分离到多个不同来源的高比活植酸酶并克隆了相关基因^[7~9],其中来源于瘤胃微生物 *Selenomonas ruminantium* JY35、大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 33965 的植酸酶基因在重组毕赤酵母中均实现了高效分泌表达^[5,10]。大肠杆菌植酸酶基因经优化在毕赤酵母中的绝对表达量为 2.5g/L,发酵效价达 7.5×10^6 IU/mL 发酵液,是目前广泛用于工业生产的菌株。为进一步提高植酸酶的发酵效价,一方面可对现有菌株进行改良,而另一方面则是发掘比活更高的植酸酶并实现其高效表达。

来源于 *Citrobacter braakii* 的植酸酶^[11]的比活性

为 3.5×10^6 IU/mg,是目前发现的比活性最高的植酸酶,比目前工业生产并广泛应用的曲霉来源的植酸酶^[10]高出近 35 倍。本文报道了此酶编码基因 *AppA* 的改造及在毕赤酵母中的高效表达,重组菌株有望用于植酸酶的工业化生产,从而进一步大幅度降低植酸酶的生产成本。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :大肠杆菌 JM109 菌株、质粒 pUC19、pBluscript SK- 酵母菌株 *Pichia pastoris* GS115 (*His⁻ Mut⁺*) 质粒 pPIC9 均为本实验室保存。

1.1.2 酶和试剂 :限制性核酸内切酶均购于 Gibco 和大连宝生物工程公司, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, T4 多核苷酸激酶、脱糖基化酶 Endoglycosidase H 为 Biolab 公司产品,蛋白质分子量标准为 Pharmacia 公司产品;植酸钠(肌醇六磷酸十二钠)购自 Sigma 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基和培养条件 :大肠杆菌培养基 LB,参照文献^[12] 配制。酵母生长培养基 YPD、转化培养基 RDB、选择培养基 MM、MD 以及诱导表达培养基 BMGY、BMMY、发酵培养基 10 × Basal Salts、微量盐溶液 PTM1 均根据 Invitrogen 公司操作手册配制。

基金项目 :国家“863 计划”(2003AA214030)

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

作者简介 :黄火清(1981 -)男,江西人,硕士研究生,研究方向为酶的分子生物学与基因工程。E-mail :huoqinghuang@126.com

其他作者 :孟 昆,袁铁铮,杨培龙

收稿日期 :2006-03-02 ;接受日期 :2006-04-26 ;修回日期 :2006-06-22

1.2 高比活植酸酶基因 *AppA* 的改造、人工合成及克隆

根据编码 *Citrobacter braakii* 植酸酶成熟蛋白的基因序列^[11],按照毕赤酵母密码子的偏爱性^[13],在不改变其氨基酸序列的前提下进行序列改造,同时在序列中避免富含 AT 序列(ATTTA、AATAA、AATTAA 等)的出现。并按所用克隆载体的多克隆位点设计、添加合适的限制性内切酶位点,设计改造后的植酸酶基因双链分为 A1~A10, B1~B15, C1~C9, D1~D11, E1~E10 共 55 个寡聚 DNA 片段分别进行合成,合成后的片段退火成 A、B、C、D、E 5 个片段,再通过此 5 个片段两端设计的酶切点,分别克隆到载体 pBluscript SK-和 pUC19 上,再将各片段依次拼接成完整的 *AppA*(m) 基因。

1.3 植酸酶基因 *AppA*(m) 表达载体的构建

带有改造基因 *AppA*(m) 的质粒 pUC19-*AppA*(m) 及酵母表达载体 pPIC9 分别双酶切(*Eco*R I + *Not* I) 将载体与基因连接,筛选挑出阳性克隆子 pPIC9-*AppA*(m)。DNA 的重组操作主要依据 Sambrook 手册^[11]进行。

1.4 酵母的电击转化及筛选

转化和筛选主要操作流程参照 Invitrogen 公司的毕赤表达操作手册。其中有部分修改,简单描述如下:取 80 μ L 感受态细胞,加入 1~5 μ g 用 *Bgl* II 线性化的重组质粒,混合后转移至预冷的 0.2cm 电击杯中,置电击仪电击转化。电击结束后立即加入 1mL 预冷的 1mol/L 的山梨醇,混匀后,以每板 300 μ L 菌液涂布到固体 MD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养至转化子长出。将在 MD 上生长的转化子用牙签挑取按先后顺序分别点到 MM 和 MD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2d,在 MD 上生长正常而在 MM 上生长缓慢或不生长的转化子为阳性克隆子。

1.5 重组酵母的诱导表达

重组酵母在 5mL BMGY 培养基中于 30 $^{\circ}$ C 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 30 $^{\circ}$ C 诱导培养,48h 后取样检测各菌株上清液的植酸酶活性,从中筛选出表达植酸酶的转化子。

酶活性单位定义为:在一定条件下,每分钟释放出 1nmol 无机磷所需的酶量为一个酶活性单位(IU)。酶活性测定方法参见文献[7],酶活性测定体系 pH 值为 4.5。

1.6 重组酵母中植酸酶基因的 PCR 检测分析

通过 α -factor 信号肽序列及 pPIC9 的 *HIS4* 序

列,染色体上 *AOX1* 启动子前面的序列和植酸酶基因内部的序列,分别设计合成两对引物,对整合到酵母染色体上的植酸酶基因进行 PCR 扩增,所用引物终浓度为 0.2pmol/ μ L。DNA 模板为 0.1 μ g。扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 10min, 95 $^{\circ}$ C 60s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 共进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。

1.7 表达产物的 SDS-PAGE 分析及脱糖基化处理

选取在摇床诱导表达 48h 后有酶活性的转化子,离心取 8 μ L 上清液进行 SDS-PAGE 分析。取 9 μ L 上清液进行脱糖基化处理,建立如下反应体系:9 μ L 上清液加 1 μ L 10 \times Glycoprotein 变性缓冲液,100 $^{\circ}$ C 反应 10min 后加 1.2 μ L 10 \times G5 缓冲液、1 μ L Endo H, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

1.8 发酵罐水平植酸酶的表达

选取摇床水平上植酸酶活性高的转化子,研究其发酵罐条件下植酸酶的表达。重组酵母的发酵为高细胞密度补料发酵,发酵过程分为菌株培养阶段、碳源饲喂阶段和诱导表达阶段,具体方法见 Invitrogen 操作手册。在诱导过程中每 12h 取样 1 次测定表达的植酸酶的积累量并进行表达蛋白的 SDS-PAGE。

1.9 表达植酸酶酶学性质的测定

1.9.1 酶的纯化 毕赤酵母表达的植酸酶纯化方法如下:首先进行脱盐处理,再经分子筛 Superdex-75 纯化。分步收集洗脱峰,每管 1mL,选取酶活性最高的几管电泳检测其纯度,以达到电泳纯的收集液作为表达植酸酶酶学性质研究的样品。

1.9.2 pH 值和温度对酶活力和稳定性的影响 将酶液在不同 pH 值的缓冲液中于 37 $^{\circ}$ C 下处理 1h 及在不同温度(60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C)下分别处理 30min,在 37 $^{\circ}$ C、pH4.5 的条件下分别测定酶活性以测定酶的 pH 稳定性和酶的热稳定性。

1.9.3 酶比活性测定 酶的比活单位的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,测定纯化的植酸酶蛋白含量,同时在最适 pH4.5, 37 $^{\circ}$ C 条件下,测定植酸酶酶活性,由此得到酶的比活(IU/mg 酶蛋白)。

1.9.4 酶的动力学参数 用不同浓度的植酸钠为底物,在 pH4.5、37 $^{\circ}$ C 条件下反应 10min 测定酶活性,计算出酶的 K_m 值及 V_{max} 。

1.9.5 化学试剂对酶活力的影响 酶促反应体系中加入终浓度为 1mmol/L 的不同的金属离子及化学试剂,在 37 $^{\circ}$ C、pH4.5 条件下测定酶活性,研究其对酶活性的影响。

1.9.6 蛋白酶对酶活力的影响 取 0.5mL 纯化后的植酸酶酶液, 分别加入 0.5mL 胃蛋白酶(pH2.0 , 0.1mg/mL) 和胰蛋白酶(pH7.0 , 0.1mg/mL) , 37℃ 保温, 不同时间取样, 37℃、pH4.5 条件下测定酶活性。

2 结果

2.1 AppA 基因的设计改造及克隆

综合了影响基因表达的各种因素, 对植酸酶基因进行改造, 以使其能够在目标宿主——毕赤酵母的真核表达系统中高效表达。改造的总体原则是: (1) 不改变原有植酸酶基因所编码的氨基酸序列; (2) 根据报道的毕赤酵母密码子的选择偏向及 G + C 的含量特征, 并尽量避免在密码子的第二、三位碱基上出现 CG 组合, 对密码子进行优化; (3) 改造过程中要避免一些可能降低表达的序列, 如: ATTTA、AATAA、AATTAA 等。

AppA 基因去掉信号肽序列后全长 1236bp。按毕赤酵母密码子偏向, 在不改变氨基酸序列的前提下进行改造, 共改变了 207 个碱基涉及 192 个密码子, G + C 含量由原来的 43.3% 变为 47.1%, 密码子第三位碱基的 G + C 含量由原来的 36.9% 变为 51.7%, 基本符合毕赤酵母 G + C 的含量特征。

在合成基因时, 考虑到基因的长度、载体上的酶切位点, 笔者将基因分为 A(240bp)、B(332bp)、C(198bp)、D(248bp)、E(218bp) 5 个大片段, 然后再进一步将 5 个大片段分成小片段分别进行单链合成。另外, 为便于进行克隆操作, 以及考虑到目的基因片段在载体上的正确插入方向, 在合成的 A 片段的 5' 端设计了 EcoR I、Kpn I、EcoR I 3 个酶切位点序列, 3' 端设计了 Sma I 酶切位点序列; 在 B 片段的 5' 端设计了 Sma I, 3' 端设计了 Hind III 酶切位点序列; 在 C 片段的 5' 端设计了 Hind III, 在 3' 端设计了 Pst I 酶切位点; 在 D 片段的 5' 端设计了 Pst I, 在 3' 端设计了 Spe I 酶切位点; 在 E 片段的 5' 端设计了 Spe I, 在 3' 端设计了 Not I 酶切位点; 利用这些酶切位点可方便地将基因片段 A、B 克隆到载体 pUC19 上, 片段 C、D、E 克隆到载体 pBluscript SK- 上。然后通过 Kpn I 和 Hind III 将 AB 拼接于克隆有 CDE 片段的 pBluscript SK- 上。从而拼接成完整的植酸酶基因 AppA(m), 用 pBluscript SK- 载体上的通用引物进行 AppA(m) 基因的全序列分析, 结果证实了合成的基因 DNA 序列与设计的序列一致。

2.2 重组酵母表达载体的构建

经改造的 AppA 基因 AppA(m) 通过 EcoR I 和

Not I 位点以正确的阅读框架与酵母表达载体 pPIC9 的 α -因子信号肽序列的 3' 端融合, 得到重组表达载体 pPIC9-AppA(m) (图 1)。通过酶切鉴定证实重组质粒构建正确。

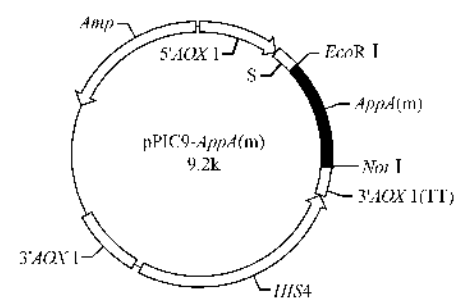


图 1 重组表达质粒 pPIC9 - AppA(m) 的物理图谱
Fig.1 Physical map of recombinant expression plasmid pPIC9-AppA(m).

2.3 重组酵母的获得与筛选

重组载体上带有 His4 基因及乙醇氧化酶基因 (AOX1) 的 5' 与 3' 同源序列区, 经 Bgl II 线性化电击转化受体菌 GS115 (His-Mut +) 后, 只有 His4 基因整合到酵母染色体上的重组酵母才能在不加 His 的培养基 MD 上正常生长, 从而通过这一标记筛选到 His + 转化子。进一步在试管中诱导表达, 通过酶活性测定, 从 200 株带有改造植酸酶基因的重组酵母中筛选到 75 株表达植酸酶的重组子, 其中表达量最高的 3 株重组子分别定名为 P. pastoris AppA(m) 15[#]、38[#]、176[#]。

2.4 重组酵母中植酸酶基因的 PCR 分析

为了检测植酸酶基因在酵母染色体上的整合, 通过 α -factor 信号肽序列及 pPIC9 的 HIS4 序列设计引物(P1)对 GS115 和 38[#] 重组子进行 PCR 扩增, GS115 没有扩增出目的条带, 38[#] 重组子扩增出约 2.1kb 大小条带, 与重组载体上的目的序列大小一致, 证实该植酸酶基因在酵母染色体上整合。同时用染色体上 AOX1 启动子前面的序列和植酸酶基因内部的序列设计引物(P2)对 GS115 和 38[#] 重组子进行 PCR 扩增, GS115 没有扩增出目的条带, 38[#] 重组子扩增出约 1.3kb 大小条带, 证实目的基因在 AOX1 部位整合用基因两端的引物。进一步测定扩增产物的序列, 结果表明, 整合的植酸酶基因序列完全正确。

2.5 摇床水平表达植酸酶的 SDS-PAGE 分析及脱糖基化

通过 SDS-PAGE 鉴定植酸酶蛋白的表达(图 2), SDS-PAGE 分析结果表明, 毕赤酵母表达的植酸酶出现分子量大小不同的蛋白条带, 其表观分子量在

49kDa 到 58kDa 之间,均比从氨基酸序列推断出的理论分子量(约 46.5kDa)大。分析该植酸酶的氨基酸序列,发现有 5 处潜在糖基化位点,所以有可能是因为糖基化造成分子量偏大,而不同程度的糖基化造成表达蛋白分子量的差异。将表达外源蛋白进行脱糖基处理后,不同分子量的蛋白带,均变为同一条分子量约 47kDa 的蛋白带,与 AppA(m)基因产物的理论分子量相当。

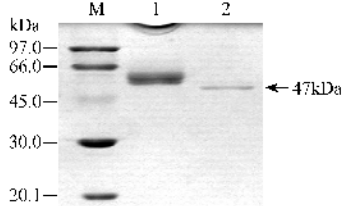


图2 摇床水平表达植酸酶脱糖基前后的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed phytase in shake flask culture and deglycosylated by Endo H. M. Standard protein molecular weight ; 1. Expressed phytase by recombinants *P. pastoris* pPIC9-AppA(m)38 # ; 2. Expressed phytase deglycosylated by Endo H.

2.6 发酵水平植酸酶的表达

选择摇床水平表达量高的毕赤酵母重组菌株 38 # 进行 5L 发酵罐发酵研究,发酵过程分为两个阶段:一为菌体的生长阶段,二为诱导表达阶段。在菌体生长阶段以葡萄糖为碳源,诱导阶段以甲醇为碳源。在菌体生长阶段发酵上清中检测不到植酸酶活性。随着甲醇的诱导,上清中植酸酶酶活力显著增加,酶蛋白不断积累(图 3)。经甲醇诱导 132h 后植酸酶绝对表达量达到 3.2mg/mL,发酵效价 1.4×10^7 IU/mL 以上。

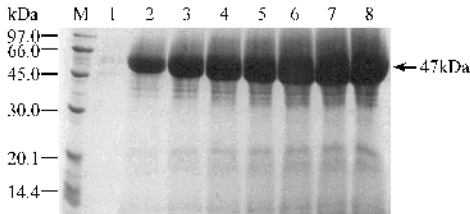


图3 5L 发酵罐表达植酸酶不同时间取样的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE of expressed phytase in the 5L fermentor with different induction time. M. Standard protein molecular weight ; 1. Fermented broth before induced by methanol ; 2 ~ 8. Fermented broth after induced by methanol for 12h, 36h, 60h, 84h, 108h, 120h and 132h, respectively.

2.7 表达产物植酸酶 AppA 的酶学性质测定

表达的植酸酶的各种酶学性质测定结果表明:(1)其最适 pH 值为 4.0~4.5。在 pH 3.5~8.5 的范围内,植酸酶的相对活性都在 70% 以上。其中,在 pH3.5~6.5,植酸酶的相对活性都稳定在 90% 以

上。pH 1~3 时,酶活力下降迅速,但仍维持在 40% 以上(图 4)。(2)AppA 在 pH4.5 不同温度下酶活性

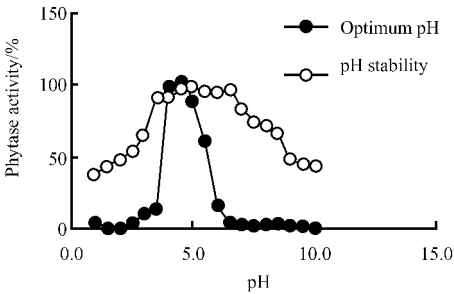


图4 重组植酸酶 AppA 的最适 pH 和 pH 稳定性曲线

Fig.4 The optimum pH and pH stability of AppA.

的测定结果表明,该酶的最适温度为 55℃,在 40~55℃ 范围内,植酸酶的相对活性在 50% 以上(图 5-A)。70℃ 条件下处理 10min 后,酶的剩余活性为 7.5%,而 80℃ 处理 1min 后,酶活仅余 18%。说明该酶耐热性较差(图 5-B)。(3)表达的植酸酶比活为 4.3×10^6 IU/mg, $K_m = 0.165$ mmol/L, $V_{max} = 3306878.3$ IU/mg·min。(4)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, K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 EDTA 对 AppA 有轻微的激活作用;金属离子 Zn^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对 AppA 的酶促反应均较强的抑制作用,尤其是 Cu^{2+} 抑制力最强。而 SDS 完全抑制了其植酸酶活性。(5)在 pH2.0 用胃蛋白酶处理植酸酶 AppA 5min 后酶活性余 50%,用胃蛋白酶处理 120min 后,酶活性基本消

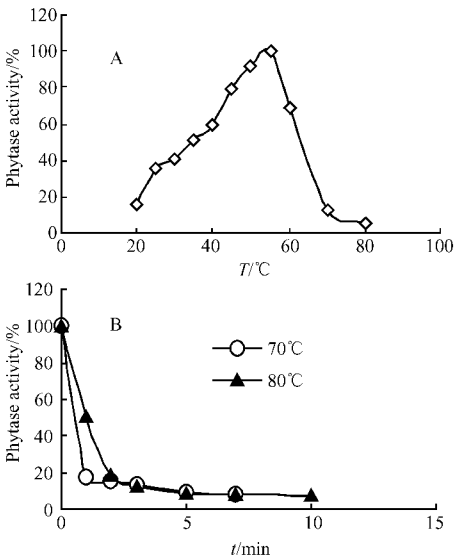


图5 重组植酸酶 AppA 的最适温度(A)和热稳定性(B)曲线

Fig.5 The optimum temperature (A) and thermal stability (B) of AppA.

失。由于胃蛋白酶处理是在酸性条件下进行处理的,分析可能是酸性环境对酶活性的影响与蛋白酶共同作用的结果。用胰蛋白酶处理 120min 后,剩余 23% 的酶活性。说明植酸酶 AppA 具部分抗胰蛋白酶水解的能力。

3 讨论

高比活植酸酶的高效表达,正在成为大幅度地提高植酸酶的发酵效价,进一步降低其生产成本的一个有效途径。来源于 *Selenomonas ruminantium* 的植酸酶基因 *phyS* 在毕赤酵母中表达^[10] 绝对表达量为 4mg/mL,但其效价已达到 1.6×10^6 IU/mL。而来源于 *E. coli* 的植酸酶基因 *appA* 经改造后在重组酵母中的绝对表达量虽然仅有 2.3mg/mL,但其效价已达到 7.5×10^6 IU/mL 以上^[5],证明了采用高比活基因的有效性。来源于 *Citrobacter braakii* 的植酸酶^[11] 的比活性为 3.5×10^6 IU/mg,是目前发现的比活性最高的植酸酶,比原来用于工业生产并广泛应用的曲霉来源植酸酶^[10] 高出近 35 倍。本文将来源于 *Citrobacter braakii* 的植酸酶基因进行了改造,在毕赤酵母表达系统实现了高效表达,绝对表达量为 3.2mg/mL,发酵效价可高达 1.4×10^7 IU/mL 以上,较目前广泛应用的大肠杆菌来源的植酸酶的发酵效价提高了近一倍,是目前报道的表达酶活性最高的植酸酶。应用于工业生产可使生产成本进一步大幅度降低。从而推动植酸酶在我国的广泛应用。经测定毕赤酵母表达的该植酸酶的比活为 4.3×10^6 IU/mg,较原报道的酶的比活有所提高。经毕赤酵母表达的植酸酶比活发生变化(或降低或提高)的问题,一直是困扰我们而没有解决的一个问题,我们将在今后继续进行研究。

毕赤酵母表达系统会使外源蛋白进行糖基化。如大肠杆菌来源的植酸酶的表达一样,在重组酵母中表达的该柠檬酸杆菌植酸酶蛋白是分子量在 49kDa 到 58kDa 之间,分析发现该酶分子上有 5 个糖基化位点,脱糖基处理结果表明,该酶蛋白为糖蛋白,糖基化程度为 5% ~ 25%,不同程度的糖基化造成了其分子量的差异。而这些分子量有差异的植酸酶蛋白分子之间在酶学性质上是否有细微的差异,正在进一步的研究之中。

对重组植酸酶的抗蛋白酶能力的研究发现其具有一定的抗胰蛋白酶的能力,但抗胃蛋白酶能力较弱。与报道的非重组酶抗蛋白酶性质^[11] 不同,其原因正在进一步研究。在进行饲喂试验时也发现,体外试

验与体内试验的结果并不完全一致,其饲喂效果同目前广泛应用的大肠杆菌来源的植酸酶相当。研究中还发现该植酸酶的热稳定性较差,这也是目前所报道的酸性植酸酶遍存在的问题,都没有能通过高温制粒的。如:目前广泛应用的黑曲霉来源的植酸酶^[10]、大肠杆菌来源的植酸酶^[9]等,在性质上与理想饲料用酶相比也都还存在很大的缺陷,但这并不是限制植酸酶广泛应用的决定因素。人们通过基因工程、酶工程等对植酸酶分子进行改造,可使其热稳定性及在胃环境中的稳定性得到显著提高^[14,15],从而能更好的满足工业生产的要求。由于该植酸酶有比活性极高的优点,为我们进行分子改良提供了一个很好的素材。同时植酸酶蛋白酶抗性、耐酸性、耐热性等问题可以通过后加工进行包被而得到解决。可见该酶在理论研究及工业应用都具有非常广阔的前景。

植酸酶除了可以在饲料行业应用外,随着其应用范围的扩展,目前在食品加工、水果加工、肌醇和肌醇单磷酸盐料添加剂生产等方面已开始应用,在不同的应用领域对酶的性质要求是不一样的。根据本研究植酸酶的优缺点,也有望在别的应用领域开发应用。

从重组酵母的植酸酶绝对表达量来看,达到了 3.2mg/mL。有望通过表达条件的进一步优化,使表达量得到进一步提高。一方面可以通过表达元件和植酸酶基因的优化来提高表达量,另一方面也可通过适当提高植酸酶基因在酵母染色体上整合的拷贝数的方法使表达量进一步提高。目前,我们已通过适当提高拷贝数的方法使大肠杆菌来源的植酸酶在毕赤酵母中的表达量提高了近一倍,详情将另文发表。

参 考 文 献

- [1] Pallauf J, Rimbach G. Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch Tierernahr*, 1997, **50**(4): 301 - 319.
- [2] Lei XG, Porres JM. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(21): 1787 - 1794.
- [3] Vohra A, Satyanarayana T. Phytase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2003, **23**(1): 29 - 60.
- [4] 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.
- [5] 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.

- [6] 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.
- [7] Lassen SF, Bech L, Fuglsang CC, *et al.* Peniophora phytase. US patent 6060298 2000.
- [8] D'Silva CG, Bae HD, Yanke LJ, *et al.* Localization of phytase in *Selenomonas ruminantium* and *Mitsuokella multiacidus* by transmission electron microscopy. *Can J Microbiol*, 2000, **46**(4): 391 – 395.
- [9] Golovan S, Wang G, Zhang J, *et al.* Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can J Microbiol*, 2000, **46**: 59 – 71.
- [10] 王亚茹, 姚斌, 罗会颖, 等. 来源于 *Selenomonas ruminantium* 的高比活植酸酶基因在毕赤酵母中的高效表达. 中国农业科学, 2004, **37**(5): 762 – 768.
- [11] Han-Woo Kim, Young-Ok Kim, Jeong-Ho Lee, *et al.* Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnology Letters* 2003, **25**: 1231 – 1234.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] Zhao X, Huo KK, Li YY, *et al.* Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, **16**(3): 308 – 311.
- [14] Garrett JB, Kretz KA, O'Donoghue E, *et al.* Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as a phosphate-mobilizing monogastric-feed supplement. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(5): 3041 – 3046.
- [15] 赵海霞, 王红宁, 陈惠, 等. 饲用植酸酶热稳定性的研究. 微生物学通报, 2004, **31**(1): 105 – 109.

Overexpression of *Citrobacter braakii* phytase with high specific activity in *Pichia pastoris*

HUANG Huo-qing, LUO Hui-ying, BAI Ying-guo, WANG Ya-ru, YAO Bin*

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

Abstract: Utilization of the phytase with high specific activity is an effective way to improve the fermentation potency of phytase in recombinant host and decrease the production cost. Up to now, the phytase APPA from *Citrobacter braakii* exhibits the highest specific activity in the all phytases recorded previously. The gene *AppA* encoding phytase was modified according to the bias in codon choice of the high expression gene in *Pichia pastoris* without changing the amino acid sequence and artificially synthesized. The modified gene, *AppA*(*m*), was inserted into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9 under the control of *AOX1* promoter, and the resulted expression vector pPIC9-*AppA*(*m*) was introduced into the host *Pichia pastoris* by electroporation. PCR analysis of the recombinant yeast indicated that *AppA*(*m*) gene was integrated into the chromosome of *Pichia pastoris*. The *Pichia pastoris* recombinants for phytase overexpression were screened by enzyme activity analysis and SDS-PAGE. The recombinant phytase APPA was purified by simple methods, such as dialysis, ultrafiltration and chromatography. After the simple purification, the purity of the recombinant phytase reached to electrophoresis purity, and the recombinant phytase was shown to be glycosylated by Endo-H treatment. The specific activity of the purified recombinant APPA was 3.5×10^6 IU/mg of protein. Recombinant phytase APPA showed activity at pH values from 2.0 through 7.0 with the optimum at 4.5. The temperature optimum was 55°C at pH 4.5. The K_m value for sodium phytate was 0.165 mmol/L with a V_{max} of 3.3×10^6 IU/mg · min. In 5-liter fermentor in fed-batch fermentation, the expression level of phytase in recombinant *Pichia pastoris* was 3.2 mg/mL and the fermentation potency exceeded 1.4×10^7 IU/mL, which is the highest level among all of the reported phytase recombinant strains at present.

Keywords: Phytase with high specific activity; Gene modification; *Pichia pastoris* Overexpression

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2003AA214030)

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

Other authors: MENG Kun, YUAN Tie-zheng, YANG Pei-long

Received: 2 March 2006/Accepted: 26 April 2006/Revised: 22 June 2006