

人工合成的黑曲霉 NRRL3135 菌株植酸酶基因 在毕赤酵母系统中的高效表达

贝锦龙^{1*} 陈庄² 杨林¹ 廖玲² 王棻章¹ 蒋宗勇²

¹(中山大学生物防治国家重点实验室 生物医药中心 广州 510275)

²(广东省农业科学院畜牧研究所 广州 510650)

摘 要 本文以黑曲霉 (*Aspergillus niger*) NRRL3135 菌株植酸酶基因为对象,通过基因人工合成的方法去除了该基因的内含子与信号肽编码序列,换用在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中使用频率较高的密码子以优化其表达。该人工合成植酸酶基因 (*PhyA-as*) 以 N 端融合的方式正确插入到毕赤酵母表达载体 pPICZαA。通过电击将重组表达载体整合入酵母染色体 DNA 中得到重组转化子。SDS-PAGE 结果与表达产物酶学性质研究表明植酸酶得到分泌表达,且与天然产物性质基本一致。筛选得若干株高产基因工程菌,其中 SPAN-III 菌株达到了在摇床培养条件下,每毫升发酵液产生 165000u 植酸酶的水平,基本满足工业化生产的要求。

关键词 基因人工合成,植酸酶基因 *phyA-as*,基因克隆,毕赤酵母表达系统

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0254-05

单胃动物缺乏内源性植酸酶,因而对饲料口粮中植酸磷的利用率很低,必须添加无机磷(如磷酸氢钙)才能满足动物正常生长发育对磷的需求,而饲料中的有机磷随粪便排出体外,会造成磷的大量浪费和对土壤和水源的严重污染。在饲料中添加植酸酶能够提高植物性饲料中磷的利用率,减少对无机磷的使用以及磷的排泄,降低植酸磷的抗营养作用,促进动物生长发育,达到提高畜牧业生产效益,减少环境污染的作用^[1]。研究发现,大量天然微生物能够产生并分泌植酸酶,如细菌、酵母、丝状真菌^[2~4]等。其中来自黑曲霉 NRRL3135 菌株的植酸酶被证明非常适用于饲料工业,但由于黑曲霉天然菌株的植酸酶生产能力有限,通过其实现工业化生产十分困难;而对出发菌株的基因工程改造虽然也取得一定效果,但仍达不到工业生产的要求^[5]。本文采用全人工合成的方法,全方位改造天然基因序列,使来自于黑曲霉 NRRL3135 菌株的植酸酶在毕赤酵母系统中得到高效的分泌表达。通过该酶的主要酶学特性测定,证明该重组产物与天然产物各项性质基本相同。该种植酸酶的发酵生产条件得到了初步确立,并筛选得每毫升发酵液能够产生 165000u 植酸酶的高产

基因工程菌,基本达到工业化生产的要求。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

对来自 *A. niger* NRRL3135 菌株的植酸酶基因 (*phyA*) 序列^[5]进行重新设计与改造,并委托大连宝生物工程公司合成该基因 *phyA-as*。转移载体 pBluescript II SK(+) 购自 Promega 公司;酵母菌株 *Pichia pastoris* X-33,转移载体 pPICZαA 等购自 Invitrogen 公司。

QLA quick gel extraction kit 购自 QIAGEN 公司; TaKaRa LA Taq 酶、限制酶等购自 TaKaRa 公司; T4DNA 连接酶购自 Promega 公司;脱糖基化酶 *endoglycosidase*H、SDS、植酸钠、TEMED、过硫酸氨、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺等购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 天然基因序列的改造:对来自于 *A. niger* NRRL3135 菌株的植酸酶基因序列^[5]进行如下改造:在全长结构基因序列中去掉 +45 ~ +146 位的内含子序列,去除 +1 ~ +44, +147 ~ +159 的原黑曲霉信号肽编码序列;得到植酸酶成熟肽编码序列。根

据毕赤酵母中密码子的使用情况^[6,7]对植酸酶成熟肽编码序列进行改造。将部分在毕赤酵母中低偏爱性的密码子替换为高偏爱性的密码子;主要替换编码 S、R、T、G、P、L 等氨基酸的密码子,也有少量编码 A、C、V 等氨基酸的密码子被替换。最后得到 *phyA-as* 序列。在 *phyA-as* 序列 5' 端加上部分 α 信号肽^[8]编码序列 CTCGAG (*Xho* I)AAAAGAGAGGCTGAAGCT 以使得植酸酶成熟肽编码序列与表达载体 pPICZ α A 上的 α 信号肽编码序列融合;在此基础上,再在 5' 端加上 GAATT 与部分 α 信号肽编码序列的第一碱基 C 形成 *Eco*R I 位点,以方便克隆该基因入转移载体 pBluescript II SK(+);在 *phyA-as* 序列 3' 端加上 TAA 终止密码子,在该终止子后加上 GGTACC (*Kpn* I 酶切位点)以方便克隆该基因入转移载体 pBluescript II SK(+)与表达载体 pPICZ α A(图 1)。

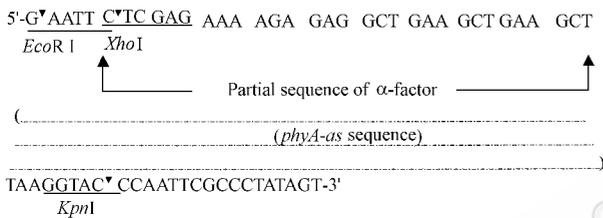


图 1 *phyA-as* 5'-3'-端的序列设计

Fig. 1 5'-3'-end sequence design of *phyA-as*

1.2.2 改造序列的人工合成:通过 19 对引物设计与合成、DNA 聚合酶反应(链延长反应和 PCR 反应)酶切和连接反应,最后将人工合成的 *phyA-as* 克隆到大肠杆菌载体质粒 pBluescript II SK(+)上,构建出含 *phyA-as* 基因的重组质粒 pBluescript II SK(+)-*phyA-as*。

1.2.3 重组转移载体质粒的构建:DNA 重组操作参照分子克隆实验手册^[9]略作修改进行。筛选得含有 *phyA-as* 基因的重组转移载体质粒 pPICZ α A-*phyA-as*。

1.2.4 酵母转化:将 5mL 酵母 X-33 过夜培养菌液接种于 50mL YPD 液体培养基 30℃ 培养过夜。取过夜培养的菌液 0.1 ~ 0.5mL 接种于 500mL 新鲜 YPD 液体培养基,30℃ 过夜培养至 $OD_{600} = 1.3 \sim 1.5$ 。

4℃,1500 × g 离心 5min,500mL 0℃ 无菌水重悬菌体。离心同上,重悬于 250mL 0℃ 无菌水。离心同上,重悬于 20mL 0℃ 1mol/L 山梨醇溶液。离心同上,重悬于 1mL 0℃ 1mol/L 山梨醇溶液,置于冰上。将制备的细胞 80 μ L 和 5 ~ 10 μ g 线性化 DNA 注入 0℃ 电击池,混匀,置冰上 5min 后电击。(电压:1500V;电容:25 μ F;电阻 200 Ω)。迅速加 1mL 0℃ 1mol/L 山梨醇

溶液到电击池内,混匀。将池内液体转置 EP 管,30℃ 静置培养 90min。分别取 150 μ L 涂布含 ZeocinTM 100 μ g/mL 和含 ZeocinTM 1000 μ g/mL 的 YPDS 固体培养基,30℃ 培养 2 ~ 4d。

1.2.5 重组酵母的 PCR 鉴定:所用引物由 EasySelectTM *Pichia* Expression Kit 提供:上游引物序列为 5'-GACTGTTCCAATTGACAAGC-3',下游引物序列为:5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'。提取酵母基因组 DNA,稀释至大约 1ng/ μ L,作为模板 DNA。反应程序设置如下:①95℃,5min,②加 2.5u Taq DNA 聚合酶。95℃ 变性 1min,54℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min。如此循环 30 次。③72℃ 最后延伸反应 7min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.6 重组酵母的诱导表达:诱导表达操作见 invitrogen 公司手册。

1.2.7 诱导表达产物的脱糖基化:建立下列反应体系:磷酸氢二钠——柠檬酸(pH5.5)10 μ L,endo H (*Endo*- β -N-acetylglucosaminidase H)0.01u,1 ~ 2 μ g/ μ L 蛋白质溶液(发酵液上清)50 μ L,加无菌水至终体积 100 μ L;在 pH5.5、37℃ 条件下,反应 5h^[10]。

1.2.8 诱导表达产物鉴定:诱导表达后的发酵液离心,将未经脱糖基化处理以及处理过的上清作 SDS-PAGE 鉴定、植酸酶酶活测定^[4]。酶活单位定义为:在一定条件下,每分钟释放出 1nmol 无机磷酸所需要的酶量为 1u。

1.2.9 植酸酶高产工程菌的筛选:在 ZeocinTM 高抗性筛选的基础上,通过单克隆菌株诱导表达产物的酶活测定,获得高产菌株。

1.2.10 重组植酸酶酶学性质测定:在不同 pH 值与温度条件下,测定重组酵母菌株诱导表达后,上清中的植酸酶活性;并绘制出植酸酶活的 pH 曲线与温度曲线。

1.2.11 工程菌发酵产酶条件的初步建立:选择廉价的工业发酵原料,每隔 12h 测定发酵上清植酸酶酶活,绘制发酵液的酶活时间曲线。

2 结 果

2.1 *phyA-as* DNA 片段的获得

经改造后 *phyA-as* 的序列(图 2)委托大连宝生物工程公司人工合成;最后将全长 *phyA-as* 基因通过 *Eco*R I 位点、*Kpn* I 位点克隆入 pBluescript II SK(+)构建出含 *phyA-as* 基因的重组质粒 pBluescript II SK(+)-*phyA-as*。

5'-CTGGCAGTC[CC]GCC[TC]AGAAATCAATCC[TC]TTG[GT]GAT[AC]GTGCGATCA[GG]TAT
 CAA[TC]TTTCTCCGAGAC[TC]CATCTTTGGGGTCAATACGCA[CC]ATCTCTCTCTGGC
 AAACGAA[TC]GTCACTCCCTGAGGTG[CC]AGCCGGAT[GT]AGAGTCACTTTCGCTCAG
 GTC[CT]TCC[AG]CATGGA[GC]TAT[CC]ACCAGCTCCAAG[GG]AAGAAATACATCCGC
 T[CT]ATTGAGGAGTCCAGCAGAAC[GC]ACCACCTTTGACGGAAATATGCTTCTCTG
 AAGACATACAAC[TC]T[TC]TTGGGTGCAGATGACCTGACT[CC]ATTCGGAGAACAGGAG[CT]
 T[GT]GTCAACTCC[GG]ATCAAGTTCTACCAG[CA]TACGAA[TC]TTGACA[AG]AACATCGTT
 CCATTCAT[CA]TCCCTCT[GG]TCC[TC]TGA[GT]ATCGCTCC[GG]AAGAAATATCAATCGAG
 [GG]TTCAGAGC[AC]TAAAGTGAAGGATCCT[AG]GCCCA[CC]AGG[CA]TCTCTCTCC[CA]
 AGATCGAG[GT]GTCATTTCCGAGGCC[CT]CATCCAACAACACT[CT]GACCA[GG]TAC[CT]
 T[GT]ACTGTCTTCGAAGAC[CT]GAATGGCCGAT[AC]GTGCAAGCCAATTC[AC]TGC[CA]
 C[CT]TCGTCC[CA]TCCATT[AG]CAAA[AG]CTGGAGAAGCAGCTGTCCGGT[GT]ACT[CT]TAC[CT]
 GAC[AC]TGAAG[GT]TAC[CT]TAC[CT]ATGGACATG[GT]TCTTCGAC[AC]ATCTCC[AC]TTC[CT]AC
 CGTCGACACCAAGCTGTCC[CA]TCTGTGACCTGTACCCCATGACGAATGGATCAAC
 TACGACTA[CT]GAGTCTTGA AAAAGTATTAC[GG]TCAATGGTGCAGGTAAC[CA]TTGGG
 TCC[CA]ACCAG[GG]TGTCCGGTACGCTAACGAGT[GT]ATCGCC[AG]CTGACCCAC[CT]CCT
 GTCACGATGACACC[CT]TCCAACCACACTTTGGAC[CT]TTC[CA]GCTACCTTT[CC]AT
 T[CA]ACTTAC[CT]TAC[CT]GACTTT[CT]CATGACAAC[GG]TATCATCTCCAT[TT]TTTGC
 TTTAGTCTGTACAAC[GG]ACTAAG[CA]TGTCTIAC[AC]ACCGT7GAGAATATCACCC
 AGACAGATGGAT[CT]TCTGCTTGG[AC]TGT[CC]TTC[CT]TGTAG[AT]GTAGCTCGAG
 ATGATGACAGTGTCAAG[CT]GAGCAGGAG[CC]CTGGT[CA]GTCTTGGTAAATGAT[AG]G
 TTGT[CC]CTGCAATGG[GT]GT[CC]GTTGATGCTTTGGG[AG]AGTGTACC[AG]GAT[CT]TT
 T[GT]AGAGG[GT]TGT[CT]TTTCTAGATCTGG[GT]GATGG[GC]GAGTGTTTTGTCT-3'

图2 *PhyA-as* 的人工合成基因序列

Fig.2 The artificial synthetic gene sequence of *PhyA-as* ;

The changed codons are indicated by by outline.

The changed bases are indicated by italic

2.2 含 *phyA-as* 基因的重组转移载体质粒的构建

构建含 *phyA-as* 基因的重组转移载体质粒 pPICZ α -*phyA-as* (图3)。转移载体质粒 pPICZ α 多克隆位点上游依次含有 α 信号肽编码序列、AOX I 启动子。将 pBluescript II SK(+) -*phyA-as* 经 *Xho* I / *Kpn* I 酶切得到的含有 *phyA-as* 基因的 1375bp 片段插入至 pPICZ α 经 *Xho* I / *Kpn* I 切出的窗口中。*Xho* I / *Kpn* I 酶切鉴定结果表明构建得到 pPICZ α -*phyA-as* (图4)。

2.3 重组酵母的获得与鉴定

通过电击法将经 *Sac* I 单酶切线性化的 pPICZ α -*phyA-as* 转化入毕赤酵母 X-33 菌株。分别涂布每 mL 含抗生素 ZeocinTM 100 μ g、500 μ g 以及 1000 μ g 的 YPDS 平板;28 $^{\circ}$ C 培养 48h 后,有菌落出现,挑取单克隆菌株,提取酵母基因组 DNA,PCR 鉴定,扩增得到 2.0kb 的 DNA 片段(若未发生整合,则不能扩增得 DNA 片段;若整合入酵母基因组的是不含目的基因的空载体,则只能扩增得到 0.6kb 左右的 DNA 片段);证明重组转移载体质粒 pPICZ α -*phyA-as* 成功整合入酵母基因组 DNA 中(图5)。

2.4 *phyA-as* 基因在 X-33 酵母细胞中的诱导表达

将重组酵母用 250mL BMGY 培养基,在 29 $^{\circ}$ C、250r/min 条件下培养 48h;将细胞用 4000r/min、5min 离心沉淀,转移入 125mL BMMY 培养基,用上述条件继续培养 72h;在此期间,每隔 24h 添加大约 0.5mL 甲醇,以促进其诱导表达。

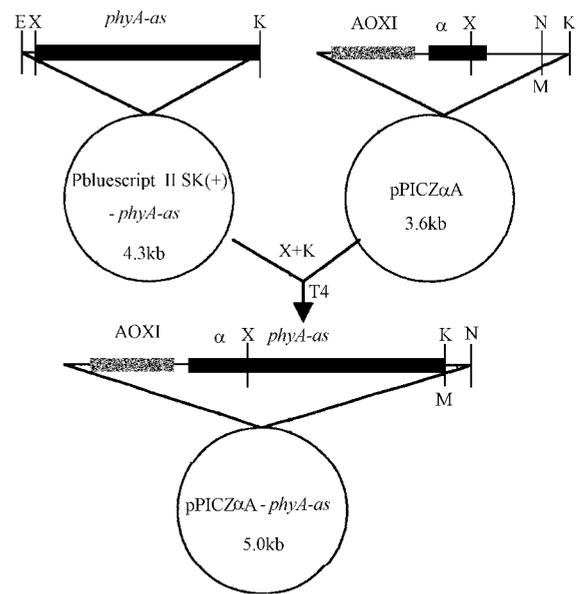


图3 重组质粒 pPICZ α -*phyA-as* 的构建

Fig.3 Construction of the recombinant

plasmid pPICZ α -*phyA-as*

E. *Eco* R I ; X. *Xho* I ; K. *Kpn* I ; N. *Not* I ; M. MCS α . α signal sequence ; T4. T4 DNA ligase ; AOX I ; AOX I promoter

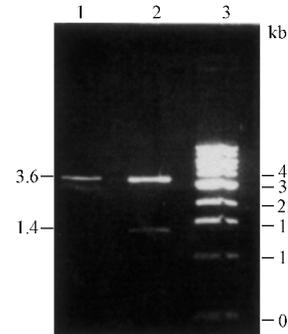


图4 pPICZ α -*phyA-as* 酶切鉴定

Fig.4 Characterization of pPICZ α -*phyA-as* by *Xho* I / *Kpn* I digestion

1. pPICZ α digested by *Xho* I / *Kpn* I 2. pPICZ α -*phyA-as* digested by *Xho* I / *Kpn* I 3. DNA marker

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

SDS-PAGE 结果表明经过诱导表达,重组酵母分泌了 90kD 左右的重组蛋白入培养基,经 EndoglycosidaseH 脱糖基处理后,形成一条大约 50kD 左右的锐带,与 *phyA-as* 基因产物的理论值^[5]相符(图6)。

2.6 高产菌株的筛选

在 37 $^{\circ}$ C 测定 85 株重组酵母菌株诱导表达后,上清中的植酸酶酶活,选出高产菌株 SPAN-III;其诱导表达 72h 后,上清中酶活高达 165000u/mL,为野生型 *Aspergillus. niger* NRRL3135 菌株植酸酶产量^[5]的 275 倍。

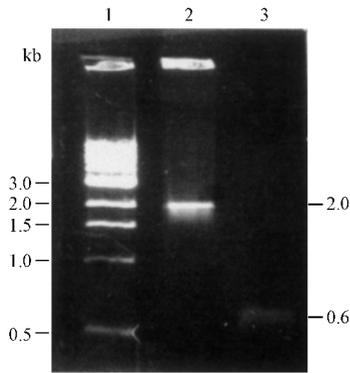


图 5 重组子的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of X-33 transformed with pPICZ α A-*phyA-as* by PCR

1. DNA marker
2. X-33 transformed with pPICZ α A-*phyA-as* ;
3. X-33 transformed with pPICZ α A

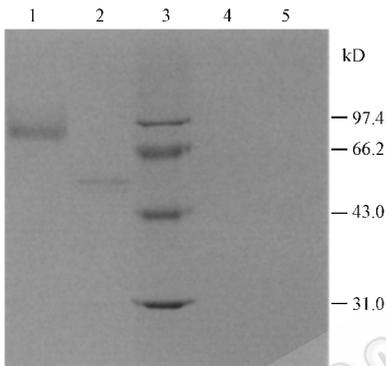


图 6 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig. 6 SDS-PAGE of supernatant after methanol inducing

1. X-33 transformed with pPICZ α A-*phyA-as*
2. X-33 transformed with pPICZ α A-*phyA-as* (deglycosylated by *endoglycosidase H*)
3. size maker ;
4. X-33 transformed with pPICZ α A
5. X-33 transformed with pPICZ α A-*phyA-as* (deglycosylated by *endoH*)

2.7 表达产物的植酸酶酶学性质的确定

实验结果表明,表达的植酸酶的最适作用 pH 值有两个,分别为 1.8 和 5.7,在 pH1.8~5.7 的 pH 范围内,表达的植酸酶均能维持较高的酶活性(图 7a)。在 pH5.5、不同温度下的酶活性测定结果表明,植酸酶的最适作用温度为 55℃(图 7b)。表达植酸酶的最适 pH 和最适温度与原菌株 *A. niger* NRRL 3135 所产的植酸酶^[11]相比并没有明显差别。

2.8 重组酵母植酸酶表达量与诱导培养时间的关系

酵母重组子 *P. pastoris* SPAN-III 在诱导培养后每隔 12h 取 2mL 培养液用于测定植酸酶活性,研究表明,在诱导培养 210h 之内,植酸酶的表达随诱导时间的延长而增加,到 160h 接近高峰,再增加诱导表达时间,植酸酶的表达量仅缓慢增加(图 8)。在此基础上,选用廉价的工业发酵原料,植酸酶仍然能

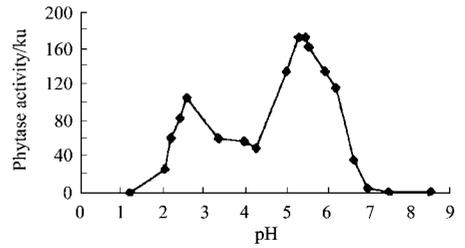


图 7a pH 曲线

Fig. 7a pH-dependence of enzymatic activity

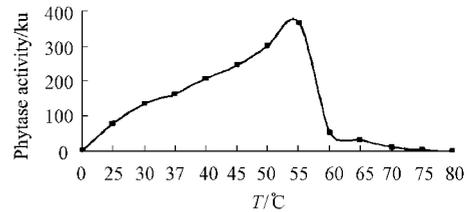


图 7b 温度曲线

Fig. 7b Temperature-dependence of enzymatic activity

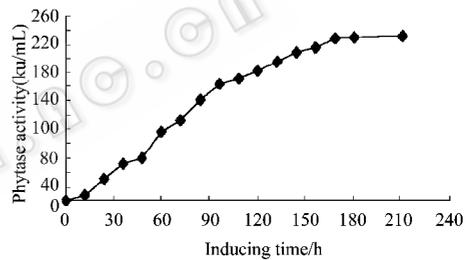


图 8 植酸酶诱导表达的时间曲线

Fig. 8 Time course curve of phytase activity induced by methanol

够达到相同的分泌表达水平。

3 讨论

植酸酶(EC 3.1.3.8)属于酸性磷酸酯酶,它可以催化植酸磷水解为单磷酸肌醇与 5 个无机磷酸^[3]。而来自黑曲霉 NRRL3135 菌株的植酸酶,最适合于在单胃动物的消化道中分解植酸磷,从而达到提高饲料利用率,降低养殖业的环境污染等作用^[12]。限制该酶实际应用的主要瓶颈在于出发菌株的植酸酶生产能力有限,从而导致生产成本偏高^[5]。而毕赤酵母表达系统是近年来出现的一个新型高效真核表达系统。它除了具有真核系统的蛋白质加工、折叠、翻译后修饰等特点,还有以下优势:(1)表达量高;已报道的使用本文所用的 AOX I^[13]启动子的外源基因最高表达量达到了 12g/L^[14]。(2)容易大规模生产,毕赤酵母非常适合于进行大规模发酵来生产重组蛋白。从 1L 到 10 000L 的发酵规模均有报道。(3)生产成本低廉。(4)遗传稳定性较好。在本研究中经过多次传代,外源基因仍能稳定

表达(相关数据另文发表)。但表达量也取决于外源基因本身,主要体现于其所使用的密码子是否为毕赤酵母所偏爱,国内学者对此也做了研究,并利用毕赤酵母系统表达了改造后的来源于 *Aspergillus niger* 963 的植酸酶基因,达到了摇床培养条件下,植酸酶表达量约为 15000u/mL 的水平^[15]。本文报道了全人工合成的改良黑曲霉 NRRL3135 植酸酶基因 *phyA-as* 在毕赤酵母菌株 X-33 中的高效表达。表达植酸酶的主要酶学性质也得到了鉴定。结果表明该植酸酶与出发菌株所产酶性质基本一致。并且获得了在摇床发酵生产条件下,每毫升发酵液能够产生 165000u 植酸酶的高产基因工程菌,基本满足了工业化生产的要求。SDS-PAGE 结果表明与天然酶相比,该重组酶的糖基化程度更大,这与毕赤酵母的本身的特性相关。酶学性质测定结果表明富糖基化并未提高植酸酶的耐热性。

REFERENCES (参考文献)

- [1] QU 屈健). feeding zymon—phytase, *Feed Panorama*, 1998, 10(5):10~12
- [2] Powar V K, Jagannathan V. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology*, 1982, 151(3):1102~1108
- [3] Shieh T R, Ware J H. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase, *Applied Microbiology*, 1968, 16(9):1348~1351
- [4] Ullah A H J. Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*, *Preparative Biochemistry*, 1988, 18(4):443~458
- [5] Van Hartingsveldt M, Van Zeiji C M J, Hartevelde G M *et al.* Cloning,

- characterization and overexpression of the phytase -encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*, *Gene*, 1993, 127:87~94
- [6] Sharp P M, Tuohy T M, Mosurski K R. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes, *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(13):5125~5143
- [7] Zhao X, Huo K K, Li Y Y. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*, *Chinese Journal of biotechnology*, 2000, 16(3):308~311
- [8] Brake A J, Merryweather J P, Coit D G *et al.* α -Factor-Directed Synthesis and Secretion of Mature Foreign Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1984, 81:4642~4646
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [10] Tai T, Yamashita K, Ogata-Arakawa M *et al.* Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo-beta-N-acetylglucosaminidase specificity, *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(21):8569~8575
- [11] Ullah A H. *Aspergillus ficuum* phytase: partial primary structure, substrate selectivity and kinetic characterization, *Preparative Biochemistry*, 1988, 18(4):459~471
- [12] Ellis S B, Brust P F, Koutz P J *et al.* Isolation of Alcohol Oxidase and Two other Methanol Regulatable Genes from the Yeast, *Pichia pastoris*, *Molecular Cellular Biology*, 1985, 5:1111~1121
- [13] Howson S J and Davis R P. Production of phytase-hydrolysing enzyme by some fungi, *Enzyme & Microbial Technology*, 1983, 5:377~382
- [14] Clare J J, Rayment F B, Balantine S P *et al.* High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene, *Biotechnology (NY)*, 1991, 9(5):455~460.
- [15] YAO 姚斌), ZHANG C Y (张春义), WANG J H (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

Overexpression of Artificial Synthetic Gene of *Aspergillus niger* NRRL3135 Phytase in *Pichia pastoris*

BEI Jin-Long^{1*} CHEN Zhuang² YANG Lin¹ LIAO Ling² WANG Xun-Zhang¹ JIANG Zong-Yong²

¹(Biopharmaceutical Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

²(Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Institute of Animal Science, Guangzhou 510650, China)

Abstract The phytase gene of *Aspergillus niger* NRRL 3135 was modified with a deletion of intron and signal coding sequence. Then, according to the codon preference of *Pichia pastoris*, modified *phyA* gene was artificially synthesized and cloned into expression vector of pPICZ α A. The recombinant plasmid was transformed into chromosome of *Pichia pastoris* X-33 strain by electroporation. The results of SDS-PAGE and enzymatic kinetic analysis proved that the recombinant phytase was secreted into culture medium with nearly same character of natural phytase. After screening for high level productive yeast strains, a strain named SPAN-III produced recombinant phytase with 165000u/mL under the condition of shake cultivation. It will satisfy the demand for industrialized production in some degree.

Key words artificial synthesis of gene, phytase gene of *phyA-as*, gene cloning, *Pichia pastoris*

Received: November 13, 2000

This work was supported by Grant from Guangdong Provincial Natural Science Foundation (990508).

* Corresponding author. Tel: 86-20-84112504; Fax: 86-20-84036551; E-mail: jcl6@zhuo.cn

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