کلونینگ، بیان و بهینه‌سازی محیط جهت بیان آنزیم فیتاز *آسپرجیلوس نایجر* در میزبان هانسنولا پلی‌مورفا

محمدتقی برجیان بروجنی [۱*](M.Sc)، سیدامیدرعنایی سیادت [۱](Ph.D)، جواد هراتی [۱](M.Sc)، فرناز نیکزاد جمنانی [۱و۲](M.Sc)، شیرین یوسفیان [۱](M.Sc)، سهراب مرادی [۱](M.Sc)

۱- *دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده‌ی مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی*

۲- *دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیوتکنولوژی*

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم فیتاز توانایی تبدیل فیتیک‌اسید به میواینوزیتول و فسفات معدنی را دارا می‌باشد؛ از این‌رو به صورت گسترده‌ای به عنوان یک افزودنی در غذای حیوانات تک معده‌ای اضافه می‌گردد. هدف این تحقیق، کلونینگ، بیان و بهینه‌سازی محیط برای بیان آنزیم فیتاز *آسپرجیلوس نایجر* در میزبان هانسنولا پلی‌مورفا بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، جهت دست‌یابی به مقادیر بالای تولید پروتئین، توالی ژن آنزیم فیتاز گونه‌ی *Aspegillus niger NRRL3135* پس از بهینه‌سازی کدون برای میزبان بیانی *Hansenula polymorpha*، به آن انتقال یافته و فعالیت ویژه‌ی آنزیم در محیط‌های بیانی مختلف بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده در کشت فلاسک، تولید ۱۱۸۵ U/L آنزیم فیتاز نوترکیب با فعالیت ویژه‌ی ۳۴/۸۴ U/mg را در محیط بیانی YNB-methanol نشان داد.

نتیجه‌گیری: محیط بیانی YP-methanol را به عنوان یک محیط کارامد جهت تولید آنزیم فیتاز A. NigerNRRL 313 در میزبان بیانی H. polymorpha، در مقیاس صنعتی نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: فیتاز، بهینه‌سازی محیط کشت، هانسنولا پلی‌مورفا

مقدمه

فیتات (میواینوزیتول هگزافسفات) که فرم اصلی ذخیره‌ی فسفات در گیاهان می‌باشد [۱]، به علت اتصال به مواد مغذی، آمینواسیدها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها، سبب عدم جذب آن‌ها شده و هم‌چنین با اتصال به پروتئین‌ها، سبب جلوگیری از عمل‌کرد صحیح آن‌ها می‌گردد [۴،۲،۳]. حیوانات تک‌معده‌ای مانند ماکیان و خوک به علت فقدان آنزیم فیتاز، توانایی تجزیه‌ی این ماده را نداشته و بدین ترتیب مقدار زیادی از فسفات به همراه سایر مواد معدنی از بدن آن‌ها دفع می‌گردد [۵]. فیتات‌های تجزیه‌نشده، نه تنها سبب کاهش کیفیت مواد غذایی شده بلکه سبب آلودگی‌های زیست‌محیطی نیز می‌شوند [۶،۵].

فیتاز (میواینوزیتول هگزوفسفات فسفوهیدرولاز)؛ آنزیمی است که توانایی تجزیه‌ی فیتیک‌اسید به میواینوزیتول‌هایی با مقدار فسفات کم‌تر و فسفات معدنی را دارا می‌باشد؛ بنابراین از این آنزیم به صورت گسترده‌ای به عنوان یک افزونی در غذاهای حیوانات استفاده می‌شود [۷].

توالی ژن فیتاز جداشده از گونه‌ی A. niger با طول

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۴۳۱۷۸۲- ۰۲۱۲ نمابر: ۲۴۳۱۷۸۲- ۰۲۱۲

Email: mtborjian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۷

Archive of SID

www.SID.ir

bp1437، دارای مقاومت دمایی نسبتاً بالا (حفظ ۹۰٪ فعالیت پس از ۳۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد)، تمایل بالا نسبت به فیتات و مقاومت بالا در دستگاه گوارش حیوانات مصرف‌کننده، می‌باشد؛ [۹،۸] اما به علت سطح پایین تولید آنزیم در میزبان اولیه نمی‌توان از این میزبان برای تولید آنزیم در مقیاس صنعتی استفاده کرد.

گونه‌ی H. polymorpha یکی از اعضای خانواده‌ی مخمرهای متیلوتروف بوده که همانند گونه‌ی پیکیاپاستوریس توانایی استفاده از متانول به عنوان تنها منبع کربنی را دارا می‌باشد. این میزبان بیانی، علاوه بر دارا بودن تمام مزایای سیستم بیانی پیکیاپاستوریس همانند؛ توانایی رشد در محیط‌های ساده، سرعت رشد بالا، توانایی ترشح پروتئین به خارج از سلول و غیره؛ دارای توانایی تکثیر پلاسمید در داخل خود، تحمل غلظت‌های بسیار بالای سلولی، مقاومت دمایی نسبتاً بالا (تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و عدم لزوم حضور متانول به عنوان تنها القاکننده‌ی پروموتر به کار رفته در این سیستم، می‌باشد [۱۲،۱۰،۱۱].

در این مطالعه، ژن فیتاز A. niger جهت دست‌یابی به سطح بالایی از بیان به میزبان بیانی H. polymorpha انتقال داده شد. ما توالی ژن فیتاز A. niger NRRL3135 را بر طبق ترجیح کدونی میزبان بیانی بهینه‌سازی کرده و سپس بیان آنزیم را در محیط‌های YNB و YP با منابع کربن متفاوت (گلیسرول ۱٪، گلوکز ۲٪ و متانول۱٪) بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

کلونینگ ژن فیتاز در باکتری اشرشیاکلی: توالی پروتئینی آنزیم فیتاز گونه‌ی A. niger با شماره دسترسی P34752 از بانک‌های اطلاعاتی پروتئین استخراج شده و با توجه به ترجیح کدونی میزبان بیانی، پس از بهینه‌سازی از نظر محتوای GC، ساختارهای ثانویه‌ی mRNA و غیره با استفاده از نرم‌افزار Gene Optimizer، توالی ژن طراحی و توسط شرکت Shine Gene Molocolar Biotec سنتز گردید. توالی ژن فیتاز در داخل وکتور PUC57 بین دو جای‌گاه برش HindIII و BamHI به آزمایش‌گاه تحویل داده شد. توالی فیتاز بهینه‌شده پس از برش با استفاده از آنزیم‌های HindIII و BamHI، به داخل وکتور دوگانه‌ی pFPMTMFα با پروموتر فرمات دهیدروژناز (FMD) و سیگنال پپتید Saccharomyces cerevisiae (MF4I)، انتقال یافت. جهت دست‌یابی به مقادیر بالای پلاسمید، سازه‌ی ساخته شده با استفاده از روش شوک حرارتی در داخل باکتری‌های مستعد اشرشیاکلی سویه‌ی DH5α کلون شد [۱۴،۱۳]. باکتری‌ها در محیط LB حاوی ۰/۵٪ عصاره‌ی مخمر، ۱٪ تریپتون و ۱٪ سدیم کلرید، در شیکرانکوباتور با دور ۳۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد داده شدند.

کلونینگ ژن فیتاز در میزبان مخمری: تهیه‌ی سلول‌های مستعد مخمر H. polymorpha طبق روش Faber et al. (۱۹۹۴) انجام شد. سازه‌ی نوترکیب حاوی ژن فیتاز A. niger در شرایط ۲۵μF، ۲kv و ۲۰۰ Ω در مدت ۴.۵-۳ میلی‌ثانیه به سلول‌های مستعد H. polymorpha انتقال یافته و سپس مقداری از آن در محیط کشت حداقل YNB-Dextrose حاوی ۰/۱۷٪ Yest Nitrogen base، ۰/۵٪ آمونیوم سولفات، ۲٪ دکستروز و ۱/۸٪ آگار خالص، پخش شد. پلیت‌ها را برای مدت ۱۲۰-۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا کلنی‌های مخمر تشکیل گردند [۱۶،۱۰،۱۵]. سپس در طی ۸ مرتبه واکشت مخمرهای ترانسفورم شده در محیط‌های حداقل، پلاسمید pFPMTMFα در مخمر بیانی تکثیر یافته و از طریق نوترکیبی هومولوگ با تعداد نسخه بالا به درون ژنوم مخمر انتقال می‌یابد (مرحله انتقال). پس از دو بار کشت مخمرهای ترانسفورم شده در محیط غنی YPD، مخمرهایی که ژن در ژنوم آن‌ها تلفیق نشده پلاسمیدهای خود را از دست دادند (مرحله تثبیت). در نهایت، دوباره مخمرها در محیط کشت حداقل برده شدند تا کلنی‌های نوترکیب انتخاب شوند (مرحله انتخاب). مخمرهای نوترکیب توانایی سنتز یوراسیل را داشته و می‌توانند در محیط کشت حداقل رشد کنند.

بررسی بیان آنزیم فیتاز در میزبان نوترکیب: کلون‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت حداقل در مرحله‌ی انتخاب

Archive of SID

www.SID.ir

را در ۳۰ میلی‌لیتر از دو محیط YNB (حاوی ۰/۱۷٪ Yest Nitrogen base و ۰/۵٪ آمونیوم سولفات) و YP (حاوی ۰/۱٪ عصاره‌ی مخمر و ۲٪ پپتون) با منابع کربن متفاوت (گلیسرول ۱٪، گلوکز ۲٪ و متانول ۱٪)، کشت دادیم. فعالیت آنزیم با استفاده از روش آمونیوم مولیبدات، تعیین شد [۱۷]. هر واحد فعالیت آنزیمی فیتاز (U) عبارت است از مقدار آنزیمی که می‌تواند µmol ۱ اورتوفسفات غیر معدنی را در هر دقیقه از سدیم فیتات، جدا کند [۱۸]. فعالیت ویژه‌ی آنزیم با کمک روش بردفورد محاسبه شد. بیان و ترشح آنزیم فیتاز محلول در محیط کشت، با استفاده از ژل الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید ۱۰٪ (SDS-PAGE) بررسی شد.

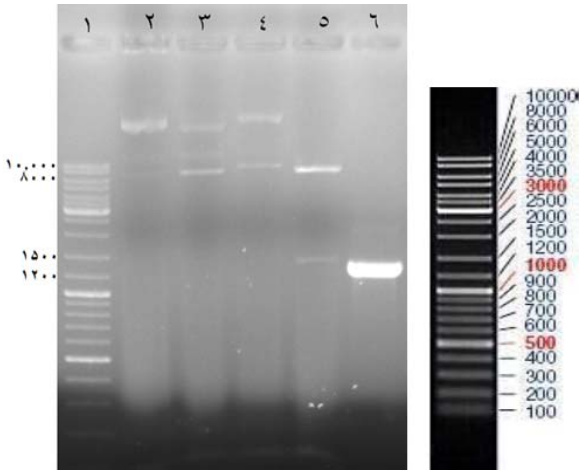
نتایج

کلونینگ ژن فیتاز در باکتری اشرشیاکلی: تایید حضور ژن در داخل باکتری‌های ترانسفرم شده با استفاده از روش PCR با کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ابتدا و انتهای ژن فیتاز انجام شده (جدول ۱) و بدین ترتیب قطعه‌ای به طول bp1303 تکثیر یافت. با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم‌های HindIII و BamHI، حضور پلاسمید با طول bp7233 و ژن فیتاز با طول bp1437 بر روی ژل آگارز تایید شد. با برش وکتور با استفاده از آنزیم EcoRI که تنها یک جایگاه برش در داخل وکتور دارد، حضور ژن به همراه وکتور با طول bp8670 تایید شد (۱).

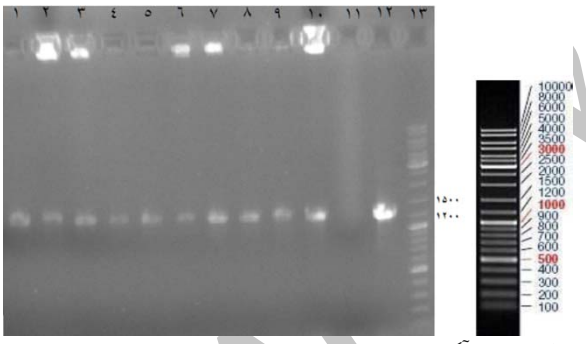
جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

توضیحات	توالی
پرایمر بالادست ژن فیتاز (PhyFW)	5’GTGTTTCTGCTGTTTTGT TGCCATTG3’
پرایمر پایین دست ژن فیتاز (PhyREV)	5’CAACCGTGCAATGGAAC AACTCTGTC3’

کلونینگ ژن فیتاز در میزبان مخمری: جهت تایید حضور ژن در مخمرهای ترانسفرم شده، واکنش Colony-PCR با استفاده از پرایمرهای بالا و پایین دست ژن فیتاز، گذاشته شد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱. ژل آگارز نشان دهنده‌ی تایید کلونینگ توالی نوترکیب فیتاز در وکتور pFPMTMFα. چاهک شماره ۱. نشانگر GeneRuler™ #SM 0331 2. پلاسمید حاوی ژن فیتاز بریده نشده ۳. پلاسمید pFPMTMFα بریده شده با آنزیم EcoRI 4. پلاسمید pFPMTMFα حاوی ژن فیتاز بریده شده با آنزیم EcoRI 5. پلاسمید pFPMTMFα حاوی ژن فیتاز بریده شده با آنزیم‌های HindIII و BamHI 6. محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PhyFWD و PhyREV.



شکل ۲. ژل آگارز نشان‌دهنده‌ی تایید انتقال توالی نوترکیب فیتاز با استفاده از روش Colony-PCR در مخمر *H. polymorpha*. چاهک‌های شماره ۱۰-۱ حاوی فیتاز نوترکیب به طول ۱۳۰۳bp با استفاده از پرایمرهای PhyFW و PhyREV. چاهک شماره ۱۱ کنترل منفی چاهک شماره ۱۲ کنترل مثبت (توالی فیتاز تکثیر شده در داخل پلاسمید). چاهک شماره ۱۳ نشانگر GeneRuler™ #R0491.

فعالیت آنزیم فیتاز نوترکیب در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۵/۵ بررسی شد. بالاترین سطح فعالیت آنزیم فیتاز نوترکیب (U/L971.8 پس از گذشت ۱۲۰ ساعت) در محیط YP-Methanol مشاهده شد. فعالیت ویژه‌ی آنزیم فیتاز نوترکیب در محیط‌های YNB-Methanol، YNB-Glucose،

Archive of SID

www.SID.ir

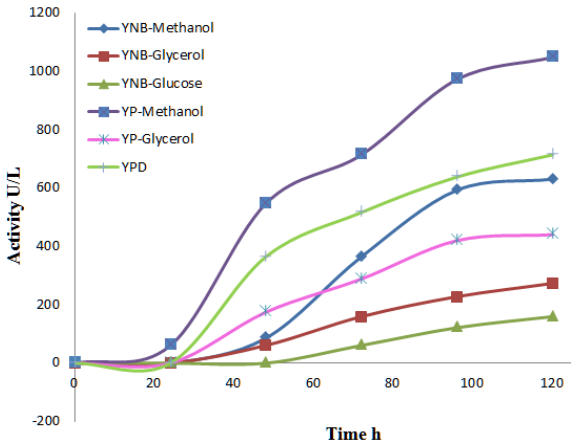
YP-Methanol، YNB-Glycerol، YPD و YP-Glycerol به ترتیب ۳۴/۸۴ U/L، ۱۲/۱۴ U/L، ۱۰/۷۸ U/L، ۹/۱ U/L، ۴/۱ U/L و ۲/۱ U/L، محاسبه شد (شکل ۳).

فعالیت ویژه‌ی به دست آمده از آنزیم تجاری خریداری شده از شرکت BASF، ۴۲/۲۴U/mg به دست آمد (جدول ۲).

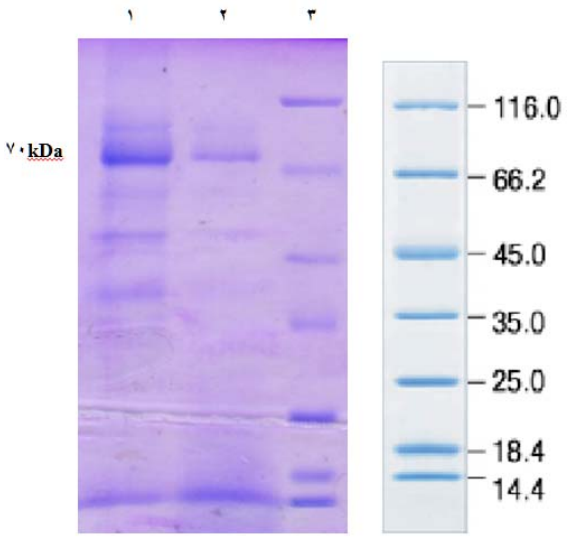
جدول ۲. بررسی فعالیت، مقدار پروتئین تولید شده با استفاده از روش بردفورد و فعالیت آنزیم فیتاز نوترکیب و آنزیم تجاری تولید شده از شرکت BASF آلمان

محیط‌های کشت و فرم تجاری	فعالیت (U/L)	فعالیت ویژه (U/mg)
آنزیم تجاری (BASF)	۳۰۰۰	۴۲.۲۴
YNB-Methanol	۱۱۸۵	۳۴.۸۴
YNB-Glycerol	۴۵۵.۵۲	۹.۱
YNB-Glucose	۲۴۲.۹۴	۱۲.۱۴
YP-Methanol	۱۹۴۳.۶	۱۰.۷۸
YP-Glycerol	۸۳۹.۶۸	۲.۱
YPD	۱۲۷۵.۴۸	۴.۱

صحت بیان و ترشح نسبتاً خالص آنزیم فیتاز نوترکیب در محیط‌های بیانی YNB-Methanol و YP-Methanol با استفاده از ژل SDS-PAGE بررسی شد (شکل ۴).



شکل ۳. بررسی فعالیت آنزیم فیتاز در مخمر *H. polymorpha* در محیط‌های کشت مختلف در طی زمان ۱۲۰ ساعت. فعالیت آنزیم در محیط‌های YNB-Methanol (◆)، YNB-Glycerol (■)، YNB-Glucose (▲)، YP-Methanol (■)، YP-Glycerol (✳)، YPD (—).



شکل ۴. بررسی بیان پروتئین نوترکیب فیتاز در محیط بیانی YNB-Methanol و YP-Methanol. چاهک شماره ۱. پروتئین فیتاز بیان شده در محیط YP-Methanol. چاهک شماره ۲. پروتئین فیتاز بیان شده در محیط YNB-Methanol. چاهک شماره ۳. نشانگر پروتئینی.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج کلونینگ ژن فیتاز و همچنین وزن مولکولی آنزیم فیتاز نوترکیب خالص شده، با استفاده از ژل SDS-PAGE که در حدود 85kDa محاسبه شد، مشابه با داده‌های به دست آمده در گزارشات قبلی است [۱۹].

مقاومت دمایی بالا، تمایل بالا نسبت به فیتیک‌اسید، فعالیت مناسب در رنج pH بین ۵-۴ (مناسب برای فعالیت در دستگاه گوارش) و مقاومت بالای آنزیم فیتاز A. niger NRRL 3135 در دستگاه گوارش حیوانات مصرف‌کننده، نشان‌دهنده‌ی ارزش بالای این منبع آنزیمی جهت تولید در سطح تجاری است [۱۸،۸].

مخمر H. polymorpha به علت توانایی تولید خارج از سلولی آنزیم در سطح بالا، نیاز به محیط کشت ساده، عدم لزوم متانول برای بیان پروتئین (بر خلاف Picha pastoris)، توانایی تحمل غلظت‌های بالای سلولی، بیان پایدار پروتئین در داخل آن و غیره، به عنوان میزبان مناسب جهت بیان آنزیم A. nigerNRRL 3135، انتخاب گردید [۱۲].

مایر در سال ۱۹۹۸ نشان داد که مخمر H. polymorpha، بالاترین سطح تولید آنزیم فیتاز (تولید ۱۳/۵ g/L) را در

Archive of SID
www.SID.ir

محیط بیانی با منبع کربن گلوکز (YPD)، در شرایط فرمانتور دارا می‌باشد [۱۲]. در این تحقیق نشان داده شد که فعالیت آنزیم فیتاز A. nigerNRRL 3135 در محیط بیانی YP-methanol، ۱/۵۲٪ از محیط YPD بیش‌تر می‌باشد. این نتایج، محیط YP-methanol را به عنوان یک محیط کارآمد جهت تولید آنزیم فیتاز A. nigerNRRL 313 در مقیاس صنعتی معرفی می‌کند.

مقایسه بین فعالیت ویژه‌ی آنزیم فیتاز خریداری شده از شرکت BASF با آنزیم فیتاز تولید شده در محیط YNB-methanol تولید شده در کشت فلاسک و بدون مراحل خالص‌سازی، نشان‌دهنده‌ی پتانسیل بالای محیط بیانی YNB-Methanol در ترشح نسبتاً خالص آنزیم فیتاز نوترکیب تولید شده در مخمر H. polymorpha به خارج از سلول می‌باشد؛ که با توجه به هزینه‌ی بالای خالص‌سازی آنزیم‌های نوترکیب تولید شده در میزبان‌های جدید، کارایی بالای این محیط را در تولید ارزان قیمت آنزیم فیتاز نشان می‌دهد.

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهند که با شناخت کامل میزبان بیانی و تغییر در محیط بیانی آن می‌توان مراحل بسیار پرهزینه خالص‌سازی آنزیم را تا حد زیادی کاهش داد که می‌تواند افق بزرگی را در پیش‌برد خودکفای تولید آنزیم در کشور نشان دهد.

در این تحقیق برای اولین بار، کلونینگ، بیان و بررسی فعالیت آنزیم فیتاز نوترکیب A. niger NRRL 3135 در محیط‌های بیانی مختلف در مخمر H. polymorpha، انجام شد. نتایج این تحقیق، محیط بیانی YP-methanol را به عنوان یک محیط کارآمد جهت تولید آنزیم فیتاز A. niger NRRL 313 در میزبان بیانی H. polymorpha، در مقیاس صنعتی نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

تمام مراحل آزمایش‌گاهی این پژوهش در آزمایش‌گاه نانوبیوتکنولوژی دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شد، که بدین وسیله از زحمات و حمایت‌های مالی این آزمایش‌گاه سپاس‌گذاری می‌شود.

منابع

[1] Turner BL, Richardson AE, Mullaney EJ. Inositol phosphates: linking agriculture and the environment. CABI 2006.

[2] Kerovuo J. A novel phytase from Bacillus: characterization and production of the enzyme. Univ Helsinki 2000, 8-69.

[3] Kumar V, Sinha AK, Makkar HP, Becker K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chemistry 2010; 120: 945-959.

[4] Greiner R, Konietzny U. Phytase for food application. Food Technol Biotechnol 2006; 44: 125-140.

[5] Cowieson AJ, Acamovic T, Bedford MR. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. Br Poult Sci 2004; 45: 101-108.

[6] Vats P, Banerjee UC. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate hosphohydrolases): an overview. Enzyme and Microbial Technology 2004; 35: 3-14.

[7] Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 1979; 6: 23-28.

[8] Zhang GQ, Dong XF, Wang ZH, Zhang Q, Wang HX, Tong JM. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from Aspergillus ficuum NTG-23. Bioresour Technol 2010; 101: 4125-4131.

[9] Gellissen G. Hansenula polymorpha: biology and applications. Wiley-VCH 2002.

[10] Gellissen G. Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic expression systems. Wiley-VCH Verlag 2005.

[11] Mayer AF, Hellmuth K, Schlieker H, Lopez-Ulibarri R, Oertel S, Dahlems U, et al. An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of Hansenula polymorpha. Biotechnol Bioeng 1999; 63: 373-381.

[12] Faber KN, Haima P, Harder W, Veenhuis M, Ab G. Highly-efficient electrotransformation of the yeast Hansenula polymorpha. Curr Genet 1994; 25: 305-310.

[13] Pope B, Kent HM. High efficiency 5 min transformation of escherichia coli. Nucleic Acids Res 1996; 24: 536-537.

[14] Higgins DR, Cregg JM. Pichia Protocols. Humana Press 1998.

[15] Kawai S, Hashimoto W, Murata K. Transformation of Saccharomyces cerevisiae and other fungi: Methods and possible underlying mechanism. Bioeng Bugs 2010; 1: 395-403.

[16] Dvoráková J. Phytase: sources, preparation and exploitation. Folia Microbiol 1988; 43: 323-338.

[17] Lassen SF, Breinholt J, Østergaard PR, Brugger R, Bischoff A, Wyss M, Fuglsang CC. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: peniophora lycii, agrocybe pediades, a ceriporia sp., and trametes pubescens. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 4701-4707.

[18] Ullah AH, Gibson DM. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from Aspergillus ficuum NRRL 3135: purification and characterization. Prep Biochem 1987; 17: 63-91.

Archive of SID

www.SID.ir

Cloning, expression and culture optimization of gene encoding *Aspergillus niger NRRL3135* phytase in *Hansenula polymorpha host*

Mohammadtaghy Borjian Borujeni (M.Sc)[*1], Seyyed Omid Ranaei Siadat (Ph.D)[1], Javad Harati (M.Sc)[1], Farnaz nikzad jamnani (M.Sc)[1,2], Shirin Yousefian (M.Sc)[1], Sohrab Moradi (M.Sc)[1]

1 - Nanobiotechnology laboratory, Dept. of Biotechnology, Faculty of Energy Engineering and New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2 – Dept. of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received: 18 Dec 2012; Accepted: 27 Apr 2013)

Introduction: Phytase is able to change phytic acid into the myo-inositiol and inorganic phosphate, so it has been used as a cereal food additive in monogastric animal's food. The aim of this study was to eamine cloning, expression and culture optimization of gene encoding Aspergillus niger NRRL3135 phytase in *Hansenula polymorpha* host.

Materials and Methods: In this study, in order to achieve high level production of protein, the sSequence of protein encoding fangal *Aspergillus niger NRRL3135* phytase was designed according to the expression cod on usage of Hansenula polymorpha and transformation was done. The enzyme specific activity in different cultures was survived.

Results: The results in flask culture showed that the recombinant phytase production was 1185 U/L with 34.84 U/mg specific activities in YNB-Methanol culture.

Conclusion: Results indicate YP-methanol culture is the efficient culture to produce *Aspergillus niger NRRL3135 phytase* in *Hansenula polymorpha* as a host on industrial scale.

Keywords: Phytsase, Culture optimization, *Hansenula polymorpha*

Corresponding author: Fax: +98 212 2431782 Tel: +98 212 2431782
Email: mtborjian@gmail.com

How to cite this article:
Borjian Borujeni M, Ranaei Siadat O, harati J, nikzad jamnani F, yousefian S, Moradi S. Cloning, expression and culture optimization of gene encoding Aspergillus niger NRRL3135 phytase in Hansenula polymorpha host. koomesh. 2013; 15 (1) :17-21
URL http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-1660-1&slc_lang=fa&sid=1

نحوه ارجاع به این مقاله:
برجیان بروجنی محمدتقی، رعنایی سیادت امید، هراتی جواد، نیکزاد جمنانی فرناز، یوسفیان شیرین، مرادی سهراب. کلونینگ، بیان و بهینه‌سازی محیط جهت بیان آنزیم فیتاز آسپرجیلوس نایجر در میزبان هانسنولا پلی‌مورفا. کومش . ۱۳۹۲; ۱۵ (۱) :۱۷-۲۱

www.SID.ir