

植酸酶和甘露聚糖酶双功能毕赤酵母工程菌的构建和产酶分析

黄生平, 汪昌丽, 张桂敏, 马立新*

(湖北大学生命科学学院 分子微生物与基因工程研究室 武汉 430062)

摘 要 根据已发表的植酸酶基因和甘露聚糖酶基因序列设计并合成引物, 应用 PCR 技术, 分别以土曲霉总 DNA 和质粒 pHBM1201 为模板, 扩增出均不含假定信号肽序列的植酸酶基因 *phyA* 和甘露聚糖酶基因 *man*, 将它们各自克隆到毕赤酵母表达载体 pHBM907C 上, 分别得到重组质粒 pHBM907C-*phyA* 和 pHBM907C-*man*。将质粒 pHBM907C-*phyA* 上由乙醇氧化酶(AOX1)启动子和终止子引导表达、酿酒酵母 α 信号肽序列引导分泌的 *phyA* 表达盒式结构插入到质粒 pHBM907C-*man* 中, 构成双基因表达分泌质粒 pHBM907C-*phyA-man*。pHBM907C-*phyA-man* 经 *Sal* I 酶切线性后转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115, 获得了同时分泌表达植酸酶和甘露聚糖酶的双功能酵母工程菌。研究了该酵母工程菌所分泌表达的重组植酸酶和甘露聚糖酶的相关酶学性质, 并进行了双功能酵母工程菌的稳定性测试。

关键词 : 植酸酶 ; 甘露聚糖酶 ; 毕赤酵母 ; 共表达

中图分类号 : Q933 **文献标识码** : A **文章编号** : 1001-6209(2007)02-0280-05

植酸酶(Phytase; EC3.1.3.8)是催化植酸(即肌醇六磷酸)及植酸盐水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称。植酸酶作为一种单胃动物的环保型饲料添加剂, 它的饲喂效果已在世界范围内得到了认证。在饲料中添加植酸酶能够使植物性饲料中磷的利用率提高 60%, 粪便中磷的排出量减少 40%, 同时还能降低植酸磷的抗营养作用, 提高饲料中微量元素的利用率, 提高饲料中蛋白质和氨基酸的利用率, 因此对提高畜牧生产效益及降低其对环境的污染有重要意义^[1, 2]。

β -甘露聚糖酶(β -1, 4-D-mannan mannohydrolase; EC3.2.1.78)是一类降解甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳甘露聚糖和半乳葡萄甘露聚糖的主链 β -1, 4-D-甘露吡喃糖的酶^[3, 4]。 β -甘露聚糖酶作为一种新型的饲料添加剂已日益为人们所重视。它具有降低消化道内容物粘度、破坏植物性饲料细胞壁结构, 使营养物质与消化酶充分接触, 提高动物内源酶(如胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶)的活性, 改善肠道微生物菌群和提高肠粘膜的完整性等功能。

毕赤酵母表达系统是甲醇酵母表达系统类型中比较成熟的一个表达系统, 有许多蛋白质和多肽在该系统中成功表达并且获得较高的表达量, 同时巴斯德毕赤酵母的工业发酵工艺也已经发展的比较成

熟, 这使得该酵母在饲料添加剂上具有广阔的前景^[5]。目前, 利用 *P. pastoris* 表达系统单独表达植酸酶或者甘露聚糖酶的例子很多, 例如姚斌等^[6]将来源于 *Aspergillus niger* 963 的植酸酶基因经定点突变后在毕赤酵母中实现了表达, 伍洛夫等^[7]将来源于土曲霉植酸酶基因在该系统中实现了高效表达; 韦跃华等将来源于里氏木霉内切- β -甘露聚糖酶基因和谭秀华等将从土壤中筛选得到的耐碱性甘露聚糖酶基因也在该系统中实现了表达^[8, 9]。

本研究利用 *P. pastoris* 表达系统首次实现了对植酸酶和甘露聚糖酶的共分泌表达, 并对这两种酶的相关酶学性质作了初步研究。鉴于酵母本身的生物安全性, 并且植酸酶和甘露聚糖酶均可以作为良好的动物饲料添加剂, 本研究为新型复合酶饲料添加剂的研究奠定了初步的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 : 大肠杆菌 XL10-Gold 购于 Stratagene 公司, 巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 购于 Invitrogen 公司, pMD18-T 载体购于 TaKaRa 公司, pHBM907C、pHBM1201 为本研究室保存, 土曲霉 CCTCCAF93044 购于中国典型培养物保

基金项目 : 国家 863 计划(2002AA2270117) 湖北省自然科学基金(2003ABA118) 武汉市青年科技晨光计划(20025001038)

* 通讯作者。Tel: 86-27-88666349; 86-27-50865627; Fax: 86-27-88666349; E-mail: malixin9@hotmail.com

作者简介: 黄生平(1980-), 男, 湖北公安人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物与基因工程方面的研究。Tel: 86-27-63329626;

E-mail: huangsp126@126.com

收稿日期: 2006-07-20; 接受日期: 2006-09-08; 修回日期: 2006-11-15

藏中心。

1.1.2 培养基:LB、NZY 培养基参照文献[10] YEPD、MD、BMGY、BMMY 培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

1.1.3 试剂:限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Ex-Taq* DNA 聚合酶、dATP、dGTP、dCTP、dTTP 等购自 TaKaRa 公司,其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

1.2 质粒的抽提和纯化

参考文献[10]用碱法提取,亚精胺法纯化。

1.3 土曲霉总 DNA 抽提

抽提步骤参考文献[11]进行。

1.4 DNA 操作

DNA 回收、消化、连接和转化参见相应试剂盒手册和文献[12]进行。毕赤酵母感受态细胞制备、转化参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册进行。

1.5 PCR 引物设计和扩增反应

根据文献[13]发表的土曲霉 CCTCCAF93044 植酸酶基因 *phyA* 序列,设计一对引物 P1 和 P2 ,P1 :5'-GTCAACTGGCAGTCCCCGCCTC-3' ;P2 : 5'-GGCCACTAAGCAAAACACTCCGCCCA-3' ,GTCA 和 GGCCA 分别为 P1 和 P2 的 5' 端接头,用于从土曲霉 CCTCCA F93044 总 DNA 中扩增植酸酶基因 *phyA* 和转化子中植酸酶基因 *phyA* 整合的 PCR 检测。PCR 反应条件:94℃ 5min ;94℃ 30s ,52℃ 1min ,72℃ 2min ,30 个循环,72℃ 10min。扩增产物用 0.7%TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

根据文献[9]发表的甘露聚糖酶基因 *man* 序列设计一对引物 P3 和 P4 ,P3 :5'-GTCACAAAACGGA TTTCACGTATCCG-3' ;P4 : 5'-GGCCATTAATCACTCTT AAGCCCATTTCACC-3' ,GTCA 和 GGCCA 分别为 P3 和 P4 的 5' 端接头,用于从质粒 pHBM1201 中扩增甘露聚糖酶基因 *man* 和转化子中甘露聚糖酶基因 *man* 整合的 PCR 检测。扩增条件:94℃ 5min ;94℃ 1min ,53℃ 1min ,72℃ 1min ,30 个循环,72℃ 10min。扩增产物用 0.7%TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 共表达植酸酶和甘露聚糖酶的转化子的筛选

毕赤酵母感受态细胞的制备与转化参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册进行。将 MD 平板上生长的部分毕赤酵母转化子分别转接适量到 BMGY 平板上,28℃培养 2d,再分别转接适量菌落到添加 0.5% 的植酸钙(植酸酶作用底物)和添加 0.5% 的魔芋粉(甘露聚糖酶作用底物)的 MM 平板上,每 12h 添加适量甲醇进行诱导,28℃培养,观察其表达情况。

1.7 植酸酶基因 *phyA* 与甘露聚糖酶基因 *man* 在毕赤酵母中的高密度诱导表达^[14]

挑取待表达的重组毕赤酵母单菌落于 BMGY 液体培养基(按 ≤10% 装瓶),28℃、280r/min 培养至对数期($OD_{600} = 2 \sim 6$),转接 1mL 培养液至 100mL BMGY 液体培养基(按 ≤10% 装瓶),28℃、280r/min 摇床培养至对数中期($OD_{600} = 20 \sim 30$),室温 4000r/min 离心 5min,收集菌体,弃上清,细胞沉淀全部转移至 100mL BMMY 液体培养基中,28℃、280r/min 摇床培养。每隔 12h 补加 100% 甲醇至适当浓度。从细胞沉淀转至 BMMY 液体培养基诱导开始,每隔 24h 取 1mL 上清分析表达水平。

1.8 甘露聚糖酶酶活力单位的定义

吸取 214mL 1.0% 的魔芋粉溶液(以 0.2mol/L 的 HAC 和 NaAC 缓冲液配制 pH3.6~5.8 的溶液,以 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 缓冲液配制 pH5.8~8.0 的溶液,以 0.1mol/L 的 Na_2CO_3 和 $NaHCO_3$ 缓冲液配制 pH8.77~10.57 的溶液),加入 0.1mL (NH_4)₂SO₄ 沉淀的粗酶液,50℃水浴反应 30min 后,DNS 法测定酶解液的还原糖基含量 15。酶活力单位定义:以每分钟生成 1μmol 相当于 D-甘露糖的还原糖所需的酶量为一个酶活力单位(U)。

1.9 植酸酶酶活力单位的定义

植酸酶酶活力测定见参考文献[16]。酶活力单位定义:样品在 37℃、pH5.0 的条件下,每分钟释放 1μmol 无机磷所需植酸酶的量即为一个酶活力单位(U)。

2 结果

2.1 植酸酶基因 *phyA* 与甘露聚糖酶基因 *man* 的克隆

按材料方法 1.5 所述,以土曲霉 CCTCCAF93044 总 DNA 为模板,用引物 P1 与 P2 进行 PCR 扩增,获得了约 1.4kb 的特异性条带,与预期的大小一致。PCR 产物经过胶回收与 pMD18-T 载体连接后送上海博亚公司测序验证。

按材料方法 1.5 所述,以质粒 pHBM1201 为模板,用引物 P3 与 P4 进行 PCR 扩增,获得了约 900bp 的特异性条带,与预期的大小一致。PCR 产物经过胶回收与 pMD18-T 载体连接后送上海博亚公司测序验证。

2.2 植酸酶与甘露聚糖酶毕赤酵母共表达质粒 pHBM907C-*phyA-man* 的构建

将结果 2.1 中的两种 PCR 产物经凝胶回收纯化后,在 HTP 的保护下经 T4 DNA 聚合酶处理,与

经 *Cpo* I 和 *Not* I 双酶切的毕赤酵母表达载体 pHBM907C 相连,得到两个重组质粒,分别命名为 pHBM907C-*phyA* 与 pHBM907C-*man*。在这两个重组质粒中,*phyA* 表达盒式结构与 *man* 表达盒式结构的上游均有 *Nhe* I 和 *Sse8387* I 这两个单酶切位点,下游均有 *Xba* I 这一单酶切位点。质粒 pHBM907C-*phyA* 经过 *Sse8387* I 和 *Xba* I 双酶切后回收含有 *phyA* 表达盒式结构的小片段,此小片段命名为 F1;质粒 pHBM907C-*man* 经过 *Sse8387* I 和 *Nhe* I 双酶切后回收含有 *man* 表达盒式结构和骨架载体的大片段,此大片段命名为 F2。由于 *Nhe* I 和 *Xba* I 为同尾酶,故小片段 F1 与大片段 F2 粘性末端恰好匹配,这样小片段 F1 与大片段的 F2 进行定向连接后,即得到植酸酶与甘露聚糖酶毕赤酵母共表达质粒,命名为 pHBM907C-*phyA-man*。共表达质粒 pHBM907C-*phyA-man* 的物理图谱如图 1 所示。

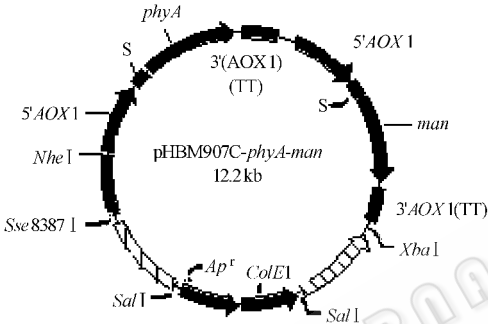


图 1 重组质粒 pHBM907C-*phyA-man* 的物理图谱
Fig.1 Physical map of the recombinant plasmid pHBM907C-*phyA-man*.

2.3 植酸酶与甘露聚糖酶双功能毕赤酵母工程菌的筛选

将质粒 pHBM907C-*phyA-man* 用 *Sal* I 酶切后,转化毕赤酵母 GS115,涂布 MD 平板。随机挑取 100 个转化子点接至 BMGY 培养基平板上,并编号 1、2、3...100,28℃培养 1~2d 后,分别按编号顺序点接至添加 0.5% 的植酸钙和添加 0.5% 的魔芋粉的 MM 平板上。加适量甲醇诱导(每 12h 补加一次)12h 后,在添加 0.5% 的魔芋粉的 MM 平板上的部分菌落的周围出现明显的透明水解圈(图 2-B),24h 后,在添加 0.5% 的植酸钙的 MM 平板上的部分菌落周围也出现了明显的透明水解圈(图 2-A)。在 BMGY 培养基平板上,选取在两种平板上均能出现较大水解圈并且菌体相对较小的菌落 6 株,记下其编号,按其编号分别命名为 NO.3、10、19、29、36、62。图 2 给出了部分转化子的编号。将这 6 株酵母菌落接种于 YPD 液体培养基中培养到适当浓度后,收集菌体,抽提总 DNA 作为模板,分别利用引物 P1、P2 和引物 P3、P4 进行 PCR 扩增,前者得到与正对照

(pHBM907C-*phyA* 质粒 DNA 作为模板)一致的扩增产物,后者得到与正对照(pHBM907C-*man* 质粒 DNA 作为模板)一致的扩增产物,说明 *phyA* 与 *man* 这两个基因已整合到酵母染色体上。

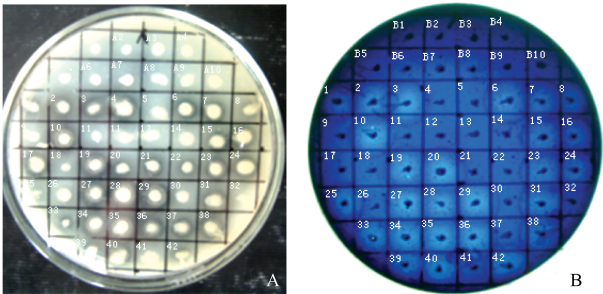


图 2 部分转化子的平板鉴定
Fig.2 Plate detection of partial transformants. The twenty transformants (A1-A10,B1-B10) are negative controls; The eight transformants(A1-A4,B1-B4) are GS115(pHBM907C); A5-A10 are GS115(pHBM907C-*man*); B5-B10 are GS115(pHBM907C-*phyA*).

2.4 双功能毕赤酵母中植酸酶与甘露聚糖酶的表达

将上述 6 株酵母菌按高密度摇瓶方式在 28℃、1.0%(V/V)甲醇流加量条件下诱导产酶,28℃、280r/min 振荡培养 72h,测定上清中植酸酶与甘露聚糖酶的酶活(表 1)根据酶活的测定数据我们看出,双功能毕赤酵母工程菌 No.29 在以摇瓶方式诱导产酶 72h 后,分泌表达的植酸酶酶活力与伍洛夫等^[7]报道的同是来源于土曲酶的植酸酶的酶活力相差不多,而分泌表达的甘露聚糖酶的酶活力则与单独表达时基本一致^[9]。这表明,并没有因为共表达而影响每一种酶的酶活力,因为即使共表达这两种酶时所分泌表达的蛋白总量与毕赤酵母中分泌型蛋白表达量最高可达 14.8mg/mL 的报道^[17]相比,还有很大上升空间。

表 1 工程菌植酸酶与甘露聚糖酶分泌酶活性的测定
Table 1 Determination of secreted activities of phytase and mannanase of engineered yeast

Transformant number	3	10	19	29	36	62
Phytase(U/mL)	70.3	82.8	79.4	120.6	51.7	98.2
Mannanase(U/mL)	25.5	28.2	27.1	39.7	16.9	34.5

2.5 酵母工程菌所分泌的植酸酶与甘露聚糖酶酶学性质分析

植酸酶的酶学性质的研究显示:该酶最适 pH 值约为 5.5,在 pH2.0~6.5 范围内该酶的酶活较稳定,该酶作用的适宜温度为 45℃~50℃,最适温度为 50℃,80℃处理 5min 后,酶活下降到 70%;甘露聚糖酶酶学性质的研究显示:该酶的最适 pH 值为 7.5,在 pH5.5~10.5 范围内该酶的酶活较稳定,酶

的最适反应温度为 55℃ ,80℃ 处理 5min 后 ,酶活下降到 10% ,当温度再恢复到 55℃ 其活性竟然提高到 60% 以上 ,由此可见 :甘露聚糖酶酶学性质共表达与单独表达时的基本一致^[9] ,本研究表达的植酸酶的酶学性质虽未见报道 ,但与伍洛夫等^[7]报道的同是来源于土曲霉的植酸酶的酶学性质相差不大。本研 究所得的双功能酵母工程菌在弱酸性环境中能比较 好的行使其功能。

2.6 双功能工程菌植酸酶和甘露聚糖酶表达的稳定性检测

将 No.3、10 和 29 三株菌在 YPD 平板上连续传 代 10 次后 ,分别将原初菌株与转移 5 次和 10 次 的菌株按高密度摇瓶方式在 28℃、1.0%(V/V)甲醇流 加量条件下诱导产酶 ,28℃、280r/min 振荡培养 72h , 测定上清中植酸酶与甘露聚糖酶的酶活(表 2)。上 述结果表明 ,这 3 株工程菌所分泌表达原初的植酸 酶和甘露聚糖酶酶活与转移 5 次和 10 次的相比 ,无 明显的差异 ,说明本研究得到的双功能酵母工程菌 具有比较好的稳定性。

表 2 双功能工程菌稳定性检测

Table 2 Stability test of engineered yeast NO.3 , 10 and 29		
Strain/transfer times	Phytase(U/mL)	Mannanase(U/mL)
Strain 3	68.5	25.7
Strain 3/5 times	72.4	25.1
Strain 3/10 times	65.8	23.5
Strain 10	83.1	26.8
Strain 10/5 times	81.2	24.3
Strain 10/10 times	78.8	23.0
Strain 29	118.7	37.3
Strain 29/5 times	112.4	34.3
Strain 29/10 times	109.6	33.8

3 讨论

本研究构建的毕赤酵母共表达质粒的优越性主 要有 (1)在克隆目的基因 *phyA* 与 *man* 时 ,在 PCR 正、反向引物的两端分别加上 GTCA 和 GGCCA 的序 列 ,将 PCR 扩增出来的产物用 dTTP 保护 ,利用 T4 DNA polymerase 3'→5'方向的外切酶活性 ,在 PCR 产 物两端产生的粘性末端恰好可以和经 *Cpo* I、*Not* I 双酶切的载体产生的两个粘性末端互补匹配 ,无须 考虑这两个基因内部的酶切位点 ,两个基因可以平 行操作 ,这种高通量的克隆方式也能推广到多个基 因的平行操作 ,为克隆外源基因带来方便。(2)本研 究在构建毕赤酵母共表达质粒时 ,巧妙利用表达盒 式结构左侧稀有酶切位点 Sse8387 I 和两侧的一对 同尾酶 *Nhe* I 和 *Xba* I ,解决了仅用一对同尾酶时

产生非定向连接的问题。(3)载体线性化后抗药性 标记被切除掉 ,这使得我们构建的双功能毕赤酵母 中没有采用任何抗药性标记 ,具有很好的生物安全 性。

本研究所使用的受体菌毕赤酵母本身具有很 好的安全性 ,曾作为单细胞蛋白广泛应用(包括在饲料 中使用) ,双功能工程菌所分泌的植酸酶和甘露聚糖 酶可以不必分离纯化 ,而能直接以酵母培养物的形 式添加到饲料中。这在实际生产应用中可进一步降 低生产成本。

本研究利用 *P. pastoris* 表达系统首次共表达的 植酸酶和甘露聚糖酶在经过 80℃ 处理 5min 后 ,恢复 到 50℃ ,酶活力均维持在 60% 以上 ,这表明本研 究所得到的双功能工程菌具有比较好的热稳定性 ,这 一点对于解决工业酶制剂的制粒问题具有重要意义 ,比较适合工业生产的要求。但是本研究使用的 *phyA* 与 *man* 均没有经过改造 ,进一步通过结构基因的 定点诱变、根据毕赤酵母密码子的选择偏向进行 基因的优化改造^[18]、改变基因在染色体上整合位 点 ,可以得到表达量更高、热稳定性更好、催化活性 更高、两种酶的比例更合适的双功能工程菌。这样 在饲料高温制粒过程中酶的损失更小 ,并且在动物 的消化道中不容易被降解。结合巴斯德毕赤酵母营 养要求低、生长快、培养基廉价、能高密度发酵生长 等优点 ,为廉价有效地生产优质饲料酶 ,特别是环保 性复合酶饲料添加剂的研究提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Han YM , Yang F , Zhou AG , *et al.* Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing. *Journal of Animal Science* , 1997 , **75** (4) :1017 - 1025 .

[2] Murry AC , Lewis RD , Amos HE. The effect of microbial phytase in a pearl millet -soybean meal diet on apparent digestibility and retention of nutrients , serum mineral concentration , and bone mineral density of nursery pigs. *Journal of Animal Science* , 1997 , **75** (5) :1284 - 1291 .

[3] Paice MG , Gurnagul N , Page DH , *et al.* Mechanism of hemicellulose-directed pre- bleaching of kraft pulps. *Enzyme Microb Technol* , 1992 , **14** (4) :272 - 276 .

[4] 杨文博 , 佟树敏 , 沈 庆 , 等 . β-甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用 . *微生物学报* , 1995 , **22** (4) :204 - 207 .

[5] Daly R , Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris* : a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* , 2005 , **18** (2) :119 - 138 .

[6] 姚 斌 , 张春义 , 王建华 , 等 . 高效表达具有生物学活性的植酸酶的毕赤酵母 . *中国科学(C 辑)* , 1998 , **28** (3) :237 -

- [7] 伍洛夫, 周俊初, 赵述森. 土曲霉植酸酶基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达. 湖北农业科学, 2005, **44**(3): 21–24.
- [8] 韦跃华, 毛爱军, 何永志, 等. 里氏木霉内切- β -甘露聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达. 生物工程学报, 2005, **21**(6): 878–883.
- [9] 谭秀华, 武玉永, 马立新, 等. 耐碱性甘露聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达. 微生物学报, 2004, **45**(4): 543–546.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Genis JL. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 1992, **20**: 2380.
- [12] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] 张晚鸣, 马立新. 土曲霉 CCTCCAF93044 植酸酶基因的克隆及序列分析. 湖北大学学报(自然科学版), 2001, **23**(2): 174–177.
- [14] Li A, Crimmins DL, Luo Q, *et al.* Expression of a novel regenerating gene product, RegIV, by high density fermentation in *Pichia pastoris*: production, purification, and characterization. *Protein Expr Purif*, 2003, **31**(2): 197–206.
- [15] Akino T, Kato C, Horikoshi K, *et al.* Characterization of three beta-mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp.. *Agric Biol Chem*, 1988, **52**: 773–779.
- [16] 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 Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 1696–1700.
- [17] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 2000, **16**(1): 23–52.
- [18] 赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析. 生物工程学报, 2000, **16**(3): 308–311.

Construction of a double functional recombinant strain of *Pichia pastoris* co-expressing phytase and mannanase and the enzymatic analyses

HUANG Sheng-ping, WANG Chang-li, ZHANG Gui-min, MA Li-xin*

(Laboratory of Molecular Microbiology & Gene Engineering, College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: Co-expression of phytase and mannanase in *Pichia pastoris* is a useful way to reduce the production cost in feedstuff industry. Based on the published DNA sequences of phytase gene and mannanase gene, primers were designed and genes *phyA* and *man* were cloned by PCR from *Aspergillus terreus* and the plasmid pHBM1201, respectively. Then the two fragments were treated and inserted into the same expression vector pHBM907C, which contains both the methanol-inducible promoter and the transcription terminator of the AOX1 gene, resulting the plasmid pHBM907C-*phyA* and the plasmid pHBM907C-*man*. The *phyA* expression cassette was combined to the expression vector pHBM907C-*man* which contains the expression cassette of mannanase, so pHBM907C-*phyA-man* was obtained. The recombinant expression plasmid pHBM907C-*phyA-man* was digested by *Sal* I and introduced into the chromosomes of *Pichia pastoris* GS115 by using the LiCl/PEG method. Following transformation, several parameters that demonstrated the expression of phytase and mannanase were measured. Firstly, the two different Petri dishes that contain enzymatic substrates such as calcium phytate and mannose were screened simultaneously, thus 100 clones were found to be positive on both of these plates. Secondly, 6 clones among them were chosen for induced expression at shakeflasks showing the probability of high expression. After that, some relative enzymatic properties were measured. At 72 hours' induction in the condition of shake cultivation, the enzyme activity of phytase in supernatant was 120.6U/mL, while the enzyme activity of mannanase in supernatant was 39.7U/mL. The expression product phytase was active under pH2.0~6.5, and the activity was up to the highest under pH5.5. And the other expression product mannanase was active under pH5.5~10.5, and the activity was up to the highest under pH7.5. The optimal temperatures for the two enzyme were both around 52°C: the optimal temperature for phytase activity was 50°C, and that for mannanase was 55°C. At last, stability test of the engineered yeast was taken, and the engineered yeast still showed an excellent stability even after 10 generation growth in the absence of selective pressure. The stable double functional engineered yeast simultaneously expressing extracellular phytase and mannanase is obtained. It will satisfy the demand for industrialized production in some degree.

Keywords: phytase; mannanase; *Pichia pastoris*; co-expression