

增加植酸酶基因 *appA-m* 的拷贝提高其在巴斯德毕赤酵母的表达量

Improving Phytase Expression by Increasing the Gene Copy Number of *appA-m* in *Pichia pastoris*

罗会颖, 黄火清, 柏映国, 王亚茹, 杨培龙, 孟 昆, 袁铁铮, 姚 斌*

LUO Hui-Ying, HUANG Huo-Qing, Bai Ying-Guo, WANG Ya-Ru, YANG Pei-Long, MENG Kun, YUAN Tie-Zheng and YAO Bin*

中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

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

摘 要 为了进一步提高植酸酶的发酵效价,降低植酸酶生产成本,对毕赤酵母表达载体 pGAPZ α -A 进行了改造。将表达载体 pPIC9 的 AOX1 启动子序列引入 pGAPZ α -A,使之成为甲醇可诱导型表达载体 pAOXZ α ,插入植酸酶基因 *appA-m* 后得到重组载体 pAOXZ α -*appA-m*。以染色体上带有一个拷贝的 *appA-m* 基因、发酵效价可达到 7.5×10^6 IU/mL 发酵液的重组酵母菌株 74[#] 为受体菌进行转化,在该重组菌株的染色体上的另一位点整合含有植酸酶基因的表达盒,经筛选到高表达植酸酶的重组子。通过 PCR 进行验证,植酸酶基因被整合到重组酵母的染色体上,且受体菌中原有的植酸酶基因结构未改变。重组菌在 5L 发酵罐经甲醇诱导 120h 植酸酶蛋白表达量达到 4mg/mL 发酵液,酶活性(发酵效价)达到 1.2×10^7 IU/mL 发酵液以上,较含单拷贝植酸酶基因的受体菌株表达量有较大程度提高。PCR 检测及表达量分析证明改良的菌株具有很好的遗传稳定性和表达稳定性。

关键词 植酸酶,载体改造,拷贝数增加,高效表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0528-06

Abstract In order to improve the fermentation potency of phytase in recombinant host and decrease the production cost, the pichia expression vector pGAPZ α -A was modified by introduction of an AOX1 promoter from vector pPIC9 and the resulted vector pAOXZ α is an methanol induced vector. After that, a phytase gene *appA-m* was cloned into pAOXZ α to construct the recombinant vector pAOXZ α -*appA-m*. The recombinant *Pichia pastoris* 74[#], which already contains one copy of *appA-m* and its fermentation potency exceeded 7.5×10^6 IU/mL, was used as the host strain for the transformation of pAOXZ α -*appA-m*. The *Pichia pastoris* transformants were gained by electroporation. PCR results indicated that the *appA-m* expression box has integrated into the genome of *Pichia pastoris* and the original construction of phytase gene has not changed. SDS-PAGE analysis revealed that phytase was overexpressed and secreted into the medium supernatant. Recombinants with high expression level were screened and used for fermentation. In 5L fermentor, the expression level of phytase protein achieved 4mg/mL and the phytase activity (fermentation potency) exceeded 1.2×10^7 IU/mL, which was about 1.6-fold compared with that of the host strain 74[#]. Moreover, the improved recombinant *Pichia pastoris* is excellent at expression stability and heredity stability.

Key words phytase, vector modification, the gene copy number increase, overexpression

Received: March 1, 2006; Accepted: April 5, 2006.

This work was supported by a grant from The National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2003AA214030).

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

国家高技术研究与发展计划(863计划)项目资助(No. 2003AA214030).

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

植酸酶(EC3.1.3.8, *myo*-inositol hexaphosphate phosphohydrolase)是一种可以将植酸磷降解为肌醇和磷酸的酶,应用在单胃动物饲料中可使植酸磷的利用率提高 60%,粪便中磷排出量减少 40%,并可减少植酸磷的抗营养作用,因此已被广泛的应用于动物饲料中^[1]。

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研究上都取得了大量进展^[2-4]。通过重组微生物反应器高效表达植酸酶,尤其是高比活植酸酶,提高其发酵效价,以进一步降低生产成本是目前植酸酶研究的热点之一。目前,发现的高比活植酸酶有多种。其中,来源于大肠杆菌的植酸酶^[5]的比活性为 3.1×10^6 IU/mg,仅次于柠檬酸杆菌^[6]来源的植酸酶。该植酸酶基因已在毕赤酵母表达系统实现了高效表达,表达植酸酶的酶活性可达 7×10^6 IU/mL 发酵液^[7]。其绝对表达量为 2~2.5g/L 发酵液,还有进一步提高的潜力。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是一种发展的较为完善的、被广泛用来表达外源蛋白的甲醇营养型酵母表达系统^[8]。许多蛋白质在毕赤酵母中实现了高效表达,部分已经达到了每升十几克的表达水平^[9]。研究表明外源基因在毕赤酵母中的分泌表达受外源基因的拷贝数、信号肽等多种因素的影响^[10]。适当提高外源基因的拷贝数是提高外源基因表达量的一个有效途径。

我们通过改造毕赤酵母表达载体 pGAPZ α -A 成为甲醇可诱导型表达载体 pAOXZ α ,将重组载体 pAOXZ α -*appA-m* 转化 74[#] 号菌株(基因组内含有一个植酸酶基因拷贝的宿主菌得到重组菌株),从而在其染色体上的另一位点整合含有植酸酶基因的表达盒,使植酸酶基因在重组菌株中的拷贝数得到提高。该重组菌株的植酸酶的表达量较原菌株表达量提高了 1 倍,应用于工业生产可使植酸酶的生产成本进一步降低。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:酵母菌株 *Pichia pastoris* GS115 (His⁻ Mut⁺)、重组酵母菌株 74[#](以毕赤酵母 GS115 为受体菌,在基因组内整合有一个拷贝的植酸酶基因 *appA-m*,5L 发酵罐水平表达植酸酶的酶活性为 7×10^6 IU/mL 发酵液^[7])、质粒 pPIC9、pGAPZ α -A 均为本实验室保存。

1.1.2 工具酶和生化试剂:限制酶购自 Gibco 和大

连宝生物工程公司;Taq 酶购自大连宝生物工程公司;T₄ DNA 连接酶购自 Promega 公司;蛋白质分子量标准为 Pharmacia 公司产品;Zeocin 购自 invitrogen 公司;植酸钠(肌醇六磷酸十二钠)购自 sigma 公司;其它化学试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基及培养条件:大肠杆菌培养基 LB(低盐)、酵母生长培养基 YPD、转化及筛选培养基 YPDS(+Zeocin)及诱导培养基 BMGY、BMMY 发酵培养基 10X 基本盐溶液、微量盐溶液 PTM1 均根据 Invitrogen 公司操作手册配制。

1.2 方法

1.2.1 载体 pGAPZ α -A 的改造:改造 pGAPZ α -A 载体,引入 pPIC9 来源的 AOX1 启动子序列及 α 因子信号肽序列,同时去除部分 GAP 启动子序列。

设计引物 primer-f: 5' CCA GATATC AACATCCAAAG ACGAAAGGTTG 3' EcoRV

primer-r: 5' ATA GAATTC TACGTAAGCTTCAGCC TCTCTTT 3' EcoRI

以 pPIC9 为模板进行 PCR 扩增,对得到的 1.23kb AOX1 启动子和信号肽序列扩增产物进行 EcoRV 和 EcoRI 双酶切处理。将质粒 pGAPZ α -A 通过 DraI 和 EcoRI 双酶切处理后与 PCR 产物连接,得到改造的载体 pAOXZ α 。

1.2.2 酵母表达载体的构建:将按密码子偏爱进行改造的来源于 *E. coli* 的植酸酶基因 *appA-m* (GenBank accession number DQ513832)通过 EcoRI/NotI 位点克隆到载体 pAOXZ α 上获得表达载体 pAOXZ α -*appA-m*。DNA 的重组操作主要依据 Sambrook 手册^[11]进行。

1.2.3 酵母的电击转化及筛选:将表达载体 pAOXZ α -*appA-m* 用 AvrII 酶切使之线性化,电击转化毕赤酵母 GS115 和带有一个 *appA-m* 拷贝的重组酵母菌株 74[#]。转化后菌液涂布在含有 100 μ g/mL Zeocin 的 YPDS 平板,30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d,挑取阳性转化子。电转化及筛选方法参见 Invitrogen 公司操作手册。

1.2.4 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,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。

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

1.2.5 重组酵母中植酸酶基因的 PCR 分析:根据载体 α -factor 信号肽序列及 pPIC9 的 *HIS4* 序列设计一对引物命名为 P1, P1 (P α :CCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGG; PH:CTGTTGAAGGTCTAGATGCTCACC GC)。同样据载体 α -factor 信号肽序列及改造载体 pAOXZ α 的 Zeocin 编码序列设计另一对引物命名为 P2, P2 (P α ; PZ:TCCAGAACTCGACCGCTCCGG)。对整合到酵母染色体上的植酸酶基因进行 PCR 扩增。

1.2.6 表达产物植酸酶的 SDS-PAGE 分析:选取在摇瓶中表达植酸酶活性较高的转化子,诱导表达后离心取 8 μ L 上清液进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.7 重组酵母在 5L 发酵罐中发酵表达植酸酶:重组酵母在 5L 发酵罐(BIOSTAT B5 型)中进行发酵。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 取样一次测定表达的植酸酶的积累量并进行表达蛋白的 SDS-PAGE。

1.2.8 5L 发酵罐中重组酵母的遗传稳定性:在重组 *P. pastoris* 生长、诱导表达的一个发酵周期结束后,直接取经诱导表达的菌液作为种子液(接种量为 1%)进行下一轮发酵,累计进行 5 轮,在每轮中均对菌株生长的生物量和植酸酶表达量进行测定。另外,取每轮发酵完的菌体铺 YPD 平板,挑取 10 个单菌落提取基因组 DNA,分别对整合在不同位点的植酸酶基因进行 PCR 检测。

2 结果和分析

2.1 载体 pGAPZ α -A 的改造及重组酵母表达载体的构建

表达载体 pGAPZ α -A 改造后成为甲醇可诱导型表达载体。经改造后载体 pGAPZ α -A 启动子 *GAP* 部分序列被去除,同时加入了 *AOX1* 启动子,命名 pAOXZ α 。该载体可以通过载体上的部分 *GAP* 序列与毕赤酵母染色体上的 *GAP* 序列发生重组,从而使外源基因与酵母染色体进行整合。将按照毕赤酵母密码子偏爱改造后的 *appa* 基因 *appa-m* 通过 *EcoRI* 和 *NotI* 位点以正确的阅读框架与表达载体 pAOXZ α 的 α -因子信号肽序列的 3' 端融合,得到重组表达载体 pAOXZ α -*appa-m*(图 1)。通过酶切鉴定证实重组质粒的构建是正确的。

2.2 重组酵母的获得与筛选

重组载体上带有 *Zeocin* 抗性基因及 *GAP* 启动

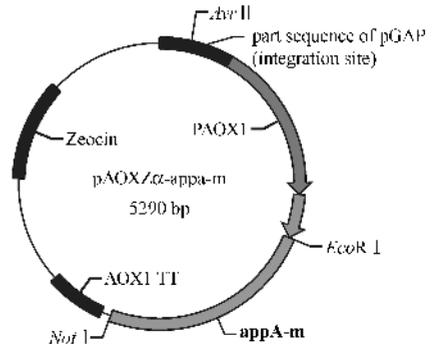


图 1 重组表达质粒 pAOXZ α -*appa-m* 的物理图谱

Fig.1 Physical map of recombinant expression plasmid pAOXZ α -*appa-m*

子部分序列经 *AvrII* 线性化电击转化受体菌 GS115 (*His⁻Mut⁺*)和重组菌株 74[#] 后,外源基因可通过 *GAP* 与酵母染色体的同源序列发生同源重组。只有 *Zeocin* 基因整合到酵母染色体上的重组酵母才具有 *Zeocin* 抗性,从而能在加有 *Zeocin* 的培养基 YPDS 上正常生长,通过这一标记筛选到重组转化子。而以重组菌株 74[#] 为受体菌的阳性转化子,由于其染色体已整合有一个 *appa-m* 基因拷贝,再整合含有植酸酶基因的表达盒后,则可能含有 2 个或更多拷贝的植酸酶基因。

重组转化子经甲醇诱导 48h 后,测定诱导培养基中植酸酶的活性。在 GS115 的转化子经甲醇诱导后筛选到了有植酸酶活性的菌株,其在摇床水平表达植酸酶活性可达 7.1×10^5 IU/mL。说明改造的载体 pAOXZ α 可以被甲醇诱导从而实现外源基因的分泌表达。从近 300 个转化 74[#] 菌的转化子中筛选到 3 株高效表达植酸酶基因的重组子为 1-35、3-56、3-96。在摇床水平表达植酸酶活性均在 1.2×10^6 IU/mL 以上。取上清进行 SDS-PAGE(图 2)电泳。结果显示,74[#] 菌株的转化重组菌植酸酶表达量明显高于未转化的 74[#] 原菌株。

2.3 重组酵母的 PCR 检测

为了检测植酸酶基因是否整合到宿主菌染色体上,以表达植酸酶量最高的重组酵母 3-56[#] 及 GS115、74[#] 菌株染色体为模板进行 PCR 扩增验证。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示在 GS115 以两对引物进行扩增均未出现明显条带,74[#] 菌株通过 α -factor 信号肽序列及 pPIC9 的 *HIS4* 序列设计引物 P1 扩增出约 2.1kb 大小条带(Lane4),而另一对引物 P2 未扩增出明显条带(Lane5)。以重组酵母 3-56[#] 基因组为模板用两对引物 P1 和 P2 分别扩增出 2.1kb(Lane6)及 2.5kb(Lane7)条带,大小与

预期相符(图3),这证实了转化菌株同时含有原来的植酸酶基因和新整合的植酸酶基因。

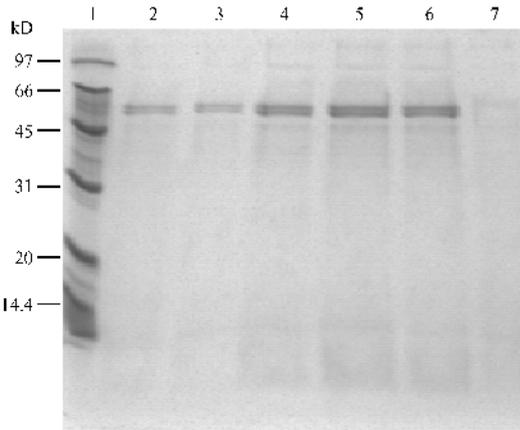


图2 摇床水平上表达植酸酶的 SDS-PAGE 分析
Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed phytase in shake flask culture

1: standard protein molecular weight; 2: expressed phytase by recombinants *P. pastoris* 74[#]; 3: expressed phytase by recombinants GS115 pAOXZα-*appA-m*; 4~6: expressed phytase by recombinants *P. pastoris* 74[#] pAOXZα-*appA-m* 1-35, 3-56 and 3-96, respectively. 7: recombinants GS115 pAOXZα-*appA-m* not induced by methanol.

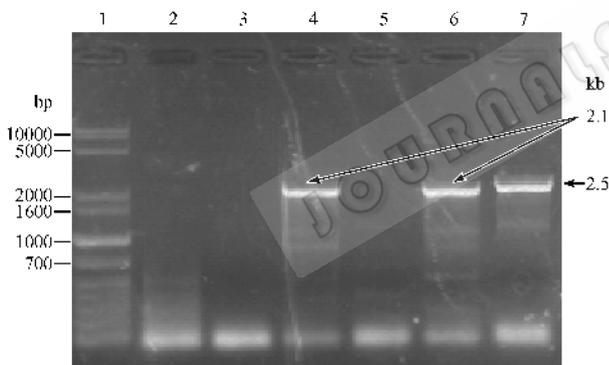


图3 重组酵母中植酸酶基因的 PCR 检测

Fig.3 PCR analysis of phytase gene in GS115 and recombinant *P. pastoris*

1: 1kb DNA marker; 2, 3: *Pichia pastoris* GS115 host; 4, 5: *P. pastoris-appA-m* 74[#]; 6, 7: *P. pastoris-appA-m* 3-56[#].

2.4 在 5L 发酵罐中重组菌株的表达研究

选择摇床水平表达量高的毕赤酵母重组菌株 3-56[#] 进行 5L 发酵罐发酵研究。在诱导之前的菌体生长阶段发酵上清中检测不到植酸酶活性。随着甲醇诱导的时间增加,上清液中植酸酶酶活力显著增加,酶蛋白不断积累(图4)。经甲醇诱导 120h 后酶蛋白绝对表达量达到 4mg/mL,发酵效价达 1.2×10^7 IU/mL 以上。而该重组菌株的受体菌 74[#] 经甲醇诱导 120h 后植酸酶活性为 7.5×10^6 IU/mL。可见 3-56[#] 较含单拷贝植酸酶基因的受体菌株表达量有较

大程度提高。从 5L 罐中连续 5 批次的发酵试验(图5)来看,其 5 批次的酶积累曲线基本一致,说明重组酵母具有很好的表达稳定性。

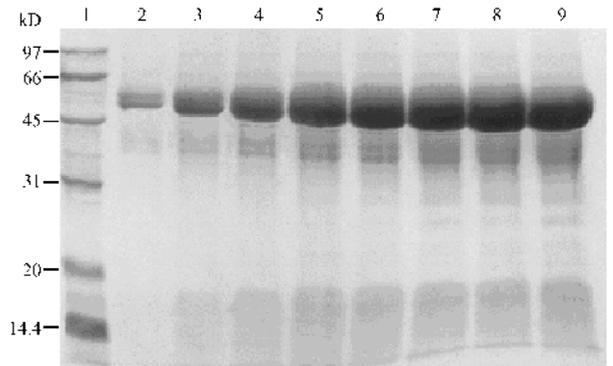


图4 5L 发酵罐中植酸酶经甲醇诱导不同时间内的表达量
Fig.4 SDS-PAGE of expressed phytase in the 5L fermentor with different induction time

1: standard protein molecular weight; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9: culture broth after induced by methanol for 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 84h, 96h and 120h.

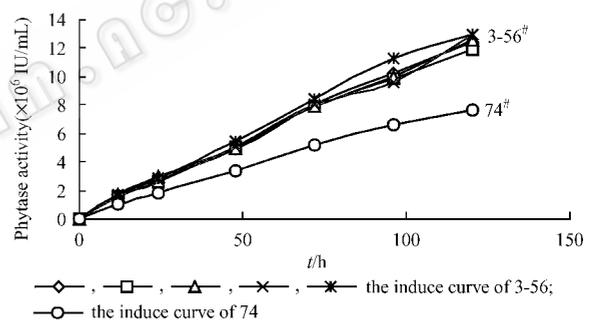


图5 5 批次发酵罐水平植酸酶活性随诱导时间的积累
Fig.5 Accumulation of enzymatic activity with different induction time in 5L fermentor for five times

2.5 5L 发酵罐中重组酵母的遗传稳定性

通过 α -factor 信号肽序列及 pPIC9 的 *HIS4* 序列和改造载体 pAOXZα 的 Zeocin 编码序列设计的对引物 P1 和 P2, 分别经 5 轮发酵及 PCR 检测结果表明(表1)菌株生长的生物量、速度及植酸酶的表达量在各轮中基本保持稳定,经过 5 轮的连续培养,两种不同整合的 *appA-m* 依然稳定整合在 *P. pastoris* 基因组中。这些结果证明重组 *P. pastoris* 具有良好的遗传稳定性。

3 讨论

高效表达高比活植酸酶是降低生产成本的有效途径。笔者将目前报道的来源于大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 33965^[7]、瘤胃微生物 *Selenomonas ruminantium* AY35^[12]、隔孢伏革菌

表 1 重组毕赤酵母的遗传稳定性
Table 1 Genetic ability of recombinant *P. pastoris*

Times of reinoculation	With primer P1 PCR +	With primer P2 PCR +	Biomass of growing for 24h (wet weight of weight of <i>P. pastoris</i> cell g/L)	Wet weight of <i>P. pastoris</i> cell after induction for 120h (g/L)	Phytase expression level after induction 120h ($\times 10^7$ IU/mL)
1	100%	100%	146	323	1.24
2	100%	100%	155	341	1.19
3	100%	100%	152	335	1.25
4	100%	100%	148	341	1.30
5	100%	100%	159	348	1.29

Peniophora lycii 和柠檬酸杆菌 *Citrobacter braakii* 的高比活植酸酶基因分别在毕赤酵母中进行了表达。其中柠檬酸杆菌 *Citrobacter braakii* 的植酸酶^[6]是目前报道的比活性最高的植酸酶,其在毕赤酵母中表达发酵效价可达 1.4×10^7 IU/mL 发酵液(详情将另文发表)。而来源于 *Escherichia coli* 的植酸酶^[5]除具有高比活性外,还具有好的抗蛋白酶降解能力^[13],且动物饲喂效果好^[14]。该植酸酶基因经优化在毕赤酵母中表达的绝对表达量为 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。但从我们以往的工作看^[15]通过菌株改良使表达量得到进一步提高是可能的。

影响外源基因在毕赤酵母中表达的因素很多,比如表达单元的拷贝数、表达框的染色体整合位点和整合方式、外源基因的特性、分泌信号肽、外源基因密码子转录和翻译的效率、内源蛋白酶的活性、宿主的种类和状态及生长条件与发酵参数等等。许多实验表明,含单拷贝表达框的宿主可以得到较为理想的表达,而在大多数情况下,随着拷贝数的增加,表达产物也会增加^[8]。

我们从几百个经电击转化得到的 *P. pastoris* pPIC9-*appA-m* 转化子中筛选到植酸酶表达量较高的转化子, Southern blotting 分析的结果表明,所检测的重组酵母外源基因均为单拷贝整合^[7]。因此,提高外源基因的拷贝数,可能是提高外源基因表达量简单有效的方法。提高外源基因的拷贝数可以通过使用可在体外插入多个目的基因的载体 pAO815 系列,也可以使用能快速筛选高拷贝整合转化子的载体 pPIC9k, pPIC3k 等。但在这些载体的使用过程中人们发现,这种多拷贝整合多为单点的重复串联整合,整合不稳定,在没有选择压力的情况下,随传代次数的增加外源基因会不断丢失^[16]。我们通过对毕赤酵母表达载体 pGAPZ α -A 进行改造,使之成为甲醇可诱导型表达载体,该载体可以通过 GAP 位点

整合到毕赤酵母染色体上。以基因组内整合有一个植酸酶基因 *appA-m* 的植酸酶重组酵母菌株 74[#] 为受体菌,经电击转化、筛选后得到的重组菌株在其染色体上整合有另一个植酸酶基因的表达盒,而原来整合在 AOX1 位点的植酸酶基因并没有发生改变,这种整合经验证其表达与遗传均具有很高的稳定性。经筛选得到的高效表达的重组子的植酸酶表达量显著提高,经 5L 罐高密度发酵后,重组植酸酶的表达量达到了 4g/L,发酵效价达到 1.2×10^7 IU/mL 发酵液以上,如在大规模工业生产中能达到此水平可使生产成本得到进一步降低。

在转化过程中我们发现,所得到的大多数重组菌株表达植酸酶活性较 74[#] 没有提高,也有些重组菌株表达植酸酶活性较 74[#] 大幅度降低,其原因有待进一步研究。另外,通过二次转化得到的转化菌株的转化效率很低,推测可能是载体线性化后在酵母体内又可能重新成环,而与酵母染色体的整合可能发生在 GAP 外的其它位置,如 AOX1、*appA-m*、3' AOX1 等位置。具体原因有待进一步研究。

REFERENCES (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. *Crit Rev Biotechnol*, 2003, **23**(1): 29 - 60
- [4] Yao B, Fan YL. Molecular biology and gene engineering of phytase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, **16**(1): 1 - 5
- [5] Golovan S, Wang G, Zhang J. 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
- [6] Han-Woo Kim, Young-Ok Kim, Jeong-Ho Lee, et al. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**: 1231 - 1234

- [7] Luo HY(罗会颖), Yao B(姚斌), Yuan TZ(袁铁铮) *et al.* Overexpression of *Escherichia coli* phytase with high specific activity. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2004, **20**(1):78-84
- [8] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, **190**(1):55-62
- [9] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J *et al.* Recombinant protein expression in *pichia pastoris*, *Mol Biotechnol* 2000, **16**(1):23-52
- [10] Li X(李欣), Guo SH(郭树华). Factors that influence heterologous gene expression in *Pichia pastoris*. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯) 2000, **11**(2):132-140
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [12] Wang YR(王亚茹), Yao B(姚斌), Luo HY(罗会颖). Overexpression of *Selenomonas ruminantium* phytase with high specific activity in *Pichia pastoris*. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学) 2004, **37**(5):762-768
- [13] Rodriguez E, Porres J M, Han Y, Lei X G. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin *in vitro*. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **365**(2):262-267
- [14] Augspurger NI, Webel DM, Lei XG *et al.* Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorous in young chicks and pigs. *J Anim Sci* 2003, **81**(2):474-483
- [15] 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
- [16] Scorer CA, Clare JJ *et al.* Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *pichia pastoris* for high level foreign gene expression. *Bio Technology*, 1994, **12**(2):1812184