

Design of gene structure and expression of *E. coli* phytase and *Aspergillus Niger* phytase in *Pichia pastoris* yeast in order to increase plant phytate degradation

Bahareh Pakbaten 

Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: bahareh.pakbaten@gmail.com

Hassan Kermanshahi 

*Corresponding author. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: kermansh@um.ac.ir

Farhid Hemmatzadeh 

Assistant Professor, School of Animal and Veterinary Science, The University of Adelaide, Roseworthy, South Australia, Australia. E-mail address: farhid.hemmatzadeh@adelaide.edu.au

Reza Majidzadeh Heravi 

Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: rmajidzadeh@um.ac.ir

Ali Javadmanesh 

Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: javadmanesh@um.ac.ir

Abstract

Objective

Phytases are classified as 3-phytases (E.C.3.1.3.8), 5-phytases (E.C. 3.1.3.72) and 6-phytases (E.C. 3.1.3.26) based on the position of the first phosphate residue removed from the myo-inositol ring of phytate. *P. pastoris* has been of interest in the last few years as an industrial expression system. Among the advantages of this expression system, can mention strong and adjustable progress, high density of cells in culture medium and convenient genetic manipulation. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* requires a simpler environment (only one carbon source and one nitrogen source) than other yeasts to produce recombinant products at high cell density. The coexpression of digestive enzymes in a single recombinant cell system would thus be advantageous. The objective of this study is to determine whether combining fungal phytases (3-phytase) with bacterial phytase (6-phytase) was more effective than each phytase alone in degrading of plant phytate. In the paper, we tested the new vector, aimed to clone and coexpress the phytase genes (appA and phyA) isolated from *E. coli* and *aspergillus niger*, respectively, and

transformed into *Pichia pastoris*. Evaluations were made for the biochemical properties of the active expressed phytase.

Materials and methods

The nucleotide sequence of phyA and appA2, 2a peptide and alpha factor were obtained from NCBI database. A coexpression system for the extracellular production of phytase of *Aspergillus Niger* (3-phytase) and phytase of *E. coli* (6-phytase) will be established in *Pichia pastoris* yeast. Plasmid that used in this study was pPIC9k. The genes for each enzyme are fused in-frame with the “a-factor” secretion signal and linked by the 2A-peptide-encoding sequence. After receiving the synthetic plasmid with fragments, plasmid that contained phyA and appA2 was cloned in DH5@ and after that digested by SacI and transferred by electroporation into *Pichia pastoris*. Positive cells are resuspended at 5 mL of BMMY containing 0.5 percent methanol as an inducer. To follow the induction, methanol was injected into the culture every 24 hours in order to reach a definitive concentration of 0.5 percent. The recombinant protein was analyzed using sds-page.

Results

The results of present study showed that the recombinant phytase gene was transferred to *Pichia pastoris* and the results of PCR confirmed that. The molecular weight of the produced recombinant phytases was estimated to be around 45 and 80 kDa for appA and phyA, respectively by SDS-PAGE. The recombinant protein has phytase activity equal to 160.97 U/ml.

Conclusions

In general, this study has shown successful results in the production and expression of two phytases in *Pichia pastoris* yeast and can be used to increase phytate decomposition in poultry. Recombinant yeast will be used for further experiments (farm experiments).

Keywords: Co-expression, Phytase enzyme, *Pichia pastoris*, Poultry, Recombinant protein

Paper Type: Research Paper.

Citation: Pakbaten B, Kermanshahi H, Hemmatzadeh F, Majidzadeh heravi R, Javadmanesh A (2024) Design of gene structure and expression of *E. coli* phytase and *Aspergillus Niger* phytase in *Pichia pastoris* yeast in order to increase plant phytate degradation. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (1), 135-154.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (1), 135-154. DOI: 10.22103/jab.2023.22428.1517

Received: October 25, 2023.

Received in revised form: December 27, 2023.

Accepted: December 28, 2023.

Published online: February 20, 2024.




Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

طراحی سازه ژنی فیتاز ایکولای و فیتاز اسپرژیلوس نایجر و بیان آن در مخمر پیکیا

پاستوریس به منظور افزایش تجزیه فیتات گیاهی


بهاره پاک باطن 

دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران. رایانامه


Bahareh.pakbaten@gmail.com

حسن کرمانشاهی 

*نویسنده مسئول: استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران. رایانامه kermansh@um.ac.ir

فرهید همت زاده 

دانشیار، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آدلاید، استرالیا. رایانامه farhid.hemmatzadeh@adelaide.edu.au

رضا مجیدزاده هروی 

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران. رایانامه rmajidzade@um.ac.ir

علی جوادمنش 

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران. رایانامه javadmanesh@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۳ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۷

چکیده

هدف: فیتازها براساس اولین کربنی که در حلقه میواینوزیتول فسفات در فیتات دفسفریلاسیون شروع می شود به گروه های ۳- فیتازها (E.C. 3.1.3.8)، ۶- فیتازها (E.C. 3.1.3.26) و ۵- فیتازها (EC 3.1.3.72) طبقه بندی می شوند. مخمر *pastoris* P. در چند سال گذشته به عنوان سیستم بیانی صنعتی مورد توجه واقع شده است. از مزایای این سیستم بیانی می توان به پیش بر قوی و قابل تنظیم، تراکم بالای سلول ها در محیط کشت و دست کاری راحت ژنتیکی اشاره کرد. مخمر متانول دوست پیکیا پاستوریس برای تولید پروتئین های نو ترکیب در تراکم سلولی بالا به محیط ساده تری (فقط یک منبع کربن و یک منبع نیتروژن) نسبت به بقیه مخمرها نیاز دارد که باعث کاهش هزینه های تولید می شود. بنابراین بیان هم زمان دو آنزیم در یک میزبان بیانی نو ترکیب سودمند

خواهد بود. هدف از این مطالعه ساخت وکتور نو ترکیب حاوی ژن‌های آنزیم فیتاز ایکولای از خانواده ۶-فیتاز و آنزیم فیتاز آسپرژیلوس نایجر از خانواده ۳-فیتاز به منظور افزایش تجزیه فیتات و بیان هم‌زمان آنها در مخمر پیکیا پاستوریس بود.

مواد و روش‌ها: توالی نوکلئوتیدی ژن‌های آنزیم فیتاز ایکولای، (*appa2*) فیتاز آسپرژیلوس نایجر، (*phyA*) لینکر 2a و سیگنال پپتید آلفا فاکتور از پایگاه داده NCBI دریافت گردید. در این پژوهش ژن‌های فیتاز ایکولای (*appa2*) و آسپرژیلوس نایجر (*phyA*) که به وسیله لینکر a2 بهم متصل شده بودند در پلاسمید PIC9K طراحی و برای سنتز به شرکت Genescript آمریکا فرستاده شد. پس از دریافت پلاسمید سنتز شده که حاوی ژن‌های مورد نظر بود، این سازه ژنی در باکتری DH5a کلون شد و پس از برش با آنزیم *SacI* به روش الکتروپوریشن وارد ژنوم مخمر *Pichia pastoris* شد. تحریک بیان ژن با استفاده از متانول در غلظت نهایی نیم درصد در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد صورت گرفت. نمونه‌گیری هر ۲۴ ساعت انجام شد و میزان تولید پروتئین نو ترکیب با استفاده از الکتروفورز بررسی گردید.

نتایج: صحت همساز سازی پلاسمید نو ترکیب در مخمر با استفاده از واکنش کلونی پی سی آر تأیید شد. نتایج SDS-PAGE نشان داد که فیتاز *appa* و فیتاز *phyA* با موفقیت در مخمر پیکیا پاستوریس بیان شد. وزن مولکولی فیتازهای نو ترکیب تولید شده در حدود ۴۵ و ۸۰ کیلو دالتون به ترتیب برای فیتاز *appa* و فیتاز *phyA* تخمین زده شد. فعالیت آنزیم نو ترکیب تولید شده 160/97 U/ml بود.

نتیجه‌گیری: به طور کلی، این مطالعه نتایج موفقیت‌آمیز در ساخت و بیان هم‌زمان دو فیتاز در مخمر پیکیا پاستوریس را نشان داده و می‌تواند به منظور افزایش تجزیه فیتات در طیور مورد استفاده قرار بگیرد. این سازه ژنی برای انجام آزمایشات بعدی (آزمایشات مزرعه‌ای) استفاده خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: آنزیم فیتاز، پروتئین نو ترکیب، پیکیا پاستوریس، طیور

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: پاک باطن بهاره، کرمانشاهی حسن، همت زاده فرهید، مجیدزاده هروی رضا، جوادمنش علی (۱۴۰۳) طراحی سازه ژنی فیتاز ایکولای و فیتاز آسپرژیلوس نایجر و بیان آن در مخمر پیکیا پاستوریس به منظور افزایش تجزیه فیتات گیاهی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۶(۱)، ۱۳۵-۱۵۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

جیره غذایی طیور در بیشتر کشورها بر پایه گیاهان از جمله ذرت و سویا هست. گیاهان منبع غنی از فسفر محسوب می‌شوند که تقریباً ۶۰ تا ۷۵ درصد فسفر موجود در آن‌ها به صورت باند شده با فیتات می‌باشد (Sell and Ravindran 2007). فسفر متصل به فیتات برای حیوانات تک معده‌ای همچون طیور و خوک غیرقابل دسترس می‌باشد در نتیجه با فضولات دفع می‌شود. سطح فسفر بالا در مدفوع می‌تواند به دریاچه‌ها و رودخانه‌ها منتقل شده و سبب آلودگی محیط زیست شوند (Naham 2007). از طرفی فیتات با اتصال به مواد مغذی، آمینواسیدها و چربی‌ها، سبب عدم جذب آن‌ها شده و هم چنین با اتصال به پروتئین‌ها، سبب جلوگیری از عملکرد صحیح آن‌ها در داخل جیره حیوانات می‌گردد (Kumar et al. 2010).

فیتاز آنزیمی است که قادر است مولکول فیتات را هیدرولیز نماید و در نتیجه سبب آزاد شدن فسفر و سایر مواد مغذی متصل به آن شود. در نتیجه استفاده از آنزیم فیتاز می‌توان جیره‌هایی تنظیم نمود که سطح فسفات، اسیدهای آمینه، پروتئین، انرژی قابل متابولیسم و مواد معدنی پایین‌تری را دارا باشند و بدین طریق می‌توان هزینه‌های تولید و آلودگی‌های زیست‌محیطی را کاهش داد (Greiner and Konietzny 2006).

کمیته نام‌گذاری آنزیم اتحادیه بین‌المللی بیوشیمی^۱ سه گروه از آنزیم‌های فیتاز به نام‌های ۳-فیتاز (EC 3.1.3.8) ۶-فیتاز (EC 3.1.3.26) و ۵-فیتاز (EC 3.1.3.72) را توجه به شماره کربن حلقه اینوزیتول که گروه فسفات آن توسط آنزیم برداشته می‌شود ارائه داده است. مطالعات ژنتیکی فیتازها در سال ۱۹۸۴ شروع شد. اولین و شاید بهترین فیتاز شناخته شده فیتاز مربوط به *A.niger* است که به وسیله یک قطعه ۱,۴ kb رمز می‌شود و وزن مولکولی آن ۸۰ کیلودالتون می‌باشد. این فیتاز از نوع ۳-فیتاز می‌باشد (Ehrlich et al. 1993). فیتازهای باکتریایی مانند فیتاز *E.coli* غیر گلیکوزیله هستند. این فیتاز در مقایسه با فیتاز قارچی به دلیل pH بهینه اسیدی، مقاومت به پپسین و فعالیت ویژه بالا نسبت به فیتات در رهاسازی فسفر از جیره غذایی خوک و طیور مؤثرتر است (Lei et al. 2007). فیتاز ایکولای از نوع ۶-فیتاز می‌باشد و اندازه آن ۴۵ کیلودالتون است. کارایی یک نوع فیتاز که به خوراک اضافه می‌شود کم است و قابلیت هضم فسفر را حدود ۱۲ تا ۱۸٪ در خوراک طیور بهبود می‌بخشد. استفاده ترکیبی از دو گروه آنزیم، قابلیت هضم بیشتری را بر روی فسفر در خوراک نشان می‌دهد (Ullah and Gibson 1987).

مخمرها برای بیان پروتئین‌های خارج سلولی بسیار مناسب هستند. در طول ۲۰ سال گذشته سیستم‌های بیانی مخمرها که مشهورترین آنها پیکیا پاستوریس است، برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند (Damasceno et al. 2012). اهمیت ویژه این مخمر، توانایی ترشح پروتئین خارجی در محیط کشت است. محصول ترشح شده می‌تواند بیش از ۸۰ درصد پروتئین‌های محیط کشت را شامل شود (Li et al. 2007). با توجه به قابلیت این سیستم بیانی، تاکنون بیش از ۱۰۰۰ پروتئین در سیستم بیانی فوق کلون و بیان شده‌اند (Prinz et al. 2004; Yokoyama et al. 2003). پیکیا پاستوریس یک سیستم بیانی مفید با بازدهی مؤثر و یک ابزار تجربی-کاربردی در مهندسی پروتئین به شمار می‌رود (Cregg et al. 2000; Zhang et al. 2000).

2009). در سال ۱۹۸۰، پیکیا- پاستوریس برای بیان پروتئینهای خارجی توسعه یافت (Cregg et al. 1985) و در سال ۲۰۰۹ اولین پروتئین نوترکیب دارویی (آنزیم بازدارنده کالیکرین) در آن تولید شد (Mattanovich et al. 2012).

استفاده از سیگنال ترشحی مخمر (آلفا فاکتور مشتق از ساکارومایسس سرویزیه) یا خود ژن قادر است پروتئین نوترکیب را در مسیر ترشحی مخمر هدایت کند، که در آن تشکیل باندهای دی سولفیدی و گلیکوزیلاسیون می‌تواند قبل از ترشح پروتئین نوترکیب به داخل محیط کشت صورت پذیرد (Fidler et al. 2003). در مورد پروتئین‌هایی که به طور نرمال ترشحی و گلیکوزیله هستند اگر از سیگنال پپتید طبیعی ژن هم استفاده شود بسیار مؤثرتر است (Invitrogene).

استفاده از لینکر 2a برای بیان هم‌زمان دو پروتئین در سیستم بیانی مخمر استفاده شده است (Wang et al. 2007). در این مطالعه کولین مونواکسیژناز و بتابین آلدئید را با یک پروموتور به‌وسیله لینکر 2a هم‌زمان بیان شد و نشان داده شد که لینکر 2a بیان مؤثر آنزیم‌های جداگانه را در یک میزبان تسهیل می‌کند. بنابراین، پپتید 2a ممکن است یک سیستم ایده‌آل برای بیان هم‌زمان پروتئین‌های متعدد از یک ORF منفرد در مخمر متیلوتروفیک باشد. به‌علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi et al. 2020a). ماده ژنتیکی^۱ یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به طور هم‌زمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Mohammadabadi et al. 2020b). محیطی که موجود در آن رشد می‌کند مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود (Jafari Ahmadabadi et al. 2023). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Arabpoor Raghbadi et al. 2021). ژن‌های یوکاریوتی بیان‌شان تحت کنترل موقت و چندبعدی است. در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi and Hasanzadeh Davarani 2021). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Shokri et al. 2023). یکی از اقدامات اساسی در پهنزادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Asadollahpour Nanaei 2021). لذا، هدف از انجام این مطالعه تولید آنزیم‌های ۳-فیتاز و ۶-فیتاز توسط یک مخمر نوترکیب به منظور افزایش کارایی تجزیه فیتات گیاهی توسط فیتاز بود.

¹ DNA

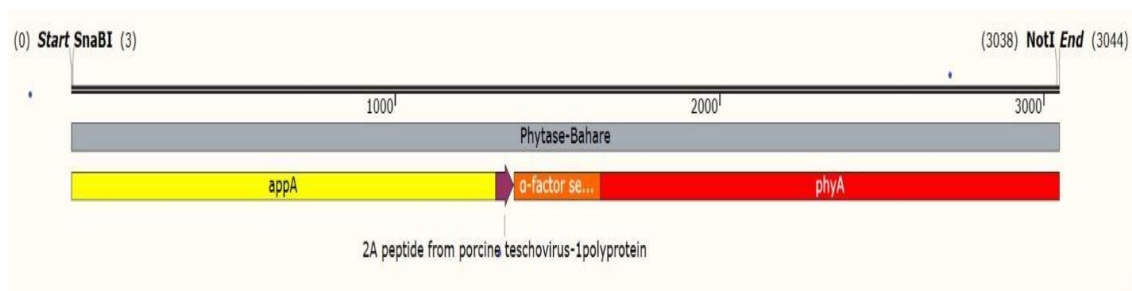
مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و مخمرهای مورد استفاده: از ایکلای سویه DH5a و مخمر *Pichia pastoris* سویه GS115 تهیه شده از پژوهشکده بوعلی مشهد استفاده گردید. از حامل دومانظوره pPIC9k برای انجام همسانه‌سازی اولیه در باکتری و نیز بیان در مخمر استفاده گردید.

محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها: از محیط‌های LB و LB-agar حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین جهت کشت و انتخاب در باکتری و محیط‌های YPD و YPD-Agar برای کشت و انتخاب مخمر نوترکیب استفاده گردید. از آنتی‌بیوتیک geneticin برای غربال‌گری در مخمر استفاده شد.

طراحی پرایمرها: پرایمرهای رفت و برگشت با استفاده از نرم‌افزار Snapgene (www.snapgene.com) طراحی و توسط شرکت پیشگام ساخته شد.

طراحی سازه ژنی: مرحله اول این آزمایش جستجوی پلاسمید مناسب برای آزمایش بود. تعداد زیادی از وکتورهای تجاری برای بیان پروتئین‌های خارجی در پیکیا پاستوریس وجود دارد که بعد از بررسی‌های انجام شده در مطالعات گذشته، حامل pPIC9k تحت پروموتور AOX1 که دارای سیگنال سکانس آلفا فاکتور بود به‌عنوان حامل بیان مورد استفاده در مخمر پیکیا پاستوریس برای این پژوهش انتخاب شد (Zou et al. 2008; Liu et al. 2015). مزیت این حامل این است که می‌توان از محیط فاقد پپتید و پروتئین برای بیان استفاده کرد و از طرفی پروتئین تولیدی به‌صورت ترش‌حی خواهد بود. از آنجایی که پیکیا پاستوریس GS115 فاقد پروتئین‌های ترش‌حی قابل توجهی می‌باشد بنابراین بخش اصلی پروتئین‌های ترش‌حی شده در محیط کشت بعد از بیان مربوط به پروتئین‌های موردنظر است. قطعه کد کننده ژن فیتاز ۱۲۹۹ bp است که ناحیه کد کننده پروتئین فعال ۱۲۵۳ bp می‌باشد که این ناحیه توسط (Rodriguez et al, 1999) تحت appA2 نامگذاری گردید (شماره دسترسی بانک ژنی AY496073/1). فیتاز ایکولای یک آنزیم از خانواده ۶-فیتاز و زیرخانواده هیستیدین اسید فسفاتازها می‌باشد که برای فعالیت خود نیاز به کوفاکتور ندارد (Konietzny & Greiner 2004). فیتاز *آسپرژیلوس نایجر phyA* از خانواده ۳-فیتاز می‌باشد که اندازه آن 1506 bp می‌باشد (شماره دسترسی بانک ژنی AY745739.1).



شکل ۱. سازه ژنی طراحی شده حاوی ژن‌های فیتاز در ناحیه *SnaBI* و *NotI*

Figure 1. Designed Structure including phytases gene in *SnaBI* and *NotI*

برای بیان هریک از فیتازها به صورت جداگانه در میزبان مخمری از لینکر 2a استفاده شد. 2a پپتید، لینکری مفید برای بیان متعادل پروتئین‌های متعدد از یک پروموتور است. 2a-پپتید ۱۸ تا ۳۰ اسیدآمینو هست که باعث جداسازی هم‌زمان دو پروتئین به دو بخش مستقل می‌شوند (Roongsawang et al. 2010). به منظور ترشح خارج سلولی قطعه دوم قبل از توالی فیتاز دوم از سیگنال ترشچی آلفا فاکتور استفاده شد. قطعه طراحی شده مورد نظر بین دو جایگاه آنزیمی *Not I* و *SnaB I* در پلاسمید pPIC9k قرار گرفت. بهینه کردن کدون با نرم افزار آنلاین Genescript براساس میزبان بیانی انجام شد.

به منظور طراحی ژن‌ها در داخل وکتور از نرم‌افزار Snapgene استفاده شد. توالی طراحی شده برای ساخت به شرکت Genescript آمریکا فرستاده شد. پس از ارسال کانستراکت سنتز شده توسط شرکت Genescript، به منظور تکثیر و زیاد کردن سازه ژنی مورد نظر باید در باکتری *E. coli* DH5α ترانسفرم انجام می‌شد.

آماده‌سازی کانستراکت: قبل از افزودن آب دیونیزه به تیوب حاوی کانستراکت، ابتدا میکروتیوب سانتی‌فیوژ شد تا تمام محتویات ته لوله جمع شود و سپس مقدار ۸۰ μL آب مقطر دیونیزه افزوده شد و دوباره سانتی‌فیوژ گردید. میزان آب اضافه شده به میکروتیوب به اندازه‌ای بود تا غلظت نهایی به ۵۰ ng/ml برسد

انتقال پلاسمید به باکتری *E. coli* DH5α: پس از تهیه سلول‌های مستعد باکتری، پلاسمید رقیق شده با استفاده از روش شوک حرارتی به درون سلول‌های باکتری انتقال یافت. در طی این روش، سلول‌های مستعد باکتری را برای ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده؛ سپس آن‌ها را برای ۲ دقیقه در دمای ۴۲ درجه و دوباره آن‌ها را به روی یخ به مدت ۱-۲ دقیقه انتقال داده. باکتری‌ها در محیط LB در شیکر انکوباتور رشد داده شد و سپس بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک به مدت یک شبانه‌روز کشت داده شد. بدین ترتیب مقدار زیادی از پلاسمید به دست آمد.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از پرایمر رفت AOX1 و پرایمر برگشت 2AR اختصاصی طراحی شده بر روی قطعه و مسترمیکس 2x آمپلیکون (شرکت آمپلیکون دانمارک) استفاده شد بعد از واسرشت شدن (Denaturation) در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه، قطعه وارد شده در ۳۵ چرخه با دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال (Annealing) ۵۹ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای تکثیر (Extension) ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه تکثیر شد. کلونی‌های تأیید شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد پس از کلونی PCR برای استخراج پلاسمید آماده شدند. استخراج پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید شرکت پیشگامان انتقال ژن (GTP) صورت گرفت. پس از تأیید پلاسمید نوترکیب استخراج شده به منظور انتقال به مخمر *Pichia pastoris* در محل برش آنزیم *Sac I* خطی شد.

انتقال به مخمر: حدود ۵ میکروگرم ناقل خطی شده به وسیله روش الکتروپوریشن (Electroporation) به سلول‌های مستعد *Pichia pastoris* ترانسفورم شد. الکتروپوریشن با استفاده از میکروپالسر BIO-RAD GENE PULSER XCELL TOTAL با کووت ۰/۲ سانتیمتر و در ولتاژ ۲۰۰۰ ولت به مدت ۵ میلی‌ثانیه صورت گرفت. سلول‌های

ترانسفورم شده روی محیط MD پخش شده و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. تک کلونی‌های رشد کرده به پلیت YPD آگار حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی بیوتیک جنتیسین انتقال یافتند. بعد از ۵ روز کلونی‌های مثبت مشاهده شدند. به منظور تأیید ورود قطعه ژنی به درون ژنوم مخمر، DNA مخمري با استفاده از کیت استخراج DNA استخراج و PCR با روش قبلی و آغازگرهای ذکر شده انجام شد.

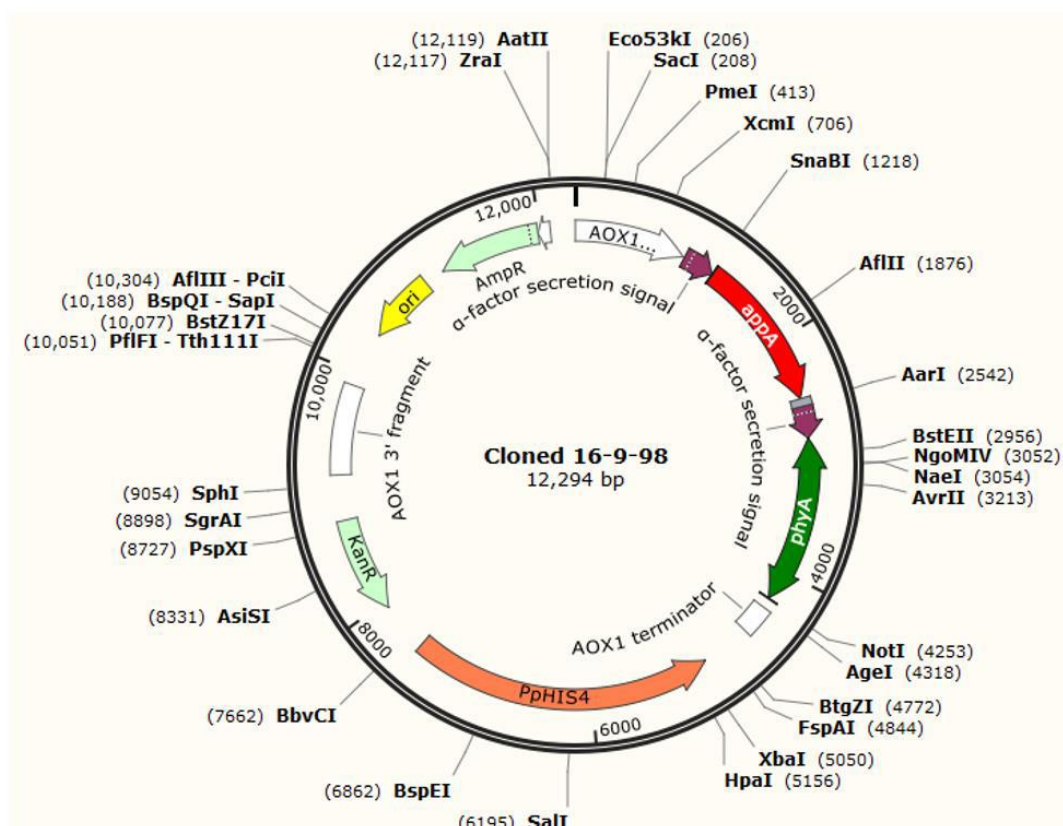
به منظور تولید بیومس مقدار کمی از هر کلنی برداشته و به ۴ میلی لیتر محیط BMGY درون ارلن‌های ۵۰ میلی لیتری بافل دار تلقیح گردید و برای ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد سپس به منظور جدا کردن سلول‌های مخمري از محیط کشت به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور انجام و پس از حذف محیط کشت مجدداً رسوب ۲ بار با بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار و سانتریفیوژ مانند قبل شستشو داده شد. در ادامه سلول‌های مخمري در ۱۰ میلی لیتر محیط BMMY حل شد سپس در انکوباتور شیکر دار ۳۰ درجه قرار گرفت. هر ۲۴ ساعت متانول ۱۰۰ صددرصد به محیط اضافه گردید به طوری که غلظت نهایی متانول در محیط کشت به نیم درصد برسد. تا ۷۲ ساعت هر ۲۴ ساعت نمونه برداشته شد تا بر روی ژل SDS برده شود.

تعیین باند فعال آنزیمی با استفاده از روش زیموگرام: از آنجا که در این مطالعه آنتی‌بادی ضد فیتاز موجود نبود و بنابراین امکان استفاده از وسترن بلائینگ نیست لذا آزمایش زیموگرافی تکنیک جایگزینی برای تشخیص باند فعال آنزیمی می‌تواند باشد. این آزمایش طبق روش (Yanke et al. 1998) برای تعیین باندی که دارای فعالیت فیتازی است روی آگارز انجام گرفت. روی ژل چاهک‌هایی ایجاد شده و نمونه‌ها درون چاهک‌ها ریخته شد. سپس ژل در محلول تراپتون x-100 به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق غوطه‌ور شد. مراحل انکوباسیون ژل در سدیم استات ۰/۱ مولار (pH=5) در دمای ۴ درجه به مدت ۱ ساعت دنبال شد. سپس ژل در بافر استات ۰/۱ مولار حاوی ۰/۴٪ سدیم فیتات به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. بعد از پایان مدت انکوباسیون ژل با آب مقطر شستشو و سپس در کلرید کبالت ۲٪ به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور گردید و سپس محلول کلرید کبالت با محلول آمونیوم مولیبدات ۶/۲۵٪ و آمونیوم وانادات ۰/۴۲٪ جایگزین گردید. باندهای تیره در زمینه روشن نقاط دارای فعالیت فیتازی را نشان داد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیم فیتاز با استفاده از روش آمونیوم مولیبدات (Tran et al. 2011) انجام شد و با دستگاه اسپکتوفتومتر جذب آن در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج با یک منحنی استاندارد تهیه شده با فسفات معدنی (KH₂PO₄) مقایسه شد. هر واحد فعالیت آنزیمی فیتاز (U) عبارت است از مقدار آنزیمی که میتواند ۱ μmol فسفر معدنی را در هر دقیقه از سدیم فیتات، جدا کند.

نتایج و بحث

انتخاب توالی فیتاز و سنتز ژن: توالی ژن فیتاز ایکولای با شماره دسترسی AY496073.1 و توالی ژن فیتاز اسپریلوس نایجر با شماره دسترسی AY745739.1 در GenBank بررسی شد و توالی نوکلئوتیدی آن‌ها بر اساس ترجیح کدونی میزبان بیانی پیکیا پاستوریس توسط Genescript طراحی شد. به منظور بیان راحت تر باید قطعات آلفا فاکتور و لینکر 2a به توالی اضافه گردد. با استفاده از نرم افزار Snapgene (version 3.2) طراحی کانستراکت کلون شده در داخل حامل pPIC9k انجام شد. با استفاده از این نرم افزار می‌توان جایگاه برش آنزیمی و هم چنین قالب صحیح خواندن کدون‌ها را تعیین نمود (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر شماتیک از سازه ژنی کلون شده توسط نرم افزار Snapgene. قطعه طراحی شده بلافاصله

بعد از پروموتور AOX1 قرار می‌گیرد. قطعه طراحی شده بین دو آنزیم SnaBI و NotI قرار می‌گیرد

Figure 2. cloned Structure by Snapgene software. The designed fragment is located after the AOX1 promoter. The designed fragment is placed between two enzymes SnaBI and NotI

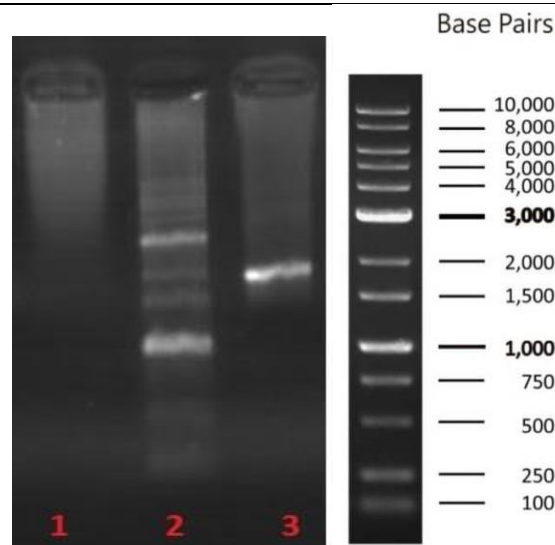
تأیید وجود ژن سنتز شده از طریق روش PCR: از کلنی‌های رشد یافته با پرایمر رفت AOX1 و پرایمر برگشت 2AR اختصاصی طراحی شده بر روی قطعه PCR انجام شد (جدول ۱) و با استفاده از الکتروفورز محصول بدست آمده مورد بررسی

قرار گرفت. با در نظر گرفتن اندازه قطعه که باید ۱۷۷۵ جفت باز می بود می توان وجود ژن را تایید کرد (شکل ۳). سپس استخراج پلاسمید انجام شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی

Table 1. The sequences of forward and reverse specific primers

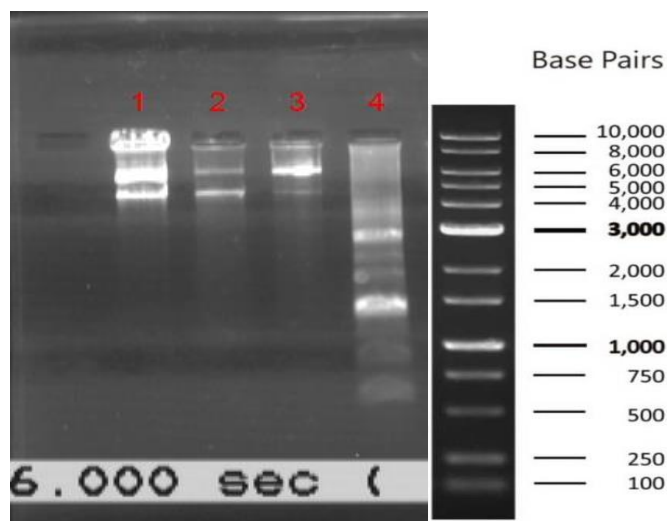
| نام آغازگر | توالی آغازگر | طول قطعه |
|------------|--------------------------------|----------|
| AOX1 | (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') | 1775 |
| 2AR | (5'-GGACCTGGATTCTCTCAACATC-3') | |



شکل ۳. تایید وجود وکتور و ژن از طریق الکتروفورز. لاین ۱ کنترل منفی، لاین ۲ لدر 1KB دنا زیست، لاین ۳ کلونی تایید شده

Figure 3. Confirming the presence of vector and gene by electrophoresis. Line 1 is a negative control, line 2 is a 1KB DNA ladder, line 3 is a confirmed colony

ارزیابی پلاسمید تخلیص شده: پس از تایید کلونی PCR، کلونی های مثبت در محیط LB حاوی آمپی سیلین کشت داده شده و پلاسمید نوترکیب استخراج شد. میزان ۲ μL از پلاسمید تخلیص شده بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید تا از صحت مراحل کار و وجود پلاسمید اطمینان حاصل شود. پس از انجام الکتروفورز نمونه ها بررسی شدند و باند مربوطه مشاهده گردید. در فرایند الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده، برای هر نمونه چندین باند مشاهده می شود که این تفاوت به دلیل اینست که برخی پلاسمید ها در طی مراحل استخراج ممکن است به صورت سوپرکویل، تک رشته یا کلاف DNA در آمده باشند به همین دلیل در ستون مربوط به یک نمونه چندین باند مشاهده می شود (شکل ۴).

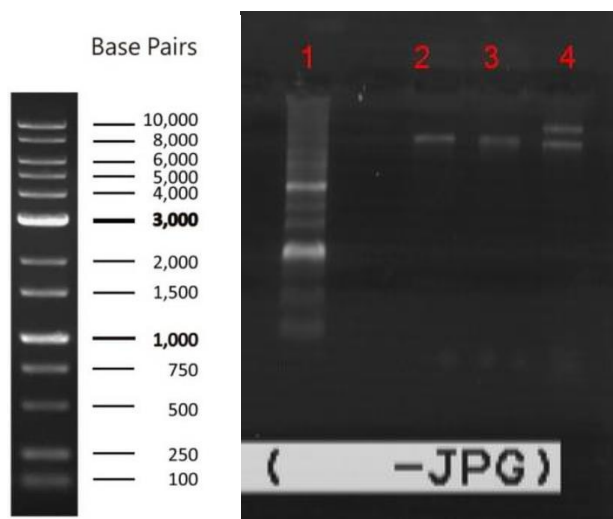


شکل ۴. استخراج پلاسمید. لاین ۱ و ۲، ۳ پلاسمیدهای استخراج شده از هر کلونی. لاین ۴. لدر 1kb
دنازیست

Figure 4. Plasmid extraction. Lane 1, 2 and 3 plasmids extracted from each clone. Line 4. The 1kb ladder

هضم آنزیمی جهت خطی کردن پلاسمید توسط آنزیم *SacI*: به منظور انتقال و کتور نو ترکیب pPIC9K لازم

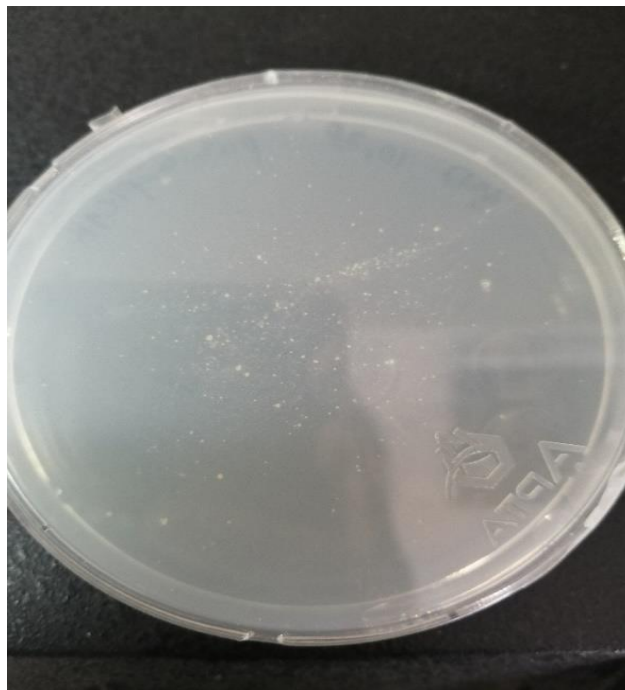
بود تا و کتور بصورت خطی در آید. این عمل با آنزیم *SacI* که تنها دارای یک محل برش در پروموتور 5'AOX1 و کتور بود انجام شد و و کتور بصورت خطی درآمد (شکل ۵).



شکل ۵. هضم آنزیمی با آنزیم *SacI*. لاین ۱ لدر 1kb دنازیست، لاین ۲ و ۳ هضم آنزیمی با *SacI* و لاین ۴ پلاسمید غیر خطی

Figure 5. Digestion of recombinant plasmid with *SacI* (1) ladder 1kb (2 and 3) linear plasmid with *SacI* (4) Not linear plasmid

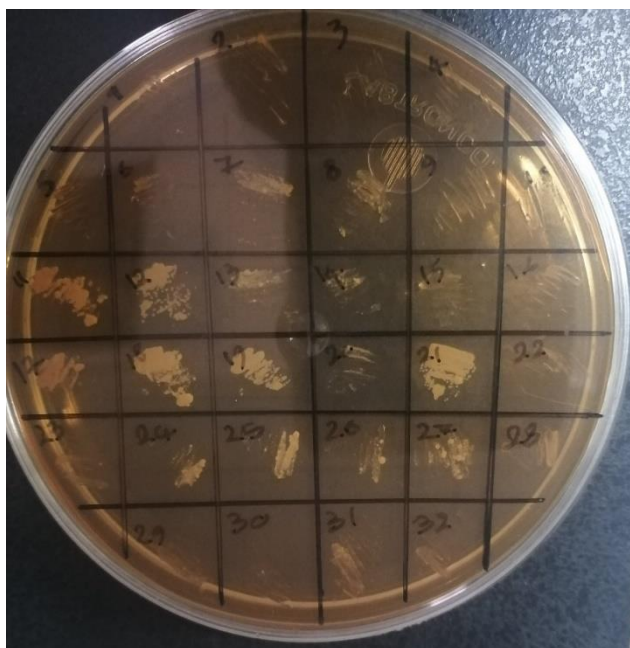
انتقال پلاسمید PIC9K نو ترکیب خطی شده به سلول های مستعد پیکیا پاستوریس: محیط MD حاوی
 مواد حداقلی برای رشد مخمر بوده ولی هیچگونه آمینواسیدی در آن وجود ندارد. پیکیا پاستوریس معمولی برای رشد نیاز به حضور هیستیدین در محیط کشت داشته و خودش قادر به ساخت این آمینواسید نیست لذا در محیط بدون آمینواسید رشد نخواهد کرد اما سلول های مخمیری که در طی الکتروپوریشن موفق به جذب و کتورهای نو ترکیب pPIC9k به داخل ژنوم خود شده باشند قادر خواهند بود که هیستیدین مورد نیاز شان را خودشان از مواد حداقلی موجود بسازند. بعد از ۵ روز کلونی ها در محیط MD رشد کردند (شکل ۶). سپس کلونی های رشد کرده بر روی محیط YPD آگار حاوی جنتیسین ۰,۰۲۵، بصورت شطرنجی کشت داده شد (شکل ۷).



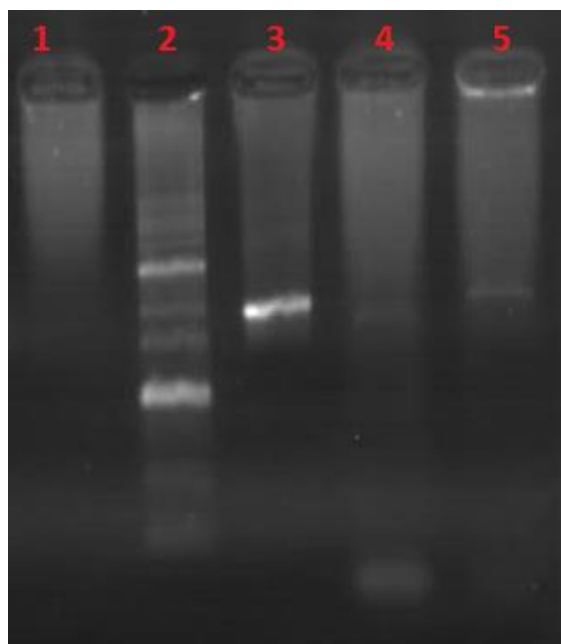
شکل ۶. کشت سفره ای سلولهای الکتروپوریت شده بر روی MD plate

Figure 6. Plate culture of electrotransformed cells on MD plate

تایید وجود پلاسمید در کلنی های بدست آمده از الکتروترانسفرم: PCR مستقیم از کلنی های کشت مجدد
 باکتری های منتقل شده با پرایمر رفت AOX1 و پرایمر برگشت 2AR اختصاصی طراحی شده بر روی قطعه جهت تایید وجود پلاسمید در آنها انجام گرفت. با توجه به اینکه پرایمر مورد استفاده اختصاصی پلاسمید pPIC9k طراحی شده بود در صورت قرارگرفتن قطعه ژن ها یک قطعه ۱۷۷۵ و در صورت عدم وجود پلاسمید هیچ بانندی مشاهده نمیشود (شکل ۸).
 PCR مستقیم از کلنی منتقل شده یک روش مطمئن برای تایید وجود پلاسمید و آزمایش صحت انتقال است. مقالاتی در این ارتباط وجود دارد که از این روش به عنوان یکی از راههای تایید انتقال پلاسمید استفاده کرده اند و به این طریق باکتری های مطمئنی را برای ادامه آزمایش انتخاب کرده اند (Liu et al. 2007; Liu et al. 2005).



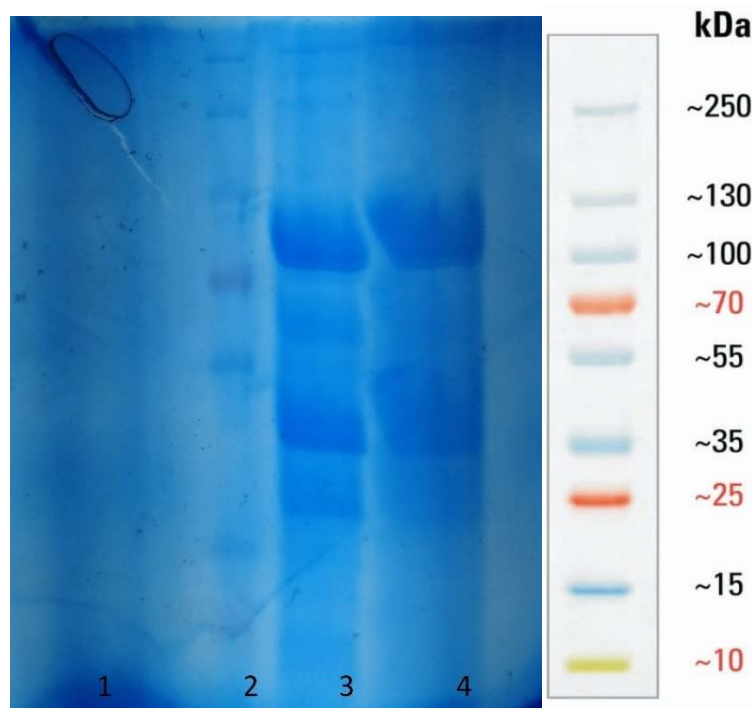
شکل ۷. کشت شطرنجی کلونی های MD plate بر روی محیط YPD آگار حاوی ۰.۰۲۵، + جنتیسین
Figure 7. Checkered culture of MD plate colonies on YPD medium containing 0.025 geneticin



شکل ۸. نتایج PCR بر روی کلونی های منتخب با پرایمرهای اختصاصی لاین ۱ کنترل منفی لاین ۲ لدر 1kb دنازیست، لاین ۳ کنترل مثبت و لاین ۴ و ۵ کلونی PCR

Figure 8. PCR on the selected colonies with specific primers line 1, negative control, line 2, 1kb Denazist leader, line 3, positive control and line 4 and 5 PCR colonies

تعیین باند فعال آنزیم توسط SDS-PAGE: الکتروفورز نمونه روی ژل آکریلامید یک باند را در ناحیه ۴۵ kDa مربوط به فیتاز ایکولای و یک باند در ناحیه 80 kDa مربوط به فیتاز اسپرژیلوس نایجر را نشان داد که با آنچه که در مدل سازی نرم افزاری بود مطابقت میکرد (شکل ۹). این نتایج با مطالعه (Heravi et al. 2017) که ژن فیتاز ایکولای به اندازه ۴۶ kDa را با موفقیت در داخل لاکتوکوکوس لاکتیس بیان کردند و فعالیت آنزیمی آن را 4.9 U/mL گزارش کردند مطابقت داشت. همچنین (Pakbaten et al. 2019) ژن فیتاز ایکولای را در داخل باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس بیان کرده و باند ۴۶kDa را مشاهده کردند. در مطالعه ای دیگر فیتاز اسپرژیلوس با موفقیت داخل مخمر پیکیا پاستوریس بیان شد و باند 84 kDa را مشاهده کردند (Weaver et al. 2007).



شکل ۹. الکتروفورز نمونه فیتاز روی ژل آکریلامید ۱۰ درصد. ستون ۱: کنترل منفی (مخمر خالی) ستون ۲: مارکر مولکولی (kDa)، ستون ۳ و ۴: آنزیم نوترکیب تولید شده

Figure 9. SDS-polyacrylamide gel 10 percent electrophoresis analysis of the recombinant phytase. Lane 1: native yeast, lane 2: protein marker, lane 3 and 4: Recombinant enzyme

تعیین باند فعال آنزیمی با استفاده از زیموگرام: در این آزمایش ژل آگارز با سوبسترای آنزیم اشباع شده و سپس رنگ آمیزی معکوس انجام می گیرد به این معنا که مکانهایی از ژل که دارای فعالیت آنزیمی است شفاف (بیرنگ) و قسمت های دیگر به واسطه تشکیل کمپلکس فیتات با فلزاتی مثل کروم و مولیبدات کدر می گردد.



شکل ۱۰. رنگ آمیزی زیموگرام. ۱ کنترل منفی ۲. آنزیم تجاری هوستازایم ۳. آنزیم نو ترکیب

Figure 10. Zymogram assay. 1: negative control 2: Hostazyme enzyme 3: recombinant enzyme

تعیین فعالیت آنزیمی: فیتاز نو ترکیب فعالیت آنزیمی $160/97$ U/mL را نشان داد، در حالی که پیکیا پاستوریس غیر

نو ترکیب هیچ گونه فعالیت فیتاز را در این مطالعه نشان نداد.

نتیجه گیری: فیتاز آنزیمی کاربردی در صنعت جیره دام و طیور می باشد که با توجه به اثرات مثبت در بهینه سازی مصرف

جیره دام و طیور باعث شده که در سالهای اخیر به طور انبوه بصورت نو ترکیب توسط شرکت های متعدد مانند BSAF و... تولید گردد. در چند سال اخیر بهره گیری از افزودنی های مختلف در خوراک دام و طیور در سطح جهان و ایران رونق خاصی یافته است. از آن جا که طیور فاقد آنزیم فیتاز در بدن خود می باشند و فسفر فیتاته، در بدن طیور بدون تجزیه دفع میشود استفاده از این محصول در صنعت کشاورزی و علوم دامی می تواند باعث تجزیه و در دسترس قرار گرفتن فسفر و سایر مواد مغذی از جمله کلسیم و در نتیجه کاهش آلودگی محیط زیست شود. در میزبان های مخمری متیلوتروف پروتئین های متعددی با موفقیت کلون سازی و بیان شده اند. میزبان های مخمری به راحتی دست ورزی ژنتیکی شده و قادر به رشد و تولید پروتئین های نو ترکیب در محیط های ارزان هستند. همچنین مطالعات بسیاری در زمینه تولید انبوه آنزیم های صنعتی در آنها صورت گرفته است. در این تحقیق یک آنزیم ۳-فیتاز و یک آنزیم ۶-فیتاز را انتخاب نمودیم تا در میزبان مخمری پیکیا پاستوریس بیان کنیم تا علاوه بر تولید آنزیم نو ترکیب، کاندیدای مناسب

جهت تولید انبوه فیتاز را با توجه به معیارهای تولید صنعتی فیتاز شناسایی نماییم. به منظور تولید مکمل آنزیم فیتاز نوترکیب، ژن‌های هدف در وکتور بیانی pPIC9k طراحی و سنتز شد و وکتور نوترکیب پس از تکثیر در باکتری اشرشیا کلی DH5 α وارد ژنوم مخمر پیکیا پاستوریس به عنوان میزبان بیانی شد. فیتاز appA و فیتاز phyA با موفقیت در مخمر پیکیا پاستوریس بیان شد. فعالیت آنزیم نوترکیب تولید شده ۱۶۰,۹۷ U/mL بود.

سپاسگزاری: این تحقیق با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد، گرنت شماره ۳/۴۷۷۵۴ انجام شد. از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) نیز بدلیل حمایت های مالی و جناب آقای دکتر محمدرضا نصیری جهت همکاری در این مطالعه نهایت تشکر را بعمل می آوریم.

منابع

- عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.
- محمدآبادی محمدرضا، اسدالله پور نعنایی حجت (۱۴۰۰) بیان ژن لپتین در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۳(۱)، ۱۹۷-۲۱۴.
- محمدآبادی محمدرضا، حسن زاده داورانی فاطمه (۱۴۰۰) اهمیت تغذیه در بیان ژن، همانندسازی، ترمیم و پیشگیری از آسیب DNA. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۳(۳)، ۲۰۵-۲۲۲.
- محمدآبادی محمدرضا، خیرالدین حمید، لطیفی آیگین، بانکو اولنا ایوانیونا (۱۴۰۱) پروفایل بیانی ژن DNAH1 در بافت بیضه بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۴(۳)، ۲۴۳-۲۵۶.
- محمدآبادی محمدرضا، شبان جرجندی دیانا، عرب پور رق آبادی زهرا و همکاران (۱۴۰۱) نقش رازیانہ بر بیان ژن DLK1 در بافت قلب گوسفند. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۴(۲)، ۱۵۵-۱۳۳.

References

- Arabpoor Raghbadi Z, Mohammadabadi MR, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. Agric Biotechnol J 13 (4), 183-200.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR (2000) Recombinant protein expression in Pichia pastoris. J Mol Biotechnol 16, 23-52.
- Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR (1985) Pichia pastoris as a host system for transformations. J Mol Cell Biol 5, 3376-3385.

- Ehrlich KC, Montalbano BG, Mullaney EJ et al. (1993). Identification and cloning of a second phytase gene (phy B) from *Aspergillus niger* (ficcum). *Biochem Biophys Res Commun* 195, 53–57.
- Fidler AE, Lin JS, Lun S et al. (2003) Production of biologically active tethered ovine FSH β by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Mol Endocrinol* 30, 213–25.
- Greiner R, Konietzny U (2006) Phytase for Food Application. *Food Technol and Biotechnol* 4, 125–140
- Heravi RM, Sankian M, Kermanshahi H et al. (2017) The Construction of a Probiotic Lactic Acid Bacterium Expressing Acid-Resistant Phytase Enzyme. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 9(8), 963-968.
- Invitrogen (2005) *Pichia* Expression Kit, Protein Expression, A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1710-01. <http://www.invitrogen.com>
- Konietzny U, Greiner R (2004) Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Braz. J. Microbiol* 35, 12-18.
- Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, Becker K (2010) Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem* 120(4), 945–959.
- Lei GX, Porres JM, Mullaney EJ, Brinch-Pedersen H (2007) Phytase: Source, structure and application. *Industrial enzymes*. 505-529.
- Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *J Appl Microbiol Biotechnol* 93, 31-39.
- Li P, Anumanthan A, Gao XG et al. (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *J Appl Biochem Biotechnol* 142, 105-124.
- Liu JR, Yu B, Lin SH et al. (2005) Direct cloning of a xylanase gene from the mixed genomic DNA of rumen fungi and its expression in intestinal *Lactobacillus reuteri*. *FEMS microbiol lett* 251(2), 233-241.
- Liu JR, Yu B, Zhao X, Cheng KJ (2007) Coexpression of rumen microbial β -glucanase and xylanase genes in *Lactobacillus reuteri*. *Appl microbiol biotechnol* 77, 117-124.
- Liu R, Zhao B, Zhang Y et al. (2015) High-level expression, purification, and enzymatic characterization of truncated human plasminogen (Lys531-Asn791) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BMC biotechnology* 15(1), 1-8.
- Mattanovich D, Branduardi P, Dato L et al. (2012) Recombinant protein production in yeasts. *J Methods Mol Biol* 824, 329-358.

- Mohammadabadi MR, Kheyrodin H, Latifi A, Babenko OI (2022a) mRNA expression profile of DNAH1 gene in testis tissue of Raini Cashmere goat. *Agric Biotechnol J* 14 (3), 243-256.
- Mohammadabadi MR, Asadollahpour Nanaei H (2021) Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 13 (1), 197-214.
- Mohammadabadi MR, Shaban Jorjandy D, Arabpoor Raghavadi Z, et al. (2022b) The role of fennel on DLK1 gene expression in sheep heart tissue. *Agric Biotechnol J* 14 (2), 155-170.
- Mohammadabadi MR, Hasanzadeh Davarani F (2021) The importance of nutrition in gene expression, replication, repair and prevention of DNA damage. *Agric Biotechnol J* 13 (3), 205-222.
- Pakbaten B, Majidzadeh Heravi R, Kermanshahi et al. (2019) Production of phytase enzyme by a bioengineered probiotic for degrading of phytate phosphorus in the digestive tract of poultry. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11, 580-587.
- Prinz B, Schultchen J, Rydzewski R et al. (2004) Establishing a versatile fermentation and purification procedure for human proteins expressed in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* for structural genomics. *J Struct Funct Genomics* 5, 29-44.
- Roongsawang N, Promdonkoy P, Wongwanichpokhin M et al. (2010) Coexpression of fungal phytase and xylanase utilizing the cis-acting hydrolase element in *Pichia pastoris*. *J FEMS Yeast Res* 10 (2010), 909–916.
- Rodriguez E, Han Y, Lei XG (1999) Cloning, Sequencing, and Expression of an *Escherichia coli* Acid Phosphatase/Phytase Gene (appA2) Isolated from Pig Colon. *Biochem. Biophys Res Commun* 257,117-123.
- Selle PH, Ravindran V (2007) Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim Feed Sci and Technol* 135(1), 1-41.
- Tran TT, Hatti-Kaul R, Dalsgaard S, Yu S (2011) A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid–protein complex as substrate. *Anal biochem* 410, 177-184.
- Ullah AHJ, Gibson DM (1987) Extracellular phytase (E.C.3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep Biochem* 17, 63–91.
- Wang S, Yao Q, Tao J et al. (2007) Co-ordinate expression of glycine betaine synthesis genes linked by the FMDV 2A region in a single open reading frame in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biot* 77, 891–899.
- Weaver JD, Ullah AH, Sethumadhavan K et al. (2009) Impact of assay conditions on activity estimate and kinetics comparison of *Aspergillus niger* PhyA and *Escherichia coli* AppA2 phytases. *J Agric Food Chem* 57(12), 5315-5320.
- Yanke LJ, Bae HD, Selinger LB, Cheng KJ (1998). Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiol* 144(6) 1565-1573.

- Yokoyama S (2003) Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *J Currn Opin Chem Biol* 7, 39-43.
- Zhang AL, Luo JX, Zhang TY et al. (2009) Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *J Mol Biol Rep* 36, 1611-1619.
- Zou LK, Wang HN, Pan X et al. (2008). Expression, purification and characterization of a phyA m-phyCs fusion phytase. *J Zhejiang Univ Sci B* 9, 536-545.