

植酸酶 *phyA* 基因在解脂耶氏酵母 *po1h* 中的表达

陈云¹, 邹由², 王一丁¹, 马立新²

1 四川师范大学生命科学学院, 成都 610101

2 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062

摘要: 本实验通过 PCR 方法从毕赤酵母 GS115-*phyA* 中扩增出不含有信号肽及内含子的黑曲霉 NRRL3135 植酸酶 *phyA* 基因, 并将其克隆到表达载体 pINA1297 中, 得到表达载体 pINA1297-*phyA*, 利用醋酸锂转化法将线性化载体转化到解脂耶氏酵母 *po1h* 中, 通过 YNB_{casa} 和 PPB 平板筛选出阳性表达菌株, 阳性菌株在 YM 培养基中 28°C 培养 6 d 后酶活达到最大为 636.23 U/mL。表达上清经 SDS-PAGE 分析得到表达植酸酶分子量约为 130 kDa, 但通过去糖基化处理后其分子量变为 51 kDa, 与理论值相符。经过酶学性质分析表明重组植酸酶最适 pH 为 5.5, 最适温度为 55°C, 该酶在 pH 2.0~8.0 处理 1 h 后仍有较高酶活, 并且 90°C 处理 10 min 后还有 86.08% 的残留酶活, 其抵抗胃蛋白酶和胰蛋白酶能力也较强。

关键词: 黑曲霉, 植酸酶, *phyA* 基因, 解脂耶氏酵母 *po1h*

Expression of phytase gene *phyA* in *Yarrowia lipolytica po1h*

Yun Chen¹, You Zou², Yiding Wang¹, and Lixin Ma²

1 College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

2 College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China

Abstract: Using the polymerase chain reaction (PCR), we amplified the phytase gene *phyA* from *Pichia pastoris* GS115-*phyA* in *Aspergillus niger* NRRL3135 without the signal peptide sequence and intron sequence. Then, it was cloned into pINA1297 vector to generate a recombinant vector of pINA1297-*phyA*. pINA1297-*phyA* was linearized and transformed into *Yarrowia lipolytica po1h* by the lithium acetate method. The positive transformants were obtained by YNB_{casa} and PPB plates, after induced in YM medium at 28°C for 6 day. The activity of the expressed phytase *phyA* reached 636.23 U/mL. The molecular weight of the enzyme was 130 kDa measured with SDS-PAGE analysis, whereas its molecular size reduced to 51 kDa after deglycosylation which is correspond with theoretical value. The enzymatic analysis of the recombinant phytase *phyA* revealed its optimal pH and temperature was 5.5 and 55°C, which had high activity after incubated in pH ranged from 2.0 to 8.0 for 1 h. Moreover, its activity remained 86.08% after exposure to 90°C for 10 min. It also was resistant to pepsin or trypsin treatment.

Keywords: *Aspergillus niger*, phytase, *phyA* gene, *Yarrowia lipolytica po1h*

植酸酶是一种新型的环保型“绿色”饲料添加剂, 它能分解饲料中的植酸和植酸盐形成禽畜可利用的磷酸和肌醇, 提高了饲料中有机磷的利用率,

减少了添加无机磷的量, 降低饲料成本, 减轻磷污染, 并可抑制植酸对矿物质和蛋白质的亲和力, 解除植酸的抗营养作用^[1]。而商品化植酸酶大多为来

源于曲霉的植酸酶, 其中由黑曲霉 *Aspergillus niger* NRRL3135 菌株 *phyA* 基因编码的植酸酶应用最早最广泛^[2]。

目前黑曲霉 *Aspergillus niger* NRRL3135 菌株 *phyA* 基因已经在酿酒酵母、毕赤酵母 GS115、KM71 和 X-33 中得到表达, 但还未见其在非常规酵母解脂耶氏酵母中进行表达研究, 而解脂耶氏酵母被认为是安全的 (Generally regarded as safe), 因此, 能用于食品和药物生产上。在上世纪 90 年代解脂耶氏酵母被成功地开发为一种新的优良酵母表达系统, 它能大量分泌多种代谢产物, 能利用很多普通的碳水化合物和脂肪作为碳源, 这也使得它更适合于不同的工业应用^[3]。

1 实验材料

1.1 菌种和质粒

重组毕赤酵母 GS115-*phyA*、大肠杆菌 DH10 β 为本实验室保存。pINA1297 载体和解脂耶氏酵母 *polh* (CLIB882: Ura⁻, Δ AEP, Δ AXP, Suc⁺) 由法国国家科学研究中心微生物学和分子遗传学实验室的 Catherine Madzak 教授赠送。

1.2 试剂与培养基

脱糖基化酶(Endoglycosidase H)、DNA 限制性内切酶购自 Promega 公司。T4 DNA 连接酶、LATAq 酶均购自宝生物工程(大连)有限公司。PEG4000、醋酸锂购自 Sigma 公司, 植酸钙为实验室自制, 质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯。引物合成和测序由上海英骏生物工程有限公司完成。

YEPD 培养基: 1.0% 酵母提取物, 2.0% 蛋白胨, 2.0% 葡萄糖; 筛选重组解脂耶氏酵母 *polh* 转化子的 YNB_{casa} 培养基: 0.17% YNB, 2% 葡萄糖, 0.2% 酪蛋白水解物; PPB^[4] 培养基: 0.132% 酵母提取物, 2.0% 葡萄糖, 0.132% NH₄Cl, 0.032% KH₂PO₄, 0.024% MgSO₄·7H₂O, 0.033% Vitamin B₁; 用于重组解脂耶氏酵母 *polh* 表达的 YM^[5] 培养基: 0.5% 酵母提取物, 2% 麦芽膏, 1% 蛋白胨, 1.5% 葡萄糖。

2 方法

2.1 植酸酶 *phyA* 基因片段的克隆

将重组毕赤酵母菌种 GS115-*phyA* 接种于 YEPD 液体培养基中, 28℃ 培养 48 h 后挑单菌落转接到 YEPD 液体培养基中, 摇床培养至大量菌体产生。收集菌体, 利用 CTAB 法^[6]提取其基因组 DNA, 并检测其抽提效果。根据植酸酶 *phyA* 基因序列^[7]设计引物如下:

1297*phyA*F:5'-TACGGCCGTTCTGGCCATGCTGGCAGTCCCCGCCTC-3' (下划线为 *Sfi* I 酶切位点); 1297*phyA*R:5'-CGGGGTACCCTAAGCAAACACTCCGCCCAATCA-3' (下划线为 *Kpn* I 酶切位点); 扩增的植酸酶 *phyA* 基因的模板为 GS115-*phyA* 酵母的总 DNA。PCR 扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 47℃ 35 s, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增产物用 DNA 回收试剂盒回收。

2.2 重组表达载体 pINA1297-*phyA* 的构建

通过 PCR 方法获得带有 *Sfi* I 和 *Kpn* I 酶切位点的植酸酶 *phyA* 基因片段, 对载体 pINA1297 和扩增出的植酸酶 *phyA* 基因片段进行 *Sfi* I 和 *Kpn* I 双酶切, 凝胶回收后做连接, 然后将连接液转化入大肠杆菌 DH10 β 感受态细胞, 涂布到卡那霉素抗性的 LB 固体平板上, 放入 37℃ 恒温培养箱中培养 14 h, 分别挑取长出的单菌落接种到含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 220 r/min 恒温摇床中 37℃ 培养 20 h, 用碱抽提法抽提其质粒, 然后进行电泳检验及 PCR 鉴定, 所用引物为: F:5'-GCTACCGCCTTTACTATTCTCACGGC-3', R:5'-CAACGTGAGGGGACGCCATGG-3'。最后将上述筛选出的重组子进行酶切验证及测序分析, 最终找到阳性克隆即为所要构建的解脂耶氏酵母表达载体 pINA1297-*phyA*。

2.3 解脂耶氏酵母的转化

从 -80℃ 冰箱取出 50% 甘油保存的解脂耶氏酵母 *polh*, 在 YEPD 平板上划线, 30℃ 培养约 18 h, 将生长出的菌体悬浮到装有 1 mL 1 mol/L TE (pH 7.0) 的 EP 管中, 10 000 r/min 离心 1 min 弃去上清, 然后悬浮菌体到 600 μ L 0.1 mol/L 醋酸锂 (pH 6.0) 中, 28℃ 水浴孵化 1 h 不振荡。3 000 r/min 离心 2 min 后弃去上清, 轻悬菌体到 80~120 μ L 0.1 mol/L 醋酸锂

(pH 6.0) 中便是用于转化的感受态细胞。取 40 μL 的解脂耶氏酵母 *po1h* 感受态细胞加入 2 μL ssDNA 和 3 μL *Not I* 线性化的重组质粒, 28 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵化 15 min 后加入 350 μL 1 mol/L PEG4000 (如需要可加入 16 μL 1 mol/L DTT 可提高转化效率), 28 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵化 1 h 不振荡, 39 $^{\circ}\text{C}$ 热击 10 min, 加入 600 μL 0.1 mol/L 的醋酸锂 (pH 6.0) 中, 迅速涂到筛选平板 YNB_{casa} 上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7~14 d^[8]。

由于解脂耶氏酵母 *po1h* 是尿嘧啶营养缺陷型的菌株, 而将含有尿嘧啶筛选标记的 *pINA1297-phyA* 重组表达载体转化到解脂耶氏酵母中后, 重组解脂酵母便能生长在尿嘧啶营养缺陷的 YNB_{casa} 平板上, 挑取长出的菌落, 提取其酵母总 DNA。采用 PCR 鉴定其是否为重组子^[9], 所用引物为: F:5'-GCTACCGCCTTACTATTCTCACGGC-3', R:5'-CAACGTGGGACAGGCCATGG-3'。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 30 个循环。PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2.4 高活性重组酵母菌株的筛选

将鉴定出的重组酵母菌株点接到 YEPD 固体平板上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d, 然后将其点到含有 0.5% 植酸钙的 PPB 平板上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4~7 d, 挑出水解圈大的菌株即可能为植酸酶活性较高菌株。

2.5 重组酵母菌株的表达

从 PPB 平板上挑取水解圈较大的重组酵母菌株接种到 YM 平板上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~4 d, 然后将其转接到装有 100 mL 的 YM (pH 5.5) 液体培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床中培养, 离心培养液取上清即为重组酵母菌株分泌表达的胞外植酸酶 *phyA* 粗酶液, 用 12% SDS-PAGE 电泳观察结果。

2.6 重组植酸酶酶学性质测定

取上述植酸酶粗酶液在不同 pH 和温度条件下, 测定植酸酶酶活性。植酸酶的活性测定方法参照 GB/T18634-2009 进行, 酶的活性单位定义为: 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.5 条件下每分钟水解植酸释放 1 μmol 的无机磷所需要的酶量为 1 个酶活力单位, 以 U 表示^[10]。

2.7 胃蛋白酶和胰蛋白酶对酶活性的影响

分别加入 500 μL 浓度为 0.5 mg/mL 的胃蛋白酶 (用 pH 2.5 的缓冲液配制) 和胰蛋白酶 (用 pH 7.0 的

缓冲液配制) 到稀释好的 500 μL 粗酶溶液中, 然后放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中分别处理 30、60 和 120 min, 再在常规条件下测定酶活, 以未处理的酶活为 100%, 在其他条件下测得的酶活占最高酶活的百分数即为该酶在此条件的相对酶活^[11]。

3 结果与分析

3.1 植酸酶 *phyA* 基因片段的克隆

在此 PCR 反应条件下, 获得了一条长约 1.4 kb 的特异性 PCR 扩增条带 (图 1), 符合 *phyA* 基因去掉信号肽和内含子后的理论长度 1347 bp, 可初步判断 PCR 扩增 *phyA* 基因成功。

3.2 重组表达载体的构建

构建含有植酸酶 *phyA* 基因表达片段的重组表达载体 *pINA1297-phyA* (图 2)。重组表达载体经 *Sfi I* 和 *Kpn I* 双酶切鉴定后得到一条约 1.4 kb 的产物 (图 3), 与预期的植酸酶 *phyA* 基因序列大小一致。重组表达载体经测序后表明重组质粒中的基因片段即为植酸酶 *phyA* 基因。由此表明 *pINA1297-phyA* 构建成功。

3.3 酵母的转化与筛选

将重组表达载体 *pINA1297-phyA* 经 *Not I* 线性化处理后转化解脂耶氏酵母 *po1h*。经过 YNB_{casa} 平板筛选得到重组解脂耶氏酵母的转化子。提取酵母基因组总 DNA 并作为模板, 用目的片段所连接的部分载体基因序列作为引物进行 PCR 扩增, 得到约 1.4 kb 的电泳带 (图 4), 证明重组表达载体已经成功整合入酵母基因组 DNA 中。

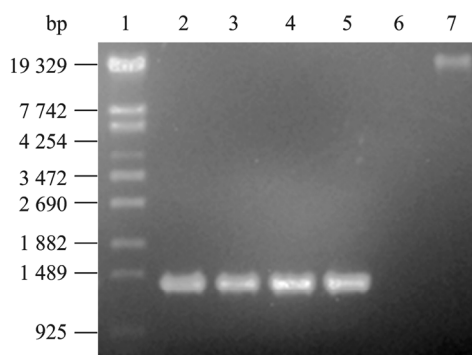


图 1 PCR 扩增植酸酶 *phyA* 基因产物

Fig. 1 PCR products of the phytase *phyA* gene. 1: λ -EcoT14 marker; 2-5: PCR products; 6: control; 7: DNA of the GS115-*phyA*.

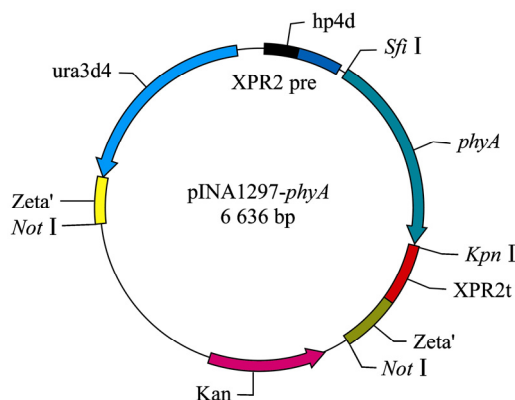


图2 重组表达载体 pINA1297-*phyA* 的物理图谱
Fig. 2 Physical map of recombinant plasmid pINA1297-*phyA*.

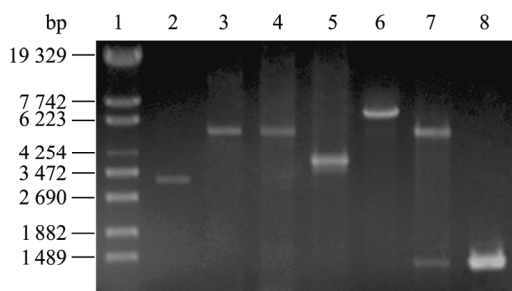


图3 重组质粒 pINA1297-*phyA* 的酶切鉴定
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pINA1297-*phyA* by enzyme digestion. 1: λ -EcoT14 marker; 2: pINA1297; 3: pINA1297 digested with *Sfi* I; 4: pINA1297 digested with *Sfi* I and *Kpn* I; 5: pINA1297-*phyA*; 6: pINA1297-*phyA* digested with *Sfi* I; 7: pINA1297-*phyA* digested with *Sfi* I and *Kpn* I; 8: PCR product of pINA1297-*phyA*.

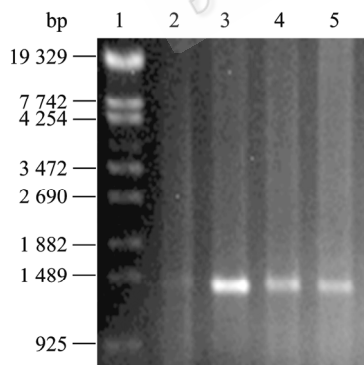


图4 重组解脂耶氏酵母 *po1h* 植酸酶 *phyA* 基因片段的 PCR 扩增
Fig. 4 PCR amplification of *phyA* gene in recombinant *Yarrowia lipolytica* *po1h*. 1: λ -EcoT14 marker; 2-5: PCR products.

3.4 高活性重组菌株的筛选

酵母转化子点接到含有 0.5% 植酸钙的 PPB 平板上, 由于重组解脂耶氏酵母表达的植酸酶能分解培养基中的植酸钙而形成水解圈, 则挑取其中水解

圈较大的酵母菌落, 即可能为植酸酶活性较高的菌株 (图 5)。

3.5 植酸酶 *phyA* 基因的表达

分别收集培养重组酵母的 YM 培养液, 离心取上清测其酶活, 便筛选到了一株产酶活性较高的解脂耶氏酵母, 其在培养第 6 天的时候表达的植酸酶酶活达到最大为 636.23 U/mL。经 12% SDS-PAGE 对表达产物进行鉴定, 结果表明重组解脂耶氏酵母 *po1h* 分泌了约 130 kDa 的蛋白, 其比理论的植酸酶分子量大, 可能是由于植酸酶 *phyA* 基因潜在的糖基化位点所造成, 所以又用脱糖基化酶 *endoglycosidase H* 处理重组解脂耶氏酵母的表达产物, 形成了一条约 51 kDa 的蛋白带, 与植酸酶 *phyA* 基因产物的理论值相符 (图 6)。

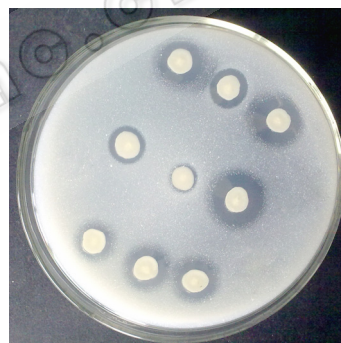


图5 重组解脂耶氏酵母生长在 PPB 平板上
Fig. 5 Recombinant *Yarrowia lipolytica* grows on PPB plate.

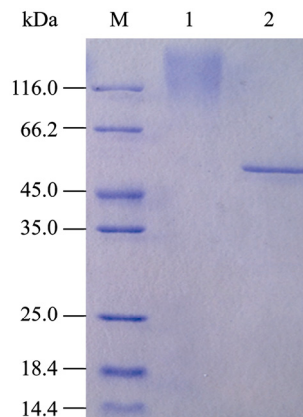


图6 SDS-PAGE 分析重组解脂耶氏酵母 *po1h* 中植酸酶的表达
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein expressed in the recombinant *Yarrowia lipolytica* *po1h*. 1: protein marker; 2: the *phyA* phytase expressed by the recombinant *Yarrowia lipolytica* *po1h*; 3: the recombinant phytase protein was treated with Endo H.

3.6 表达产物的酶学性质

按照文献[12]的方法配置测反应体系的缓冲液(0.2 mol/L 甘氨酸缓冲液 (pH 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0); 0.2 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0); 0.2 mol/L Tris 缓冲液 (pH 6.5、7.0、7.5、8.0)), 研究 pH 对表达的植酸酶 *phyA* 酶活性的影响, 以最高酶活性为 100%, 其他条件下的酶活占最高酶活的百分数即为该酶在此 pH 条件的相对酶活。实验结果表明重组解脂耶氏酵母 *po1h-phyA* 表达蛋白在 pH 2.0~2.5 酶活较高, 然后下降, 而 pH 到 5.5 时则有一个高点, 其与黑曲霉 NRRL3135 中产生的植酸酶性质相似, 此酶的最适反应 pH 值为 5.5 (图 7)。

用不同 pH 的缓冲液在 37°C 下处理粗酶液 60 min, 然后调回最适 pH 5.5, 在常规条件下测定酶活, 考察该酶在 37°C 下的 pH 稳定性。以剩余最高酶活为 100%, 其他条件下的酶活占最高酶活的百分数即为该酶在此 pH 条件的相对酶活。从图 8 可见, pH 2.0~8.0 时, 该酶可保持超过 80% 的酶活力, 可见此酶在酸性、中性及弱碱性条件中都有较强的耐受性。

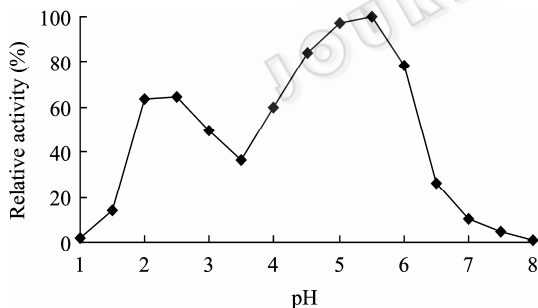


图 7 重组植酸酶的最适 pH

Fig. 7 Optimal pH of the recombinant phytase activity.

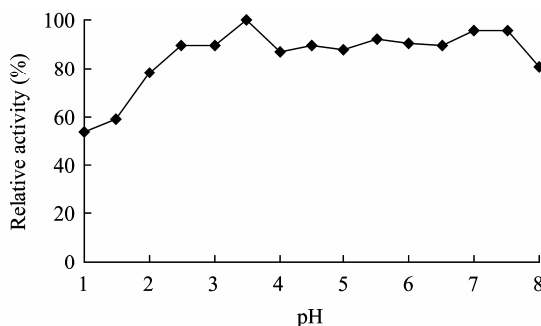


图 8 重组植酸酶 pH 耐受性

Fig. 8 pH tolerance of the recombinant phytase activity.

在不同酶反应温度下 (20°C、25°C、37°C、45°C、50°C、55°C、60°C、70°C) 测此酶的酶活力。从图 9 可见, 重组植酸酶随着温度的增加, 酶活一直呈上升趋势, 约到 55°C 时酶活达到最高, 当温度超过 55°C 后酶活开始下降, 可见该酶活的最适反应温度为 55°C。

将重组植酸酶分别在 70°C、80°C 和 90°C 下保温 10 min 后再在 37°C、最适 pH 下测定酶活性, 以不进行热处理的重组植酸酶的酶活性为 100%, 其他条件下的酶活占最高酶活的百分数即为该酶在此 pH 条件下的相对酶活。从图 10 可以看出, 重组植酸酶有好的耐热性, 在 90°C 处理 10 min 后酶活保留在 86.08%。

3.7 酶的胃蛋白酶和胰蛋白酶抗性

随着处理时间的延长, 植酸酶活力逐渐下降。其用胃蛋白酶处理 2 h 后残留酶活为 97.08%, 用胰蛋白酶处理 2 h 后残留酶活为 88.85%。该酶抵抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的能力强。

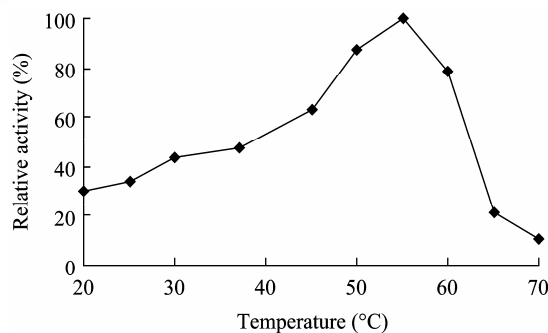


图 9 重组植酸酶最适温度

Fig. 9 Optimal temperature of the recombinant phytase activity.

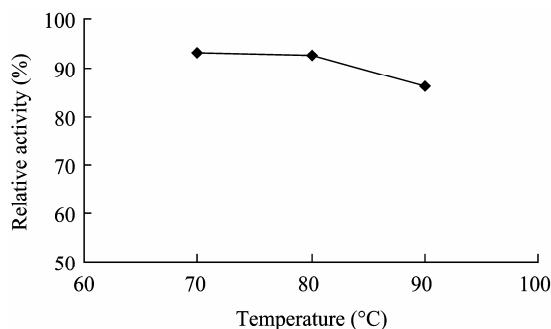


图 10 重组植酸酶的热稳定性

Fig. 10 The thermo stabilities of the recombinant phytase activity.

4 讨论

到目前为止还未见到以解脂耶氏酵母 *po1h* 作为黑曲霉 NRRL3135 植酸酶 *phyA* 的表达菌株报道。本实验将黑曲霉 NRRL3135 菌株植酸酶基因整合到解脂耶氏酵母 *po1h* 染色体上进行表达, 并对产物进行鉴定, 发现表达的植酸酶性质与理论值基本一致, 但其耐热性有所提高, 该酶经 90°C 处理 10 min, 残留酶活性为 37°C 时的 86.08%。比野生型的黑曲霉 NRRL 3135 植酸酶 *phyA* 及在毕赤酵母 X33、KM71 和 GS115 中表达的重组黑曲霉 NRRL3135 的植酸酶提高很多, 野生型的黑曲霉 NRRL3135 植酸酶 *phyA* 在 68°C 加热 10 min 后只剩余 40% 的活性, 毕赤酵母 X33、KM71 和 GS115 中表达的重组黑曲霉 NRRL3135 的植酸酶在 85°C 加热 10 min 的条件下, 也只有 50% 左右的活性保留^[13-14]。其更高的热稳定性, 使其在饲料制粒或膨化过程中引起的酶活损失少, 基本能满足饲料加工、贮藏、使用的要求, 也就不会因为热不稳定性而限制此植酸酶在饲料中的推广和应用。

另外由于动物的胃液环境大多为酸性, 小肠为近中性, 本研究的植酸酶在酸性及中性都保持了大部分的酶活力, 且对胃蛋白酶和胰蛋白酶抗性较强, 所以这种酶是比较适合作为饲料用酶。

REFERENCES

- [1] Wang JH, Mu YL, Huang ZX. Purification and characterization of phytase (*phyA*) from genetic engineering Barm. *J Yunnan Normal Univ Sci*, 2003, **23**(1): 43-47.
王金华, 穆跃林, 黄遵锡. 基因工程菌产植酸酶 (*phyA*) 的纯化及性质初步研究. 云南师范大学学报, 2003, **23**(1): 43-47.
- [2] Chen Z, Fu J, Bei JL, et al. Purification and comparison of enzymatic properties of two recombinant fungal phytase. *J Sichuan Univ Sci*, 2007, **44**(5): 1141-1146.
陈庄, 付捷, 贝锦龙, 等. 两种重组真菌植酸酶的纯化及其酶学性质比较. 四川大学学报, 2007, **44**(5): 1141-1146.
- [3] Zhao HY, Huang Y, Yang JK, et al. Review of *Yarrowia lipolytica* expression system. *Chin J Biopro Eng*, 2008, **6**(3): 10-16.
- [4] Madzak C, Tréton B, Blanchin-Roland S. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2000, **2**(2): 207-216.
- [5] Roth R, Moodley V, van Zyl P. Heterologous expression and optimized production of an *Aspergillus aculeatus* Endo-1,4-b-mannanase in *Yarrowia lipolytica*. *Mol Biotechnol*, 2009, **43**: 112-120.
- [6] Graham GC, Mayers P, Hen RT. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques*, 1994, **16**(1): 48-50.
- [7] van Hartingsveldt W, van Zeijl CM, Hartevelde GM, et al. Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. *Gene*, 1993, **127**: 87-94.
- [8] Le Dall MT, Nicaud JM, Gaillardin C. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet*, 1994, **26**: 38-44.
- [9] Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol*, 2004, **109**: 63-81.
- [10] Zou LK, Wang HN, Pan X. Expression, purification and characterization of a *phyA^m-phyCs* fusion phytase. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, **9**(7): 536-545.
- [11] Rodriguez E, Porres JM, Han Y, et al. 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.
- [12] Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, et al. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphor-hydrolases): catalytic properties. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 367-373.
- [13] Han YM, Lei XG. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase(*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **364**(1): 83-90.
- [14] Kang W, Wang Z, Zhan DL, et al. Overexpression of phytase (*phyA*) gene from *Aspergillus niger* NRRL3135 in *Pichia pastoris* GS115. *J Jilin Agric Univ*, 2006, **28**(6): 623-627.
康维, 王智, 詹冬玲, 等. 黑曲霉 NRRL3135 菌株植酸酶基因在毕赤酵母 GS115 系统中的表达. 吉林农业大学学报, 2006, **28**(6): 623-627.