

海藻酸裂解酶基因在毕赤酵母中的表达 及重组酶性质的初步研究

岳 明¹, 丁宏标^{1*}, 乔 宇¹

(1. 中国农业科学院 饲料研究所, 北京 100081)

摘要:褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)是一种海藻酸降解菌. 本实验采用 PCR 的方法, 以褐球固氮菌基因组 DNA 为模板, 克隆出约 1.05 kb 的海藻酸裂解酶基因 *algL* 的成熟蛋白编码序列, 并将其插入巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达载体 pPIC9 K 中, 获得重组质粒 pPIC9 K-*algL*. 重组质粒线性化后用聚乙二醇(PEG)法导入毕赤酵母菌株 GS115 中, 获得高效分泌表达海藻酸裂解酶的毕赤酵母工程菌株. 用甲醇诱导培养基进行摇瓶发酵, 表达得到 43 kDa 的目的蛋白, 酶活力可达 1 400 U/cm³ 左右. 经测定, 该重组酶的最适反应 pH 为 8.5, 最适反应温度为 40℃, 并且在 20~55℃, pH 2.0~11.0 具有较好的稳定性. 另外, 10 mmol/cm³ 的 Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ 和 Ca²⁺ 对酶有不同程度的抑制作用.

关键词:海藻酸裂解酶; 毕赤酵母; 海藻寡糖; 诱导表达

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2007)05-0154-07

1 引言

海藻是世界上最为丰富的海洋资源之一, 它包括 250 属, 1 500 余种, 有经济价值的种类就有 100 多种. 我国拥有漫长的海岸线, 海藻产量居世界前列^[1]. 海藻中富含海藻酸盐, 据报道马尾藻的海藻酸盐含量可达 30%~35%^[2], 海带干物质海藻酸盐含量为 24%^[3]. 经降解处理后的海藻酸可产生具有较强生物活性及益生作用的海藻寡糖. 传统上多以化学方法降解海藻酸, 但它的效率低, 反应条件剧烈^[4], 因此, 更加环保温和的高效降解方法成为人们关注的焦点, 海藻酸裂解酶(alginate lyase)就是这样一种高效生物催化剂, 它的深入研究对海藻资源的开发具有重要的理论意义和应用价值.

海藻酸是由 α -D-甘露糖醛酸(M)和 β -L-古罗糖醛酸(G)为单体随机聚合形成的线性高分子

聚合物, 其一级结构受不同来源决定^[5]. 海藻酸裂解酶按其降解海藻酸片段的不同可分为两大类: 1,4-D-甘露糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.3)和 1,4-L-古罗糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.11). 它们分别作用于海藻酸的甘露糖醛酸段和古罗糖醛酸段, 生成寡聚糖醛酸, 并在非还原末端产生 C4, C5 不饱和和双键^[6].

海藻酸裂解酶主要来源于某些微生物^[7-10]和一些海洋动植物^[11-13], 其中褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)是研究较为清楚的产海藻酸裂解酶的菌株, 其分泌的海藻酸裂解酶能够有效的作用于海藻酸盐中 M-M 和 M-G 间的 1,4-糖苷键. 褐球固氮菌海藻酸裂解酶的编码基因 *algL* 已于 1998 年被克隆, 并且在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行了表达, 但表达活力较低^[5]. 巴斯德毕赤酵母是一种高效的真核表达系统, 具有许多优于原核表

收稿日期: 2006-03-10; 修订日期: 2006-07-16

基金项目: 国家 973 计划课题(2004CB117500); 国家 863 计划课题(2005AA246010); 国际科技合作重点项目计划课题(2005DFA31070) 联合资助.

作者简介: 岳明(1982—), 男, 河北省石家庄市人, 博士研究生, 从事饲料生物技术研究. E-mail: rockyueming@yahoo.com.cn

* 通讯作者, dinghongbiao@mail.caas.net.cn

达系统的特点,但迄今为止,国内外尚未有海藻酸裂解酶在毕赤酵母中表达的研究报道.本研究采用 PCR 的方法克隆到褐球固氮菌 *algL* 基因的成熟蛋白编码序列,将其在巴斯德毕赤酵母中进行表达,并对表达产物性质进行了初步研究.

2 材料和方法

2.1 菌株和质粒

褐球固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*), 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心 (CGMCC 1.178); 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 菌株由中国农业科学院饲料研究所生态饲料研究室保存; 毕赤酵母 (*Pichia Pastoris*) GS115 和 pPIC9K 分泌型表达载体购自 Invitrogen 公司; 质粒 pCF - T Vector 购自天为时代公司.

2.2 酶和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品; Pfu DNA 聚合酶购自天为时代公司; X - Gal 购自 Promega 公司; G418 购自 Invitrogen 公司; 海藻酸钠、葡萄糖醛酸为 Sigma 公司产品; 其他化学试剂为国产或进口分析纯试剂.

2.3 培养基

LB 培养基见文献 [14], YPD, RDB, MM, MD, BMGY, BMMY 培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册.

2.4 褐球固氮菌 *algL* 基因成熟蛋白编码序列的克隆及毕赤酵母表达载体的构建

2.4.1 褐球固氮菌基因组 DNA 的提取

参照文献 [14] 方法从褐球固氮菌中提取基因组 DNA.

2.4.2 褐球固氮菌 *algL* 基因成熟蛋白编码序列的克隆

根据 Genbank no. AJ223605 序列^[5], 以 *algL* 基因信号肽编码序列后第一个核苷酸到全基因终止密码子序列 (1053 bp) 设计 PCR 扩增引物, 上游引物序列为 5' CGGAATTCGCCA GCGCCCTGGT-TCCG CCCAA 3', 下游引物序列为 5' GCGGC-CGCCTA GTCCGCGTTGCCGACA GT 3', 其中上、下游引物中分别引入 *EcoRI* 和 *NotI* 酶切位点, 如下划线所示, 使目的片段经 *EcoRI*、*NotI* 酶切后插入到同样酶切处理的质粒 pPIC9K 中. 以褐球固氮菌基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 反应, 体系为 50 μ L: 含有约 50 ng 褐球固氮菌基因组 DNA 1.5 μ L, 总浓度 10

mmol/ dm³ dNTP 4 μ L, 10 mmol/ dm³ 的上下游引物各 1 μ L, 10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ L, 5 U/ mm³ 的 Pfu DNA 聚合酶 0.5 μ L, ddH₂O 37 μ L. 反应条件为: 94 预变性 5 min 后, 75 热启动加酶; 94 变性 50 s, 61 退火 50 s, 72 延伸 1 min, 进行 35 个循环; 最后延伸 5 min; 随后加入 2 U/ mm³ 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, 10 mmol/ dm³ dATP 1 μ L, 72 加 A 反应 20 min, 使得平末端的扩增产物带有 3 端 A 突出的黏性末端, 以便与克隆载体连接.

PCR 扩增产物经回收纯化后, 连接到 pCF - T Vector 上, 转化大肠杆菌 DH5, 通过蓝白斑筛选获得阳性克隆, 并进行测序鉴定.

2.4.3 毕赤酵母重组表达载体的构建

将 *algL* 基因成熟蛋白编码序列经 *EcoRI*、*NotI* 双酶切后插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 的多克隆位点, 位于 - 因子信号肽序列的下游, 得到重组质粒 pPIC9K - *algL*, 并对该质粒进行限制性酶切及测序鉴定.

2.5 毕赤酵母的聚乙二醇 (PEG) 法转化

接毕赤酵母菌株 GS115 单菌落于 10 mL YPD 中 30, 250 ~ 300 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 ~ 1.0, 离心收集菌体, 用 10 mL Solution I (见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册) 重悬细胞, 离心收集菌体, 用 1 mL Solution I 重悬细胞, 此时酵母细胞处于感受态, 取 80 μ L 上述菌液, 加入 3 μ g 经限制性内切酶 *BglIII* 线性化的重组质粒 pPIC9K - *algL*, 加入 1 mL Solution II, 充分混匀, 30 水浴 1 h, 其中每 15 min 旋涡震荡, 42 水浴 10 min, 4 000 r/min 离心收集菌体, 加入 1 mL Solution III, 离心去上清, 最后加入 100 ~ 150 μ L Solution III, 重悬细胞, 菌液涂布于固体 RDB 平板上, 30 培养 2 ~ 4 d 直至转化子出现.

2.6 重组毕赤酵母的筛选和鉴定

2.6.1 重组毕赤酵母的筛选

用灭菌牙签挑取 RDB 平板上的转化子分别点种到 MM、MD 和含 600 μ g/cm³ G418 的 YPD 平板上, 30 培养. 在 MD 上生长正常而在 MM 上生长缓慢或不生长的转化子为甲醇利用慢型; 在含 G418 的 YPD 平板上生长正常的为多拷贝转化子.

2.6.2 重组毕赤酵母菌株的 PCR 鉴定

毕赤酵母基因组 DNA 的提取参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册. 以毕赤酵母基因组 DNA 为模板, 利用目的基因特异性引物进行 PCR 反应,

以确定外源基因的整合情况。

2.6.3 重组毕赤酵母工程菌株的诱导表达

将转化子接种于含 3 mL BMGY 培养基中的 12 mL 离心管中,30 220 r/min 摇床培养 48 h. 离心收集菌体,用 3 mL BMMY 诱导培养基重悬菌体,30 220r/min 继续培养,每 24 h 补加甲醇至终浓度 0.5%. 每 24 h 取样,将培养液于 6 000 r/min 离心 5 min,收集上清,得粗酶液,用于初步定性测定酶活力,以筛选出有酶活的菌株. 然后将初测有酶活的菌株在 25 mL 培养基中再次诱导表达,进行酶活的定量测定.

2.6.4 重组海藻酸裂解酶活力检测

采用 3,5-二硝基水杨酸法测定酶活力^[15]. 每 24 h 吸取甲醇诱导的不同菌株的粗酶液各 100 μ L, 100 μ L 1% 褐藻酸钠溶液(pH7.0 的 1/15N 的磷酸缓冲液配制),于试管中混匀,以 100 μ L 蒸馏水替代粗酶液做空白对照实验. 置于 40 $^{\circ}$ C 水浴反应 10 min,冷却,加入 3,5-二硝基水杨酸显色剂 600 μ L,再沸水浴 10 min 显色,冷却,用蒸馏水定容至 5 mL,混匀,在 550 nm 下测定吸光度(用空白调零),OD 值越高酶活力越高. 酶活力定义:在一定温度和 pH 下,水浴保温 10 min,每分钟催化海藻酸钠水解生成 1 μ g 葡糖醛酸的酶量定义为一个海藻酸裂解酶活力单位(U).

2.7 重组毕赤酵母表达产物分析

2.7.1 SDS-PAGE

取诱导表达 120 h 的粗酶液 20 μ L,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[16],分析重组蛋白的表达情况.

2.7.2 重组海藻酸裂解酶最适反应 pH 及 pH 稳定性测定

在不同 pH 反应条件下测定重组海藻酸裂解酶的活力;将重组海藻酸裂解酶液在不同 pH 值的缓冲液中 40 $^{\circ}$ C 保温 30 min,检测剩余的酶活力. 每个反应设三个平行.

2.7.3 重组海藻酸裂解酶最适反应温度及热稳定性测定

在不同温度条件下测定重组海藻酸裂解酶的酶活力;将重组海藻酸裂解酶液在相同 pH 值不同温度下分别保温 30 min,检测剩余的酶活力. 每个反应设三个平行.

2.7.4 金属离子对重组海藻酸裂解酶活性的影响

配制 0.1 mol/dm³ 的 CoCl₂·6H₂O, MnSO₄·

H₂O, CaCl₂, KCl, NaCl, CuSO₄, FeSO₄·7H₂O, ZnCl₂ 溶液,将酶液与上述溶液混合(使终浓度分别为 1 和 10 mmol/dm³)后在 40 $^{\circ}$ C 保温 30 min,测定酶活力,以未与盐溶液混合,在 40 $^{\circ}$ C 保温 30 min 的酶液活力为 100%. 每个反应设三个平行.

3 结果

3.1 褐球固氮菌 *algL* 基因成熟蛋白编码序列的克隆及毕赤酵母表达载体的构建

3.1.1 褐球固氮菌 *algL* 基因成熟蛋白编码序列的克隆

以褐球固氮菌基因组 DNA 为模板,扩增出 *algL* 基因成熟蛋白编码序列,电泳条带大小约为 1.0 kb(图 1),与理论值(1.05 kb)相符. 将该序列连接到 pCF-T Vector 上进行测序,使用 DNAMAN 软件比对测序结果与 Genbank no. AJ223605 *algL* 基因序列,一致性为 97.24%^[15].

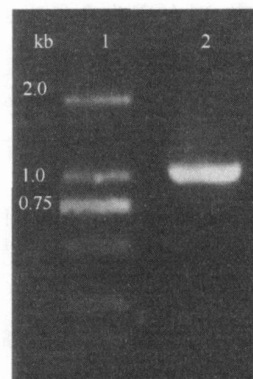


图 1 褐球固氮菌 *algL* 基因成熟编码序列的克隆

3.1.2 表达载体的构建

将 *algL* 基因成熟蛋白编码序列进行 *Eco*RI 和 *Not*I 双酶切后插入到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中,进行 *Eco*RI 单酶切(见图 2)、*Eco*RI 和 *Not*I 双酶切(见图 3)鉴定,电泳结果与理论值相符. 测序结果表明插入片段在 pPIC9K 中有正确的阅读框,表达载体 pPIC9K-*algL* 构建完成.

3.2 重组毕赤酵母的筛选和鉴定

通过在 MM 和 MD 培养基上的培养,得到的转化子大部分为甲醇利用慢型,并在含有 600 μ g/dm³ G418 的 YPD 平板上获得了 9 个高拷贝转化子. 提取重组工程菌株基因组 DNA,进行 PCR 鉴定,结果表明 *algL* 基因成熟蛋白编码序列已插入到毕赤酵母的基因组中(见图 4),保证了该基因

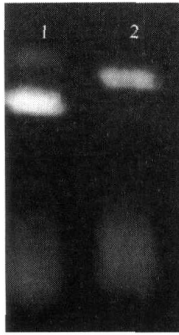


图2 重组质粒 pPIC9K- algL 的单酶切分析

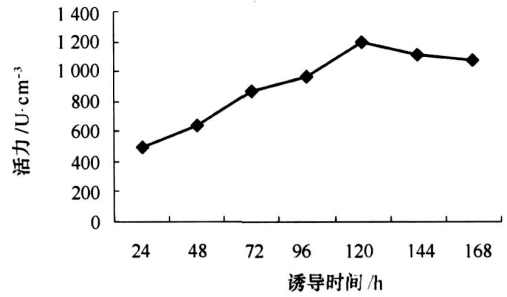


图5 重组毕赤酵母诱导产酶曲线

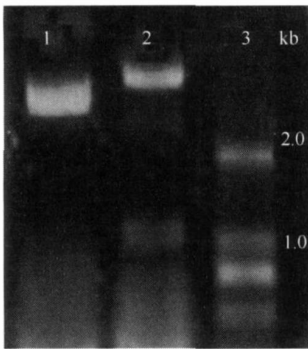


图3 重组质粒 pPIC9K- algL 的双酶切分析

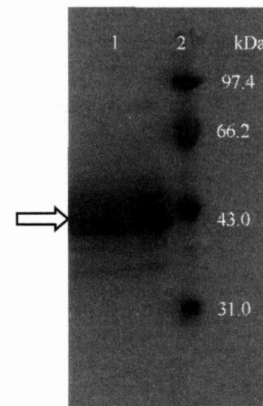


图6 重组海藻酸裂解酶的 SDS - PAGE 分析

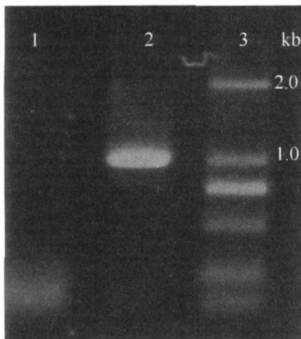


图4 重组毕赤酵母工程菌株的 PCR 鉴定

的稳定遗传.

3.3 重组毕赤酵母表达产物的分析

3.3.1 重组毕赤酵母的诱导表达和 SDS - PAGE

将初筛有酶活的菌株在诱导培养基中进行表达,每 24 h 取诱导培养物上清液 100 μ L 测定酶活力,筛选出一株酶活力最高的毕赤酵母重组工程菌,酶的活力在诱导培养 120 h 达到高峰(图 5),峰值为 1 400 U/cm^3 左右. SDS - PAGE 分析结果(图 6)表明,表达产物分子量约为 43 kDa,与文献

报道一致^[5].

3.3.2 重组海藻酸裂解酶最适反应 pH 及 pH 稳定性

在不同 pH 反应条件下测定重组海藻酸裂解酶的活力,测得该酶最适 pH 为 8.5 左右(见图 7),并在中性偏碱性条件下均具较高活性.将重组海藻酸裂解酶在不同 pH 的磷酸缓冲液中 40 $^{\circ}C$ 保温 30 min,检测剩余的酶活力,发现该酶在 pH 5.0 ~ 12.0 的条件下保温 30 min 后仍具有 60% 以上的酶活力(见图 8).

3.3.3 重组海藻酸裂解酶最适反应温度及热稳定性

在不同温度条件下测定海藻酸裂解酶的活力,发现该酶最适反应温度为 40 $^{\circ}C$ (见图 9).将重组海藻酸裂解酶的酶液分别在不同温度下保温 30 min,检测剩余的酶活力,结果表明重组海藻酸裂解酶在 20 ~ 50 $^{\circ}C$ 的条件下保温 30 min 后仍具有 95% 以上的酶活力,而在 60 $^{\circ}C$ 及以上条件下保温 30 min 酶活下降 70% 以上(见图 10).

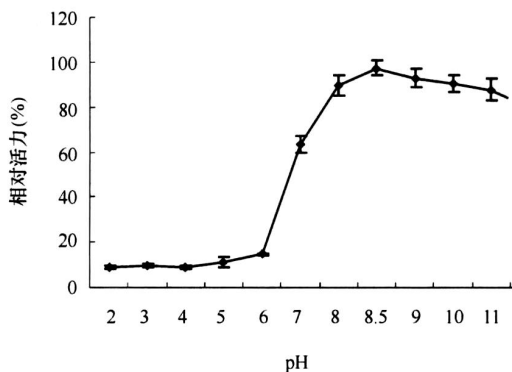


图7 pH对重组海藻酸裂解酶的活力的影响

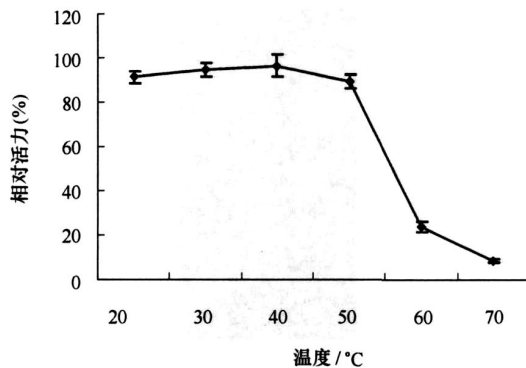


图10 重组海藻酸裂解酶的热稳定性

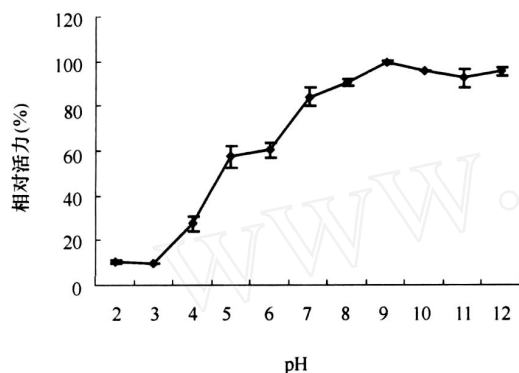


图8 重组海藻酸裂解酶的pH稳定性

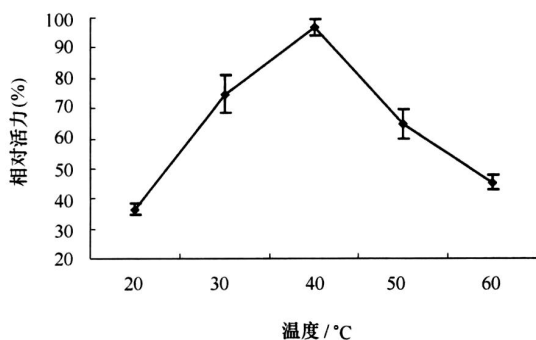


图9 温度对重组海藻酸裂解酶的活力的影响

3.3.4 金属离子对重组海藻酸裂解酶活性的影响

由图 11 可见,离子浓度为 1 mmol/dm^3 和 10 mmol/dm^3 的盐溶液对酶活力的影响有差异,除 K^+ 和 Na^+ 外, 10 mmol/dm^3 的离子浓度比 1 mmol/dm^3 对酶活力的抑制作用强,其中 10 mmol/dm^3 的 Cu^{2+} 与 Fe^{2+} 分别使酶活力丧失了近 60% 和 50% ,

10 mmol/dm^3 的 Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} 分别使酶活力丧失了 20% 左右,其他金属离子对酶活力的影响较小; 1 mmol/dm^3 的 Fe^{2+} 使酶活力丧失了近 20% ,其他金属离子对酶活力没有或有轻微的影响,剩余酶活力都在 90% 以上。

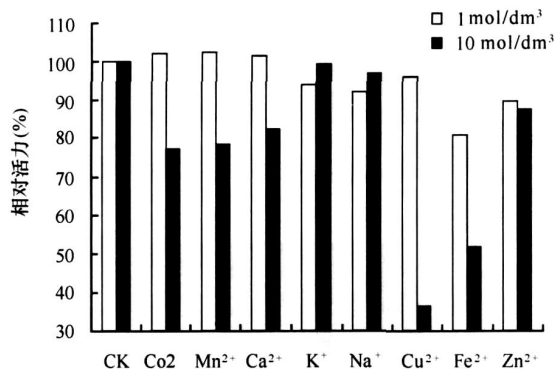


图11 金属离子对重组海藻酸裂解酶活性的影响

4 讨论

近年来国内外学者已对海藻酸裂解酶进行了广泛的研究,并将其基因在大肠杆菌中进行表达^[5,10,17],然而在大肠杆菌中表达海藻酸裂解酶基因,易受原核表达系统自身局限性的限制,如产生包涵体,无法分泌到胞外,导致酶活力不高,纯化过程复杂.巴斯德毕赤酵母表达系统是一种较为理想的真核表达系统.本实验首次采用了毕赤酵母表达系统,它具有受甲醇调控的 AOX1 基因强启动子,有效地提高了表达水平;它还能对外源蛋白进行加工、折叠,翻译后修饰,并在表达载体自身信号肽的帮助下将其分泌到培养基中,保证了外源蛋白的天然活性;毕赤酵母产生的自身分泌蛋白很少,简化了外

源蛋白的分离纯化过程^[18,19]. 若将毕赤酵母进行细胞高密度发酵,还可能更大幅度的提高表达水平,达到工业化生产与应用的要求.

通过对重组海藻酸裂解酶酶学性质的初步研究,发现该酶的最适反应温度为 40℃,比文献报道略高^[5],这可能与表达产物的糖基化有关,并且该重组酶在较强的碱性条件下也具较高活性. 另外,除 K⁺ 和 Na⁺ 外,10 mmol/dm³ 的金属离子比 1 mmol/dm³ 的对酶活力的抑制作用更为明显,因此在酶活测定时采用的是含 K⁺ 的磷酸缓冲体系,以减少外界因素对酶活力带来的影响,在实际应用时也应注意到反应环境中金属离子的浓度和种类. 本实验制备出的是粗酶液,未经纯化,酶液中的蛋白成分并不唯一,含有少量杂蛋白,可能对酶学性质的测定产生一定的影响,致使不同批次产物特性有所差异. 因此有必要对产物进行纯化后,进一步对其纯品的酶学性质进行研究.

褐球固氮菌产生的是具甘露糖醛酸(M)特异性的裂解酶,而不同来源的酶具有较强的底物专一性,在不同条件下水解不同来源的海藻酸底物,例如,一种海洋软体动物鲍鱼可产生聚古罗糖醛酸(G)特异性的裂解酶,最适反应 pH 4.0,较细菌来源的低^[20];滨螺肝脏中产生的聚甘露糖醛酸(M)特异性的裂解

酶在低盐浓度条件下最适反应 pH 偏酸性,而在较高盐浓度下最适反应 pH 偏碱性^[21];还有一些海藻和水生细菌可以产生同时具有聚甘露糖醛酸(M)和聚古罗糖醛酸(G)特异性的海藻酸裂解酶^[22,23]. 鉴于自然界中存在的海藻酸裂解酶种类众多,尚需进一步对不同生物来源具有不同酶学特性的海藻酸裂解酶进行深入研究,以适应多种底物原料与反应条件的要求.

现在海藻酸裂解酶已被广泛应用于食品、饲料、医药等工业以及科研工作中,例如,该酶能高效催化以海藻为原料的动物饲料中海藻多糖的降解,提高饲料利用率,并能生成有益寡糖,促进肠道益生环境的形成,抑制有害菌生长,起到替代多种抗生素的作用^[24];在由铜绿假单胞菌感染造成的人肺囊性纤维化症 cystic fibrosis (CF) 的治疗中,利用海藻酸裂解酶,降低菌体产生的聚甘露糖醛酸粘度,减弱致病菌在病人体内的附着能力,使疾病的治疗效果明显提高^[25,26];在海藻遗传工程研究中,由于海藻细胞壁中富含高黏度海藻多糖,使 DNA 提取非常困难,添加海藻酸裂解酶以后,海藻多糖黏度下降,细胞壁降解,方便了 DNA 的提取^[27]. 总之,随着海藻酸裂解酶的不断深入研究,将为该酶的应用提供有利的理论依据和更加广阔的前景.

参考文献:

- [1] 黄知清,严兴洪. 海藻研究开发的发展概述[J]. 海洋技术,2002,21(2):22—25.
- [2] 邓富文. 酶解技术用于马尾藻提取海藻酸工艺的研究[J]. 广西化工,1999,28(2):11—13.
- [3] 海带营养丰富功能多[J]. 保鲜与加工,2002,3(3):39.
- [4] 秦国奎,张玉忠,陈秀兰,等. 海藻酸盐裂解酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2004,24(2):26—33.
- [5] ANA P,ALBERTO P,ANYONIO P. Cloning and Expression of the *algL* Gene,Encoding the *Azotobacter chroococcum* Alginate Lyase: Purification and Characterization of the Enzyme[J]. J Bacteriol,1999,181(5):1409—1414.
- [6] HENRY I N, PATRICIA C S. Alginic acid degradation by eliminases from *abalone hepatopancreas* [J]. J Bio Chem,1967,242(5):845—851.
- [7] STEVEN R M,NEAL L S. Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: the Role of AlgL (Alginate Lyase) and AlgX[J]. J Bacteriol,1996,178(3):625—632.
- [8] HAN Feng,GONG Qian-hong,SONG Kai,et al. Sequence Analysis and Expression of Gene *alyVI* Encoding Alginate Lyase from Marine Bacterium *Vibrio* sp. QY101[J]. DNA Sequence,2004:1—8.
- [9] TOMOO S,MIWA O,YOSHIO E. Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4[J]. Carbohydr Res,1997,304:69—76.
- [10] ERTESVAG H,ERLIEN F,SKJA K-BRAEK G,et al. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase[J]. J Bacteriol,1998,180(15):3779—3784.
- [11] SHIMIZU E,OJIMA T,NISHITA K. cDNA cloning of an alginate lyase from *abalone*, *Haliotis discus hannai* [J]. Carbohydr Res,2003,338(24):2841—2852.
- [12] MADGWICK J,HAUG A,LARSEN B. Alginate lyase in the brown alga *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour [J]. Acta Chem Scand,1973,27(2):711—712.

- [13] 刘万顺,李 颀. 海洋无脊椎动物消化酶的研究 :紫贻贝、日本鲟、滨螺消化酶的初步分析和应用[J]. 山东海洋学院学报,1988,18(1):54—57.
- [14] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W(黄培堂,等译). 分子克隆实验指南上、下册[M]. 北京:科学出版社,2002. 1 949.
- [15] 袁兆慧,韩丽君,林 伟,等. 褐藻降解酶的制备及其性质研究[J]. 海洋科学,2005,29(2):78—80.
- [16] 马歇克 D R,门永 J T,布格斯 R R,等(朱厚础,等译). 蛋白质纯化与鉴定实验指南[M]. 北京,科学出版社,1999. 279.
- [17] 刘 岩,江晓路,管华诗. 褐藻胶裂解酶研究进展[J]. 中国水产科学,2001,7(4):99—103.
- [18] HONG F,MEINANDER N Q,JONSSON L J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnol Bioeng,2002,79(4):438—449.
- [19] SREEKRISHNA K,BRANKAMP R G. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Gene,1997,190(1):55—62.
- [20] NAKADA H I,SWEENEY P C. Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas[J]. Biol Chem,1967,242:845—851.
- [21] favorov vv,vozhova ei,denisenko va,et al. A study of reaction catalysed by alginate lyase VI from the sea mollusc, *Littorina* sp. [J]. Biochim Biophys Acta,1979,569:259—266.
- [22] SHIRAIWA Y,ABE K,SASAKI S F,et al. Alginate lyase activities in the extracts from several brown algae[J]. Bot Mar,1975,18:97—104.
- [23] BROWN B J,PRESTON J F III L. Guluronan - specific alginate lyase from a marine bacterium associated with *Sargassum*[J]. Carbohydr Res,1991,211:91—102.
- [24] 孙忠保,阎宏,马永军. 寡糖在动物生产中的应用[J]. 宁夏农学院学报,2004,25(4):80—84.
- [25] 柴 栋,王 睿. 藻酸盐裂解酶对粘液型铜绿假单胞菌生物被膜的影响[J]. 国外医药抗生素分册,2001,22(4):172—175.
- [26] EFTEKHAR F,SPEERT D P. Alginate Treatment of Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* Enhances Phagocytosis by Human Monocyte - Derived Macrophages[J]. Infect Immun,1988,56(11):2 788—2 793.
- [27] TOMOO S,YOSHIO E,TA KAHISA K. Application of an alginate lyase from *Alteromonas* sp. for isolation of protoplasts from a brown algae *Laminaria japonica*[J]. Nippon Suisan Gakkaishi,1993,59(4):705—709.

Secreted expression of *Azotobacter chroococcum* alginate lyase gene(*algL*) in *Pichia pastoris* and primary analysis of enzymic properties

YUE Ming¹, DING Hong-biao¹, QIAO Yu¹

(1. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: An alginate lyase gene of *Azotobacter chroococcum*, called *algL*, has been cloned with PCR technique. The sequence encoding the mature peptide of alginate lyase of *Azotobacter chroococcum* was added with *EcoRI* and *NotI*. Then the gene was inserted into the *Pichia pastoris* vector pPIC9K and introduced into the host *Pichia pastoris* GS115 by PEG method. After screen, the recombinant *Pichia pastoris* strain was obtained and induced in 25mL methylotrophic culture medium. Expression of the *algL* gene in *P. pastoris* cells resulted in the expression of alginate lyase activity (1 400 U/cm³) and the appearance of a new protein of 43 kDa detected on SDS - PAGE. To characterize the recombinant enzyme, it was found that the optimum temperature is 40 °C at pH 8.5 and that activity of alginate lyase decreased rapidly when analyzed above 60 °C. The activity of recombinant AlgL decreased by over 50% in the presence of 10 mmol/L Cu²⁺ or Fe²⁺, furthermore, 10mmol/L Co²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ or 1mmol/L Fe²⁺ decreased it by 20% respectively. Other cations including K⁺, Na⁺, Zn²⁺ did not affect significantly the enzymatic activity.

Key words: alginate lyase; *Pichia pastoris*; alga oligosaccharides; expression induced