

文章编号:1673-1689(2005)02-0060-05

Bacillus amyloliquefaciens 中性植酸酶基因的原核表达及蛋白纯化和性质

陈 艳^{1,2}, 孙建义^{1*}, 赵学新², 付石军¹, 翁晓燕³

(1. 浙江大学 教育部动物分子营养学重点实验室, 浙江 杭州 310029; 2. 山东省潍坊市畜牧技术推广站, 山东 潍坊 261000; 3. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310029)

摘 要: 淀粉液化芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 是一种嗜热细菌, 其产生的中性植酸酶具有很好的应用前景. 通过 TD-PCR 技术将 *Bacillus amyloliquefaciens* 编码的中性植酸酶基因克隆至原核表达载体 pET-30a(+), 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中得到了高效表达, 表达量占大肠杆菌可溶性蛋白的 33.5%. 采用金属 Ni^{2+} 亲和层析对基因表达产物进行纯化, 表达产物具有正常的生物学功能.

关键词: *Bacillus amyloliquefaciens*; 中性植酸酶; 高效表达; 纯化

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Expression of Neutral Phytase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* in *Escherichia coli*

CHEN Yan^{1,2}, SUN Jian-yi^{1*}, ZHAO Xue-xin², FU Shi-jun¹, WENG Xiao-yan³

(1. The Key Laboratory of Animal Molecular Nutrition, Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. The Institute of Husbandry and Veterinary of Weifang, Shandong Province, Weifang 261000, China; 3. The College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: *Bacillus amyloliquefaciens* is one of the few thermophilic bacteria. The phytase found in *B. amyloliquefaciens* has shown the extremely thermostability and considerable potential in large-scale production. The gene of phytase BPhyC from *B. amyloliquefaciens* was amplified by TD-PCR, inserted into the plasmid pET-30a(+), and fused with the 6 His tag. The recombinant plasmid was transformed to *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein was purified by heating and immobilizing metal affinity chromatography. The expression phytase was over 40% the total soluble protein of *E. coli* and has normal bioactivity.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; neutral phytase; overexpression; purification

作为饲料主要来源的玉米、豆饼粕、谷糠、棉籽粕中所含的磷大约有 40%~70% 以植酸磷的形式

存在. 单胃动物消化道内缺乏水解植酸磷的酶, 其利用率小于 40%, 大部分磷被直接排出体外, 形成

收稿日期: 2004-05-14; 修回日期: 2004-11-26.

作者简介: 陈艳(1978-), 女, 山东潍坊人, 农学硕士; * 责任作者.

万方数据

的高磷粪便严重污染环境^[1,2]. 另外, 植酸盐在动物胃肠道的消化吸收过程中与多种金属离子如 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 等以及蛋白质螯合成相应的不溶性化合物, 降低动物对营养物质的有效利用^[3].

植酸酶可使植酸磷降解成肌醇和磷酸. 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^[4], 促进动物生长发育, 提高畜牧业生产效益, 减少环境污染.

以往的研究主要集中在酸性植酸酶上, 并且已从不同的微生物中得到了分离, 如 *Aspergillus niger* (ficuum)、*Myceliophthora thermophila* 和 *Talaromyces thermophilus* 等^[5~9], 而对中性植酸酶研究比较少. 由于酸性植酸酶在 pH 中性的条件下活性比较低, 不适合在消化道无胃、肠道呈中性的鲤科鱼类中应用. 芽孢杆菌植酸酶具有近乎中性的 pH 值, 酶活较高, 热稳定性好, 可广泛应用于水产饲料中, 同时可与酸性植酸酶配合用于单胃畜禽动物, 具有很好的应用前景.

作者从淀粉水解芽孢杆菌中分离克隆中性植酸酶基因, 此基因因此大肠杆菌中高效表达, 且表达产物具有正常的生物学活性.

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

Bacillus amyloliquefacien 菌株由作者所在实验室自行分离、保存; 大肠杆菌菌株 *E. coli* TGW、BL21(DE3)、克隆载体 pGEM-T Easy Vector 均购自 Promega 公司; 大肠杆菌表达质粒 pET-30a(+) 为 Novagen 公司产品.

1.2 工具酶和生化试剂

限制酶 BamH I 和 Xho I 等购自 Gibco 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; Taq 酶购自上海生物工程有限公司; 蛋白质相对分子质量标准为 Phamacia 公司产品; 植酸钠、IPTG 购自 Sigma 公司.

1.3 *Bacillus amyloliquefacien* 菌株总 DNA 的提取

取 37 ℃ 培养 2~3 d 的菌液, 5 000 r/min 离心 10 min, 清洗并收集菌体约 1.0 g 放于研钵中, 在液氮存在的情况下磨成细粉. 将细粉转至干净的离心管中, 加入 4.2 mL TE 缓冲液和 1.0 mL 溶菌酶, 混匀, 60 ℃ 水浴 10 min, 加入 0.225 mL 10% SDS, 混匀, 60 ℃ 水浴保温 10 min, 加入 RNase 60 μL, 37 ℃ 水浴 2 h, 加入 ProteinaseK 40 μL, 37 ℃ 水浴

2 h, 55 ℃ 保温 1 h, 冷却至室温, 8 000 g 离心 15 min, 上清液转移至另一洁净的离心管中, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇, 柔和颠倒几次, 10 000 g 离心 5 min, 取上清液于干净的 10 mL 离心管中, 反复 3 次, 加入 1/20 体积的 5 mol/L 的氯化钠和 2 倍体积的无水乙醇, 10 000 g 离心 2 min, 弃去上清液, 加入适量体积 70% 的乙醇, 1 000 g 稍离心, 弃去上清液, 重复此步骤 3 次, 室温干燥沉淀, 加入 50 μL 的 TEN 缓冲液以溶解 DNA, -70 ℃ 保存备用.

1.4 植酸酶基因 phyC 的克隆及大肠杆菌重组表达载体的构建

首先根据 GenBank 报道的 *Bacillus amyloliquefaciens* AY055220 植酸酶基因设计引物. 在引物中分别引入 BamH I 和 Xho I (划线部分), 引物由上海生物工程有限公司合成. 分别为

上游引物 P1: 5' AGGAGGATCCATGAATCATTTCAAAAACACTT 3',

下游引物 P2: 5' CACTCGAGTTTTTCCGCTTCTGTCTCGG 3'.

将克隆到的带有信号肽编码序列的植酸酶基因 phyC 插入表达质粒 pET-30a(+) 上, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取阳性克隆子用于表达研究.

1.5 中性植酸酶的诱导表达及产物 SDS-PAGE 分析

挑重组子于 3 mL LB 培养基 (含 100 μg/mL Kana) 中 30 ℃ 培养过夜, 按 0.1% 接种到 300 mL LB 培养基中 (含 100 μg/mL Kana), 30 ℃, 250 r/min 培养过夜 (约 12 h); 然后加入终质量浓度为 240 μg/mL 的 IPTG 进行诱导表达约 4 h. 取 1 mL 诱导培养物 1.5 mL 菌液 12 000 r/min 离心 10 min, 彻底除去上清液, 收集菌体; 加 100 μL 的 PBS 缓冲液悬浮菌体, 加 2 倍上样缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8、200 mmol/L DTT, 4% SDS、0.2% 溴酚蓝、20% 甘油) 100 μL, 100 ℃ 煮 10 min 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 15 μL 进行丙烯酰胺凝胶电泳.

1.6 表达产物的纯化及酶学特性测定

由于所采用的 pET30a(+) 表达系统所表达的蛋白质带有 6 个连续的组氨酸, 可以通过金属离子层析柱 (Ni-NTA Agarose) 亲和纯化. 超声波破碎诱导后的菌体于 15 000 r/min 离心, 去除细胞碎片, 上清液进行冷冻干燥浓缩. 采用 QIAGEN 公司 His 纯化试剂盒, 操作参照 The QIA expressionist (第五版) 中的纯化步骤 10, 17.

酶活测定方法如下: 过柱后的洗脱液适当稀

释. 0.2 mL 的酶液加入 0.8 mL 1% 的植酸钠, 37 ℃ 保温 30 min, 加入 1 mL 10% TCA 终止酶活反应, 然后加入 2 mL 硫酸亚铁—钼酸铵显色液, 700 nm 比色(721 型分光光度计)测定无机磷含量. 对照先在 0.2 mL 的酶稀释液中加入 1 mL 10% TCA (三氯乙酸)使酶灭活, 再加入底物. 酶活单位定义为: 在 pH 5.0, 37 ℃ 反应液中, 底物每分钟释放 1 nmol 无机磷的酶量为 1 个酶活力单位(U).

配制 pH 2.0~9.0 的一系列缓冲液. (pH 2.0~3.0, 0.2 mol/L 甘氨酸—HCl 缓冲液; pH 3.5~5.5, 0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液; pH 6.0~6.5, 0.2 mol/L 咪唑—HCl 缓冲液; pH 7.0~9.0 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液), 再用 pH 计校正. 用上述不同 pH 缓冲液分别配制测定酶液和 1% 植酸钠底物, 最适温度下反应 10 min, 测其酶活. 用上述不同的 pH 缓冲液在 37 ℃ 水浴条件下处理酶液 4.0 h, 然后测其酶活.

2 试验结果

2.1 中性植酸酶基因的克隆测序

以提取的 *Bacillus amyloliquefaciens* 基因组为模板, P1、P2 为引物进行扩增, TD-PCR (Touchdown PCR) 的反应参数为: 94 ℃ 预变性 2 min, 94 ℃ 变性 50 s、63 ℃ 退火 50 s、每个循环降低 0.2 ℃、72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环后, 72 ℃ 保温 10 min. 扩增产物用 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测, 见图 1. 结果发现在 1 200 bp 处有一条带, 这与预期片段相符, 说明已经成功克隆.

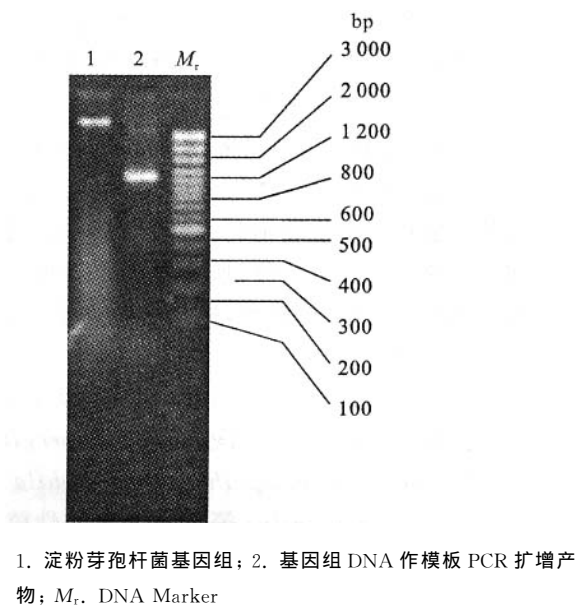


图 1 淀粉芽孢杆菌植酸基因 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of phytase gene from *B. amyloliquefaciens*

中性植酸酶基因序列见图 2. 克隆序列全长为 1 152 bp, 编码 383 个氨基酸的前体蛋白, 根据信号肽序列的结构规则推断, N-端的 26 个氨基酸为信号肽, 信号肽的切割位点在 +26 位的 Ala 之后. 此植酸酶基因与基因库中已登录的中性植酸酶基因 (AF029053, AY055220, AF290103) 同源性在 90% 以上, 而与以往大量报道的来源于丝状真菌酸性植酸酶基因均无同源性, 也不含有丝状真菌和植物来源的植酸酶蛋白中存在的高度保守序列: RHGAR-YP. 这说明分离到的植酸酶为另一类植酸酶.

1	GGA TCC ATG AAT CAT TCA AAA ACA CTT TTG TTA ACC GCG GCG GCC GGA CTG ATG CTC ACA	60
1	BamHI M N H S K T L L L T A A A G L M L T	20
61	TGC GGT GCG GTG TCT TCC CAG GCA AAG CAT AAG CTG TCC GAT CCT TAT CAT TTT ACC GTG	120
21	C G A V S S Q A↑ K H K L S D P Y H F T V	40
121	AAT GCA GCG GCG GAA ACG GAA CCG GTT GAT ACG GCC GGT GAC GCG GCT GAT GAT CCT GCG	180
41	N A A A E T E P V D T A G D A A D D P A	60
181	ATT TGG CTG GAC CCC AAG ACT CCT CAG AAC AGC AAA TTG ATT ACG ACC AAT AAA AAA TCA	240
61	I W L D P K T P Q N S K L I T T N K K S	80
241	GGT TTA GTC GTT TAC AGC CTT GAT GGT AAG ATG CTT CAT TCC TAT AAT ACC GGG AAG CTG	300
81	G L V V Y S L D G K M L H S Y N T G K L	100
301	AAC AAT GTC GAT ATC CGT TAT GAT TTT CCG TTG AAC GGC AAA AAA GTC GAT ATC GCG GCA	360
101	N N V D I R Y D F P L N G K K V D I A A	120
361	GCA TCC AAT CGG TCT GAA GGA AAA AAT ACC ATT GAG ATT TAC GCT ATT GAT GGA AAA AAC	420
121	A S N R S E G K N T I E I Y A I D G K N	140
421	GGC ACA TTA CAA AGC ATG ACA GAT CCA GAC CAT CCG ATT GCA ACA GCA ATT AAT GAG GTA	48
141	G T L Q S M T D P D H P I A T A I N E V	160
481	TAC GGT TTA ACC TTA TAC CAC AGT CAA AAA ACA GGA AAA TAT TAC GCG ATG GTG ACA GGA	540

161	Y	G	F	T	L	Y	H	S	Q	K	T	G	K	Y	Y	A	M	V	T	G	180
541	AAA	GAG	GGT	GAA	TTT	GAA	CAA	TAC	GAA	TTA	AAG	GCG	GAC	AAA	AAT	GGA	TAC	ATA	TCC	GGC	600
181	K	E	G	E	F	E	Q	Y	E	L	K	A	D	K	N	G	Y	I	S	G	200
601	AAA	AAG	GTA	CGG	GCG	TTT	AAA	ATG	AAT	TCC	CAG	ACG	GAA	GGG	ATG	GCA	GCA	GAC	GAT	GAA	660
201	K	K	V	R	A	F	K	M	N	S	Q	T	E	G	M	A	A	D	D	E	220
661	TAC	GGC	AGG	CTT	TAT	ATC	GCA	GAA	GAA	GAT	GAG	GCC	ATT	TGG	AAG	TTC	AGC	GCC	GAG	CCG	720
221	Y	G	R	L	Y	I	A	E	E	D	E	A	I	W	K	F	S	A	E	P	240
721	GAC	GGC	GGC	AGT	AAC	GGA	ACG	GTT	ATC	GAC	CGT	GCC	GAC	GGC	AGG	CAT	TTA	ACT	CGT	GAT	780
241	D	G	G	S	N	G	T	V	I	D	R	A	D	G	R	H	L	T	R	D	260
781	ATT	GAA	GGA	TTG	ACG	ATT	TAC	TAC	GCT	GCT	GAC	GGG	AAA	GGC	TAT	CTG	ATG	GCA	TCA	AGC	840
261	I	E	G	L	T	I	Y	Y	A	A	D	G	K	G	Y	L	M	A	S	S	280
841	CAG	GGA	AAC	AGC	AGC	TAC	GCC	ATT	TAT	GAC	AGA	CAA	GGA	AAG	AAC	AAA	TAT	GTT	GCG	GAT	900
281	Q	G	N	S	S	Y	A	I	Y	D	R	Q	G	K	N	K	Y	V	A	D	300
901	TTT	CGC	ATA	ACA	GAC	GGT	CCT	GAA	ACA	GAC	GGG	ACA	AGC	GAT	ACA	GAC	GGA	ATT	GAC	GTT	960
301	F	R	I	T	D	G	P	E	T	D	G	T	S	D	T	D	G	I	D	V	320
961	CTG	GGT	TTC	GGA	CTG	GGG	CCT	GAA	TAT	CCG	TTC	GGT	ATT	TTT	GTC	GCA	CAG	GAC	GGT	GAA	1020
321	L	G	F	G	L	G	P	E	Y	P	F	G	I	F	V	A	Q	D	G	E	340
1021	AAT	ATA	GAT	CAC	GGC	CAA	AAG	GCC	AAT	CAA	AAT	TTT	AAA	ATC	GTG	CCA	TGG	GAA	AGA	ATT	1080
341	N	I	D	H	G	Q	K	A	N	Q	N	F	K	I	V	P	W	E	R	I	360
1081	GCT	GAT	CAA	ATC	GGT	TTC	CGC	CCG	CTG	GCA	AAT	GAA	CAG	GTT	GAC	CCG	AGA	AAA	CTG	ACC	1140
361	A	D	Q	I	G	F	R	P	L	A	N	E	Q	V	D	P	R	K	L	T	380
1141	GAC	AGA	AGC	GGA	AAA	<u>CTC GAG</u>														1161	
381	D	R	S	G	K	XhoI														400	

图 2 来源于 *Bacillus amyloliquefaciens* 的中性植酸酶的基因序列及推导出的氨基酸序列

Fig. 2 The DNA sequence of phytase gene BPhyC from *Bacillus amyloliquefaciens* and deduced AA sequence signal peptide encoding sequence is indicated by sequence underlined signal peptide cleavage site indicated vertical arrows

2.2 表达载体的构建及重组质粒酶切鉴定

将带有自身信号肽的 BPhyC 基因通过 BamH I 和 Xho I 位点定向插入大肠杆菌表达载体 pET-30a(+)(见图 3),得到重组质粒 pPhyC. 重组表达载体 pET-30(+)-a-GH 经 BamHI 和 XhoI 双酶切得到与插入片段同样大小的片段,酶切得到的片段与克隆得到的基因片段的长度相符,说明重组表达质粒构建成功. 正反测序结果表明,所插入的中性植酸酶基因序列完全正确.

2.3 中性植酸酶基因 BPhyC 在大肠杆菌中的表达

所表达的中性植酸酶蛋白的 SDS-PAGE 见图 4. 结果表明,中性植酸酶基因 BPhyC 在大肠杆菌得到了高效表达. 在标准蛋白质 45 000~66 000 之间有一条明显的特异性蛋白质条带,其相对分子质量约为 50 000,基因工程菌经 IPTG 诱导后(泳道 1)比未经诱导的(泳道 2)的表达量明显提高,占菌体总蛋白质的 21.3%,比推导出的理论相对分子质量 41 900大. 这是由于两方面因素引起的,一方面 pET 表达系统中自带一段信号肽与 BPhyC 基因发生融合表达,另一方面在试验设计时去掉了基因序

列本身的终止子(TAA),采用系统的终止子(TGA),并融合表达了两个有利于用 Ni-NTA 纯化的组氨酸链.

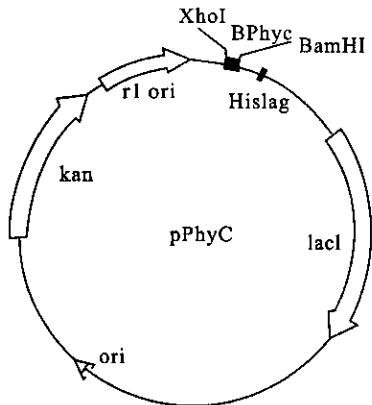


图 3 重组表达质粒 pPhyC 的物理图谱

Fig. 3 Physical map of recombinant expression plasmid pPhyC

2.4 中性植酸酶的酶学特性

表达产物用 Ni-NTA 亲和纯化,分别经 10,20,250 mmol/L 咪唑依次洗脱,测酶活. 收集酶液,进行分析,结果见图 5.

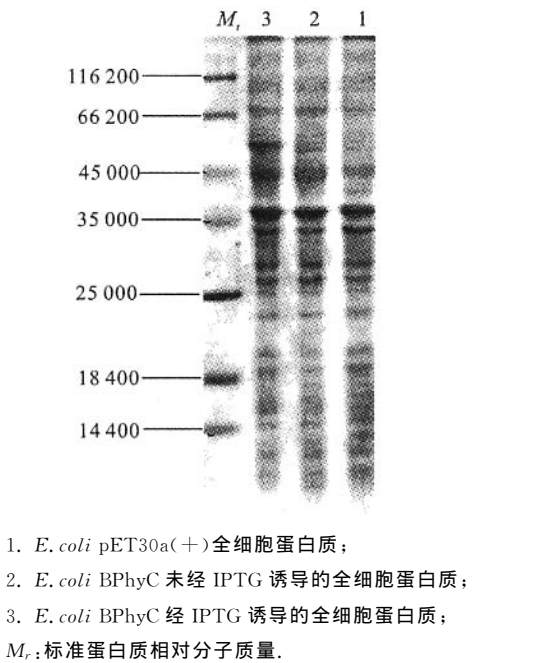


图 4 中性植酸酶的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the neutral phytase

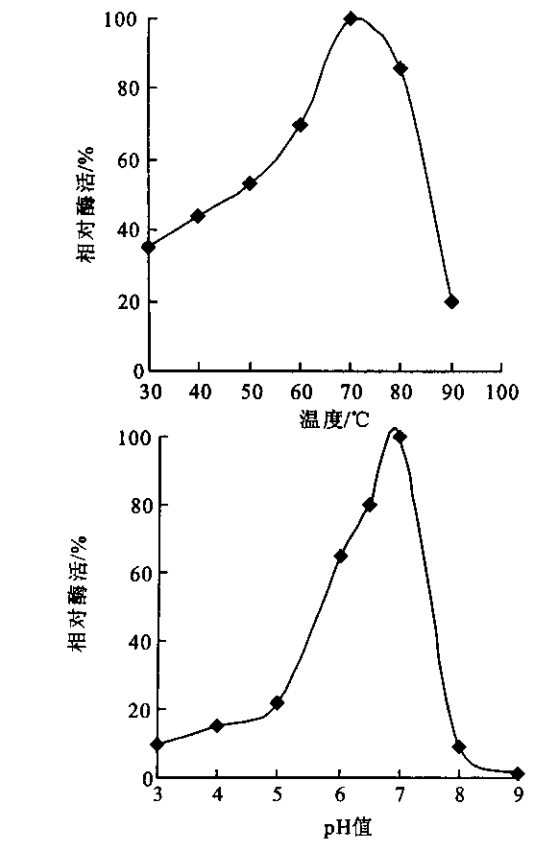


图 5 中性植酸酶的最适反应温度和最适 pH 值
Fig. 5 The optimal temperature and the optimal pH of phytase

结果表明,在 37 ℃ 下其反应的最适 pH 值为 7.5;最适 pH 值下,反应的最佳温度为 70 ℃ ;37 ℃ 以植酸钠为底物的 K_m 值为 0.32 mmol/L,单位发酵液工程菌植酸酶活性为 480.6 U/mL,为出发菌株活性的 1.27 倍.表达的中性植酸酶在最适温度、pH 值等酶学特性跟 *Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus subtilis* 的中性植酸酶基本一致,这证明克隆到的这一基因为中性植酸酶基因.

3 讨 论

在大肠杆菌中表达的中性植酸酶具有正常的生物学功能,酶学性质与淀粉液化芽孢杆菌原始植酸酶一致,但表达的植酸酶蛋白活性较低.经进一步分析,其原因可能是由于在大肠杆菌中表达的植酸酶大多以无活性的包涵体的形式存在.将重组子植酸酶诱导温度从 37 ℃ 降低到 28 ℃ ,表达量一致的情况下,检测到的酶活性也有所提高,占可溶性蛋白质的 33.5%.枯草芽孢杆菌植酸酶基因在不同的系统中表达,相继发现了有包涵体形式的存在,如 Kerovuo 将带有自身信号肽的 *B. subtilis* 植酸酶基因克隆到表达载体 pQE-70,表达的融合蛋白 90% 以包涵体的形式存在,姚斌等将来源于 *B. subtilis* 植酸酶基因在 *E. coli* BL21 中表达,产物 70% 以包涵体的形式存在.淀粉液化芽孢杆菌植酸酶基因可能也具有这个特征,确切原因有待进一步研究.

Ca^{2+} 对维持 *Bacillus amyloliquefaciens* 植酸酶的活性和稳定性都起着很重要的作用,酶反应体系中加入不同浓度的 Ca^{2+} ,结果表明,反应体系中无 Ca^{2+} 时,检测不到酶活性,随着 Ca^{2+} 浓度的增加,植酸酶的活性进一步提高,浓度达到 1 mmol/L 时,酶活性达到最高值.这说明此中性植酸酶的生物活性依赖 Ca^{2+} 存在. Shin 等^[10] 在 2001 年研究发现 *Bacillus amyloliquefaciens* 植酸酶的活性部位不仅有 4 个 Ca^{2+} ,而且还有两个不同的磷酸离子 (Pho1 和 Pho2) 的结合位点.该酶的 4 个 Ca^{2+} 与结合在 pho1 位点的磷酸离子发生螯合,在亲和位点的 Lys76、Arg122、Tyr159、Lys179 残基侧链与结合在 Pho2 位点的磷酸离子发生相互作用.

(下转第 72 页)

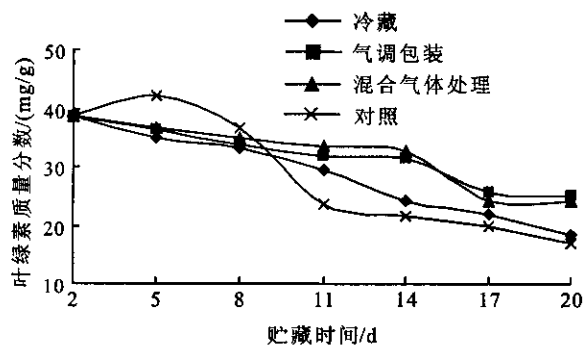


图8 4种处理对芦笋叶绿素的影响

Fig.8 Effects of four treatments on the chlorophyll of Asparagus

3 结论

在芦笋保鲜实验中,0.9 MPa 混合惰性气体处理后的芦笋有明显的保鲜效果,在芦笋的贮藏过程中,各项指标都好于直接冷藏,在抑制呼吸高峰、减少纤维素含量增加和膜通透性方面则好于气调包装.

参考文献:

- [1] Yohanes Aris Purwanto, Seiichi Oshita, Yasuhisa Seo, *et al.* Concentration of liquid foods by the use of gas hydrate[J]. *Journal of Food Engineering*, 2001, 47: 133—138.
- [2] Kazunari Ohgaki, Takeshi Sugahara, Masaru Suzuki, *et al.* Phase behavior of xenon hydrate system[J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2000, 175: 1—6.
- [3] Vladimir R Belosludov, Talgat M Inerbaev, Oleg S, *et al.* Thermal expansion and lattice distortion of clathrate hydrates of cubic structures I and II[J]. *Journal of Supramolecular Chemistry*, 2002, 2: 453—458.
- [4] 黄光荣, 沈清莲, 王向阳. 芦笋 MAP 保鲜研究[J]. *食品科学*, 2000, 21(7): 50—54.
- [5] 孙长宇, 陈光进, 郭天明. 水合物成核动力学研究现状[J]. *石油学报*, 2001, 23(1): 82—86.
- [6] 耿昌红, 裘俊红. 笼形水合物分离技术[J]. *浙江工业大学学报*, 2001, 29(2): 131—135.
- [7] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990.
- [8] 叶世柏. 食品理化检验方法指南[M]. 北京: 北京大学出版社, 1991.
- [9] 段旭昌, 高鹏程, 李志成. 芦笋嫩茎生长期及采后生理变化的研究[J]. *西北农林科技大学学报*, 2002, 12(6): 104—107.

(责任编辑: 杨 勇)

(上接第 64 页)

参考文献:

- [1] Reddy N R, Sathe S K, Salunkhe D K. Phytates in legumes and cereals[J]. *Adv Food Res*, 1982, 28: 1—92.
- [2] Cromwell G L, Coffey R D. Biotechnology in the Feed Industry[M]. Nicholasville: Alltech Technical Publisher Press, 1991.
- [3] Sharma C B, Goel M, Irshad M. Myo-inositol hexaphosphate as a potential inhibitor of amylases of different origins[J]. *Phytochemistry*, 1978, 17: 201—204.
- [4] Nelson T S, Shiel T R, Eodzinski R J, *et al.* The availability of phytase phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase[J]. *Poult Sci*, 1968, 47: 1842—1848.
- [5] Piddington C S, Houston C S, Paloheimo M, *et al.* The cloning and sequencing of the genes encoding phytase(phy) and pH 2.5-optimum acid phosphatase(aph) from *Aspergillus niger* var. awaamori [J]. *Gene*, 1993, 133: 55—62.
- [6] Van Hartingsveldt M, Van Zeijl C M J, Harteveld G M, *et al.* Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene(phyA) of *Aspergillus niger*[J]. *Gene*, 1993, 127: 87—94.
- [7] Mitchell D B, Vogel K, Weimann B J, *et al.* The phytase Subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*[J]. *Microbiology*, 1997, 143: 243—252.
- [8] Pasamontes L, Hailer M, Henriquez-Huecas M, *et al.* Cloning of the phytase from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilic*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1353(3): 217—223.
- [9] 姚斌, 范云六. 植酸酶的分子生物学与基因工程[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(1): 1—5.
- [10] Shin S, Ha N C, Oh B C, *et al.* Enzyme mechanism and catalytic property of β propeller phytase[J]. *Structure with Folding and Design*, 2001, 9: 851—858.

万方数据

(责任编辑: 李春丽)