

# 亮白曲霉乳糖酶基因在毕赤酵母中的高效分泌表达及酶学性质研究

张 伟<sup>1</sup> 范云六<sup>1</sup> 姚 斌<sup>2\*</sup>

( 中国农业科学院<sup>1</sup> 生物技术研究所<sup>2</sup> 饲料研究所 北京 100081 )

**摘 要** :将克隆的亮白曲霉(*Aspergillus candidus*)乳糖酶基因 *lacb'* 插入到毕赤酵母(*Pichia pastoris*)高效表达载体 pPIC9 中,与分泌信号肽序列  $\alpha$ -因子融合,通过同源重组将 *lacb'* 整合到酵母染色体上。通过 SDS-PAGE 检测和表达产物的酶活性筛选,得到重组转化子,证明乳糖酶获得有效分泌和高效表达。表达的乳糖酶为糖蛋白,表观分子量为 130kD,脱糖基后的蛋白分子量下降为 110kD。经过 5L 小罐高密度发酵,重组酵母中酶蛋白表达量为 6mg/mL 发酵液,每毫升发酵液中乳糖酶的活力为 3600U,高于目前国内外报道的水平。进一步研究了表达产物的酶学性质,该酶最适 pH 为 5.2,最适反应温度 60℃,比活性为 706.5 ± 2.6U/mg,  $K_m$  为 1.7mmol/L,  $V_{max}$  为 3.3 $\mu$ mol/min。与米曲霉 ATCC 20423 的乳糖酶相比,该乳糖酶具热稳定性强、比活性高、pH 范围宽等特点。

**关键词** :乳糖酶,毕赤酵母,高效表达,酶学性质

中图分类号 :Q786,Q55 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)02-0247-06

乳糖酶( $\beta$ -D-半乳糖苷酶, $\beta$ -D-galactoside galatohydrolase, EC 3.2.1.23)可将牛乳和乳制品中的主要糖成分——乳糖水解为半乳糖和葡萄糖,主要应用于生产营养成分更利于人体消化吸收的低乳糖乳制品,治疗因人体内缺乏乳糖酶而引起的饮用牛奶后的乳糖吸收障碍和乳糖不耐受症,还可改良乳制品的品质和风味。

乳糖酶广泛存在于动植物、微生物中,目前商品化的乳糖酶多来源于曲霉和乳酸酵母属。乳糖酶工业化生产的研究已开展几十年,主要集中在提高乳糖酶单位产量和解决胞内酶提取困难的问题上。起初通过筛选、诱变天然菌株来提高单位产量或优化酶学性质,但终因产量过低无法应用于工业化生产<sup>[1,2]</sup>。继而在通过基因工程技术并利用酿酒酵母和丝状真菌表达系统来表达曲霉和酵母来源的乳糖酶基因方面取得了一定的进展,但表达量依然有限<sup>[3,4]</sup>。目前报道的用基因工程米曲霉分泌表达自身来源的乳糖酶基因的最高表达量也仅为 1mg/mL 发酵液,酶活力为 500U/mL 发酵液<sup>[5]</sup>。长期以来,胞内乳糖酶提取困难、生产成本高一直是制约乳糖酶生产发展的另一因素。虽然多有研究通过引入外源信号肽、改变细胞状态、改进提取工艺等方法来提高胞内乳糖酶的提取率或简化分离纯化工艺<sup>[6~11]</sup>,但均收效甚微。即便丝状真菌表达系统可分泌乳糖酶

到胞外,但也存在着菌体生长繁殖周期长、表达稳定性差、分离纯化困难等局限性。

因此,寻求更加有效的表达系统高效分泌表达乳糖酶是提高产量、简化纯化工艺、降低成本的直接途径。本实验室从亮白曲霉中克隆了乳糖酶基因<sup>[12]</sup>,并试图利用毕赤酵母高效表达系统解决上述问题,为推动乳糖酶生产提供借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒** :亮白曲霉(*Aspergillus candidus*)由本实验室保存;毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统由加拿大 Alberta 大学 D. Luo 博士惠赠;大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 为本实验室保存;重组质粒 pT-*lacb'*(含有去除乳糖酶基因信号肽序列的 cDNA 片段)由本实验室构建保存。

**1.1.2 试剂和仪器** :5L 发酵罐,德国 Barun 公司;限制性内切酶、连接酶、脱糖基化酶等购自 Promega 及 NEB 公司;Taq Plus DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司;邻硝基苯酚- $\beta$ -D 半乳糖苷(*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, ONPG)购自 Pierce 公司;其余试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 培养基** :异源表达的宿主甲醇毕赤酵母的培养采用 YPD 培养基(每升含 10g 酵母粉,20g 蛋白

基金项目 :国家 863 计划(2003AA214030)

\* 通讯作者。Tel 86-10-68975126;Fax 86-10-68975127;E-mail :yaobin@public3.bta.net.cn

作者简介 :张 伟(1973-),女,河北石家庄人,助理研究员,博士,从事微生物与分子生物学研究。E-mail :zhangwei7312@hotmail.com

收稿日期 :2004-10-15,修回日期 :2004-12-13

胨 20g 葡萄糖)。用于异源诱导表达及筛选的培养基为 RDB 培养基(每升含 186g 山梨醇, 10g 葡萄糖, 13.4g YNB  $4 \times 10^{-4}$ g 生物素, 0.05g 谷氨酸, 0.05g 甲硫氨酸, 0.05g 赖氨酸, 0.05g 亮氨酸, 0.05g 异亮氨酸, 15g 琼脂) MM 培养基(每升含 13.4g YNB  $4 \times 10^{-4}$ g 生物素, 0.5% 甲醇, 15g 琼脂) MD 培养基(每升含 13.4g YNB  $4 \times 10^{-4}$ g 生物素, 10g 葡萄糖, 15g 琼脂) BMGY 培养基(每升含 10g 酵母粉, 20g 蛋白胨, 100mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH6.0), 13.4g YNB  $4 \times 10^{-4}$ g 生物素, 10g 甘油)和 BMMY 培养基(除以 0.5% 甲醇代替甘油, 其余成份均与 BMGY 相同)。高密度发酵培养基: 每升含 10 × Basal Salts, 26.7mL 磷酸, 0.93g 硫酸钙, 18.2g 硫酸钾, 14.9g 硫酸镁, 4.13g 氢氧化钾, 40g 甘油或葡萄糖。

## 1.2 乳糖酶基因的高效表达

**1.2.1 构建酵母重组表达载体:** 用 *Sna* B I、*Not* I 分别对重组质粒 pT-*lacb'*、毕赤酵母表达载体 pPIC9 进行双酶切, 将已去除自身信号肽的乳糖酶 cDNA 片段连于毕赤酵母表达载体 pPIC9 上, 构建重组表达质粒 pPIC9-*lacb'*。

**1.2.2 乳糖酶基因在毕赤酵母中的转化:** 挑取毕赤酵母受体菌 GS115(*His*<sup>-</sup>, *Mut*<sup>+</sup>)的单菌落接种于 10mL YPD 培养基中, 30℃ 摇床培养过夜, 并制备酵母感受态细胞。用 *Bgl* II 酶切重组表达质粒 pPIC9-*lacb'* 使质粒线性化, 取 80 $\mu$ L 感受态细胞与线性化质粒 (1 ~ 5 $\mu$ g) 混合后转移到冰预冷的 0.2cm 电击杯中, 电击转化酵母感受态细胞 (2.5kV, 5ms), 立即向电击杯中加入 1mL 冰冷的 1mol/L 山梨醇, 混匀后, 以每板 200 $\mu$ L 菌液涂布到 RDB 平板上, 30℃ 培养至长出转化子。将 RDB 平板上生长的 *His*<sup>+</sup> 转化菌落按先后顺序分别点种于酵母选择培养基 MM 和 MD 平板的相应位置上。

**1.2.3 重组酵母的培养、初筛及活性测定:** 挑取在 MM 平板上生长缓慢而在 MD 平板上生长良好的转化子接种于 5mL BMGY 培养基中, 于 30℃ 摇床培养 48h, 5000r/min 离心, 弃去上清, 用 1mL BMMY 甲醇诱导培养基重悬, 继续在 30℃ 诱导培养 48h 后取上清检测各菌株的乳糖酶活性, 从中筛选出表达乳糖酶的阳性转化子。

将表达上清用 0.1mol/L pH5.2 醋酸缓冲液稀释, 取 400 $\mu$ L 稀释液加入 1.6mL 0.25% (W/V) ONPG (0.1mol/L pH5.2 醋酸缓冲液配制), 60℃ 水浴保温 15min, 加入 2mL 1mol/L 碳酸钠显色液,  $OD_{420}$  测定乳糖酶活性, 同时以 0.1mol/L pH5.2 醋酸缓冲液代替

上清稀释液作为对照<sup>[13]</sup>。

1 个单位的乳糖酶的活性定义为: 在 pH5.2、60℃ 下每分钟分解邻硝基苯酚- $\beta$ -D 半乳糖苷 (ONPG) 生成 1 $\mu$ mol 邻硝基酚 (ONP) 所需的酶量。

**1.2.4 表达产物的脱糖基化:** 将纯化的乳糖酶进行脱糖基化处理, 建立如下反应体系: 9 $\mu$ L 乳糖酶, 1 $\mu$ L  $10 \times$  Glycoprotein 变性缓冲液, 100℃ 反应 10min 后加 1.2 $\mu$ L  $10 \times$  G5 缓冲液, 1 $\mu$ L Endo H 37℃ 反应 1h。

**1.2.5 高表达菌株的筛选及高密度发酵:** 通过摇床水平的筛选获得乳糖酶活性最高的转化子在 5L 发酵罐内进行高密度发酵, 研究乳糖酶的表达。首先挑取该转化子的单菌落接种于 30mL YPD 液体培养基中, 30℃ 摇床培养过夜, 再以 10% 的接种量转接于 300mL YPD 培养基中, 30℃ 摇床培养 24h, 然后以 10% 的接种量接种于 5L 发酵培养基中进行发酵。在诱导过程中每隔 12h 取样一次测定表达的乳糖酶的活性, 并同时进行了 SDS-PAGE 监测表达量的累积。SDS-PAGE 参考文献 [14] 以定量的标准蛋白为参照, 用 Imagemaster 1.0 (Pharmacia) 软件分析测定发酵液中乳糖酶蛋白的表达量。

## 1.3 乳糖酶酶学性质的比较

**1.3.1 比活性的测定:** 通过考马斯亮蓝法测定样品酶液中的蛋白含量, 同时测得乳糖酶活力, 由此得到乳糖酶的比活性。

**1.3.2 最适 pH 和 pH 稳定性的测定:** 分别配制 pH2.0 ~ 10.0 的不同 pH 的缓冲液 (pH2.0 ~ 3.6 和 pH5.8 ~ 8.0 的 0.1mol/L 柠檬酸-0.2mol/L 磷酸二氢钠系列缓冲液; pH3.6 ~ 5.8 的 0.1mol/L 醋酸系列缓冲液; pH9.0 ~ 10.0 的 0.05mol/L 甘氨酸-氢氧化钠系列缓冲液) 将底物 ONPG 溶于不同 pH 的系列缓冲液中 (0.25%, W/V), 并将乳糖酶用相应的不同 pH 的缓冲液稀释, 分别在 60℃ 和 37℃ 条件下, 测定不同 pH 下的乳糖酶活性, 并绘制最适 pH 曲线。

将乳糖酶置于不同 pH 缓冲液中, 37℃ 保温 1h, 然后将其 pH 调回至 5.2, 60℃ 下测定乳糖酶相对活力, 同时以未保温的相应 pH 的稀释酶液为对照绘制 pH 稳定性曲线。

**1.3.3 最适反应温度和热稳定性的测定:** 分别测定经 0.1mol/L pH5.2 的醋酸缓冲液稀释的乳糖酶在不同的温度下的酶活力, 绘制最适反应温度曲线。

测定乳糖酶在 60℃、70℃ 温度下分别保温 2min、5min、10min、15min、20min、30min 时的酶相对活力, 绘制酶的热稳定性曲线。

**1.3.4 金属离子和相关化学试剂对乳糖酶活性的**

影响:在酶促反应中加入不同的金属离子和相关化学试剂(终浓度为 1mmol/L),研究其对乳糖酶活性的影响,以未加金属离子和化学试剂的稀释酶液为对照。

**1.3.5  $K_m$  和  $V_{max}$  的测定:**用不同浓度的 ONPG 底物在 0.1mol/L pH5.2 缓冲体系中 60℃ 下测定酶活性。按双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)计算出  $K_m$  和  $V_{max}$  值。

## 2 结果

### 2.1 乳糖酶的高效表达

**2.1.1 毕赤酵母表达载体的构建及鉴定:**去除自身信号肽的 *lacb'* 基因通过 *Sna*B I、*Not*I 位点定向插入到酵母表达载体 pPIC9 上,与其中的  $\alpha$ -因子信号肽 3' 端融合,得到重组表达质粒 pPIC9-*lacb'* (图 1)。

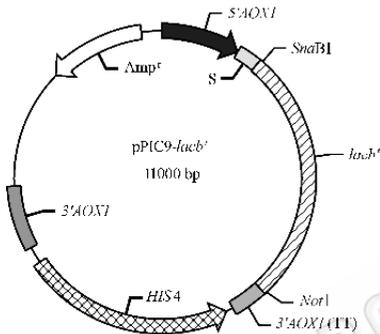


图 1 重组表达质粒 pPIC9-*lacb'* 的物理图谱

Fig.1 Physical map of recombinant expression plasmid pPIC9-*lacb'*

**2.1.2 具乳糖酶活性的重组转化子的筛选:**将重组表达质粒 pPIC9-*lacb'* 转化毕赤酵母 GS115,经组氨酸缺陷平板初步筛选得到的转化子经甲醇诱导 48h 后,测定发酵液上清中的乳糖酶活性,通过酶活力测定,从 90 个转化子中挑选出 23 株有乳糖酶活性的阳性转化子。SDS-PAGE 显示,毕赤酵母表达的乳糖

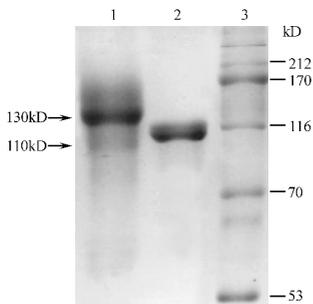


图 2 毕赤酵母表达乳糖酶 LACB 脱糖基化 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE analysis of LACB deglycosylated by Eendo H

1. Purified LACB; 2. LACB deglycosylated by Eendo H; 3. Middle molecular weight standards.

酶蛋白的表观分子量为 130kD,经纯化后进行脱糖基化处理,酶蛋白分子量降低到 110kD(图 2),与理论分子量一致,说明表达的乳糖酶经过了糖基化修饰。

**2.1.3 乳糖酶重组表达菌株的高密度发酵:**选择经摇床水平两次筛选获得的酶活力最高的 85# 转化子在 5L 发酵罐上进行高密度发酵研究乳糖酶的表达。在 5L 发酵罐中,在甲醇未诱导之前,处于菌株培养和碳源饲喂阶段,在这两个阶段内,菌体大量增长,菌体湿重可达 200mg/mL 发酵液,在发酵液上清中检测不到乳糖酶活性,SDS-PAGE 也表明此时无乳糖酶蛋白的表达(图 3)。随着甲醇的诱导,发酵液中的乳糖酶活性逐渐增加,诱导 120h 后发酵液中乳糖酶活性为 3600U/mL(图略);SDS-PAGE 同时表明发酵液中乳糖酶蛋白表达量也在不断积累,经 Imagemaster1.0(Pharmacia)软件扫描分析诱导 120h 后乳糖酶的表达量为 6mg/mL 发酵液(图 3)。

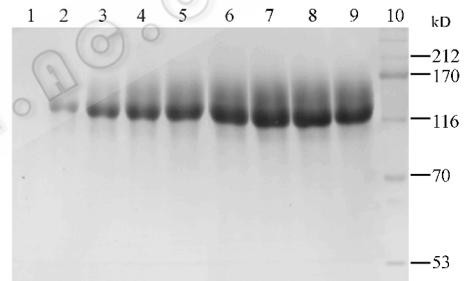


图 3 5L 发酵罐中乳糖酶 LACB 经甲醇诱导不同时间内的表达量

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expressed LACB in the 5L fermenter with different induction time

1. Noninduced by methanol in fermenter; 10. Middle molecular weight standards; 2~9. Induced for 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 96h, 108h, 120h by methanol in fermenter.

### 2.2 乳糖酶酶学性质的比较

LACB 与绝大多数的乳糖酶同源性较低,但与 *A. oryzae* ATCC 20423 的乳糖酶(LACO)同源性很高,仅有 3 个氨基酸的差异<sup>[12]</sup>。故在本研究中同时用毕赤酵母表达的 LACB 和 LACO 重组菌株由本实验室构建,经纯化后进行了酶学性质的比较研究。

**2.2.1 比活性的比较:**通过考马斯亮蓝法测定酶液中的蛋白含量,再通过乳糖酶活性测定方法测得乳糖酶的活性,最后获得两个酶的比活性,LACB 为  $706.5 \pm 2.6$  (U/mg); LACO 为  $532.6 \pm 1.8$  (U/mg),由此可知,LACB 的比活性比 LACO 高 32.7%。

**2.2.2 最适 pH 和 pH 稳定性的比较:**LACB 和 LACO 在 37℃、60℃ 下测定的最适 pH 均为 pH5.2(图

4)。值得注意的是,LACB的整个pH曲线的范围比LACO的要宽些。从图中可看出,在pH3.6~5.0之间,无论在37℃还是在60℃,在同一pH条件下LACB的相对活力均高于LACO;特别是60℃条件下,LACB的相对活力要明显高于LACO。而在60℃、pH7.0时,LACB的相对活力为28.0%,LACO的相对活力只有4.7%,因天然牛奶的pH在7.0左右,因此LACB更适于生产低乳糖乳制品。LACB和LACO的pH稳定性曲线显示(图略),二者均在pH4.0~9.0之间保持90.0%以上的酶相对活力,而在pH3.0~4.0之间,LACB的相对活力明显高于LACO。

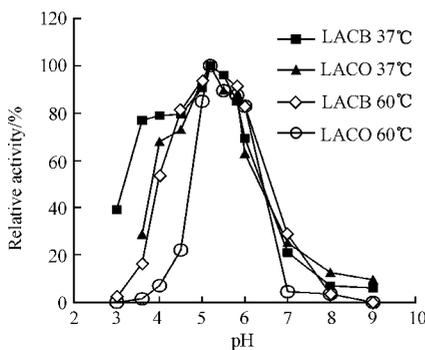


图4 最适pH的比较

Fig.4 Comparison of optimal pH of the LACB and LACO

2.2.3 最适反应温度和热稳定性的比较:LACB的最适反应温度为60℃,LACO的最适反应温度为55℃。二者在热稳定上存在着巨大的差异(图5)。LACB在60℃条件下保温30min,酶相对活力为60.2%而LACO在60℃条件下保温20min,酶相对活力仅为2.5%。LACB在70℃条件下保温5min,酶相对活力为18.0%,LACO在70℃条件下保温2min,酶相对活力只有10.2%。由此可见,LACB的热稳定性明显高于LACO。

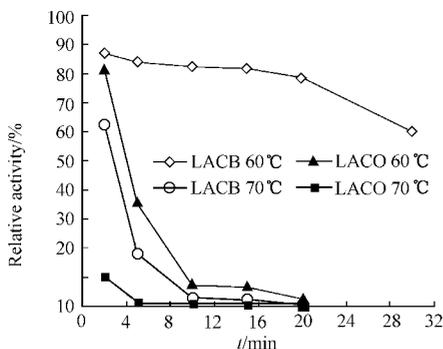


图5 热稳定性的比较

Fig.5 Comparison of thermal stability of the LACB and LACO

2.2.4 对金属离子和相关化学试剂稳定性的比较:在酶促反应中加入不同的金属离子和化学试剂(终浓度1mmol/L),研究其对LACB和LACO酶活性的影响(表1)。

表1 金属离子及化学试剂对乳糖酶活性的影响

Metal ion and some reagents (1mmol/L)	Relative activity of the LACO/%	Relative activity of the LACB/%
Cu <sup>2+</sup>	12.4	69.5
Pb <sup>2+</sup>	123.4	136.7
Mg <sup>2+</sup>	96.4	102.1
Fe <sup>2+</sup>	19.5	54.8
K <sup>+</sup>	98.3	99.3
Ca <sup>2+</sup>	98.1	101.4
Zn <sup>2+</sup>	66.2	97.5
Mn <sup>2+</sup>	79.4	80.1
EDTA	103.0	102.3
SDS	47.4	98.6

由表1可知,Pb<sup>2+</sup>对二者的酶活有轻微促进作用。Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>明显抑制二者的活性,但抑制程度不同。Mn<sup>2+</sup>对二者的抑制程度基本相当。LACB受Cu<sup>2+</sup>较轻微的抑制,酶相对活性为69.5%;LACO受Cu<sup>2+</sup>的抑制更明显,酶相对活性只有12.4%。LACB在Fe<sup>2+</sup>抑制下的相对活性为54.8%而LACO的相对活性仅为19.5%。此外,LACO还受到Zn<sup>2+</sup>、SDS的显著抑制。Ca<sup>2+</sup>对两个酶的活性均无显著影响,但在同一条件下,LACB对Ca<sup>2+</sup>的稳定性更强。由此可见,LACB对于金属离子和化学试剂的稳定性高于LACO。

2.2.5 乳糖酶K<sub>m</sub>和V<sub>max</sub>的比较:采用双倒数作图法绘制LACB和LACO水解ONPG的动力学曲线,求出K<sub>m</sub>和V<sub>max</sub>。结果表明,LACO的K<sub>m</sub>和V<sub>max</sub>分别为3.7mmol/L和3.3μmol/min,LACB的K<sub>m</sub>和V<sub>max</sub>分别为1.7mmol/L和3.3μmol/min。两个乳糖酶的最大反应速度相同,而LACB的K<sub>m</sub>较LACO的低1倍以上,说明LACB对底物ONPG的亲合力远大于LACO,具有更高的酶解效率。

通过酶学性质的比较发现,LACB在热稳定性、比活性、金属离子的稳定性、K<sub>m</sub>及最适pH曲线范围方面均优于与其氨基酸同源性最高的已用于商业化生产的LACO。

### 3 讨论

毕赤酵母表达的乳糖酶经脱糖基化处理后其分子量发生了变化,说明表达的酶蛋白为糖蛋白。分析

其氨基酸序列发现存在 11 个潜在的糖基化位点<sup>[12]</sup> 因而造成了表观分子量与理论分子量的差异。我们通过酶活力测定发现,脱糖基化并没有使该酶的酶活力发生改变(数据未显示),由此推测糖基化对乳糖酶的生物活性可能不是必需的,是否对乳糖酶的酶学性质有所影响还需进一步实验。

在 5L 小罐中进行高密度发酵,重组酵母经甲醇诱导 120h 后的乳糖酶的表达量经 Imagemaster1.0 (Pharmacia) 软件扫描分析为 6mg/mL 发酵液。乳糖酶比活性是将发酵液上清中酶蛋白进行纯化后测定获得的,为  $706.5 \pm 2.6$  (U/mg)。通过比活性与表达量计算得到的乳糖酶理论酶活力应为 4200U/mL 发酵液,而实际测得的发酵液上清中的酶活力为 3600U/mL 发酵液,二者存在的差距可能是由于发酵液中存在大量的金属离子、色素和其他代谢产物从而降低了乳糖酶的活力而造成的。

本研究利用毕赤酵母表达系统实现了乳糖酶胞外高效分泌表达。表达量为 6mg/mL 发酵液,酶活力为 3600U/mL 发酵液,是文献报道的曲霉表达系统的表达量的 6 倍,酶活性的 7 倍。利用该系统还可高效、稳定地分泌表达乳糖酶蛋白,且发酵液中杂蛋白含量很少,乳糖酶占发酵液中总分泌蛋白的 90.0% 以上,从而大大简化了酶的分离纯化工艺。

同源性比较发现,LACB 与绝大多数的乳糖酶同源性较低,但与 LACO 同源性很高,仅有 3 个氨基酸的差异<sup>[12]</sup>,但经酶学性质比较表明,LACB 在热稳定性、比活性、金属离子的稳定性、 $K_m$  及最适 pH 曲线范围方面均优于 LACO。大量的研究结果表明蛋白中几个乃至一个氨基酸的改变就可能造成酶学性质的改变<sup>[15~18]</sup>。LACO 和 LACB 可作为有用的材料进一步研究乳糖酶结构和功能的关系。

以往低乳糖乳制品的生产多数使用最适 pH 最接近牛奶的酵母来源的乳糖酶,曲霉来源的乳糖酶因其最适 pH 较低大多被用于处理酸奶和酸乳清,这就忽视了其特有的优越性。乳糖水解实验表明,LACB 不仅在其最适温度(50℃、60℃)下可有效地水解牛奶中的乳糖,还可在常温(37℃)和低温条件(6℃)下有效地水解牛奶中的乳糖,水解率达 80.0% 以上(有关乳糖酶 LACB 水解乳糖的应用结果将另文发表)。因此,可在牛奶生产过程中的低温储藏、高温消毒等多个环节使用该乳糖酶。此外,与酵母来源的乳糖酶<sup>[19]</sup>相比,LACB 同样具有 pH、热稳定性范围广的特点。在工业生产中比酵母来源的乳糖酶更具有商业竞争力,不仅可用于生产低乳糖

糖乳制品,还可作为药物使用,有望成为多用途的酶制剂。

## 参 考 文 献

- [1] Pastore G M. Screening of high  $\beta$ -galactosidase-producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain. *Journal of Food Science*, 1979, **44**: 1577 - 1579.
- [2] Rasouli I, Kulkarni P R. Enhancement of  $\beta$ -galactosidase productivity of *Aspergillus niger* NCIM - 616. *Journal of Applied Bacteriology*, 1994, **77**: 359 - 361.
- [3] Becerra M, Diaz Prado S, Gonzalez Siso M I, et al. New seretary strategies for *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *Protein Engineering*, 2001, **14**(5): 379 - 386.
- [4] Becerra M, Rodriguez-Belmonte E, Esperanza Cerdan M, et al. Engineered autolytic yeast strains secreting *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media. *J Biotechnol*, 2004, **109**(1-2): 131 - 137.
- [5] Berka, Randy M, Hucul, et al. Increased production of beta-galactosidase in *Aspergillus oryzae*. US patent, 5736374, 1998, 4, 7.
- [6] Ganeva V, Galutzav B, Eynard N, et al. Electroinduced extration of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**: 411 - 413.
- [7] Domingues L, Onnela M L, Teixeira J A, et al. Construction of a flocculent brewer's yeast strain secreting *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**: 97 - 103.
- [8] Becerra M, Cerdan E, Gonzalez Siso M I, Heterologous *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase production and released by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic-remedial thermosensitive autolytic mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, **1335**: 235 - 241.
- [9] Martins D B, de Souza Jr C G, Simoes D A, et al. The beta-galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. *Curr Microbiol*, 2002, **44**(5): 379 - 382.
- [10] Rubio T M, Castrillo J I, Adam A C, et al. Highly efficient assimilation of lactose by a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1998, **14**: 827 - 837.
- [11] Ladero M, Perez M T, Santos A, et al. Hydrolysis of lactose by free and immobilized beta-galactosidase from *Thermus* sp. strain T2. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **81**(2): 241 - 252.
- [12] 张伟,姚斌,王磊,等.来源于 *Aspergillus candidus* 的乳糖酶基因的克隆及序列分析. *生物工程学报*, 2002, **18**(5): 566 - 571.
- [13] Park Y K, De Santi M S S, Pastore G M. Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, 1979, **44**: 100 - 103.
- [14] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] Turunen O, Janis J, Fenel F, et al. Engineering the thermotolerance and pH optimum of family 11 xylanases by site-directed mutagenesis. *Methods Enzymol*, 2004, **388**: 156 - 167.

- [ 16 ] Qin J, Peng Z, McLeod M V. *In vitro* mutagenesis to define functional domains. *Methods Mol Biol*, 2004, **241** :189 - 194.
- [ 17 ] Ma X, Ke T, Li Y, *et al.* *In vitro* mutagenesis of *Xanthomonas campestris* alpha-amylase gene by partially replacing deoxythymidine triphosphate with 5-bromo-2'-deoxyuridine-5'- triphosphate using a PCR technique. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**( 2 ):171 - 175.
- [ 18 ] 朱国萍,滕脉坤,伍传金,等. G138P 定点突变对葡萄糖异构酶热稳定性的改善. *生物化学与生物物理学报*, 1998, **30** ( 6 ):607 - 610.
- [ 19 ] 谭树华, Hadeel A malek A Majid, 高向东, 等. 脆壁克鲁维酵母乳糖酶提取物性质研究. *药物生物技术*, 2000, **7**( 3 ):153 - 156.

## Overexpression of *Aspergillus candidus* lactase and analysis of enzymatic properties

ZHANG Wei<sup>1</sup> FAN Yun-liu<sup>1</sup> YAO Bin<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Biotechnology Research Institute, <sup>2</sup> Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract** : The lactase gene *lacb* ' from *Aspergillus candidus* was fused behind  $\alpha$ -factor signal sequence in the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9, then integrated into the genome of *P. pastoris* by recombination events. The *P. pastoris* recombinants for lactase overexpression were screened by enzyme activity analysis and SDS-PAGE. The lactase expressed in *P. pastoris* was glycosylated protein with an apparent molecular weight of 130kD, while the deglycosylated lactase treated with Endo H had an apparent molecular weight of about 110kD. The expression level of secreted lactase protein in recombinant *P. pastoris* was 6mg/mL with enzymatic activity of 3600U/mL in the 5L fermenter, which was the highest among that of all kinds of recombinant strains reported now. The optimal pH and optimal temperature of the lactase are 5.2 and 60°C. The  $V_{max}$ ,  $K_m$  and specific activity of the lactase are 3.3 $\mu$ mol/min, 1.7mmol/L and 706.5  $\pm$  2.6U/mg, respectively. Compare to the lactase from *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, the expressed lactase from *A. candidus* have better enzymatic properties including the high thermostability, high specific activity and wide pH range for enzyme reaction.

**Key words** : Lactase, Overexpression, *Pichia pastoris*, Enzymatic properties

Foundation item :Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 2003AA214030 )

\* Corresponding author. Tel 86-10-68975126 ; Fax 86-10-68975127 ;E-mail :yaobin@public3.bta.net.cn

Received date :10-15-2004

### 《微生物学报》加入“万方数据”等数字化期刊群的声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在投稿时声明,否则本刊将视为同意收录。

另外,从2002年开始,凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。有不同意见者,请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

读者可上网查询浏览本刊内容,刊物网址: <http://wswxb.periodicals.com.cn>

《微生物学报》编辑部