

基因工程酵母产植酸酶的酶学性质研究*

陈惠¹ 王红宁² 赵海霞²

(四川农业大学基础部 雅安 625014)¹ (四川农业大学动物科技学院 雅安 625014)²

摘要:对重组基因工程酵母(PP-NP-1)进行诱导培养,然后对诱导表达物进行饱和硫酸铵分级沉淀,再对沉淀进行Western印迹,证实其为特异的植酸酶;再对基因工程菌所产植酸酶进行纯化,并对其酶学性质进行了研究。研究结果:测得其分子量为70.2kD;酶作用最适温度为55℃;在pH 2.5~5.6范围内植酸酶均具有较高的酶活性,最适pH为4.6;另外Ca²⁺、牛血清白蛋白、Mn²⁺、Mg²⁺对酶有激活作用,而HPO₄²⁻、SDS、Cu²⁺、Fe²⁺对酶有抑制作用。

关键词:基因工程酵母,植酸酶,性质

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2003)02-0038-04

THE RESEARCH OF PHYTASE'S CHARACTERISTICS FROM GENE ENGINEERING YEAST

CHEN Hui¹ WANG Hong-Ning² ZHAO Hai-Xia²

(Sichuan Agricultural University Base Department, Yaan 625014)¹

(Sichuan Agricultural University college of Animal Sciences&Technology, Yaan 625014)²

Abstract: the *phyA* gene has been expressed as an active enzyme in *pichia pastoris*. The expressed extracellular phytase has been verified by Western blotting analyse, and it is to be a specific product of the *phyA* gene and a functional enzyme. The expressed extracellular phytase was purified by ammonium sulfate precipitation. Its molecular weight is 70.15kD, and optimal pH is 4.6. Its optimal temperature is 55℃. The enzyme can be activated by the Ca²⁺, mogy serum albumin, Mn²⁺, Mg²⁺; inhibited by HPO₄²⁻, SDS, Cu²⁺, Fe²⁺.

Key words: Gene engineering yeast, Phytase, Characters

植酸酶可将植物性饲料中植酸及其盐分解为肌醇和磷酸,增加可利用磷的含量,抑制植酸对矿物质和蛋白质的亲和力,解除植酸的抗营养作用。研究发现,植物、反刍动物、许多微生物包括酵母、曲霉、细菌都能产生植酸酶。由于天然菌株产植酸酶量低,直接用其生产出的植酸酶成本较高,构建基因工程菌以提高产酶量,进而进行大规模的发酵生产,已成为世界研究的热点^[1]。

王红宁等已构建 *phyA* 基因的表达载体 pPIC9K-*phyA* (命名为 pPNP-1),并在甲醇酵母中获得高效表达^[2,3]。本试验拟对其表达产物植酸酶进行特异性鉴定及酶性质研究。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

重组基因工程酵母及黑曲霉 N25 菌株由本课题组提供。

1.2 重组基因工程酵母的诱导表达及酶活测定

1.2.1 诱导表达:将基因工程酵母接种于 10mL BMGY 培养基 (1%酵母提取物, 2%蛋

* 国家科技部“九五”、“十五”国家科技攻关计划资助项目 (No.99-009-02)

收稿日期:2002-04-29, 修回日期:2002-09-09

白胨, 1.34% YNB, 4×10^5 生物素, 1% 甘油) 中, 30℃ 剧烈振荡培养至 $OD_{600} = 10 \sim 20$, 离心收集菌体, 加入 10mL 诱导培养基 BMMY (用 0.5% 甲醇代替 BMGY 中的甘油), 30℃ 下继续诱导培养 5~7d。

1.2.2 酶活测定: 从诱导开始计时, 每隔 12h 进行酶活性测定, 直到 120h。测定方法见文献 [4]。酶活力单位定义为: 在 pH4.6、温度 37℃ 的反应液中, 底物每分钟释放 1nmol 无机磷所需要的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.3 植酸酶的分离纯化

1.3.1 基因工程酵母产植酸酶的分离纯化过程: 在 1.2.1 诱导表达的粗酶液中加入固体硫酸铵, 使达到 30% 饱和度, 静置, 离心弃沉淀, 再向上清液加固体硫酸铵, 达到 80% 饱和度, 离心, 取沉淀即为粗酶, 在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH4.6 的 NaAC-HAC 缓冲液透析至无 SO_4^{2-} 离子。对透析液测酶活及蛋白质含量。

1.3.2 黑曲霉 N_{25} 产植酸酶的分离纯化过程: 见文献 [9]。

1.4 相对分子量测定

采用 SDS-PAGE 法测分子量, 测定方法见文献 [5]。

1.5 表达产物的 Western 印迹

兔抗植酸酶 IgG (一抗): 美国农业部 Ullah 博士赠送, 羊抗兔-HRP IgG (二抗): 购于华美公司。Western 印迹方法参见文献 [6~8]。

1.6 最适温度及酶的热稳定性测定

用透析酶液于 29℃、37℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃ 范围内进行酶促反应, 测定酶活力, 找出酶反应的最适温度。另将稀释酶液装入带塞试管中, 在 40℃、50℃、60℃ 和 65℃ 的恒温水中保温不同时间后进行酶活力测定。以未经热处理的酶液作对照, 计算酶活力剩余百分数。

1.7 最适 pH 及其稳定性测定

以植酸钠 (Sigma 产品) 为底物, 用透析后植酸酶液在 pH1.7、2.6、3.6、4.6、5.6、6.6 的 NaAC-HAC 缓冲液内稀释后直接加底物反应, 测定酶活, 得最适 pH; 用最适 pH 值缓冲液稀释酶液, 在不加底物的情况下, 于 40℃ 的恒温水浴中保温 2.5h 后再加底物植酸钠进行酶促反应, 测定酶活力, 用未经热处理的酶作对照, 计算酶活力的剩余百分数。

1.8 影响酶活性的因子测定

向酶反应混合物中分别加入 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , 牛血清白蛋白, SDS, Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Li^{+} 和 ddH_2O 作对照, 反应后测定酶活, 比较各种离子及有机物对酶活性的影响。

2 结果与分析

表 1 酵母工程菌产植酸酶的分离纯化结果

提纯步骤	总蛋白(mg)	总酶活力(u)	比活力(u/mg)	纯化倍数	回收率(%)
培养滤液	37.55	965150	25703	1	100
30% 硫酸铵沉淀	31.58	910944	28845	1.12	94.4
80% 硫酸铵沉淀	2.24	90315	40319	1.57	9.4

2.1 植酸酶的分离纯化

用重组基因工程

酵母诱导表达的酶液,

经硫酸铵分步沉淀, 便

可得植酸酶粗酶沉淀, 将以上分离提纯的结果见表 1。

2.2 表达产物的 SDS-PAGE 电泳

表达产物的 SDS-PAGE 结果见图 1, 分子量计算, 用 SPSS 统计软件对蛋白分子量和

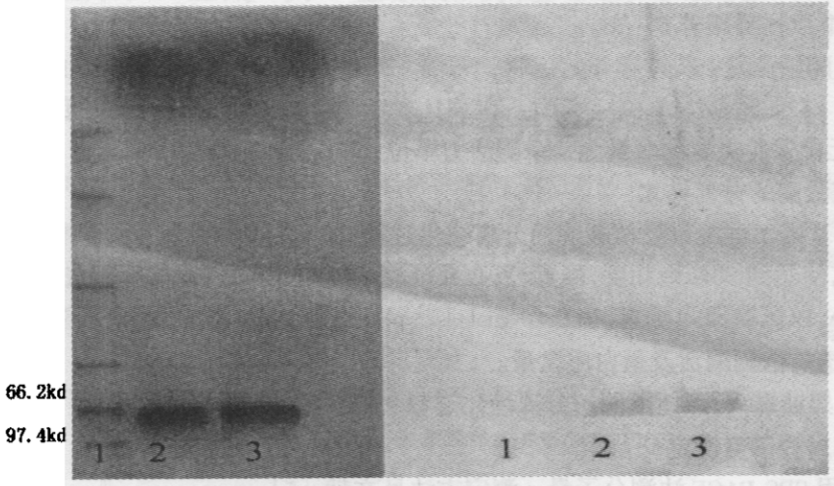


图 1 胞外蛋白的 SDS-PAGE 分析

图 2 胞外蛋白的 Western 印迹分析

注: 1 标准蛋白, 2 PP-NP-1 表达蛋白粗酶液, 3 黑曲霉 N_{25} 沉淀酶液

蛋白的迁移率的分析, 建立回归方程: $Y = 2.3641 - 1.209 \times X$ ($R = 0.99103$, $R^2 = 0.98215$, $SD = 0.03808$) (X : 蛋白质电泳迁移率; Y : 蛋白质分子量对数值)。

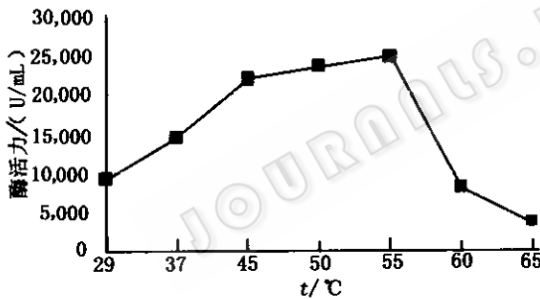


图 3 温度对植酸酶活性的影响

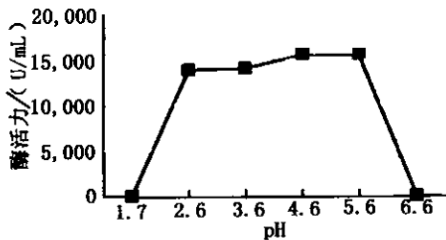


图 4 pH 对植酸酶活性的影响

计算出重组基因工程酵母产植酸酶的分子量为 70.2kD, 黑曲霉 N_{25} 产植酸酶的分子量为 69.2kD。

2.3 表达产物的 Western 印迹

从图 2 结果表明, 转化子 PP-NP-1 分泌的蛋白质中含有特异的植酸酶。

2.4 反应最适温度

在不同温度下测定酶活性, 结果见图 3。得出酶作用的最适温度为 55°C, 而在 40°C、50°C、60°C、65°C 对酶进行保温处理 1h 后, 酶活力分别为原活力的 100%、89.7%、35%、32.9%。

2.5 反应最适 pH

在 pH2.0 ~ 8.1 范围内测酶活力, 结果见图 4。PH2.5 ~ 5.6 范围内植酸酶均具较高的酶活性, 最适 pH 为 4.6, 该酶在 pH2.6 ~ 5.6 范围内, 在不加底物的情况下保温处理 2.5h, 其酶

活力与未经处理的酶活力的比值大于 50%, 结果见表 2。

2.6 影响酶活性的因子

从表 3 可以看出, Ca^{2+} , 牛血清白蛋白, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等对酶有明显的激活作用, 能提高酶活 17.2%、6.2%、13.4%、22.8%, 而 HPO_4^{2-} 、SDS、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 等对酶有抑制作用, 尤其是 Cu^{2+} , 可使酶活力降至 20.7%, 见表 3。

从以上结果可知黑曲霉 N_{25} 植酸酶 *phyA* 基因在甲醇酵母中能高效表达, 其表达量达到 $35,646.7U \cdot ml^{-1}$, 是出发菌株黑曲霉 N_{25} ($513.4U \cdot ml^{-1}$) 的 69.46 倍以上^[3]。所产植酸酶的分子量为 70.2kD, 酶作用最适温度为 55℃, 最适 pH 为 4.6, 在 pH2.5 ~ 5.6 范围内均具有较高的酶活性, pH 耐受性较好; 另 Ca^{2+} 、牛血清白蛋白、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶有激活作用, 而 HPO_4^{2-} 、SDS、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶有抑制作用。该基因工程菌所产植酸酶与原菌株黑曲霉 N_{25} 所产植酸酶的酶学性质接近^[9]。另 Yanming Han (1999) 等报道在酵母中 *A. niger* 植酸酶 *phyA* 基因表达植酸酶分子量为 120kD, 比商品酶表现出较强的热稳定性, 经研究发现植酸酶的热稳定性受糖基化的影响^[10]。姚斌等报道 *A. niger* 963 在 pH1.8 ~ 5.7 范围内, 均能维持较高的酶活性^[11], 并将 *A. niger* 963 的植酸酶 *phyA* 基因经改造后整合到甲醇酵母基因组中, 重组酵母中表达的植酸酶与天然植酸酶的酶学性质上没有差异, 具有正常的生物学活性, 其表达量也大大提高^[12]。

国外采用毕赤巴斯德酵母已经表达了近百种外源蛋白, 已经建立了好几种发酵工艺, 包括两步发酵法、连续灌注发酵法。采用高密度发酵已证实 (Vedvick T, 1991; Siegel R S, 1989), 菌体密度可高达 $OD_{600} = 70$, 酶活可相应得到提高。另外细胞固定化技术可进一步提高细胞利用时间、酶产量和降低成本。本课题正在进行植酸酶基因工程菌的工业化发酵工艺的研究, 可望进一步提高植酸酶的表达量, 降低生产成本。

参考文献

- [1] 王红宁, 吴琦, 谢晶, 等. 四川农业大学学报, 2000, 18 (1): 84 ~ 87.
- [2] 王红宁, 吴琦, 刘世贵, 等. 微生物学报, 2001, 41 (3): 310 ~ 314.
- [3] 王红宁, 马孟根, 吴琦, 等. 菌物系统, 2001, 20 (4): 486 ~ 493.
- [4] 赵赣, 陈鑫磊主编. 生物化学实验指导 (第一版). 南昌: 江西科学技术出版社, 2000.
- [5] 张龙翔, 张庭芳主编. 生物化学实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1982.
- [6] 郝福英, 朱玉贤. 分子生物学实验技术. 北京: 北京大学出版社, 1998. 452 ~ 456.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998. 110 ~ 113.
- [8] 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆. 北京: 科学出版社, 1996.
- [9] 陈惠. 四川农业大学学报, 2001, 19 (1): 77 ~ 79.
- [10] Yanming H, David B W. Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (*PhyA*) in: *Saccharomyces cerevisiae* Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (5): 1915 ~ 1918.
- [11] 姚斌, 张春义, 王建华, 等. 农业生物技术学报, 1998, 6 (1): 1 ~ 6.
- [12] 姚斌, 范云六. 生物工程学报, 2000, 16 (1): 1 ~ 5.

表 2 植酸酶对不同 pH 值的耐受性

pH	酶活力		酶剩余活力 (%)
	未经保温处理	保温处理	
2.0	11.2	0	
2.6	13980	9085	64
3.6	14137	10917	77
4.6	15579	12874	82
5.6	15550	15036	96
6.6	31.1	0	
8.1	97.8	0	

表 3 影响酶活性的因子测定

因子种类	浓度 (mmol/L)	相对酶活力 (%)	评价
对照		100	
Ca^{2+}	10^3	117.2	+
HPO_4^{2-}	10^3	65.5	-
SDS	10^3	77.4	-
Cu^{2+}	10^3	20.7	-
牛血清白蛋白	0.02mg/mL	106.2	+
Fe^{2+}	10^3	86.3	-
Ba^{2+}	10^3	91.8	-
Mn^{2+}	10^3	113.4	+
Li	10^3	92.5	-
Mg^{2+}	10^3	122.8	+

注: + 表示激活作用, - 表示抑制作用