

# 微小毛霉凝乳酶的分泌表达、产物纯化及鉴定\*

王景会<sup>1,2</sup>, 李玉秋<sup>1</sup>, 郑丽<sup>3</sup>, 李倬琳<sup>1</sup>, 高岩<sup>2</sup>, 杨贞耐<sup>1\*\*</sup>

1. 吉林省农业科学院农产品加工研究中心, 长春 130033; 2. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 长春 130118; 3. 吉林大学农业与生物工程学院, 长春 130024

**摘要:** 为将微小毛霉 (*Mucor pusillus*) 凝乳酶采用基因工程的方法进行分子改造, 获得适于乳品工业生产用的凝乳酶, 克隆到了微小毛霉凝乳酶基因, 构建了酵母表达质粒 pPIC9K/M。线性化后电击转入毕赤酵母 GS115, 在甲醇诱导下进行凝乳酶的初步发酵试验, 通过 pH 反应及酶抑制反应试验证明, 重组凝乳酶获得了分泌表达。

SDS-PAGE 分析表明重组凝乳酶的分子量约为 46 kD, 与理论值 (45.3 kD) 基本相符, 培养基上清液中凝乳酶的活性为 311.8 SU/mL, 纯化的总回收率为 51.89%, 纯度达到 92%。

**关键词:** 凝乳酶; 分泌表达; 毕赤酵母

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2011)

DOI: CNKI:22-1100/S.20110511.1646.001

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.s.20110511.1646.001.html>

## Secretory Expression, Purification and Identification of Rennet from *Mucor pusillus*

WANG Jing-hui<sup>1,2</sup>, LI Yu-qiu<sup>1</sup>, ZHENG Li<sup>3</sup>, LI Zhuo-lin<sup>1</sup>, GAO Yan<sup>2</sup>, YANG Zhen-nai<sup>1</sup>

1. Research Center of Agro-Product Processing, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China; 2. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. College of Agriculture and Biological Engineering, Jilin University, Changchun, 130024, China

**Abstract:** The rennet from *Mucor pusillus* is one of the major sources of microbial rennet, but it has some defects compared with the bovine chymosin. Aspartic proteinases from fungi are usually more heat resistant. When these enzymes are used for cheese making, the residue of enzymatic activity after heat treatment (55°C) following milk coagulation may still exist and cause proteolysis during cheese storage, bitter taste, softness and lower yield of the cheese products. In order to develop a rennet product with suitable milk clotting properties, the gene of rennet was cloned from *Mucor pusillus*, and the expression vector pPIC9K/M was constructed. The plasmids of pPIC9K/M was linearized with *SacI*, and transformed into *Pichia pastoris* GS115 competent cells. The rennet was secretory expressed in *Pichia pastoris* successfully, and a strong band at about 46 kD was shown by SDS-PAGE. Activity tests showed that the rennet activity in the culture supernatant was 311.8 SU/mL. The purity of recombinant rennet reached 92% with a 51.89% activity recovery.

**Key words:** rennet; secretory expression; *Pichia pastoris*

凝乳酶(EC3.4.23.4)是一种酸性蛋白酶, 在食品、纺织、医药等行业都有广泛的应用, 尤其是干酪生产过程中的必需酶, 产量约占全世界酶制剂总量的 15%, 为第二大酶制剂<sup>[1]</sup>。我国目前干酪生产所用凝乳酶主要依赖进口, 凝乳酶匮乏已成为制约我国干酪生产的重要因素。凝乳酶来源较为广泛, 可以从多种动物、植物、微生物中得到<sup>[2]</sup>。微生物凝乳酶主要存在

于微小毛霉 (*Mucor pusillus*) 和米黑毛霉 (*Mucor Miehei*) 等接合真菌中, 具有牛奶促凝活力高、价格低廉等优点, 但也存在蛋白水解能力较强、热稳定性高等缺陷<sup>[3-5]</sup>, 这导致成品干酪出现苦味, 甚至出现质地松软、产率低等问题。自 20 世纪 90 年代以来, 国外研究者开始对真菌凝乳酶的分子三维结构等进行了研究<sup>[6-8]</sup>, 证明了通过分子改造的方法, 可以大

\* 基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA10Z306), 现代农业产业技术体系建设专项 (农科教发[2007]14号)

作者简介: 王景会, 女, 博士研究生, 副研究员, 研究方向: 食品生物技术。

收稿日期: 2010-07-16 网络出版时间: 2011-5-11 16:46

\*\* 通讯作者

幅降低酶的蛋白水解能力及热稳定性等,使其更适合于干酪生产。本研究采用毕赤酵母表达系统获得了重组微小毛霉凝乳酶,为采用基因工程的方法进行分子改造,获得适于干酪加工用的凝乳酶奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

微小毛霉 (*Mucor pusillus*) 菌株 AS 3.3445 购自中国普通微生物保藏管理中心。大肠杆菌 *E.coli* JM109, 巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115, 表达质粒 pPIC9K 均由吉林省农业科学院食品生物技术实验室保存。

### 1.2 工具酶和试剂

内切酶、Pfu *Taq* 酶、T<sub>4</sub> DNA连接酶、dNTP mixture 和DNA片段回收纯化试剂盒购自MBI公司, pMD18-T 载体购自联星生物公司, 抗生素G418购自浩然生物技术有限公司, DNA Marker DL2000、DL15000及蛋白分子量标准购自天根生化科技有限公司, DEAE-52和Sephadex G-75购自Sigma公司, 其他试剂均为国产分析纯。PCR引物合成及序列测定由上海生工公司完成。

### 1.3 培养基

LLB、YPD、MD、MM、BMGY、BMMY培养基的组成和配制参见Invitrogen公司毕赤酵母操作手册。

### 1.4 微小毛霉凝乳酶基因的克隆

参照文献[9], 取微小毛霉菌基因组DNA作为模板。根据Genbank上已公布的微小毛霉凝乳酶基因序列 (NM\_X06219) 设计引物, 进行PCR扩增, 引物中设计有合适的酶切位点: 上游引物QMAGAF 5'-GCCGAATTCATGCTCTTCTCAAC-3', 下游引物QMAGAR 5'-ACTGCGGCCGCTTAGTTGTTCTCGTAT-3', 下划线部分分别为*EcoRI*和*NotI*的酶切位点。

将扩增的凝乳酶基因片段连接到pMD18-T载体上, 将酶切及测序证实正确的质粒命名为pMD18-T/M。

### 1.5 酵母表达载体pPIC9K/M的构建

将表达载体pPIC9K及pMD18-T/M分别用*EcoRI*、*NotI*双酶切后连接、转化大肠杆菌JM109, 提取质粒后进行酶切鉴定, 重组表达载体命名为pPIC9K/M。

### 1.6 电转化毕赤酵母GS115及高拷贝转化子的筛选

用*SacI*酶切重组质粒pPIC9K/M使其线性化。通过电击法将线性化的质粒转化到毕赤酵母GS115中, 涂布于MD平板上, 然后将将在MD平板上生长的转化子分别点接在含0.25, 0.50, 1.0, 2.0 mg/mL G418的YPD平板上, 30 °C培养7 d, 可筛选出耐受G418的高拷贝

转化子。本试验获得24个重组阳性克隆和2个高拷贝菌株。

### 1.7 重组酵母的诱导表达

将筛选得到的重组酵母GS115/pPIC9KM 接种于BMGY培养基中, 30 °C、280 r/min培养16-18 h, 至OD<sub>600</sub> 达到1.0-2.0。离心收集菌体, 用诱导培养基BMMY重悬菌体, 使OD<sub>600</sub> 约为1.0, 于30 °C、280 r/min进行诱导表达。每24 h向培养基中添加100% 甲醇至终浓度为1.0%, 同时取样检测菌液OD<sub>600</sub>、菌液上清凝乳酶活力及进行SDS-PAGE分析, 确定最佳的诱导表达时间<sup>[10]</sup>。

### 1.8 重组凝乳酶的分离纯化

甲醇诱导表达的酵母培养液离心后取上清, 经80% 饱和度硫酸铵沉淀过夜后离心, 沉淀溶于磷酸钠缓冲液中即为粗酶液, 同时 Sephadex G-75 柱用磷酸钠缓冲液平衡后, 取粗酶液上柱, 用同样的缓冲液洗脱(12 mL/h), 收集合并洗脱峰, 继续采用离子交换柱DEAE-52 分离纯化蛋白, 以含有不同浓度 NaCl (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mol/L) 的磷酸钠缓冲液 (pH 5.8) 进行梯度洗脱, 收集活性峰, 真空冷冻干燥浓缩后溶于磷酸缓冲液中。

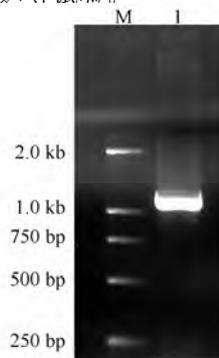
### 1.9 重组凝乳酶蛋白活性检测

将40 min凝结1 mL 10%脱脂乳的酶量定义为一个Soxhlet单位(SU)<sup>[11]</sup>。  
凝乳酶活力=(试验用乳量/凝乳酶量)×(40/t)。t为凝乳时间。

## 2 结果与分析

### 2.1 微小毛霉凝乳酶基因的克隆

以微小毛霉凝乳酶基因组为模板, QMAGAF 和 QMAGAR 为引物进行扩增, 得到与理论值(1 283 bp) 大小基本一致的凝乳酶基因片段(图1)。将目的基因连接到克隆载体pMD18-T上, 测序结果与X06219核苷酸序列比对, 同源性达到98%以上, 说明克隆得到的序列是凝乳酶基因。可继续进行以下的表达载体构建、诱导表达等试验。

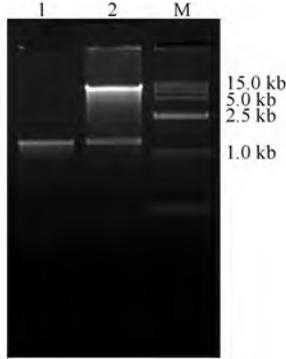


M. DL2000 DNA Marker; 1. 凝乳酶基因扩增产物 PCR product of the *Mucor rennin* gene

图1 目的基因的 PCR 扩增  
Fig. 1. PCR product of the rennet gene from *Mucor pusillus*

## 2.2 重组表达载体的鉴定

对表达载体pPIC9K / M进行PCR及EcoRI、NotI的双酶切鉴定，分别获得了1 283 bp的目的片段（图1），及9 300 bp的表达载体和 1 283 bp的目的基因（图2），其大小与预期值一致。



M. 分子量 mark Takara DL15000 DNA Marker; 1. 重组表达载体pPIC9K/M中凝乳酶基因的PCR扩增 PCR product of *Mucor* rennin gene from pPIC9K/M recombinant plasmid; 2. 重组质粒的双酶切鉴定 Digestion product of recombinant plasmid

图 2 表达载体pPIC9K/M的PCR和双酶切 (EcoRI, NotI) 鉴定

Fig. 2. Identification of recombinant plasmid pPIC9K/M by PCR and digested with *EcoRI* and *NotI*

## 2.3 重组蛋白的诱导表达

重组毕赤酵母GS115/pPIC9KM的生长曲线及活力曲线如图3。重组毕赤酵母GS115/pPIC9KM在24 h内进入对数生长期, 48 h以后进入稳定生长期, 菌液

OD<sub>600</sub>约为 3.0。产酶曲线滞后于生长曲线, 在96 h后, 产酶有明显上升的趋势, 192 h酶活达到最高, 为311.8 SU/mL。

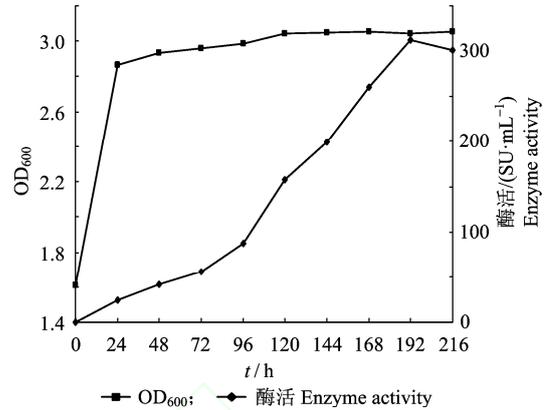


图 3 重组毕赤酵母GS115/pPIC9KM的生长曲线及活力曲线

Fig. 3. Growth and activity curves of the recombinant GS115/pPIC9KM

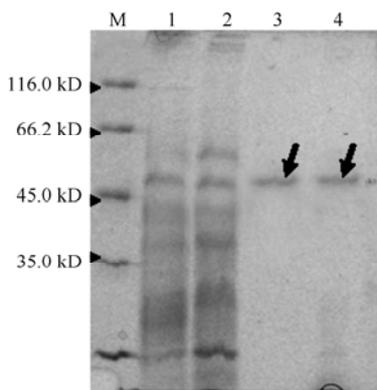
## 2.4 重组凝乳酶的分离纯化及SDS-PAGE分析

分离纯化结果见表1, 以1 L 的发酵液开始, 重组凝乳酶从发酵液到最后纯化产物, 酶的比活力由最初的855.34 SU/mg到纯化后的1 707.84 SU/mg, 提高了近2倍, 回收率为51.89%, 共得到纯化产物12.36 mg。凝胶扫描结果表明经过三步纯化后的蛋白质纯度达到92%, 取发酵液上清及不同阶段的纯化产物行SDS-PAGE电泳, 结果见图4 (2个箭头标记)。

表1 重组凝乳酶的纯化

Table 1. Purification of recombinant *Mucor* rennin

纯化步骤	总蛋白/mg	总活力 /SU	比活力/(SU·mg <sup>-1</sup> )	回收率/%
Purification step	Total protein	Total activity	Specific activity	Yield
培养液上清	47.56	40 680.00	855.34	100
Culture supernatant				
硫酸铵沉淀	32.53	37 777.77	1 161.37	92.86
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation				
葡聚糖G-75层析	21.63	33 375.98	1 543.06	82.04
Sephadex G-75				
离子交换柱分离	12.36	21 108.85	1 707.84	51.89
Sephadex DEAE-52				



M.蛋白 mark Protein mark; 1.粗酶液 Supernatant of crude enzyme extract ; 2. 80%硫酸铵沉淀 Precipitate of 80% ammonium sulfate fractionation; 3. 葡聚糖 G-75 层析 Activity component in SephadexG-75 chromatography; 4. 离子交换 DEAE-52 层析 Activity component in DEAE-52 chromatography

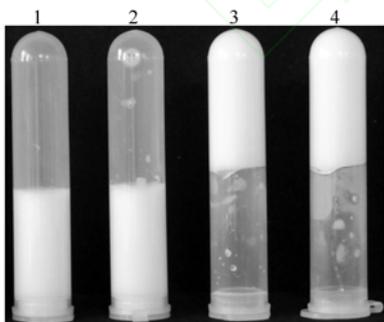
图4 重组微小毛霉凝乳酶纯化结果的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 4. SDS-PAGE analysis of the recombinant *Mucor pusillus* rennet purification

### 2.5 重组凝乳酶的酶学反应鉴定

2.5.1 pH 反应试验 在碱性条件下,凝乳酶蛋白会由于构象变化造成活性迅速消失<sup>[11]</sup>,将重组微小毛霉蛋白溶液pH值调至10.0,反应30 min后,凝乳活性全部丧失(图5)。

2.5.2 酶抑制反应试验 微小毛霉属于天冬氨酸蛋白酶,胃蛋白酶抑制剂 Pepstatin A 可以专一地抑制此类蛋白酶的活性<sup>[12]</sup>。在重组微小毛霉凝乳酶蛋白溶液中加入Pepstatin A至终浓度为 5 mmol/L,反应20 min后,凝乳活性完全丧失(图5)。

重组凝乳酶的酶抑制剂反应结果表明(图5),商品凝乳酶和重组凝乳酶出现明显凝乳反应。重组凝乳酶经过碱及蛋白酶抑制剂处理后其生物活性消失,均未出现凝乳反应。这充分证明了上清液的活性来源于重组微小毛霉凝乳酶。



1. pH对于重组凝乳酶的影响 Effect of pH on the activity of recombinant rennet; 2. 抑制剂对于重组凝乳酶的影响 Effect of inhibitor on the activity of recombinant rennet; 3. 乳中加入商品凝乳酶 Commercial chymosin; 4. 乳中加入重组凝乳酶 Recombinant rennet

图5 重组凝乳酶活性检测

Fig. 5. Milk-clotting test of recombinant rennet

## 3 讨论

毕赤酵母表达系统已成为较完善的外源基因表达系统<sup>[13-16]</sup>,具有易于高密度发酵,表达基因在宿主基因组中稳定整合,能使产物有效分泌并适当糖基化,培养方便经济等特点。目前国内外已有数百种外源蛋白基因在毕赤酵母中表达。证实该系统高效、实用、简便,能提高表达量并保持产物生物学活性的外源基因表达系统,而且非常适宜扩大工业规模。毕赤酵母表达系统在生物工程领域将发挥越来越重要的作用。

本研究成功构建了食品级的微小毛霉凝乳酶毕赤酵母分泌型表达载体pPIC9K/M,在毕赤酵母上清液中表达有活性的重组微小毛霉凝乳酶,活性达到311.8 SU/mL,为182 mg/L。较大肠杆菌<sup>[17]</sup>表达的20 mg/L及酿酒酵母<sup>[18]</sup>表达的150 mg/L表达量都有较大幅度提高。本研究初步获得了重组凝乳酶,重组菌的诱导发酵条件及凝乳酶的分子改造都将有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 杨贞耐,张莉.凝乳酶的克隆、表达和分子改造[J].农产食品科技,2007,1(2):31-36
- [2] 周俊清,林亲录.微生物源凝乳酶的研究进展[J].中国食品添加剂,2004,2:6-9.
- [3] Gouka R J, Punt P J, Hond C A, et al. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospect[J]. Appl Microbiol Biot, 1997, 47(1): 1-11.
- [4] Vanden B J. Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin[J]. Biotechnology(N Y),1990,8:135-139.
- [5] Ward M, Wilson L J, Kodama K H, et al. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion[J]. Biotechnology(N Y)1990,8:435-440.
- [6] Beldarrain A, Acosta N, Montesinos R, et al. Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic, spectroscopic and calorimetric studies[J]. Biotechnol Appl Biochem 2000,31: 77-84.
- [7] Newman M, Safro M, Frazao C, et al. X-ray analyses of aspartic proteinases. IV. Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin [J]. Microbiology, 1991,22: 1295-1309.
- [8] Pitts J E, Uusitalo J M, Mantafounis D, et al. Expression and characterisation of chymosin pH optima mutants produced in *Trichoderma reesei*[J]. Biotechnology, 1993,2(8): 69-83.
- [9] 姜媛媛,王景会,李玉秋,等.微小毛霉凝乳酶基因的克隆与表达[J].中国乳品工业,2010,38(2):7-9.
- [10] 韦宇拓,汪嵘,杜丽琴,等.合成耐高温α-淀粉酶基因在巴斯德毕

- 赤酵母中的分泌表达[J].中国生物工程杂志,2005, 25(1): 65-69.
- [11] Barkholt PV, Asbaek CK, Foltmann B. Investigations on the activation of bovine prochymosin[J]. Europe Biochemistry, 1979, 94(2):573-580
- [12] 张莉, 姜媛媛, 张健, 等.牛凝乳酶基因在毕赤酵母中的重组表达[J].生物工程学报,2009, 25(8): 1160-1165.
- [13] Egel M, Flygenring H P,and Hansen M T. A novel aspartyl protease allowing KEX2-independent MF alpha propheromone processing in yeast[J]. Apply Biochemistry 1990, 6:127-137.
- [14] 康伟, 王智, 詹冬玲, 等. 黑曲霉NRRL3135菌株植酸酶基因在毕赤酵母GS115系统中的表达[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(6):623-627.
- [15] Cregg J M, Lin C J, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. Mol. Biotechnol.2000, 16: 23-52.
- [16] 史勇, 张明军, 张英, 等. 甜味蛋白Brazzein基因酵母表达系统的建立[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(1): 43-46.
- [17] Kawaguchi Y, Shimizu N, Nishimori K, et al. Renaturation and activation of calf prochymosin produced in an insoluble form in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology, 1984, 1:307-315
- [18] Smith RA, Duncan M J, Moir D T. Heterologous protein secretion from yeast[J]. Science, 1985, 20:1219-1229