

重组嗜热乳糖酶在毕赤酵母中的表达、纯化与活性分析

李洪波¹, 罗海燕¹, 张树琴¹, 吴东海²

(1. 怀化学院 生命科学系, 民族药用植物资源研究与利用湖南重点实验室, 湖南 怀化 418000; 2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东 广州 510530)

摘要: 为获得耐高温的重组乳糖酶, PCR 扩增激烈热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 乳糖酶基因、构建毕赤酵母分泌型表达载体 pPICZαA/Lac 并转化毕赤酵母 X-33 菌株。重组酵母转化子经甲醇诱导, 重组嗜热乳糖酶实现了分泌表达并经蛋白印迹验证。纯化前上清液中乳糖酶总活力高达 125 U/mL, 经镍亲和纯化得重组酶, SDS-PAGE 显示其纯度在 95% 以上, 比活力 1 800 U/mg, 该酶最适温度在 105 °C 左右且热稳定性好, 具有很强的水解乳糖能力。

关键词: 嗜热乳糖酶; 激烈热球菌; 毕赤酵母; 分泌表达; 纯化

中图分类号: Q 786 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)08-0812-05

Expression, Purification and Activity Assay of Recombinant Thermophile Lactase From *Pichia pastoris*

LI Hongbo¹, LUO Haiyan¹, ZHANG Shuqin¹, WU Donghai²

(1. Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Department of Life Sciences, Huaihua College, Huaihua 418008, China; 2. Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

Abstract: In order to obtain the recombinant thermostable lactase, a DNA fragment containing the mature lactase gene was amplified from *Pyrococcus furiosus* by PCR and cloned into pPICZαA, generating a fusion protein with the alpha factor from baker's yeast and integrated into the genome of *Pichia pastoris* strain X-33. Recombinant yeast transformants with high-level recombinant lactase production was identified by Western blotting, secreting as much as 125 U/mL induction by methanol. The recombinant thermostability lactase was purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography and SDS-PAGE results shown that the purity was over 95%. The specific activity was about 1 800 U/mg and the optimal temperature was about 105 °C. It was also showed that the purified lactase from *P. pastoris* has a highly thermostability and strong ability to hydrolysis lactose.

Keywords: thermophile lactase, *Pyrococcus furiosus*, *Pichia pastoris*, secretory expression, purification

收稿日期: 2015-12-07

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81300655)。

作者简介: 李洪波(1980—), 男, 湖南永州人, 理学博士, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: lihongbo8007@163.com

引用本文: 李洪波, 罗海燕, 张树琴, 等. 重组嗜热乳糖酶在毕赤酵母中的表达、纯化与活性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(08): 812-816.

随着年龄的增长,人体内乳糖酶活性呈规律性减退,产生乳糖不耐。据报道,我国超过一半的成年人有乳糖不耐受症状。乳糖酶是一种高效的生物催化剂,其在乳制品行业中不可替代。 β -乳糖苷酶(β -galactosidase, EC 3.2.1.23), 又称乳糖酶, 能将乳或其制品中的乳糖水解为葡萄糖和半乳糖,降低乳制品中乳糖含量。活力强、耐高温重组乳糖酶的开发有助于简化乳糖转化工艺、降低生产成本、增加乳制品的附加值并扩大乳制品的适宜人群,有利于乳制品的普及、增加乳制品营养的吸收。乳糖酶多从酵母、曲霉或乳酸菌中提取获得,但由于耐热性差,严重影响其应用。耐高温乳糖酶能够克服这缺陷,从耐高温古细菌中分离热稳定性好的乳糖酶并克隆其基因,利用外源基因表达系统高效表达这些外源基因已成为研究和利用这些酶的重要突破点^[1-5]。在外源基因表达系统中,毕赤酵母表达系统具有许多优点,例如:操作简易、易于培养、生长速度快、表达量高、酵母表达载体含分泌型信号肽利于胞外表达,高密度发酵生产成本低且该系统的安全性已得到美国 FDA 认可^[6-8]。激烈热球菌虽然实现了在酵母中的分泌表达,但重组蛋白的纯化仍较复杂,本研究将利用毕赤酵母表达系统分泌表达带有组氨酸标签(His \times 6)的重组蛋白、纯化并检测其活性,为其耐热机理及其他方面活性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

P. furiosus 乳糖酶(Lac)cDNA 由佛罗里达大学李侍武教授馈赠,表达载体 pPICZ α A 和表达菌株 X-33 由本实验室保存。PCR 试剂及工具酶为 TaKaRa 产品;镍亲和树脂(Ni-NTA)购自 Qiagen,抗体均购自 CST 公司,其他试剂为 Sigma 分析纯产品。培养基及配制参见毕赤酵母表达系统操作手册(Version E, 010302/25-0150, Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 载体的构建及转化酵母 据 *P. furiosus* 乳糖酶 cDNA (GenBank Accession No: gblAF013169.21), 设计引物 F: 5'-GCCTCGAGAAAAGAATGAAGTTCCCAAAAACTTC-3' 和 R: 5'-GCTCTAGATTTCTTGTAACAAATTTG-3', PCR 扩增目的基因、构建质粒 pPICZ α A/Lac 并测序。pPICZ α A/Lac 经 Sac I 线性化后参照毕赤酵母表达系统操作手册 LiCl 法转

化酵母,涂布 YPDZ (Zeocin 100 mg/L), 28 °C 培养 3 d, 将 YPDZ 平板上生长的酵母菌用 2 mL 液体 YPD 洗下、稀释并涂布到高浓度 YPDZ 平板 (Zeocin 500 mg/L), 28 °C 培养 3 d, 随机挑取转化子单菌落划线接种于 YPDZ 平板, 28 °C 培养 3 d, 利用通用引物 5'-Factor 和 3'-AOX₁ 对转化子进行 PCR 验证。

1.2.2 小量表达及产物验证 转化子单菌落接种至 10 mL BMGY, 28 °C、250 r/min 培养过夜。取 2 mL 过夜菌于 200 mL BMGY 中, 同上条件培养至 A_{600} = 10 左右; 1 500 g、5 min 离心得菌体。40 mL BMMY 重悬菌体, 500 mL 三角瓶中, 28 °C、250 r/min 诱导培养; 每 24 h 取样 1 次并补甲醇至终体积分数 1%, 诱导 4 d。测定上清酶活, SDS-PAGE 分析上清中的蛋白, 以抗 His \times 6 小鼠单抗为一抗, HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 为二抗, Western blotting 检测目标产物。

1.2.3 扩大培养及蛋白纯化 按小量培养的方法, BMGY 培养基培养 1.2 L 菌液, 120 mL BMMY 重悬菌体, 诱导 4 d 后离心取上清, 1 M Tris 调节 pH 至 8.0, 15 000 g 离心 10 min。参照文献[6], 将上清转至经 20 mL 缓冲液 A 平衡的镍柱, 过柱后 100 mL 缓冲液 B (缓冲液 A 含 30 mmol/L 咪唑) 漂洗纯化柱, 10 mL 浓度分别为 50、100、200 和 300 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 洗脱。变性条件下, 10% SDS-PAGE 分析。纯化的重组蛋白经 PBS 透析后经超滤浓缩后备用。

1.2.4 酶学性质分析 配制 pH 4~7 的缓冲液, 将 ONPG 溶于缓冲液 (0.25%), 于 65 °C 测定酶活 (牛奶巴氏灭菌温度下)。温度对酶活的影响: 于 40~100 °C 的水浴和 105~120 °C 数显恒温油浴锅中, 经 1 h 水浴后测定酶活。金属离子的影响: 65 °C、pH 6.5 下, 加入不同的金属离子和相关化学试剂 (终浓度为 1 mmol/L) 测定酶活。酶比活测定: 将酶蛋白质量浓度调整至 100 μ g/mL, 分别取 1、3、5 μ L 添加至含有 10 mL 0.25% ONPG 的试管中, 于最适条件下反应 0.5 h 测定并分析其比活。

1.2.5 乳糖水解分析 乳清粉配成一定浓度的溶液, 100 °C 加热 15 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清。调整乳糖浓度为 5%, 将纯化的酶蛋白质量浓度调整至 1 mg/mL, 取 0、10、20、40 和 50 μ L 添加至含有 10 mL 乳清溶液的试管中, 于 pH 6.5、65 °C 下、水解 0.5 h, 测定乳糖水解度。莱因-埃农氏法 (GB/T 5413.5-1997) 测定乳糖含量, 酶-比色法 (GB/T

16285—96)测定葡萄糖含量。水解率计算公式为:乳糖水解率=(生成葡萄糖的质量/原乳糖质量)×100%

2 结果与讨论

2.1 重组酵母表达载体的构建及酵母转化子的筛选

Xho I 和 *Xba* I 双酶切,电泳结果如图 1(a)所示,重组载体在 1500 bp 处有 DNA 条带,该条带与目标基因大小相符(泳道 2)且测序结果与 Gene Bank 的序列一致,说明重组载体构建成功。随机挑取 4 个酵母转化子,PCR 分析结果如图 1(b)所示,重组质粒转化子在约 1800 bp 处存在特异条带(泳道 3~6),而 X-33 出发菌株对照未出现特异扩增条带(泳道 1),空载体转化子在约 270 bp 处存在条带(泳道 2),由于利用通用引物 5'-Factor 和 3'-AOX1 PCR 所得片段较目标基因大 270 bp 左右,PCR 结果说明目标基因已成功插入到毕赤酵母基因组。

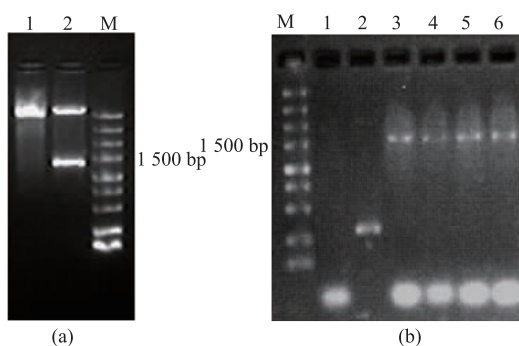


图 1 载体的构建及转化子的验证

Fig. 1 Expression vector construction and PCR results of lactase *P. pastoris* transformants

2.2 小量表达及产物验证

甲醇诱导前,检测不到酶活,诱导 24 h 后的酶活达 31 U/mL,诱导 96 h 酶活达到了 125 U/mL (图 2)。SDS-PAGE 分析结果显示,在约 55 kDa 处有与目标蛋白大小相符的条带(图 3),Western blot 也显示在目标蛋白位置,出现了特异条带(图 2)。SDS-PAGE 及蛋白印迹条带与预期重组乳糖酶的分子量大小相符。

2.3 重组蛋白的纯化

SDS-PAGE 结果表明 40 和 100 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 可将大部分杂蛋白漂洗掉,含 200 及 300

mmol/L 咪唑的缓冲液能将目标蛋白洗脱,当咪唑浓度为 300 mmol/L 时目标蛋白被大量洗脱且几乎没有杂蛋白(图 4),Quantity One 软件灰度分析结果表明,当咪唑浓度为 300 mmol/L,洗脱液中目标蛋白纯度超过 95%。SDS-PAGE 分析结果表明,利用镍亲和纯化可以快速将目标蛋白分离纯化。纯化前诱导液总酶活达 1.2×10^4 U,酶比活力为 320 U/mg,300 mmol/L 咪唑洗脱后总酶活为 3.3×10^3 U,酶比活力约 1740 U/mg,经透析和超滤浓缩后,酶比活力约 1800 U/mg,酶被纯化了 5.6 倍,各步纯化效果如表 1 所示。

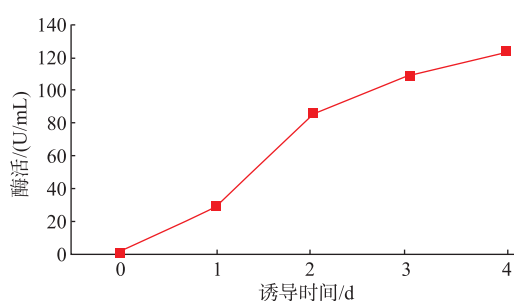


图 2 酶活变化曲线

Fig. 2 Enzyme activity curve

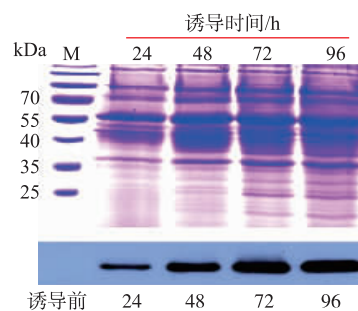


图 3 目标蛋白的检测

Fig. 3 Identification of target protein

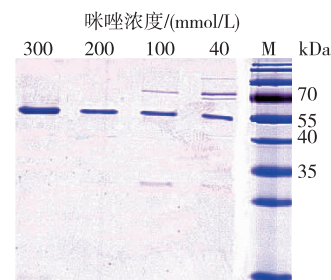


图 4 重组乳糖酶的纯化

Fig. 4 Purification of recombinant lactase

表 1 重组乳糖酶的纯化

Table 1 Purification of recombinant lactase

纯化步骤	总酶活	总蛋白/mg	纯度/%	回收率/%
纯化前	1.2×10 ⁴	37.5	-	100
镍亲和纯化	3.3×10 ²	1.9	>95	28
超滤浓缩	3.1×10 ²	1.7	>95	26

2.4 酶特性分析

酶活温度曲线如 5 所示,105 °C 时重组酶的活力最高。酶活 pH 曲线如图 6 所示,pH 6.5 左右酶活最高。Cu²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺和 Zn²⁺对乳糖酶有激活作用,Fe²⁺效果最明显,其相对酶活达到 50%;EDTA、K⁺、Mg²⁺和 Ca²⁺对酶的抑制作用不显著(图 7)。酶比活力测定分析结果表明,该酶的比活达为 1 850 U/mg。纯化酶的耐热性分析结果表明,该酶具有良好的热稳定性,经 100 °C 处理 2 h 酶活在 90% 以上,100 °C 处理 4 h 酶活在 70% 以上(图 8)。

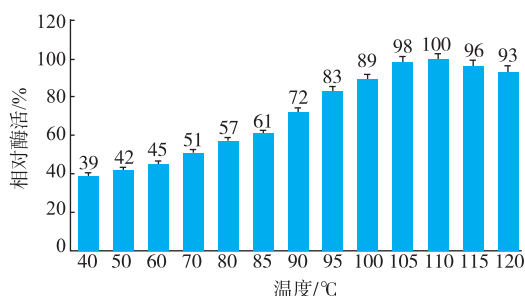


图 5 乳糖酶的温度曲线

Fig. 5 Optimum temperature curve of lactase

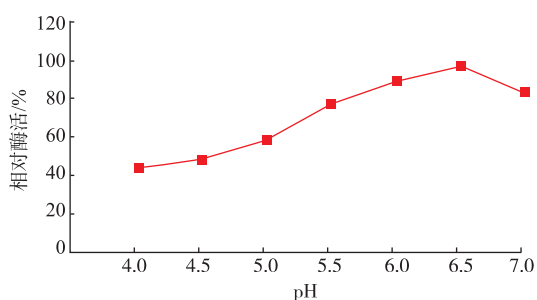


图 6 乳糖酶的 pH 曲线

Fig. 6 Optimum pH curve of lactase

2.5 乳糖水解分析

乳糖酶的使用量与乳糖水解率的关系如图 9 所示,当重组酶添加量为 37 U/g 乳糖时,乳糖的水解度为 16%;当乳糖酶的使用量为 185 U/g 乳糖时,乳糖的水解度达 67%。以上结果说明,在巴氏灭菌条件下(65 °C 保温 0.5 h),纯化的乳糖酶具有良好

的水解乳糖活性。

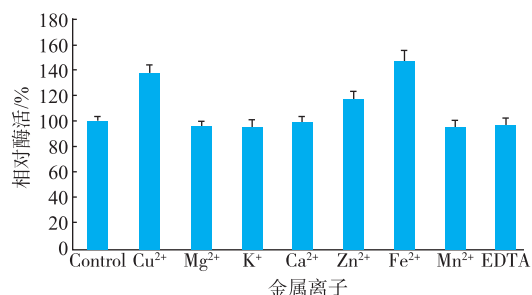


图 7 金属离子对酶活的影响

Fig. 7 Effect of metal ions to recombinant lactase activity

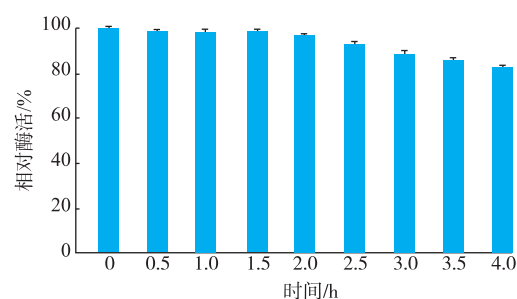


图 8 乳糖酶的热稳定性曲线

Fig. 8 Thermostability curve of recombinant lactase

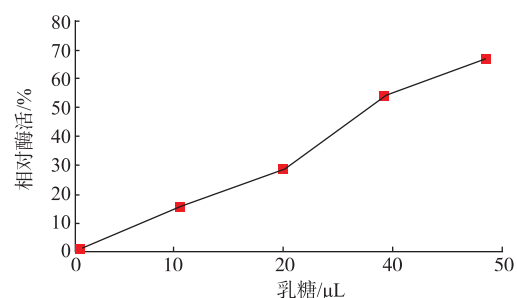


图 9 乳糖水解分析

Fig. 9 Degree of hydrolysis of lactose

3 讨论

国内外已有不少关于耐高温乳糖酶的研究报告^[9-14]。段文娟等分别利用大肠杆菌表达了与本研究相同的乳糖酶基因,但其利用大肠杆菌表达系统表达的嗜热乳糖酶的酶活力较低且表达的重组酶存在于胞内,增加了蛋白分离纯化的工艺,不适于工业化生产^[3,15]。Dong 等^[3]利用大肠杆菌表达的该重组酶经复性后才具有生物活性,但比活较酵母分泌表达的重组酶要低得多,且该复性酶的耐热性下降,其最适温度为 90 °C,最适 pH 为 7,较本研究和 Li

等^[2]表达的重组酶最适 pH 高,说明酵母表达系统较大肠杆菌更适于生产该重组酶。本研究利用毕赤酵母表达系统,在甲醇诱导下,重组嗜热乳糖酶在该表达系统中高水平分泌表达,摇瓶小量培养条件下,经甲醇诱导的培养基上清液中的酶活达 125 U/mL。该重组乳糖酶在 pH 6~7 间的酶活都在 85%以上,该 pH 范围与天然牛乳的 pH 接近,且该酶具有广泛的温度适用范围;同时,以乳清为原料,在巴氏灭菌条件下,该酶表现出良好的水解乳糖活性。以上结果都表明酵母表达系统表达的重组嗜热乳糖酶在牛奶加工中具有广阔的应用潜力。

Li 等^[2]利用 GAP 为启动子,实现该酶组成型分泌表达, Li 在高密发酵条件下酶产量约 0.7 g/L,其高密发酵条件下菌体密度约为本研究 50 倍,目标

产物为本研究 10 倍左右,说明以 AOX1 为启动子,在甲醇诱导下其表达量可能要高于 GAP 启动子;另外,酶学特性分析表明,本研究表达 C-末端带组氨酸标签重组酶的酶学性质(最适 pH、最适温度及热稳定性)与不带组氨酸标签基本一致。大多数蛋白的纯化步骤较多且过程繁琐,获得高回收率、高纯度蛋白的理想方法是尽量减少组化的步骤,本研究在目标蛋白的 C 端引入了组氨酸标签,上清液经调节 pH 后直接用于纯化,经镍亲和纯化后,优化洗脱条件,可以实现一步纯化获得高纯度的酶蛋白,该方法较离子交换更为简单,较利用热变性的方法去除其他蛋白更能保护酶的活性,有利于研究该酶的其他酶学特性、开展其他应用方面的分析及为其耐热机理等研究打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] ZHAO Q. High level production of β -galactosidase exhibiting excellent milk-lactose degradation ability from *Aspergillus oryzae* by codon and fermentation optimization[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2014, 172(6):2787-2799.
- [2] LI B. Preparation of lactose-free pasteurized milk with a recombinant thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus* [J]. **BMC Biotechnology**, 2013, 13 (73):1-10.
- [3] DONG Q. Characterization of an extremely thermostable but cold-adaptive β -galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* for use as a recombinant aggregation for batch lactose degradation at high temperature [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2014, 117(6):706-710.
- [4] BRUINS M. Oligosaccharide synthesis by the hyperthermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*: Kinetics and modeling [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, 33(1):3-11.
- [5] CHEN Jian, LIU Long, DU Guocheng. Current status and prospects of enzyme preparation industry in China[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(1):1-7. (in Chinese)
- [6] LI H. High level expression of active recombinant human interleukin-3 in *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2011, 80(2):185-193.
- [7] BOURBONNAIS Y. Production of full-length human pre-elafin, an elastase specific inhibitor, from yeast requires the absence of functional yapsin 1 (yaps1p) endoprotease[J]. **Protein Expression and Purification**, 2000, 20(3):485-491.
- [8] ZHANG A. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*[J]. **Molecular Biology Reports**, 2009, 36(6):1611-1619.
- [9] CANNIO R. Gene expression of a thermostable beta-galactosidase in mammalian cells and its application in assays of eukaryotic promoter activity[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1994, 19(2):233-244.
- [10] JIANG Yanling, ZHU Jian, YU Yiping. Studies on the purification and physical-chemical properties of thermostable lactase[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2005, 5(1):43-46. (in Chinese)
- [11] KONING S. Cellobiose uptake in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is mediated by an inducible, high-affinity ABC transporter[J]. **J Bacteriol**, 2001, 183(17):4979-4984.
- [12] FLORES M. Effect of monovalent cations on the stability and activity of *Kluyveromyces fragilis* β -galactosidase [J]. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology**, 1996, 29(5):503-506.
- [13] PARK S. Expression and characterization of an extremely thermostable β -glycosidase (mannosidase) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* DSM3638[J]. **New Biotechnology**, 2011, 28(6):639-648.
- [14] PANESAR P. Potential Applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries [J]. **Enzyme Research**, 2010, 27(1):473-137.
- [15] DUAN Wenjuan, YANG Jiaoyan, LI Zhuofu, et al. Expression of β -galactosidase from *Pyrococcus furiosus* in *E. coli* and analysis of lactase properties[J]. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 2008, 10(2):76-81. (In Chinese)