

# 米曲霉酸性蛋白酶基因在毕赤酵母中的异源表达及酶学性质

岳晓平<sup>1,2</sup>, 陈朋<sup>2</sup>, 朱玥明<sup>2</sup>, 曾艳<sup>2</sup>, 刘汉民<sup>3</sup>, 刘红彦<sup>3</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 孙媛霞<sup>2</sup>

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 中恩(天津)医药科技有限公司, 天津 300308

岳晓平, 陈朋, 朱玥明, 等. 米曲霉酸性蛋白酶基因在毕赤酵母中的异源表达及酶学性质. 生物工程学报, 2019, 35(3): 415-424.

Yue XP, Chen P, Zhu YM, et al. Heterologous expression and characterization of *Aspergillus oryzae* acidic protease in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 415-424.

**摘要:** 酸性蛋白酶作为一类重要的天冬氨酸蛋白酶, 被广泛应用于食品、医药和皮革等领域。为推动酸性蛋白酶的研究及应用, 通过对发酵豆制品样品进行宏基因组测序, 从中获得米曲霉酸性蛋白酶基因 *pepA*, 在毕赤酵母 GS115 中进行异源表达, 并对重组酶 PepA 进行酶学性质分析。结果显示毕赤酵母发酵上清液中酸性蛋白酶的活性为 50.62 U/mL。SDS-PAGE 验证 PepA 的分子量约为 50 kDa, 且发酵上清液几乎无杂蛋白。PepA 的最适 pH 值为 4.5, 最适温度为 50 °C, Mn<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对其具有激活作用, 而 Fe<sup>3+</sup>、Fe<sup>2+</sup> 与 Ca<sup>2+</sup> 则具有抑制作用。上述研究结果可为米曲霉酸性蛋白酶的异源表达及其相关工业应用提供指导。

**关键词:** 米曲霉, 酸性蛋白酶, 毕赤酵母, 异源表达, 酶学性质

## Heterologous expression and characterization of *Aspergillus oryzae* acidic protease in *Pichia pastoris*

Xiaoping Yue<sup>1,2</sup>, Peng Chen<sup>2</sup>, Yueming Zhu<sup>2</sup>, Yan Zeng<sup>2</sup>, Hanmin Liu<sup>3</sup>, Hongyan Liu<sup>3</sup>, Min Wang<sup>1</sup>, and Yuanxia Sun<sup>2</sup>

1 College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 Sinofn (Tianjin) Pharmacy Technology Co. Ltd., Tianjin 300308, China

**Abstract:** Acid protease, an important aspartic protease, has been widely used in food, pharmaceutical and tanning

**Received:** August 2, 2018; **Accepted:** November 16, 2018

**Supported by:** National Science and Technology Major Project of China (No. 2018YFD0400403), Science and Technology Program of Tianjin (No. 16PTYJNC00010), Science and Technology Program of Tianjin (No. 15PTCYSY00020).

**Corresponding author:** Yan Zeng. Tel/ Fax: +86-22-84861961; E-mail: zeng\_y@tib.cas.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFD0400403), 天津市科技计划项目 (No. 16PTYJNC00010), 天津市科技计划项目 (No. 15PTCYSY00020) 资助。

网络出版时间: 2018-12-07

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181205.0956.001.html>

industries. To promote the research and application of acid protease, an acid protease gene (*pepA*) from *Aspergillus oryzae* was obtained from fermented soy based on metagenome sequencing, and then cloned and transformed into *Pichia pastoris* GS115 for heterologous expression. The characteristic of recombinant PepA was also investigated. The activity of acid protease in the culture supernatant of *P. pastoris* was 50.62 U/mL. The molecular mass of PepA was about 50 kDa, and almost no other proteins in the supernatant were observed, as shown by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature of PepA were determined as pH 4.5 and 50 °C.  $Mn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  enhanced the activity of PepA, whereas  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  had inhibitory effects on its activity. The above findings can provide guidance for heterologous expression and industrial application of acid protease from *Aspergillus oryzae*.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*, acidic protease enzyme, *Pichia pastoris*, heterologous expression, enzymatic properties

酸性蛋白酶又称天冬氨酸蛋白酶, 主要来源于动物脏器和微生物分泌物, 是一种适合在酸性条件 (pH 2.0–5.0) 下水解蛋白质的酶类, 其被广泛应用于食品<sup>[1-7]</sup>、畜牧<sup>[8-9]</sup>、医学<sup>[10]</sup>、皮革<sup>[11]</sup>以及水产加工<sup>[12]</sup>等领域。酸性蛋白酶主要通过微生物发酵获得。产酸性蛋白酶的菌种包括黑曲霉、红曲霉、宇佐美曲霉、米曲霉等。

米曲霉作为美国 FDA 公布的安全菌株, 具有蛋白酶系丰富、酶活高、不产毒素等诸多优点, 是我国传统酿造食品酱、酱油和酒类的主要生产菌种<sup>[13-14]</sup>。然而, 米曲霉菌株普遍产中性蛋白酶和碱性蛋白酶的能力较强而产酸性蛋白酶的能力偏弱<sup>[15]</sup>, 目前对米曲霉来源酸性蛋白酶的研究主要集中于菌株的筛选与诱变、产酶条件优化、酶学特性研究等方面<sup>[16-19]</sup>, 有关米曲霉酸性蛋白酶基因异源表达与酶学性质研究尚未有报道。此外, 米曲霉酸性蛋白酶主要通过固态发酵生产, 存在发酵周期长、劳动强度大、质量不稳、纯化困难等缺点, 限制了其规模化生产。

基于巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 的蛋白表达系统具有杂蛋白分泌较少、培养成本低廉、发酵工艺成熟等优点<sup>[20-26]</sup>, 具有实现米曲霉酸性蛋白酶的工业化生产的潜力。本研究通过宏基因组测序, 从发酵豆制品中获得米曲霉酸性蛋白酶的编码基因 *pepA*, 并在毕赤酵母中实现异源表达, 同时对重组酸性蛋白酶的酶学特性展开研究, 以期为米曲霉来源酸性蛋白酶的规模化生产奠定

基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

毕赤酵母 GS115 菌株、pPIC9K 质粒均为本实验室保存; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、Trelief™ SoSoo Cloning Kit 购自北京擎科新业生物技术有限公司; Plasmid Mini Kit I、Cycl-pure Kit、Gel Extraction Kit 购自美国 OMEGA Bio-Tek 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、限制性内切酶 *Not* I、dNTPs 购自上海 Fermentas 公司; 葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、琼脂糖购自英国 OXOID 公司; 甲醇购自美国 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。大肠杆菌培养基 LB、毕赤酵母培养基 YPD、选择培养基 MD、诱导表达培养基 BMGY 和 BMMY 的培养基配方见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酸性蛋白酶基因的获取

提取发酵豆制品微生物菌群宏基因组, 利用二代测序技术进行测序。通过功能基因注释, 挖掘获得酸性蛋白酶基因。

#### 1.2.2 重组表达载体 pPIC9K-*pepA* 的构建

以特异性引物 AOX-F1 和 AOX-R1 (序列见表 1) 扩增目的基因 *pepA*, 回收 PCR 产物。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 对表达质粒 pPIC9K 进行双酶切, 纯化回收线性化质粒。在 55 °C 条件

下利用重组酶 Trelief™ SoSoo Cloning Kit 进行重组, 将重组产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 筛选阳性克隆, 提取质粒, 用 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切验证并测序。

### 1.2.3 毕赤酵母重组菌株的构建与筛选

将构建成功的重组表达质粒 pPIC9K-*pepA* 与毕赤酵母 GS115 感受态混合, 混匀后, 转入冰预冷的 0.2 cm 电转杯, 冰上放置 1 min 后电击 (1.5 kV、25  $\mu$ F、200  $\Omega$ 、6 ms) 转化, 电转结束后迅速加入 1 mL 1 mol/L 冰预冷的无菌山梨醇至杯中, 于超净台内将所有溶液转至灭菌离心管中, 30  $^{\circ}$ C 下静置培养 1 h 后, 取 300  $\mu$ L 涂布于 MD 平板, 30  $^{\circ}$ C 下倒置培养 3–4 d 后, 随机挑取若干单菌落, 用 YPD 液体培养基振荡培养 24 h, 提取染色体 DNA, 以表达载体 pPIC9K 的通用引物 AOX-F、AOX-R 进行 PCR 鉴定, 鉴定成功的菌株通过酶活力测定进一步筛选。

### 1.2.4 重组菌株的诱导表达

毕赤酵母含有醇氧化酶基因启动子 (PAOX1), 在甲醇的诱导下, PAOX1 可驱动外源基因大量表达<sup>[27]</sup>。将筛选成功的菌株接种于含 5 mL YPD 培养基的试管中, 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 1 d, 按 2% 体积将种子液接种于含 50 mL BMGY 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 1 d, 离心收集菌体, 然后全部转入含 50 mL 的 BMMY 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养, 每隔 24 h 添加甲醇至终浓度为 0.5%, 每隔 24 h 取样检测菌液

浓度及发酵上清液酸性蛋白酶活力, 实验重复 3 次, 上清液浓缩后进行 SDS-PAGE 分析<sup>[27]</sup>。

### 1.2.5 重组蛋白的酶活力测定

酶活力测定参考 GB 1886.174-2016 食品安全国家标准, 以 1% 的酪蛋白为底物, 采用 Folin-酚法进行酶活测定。以 1 mL 液体酶在 40  $^{\circ}$ C 和 pH 3.0 条件下, 每分钟水解酪蛋白产生 1  $\mu$ g 酪氨酸为 1 个酶活力单位, 用 U/mL 表示。

## 1.3 酶学性质分析

### 1.3.1 最适反应温度与温度稳定性

按 1.2.5 的方法, 在 30–60  $^{\circ}$ C, 每间隔 10  $^{\circ}$ C 取样测定酶活, 每个反应设 3 个平行, 以最高酶活为 100%, 计算其他不同温度下的相对酶活, 确定酶的最适反应温度。

将酶液分别置于 30  $^{\circ}$ C、35  $^{\circ}$ C、40  $^{\circ}$ C、45  $^{\circ}$ C、50  $^{\circ}$ C、55  $^{\circ}$ C、60  $^{\circ}$ C、65  $^{\circ}$ C、70  $^{\circ}$ C 水浴锅中, 保温 15 min 后取出酶液, 测定残余酶活力, 每个反应设 3 个平行, 以所测最高酶活为 100%, 计算各个温度条件下的相对酶活, 考察不同温度下的热稳定性。

### 1.3.2 最适反应 pH 与 pH 稳定性

在 pH 2.0–7.0 下测定酶活, 以最高酶活力为 100%, 计算其他不同 pH 下的相对酶活, 每个反应设 3 个平行, 探讨不同 pH 值对酶活力的影响。

将酶液置于 pH 1.0、2.0、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0 的反应体系中, 2 h 后取出酶液, 测定残余酶活力, 每个反应设 3 个平行, 以所测最高酶活为 100%, 计算各个 pH 条件下的相对酶活, 确定酶的 pH 值稳定性。

表 1 构建 pPIC9K-*pepA* 所用的引物

Table 1 Primers used for construction of pPIC9K-*pepA*

Primer name	Primer sequence (5'–3')
AOX1-F	TACTATTGCCAGCATTGCTGCT
AOX1-R	AGGATGTCAGAATGCCATTTGCC
AOX-F1	GATCAAAAACAATAATTATTCGAAGGATCCATGGTTATCTTGAGCAAAGTCGCTG
AOX-R1	CTAAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTAAGCCTGGGCGGCGAAGCCGAGT

### 1.3.3 金属离子对酶活力的影响

为分析金属离子对该酸性蛋白酶的影响,将不同的金属离子( $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ag}^+$ )分别添加到酸性蛋白酶反应体系中,使金属离子终浓度为 5 mmol/L,以不加金属离子的样品酶活为 100%,每个反应设 3 个平行,计算不同金属离子存在下的相对酶活,考察金属离子对酶活力的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 米曲霉酸性蛋白酶基因的克隆与重组载体的构建

利用二代测序技术对发酵豆制品进行宏基因组测序,通过功能基因注释,挖掘得到一种酸性蛋白酶基因 *pepA*,其长度为 1 215 bp,共编码 287 个氨基酸。利用 MEGA4.6 软件对不同微生物来源的酸性蛋白酶氨基酸序列构建进化树(图 1),并进行同源性分析,发现该酸性蛋白酶与来自米曲霉 RIB40 的酸性蛋白酶(GenBank 基因登录号: XM\_001824123.3)的序列完全一致<sup>[28]</sup>,与来自烟曲霉 af293 的酸性蛋白酶相似性为 70.69%<sup>[29]</sup>,与来自黑曲霉 CBS 513.88 的酸性蛋白酶相似性为 66.58%<sup>[30]</sup>。

以提取的宏基因组为模板,经引物 AOX-F1 和 AOX-R1 PCR 扩增,回收 PCR 产物,经 PCR 扩增,得到 1 200 bp 左右的片段(图 2)。在 55 °C 条件下进行重组,将重组产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,获得重组菌,提取质粒,经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后,如图 3 所示,得到两条大小分别为 9 000 bp 和 1 200 bp 的两条带,表明目的基因已经插入到 pPIC9K 载体上。测序结果表明该转化菌的质粒中确实含有目的基因片段,且阅读框正确,表达质粒 pPIC9K-*pepA* 构建成功。

### 2.2 重组菌株的诱导表达

利用电转化的方式将表达质粒 pPIC9K-*pepA* 转入毕赤酵母 GS115,利用组氨酸缺陷型 MD 培养基筛选阳性转化子,提取重组酵母菌基因组 DNA,以其为模板,利用毕赤酵母表达载体通用引物 AOX-F、AOX-R 和目的基因特异性引物 AOX1-F、AOX1-R 进行 PCR 鉴定<sup>[31]</sup>。从图 4 可以看出,使用表达载体通用引物,阳性重组菌扩增出 1 600 bp 左右的片段,使用基因特异性引物,扩增出 1 200 bp 左右片段,条带大小与理论值相符,证明 pPIC9K-*pepA* 与毕赤酵母 GS115 染色体基因组重组成功。

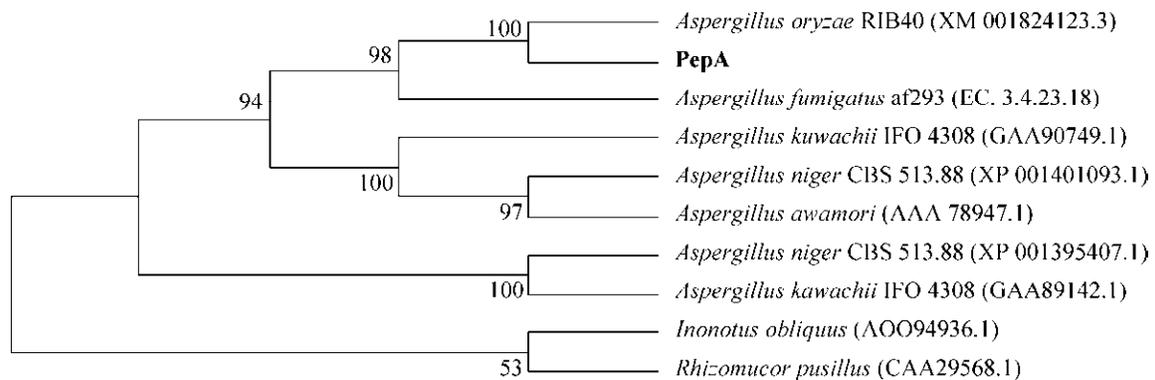


图 1 米曲霉酸性蛋白酶 PepA 与其他微生物来源酸性蛋白酶的氨基酸序列进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree based on the protein sequences of PepA from *Aspergillums oryzae* with other microbial acidic protease.

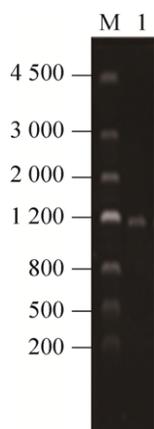


图2 *pepA* 基因的 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified. M: DNA marker; 1: PCR products with *pepA*.

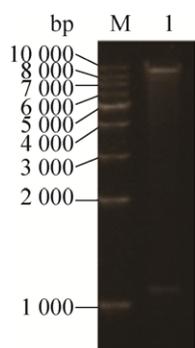


图3 毕赤酵母表达质粒酶切鉴定

Fig. 3 Identification of expression plasmids for *P. pastoris* by digestion. M: DNA marker; 1: product of double enzyme digestion.

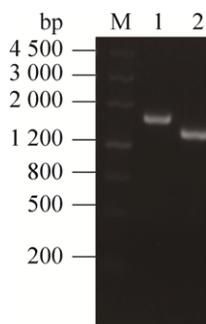


图4 转化子的 PCR 鉴定结果

Fig. 4 Identification of transformant by PCR. M: DNA marker; 1: PCR products with universal primer; 2: PCR products with specific primer.

将阳性菌株接种于以甘油为唯一碳源的培养基中, 30 °C 培养 1 d 后, 收集菌体进行甲醇诱导培养, 每隔 24 h 取样, 进行菌体浓度和酶活的测定 (如图 5 所示), 随着发酵的不断进行, 重组菌株浓度也逐渐增加, 当发酵 4 d 后, 菌体浓度达到最大,  $OD_{600}$  达到 45, 此时酶活也达到最高, 大约为 50.62 U/mL。

酸性蛋白酶经诱导表达后, 取上清液进行离心、超滤浓缩, 取浓缩后的上清蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 6 所示, 分子量 50 kDa 处有明显的条带, 无明显杂蛋白, 可以开展后续酶学性质方面的研究。

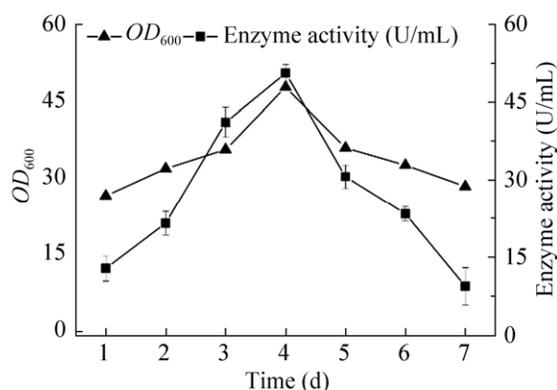


图5 重组毕赤酵母菌株产酶时间曲线

Fig. 5 The time course of the enzyme activities produced by the engineered *P. pastoris* strain.

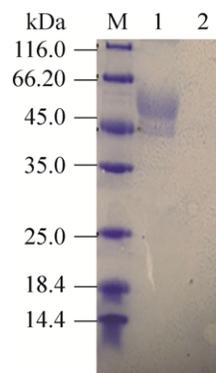


图6 浓缩后酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the concentrated enzyme. M: protein marker; 1: concentrated enzyme; 2: control.

## 2.3 酶学性质分析

### 2.3.1 最适温度与温度稳定性

如图 7A 所示, 该酶最适反应温度为 50 °C。当低于 50 °C 时, 随着反应温度的升高, 酶活力逐渐增加。在 50 °C 下, 酶活力最高, 为 30 °C 下的 2.5 倍, 但高于 50 °C 时, 酶活力随着反应温度的升高迅速下降。温度为 60 °C 时, 该酶基本失活。由图 7B 可知, 该酶在 40 °C 以下放置 15 min 后仍然具有较高的活性。

### 2.3.2 最适反应 pH 值与 pH 稳定性

该酸性蛋白酶的最适 pH 为 4.5 (图 8A)。当 pH<4.5 时 (2.0–4.5), 随着 pH 值的增加, 酸性蛋白酶的酶活力逐渐增大。酸性蛋白酶在 pH 4.5 下的酶活力是 pH 2.0 下酶活力的 6 倍。但当 pH>4.5

时, 随着 pH 值的增加, 酸性蛋白酶的相对酶活力迅速降低。图 8B 为酸性蛋白酶在 pH 1.0–7.0 下的稳定性。由图可知, 该酸性蛋白酶在 pH 3.0–4.0 下放置 120 min 后, 相对酶活仍可达 70% 以上。

### 2.3.3 常见金属离子对酸性蛋白酶活性的影响

金属离子可以影响酶结构的正确折叠, 进而影响酶活力。为分析金属离子对酸性蛋白酶酶活力的影响, 以不添加金属离子的反应体系为对照, 测定不同金属离子( $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 和  $\text{Ag}^+$ )对酶活力的影响。如图 9 所示, 该酸性蛋白酶可显著被  $\text{Mn}^{2+}$ 和  $\text{Cu}^{2+}$ 激活。添加 5 mmol/L 的  $\text{Mn}^{2+}$ 和  $\text{Cu}^{2+}$ 时, 该酸性蛋白酶的酶活力分别为对照的 2.6 倍和 1.3 倍。而  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 与  $\text{Ca}^{2+}$ 对酸性蛋白酶具有显著的抑制作用。由此可见, 不同的金属离子对酸性蛋白酶酶活力具有不同的激活或抑制作用。

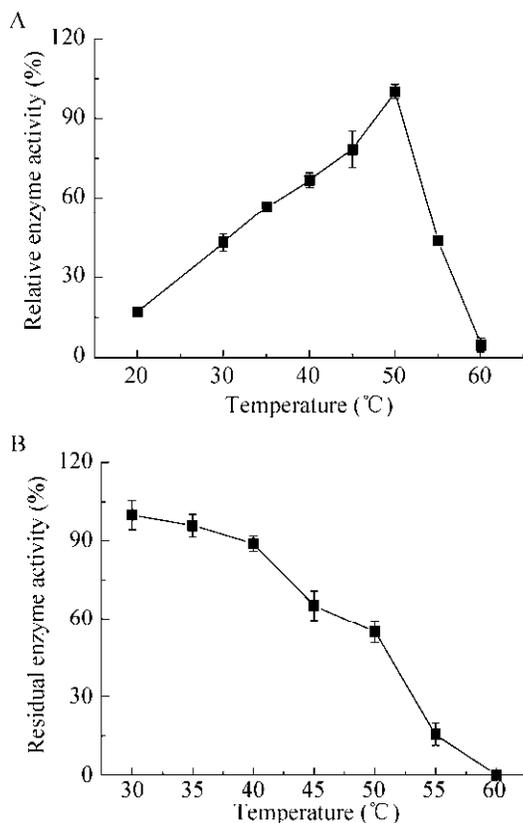


图 7 温度对重组酸性蛋白酶 PepA 活性 (A) 和稳定性 (B) 的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of recombinant PepA.

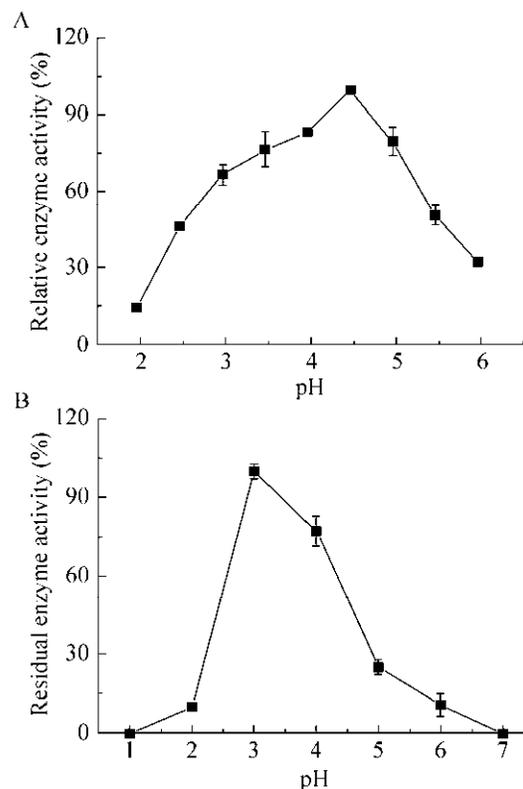


图 8 pH 对重组酸性蛋白酶 PepA 的酶活 (A) 和稳定性 (B) 的影响

Fig. 8 Effects of pH on the activity (A) and stability (B) of recombinant PepA.

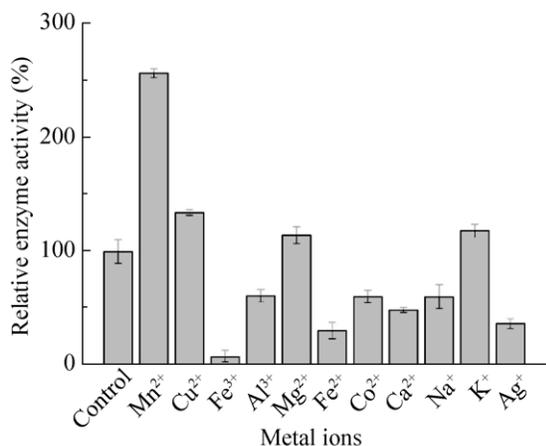


图9 金属离子对酸性蛋白酶活性的影响

Fig. 9 Effect of metal ions on the activity of acid protease.

### 3 讨论

酸性蛋白酶在制革工业、食品行业、畜牧业、医药等行业应用广泛,然而却受到酶不易获取、分离纯化困难、酶学性质不稳定等因素限制。由于毕赤酵母表达系统菌株稳定,发酵水平高,分泌能力强,自身蛋白分泌少<sup>[32]</sup>,目前已有黑曲霉、宇佐美曲霉、牛胃、猪胃等来源的酸性蛋白酶实现了在毕赤酵母中的异源表达,却少有米曲霉酸性蛋白酶的相关报道。

宏基因组技术将环境中全部微生物的遗传信息看作一个整体,自上而下地研究微生物与自然环境中生物体之间的关系,可以从微生物的天然环境中直接提取基因组遗传物质和寻找新基因,大大地拓展了微生物学的研究思路与方法<sup>[33]</sup>。本研究利用宏基因组测序及注释技术从发酵豆制品中获得了编码来源于米曲霉的酸性蛋白酶基因 *pepA*,尽管与来源于米曲霉 RIB40 的酸性蛋白酶基因序列一致,然而,到目前为止尚未见到由这一基因序列表达的酸性蛋白酶的酶学性质报道。此外,调研也没有获得其他米曲霉来源、可与 *pepA* 进行同源序列对比的酸性蛋白酶基因序列。

本研究基于分泌型表达载体 pPIC9K 携带的外源基因表达可抑制毕赤酵母自身蛋白表达的特点<sup>[34]</sup>,利用 pPIC9K 载体,首次在毕赤酵母 GS115 中成功表达了米曲霉来源的酸性蛋白酶基因 *pepA*。发酵所得上清液中蛋白组分单一,重组酸性蛋白酶活力约为 50.62 U/mL。王鑫等<sup>[35]</sup>将来自黑曲霉 CBS 513.88、与 *PepA* 相似性为 66.58% 的酸性蛋白酶在毕赤酵母中进行表达,测得重组黑曲霉酸性蛋白酶的酶活为 8.76 U/mL。邱重晏<sup>[36]</sup>研究了粗糙脉孢霉酸性蛋白酶基因在毕赤酵母 S115 中的表达,测得重组粗糙脉孢霉酸性蛋白酶最高酶活为 6.8 U/mL。与上述研究相比,本研究的重组酸性蛋白酶的酶活较高。而且,随着后续发酵条件优化以及密码子优化等分子生物学实验的开展, *PepA* 的酶活力可进一步提高。

Tsujita 和 End<sup>[37]</sup>发现来自米曲霉 365-U-64-1 的酸性蛋白酶具有底物选择特异性。在以牛血清蛋白为底物时,最适 pH 值为 4.2,在 pH 5.0、50 °C 下加热 10 min,仍可保持 70% 以上的酶活。Vishwanatha 等<sup>[38]</sup>发现米曲霉 MTCC 5341 分泌的酸性蛋白酶最适温度和 pH 值分别为 55 °C 和 3.2,在 40–57 °C 和 pH 2.5–6.0 下可保持一定的稳定性。Yin 等<sup>[39]</sup>发现来自米曲霉 BCRC 30118 的酸性蛋白酶最适温度和 pH 值分别为 60 °C 和 3.0,  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  与  $\text{Hg}^{2+}$  会抑制酶活。王鑫等<sup>[35]</sup>则发现由黑曲霉 CBS 513.88 分泌的酸性蛋白酶最适温度和 pH 分别为 50 °C 和 3.0,  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  可促进酶活,而  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  则可抑制酶活。本研究中的重组米曲霉酸性蛋白酶 *PepA* 的酶学性质与上述报道的曲霉酸性蛋白酶存在一定的差异,其最佳温度为 50 °C,40 °C 下较为稳定,最适 pH 为 4.5,在 pH 3.0–4.0 酶活力较为稳定,金属离子  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  是该酶的激活剂,而  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对酶活抑制程度较大。文献表明毕赤酵母表达蛋白的糖基化会影响其分泌及功能<sup>[40]</sup>。当糖基化修

饰发生在表达蛋白的折叠有序区域时,会降低其稳定性<sup>[41]</sup>。如马清等<sup>[42]</sup>推断 N-糖基化修饰导致毕赤酵母异源表达的  $\beta$ -甘露聚糖酶其局部结构改变,使之变为相对不耐热的结构,导致其热稳定性下降。王越等<sup>[43]</sup>认为毕赤酵母对蛋白的过度糖基修饰,会造成产物的活性位点遮蔽。因此,虽然缺少天然野生型 PepA 的酶学性质信息,但考虑到 PepA 潜在多个 N-糖基化修饰位点,推测 PepA 的酶学性质差异可能与其在毕赤酵母表达过程中的多肽链的错误折叠及蛋白糖基化作用有关<sup>[44]</sup>。

本研究实现了米曲霉酸性蛋白酶在毕赤酵母中的异源表达并对其酶学性质进行了表征,为酸性蛋白酶的异源表达研究及应用推广提供了借鉴参考,同时为食品、医药和皮革等工业提供了新型的米曲霉酸性蛋白酶来源。

## REFERENCES

- [1] Wei TY, Wang Z, Wei RF. Adding acid protease on the stability of Chinese rice wine fermentation mash. *Ferment Indust*, 2015, 41(12): 148–152 (in Chinese).  
魏桃英, 汪钊, 魏瑞锋. 发酵醪中添加酸性蛋白酶对黄酒稳定性的影响. *食品与发酵工业*, 2015, 41(12): 148–152.
- [2] Lagace LS, Bisson LF. Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *Am J Enol Viticult*, 1990, 41(2): 147–155.
- [3] Yu PB, Chen LL, Zhang B, et al. Study on improving the quality of rice wine Wheat Qu by making with two strains. *Ferment Indust*, 2012, 38(9): 1–6 (in Chinese).  
余培斌, 陈亮亮, 张波, 等. 双菌种制曲改善黄酒麦曲品质的研究. *食品与发酵工业*, 2012, 38(9): 1–6.
- [4] Zhao H, Zhao SX, Zhang W, et al. The study on the application of acid proteinase to ethanol fermentation. *Ferment Indust*, 1997, 23(2): 26–28 (in Chinese).  
赵华, 赵树欣, 张维, 等. 酒精发酵中应用酸性蛋白酶的研究. *食品与发酵工业*, 1997, 23(2): 26–28.
- [5] Xiao DG, Zhao H, Zhai JX, et al. Studies on application technology of acid protease in alcohol production III. The application experiment in alcohol production. *Liquor-Making Sci Technol*, 2000(4): 34–35, 37 (in Chinese).  
肖冬光, 赵华, 翟建新, 等. 酒用酸性蛋白酶在酒精生产中应用技术的研究 III. 酒精生产应用试验. *酿酒科技*, 2000(4): 34–35, 37.
- [6] Arai S, Makoto A, Yamashita M, et al. Applying proteolytic enzymes on soybean. *Agr Biol Chem*, 1971, 35(4): 552–559.
- [7] Xu YS, Dai MJ, Zang JH, et al. Purification and characterization of an extracellular acidic protease of *Pediococcus pentosaceus* isolated from fermented fish. *Food Sci Technol Res*, 2015, 21(5): 739–744.
- [8] Lu C, Bian LQ, Liu XJ, et al. Effects of neutral and acid protease on growth performance in weaned piglets. *Chin J Animal Nut*, 2009, 21(6): 993–997 (in Chinese).  
卢晨, 边连全, 刘显军, 等. 中性和酸性蛋白酶对断奶仔猪生长性能的影响. *动物营养学报*, 2009, 21(6): 993–997.
- [9] Wu YL, Huo SY. Research on the determination of acidic protease activity in feed premixed with enzyme additive. *J Agric Sci Technol*, 2009, 11(1): 52–55 (in Chinese).  
武英利, 霍韶瑜. 饲用酶添加剂预混料中酸性蛋白酶活力测定方法研究. *中国农业科技导报*, 2009, 11(1): 52–55.
- [10] Chen Q. Anti-edema drug-swelling elimination. *Shanxi Medical J*, 1985, 24(2): 112–113 (in Chinese).  
陈铨. 抗水肿新药——肿消净. *山西医药杂志*, 1985, 24(2): 112–113.
- [11] Li SP, Jiang QL, Bi CY. Studies and developments on the acid protease for leather processing. *Shandong Sci*, 1996, 9(4): 62–65 (in Chinese).  
李树品, 蒋千里, 毕春元. 皮革用酸性蛋白酶的研究与开发. *山东科学*, 1996, 9(4): 62–65.
- [12] Lin SZ, Liu WC, Shan YZ. Application of enzyme mixtures in aquaculture feed. *Fisher Sci*, 2009, 28(12): 798–800 (in Chinese).  
林少珍, 刘伟成, 单乐州. 酶制剂在水产养殖饲料中的应用. *水产科学*, 2009, 28(12): 798–800.

- [13] Xu DF. Breeding of novel fusant with higher activity of acid protease from *Aspergillus* and its preliminary application in soy sauce fermentation[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010 (in Chinese).  
徐德峰. 高活力酸性蛋白酶曲霉融合子的选育及其在酱油发酵中的初步应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- [14] Deng J, Xu J, Wu HC, et al. Screening of acid protease-overproducing strains of *Aspergillus oryzae*. *China Cond*, 2010, 35(1): 53–55, 59 (in Chinese).  
邓静, 徐静, 吴华昌, 等. 米曲霉高产酸性蛋白酶菌株的选育. *中国调味品*, 2010, 35(1): 53–55, 59.
- [15] Cao XH, Zhang B, Lu MF, et al. A rapid method for screening excellent soy sauce producing *Aspergillus oryzae* mutagenized by ion implanting. *China Cond*, 2007, 5(5): 26–30 (in Chinese).  
曹小红, 张斌, 鲁梅芳, 等. 离子注入诱变米曲霉及酱油优良生产菌株的快速筛选. *中国调味品*, 2007, 5(5): 26–30.
- [16] de Castro RJS, Sato HH. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2014, 3(3): 58–65.
- [17] Srinubabu G, Lokeswari N, Jayaraju K. Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-J Chem*, 2007, 4(2): 208–215.
- [18] Guo JP, Ma G. Optimization of solid-state fermentation medium for acid protease of *Aspergillus oryzae*. *China Brewing*, 2009(8): 125–128 (in Chinese).  
郭继平, 马光. 响应面法优化米曲霉酸性蛋白酶的固态发酵培养基. *中国酿造*, 2009(8): 125–128.
- [19] Lee SK, Wang JY, Choi SH, et al. Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste. *Food Sci Biotechnol*, 2010, 19(2): 327–334.
- [20] Zhu TC, Li Y. Recent development of *Pichia pastoris* system: current status and future perspective. *Chin J Biotech*, 2015, 31(6): 929–938 (in Chinese).  
朱泰承, 李寅. 毕赤酵母表达系统发展概况及趋势. *生物工程学报*, 2015, 31(6): 929–938.
- [21] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(12): 5301–5317.
- [22] Damasceno LM, Chung JH, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(1): 31–39.
- [23] Cos O, Ramón R, Montesinos JL, et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 17.
- [24] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 2005, 18(2): 119–138.
- [25] Xiong AS, Peng RH, Li X, et al. Influence of signal peptide sequences on the expression of heterogeneous proteins in *Pichia pastoris*. *Acta Bioch et Bioph Sin*, 2003, 35(2): 154–160 (in Chinese).  
熊爱生, 彭日荷, 李贤, 等. 信号肽序列对毕赤酵母表达外源蛋白质的影响. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(2): 154–160.
- [26] Zhan HJ, Liu BS, Reid SW, et al. Engineering a soluble extracellular erythropoietin receptor (EPObp) in *Pichia pastoris* to eliminate microheterogeneity, and its complex with erythropoietin. *Protein Eng*, 1999, 12(6): 505–513.
- [27] Qin HB, Li MF, Yang HJ. Heteroexpression of cellobiohydrolase A gene of *Aspergillus niger* in *Pachia pastoris*. *Biotechnology*, 2017, 27(4): 330–336 (in Chinese).  
秦慧彬, 李梦菲, 杨洪江. 黑曲霉纤维二糖水解酶基因 *cbhA* 在毕赤酵母中异源表达. *生物技术*, 2017, 27(4): 330–336.
- [28] Gomi K, Arikawa K, Kamiya N, et al. Cloning and nucleotide sequence of the acid protease-encoding gene (*pepA*) from *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(7): 1095–1100.
- [29] Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic

- filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature, 2005, 438(7071): 1151–1156.
- [30] Yang H. Expression and characterization of acid protease from *Aspergillus usami* in *Pichia pastoris*[D]. Wuhan: Hubei University, 2014 (in Chinese).  
杨琥. 宇佐美曲霉酸性蛋白酶在毕赤酵母中的表达及其酶学性质的研究[D]. 武汉: 湖北大学, 2014.
- [31] Zhang L, Jiang Y, Zhang J, et al. Recombinant expression of bovine chymosin in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2009, 25(8): 1160–1165 (in Chinese).  
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. 生物工程学报, 2009, 25(8): 1160–1165.
- [32] Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. Mol Cell Biol, 1985, 5(12): 3376–3385.
- [33] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem Biol, 1998, 5(10): R245–R249.
- [34] Huang P, Shi JL, Sun QW, et al. Engineering *Pichia pastoris* for efficient production of a novel bifunctional *Strongylocentrotus purpuratus* invertebrate-type lysozyme. Appl Biochem Biotechnol, 2018, 186(2): 459–475.
- [35] Wang X, Jin P, Song P, et al. Cloning, expression and biochemical characterization of a novel acid protease EXPA from *Aspergillus niger*[EB/OL]. Ferment Indust, 2018. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.018387> (in Chinese).  
王鑫, 金鹏, 宋鹏, 等. 黑曲霉酸性蛋白酶 EXPA 的克隆表达与酶学性质解析. 食品与发酵工业, 2018. doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.018387.
- [36] Qiu CY, Wang ZX. Cloning and identification of a gene encoding an acidic protease from *Neurospora crassa*. Microbiol China, 2006, 33(4): 91–94 (in Chinese).  
邱重晏, 王正祥. 粗糙脉孢霉酸性蛋白酶基因的克隆与鉴定. 微生物学通报, 2006, 33(4): 91–94.
- [37] Tsujita Y, Endo A. Presence and partial characterization of internal acid protease of *Aspergillus oryzae*. Appl Environ Microbiol, 1978, 36(2): 237–242.
- [38] Vishwanatha KS, Rao AGA, Singh SA. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Food Chem, 2009, 114(2): 402–407.
- [39] Yin LJ, Chou YH, Jiang ST. Purification and characterization of acidic protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. J Mar Sci Technol, 2013, 21(9): 105–110.
- [40] Gu Y, Zhu XP, Wang SH. Glycosylation of proteins expressed in *Pichia pastoris*. Chem Life, 2004, 24(4): 353–355 (in Chinese).  
顾园, 诸欣平, 王少华. 毕赤酵母表达蛋白质的糖基化. 生命的化学, 2004, 24(4): 353–355.
- [41] Shental-Bechor D, Levy Y. Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. Curr Opin Struct Biol, 2009, 19(5): 524–533.
- [42] Ma Q, Cai R, Jiang FC, et al. Effect of N-glycosylation on the heterologous expression of  $\beta$ -mannanase in *Pichia pastoris*. Food Sci, 2017, 38(16): 86–91 (in Chinese).  
马清, 蔡瑞, 姜凤超, 等. N-糖基化对  $\beta$ -甘露聚糖酶在毕赤酵母中异源表达的影响. 食品科学, 2017, 38(16): 86–91.
- [43] Wang Y, Gong X, Chang SH, et al. A *Pichia pastoris* with  $\alpha$ -1,6-mannosyltransferases deletion and its use in the expression of HSA/GM-CSF chimera. Chin J Biotech, 2007, 23(5): 907–914 (in Chinese).  
王越, 巩新, 唱韶红, 等.  $\alpha$ -1, 6-甘露糖转移酶基因敲除的毕赤酵母菌株构建及其用于融合蛋白 HSA/GM-CSF 表达的研究. 生物工程学报, 2007, 23(5): 907–914.
- [44] Wildt S, Gerngross TU. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(2): 119–128.

(本文责编 陈宏宇)