

# 乳酸克鲁维酵母乳糖酶基因在大肠杆菌中的表达及酶学性质

徐顺清 陈杏洲 崔罗生 梁运祥 张忠明<sup>\* \*</sup>

华中农业大学生农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 通过 PCR 扩增从乳酸克鲁维酵母基因组获得乳糖酶基因 *lac4*, 将其克隆至大肠杆菌表达载体 pET-28a(+), 并在大肠杆菌 BL21 中获得表达, 酶活性达  $(44.78 \pm 2.84)$  U/mL。利用 Ni-Resin HP 亲和层析技术纯化该酶, SDS-PAGE 分析表明, 重组酶分子质量约为 122 ku。酶学性质研究表明, 该酶最适反应温度为 43 °C, 37 °C 时半衰期为 30 min, 最适反应 pH 为 7.0, 在 pH 4.0 ~ 10.0 范围内有良好的稳定性,  $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  对酶有非常明显的激活作用, 比酶活性为  $(255.55 \pm 2.32)$  U/mg, 酶反应常数  $K_m$  为 3.49 mmol/L, 最大反应速率  $v_{max}$  为 4.22 mmol/(min · mg)。

**关键词** 乳酸克鲁维酵母; 乳糖酶; 基因表达; 酶学性质

**中图分类号** Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0175-06

-半乳糖苷酶( EC3. 2. 1. 23) 学名为 -D-半乳糖苷半乳糖水解酶, 常用名为乳糖酶, 该酶能将乳糖水解成为半乳糖与葡萄糖。乳糖酶来源十分丰富, 包括多种植物、动物和微生物。现在研究和应用的乳糖酶主要来自于霉菌和酵母, 霉菌来源的乳糖酶为胞外酶, 其最适 pH 偏酸性, 而酵母来源的乳糖酶为胞内酶, 其最适作用 pH 偏中性, 适用于牛乳和鲜乳清中乳糖的水解<sup>[1]</sup>。

乳糖酶的应用领域广泛。在医药领域用于治疗乳糖不耐受症<sup>[2]</sup>; 在乳品工业中主要用于生产低乳糖牛奶、浓缩乳制品; 在环保方面可以利用于水解乳清, 减轻乳清对环境的污染。现在对于乳糖酶的研究主要集中在固定化、生产低聚糖<sup>[3]</sup>和利用基因工程技术生产乳糖酶方面。利用重组工程菌株生产乳糖酶, 实现乳糖酶的高效表达, 对乳糖酶的应用有重要意义。

本研究从乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 菌株 2. 1494 克隆得到乳糖酶 *lac4* 基因, 将其构建到原核表达载体 pET-28a(+) 上, 使乳糖酶在大肠杆菌内得到高效表达。利用 Ni-Resin HP 亲和层析技术对重组乳糖酶进行了纯化, 并且对该重组乳糖酶进行酶学性质分析, 旨在为乳糖酶的工业生产和应用奠定基础。

## 材料与方法

### 材料

乳酸克鲁维酵母菌株 2. 1494 购于中国普通微生物菌种保藏中心; pET-28a(+) 载体和大肠杆菌菌株 DH5、BL21 为笔者所在实验室保存; DNA 纯化试剂盒购于 Omega 公司; pMD18-T 载体、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶等购于 TaKaRa 公司; 蛋白质分子质量标准购于 Fermentas 公司; Ni-Resin HP 亲和填料购于北京韦氏博慧色谱科技有限公司; 其它试剂购于上海国药化学试剂有限公司和武汉华顺生物技术有限公司; 引物合成由北京奥科公司完成。

### 乳酸克鲁维酵母基因组的提取

乳酸克鲁维酵母酵母基因组 DNA 的提取参考文献[2]描述的玻璃珠-酚/氯仿方法进行。

### 乳糖酶基因的克隆和原核表达载体的构建

根据已发表的乳酸克鲁维酵母乳糖酶基因 (GenBank 登录号 M84410) 序列设计引物, 在上游引物的 5' 端引入 *Sal*I 位点, 下游引物的 5' 端引入 *Xho*I 位点 (上游引物 5' ATAGTCGACAGATGTCTTGCCTTATTCCTGA 3', 下游引物 5'

收稿日期: 2009-04-15; 修回日期: 2009-06-28

\* 浙江省重大科技攻关项目 (2004C12010) 资助

\* \* 通讯作者. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

徐顺清, 男, 1982 年生, 硕士研究生. 研究方向: 生物工程. E-mail: xshq1982@webmail.hzau.edu.cn

ATACTCGAGTTATTCAAAA GCGA GATCAAAC 3), 以基因组 DNA 为模板, 用 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增 (扩增条件: 94 4 min; 94 1 min, 50 1 min, 72 3 min, 35 个循环; 72 10 min), 回收的乳糖酶基因片段连接至 pMD18-T 载体上测序验证。

用 *Sal* 和 *Xho* 双酶切 pMD18-T-*lac4* 质粒, 切下的 3 kb 乳糖酶 *lac4* 基因片段连接到线性化的 pET-28a(+) 载体上就得到了原核重组表达质粒 pET-28a-*lac4*。

### 乳糖酶的诱导表达和 SDS-PAGE 分析

重组表达质粒 pET-28a-*lac4* 转化大肠杆菌 BL21, 挑单菌落于含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 ℃、200 r/min 过夜培养; 按 1% 接种量转接于含卡那霉素的 LB 培养基中, 继续培养至对数生长期, 直到  $D_{600\text{ nm}}$  达到 0.4~0.6 时 (约 2.5 h); 加入 IPTG 至终质量浓度为 0.1 mmol/L, 28 ℃ 诱导培养 4.5 h; 4 ℃、12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 加入合适体积的 PBS 缓冲液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4), 超声液破碎; 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清作为初酶液进行 SDS-PAGE 分析, 以未经诱导的表达菌株和用 IPTG 诱导但含有空载体 pET-28a(+) 的表达菌的菌体破碎液上清液作对照。

### 乳糖酶的纯化

将初酶液和适当体积的 Ni-Resin HP 亲和填料在低温下均匀混合 30 min, 5 000 r/min 离心 1 min 去除上清; 将填料用 3 倍体积的 PBS 缓冲液均匀混合 10 min, 离心去上清, 重复洗涤 3 次; 用 2 倍填料体积的含不同浓度咪唑的洗脱缓冲液 (30、60、100、200、500 mmol/L 咪唑; 5% 甘油; 1 × PBS 缓冲液) 依次与填料均匀混合 10 min, 离心收集上清液, SDS-PAGE 电泳检测洗脱液中蛋白量。经 SDS-PAGE 电泳检测后, 将含乳糖酶的洗脱液用 PBS 缓冲液在低温下透析脱盐 48 h, 浓缩后低温储藏备用。

### 蛋白质浓度和酶活性测定

蛋白质浓度测定采用 Bradford Assay 分析方法, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白<sup>[4]</sup>。

0.1 mL 酶液加入至 0.9 mL 0.4% 邻硝基苯酚-D-半乳糖苷 (ONPG) 溶液中, 43 ℃ 温育 5 min, 加入 1 mL 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液显色, 测定体系在 420 nm 处的光密度值, 根据酶活性标准曲线计算酶

活性。酶活性单位定义为 43 ℃、pH 7.0 条件下每分钟分解 ONPG 生成 1 μmol ONP 所需的酶量为 1 个酶活性单位 (U)。

### 乳糖酶酶学性质分析

1) 乳糖酶的最适 pH 测定。将 ONPG 底物溶于不同 pH 的一系列缓冲液 (0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液, pH 6.0、pH 6.3、pH 6.6、pH 7.0、pH 7.3、pH 7.6 和 pH 8.0; 0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液, pH 9.0) 中, 并将纯化的乳糖酶用相应的缓冲液稀释, 在 37 ℃ 条件下, 测定不同 pH 条件下的乳糖酶相对活性, 绘制乳糖酶的最适 pH 曲线。

2) 乳糖酶的最适反应温度测定。用 pH 7.0、0.1 mol/L 的磷酸缓冲液配制 ONPG 底物, 同时将纯化的乳糖酶用该缓冲液稀释, 测定在各温度条件 (25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53 ℃) 下的乳糖酶相对活性, 并绘制乳糖酶最适反应温度曲线。

3) 乳糖酶的 pH 稳定性测定。用 pH 3.0~5.0、0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液; pH 6.0~8.0、0.1 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液; pH 9.0~12.0、0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液将乳糖酶稀释, 室温放置 60 min, 再将处理后的酶液用 pH 7.0 的磷酸缓冲液稀释, 在 43 ℃、pH 7.0 的条件下测定各乳糖酶样品的残余酶活性, 以未经处理样品作为正对照, 绘制乳糖酶的 pH 稳定性曲线。

4) 乳糖酶的热稳定性测定。在 37、43、50 ℃ 条件下分别处理稀释酶液 2、4、8、15、30 min, 然后在 43 ℃、pH 7.0 的条件下测定各乳糖酶样品的残余酶活性, 以未经处理样品作为正对照, 绘制乳糖酶的热稳定性曲线。

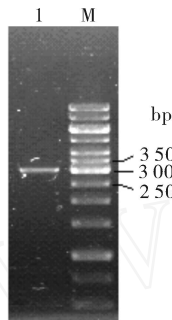
5) 测定金属离子对乳糖酶活性的影响。43 ℃、pH 7.0 的条件下, 在酶促反应中加入不同金属离子 ( $\text{K}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$ ) 至终浓度为 2 mmol/L, 测定各酶反应中乳糖酶相对酶活性, 以未加金属离子的酶反应作为对照, 研究各种金属离子对乳糖酶活性的影响。

6) 乳糖酶的  $K_m$  和  $v_{\text{max}}$  的测定在 43 ℃、pH 7.0 的条件下, 测定在不同 ONPG 底物浓度 (1、2、4、6、8、8.33 mmol/L) 下酶促反应的速率, 根据不同底物浓度及酶促反应的速率, 按 Lineweaver-Burk 作图法计算出米氏常数  $K_m$  和  $v_{\text{max}}$ 。

## 结果与分析

### 乳糖酶基因的克隆及其原核表达质粒的构建

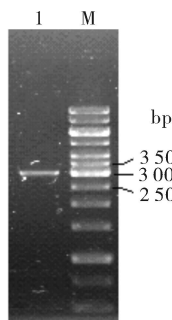
以乳酸克鲁维酵母菌株 2.1494 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测到约 3 kb 的 DNA 条带(图 1),与预期片段大小(3 078 bp)一致。回收扩增出的乳糖酶基因片段,并与 pMD18-T 载体酶连。重组质粒经 *Sal*、*Xho* 双酶切验证,出现了 3 kb 的 DNA 条带(图 2),说明乳糖酶基因已经克隆到 pMD18-T 载体上。



M. DNA 分子质量标准 DNA marker;  
1. *lac4* PCR 产物 PCR product of *lac4*.

图 1 电泳分析乳糖酶基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 Gel electrophoresis analysis of PCR product of *lac4* gene



M. DNA 分子质量标准 DNA marker;

1. 重组质粒 pMD18-T-*lac4* 经 *Sal* and *Xho* 双酶切 pMD18-T-*lac4* digested with *Sal* and *Xho*; 2. 重组质粒 pET-28a-*lac4* 经 *Sal* and *Xho* 双酶切 pET-28a-*lac4* digested with *Sal* and *Xho*.

图 2 重组质粒的酶切验证

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid with restrict digestion

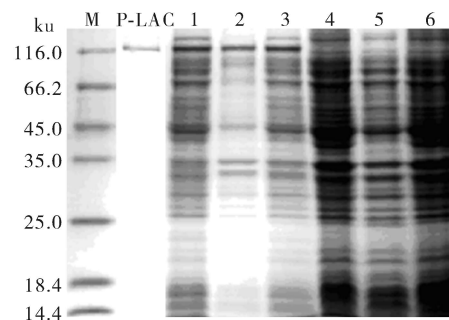
### 乳糖酶的诱导表达和 - 分析

将重组表达质粒 pET-28a-*lac4* 转化大肠杆菌 BL21,加入 IPTG 诱导乳糖酶的表达,超声波破碎后进行 SDS-PAGE 分析,同时以未经诱导的样品和

用 IPTG 诱导但含有空载体 pET-28a(+) 的表达菌作对照。结果表明,重组菌蛋白粗提物在 122 ku 附近有一明显的特异性条带(图 3-1、2、3),而对照菌的蛋白粗提物在该位置无明显条带(图 3-4、5、6),说明乳糖酶基因 *lac4* 在大肠杆菌 BL21 中得到表达,乳糖酶分子质量的理论计算值为 117.6 ku,本试验表达的乳糖酶氨基端融合了 41 个氨基酸残基,约 4.5 ku,重组蛋白分子质量应为 122 ku,与预期结果一致,表明重组蛋白被成功表达。重组乳糖酶以包涵体(图 3-2)和可溶性蛋白(图 3-1)2 种形式存在,而且 2 种形式的蛋白含量几乎相同,可溶性蛋白的存在为乳糖酶的纯化提供了方便。

### 乳糖酶的纯化

利用 Ni-Resin HP 亲和层析技术对原核表达的重组乳糖酶进行了纯化,SDS-PAGE 电泳显示,在 122 ku 附近呈现出单一的特异性条带(图 3-P-LAC),说明重组乳糖酶得到纯化,可以利用纯化的乳糖酶对乳糖酶的酶学性质进行研究。用 Bradford Assay 分析方法测定蛋白浓度,纯化的乳糖酶质量浓度为 80.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,活性为  $(20.59 \pm 0.19)$  U/mL,乳糖酶比活性为  $(255.55 \pm 2.32)$  U/mg。



M. 蛋白质分子量标准 Protein marker

P-LAC. 经  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析纯化的重组乳糖酶 Purified recombinant lactase by  $\text{Ni}^{2+}$ -chelating chromatography; 1~3. 重组菌经 IPTG 诱导细胞破碎液上清、沉淀和全蛋白 Supernatant, precipitant, total protein of recombinant strain with IPTG inducement; 4. 重组菌未经 IPTG 诱导的全蛋白 Total protein of recombinant strain without IPTG; 5~6. 加入 IPTG 诱导或未经 IPTG 诱导下重组菌 BL21/pET-28a(+) 的全蛋白 Total protein of BL21/pET-28a(+) recombinant strain induced with IPTG and without IPTG, respectively.

图 3 重组乳糖酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant lactase

### 乳糖酶的酶学性质分析

1) 乳糖酶的最适 pH 和 pH 稳定性。经在不同 pH 条件下测定重组乳糖酶的相对酶活性,得知在

pH 7.0时乳糖酶相对酶活性最大,该酶最适反应 pH 为 7.0(图 4)。

在 pH 4.0~10.0 重组乳糖酶能保持 90% 以上的残余酶活性,而在 pH 3.0 和 pH 11.0 时残余酶活性急剧下降,表明重组乳糖酶在酸性范围和碱性范围均具有良好的稳定性(图 4)。

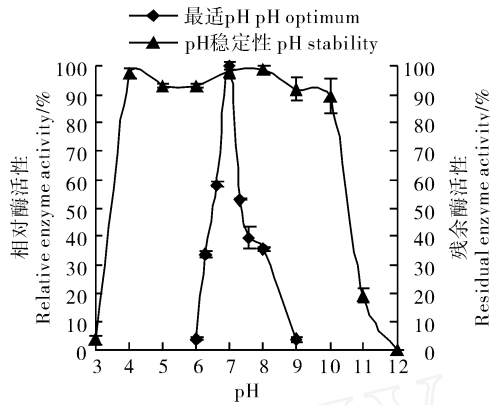


图 4 重组乳糖酶最适 pH 和 pH 稳定性曲线

Fig. 4 The pH optimum and pH stability graph of the recombinant lactase

2) 乳糖酶的最适反应温度和热稳定性。在不同温度条件下测定重组乳糖酶的相对酶活性,43 时乳糖酶的相对酶活性最高,41、45 时酶活性次之,但在 29、51 时,乳糖酶的酶活性显著降低,大约为 43 时酶活性的 50%。因此重组乳糖酶最适反应温度为 43 (图 5)。

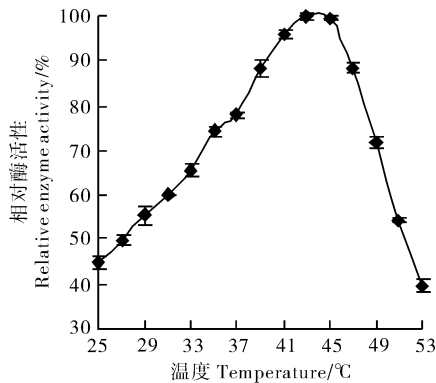


图 5 重组乳糖酶最适温度曲线

Fig. 5 The temperature optimum graph of the recombinant lactase

分别在 37、43、50 研究乳糖酶的热稳定性(图 6)。37 热处理 30 min 后,乳糖酶的残余酶活性为 50% 左右,而在 43、50 处理后,乳糖酶的活性急剧下降,43 处理 2 min 后残余酶活降低为 30%,43 处理 8 min 和在 50 处理 2 min 后残余酶活接

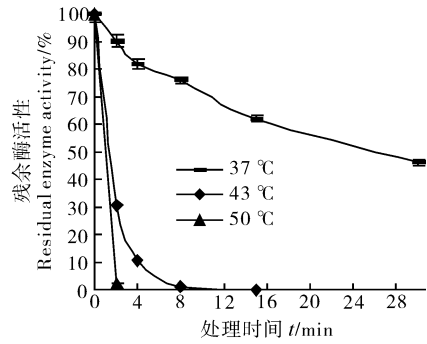
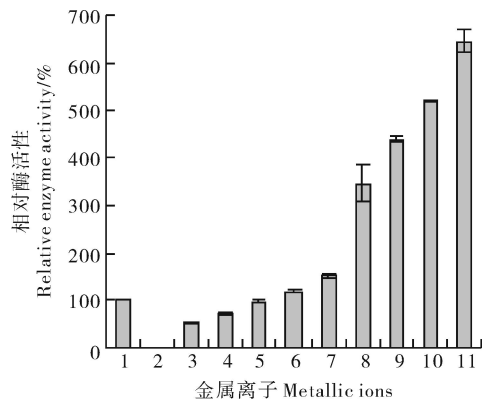


图 6 重组乳糖酶热稳定性曲线

Fig. 6 The thermostability graph of the recombinant lactase 近 0,说明 37 时乳糖酶的热稳定性较好,半衰期为 30 min,在 43、50 时酶热稳定性较差。

3) 金属离子对乳糖酶活性的影响。不同金属离子对乳糖酶活性的影响程度不同(图 7)。与不加入任何金属离子的对照(CK)相比,Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>对重组乳糖酶有非常明显的激活作用,使酶活性分别增加了 18.53%、54.49%、293.65%、347.56%、422.95%和 549.81%,K<sup>+</sup>对乳糖酶活性的影响不大,Cd<sup>2+</sup>和 Fe<sup>3+</sup>对乳糖酶活性表现出一定的抑制作用,使得乳糖酶的活性下降了 45.83%和 28.14%,而 Cu<sup>2+</sup>使乳糖酶活性完全丧失。以上数据表明该乳糖酶对金属离子表现出一定的依赖性。



1. CK; 2. Cu<sup>2+</sup>; 3. Cd<sup>2+</sup>; 4. Fe<sup>3+</sup>; 5. K<sup>+</sup>; 6. Ca<sup>2+</sup>; 7. Zn<sup>2+</sup>; 8. Fe<sup>2+</sup>; 9. Co<sup>2+</sup>; 10. Mg<sup>2+</sup>; 11. Mn<sup>2+</sup>.

图 7 金属离子对乳糖酶活性的影响

Fig. 7 Effect of metallic ions on activity of lactase

4) 乳糖酶的 K<sub>m</sub>和 v<sub>max</sub>。酶反应时间相同,底物浓度越大,乳糖酶的反应速率越快,最后随着底物浓度的增加,反应速率最后趋于平稳。根据底物浓度倒数对速率倒数作图(图 8),线性回归方程为 Y = 0.197 7X + 0.056 6, R<sup>2</sup> = 0.991,求得 K<sub>m</sub> = 3.49 mmol/L, v<sub>max</sub> = 4.22 mmol/(min · mg)。

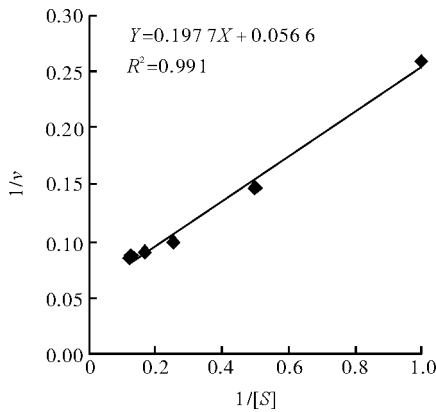


图 8 双倒数作图曲线

Fig. 8 The curve of  $1/v$  to  $1/[S]$ 

## 讨 论

乳糖酶的工业应用广泛,但工业应用的基础是要实现乳糖酶的大规模生产。现在研究者已经从利用产酶微生物发酵来生产乳糖酶转向通过基因工程技术生产乳糖酶。利用重组工程菌株实现乳糖酶的高效表达,大量生产乳糖酶,对乳糖酶的应用有重要意义。

目前,已经有细菌、真菌与酵母等微生物来源的乳糖酶通过基因工程技术实现了异源表达。由于大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、培养简单、蛋白表达量大、工艺成熟等特点,许多研究者选择大肠杆菌作为乳糖酶表达的宿主。包括类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)、嗜热古细菌(*Pyrococcus furiosus*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、嗜酸乳酸杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)等细菌来源的乳糖酶在大肠杆菌中得到表达。不同来源的乳糖酶活性有较大的差异,环状芽孢杆菌来源的乳糖酶基因在大肠杆菌中实现了高效表达,其在环状芽孢杆菌的表达量为  $20.98 \text{ U/mL}$ ,而在大肠杆菌中的表达量提高到  $33.102 \text{ U/mL}$ <sup>[5]</sup>。类芽孢杆菌来源的乳糖酶在大肠杆菌中表达量为  $25.06 \text{ U/mL}$ ,高于原始菌株的  $4.55 \text{ U/mL}$ <sup>[6]</sup>。本研究中乳酸克鲁维酵母乳糖酶在大肠杆菌中的表达量为  $(44.78 \pm 2.84) \text{ U/mL}$ ,高于以上研究的表达量。在乳糖酶的比活性研究方面,嗜热脂肪芽孢杆菌来源的耐热乳糖酶基因(*bgaB*)在大肠杆菌中表达的比酶活性为  $100 \text{ U/mg}$ <sup>[7]</sup>,苜蓿根瘤菌乳糖酶基因在大肠杆菌中表

达的比酶活性达  $55.35 \text{ U/mg}$ <sup>[8]</sup>。本研究中乳糖酶的比酶活性为  $(255.55 \pm 2.32) \text{ U/mg}$ ,与以上的研究相比,乳糖酶的比酶活性有显著提高。

毕赤酵母表达系统是表达外源基因的理想系统,外源基因在醇氧化酶基因启动子的有效调控下可以实现高效分泌表达,并且可以实现高密度发酵培养,利于工业化生产<sup>[9]</sup>,而且毕赤酵母被公认为是安全的<sup>[10]</sup>,因而毕赤酵母表达系统逐渐成为研究者表达外源基因的首选。已经有黑曲霉(*Aspergillus niger*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、亮白曲霉(*Aspergillus candidus*)、酸热脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)来源的乳糖酶在毕赤酵母中实现了高效分泌表达。张伟等构建了含有亮白曲霉乳糖酶基因的毕赤酵母工程菌株,经过  $5 \text{ L}$  发酵罐高密度发酵,蛋白表达量达  $6 \text{ mg/mL}$ ,酶活性达到  $3600 \text{ U/mL}$ <sup>[11]</sup>。李淑娟在毕赤酵母表达系统中实现了黑曲霉乳糖酶基因的高效分泌表达,酶活性达到  $271.15 \text{ U/mL}$ ,表达量达  $0.66 \text{ mg/mL}$ <sup>[12]</sup>。黑曲霉(*Aspergillus niger*)<sup>[12-13]</sup>、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)<sup>[14-15]</sup>、酿酒酵母中也实现了分泌表达,但表达效率不高。因此毕赤酵母表达系统一定会成为乳糖酶表达的有效途径。

本研究表明乳酸克鲁维酵母乳糖酶最适反应 pH 为 7.0,这与天然牛乳的 pH (pH 6.6 ~ 6.8) 较接近,在牛乳中可以发挥其最大活性,因此乳酸克鲁维酵母乳糖酶可在牛奶加工过程中用于分解牛乳及脱脂奶粉中的乳糖。在酸性范围和碱性范围内该酶均具有良好的 pH 稳定性,而且比酶活性较高,因此在乳制品工业有较大的应用前景。为了将酶表达量从  $(44.78 \pm 2.84) \text{ U/mL}$  提高到一个更高的水平,有必要选用更加高效的表达系统。在以后的研究中将构建乳酸克鲁维酵母乳糖酶的毕赤酵母工程菌株,并通过生物反应器实现乳糖酶的高效分泌表达,实现乳糖酶的大规模生产,为乳糖酶的应用奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] DOMINGUES L, TEIXEIRA J A, PENTTILA M, et al. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain secreting high levels of *Aspergillus niger* -galactosidase[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58: 645-650.
- [2] THU H N, BARBARA S, STANIMIRA K, et al. Characterization and molecular cloning of a heterodimeric  $\beta$ -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22[J].

- FEMS Microbiol Lett ,2007 ,269 :136-144.
- [3] 卢丽丽,李正义,肖敏. 微生物酶法合成低聚半乳糖的新进展[J]. 微生物学报,2008,48(7):980-985.
- [4] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem,1976,72:248-254.
- [5] 王元火,姚斌,袁铁铮,等. 环状芽孢杆菌乳糖酶基因在大肠杆菌中的表达及酶学性质分析[J]. 农业生物技术学报,2003,11(1):83-88.
- [6] 陆文伟,孔文涛,孙芝兰,等. *Paenibacillus* sp. K1 -半乳糖苷酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 山东大学学报,2008,43(6):69-73.
- [7] 龚月生,刘锦妮,王晶,等. 耐热 -半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达及酶学性质研究[J]. 西北农林科技大学学报,2008,36(10):59-66.
- [8] MADELINE L ,PATRICK V ,LIAM F ,et al. Purification and some characteristics of a recombinant dimeric *Rhizobium meliloti* -galactosidase expressed in *Escherichia coli*[J]. Enzyme and Microbial Technology ,2001 ,28 :682-688.
- [9] 黄君,张昌毅,赵述森,等. 黑曲霉内切 -1,4-葡聚糖酶在毕赤酵母中的高效表达[J]. 华中农业大学学报,2008,27(5):611-615.
- [10] TOSH O R, BRUNO M, OLLE H, et al. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the expression and production of thermostable xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus*[J]. FEMS Yeast Research ,2005 ,5 :839-850.
- [11] 张伟,范云六,姚斌. 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[J]. 微生物学报,2005,45(2):247-252.
- [12] 李淑娟. 黑曲霉乳糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[D]. 保定:河北农业大学图书馆,2007.
- [13] DOMINGUES L ,ONNELA M L ,TEIXEIRA J A ,et al. Construction of a flocculent brewer 's yeast strain secreting *Aspergillus niger* -galactosidase [J]. Appl Microbiol Biotechnol ,2000 ,54 :97-103.
- [14] MANUEL B ,ESTHER R B ,ESPERANZA C M ,et al. Engineered autolytic yeast strains secreting *Kluyveromyces lactis* -galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media[J]. Journal of Biotechnology ,2004 ,109 :131-137.
- [15] BECERRA M ,DIAZ P S ,CERDAN E ,et al. Heterologous *Kluyveromyces lactis* -galactosidase secretion by *Saccharomyces cerevisiae* super-secreting mutants [J]. Biotechnology Letters ,2001 ,23 :33-40.

## Expression and Enzymatic Properties of Lactase Gene from *Kluyveromyces lactis* in *Escherichia coli*

XU Shun-qing CHEN Xing-zhou CUI Luo-sheng LIANG Yun-xiang ZHANG Zhong-ming  
State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** The lactase gene (*lac4*) was amplified from the genome of *Kluyveromyces lactis* through polymerase chain reaction (PCR) and then cloned into *Escherichia coli* expression vector pET-28a(+), and the *lac4* gene was successfully expressed in *Escherichia coli* 21, enzyme activity reached  $(44.78 \pm 2.84)$  U/mL. The recombinant lactase was purified with affinity chromatography technology, then analyzed by SDS-PAGE, its molecular weight was approximate 122 ku. The optimal reaction conditions of lactase such as temperature, pH were 43 and 7.0, its half-life was 30 min at 37. It was very stable on the condition of pH 4.0 to 10.0, and can be greatly activated by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , its specific activity was  $(255.55 \pm 2.32)$  U/mg, the response constant  $K_m$  was 3.49 mmol/L, the maximum reaction velocity  $v_{\max}$  was 4.22 mmol/(min·mg).

**Key words** *Kluyveromyces lactis*; lactase; gene expression; enzymatic properties

(责任编辑:张志钰)