

重组毕赤酵母表达棘孢木霉几丁质酶 Tachi1 的酶学性质研究及表达条件优化

汤伟, 李雅华, 刘露, 张军霞, 咸洪泉*

青岛农业大学生命科学院, 农业应用微生物实验室, 青岛 266109

摘要:【目的】对转棘孢木霉几丁质酶基因 *tachi1* 的毕赤酵母工程菌 *GS-tachi1-K* 进行诱导表达, 研究重组几丁质酶 Tachi1 的酶学性质, 优化表达条件。【方法】对 *GS-tachi1-K* 进行甲醇诱导培养, 纯化目的蛋白 Tachi1 进行几丁质酶酶学性质的研究; 通过单因素和正交试验对 *GS-tachi1-K* 菌株产几丁质酶 Tachi1 表达条件进行优化。【结果】*GS-tachi1-K* 表达的几丁质酶 Tachi1 表观分子量约为 44 kDa, 酶反应最适的温度和 pH 分别为 50°C 和 5.5, 具有较宽的温度、pH 适用范围; 50°C 以下保持较高的酶活力, 在碱性条件下稳定性较差; 受 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和高浓度的 SDS 及 β -巯基乙醇强烈抑制。该菌株的最佳表达条件为: pH 为 6.5, 甲醇诱导浓度为 0.5%, 起始细胞浓度为 $OD_{600} = 2$, 甲醇诱导时间为 180 h; 几丁质酶 Tachi1 活力可达 17.93 U/mL, 蛋白表达量为 6.19 g/L。【结论】成功实现了棘孢木霉新几丁质酶基因 *tachi1* 的毕赤酵母高效分泌表达, 工程菌 *GS-tachi1-K* 具有高表达量和表达产物酶活性高两个特点, 明确了几丁质酶 Tachi1 的酶学性质和最佳诱导表达条件, 为该几丁质酶及其基因的深入研究和开发利用奠定了基础。

关键词: 毕赤酵母, 棘孢木霉, 几丁质酶, 酶学性质, 条件优化

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0345-08

几丁质作为真菌、甲壳类动物、昆虫、藻类等的重要结构物质, 昆虫肠围食膜的重要成分, 广泛存在于自然界中, 为仅次于纤维素的第二大多糖^[1]。几丁质来源丰富, 具有多种生物学功能, 但由于它们分子量大、结构紧密、不溶于水和普通溶剂, 故其应用受到很大限制, 所以生产上需要将几丁质降解为水溶性好的几丁寡糖等甲壳低聚糖。甲壳低聚糖不但因水溶性好而易被分散和吸收, 而且具有抗菌、抗肿瘤、提高植物防御能力等多种生理功能^[2]。

几丁质酶是一种以几丁质为底物的水解酶。丝

状真菌产生的几丁质酶可参与真菌细胞壁溶解、孢子萌发、菌丝生长、菌丝自溶、孢子形成、几丁质同化及真菌寄生等诸多过程^[3], 在植物病虫害生物防治中发挥着重要作用。将几丁质酶与生物农药一起施用, 能显著提高防治植物病虫害的效果^[4]。利用酶法制备几丁寡糖的研究十分活跃, 包括产酶的微生物、酶的特性及酶的分子生物学等多个领域^[5]。目前在几丁质酶的种类、来源、理化性质、作用机理、产物控制及分离等方面都取得了一定的研究成果, 但由于产酶菌株产酶量较低、酶活性低、稳定性差, 所

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2010CM040); 青岛农业大学高层次人才启动基金 (631108)

* 通信作者。Tel: +86-532-86080482; Fax: +86-532-86080640; E-mail: xianli0517@yahoo.com.cn

作者简介: 汤伟 (1986 -), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物研究。E-mail: tianti_121@163.com

收稿日期: 2011-10-31; 修回日期: 2011-12-20

以难以规模化生产和广泛利用。因此获得产酶量高的菌株,寻找合适的发酵工艺,提高酶的稳定性是充分发挥几丁质酶功能和几丁质酶开发利用的关键。

棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)是我国新记录的木霉种^[6],国内对该菌种的开发利用尚处于起步阶段,尚未见到该菌在几丁质酶基因的克隆与表达产物研究方面的相关报道。本课题组前期通过基因工程手段,在国内首次从*T. asperellum*中克隆出几丁质酶新基因*tachi1*(GenBank accession: GU457411),并转化到*Pichia pastoris*中,获得了高效分泌表达的重组几丁质酶Tachi1。本研究对几丁质酶Tachi1的酶学性质及表达条件进行了初步的研究,旨在为该酶在生物防治和工业上的利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:高效分泌表达几丁质酶Tachi1的毕赤酵母工程菌GS-*tachi1*-K由本课题组构建、筛选并保存(方法参见1.3)。

1.1.2 主要试剂和仪器:引物chit1和chit2由上海生工生物技术有限公司合成;*EcoR*I、*Not*I、*Stu*I和pMD18-T Vector等购自TaKaRa公司;几丁质(Chitin)购自上海生工生物工程有限公司;胰蛋白胨(Tryptone)购自北京双旋微生物培养基制品厂;酵母抽提物(Yeast Extract)购自英国OXOID公司;D-葡萄糖(D-Glucose)、生物素(D-Biotin)购自美国Sanland公司;无氨基酵母氮源(YNB)购自美国BD公司;N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)购自Sigma公司;牛血清白蛋白(Albumin bovine)购自国药集团化学试剂有限公司。YPD、BMGY和BMMY培养基见Invitrogen公司毕赤酵母操作手册。恒温恒湿培养箱(HWS-250型),上海森信实验仪器有限公司;双层全温摇床,上海福玛实验设备有限公司;752型紫外可见分光光度计,上海舜宇衡平科学仪器有限公司;电热恒温水浴锅,北京市长风仪器仪表公司;夹心式垂直电泳槽,北京六一仪器厂。

1.2 胶体几丁质的制备

称取10 g几丁质粉溶于100 mL预冷的浓盐酸中搅拌,待几丁质完全溶解后,加入5倍体积冰预冷的50%乙醇,静置过夜,用蒸馏水冲洗至中性,用

0.05 mol/L、pH5.0的醋酸钠缓冲液定容至400 mL备用。

1.3 毕赤酵母工程菌的构建与筛选

根据*T. asperellum*几丁质酶基因*tachi1*的cDNA序列设计一对表达引物chit1:5'-CCGAATTCCTCCTGTGTCTACAAACGACG-3'和chit2:5'-GGGCGGCCGCTTAGTTGAGACCGTTTCGGAT-3',在引物的5'端分别引入*EcoR*I和*Not*I酶切位点,以cDNA为模板扩增几丁质酶成熟蛋白编码序列。PCR产物与pMD18-T Vector连接,获得重组质粒pMD18T/*tachi1*。将重组质粒用*EcoR*I、*Not*I进行双酶切,与同样双酶切的酵母表达载体pPIC9K进行连接,获得重组质粒pPIC9K/*tachi1*,其DNA用*Stu*I线性化并转化毕赤酵母GS115。酵母感受态制作、电击转化、重组毕赤酵母的筛选鉴定和诱导表达参见Invitrogen公司的Pichia expression kit instruction manual进行。

1.4 酵母工程菌的培养和几丁质酶的诱导分泌表达

将GS-*tachi1*-K在YPD平板上划线进行纯化,挑取单菌落接种于BMGY培养基中,28-30℃振荡培养(250-300 r/min)至对数生长期($OD_{600} = 2-6$,约16-18 h)。室温下以5000 × g离心5 min回收酵母细胞,弃上清,将细胞重悬于适当体积的BMMY培养基中,至 OD_{600} 值为1.0-2.0,28-30℃继续培养并开始诱导表达。每隔24 h补加100%甲醇至终浓度为0.5%以维持诱导,诱导开始后,每隔24 h取样一次,直至240 h。样品将用于分析蛋白表达水平并确定诱导后的最佳收获时间。

1.5 几丁质酶的分离和纯化

大量诱导发酵至最佳收获期,发酵液室温下以5000 × g离心5 min,上清液加入硫酸铵至饱和度80%,沉淀蛋白,8000 × g离心15 min。沉淀用0.05 mol/L、pH 8.0 Tris-HCl缓冲液回溶后,透析除盐得粗酶液,并进行SDS-PAGE纯度分析。

1.6 几丁质酶Tachi1酶学性质分析

1.6.1 Tachi1最适温度及温度稳定性测定:在不同温度条件下(30-80℃)测定表达几丁质酶Tachi1活力;将表达几丁质酶Tachi1粗酶液在不同温度下保温不同的时间(10 min,20 min,30 min,40 min,50 min,60 min),检测剩余的酶活力。

1.6.2 Tachi1最适pH及pH稳定性测定:在不同pH反应条件下(pH 3-10)测定表达几丁质酶

Tachi1 的活力;将重组 Tachi1 的粗酶液在不同 pH 值的缓冲液中 50℃ 保温 1 h,检测剩余的酶活力。

1.6.3 金属离子对 Tachi1 影响的测定:在几丁质酶与其底物进行反应体系中,加入不同的金属离子,并使金属离子的最终浓度为 0.05 mol/L,以不加金属离子的反应体系的酶活定义为 100%,分别测定加入金属离子后各反应体系中几丁质酶的相对酶活性。

1.6.4 变性剂和蛋白抑制剂对 Tachi1 影响的测定:在酶与底物的反应体系中,分别加入不同的变性剂和蛋白抑制剂,以不加任何变性剂和抑制剂的酶活定义为 100%,测定其相对酶活。

1.7 表达条件的优化

以 BMMY 为诱导产酶培养基,改变发酵时间、培养基初始 pH、甲醇浓度、油酸添加量、装液量和接种量,检测其对毕赤酵母工程菌 *GS-tachi1-K* 产酶能力的影响。在此基础上,采用 4 因素 3 水平的正交试验,以发酵液中重组几丁质酶 Tachi1 酶活作为评价指标,进一步优化表达条件。

1.8 几丁质酶的酶活力检测和蛋白含量测定

采用 DNS 法测定几丁质酶的活性^[7]。反应体系为 1 mL(2.5% w/v) 胶体几丁质,粗酶液 500 μL,37℃ 温浴 1 h。酶活力单位(U)定义为每分钟产生相当于 1 μmol N-乙酰氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量。蛋白含量测定采用 Bradford 法^[8],以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2 结果

2.1 Tachi1 的纯化及 SDS-PAGE 分析

取粗酶液 25 μL 进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果表明,表达产物分子量约为 44 kDa (图 1)。

2.2 几丁质酶 Tachi1 酶学性质分析

2.2.1 表达几丁质酶 Tachi1 的最适温度及温度稳定性:在不同温度下测定重组几丁质酶 Tachi1 的酶活(图 2),该酶最适作用温度为 50℃,温度高达 80℃ 时仍具有活性,在 30 - 70℃ 范围内均能保持较高的酶催化活性,具有较宽的温度适用范围。Tachi1 分别在不同温度下保温,检测剩余的酶活力,结果表明该酶在 35 - 50℃ 均保持较高的活力(> 50%),且在 40℃ 以下几乎没有活性损失,60℃ 处理 10 min 后,仍具有 45.32% 的酶活力(图 3)。

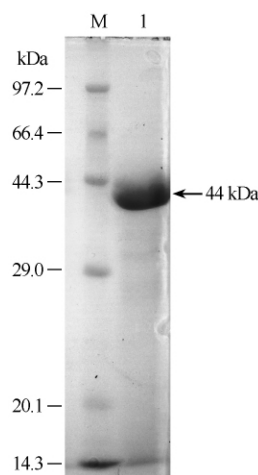


图 1 几丁质酶 Tachi1 的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of recombinant *P. pastoris* with Tachi1. M, marker; 1, Purified chitinase.

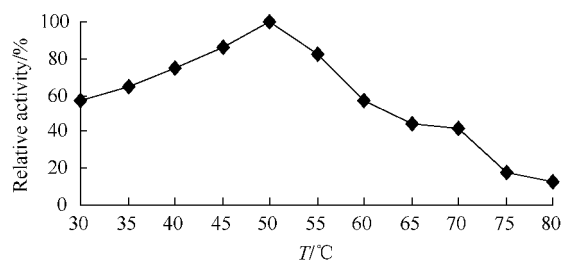


图 2 Tachi1 的最适反应温度

Fig.2 The optimal reaction temperature of Tachi1.

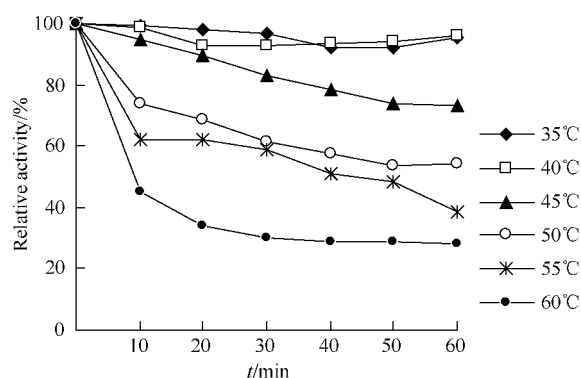


图 3 Tachi1 的热稳定性

Fig.3 The thermostability of Tachi1.

2.2.2 表达几丁质酶 Tachi1 的最适 pH 及 pH 稳定性:在不同 pH 反应条件下分析 Tachi1 的活力,发现 Tachi1 具有较广泛的 pH 适应范围(pH3 - 7.5 范围内均有较高的催化活性, > 50%),其最适反应 pH 为 5.5(图 4)。50℃ 保温 1 h 测定酶的 pH 稳定性,表明 Tachi1 在 pH 5.0 - 5.5 偏酸性环境中较稳定,

pH 大于 7.0 酶活力迅速降低,说明表达的几丁质酶在碱性条件下稳定性较差(图 5)。

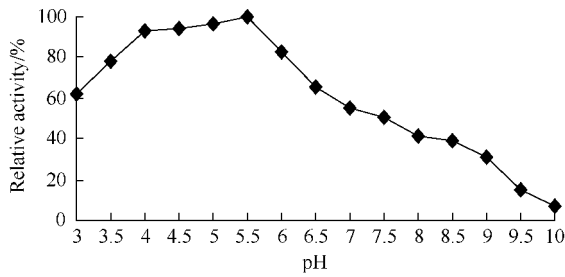


图 4 Tachi1 的最适反应 pH

Fig. 4 The optimal reaction pH of Tachi1.

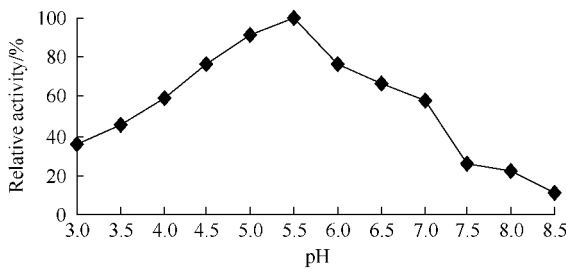


图 5 Tachi1 的 pH 稳定性

Fig. 5 The pH stability of Tachi1.

2.2.3 金属离子对表达几丁质酶 Tachi1 的影响:不同金属离子对几丁质酶 Tachi1 活性的影响不同(表 1),Ag⁺和 Hg²⁺等可完全抑制表达的几丁质酶的活性;Cu²⁺和 Fe²⁺强烈抑制酶活,残余酶活分别为 0.89% 和 2.69%;Mn²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺和 NH₄⁺抑制酶活性,残余酶活介于 20% - 80% 之间;而 Ca²⁺、K⁺、Na⁺、Ba²⁺对酶活性影响不明显。

表 1 各种金属离子对 Tachi1 活性的影响

Table 1 Effect of different metallic ions on Tachi1 activity

Metals	Relative activity/%	Metals	Relative activity/%
H ₂ O	100	Ag ⁺	0
Cu ²⁺	0.89	K ⁺	90.71
Ca ²⁺	97.47	Na ⁺	90.90
Mn ²⁺	24.09	Mg ²⁺	67.11
Fe ²⁺	2.69	NH ₄ ⁺	80.00
Hg ²⁺	0	Ba ²⁺	96.66
Zn ²⁺	58.87		

2.2.4 变性剂和蛋白抑制剂对表达几丁质酶 Tachi1 的影响:在选用的四种试剂中(表 2),EDTA 对 Tachi1 的酶活性影响最小,但尿素和 SDS 对其抑制作用非常明显。0.5 mol/L 的尿素可以使酶活下降 68.35%,这可能是因为尿素破坏了蛋白质分子中的氢键,导致蛋白质分子结构松弛,从而使其变

性;粗酶液经高浓度的 SDS 和 β-巯基乙醇处理后酶活仅残存 19.85% 和 22.81%,这可能是 SDS 破裂蛋白质分子中的氢键和疏水作用,而 β-巯基乙醇拥有较强的还原力,经其处理后几丁质酶的二硫键被还原,破坏了几丁质酶的三级结构及其稳定性,从而酶活性明显降低。

表 2 蛋白变性剂和抑制剂对 Tachi1 活性的影响

Table 2 Effect of protein denaturing agents and inhibitors on Tachi1 activity

Denaturing agent , protease inhibitors	Concentration / (mmol/L, %)	Relative activity / %
H ₂ O	-	100
Urea	500	31.65
Urea	3000	31.98
SDS	0.10%	40.37
SDS	1%	19.85
EDTA	1	94.13
EDTA	10	88.09
β-mercaptoethanol	1	91.19
β-mercaptoethanol	10	22.81

2.3 表达条件的优化

2.3.1 发酵时间:诱导表达开始后,每 24h 取样在最适条件下测发酵液酶活,酶活不再提高时终止诱导表达。发酵时间对表达 Tachi1 的酶活影响较大,随着诱导时间的延长,表达量增加并累积,诱导第 8 天时几丁质酶活力最高,继续诱导表达,酶活力不再增加,因此诱导最佳时间为 8 d(图 6-A)。

2.3.2 pH:配制 pH 3、4、5、6、7、8 的 1mol/L 磷酸钾,分别加入到 BMMY 培养基中,诱导 8d 测 Tachi1 活力。结果表明 pH 影响外源蛋白的表达,适宜 Tachi1 表达的 pH 为 6-8(图 6-B)。

2.3.3 甲醇浓度:不同浓度甲醇诱导对 Tachi1 酶活有显著影响,甲醇含量为 0.5% 最有利于 Tachi1 的表达(图 6-C)。诱导阶段,甲醇既作为唯一的碳源,又作为诱导剂,其浓度对表达的影响很大。甲醇浓度低,则不能维持菌体的代谢和满足菌体表达外源蛋白;而甲醇浓度高,残留的甲醇则被氧化成甲醛,进而产生的甲酸会杀死细胞而影响表达量^[9]。

2.3.4 油酸添加量:在诱导培养基中添加不同浓度的油酸对 Tachi1 的酶活力有显著影响。相对于不添加油酸的各试验组,添加不同浓度的油酸时几丁质酶酶活都明显降低,并且随着浓度的提高,酶活逐渐下降(图 6-D)。

2.3.5 装液量:在 500 mL 摇瓶中分别设置 10%、

15%、20%、25%、30% 的装液量,测定 8 d Tachi1 酶活(图 6-E)。装液量为 10% 时几丁质酶的酶活最高。随着装液量的增加,Tachi1 的酶活不断下降。装液量的多少直接影响溶氧水平,从而影响细胞生长和产物的积累^[10],这说明高浓度溶氧水平有利于几丁质酶 Tachi1 的表达。

2.3.6 起始细胞浓度:不同起始浓度的重组酵母对

几丁质酶 Tachi1 表达有一定影响(图 6-F),随着起始细胞浓度的提高,诱导后酶活性有所上升,当起始细胞浓度达到 $OD_{600} = 1.5 - 2.0$ 时,酶活性较高;但当起始细胞浓度继续升高时,酶活性有所降低,可能是由于细胞浓度过高使得培养基中的营养物质过度消耗,影响了产酶的速率。重组酵母进行诱导的最佳起始细胞浓度在 $OD_{600} = 1.5 - 2.0$ 。

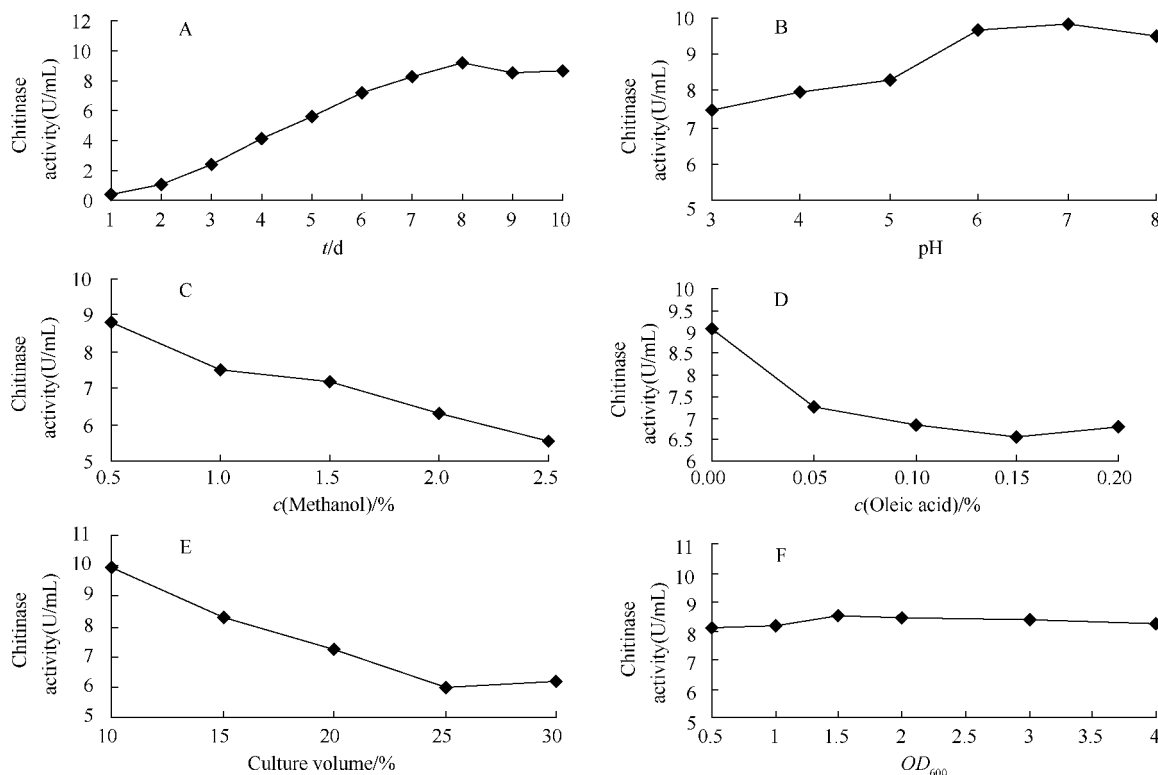


图 6 诱导时间、pH、甲醇、油酸、装液量和起始细胞浓度对重组几丁质酶 Tachi1 的影响

Fig. 6 Effect of induction time, pH, methanol concentration, oleic acid, culture volume and cell densities on the recombinant chitinase Tachi1 activity. A: induction time, B: pH. C: Effect of methanol concentration on chitinase activity. D: Effect of oleic acid concentration on chitinase activity. E: Effect of culture volume on chitinase activity. F: Effect of cell densities on chitinase activity.

2.3.7 正交试验及验证:在以上试验的基础上,进行了 pH、甲醇浓度、起始细胞浓度和诱导时间 4 因素 3 水平的正交试验(表 3)。在所试各因素水平范围内起始细胞浓度对酶活的影响最大。各因素影响依次为:起始细胞浓度 > pH > 甲醇浓度 > 诱导时间,最佳组合为 $A_1B_2C_3D_1$ 。经验证,菌株 *GS-tachi1-K* 采用 $A_1B_3C_3D_3$ 与 $A_1B_2C_3D_1$ 两种诱导表达组合时酶活分别 16.47 U/mL 和 17.93 U/mL,酶活提高了 8.86%;两组试验的蛋白表达量分别为 3.79 g/L 和 6.19 g/L,提高了 63.32%。

表 3 正交试验设计及结果

Table 3 Data of orthogonal test

No.	Factors				
	pH	c(Methanol) %	Cell densities (OD_{600})	Induction time/h	Tachi1 activity / (U/mL)
1	1(6.5)	1(0.25)	1(1.0)	1(180)	8.77
2	1(6.5)	2(0.50)	2(1.5)	2(192)	13.6
3	1(6.5)	3(0.75)	3(2.0)	3(204)	14.65
4	2(7.0)	1(0.25)	2(1.5)	3(204)	10.85
5	2(7.0)	2(0.50)	3(2.0)	1(180)	13.58
6	2(7.0)	3(0.75)	1(1.0)	2(192)	7.79
7	3(7.5)	1(0.25)	3(2.0)	2(192)	13.18
8	3(7.5)	2(0.50)	1(1.0)	3(204)	9.99
9	3(7.5)	3(0.75)	2(1.5)	1(180)	13.65
k_1	12.340	10.933	8.850	12.000	
k_2	10.740	12.390	12.700	11.523	
k_3	12.273	12.030	13.803	11.830	
R	1.600	1.457	4.953	0.477	

3 讨论

毕赤酵母 (*P. pastoris*) 为甲醇营养型酵母^[11], 既有原核生物繁殖快、易于培养、培养基廉价和试验过程简单可行等特点, 又具有强有力的启动子、可以对外源蛋白进行加工折叠和翻译后修饰等特点。目前毕赤酵母表达系统作为一个较为理想的蛋白表达系统, 已有 500 多种外源蛋白在该表达系统中获得表达^[12], 在国内外被广泛应用于生产外源蛋白。本研究通过诱导培养毕赤酵母工程菌, 高效的表达了重组几丁质酶 Tachi1, 并且对该酶的酶学性质和表达条件进行了研究。

几丁质酶 Tachi1 的分子量约为 44 kDa, 最适温度和 pH 分别为 50℃、5.5, 在 60℃ 下处理 1 h 仍然具有 27.92% 的酶活力。Ag⁺、Hg²⁺、Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 对其具有强烈的抑制作用, 这些金属离子可以使酶变性而导致失活^[13,14]; 有些金属离子如 Li⁺、Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、K⁺、Ba²⁺ 等可以对几丁质酶活力起到促进作用^[15,16], 但本研究没有发现对 Tachi1 有激活作用的金属离子。据报道, Ca²⁺ 等离子对蛋白酶有明显的稳定作用, 在有 0.05 M Ca²⁺ 存在下, 37℃ 时碱性蛋白酶的半衰期可由 7.5 min 延长到 165 min^[17]。本研究发现 Ca²⁺ 对几丁质酶 Tachi1 的影响甚微, 可以考虑添加 Ca²⁺ 来提高 Tachi1 的热稳定性, 从而扩大 Tachi1 的应用范围。

几丁质酶 Tachi1 表达的最佳 pH 为 6.5, 甲醇诱导浓度为 0.5%, 起始细胞浓度为 OD₆₀₀ = 2, 甲醇诱导时间为 180 h。GS-tachi1-K 菌株摇瓶发酵试验中, 蛋白表达量为 6.19 g/L, 实现了 Tachi1 的高效表达^[18]。几丁质酶酶活高达到 17.93 U/mL, 酶活远远高于其他已报道的几丁质酶酶活。如 Gan 等在 *P. pastoris* 中表达几丁质酶 LPCH11, 第 4 天酶活为 12.3 mU/mL (nmol/mL·min)^[19]。Wang 等将角毛壳菌 (*Chaetomium cupreum*) 几丁质酶基因 *chit58* 在毕赤酵母中的表达, 诱导培养 120 h 蛋白最大酶活为 39 U/mL^[20] (其酶活定义为每小时产生相当于 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量); Liu 等^[21] 对 *Chaetomium globosum* 的几丁质酶 CHI46 研

究中发现, 诱导第 6 天酶活达到最高为 0.71 U/mL (其酶活定义为每分钟产生相当于 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量)。目前对几丁质酶酶活的定义很不统一, 如按同一酶活定义标准统计分析, 与其他真菌的几丁质酶基因在 *P. pastoris* 中表达相比, Tachi1 酶活性最高。

木霉菌的生物防治作用包括重寄生、竞争、抗性物质、蛋白酶及多种机制协同作用^[22]。Lorito^[23] 研究指出, 木霉菌几丁质酶的生物防治效果要优于植物、细菌和其它真菌的几丁质酶。木霉几丁质酶不仅能降解病原真菌成熟的菌丝顶端, 同时也能降解具有几丁质-葡聚糖复合结构的细胞壁以及菌核^[24]。我们在对棘孢木霉几丁质酶 Tachi1 的功能研究中发现, Tachi1 也具有类似的功能, 对植物病原真菌有拮抗作用, 能抑制菌丝生长、孢子萌发及芽管的伸长等生物防治功能。本研究优化了毕赤酵母工程菌 GS-tachi1-K 的诱导表达条件, 明确了几丁质酶 Tachi1 的酶学性质, 为几丁质酶 Tachi1 在植物病虫害防治、几丁质资源开发等诸多领域的应用提供了科学依据、新的酶资源及生产工程菌株。

参考文献

- [1] Nicol S. Life after death for empty shells. *New Scientist*, 1991, 129:46-48.
- [2] 潘志强. 海洋产几丁质酶菌株的筛选、鉴定与发酵工艺的优化. 华南热带农业大学硕士学位论文, 2005. 6.
- [3] Gooday GW. The ever-widening diversity of chitinase. *Carbohydrates in Europe*, 1997, 19(1):18-22.
- [4] 韩宝芹, 余长纓, 刘万顺, 楚晓珉. 几丁质酶研究现状及展望. *中国海洋药物 (Chinese Journal of Marine Drugs)*, 1998, 29(4):643-648.
- [5] Jeon YJ, Kim SK. Continuous production chitoooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochemistry*, 2000, 35(1):623-632.
- [6] 章初龙, 徐同. 我国河北、浙江、云南及西藏木霉种记述. *菌物学报 (Mycosystema)*, 2005, 24(2):184-192.
- [7] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1951, 31:426-428.

- [8] Broford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-259.
- [9] Kaoru K, Shinobu K, Tomoshi O, Toyoo O, Masao O, Kenji T. Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2000, 89(5):479-484.
- [10] 朱明军, 梁世中. 装液量和接种量对红发夫酵母生长和虾青素积累的影响. 氨基酸和生物资源 (*Amino Acids & Biotic Resources*) 2002, 24(4):28-30.
- [11] 何诚, 朱运松. 甲醇营养型酵母表达系统的研究进展. 生物工程进展 (*Progress in Biotechnology*) ,1998, 18(3):7-11.
- [12] Oriol C, Ramón R, José M, Francisco V. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial Cell Factories*, 2006, 5: 17.
- [13] 关海宁, 徐桂花, 刁小琴. 微生物产几丁质酶的研究概况及其应用. 中国食物与营养 (*Food and Nutrition in China*) 2006, 8:33-35.
- [14] 黄小红, 徐雷, 陈清西, 王君, 沙莉, 关雄. 金属离子对苏云金芽胞杆菌几丁质酶活力的影响. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*) ,2005, 13(2):264-265.
- [15] 肖亮, 刘传, 谢池楚, 蔡峻, 刘东, 陈月华. 地衣芽胞杆菌 MY75 菌株几丁质酶基因的异源表达及特性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) ,2010, 50(6):749-754.
- [16] 郭润芳, 李多川, 王荣. 疏绵状嗜热丝孢菌热稳定几丁质酶的纯化及其性质研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2005, 45(2):270-274.
- [17] 张树政. 酶制剂工业 (下册). 北京: 科学出版社, 1984, 397-403.
- [18] 郭润芳, 李多川. 嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 热稳定几丁质酶基因的 cDNA 克隆及表达. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) .2006, 46(1):99-103.
- [19] Gan ZW, Yang JK, Tao Nan, Liang LM, Mi QL, Li Juan, Zhang KQ. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase *Lpch11* and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2007, 76:1309-1317.
- [20] Wang YJ, Yang Q. Cloning and expression of a novel Chitinase *chi58* from *Chaetomium cupreum* in *Pichia pastoris*. *Biochem Genet* 2009, 47:547-558.
- [21] Liu ZH, Yang Q, Hu S, Zhang JD, Ma J. Cloning and characterization of a novel chitinase gene (*chi46*) from *Chaetomium globosum* and identification of its biological activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* ,2008, 80:241-252.
- [22] 王芊. 木霉菌在生物防治上的应用及拮抗机制. 黑龙江农业科学 (*Heilongjiang Agricultural Sciences*) ,2001, 1:41-43.
- [23] Lorito MK, Woo SL, Ambrosio MK. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interactions* ,1996(9):206-213.
- [24] Lorito M, Di Pietro A, Hayes CK, Woo SL, Harman GE. Antifungal synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* ,1993(7) 83:721-728.

Characterization and production optimization of a chitinase (Tachi1) from *Trichoderma asperellum* in recombinant *Pichia Pastoris* expression system

Wei Tang , Yahua Li , Lu Liu , Junxia Zhang , Hongquan Xian *

Agricultural Applied Microbiology Laboratory , College of Life Science , Qingdao Agricultural University , Qingdao 266109 , China

Abstract: [Objective] We characterized a chitinase (Tachi1) from *Trichoderma asperellum* and optimized its production conditions , by methanol induction of the recombinant strain *Pichia pastoris* GS-tachi1-K transformed with the gene *tachi1* (GenBank accession: GU457411). [Methods] We purified Tachi1 from the fermentation broth to analyze enzymatic properties after it was secreted by GS-tachi1-K. The production conditions of GS-tachi1-K were optimized by single-factor experiment and orthogonal experiment. [Results] The molecular weight of Tachi1 was about 44 kDa. Tachi1 had a broad range of temperature and pH adaption with the optimal reaction temperature at 50°C and pH 5.5. It was stable at the temperature below 50°C , yet less stable under alkaline conditions. Its activity was significantly reduced by 0.05 mol/L of Ag⁺ , Hg²⁺ , Cu²⁺ , Fe²⁺ , 1% of Sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10 mmol/L of β-mercaptoethanol. The optimum conditions obtained were: initial cell density with an OD_{600} equal to 2 , 0.5% of methanol , pH 6.5 , induction time 180 h. Under the optimized condition , the activity of Tachi1 reached 17.93 U/mL and the expression of *tachi1* was 6.19 g/L. [Conclusion] The recombinant strain GS-tachi1-K showed high expression of *tachi1* and the protein secreted by GS-tachi1-K had high chitinase activity. It will provide theoretical basis for further research and application in this chitinase. **Keywords:** *Pichia pastoris* , *Trichoderma asperellum* , chitinase , enzymatic properties , production conditions

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2010CM040) and by the Research Foundation for Advanced Talents of Qingdao Agricultural University (631108)

* Corresponding author. Tel: +86-532-86080482; E-mail: xianli0517@yahoo.com.cn

Received: 31 October 2011 / Revised: 20 December 2011

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。