

# 溶菌酶 LyAa 在黑曲霉中的高效表达与酶学性质分析

顾力行, 王斌, 潘力\*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

**摘要:** 该研究探讨了将嗜碱顶孢霉中的 GH25 溶菌酶基因进行密码子优化后, 构建包含糖化酶信号肽的溶菌酶单拷贝和双拷贝表达载体并均由启动子 *Pnall* 控制表达, 利用双拷贝表达载体和 CRISPR/Cas9 基因编辑工具, 使用 PEG 介导转化无孢黑曲霉宿主 HL-1, 获得高酶活力的溶菌酶表达菌株。重组菌株 LyAa-C 的溶菌酶活力达到 2 291.37 U/mL, 是仅使用双拷贝表达载体的 LyAa-F 菌株酶活力 (869.74 U/mL) 的 2.63 倍, 是仅使用传统单拷贝表达载体的 LyAa-T 菌株酶活力 (358.41 U/mL) 的 6.39 倍。通过 6×His 标签使用镍柱亲和层析成功纯化了重组溶菌酶 LyAa, 并对其酶学性质进行了分析。溶菌酶 LyAa 蛋白大小约为 25.0 ku, 最适 pH 值为 4.0, 最适温度为 30 °C, 并显示出良好的胃蛋白酶稳定性。综上, 该研究基于双拷贝载体和 CRISPR 技术成功优化和提高了溶菌酶在黑曲霉中的表达。

**关键词:** 溶菌酶; 黑曲霉; 高效表达; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2023)01-41-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0258

## Efficient Expression and Enzymatic Characterization of Lysozyme LyAa in *Aspergillus niger*

GU Lixing, WANG Bin, PAN Li\*

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Single- and double-copy expression vectors of lysozyme-containing glucoamylase signal peptide, controlled by promoter *Pna II*, were constructed following codon optimization of the GH25 lysozyme gene derived from *Acremonium alcalophilum*. The double-copy expression vector and CRISPR/cas9 techniques were applied. Lysozyme expression strains with high enzyme activity levels were obtained through PEG-mediated transformation of *Aspergillus niger* host HL-1. The lysozyme activity of the recombinant LyAa-C strain reached 2 291.37 U/mL, which is 2.63 times that of the LyAa-F strain transformed by double-copy expression vector only (869.74 U/mL) and 6.39 times that of the LyAa-T strain transformed by traditional single-copy expression vector only (358.41 U/mL). The recombinant lysozyme LyAa was purified with 6×His-tagging through nickel affinity chromatography, and its enzymatic properties were analyzed. The purified lysozyme LyAa had a size of 25.0 ku, an optimal pH value of 4.0, an optimal temperature of 30 °C, and exhibited good pepsin stability. In conclusion, this study successfully optimized and improved the lysozyme expression in *Aspergillus niger* using double-copy vector and CRISPR systems.

**Key words:** lysozyme; *Aspergillus niger*; high-level expression; enzymatic characteristics

引文格式:

顾力行, 王斌, 潘力. 溶菌酶 LyAa 在黑曲霉中的高效表达与酶学性质分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(1): 41-49

GU Lixing, WANG Bin, PAN Li. Efficient expression and enzymatic characterization of lysozyme LyAa in *Aspergillus niger* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 41-49

溶菌酶 (Lysozyme, EC 3.2.1.17) 也被称作胞壁质因细胞壁裂解而死亡<sup>[1,2]</sup>, 最早由弗莱明在普通感冒

收稿日期: 2022-03-09

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2100200)

作者简介: 顾力行 (1997-), 男, 硕士, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: kulich\_scut@126.com

通讯作者: 潘力 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物遗传育种, E-mail: btlipan@scut.edu.cn

酶 (Muramidase), 能够将黏多糖水解为糖肽, 使细菌病人的鼻涕粘液中发现, 并命名为溶菌酶<sup>[3]</sup>。溶菌酶是一种天然的、性能安全良好的杀菌剂, 具有消炎、杀菌、抗病毒等功效, 在食品安全、生物医药、饲料制造等领域得到了广泛应用<sup>[4-6]</sup>。溶菌酶可以被分类为多个糖苷水解酶家族 (GH), 例如鸡蛋清溶菌酶属于 GH22 家族, 鹅蛋清溶菌酶属于 GH23 家族, 噬菌体 T4 溶菌酶属于 GH24 家族等 (详情可参看 CAZy 数据

库: <http://www.cazy.org/>)<sup>[7,8]</sup>。GH25 家族溶菌酶主要存在于微生物中,具有多种功能,例如在细胞分裂期间重塑细菌细胞壁,在噬菌体生命周期结束时溶解细菌细胞壁,以及在古细菌和真核生物中存在抗菌作用<sup>[9-11]</sup>。这一系列许多溶菌酶的编码基因包括了分泌信号肽,所以大多数溶菌酶可分泌到胞外。目前数据库中共有超过 10 000 个 GH25 家族溶菌酶序列,绝大多数是细菌来源的,只有极少数来自真核生物<sup>[12-15]</sup>。

嗜碱顶孢霉 (*Acremonium alcalophilum*, 又称 *Sodiomyces alcalophilus*) 是一种最早由日本研究人员从自然环境中分离出<sup>[16]</sup>的生长在碱性环境中的真菌。其基因组序列存在大量编码物质降解酶的基因,例如脂肪酶、木质纤维素酶、溶菌酶等。嗜碱顶孢霉编码表达的 GH25 溶菌酶可以有效地降解微生物细胞壁中的肽聚糖,在动物实验上被证明没有毒性,动物无不良反应,没有皮肤和眼睛刺激性,可被天然降解<sup>[17-20]</sup>。根据测试,该溶菌酶有很好的胃蛋白酶稳定性,而目前市面上主要出售的鸡蛋清溶菌酶则容易被胃蛋白酶降解。该酶能够分解肠道中堵塞绒毛的肽聚糖,增加肠道对营养物质的吸收,被广泛应用于饲料领域。由于其抗菌谱相比鸡蛋清溶菌酶较窄,无生物毒性,所以在提升饲料利用率的同时不会破坏正常的肠道菌群<sup>[17]</sup>。

黑曲霉 (*A. niger*) 作为典型的丝状真菌,胞外蛋白分泌能力十分优秀,且拥有发酵成本低、菌株能自我修饰翻译后的蛋白等优点,能被用作外源蛋白表达宿主<sup>[21-23]</sup>。黑曲霉相比大肠杆菌拥有更完备的蛋白分泌和修饰能力,相比甲醇诱导酵母则更具有安全性<sup>[24]</sup>。黑曲霉是一种安全生产菌株,在实际生产活动中也被用来生产酶制剂<sup>[25]</sup>。黑曲霉的传统基因编辑技术效率较低,是限制黑曲霉表达技术发展的一个重要因素。

近年来,新出现的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术得到了进一步发展<sup>[26]</sup>,并应用于各种丝状真菌,包括黑曲霉的基因敲除和定向改造<sup>[27]</sup>。在该系统中,在单导向 RNA (sgRNA) 的指导下,Cas9 被特异性地引导到基因组目标位点,包括 sgRNA 原间隔区的 20 bp 序列互补碱基对和下游 3 bp 原间隔区相邻基序序列,切割基因组 DNA 以引入双链断裂。如果同时提供 DNA 修复模板,断裂处可由菌株自行修复<sup>[28-32]</sup>。

本研究使用无孢黑曲霉 (*A. niger*) HL-1 作为表达宿主,利用黑曲霉的杂合启动子 (*PnII*) 和经过密码子优化的溶菌酶 *LyAa* 基因进行载体构建,使用双拷贝表达载体和 CRISPR/Cas9 工具提高溶菌酶基因表达和整合效率,筛选得到高表达菌株。通过在溶菌酶的 C 端添加 6×His 标签来进行纯化,研究了纯化后溶

菌酶的酶学性质,旨在为真菌来源 GH25 溶菌酶的规模化制备和应用提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Match1 T1 购自美国 Invitrogen 公司;黑曲霉表达宿主 *A. niger* HL-1 (*ΔpyrG*) 为本实验室构建并保存;抑菌试验所使用的细菌:溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*, ATCC 4698) 购自广州市微生物研究所;曲霉 UEV 表达载体 (杂合启动子 *PnII*、终止子 *Tref*、营养缺陷型筛选标记 *pyrG* 和淀粉酶 *amyA* 下游同源臂) 为本实验室构建并保存。

#### 1.1.2 试剂

快速核酸内切酶 (如 *XbaI*) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;UDP (尿苷二磷酸) 及 UDPG (尿苷二磷酸葡萄糖) 均购于上海颀心实验室设备有限公司;氨苄青霉素 (Amp) 和胃蛋白酶购于北京普博欣生物科技有限公司;Prime STAR Max DNA Polymerase、Protein Marker 26630 和 DNA Marker (1 kb DNA Ladder 和 DL 10000<sup>TM</sup>) 购于日本 TaKaRa 公司。

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基 (*m/m*): 1% 氯化钠、1% 胰蛋白胨、0.5% 酵母提取物 (固体加 2% 琼脂粉)。

察氏 (CD) 培养基 (*m/m*): 2% 葡萄糖、0.3% NaNO<sub>3</sub>、0.2% KCl、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、琼脂粉 (液体 0.05%, 固体 2%), pH 值 5.5。

DPY 培养基 (*m/m*): 2% 葡萄糖、1% 蛋白胨、0.5% 酵母提取物、0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。

蔗糖高渗培养基 (上层培养基 0.5% 琼脂, 下层培养基 2% 琼脂, *m/m*): 40% 蔗糖、0.3% NaNO<sub>3</sub>、0.2% KCl、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 值 5.5。

发酵培养基: 5% 玉米粉、3% 玉米浆、2% 黄豆粕粉。

#### 1.1.4 引物

引物 (表 1) 用于 PCR 扩增片段和曲霉基因组验证。

### 1.2 仪器与设备

梯度聚合酶链式反应仪 Veriti 96-Well Thermal Cycler 购于美国 Applied Biosystems 公司;M200 多功能微孔板检测器购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;浸入式水平电泳槽系统购于美国 Bio-Rad 公司;离心机、移液枪购于德国 Eppendorf 公司。

表1 引物

Table 1 Primer

引物名称	引物序列(5'-3')	碱基数
<i>Pna II</i> -F	tcatatggattGGGCCCGATAATTCATGGTGTTTTGATCATTTTAA	46
<i>Pna II</i> -R	CCCAGTTGTGTATATAGAGGA	21
<i>LyAa</i> -F	CCTCTATATACACAACCTGGGATGTCGTTCCGATCTCTACTCG	42
<i>LyAa</i> -R	TCAcaccaccaccaccacATCACCGTTAGCGAGAGCGC	41
<i>LyAaR</i> -R	cggcataaatcgaatgctccgcTCAcaccaccaccacca	41
<i>Pna IID</i> -F	gcgcggttctcggaggaattgcAATTCATGGTGTTTTGATCATTTTAA	47
<i>LyAaD</i> -R	TCAcaccaccaccacca	20
<i>TglaA</i> -F	actatagcgaaatggattgattgTCAcaccaccaccacca	44
<i>TglaA</i> -R	GCGGCCGCAGATCTCCATGGcggttgactggagctgcagag	42
<i>Tief</i> -R	cgtgcatacaaaattcatccaatacGCGGCCGCAGATCTCCATGG	46

### 1.3 方法

#### 1.3.1 目的基因序列的优化与克隆

在 GenBank 可搜索到嗜碱顶孢霉 GH25 溶菌酶氨基酸序列 (GenBank Accession id: MN603156), 将基因序列根据黑曲霉密码子偏好进行优化, 将序列发送至生物公司合成并连接至通用载体。以合成的目的质粒为模板, 使用引物 *LyAa*-F 和 *LyAa*-R 扩增溶菌酶基因 *LyAa* (在目的基因的 C 端加入 6×His 标签)。PCR 过程中使用不易引起突变的高保真酶, 将获得的产物进行电泳验证无误后回收, 保存于 -20 °C 冰箱备用。

#### 1.3.2 溶菌酶表达载体构建

##### 1.3.2.1 溶菌酶传统单拷贝表达载体构建

将溶菌酶基因 *LyAa*、杂合启动子 *Pnall* 和经过酶切线性化的通用载体 UEV (包含 *Tief* 终止子、*pyrG* 筛选标记和 *amyA* 下游同源臂) 使用 HiFi DNA 连接酶将各个片段连接成质粒载体, 与大肠杆菌感受态细胞在 42 °C 热激 90 s, 加入适量液体 LB 进行培养后, 涂布氨苄抗性平板 37 °C 放置 12 h。将长出的单菌落挑至孔板培养, 经过菌液电泳、提质粒快速酶切验证、测序验证后, 根据结果筛选出与图谱相符的表达载体。将构建成功的表达载体命名为 pUEV-*LyAa*。

##### 1.3.2.2 溶菌酶双拷贝表达载体构建

在黑曲霉中, 同向相连的重复片段由于同源重组的原因, 会导致其中一个片段的丢失。构建双拷贝载体时, 在溶菌酶单拷贝表达载体的基础上, 在 *Tief* 终止子与 *pyrG* 筛选标记之间插入一段包含杂合启动子 *Pnall*、溶菌酶基因 *LyAa* 和糖化酶终止子 *TglaA* 的反向片段, 两终止子末端相连处含有 20 bp 的酶切位点。以 1.3.2.1 节中描述的构建方法, 筛选出正确的表达载体命名为 pUEV-*LyAaD*。

#### 1.3.3 溶菌酶表达菌株的构建与筛选

将溶菌酶表达载体经过质粒大量提取, 用核酸内切酶 *Apa I* 反应 6 h 后, 纯化并浓缩。使用 PEG 介导法转化宿主 (黑曲霉 *A.niger* HL-1) 原生质体, 将含有原生质体的蔗糖软琼脂分散涂布于三个培养基平板上, 30 °C 放置 7 d 后长出菌落。挑选转化子于固体 CD 平板上继续培养, 并挑取部分转化子在 DPY 培养基提取基因组。以转化子基因组模板, PCR 验证目的基因表达框是否已整合到转化子的基因组上, 筛选出正确的溶菌酶表达菌株, 将正确的转化子经过低速研磨后接种液体 CD 培养基。

#### 1.3.4 使用双拷贝表达载体和 CRISPR/Cas9 工具提高溶菌酶的表达量

双拷贝表达载体同样经过核酸内切酶 *Apa I* 处理后与质粒 Cas9-H 进行共转化。质粒 Cas9-H 能够使黑曲霉合成出 Cas9 蛋白和 sgRNA, 切割位点位于淀粉酶 *amyA* 基因内, 带有 *hyg* 潮霉素筛选标记。使用 1.3.3 节方法筛选, 但需要在蔗糖高渗培养基中加入潮霉素 (2 μL/mL), 可得到相应的阳性转化子。转化时仅使用双拷贝表达载体可得另一组阳性转化子。

#### 1.3.5 溶菌酶重组表达菌株的摇瓶发酵及酶活测定

##### 1.3.5.1 比浊法

溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*, ATCC4698) 的细胞壁富含肽聚糖, 可以被用作实验菌, 溶菌酶可使细菌裂解而让菌悬液的 450 nm 吸光度降低。在 550 mL 容量瓶中加入 20.125 mL 的 1.0 mol/L 磷酸氢钾溶液、7.375 mL 的 1.0 mol/L 磷酸氢二钾溶液, 加入超纯水定容, 使用 1 mol/L KOH 或 1 mol/L HCl 在 25 °C 下将 pH 值调节至 6.24, 缓冲液在常温下保存。将 20 mg 菌粉与 100 mL 缓冲液混合均匀, 于 30 °C 培养 30 min,

菌悬液的  $A_{450\text{nm}}$  保持在  $0.70 \pm 0.1$  内。将鉴定正确的溶菌酶菌株在液体淀粉发酵培养基中发酵 6 d ( $30\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $250\text{ r/min}$ ),  $10\ 000 \times g$  离心 10 min, 收集上清液。吸取  $100\ \mu\text{L}$  上清液与  $2.5\ \text{mL}$  菌悬液混合均匀, 观察和记录  $A_{450\text{nm}}$  的下降值, 根据下列公式计算酶活。

$$B = \frac{(\Delta A_1 - \Delta A_0) \times df}{0.001 \times 0.1} \quad (1)$$

式中:

$B$ —酶活,  $\text{U/mL}$ ;

$\Delta A_1$  测试样品在  $450\ \text{nm}$  处每分钟吸光度下降值;

$\Delta A_0$  空白样品在  $450\ \text{nm}$  处每分钟吸光度下降值;

$df$ —稀释因子;

$0.001$ —单位定义中的吸光度 ( $\Delta A$ ) 变化;

$0.1$ —酶溶液的体积 (以毫升计) [33]。

### 1.3.5.2 平板涂布法

将溶壁微球菌接种 LB 培养基, 于  $30\text{ }^\circ\text{C}$  培养至  $450\ \text{nm}$  吸光度为  $0.5$  左右, 用 LB 培养基稀释 100 倍, 取  $1\ \mu\text{L}$  与  $100\ \mu\text{L}$  发酵上清液充分混合后在  $30\text{ }^\circ\text{C}$  培养 2 h, 取  $30\ \mu\text{L}$  涂布 LB 固体平板,  $30\text{ }^\circ\text{C}$  放置 12 h 后计算菌落数量。将宿主发酵上清液与细菌混合后进行相同处理, 作为阴性对照 [34]。

### 1.3.5.3 牛津杯法

将  $10\ \text{mL}$  LB 培养基倒入培养皿, 凝固后充当下层板, 再加入  $5\ \text{mL}$  与一定浓度菌悬液混合的 LB 培养基, 凝固后充当上层版。用镊子把牛津杯放到培养基表面, 杯口朝上, 并且牛津杯与培养基之间无空隙, 在杯中加入  $200\ \mu\text{L}$  发酵上清液,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养 12 h。发酵上清液以牛津杯为中心进行扩散, 离杯越近溶菌酶浓度越高, 在高浓度溶菌酶下细菌会裂解死亡。经过一段时间后可明显看到抑菌圈, 用尺量出透明圈的大小, 范围越大说明活性越强 [35]。

### 1.3.6 溶菌酶蛋白纯化和 SDS-PAGE 分析

构建载体时溶菌酶 LyAa 带有  $6 \times \text{His}$  标签, 可使用镍柱通过亲和层析的方式纯化溶菌酶蛋白。在发酵培养基中将目的菌株培养 6 d, 将发酵培养基高速离心取上清, 重复两次后, 用  $0.45\ \mu\text{m}$  的滤膜过滤。使用 HisTrap™ HP 层析柱进行亲和层析, 进样量为  $30\ \text{mL}$ , 流速设置  $1\ \text{mL/min}$ 。使用不同浓度的咪唑 buffer 进行洗脱, 将各个不同浓度的洗脱峰收集至  $15\ \text{mL}$  离心管。离心管中取  $40\ \mu\text{L}$  与  $10\ \mu\text{L}$   $5 \times \text{loading buffer}$  混合后, 煮沸 10 min, 取  $10\ \mu\text{L}$  反应液进行 SDS-PAGE 检测。根据每个洗脱峰检测结果, 得到单一的溶菌酶溶液。

### 1.3.7 溶菌酶的酶学性质研究

#### 1.3.7.1 温度对溶菌酶的影响

最适温度的测定: 在 pH 值 4.0 的条件下, 配置不

同温度梯度  $20$ 、 $25$ 、 $30$ 、 $35$ 、 $40$ 、 $45$ 、 $50$ 、 $60$ 、 $70$ 、 $80\text{ }^\circ\text{C}$  的菌悬液与酶液混合反应, 根据  $450\ \text{nm}$  吸光度的降低值来确定溶菌酶的最适温度, 以  $450\ \text{nm}$  吸光度最大降低值为  $100\%$ 。温度稳定性测定: 配置  $65$ 、 $70$ 、 $75$ 、 $80\text{ }^\circ\text{C}$  的菌悬液进行相同操作, 以各组加热  $0\ \text{min}$  时所得的  $450\ \text{nm}$  吸光度降低值为  $100\%$ 。

#### 1.3.7.2 pH 值对溶菌酶的影响

最适 pH 值的测定: 在 pH 值为  $3.0$ 、 $3.5$ 、 $4.0$ 、 $4.5$ 、 $5.0$ 、 $5.5$ 、 $6.0$ 、 $6.5$ 、 $7.0$ 、 $8.0$ 、 $9.0$ 、 $10.0$  的菌悬液中, 根据反应时  $450\ \text{nm}$  吸光度的降低值来确定溶菌酶的最适 pH 值, 以  $450\ \text{nm}$  吸光度最大降低值为  $100\%$ 。pH 值稳定性测定: 酶液在相应 pH 值下孵育 3 h, 进行相同操作, 以各组孵育  $0\ \text{min}$  时所得的  $450\ \text{nm}$  吸光度降低值为  $100\%$ 。

#### 1.3.7.3 溶菌酶的胃蛋白酶稳定性

将溶菌酶 LyAa 与母鸡蛋白溶菌酶在胃蛋白酶缓冲液 ( $100\ \text{mmol/L}$  甘氨酸-HCl, pH 值 4.0) 中处理  $0$ 、 $15$ 、 $30$ 、 $60\ \text{min}$  后, 在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  下根据  $450\ \text{nm}$  吸光度的下降来确定溶菌酶的残留活性。在胃蛋白酶缓冲液中孵育结束后添加终止液使胃蛋白酶失活。以在处理  $0\ \text{min}$  时的活性为  $100\%$ 。

### 1.3.8 数据处理与分析

所有数据均重复三次, 取平均值后进行数据分析与处理, 图表制作使用误差线, 并使用 Origin 软件绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶菌酶 LyAa 的三维结构预测与分析

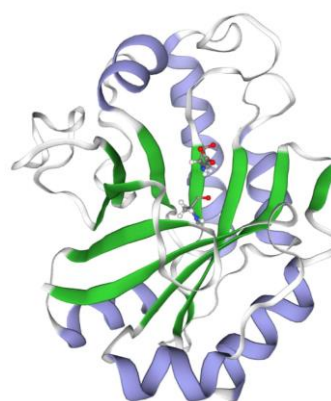


图 1 LyAa 溶菌酶的三维结构预测

Fig.1 Three-dimensional structure prediction of LyAa protein

溶菌酶 LyAa 的基因 (Genbank: MN603156) 编码包含 208 个氨基酸的 GH25 溶菌酶成熟肽 (不包含信号肽)。SWISS MODEL 蛋白质三维建模服务器预测后 (模板 PDB: 6zm8), 结果 (图 1) 显示, 溶菌酶 LyAa 含有  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠 (使用不同颜色标注),

拥有包括 Asp95 和 Glu97 两个残基形成活性中心（由单独的球棍模型标注）。在结构模型中，最后三股  $\beta$  链以无螺旋的环状相连接，而最后的  $\beta$  链以平行相反的方向连接，在活性位点残基所在的位置形成一个经典的桶状褶皱，活性位点残基位于桶状褶皱的前半部分。这种结构是一种特异性  $\beta\alpha$  折叠，也是 GH25 溶菌酶的特色结构，最早被发现于天蓝色链霉菌的溶菌酶<sup>[36]</sup>。虽然溶菌酶 LyAa 拥有 N-糖基化位点，但溶菌酶 LyAa 没有在这些结构位点发生糖基化<sup>[20]</sup>。经预测，该多肽的理论分子量为 24.9 ku、等电点为 8.4。

### 2.2 溶菌酶 LyAa 的系统进化分析

将 LyAa 与其它真菌来源的 GH25 溶菌酶进行多序列比对，并采用邻接法构建系统发育进化树。结果显示(图 2)，嗜碱顶孢霉 (*Acremonium alcalophilum*) 与毛霉菌亚门 (*Mucoromycotina* sp.) 和拟青霉 (*Paecilomyces* sp.) 等聚为一支，绿僵菌属 (*Metarhizium* sp.) 等聚为另一小支，罗斯曼枝穗菌 (*Clonostachys rosmaniae*) 等聚为第三小支。

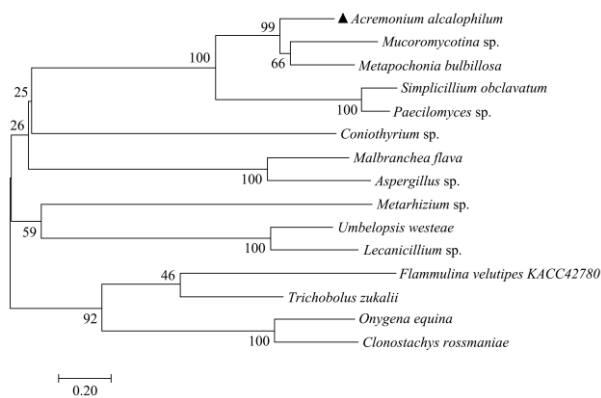


图 2 不同真菌来源 GH25 溶菌酶的系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of GH25 lysozyme from different fungal sources

### 2.3 溶菌酶 LyAa 的载体构建与表达菌株的筛选

将溶菌酶基因在 SignalP 5.0 服务器上预测信号肽，发现其 N 端含有分泌信号肽，用黑曲霉中高表达的 glaA 糖化酶信号肽进行替换。按照 1.3.2 节的方法构建溶菌酶 LyAa 单拷贝和双拷贝表达载体 (图 3a、3b)。质粒载体经过内切酶 *Apa I* 处理后，进行电泳验证，pUEV-LyAa 应有 4 200 bp 与 2 800 bp 条带，pUEV-LyAa 应有 6 200 bp 与 2 800 bp 条带，结果显示符合预期 (图 3c、3d)。测序结果显示，两个表达载体未发现突变，已成功构建。按照 1.3.3 节的方法筛选得到重组菌株，经提取基因组 PCR 验证正确后获得阳性转化子。

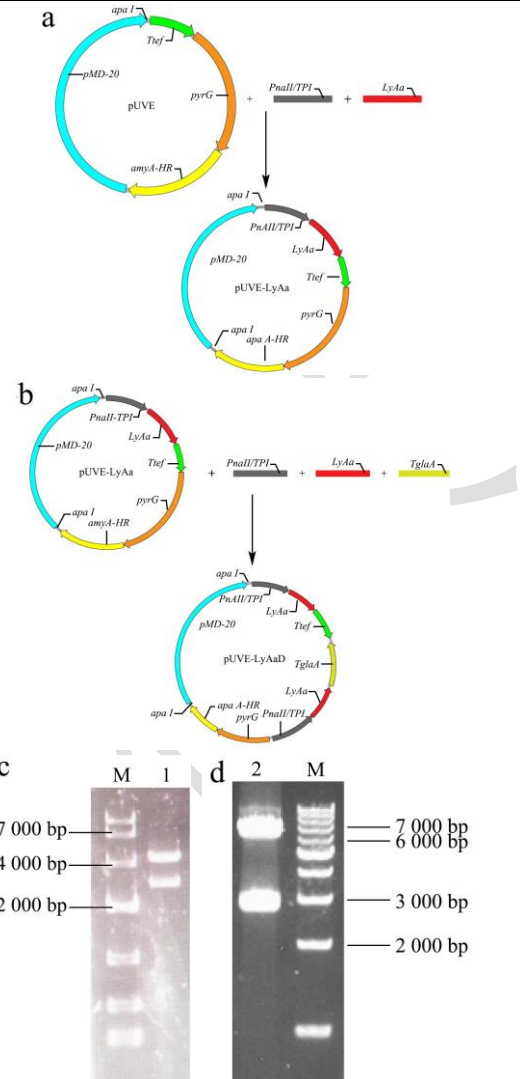


图 3 溶菌酶 LyAa 的载体构建与表达菌株的筛选

Fig.3 Vector construction of lysozyme LyAa and screening of expression strain

注：a 单拷贝表达载体 pUEV-LyAa 的构建图谱；b 双拷贝表达载体 pUEV-LyAaD 的构建图谱；c 重组质粒 pUEV-LyAa 的酶切鉴定；d 重组质粒 pUEV-LyAaD 的酶切鉴定。(M 为 DNA Marker；1 为 pUEV-LyAa 酶切；2 为 pUEV-LyAaD 酶切)。

### 2.4 溶菌酶 LyAa 表达量的提升

为了进一步提高 LyAa 的表达水平，使用双拷贝质粒 pUEV-LyAaD 与 CRISPR/Cas9 工具进行共转化作为表达策略。将双拷贝片段整合到表达菌株淀粉酶的多个位点，得到不同拷贝数的表达菌株。结果表明 (图 4A、4B)，使用双拷贝表达载体 pUEV-LyAaD 与 CRISPR/Cas9 工具进行共转化的转化子 (LyAa-C) 的蛋白条带最浓，仅使用双拷贝表达载体 pUEV-LyAaD 的转化子 (LyAa-F) 的蛋白条带浓度次之，仅使用传统单拷贝表达载体 pUEV-LyAa 的转化子 (LyAa-T) 蛋白条带浓度最淡。各表达菌株酶活力均在 6 d 达到最高，

LyAa-T 的酶活力最高为 358.41 U/mL, LyAa-F 的酶活力最高为 869.74 U/mL, 约为 LyAa-T 的 2.43 倍。LyAa-C 的酶活力最高为 2 291.37 U/mL, 约为 LyAa-F 的 2.63 倍, 约为 LyAa-T 的 6.39 倍。宿主对照几乎检测不到酶活力。平板涂布法检测酶活力, 结果显示 (图 4C), LyAa-C 发酵上清液形成的菌落数最少, 约为 20 个; LyAa-F 发酵上清液形成的菌落数约为 50 个; LyAa-T 发酵上清液形成的菌落数约为 90 个; 宿主对照菌落数约为 160 个。牛津杯法检测酶活力, 结果显示 (图 4D), LyAa-C 发酵上清液形成的溶菌圈直径约为 7.9 mm, LyAa-F 发酵上清液形成的溶菌圈直径约为 6.8 mm。

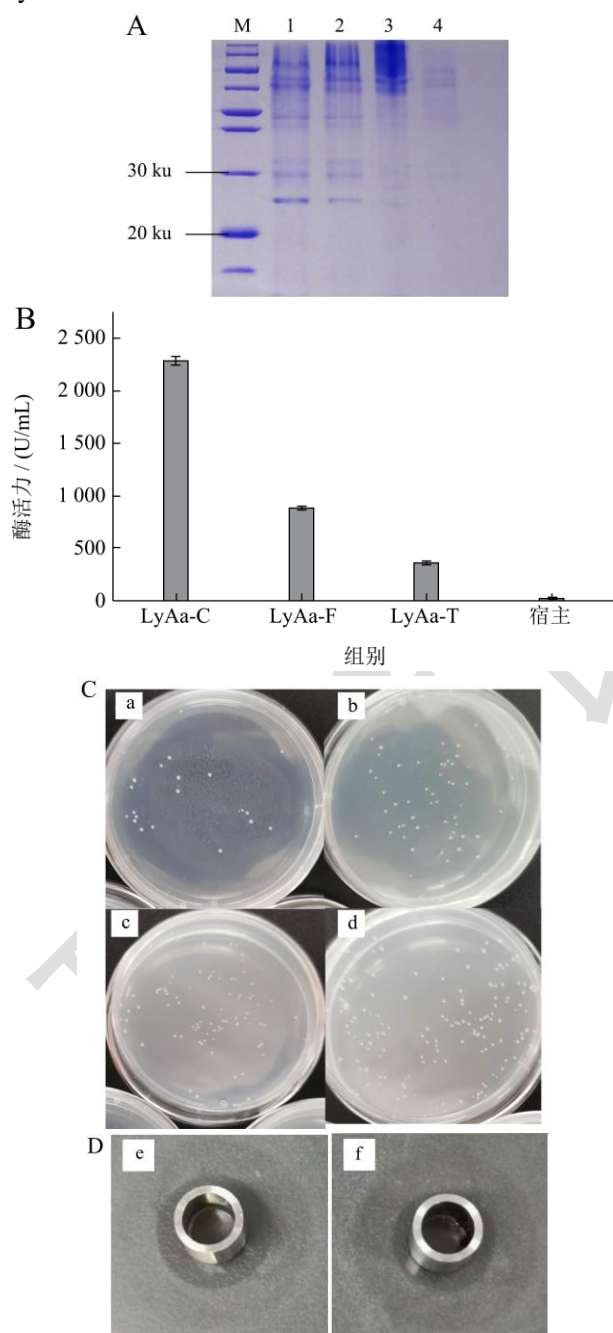


图 4 溶菌酶 LyAa 表达量的提升

Fig.4 Increasing the expression of lysozyme LyAa

注: A 各菌株发酵上清液的 SDS 分析 (M 为蛋白 Marker 26630; 1~3 为 LyAa-C、LyAa-F、LyAa-T 的 6 d 发酵上清液; 4 为宿主); B 各菌株发酵上清液酶活力柱状图; C 平板涂布法检测各菌株发酵上清液酶活力 (a 为 LyAa-C; b 为 LyAa-F; c 为 LyAa-T; d 为宿主); D 牛津杯法检测 LyAa-C 和 LyAa-F 的发酵上清液酶活力 (e 为 LyAa-C; f 为 LyAa-F)。

## 2.5 溶菌酶 LyAa 的纯化

使用镍柱进行纯化, 通过不同洗脱峰, 得到单一溶菌酶蛋白样品, 并进行 SDS-PAGE 检测 (图 5), 泳道 1 为纯化后的 LyAa 溶菌酶, 蛋白分子量大小约为 25.0 ku, 与预测结果大小相同。

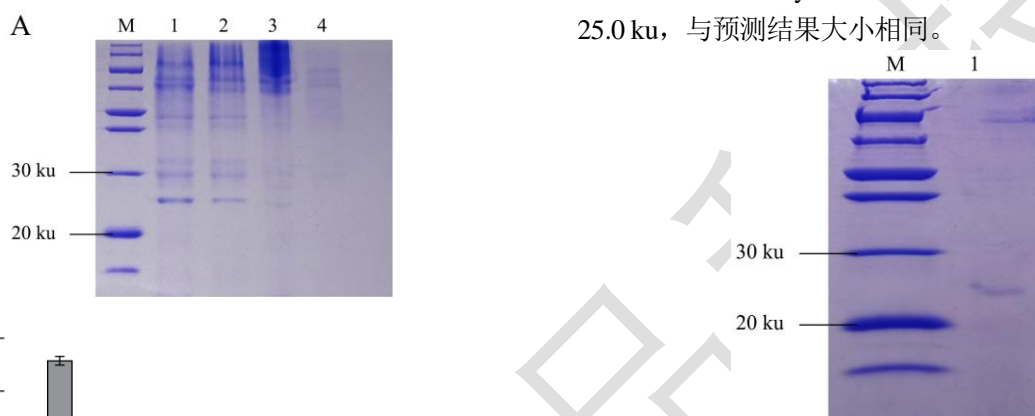


图 5 溶菌酶 LyAa 的纯化

Fig.5 SDS-PAGE profile of purified LyAa

注: M 为 26630 蛋白质 Marker; 1 为镍柱纯化后的 LyAa 蛋白条带。

## 2.6 溶菌酶 LyAa 的酶学性质

### 2.6.1 温度对 LyAa 酶活力的影响

溶菌酶 LyAa 在 30 °C 达到最适温度, 温度逐渐升高的过程中酶活不断降低 (图 6a)。溶菌酶在温度 25~70 °C 有较好的热稳定性, 在此范围内处理 60 min 后仍能保持 80% 以上的相对酶活力, 超过 75 °C 后相对酶活力下降速度较快 (图 6b)。

### 2.6.2 pH 值对 LyAa 酶活力的影响

溶菌酶 LyAa 在 pH 值为 4.0 时酶活力达到最高, 在 pH 值为 3.5~5.0 时保持着 80% 以上的相对酶活力 (图 7a)。同样在 pH 值为 3.5~5.0 时, 孵育 3 h 后仍保持 80% 以上相对酶活力 (图 7b)。

### 2.6.3 胃蛋白酶对 LyAa 与母鸡蛋白溶菌酶酶活力的影响

将 LyAa 与母鸡蛋白溶菌酶在胃蛋白酶缓冲液中处理后测定剩余活性。结果显示 (图 8), 在 15 min 后, 母鸡蛋白溶菌酶的酶活力就大大降低, 60 min 后相对酶活力已经不足 10%。而 LyAa 在处理 60 min 后的相对酶活力变化很小, 显示出良好的胃蛋白酶稳定性。

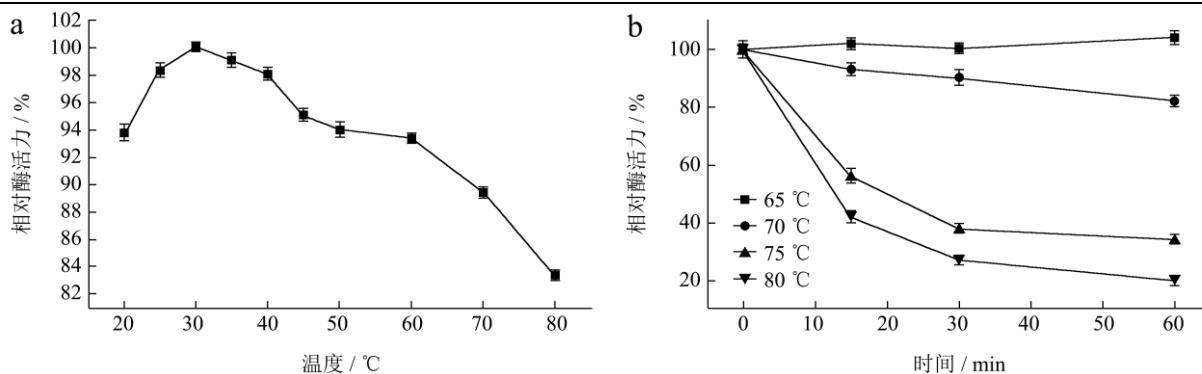


图 6 温度对 LyAa 酶活力的影响

Fig.6 Effect of temperature on LyAa enzyme activity

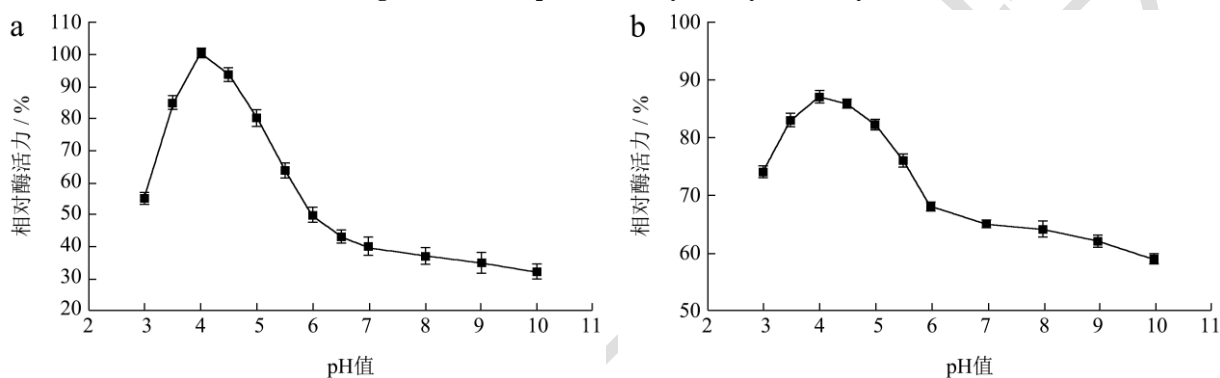


图 7 pH 值对 LyAa 酶活力的影响

Fig.7 Effect of pH value on LyAa enzyme activity

注: a 为 pH 值对酶活力的影响; b 为溶菌酶 LyAa 的 pH 值稳定性。

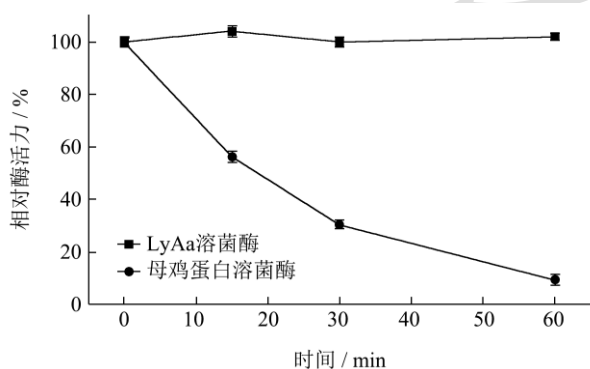


图 8 胃蛋白酶对 LyAa 与母鸡蛋白溶菌酶酶活力的影响

Fig.8 Effects of pepsin on the enzyme activity of LyAa and hen protein lysozyme

### 3 结论

黑曲霉的胞外蛋白分泌量大, 在菌株内部能够对蛋白进行修饰, 且无生物毒性, 是表达外源分泌蛋白的优良宿主。本研究将来自嗜碱顶孢霉的 GH25 基因根据黑曲霉的偏好进行密码子优化后, 将基因原有的信号肽替换成黑曲霉的糖化酶信号肽并将其置于杂合启动子 *Pnall* 控制下表达构建单拷贝表达载体和双拷贝表达载体。仅使用单拷贝载体得到的菌株 LyAa-T 摇瓶发酵酶活力为 358.41 U/mL, 仅使用双拷贝载体

得到的菌株 LyAa-F 摇瓶发酵酶活力为 869.74 U/mL, 是 LyAa-T 的 2.43 倍。使用双拷贝载体并借助 CRISPR 工具整合获得多拷贝的菌株 LyAa-C 摇瓶发酵酶活力为 2 291.37 U/mL, 是 LyAa-F 的 2.63 倍, 是 LyAa-T 的 6.39 倍。使用镍柱纯化得到单一的溶菌酶蛋白, SDS-PAGE 结果表明其分子量大小约为 25.0 ku, 与预测结果 24.9 ku 相同。测试其酶学性质, 酶活力在 30 °C 时最高, 短时间的高温处理对酶活力影响不大; 最适 pH 值为 4.0, 在 pH 值为 3.5~5.0 时有较高的酶活力和稳定性; 溶菌酶 LyAa 在胃蛋白酶缓冲液中处理后活性变化很小, 而母鸡蛋白溶菌酶的酶活力大大降低。综上, 溶菌酶 LyAa 能够不被胃蛋白酶水解且性质稳定, 且在黑曲霉中成功提升其产量, 为后续的规模化制备和应用提供理论支持。

### 参考文献

- [1] 李冬梅. 溶菌酶及在食品中的应用[J]. 食品工业, 1999, 3: 21-22
- [2] J Yon-Kahn. Lysozymes, model enzymes in biochemistry and biology [J]. Biochimie, 1996, 78(10): 887
- [3] Swaminathan R, Ravi V K, Kumar S, et al. Lysozyme: a Model Protein for Amyloid Research [M]. San Diego:

- Elsevier Academic Press Inc, 2011: 63-111
- [4] 卢冬梅,王霆.溶菌酶的抗病毒作用及其抗艾滋病病毒应用[J].广东药学,2005,15(5):62-64
- [5] 李锋涛,孙亚东,柳公卿.溶菌酶的性质及在畜牧生产中的应用[J].养殖与饲料,2009,9:49-51
- [6] 李敏.溶菌酶及其应用[J].生物学教学,2006,31(4):2-3
- [7] Lombard V, Golaconda R, Drula E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(Database Issue)
- [8] Consortium T C. Ten years of CAZyedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes [J]. Glycobiology, 2018, 28(1): 3-8
- [9] Vollmer W, Joris B, Charlier P, et al. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 259-286
- [10] Rau A, Hogg T, Marquardt R, et al. A new lysozyme fold. Crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* at 1.65 Å resolution [J]. The Journal of biological chemistry, 2001, 276(34): 31994-31999
- [11] Metcalf J, Funkhouser-Jones L, Briley K, et al. Antibacterial gene transfer across the tree of life [J]. eLife, 2014, 3: e04266
- [12] Life Science Research. New molecular biology study findings have been reported from institute of microbiology (Hitting the sweet spot-glycans as targets of fungal defense effector proteins) [J]. Defense & Aerospace Week, 2016
- [13] Pierce J J, Turner C, Keshavarz-Moore E, et al. Factors determining more efficient large-scale release of a periplasmic enzyme from *E. coli* using lysozyme [J]. J Biotechnol, 1997, 58(1): 1-11
- [14] Carlos M, Justyna E, Gideon J, et al. The crystal structure of a family GH25 lysozyme from *Bacillus anthracis* implies a neighboring-group catalytic mechanism with retention of anomeric configuration [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(13): 1753-1757
- [15] Korczynska J, Danielsen S, Schagerl U, et al. The structure of a family GH25 lysozyme from *Aspergillus fumigatus* [J]. Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun, 2010, 66(9): 973-977
- [16] Okada G, Nimura Y, Sakata T. *Acremonium alcalophilum*, a new alkalophilic cellulolytic hyphomycete [J]. Transactions of the Mycological Society of Japan, 1993, 34: 171-185
- [17] Lichtenberg J, Perez Calvo E, Madsen K, et al. Safety evaluation of a novel muramidase for feed application [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2017, 89: 57-69
- [18] Goodarzi B, Männer K, Rieger J, et al. Evaluation of a microbial muramidase supplementation on growth performance, apparent ileal digestibility, and intestinal histology of broiler chickens [J]. Poultry Science, 2019, 98(5): 2080-2086
- [19] Pereira E, Tsang A, McAllister T A, et al. The production and characterization of a new active lipase from *Acremonium alcalophilum* using a plant bioreactor [J]. Biotechnol Biofuels, 2013, 6: 111
- [20] Moroz O V, Blagova E, Taylor E, et al. Fungal GH25 muramidases: New family members with applications in animal nutrition and a crystal structure at 0.78 Å resolution [J]. PLoS One, 2021, 16(3): e0248190
- [21] 何玉兰,王斌,潘力.黑曲霉酸性果胶裂解酶的高效表达及其在果汁澄清中的应用[J].食品科学,2019,40(18):83-88
- [22] Van H, Mattern I, Van Z, et al. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the pyrG gene [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1987, 206(1): 71-75
- [23] 陈筱仪,王斌,潘力.18S rDNA 介导的桔青霉核酸酶P1 表达载体的构建及表达分析[J].现代食品科技,2019,35(6): 145-153
- [24] Sun X, Su X. Harnessing the knowledge of protein secretion for enhanced protein production in filamentous fungi [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(4): 35-54
- [25] Xiaotong L, Liangbo D, Dou Y, et al. High-level expression and characterization of the thermostable leucine aminopeptidase Thelap from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in *Aspergillus niger* and its application in soy protein hydrolysis [J]. Protein Expression and Purification, 2020, 167(105544)
- [26] Nødvig Christina S, Nielsen Jakob B, Kogle Martin E, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of *Filamentous fungi* [J]. PLoS One, 2015, 10(7): 1-18
- [27] Shi Tian-Qiong, Liu Guan-Nan, Ji Rong-Yu, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(20): 7435-7443
- [28] Zheng X, Zheng P, Zhang K, et al. 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger* [J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(7): 1568-1574
- [29] Liu Q, Gao R, Li J, et al. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain



- engineering. [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017,10: 1
- [30] Yin C, Bin W, Li P, et al. Genomic analysis of the aconidial and high-performance protein producer, industrially relevant *Aspergillus niger* SH2 strain [J]. *Gene*, 2014, 541(2): 107-114
- [31] Liangbo D, Xiaotong L, Dou Y, et al. High-level expression of highly active and thermostable trehalase from *Myceliophthora thermophila* in *Aspergillus niger* by using the CRISPR/Cas9 tool and its application in ethanol fermentation [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2020, 47(1): 133-144
- [32] Dong H Z, Zheng J W, Yu D, et al. Efficient genome editing in *Aspergillus niger* with an improved recyclable CRISPR-HDR toolbox and its application in introducing multiple copies of heterologous genes [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2019, 163: 105655
- [33] David Shugar. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1952, 8(3): 302-309
- [34] 刘益丽,邓霄禹,江明锋.溶菌酶抑菌活性及检测方法研究进展[J].*中国畜牧兽医*,2013,40(8):189-194
- [35] 杨悦,陶妍,谢晶,等.基于重组毕赤酵母的草鱼 C 型溶菌酶生物合成及其抑菌活性[J].*生物技术通报*,2021,37(12): 169-179
- [36] Lang D, Thoma R, HennSax M, et al. Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion [J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2000, 289(5484): 1546-1550