



# 地衣芽孢杆菌 E7 氨肽酶的异源表达及其在高效蛋白水解中的应用

陈雅惠, 柳志永, 张荣珍\*, 徐岩

江南大学生物工程学院, 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

陈雅惠, 柳志永, 张荣珍, 徐岩. 地衣芽孢杆菌 E7 氨肽酶的异源表达及其在高效蛋白水解中的应用. 微生物学报, 2022, 62(8): 3079–3091.

Chen Yahui, Liu Zhiyong, Zhang Rongzhen, Xu Yan. Heterologous expression of *Bacillus licheniformis* E7 aminopeptidase and its application for efficient proteolysis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3079–3091.

**摘要:**【目的】将地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) E7 氨肽酶基因 *pepN* 克隆到大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 中, 实现氨肽酶 *EcPepN* 的异源表达, 研究重组酶的酶学性质及其与碱性蛋白酶协同作用, 高效水解大豆蛋白和酪蛋白, 产生小分子活性肽和游离氨基酸。【方法】以地衣芽孢杆菌 E7 基因组 DNA 为模板, 将氨肽酶基因 *pepN* 克隆到载体 pET28a 中, 构建重组表达载体 pET28-*pepN*, 转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 经 DNA 测序验证, 获得重组菌 *E. coli* BL21/pET28-*pepN*。利用镍离子亲和层析柱对重组酶进行分离纯化, 研究纯酶的 pH 和温度稳定性、半衰期和 NaCl 的耐受性等酶学性质。以商品化氨肽酶与碱性蛋白酶协同作用为对照, 重组酶 *EcPepN* 与碱性蛋白酶协同水解大豆蛋白和酪蛋白, 测定水解产物中小分子活性肽和游离氨基酸的组成。【结果】*EcPepN* 在大肠杆菌 BL21 中可溶性表达, SDS-PAGE 分析表明纯化的重组酶在 52 kDa 左右显示单一条带。在 7 种测定底物中, *EcPepN* 的最适底物为 Ala-pNA。在最适条件(pH 9.0 和 50 °C)下, 最高比酶活为 365.04 U/mg,  $K_M$  值为 1.2 mmol/L,  $k_{cat}$  为 598.3 s<sup>-1</sup>,  $k_{cat}/K_M$  为 499.0 L/(mmol·s)。当重组酶 *EcPepN* 在 pH 6.0–9.0 孵育 2 d 后, 相对酶活力保持 85% 以上, 在 45 °C 下半衰期为 36 h。酶在 3.0 mol/L NaCl 中 22 d 后, 残留酶活力为 55% 以上。重组 *EcPepN*

**基金项目:** 国家自然科学基金(31970045); 国家轻工技术与工程双一流学科项目(LITE2018-12); 高校学科人才引进计划(111-2-06); 江苏省高等学校拔尖学科项目

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970045), by the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-12), by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06) and by the Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions

\*Corresponding author. Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85918201; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

Received: 3 December 2021; Revised: 3 March 2022; Published online: 28 March 2022

与碱性蛋白酶协同作用水解大豆蛋白和酪蛋白，和商品化氨肽酶与碱性蛋白酶协同作用水解蛋白效率相当，水解产物中超过 70% 为分子量小于 500 Da 的活性肽，同时含有超过 2 000 mg/L 种类丰富的游离氨基酸。【结论】构建了氨肽酶的重组菌株，重组酶 *EcPepN* 具有较好 pH 和温度稳定性及较强的高浓度 NaCl 耐受性，能够高效催化大豆蛋白和酪蛋白水解，释放小分子活性肽和游离氨基酸，该研究为提高蛋白质的深度水解和富含蛋白质生物资源的增值提供了重要研究途径。

**关键词：**地衣芽孢杆菌；氨肽酶；大肠杆菌；酶学性质；蛋白水解

## Heterologous expression of *Bacillus licheniformis* E7 aminopeptidase and its application for efficient proteolysis

CHEN Yahui, LIU Zhiyong, ZHANG Rongzhen<sup>\*</sup>, XU Yan

Key Laboratory of Industrial Biology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] Aminopeptidase gene *pepN* from *Bacillus licheniformis* E7 was cloned into *Escherichia coli* BL21 for heterologous expression of recombinant aminopeptidase *EcPepN*. The enzymatic properties of the recombinant *EcPepN* were studied. The combination of *EcPepN* with alkaline protease efficiently improved the hydrolysis of soybean protein and casein and released multitudinous peptides and amino acids. [Methods] With the genomic DNA of E7 as template, the aminopeptidase gene *pepN* was cloned into the expression vector pET28a to construct recombinant expression plasmid pET28-pepN, which was transformed into the competent cells of *E. coli* BL21. Through DNA sequencing verification, the recombinant *E. coli* BL21/pET28-pepN was obtained. The recombinant enzyme was purified by nickel-affinity chromatography. The pH and temperature stability, half-life, and NaCl tolerance of the pure enzyme were tested. With the commercial aminopeptidase combined with alkaline protease as a control, the combination of *EcPepN* and alkaline protease was used to hydrolyze soybean protein and casein, and the constituents of active small peptides and free amino acids in the hydrolysate were determined. [Results] The recombinant *EcPepN* was expressed in *E. coli* BL21. SDS-PAGE analysis showed that the purified target protein presented a single band at about 52 kDa. Among the seven substrates tested, the preferred substrate of *EcPepN* was Ala-pNA. Under optimal conditions (pH 9.0 and 50 °C), its highest specific activity was 365.04 U/mg, and its  $K_M$ ,  $k_{cat}$  and  $k_{cat}/K_M$  values towards Ala-pNA were 1.2 mmol/L, 598.3 s<sup>-1</sup>, and 499.0 L/(mmol·s), respectively. After incubation at pH 6.0–9.0 for 2 days, the relative activity remained more than 85%, and its half-life was 36 h at 45 °C. After 22 days of incubation in 3.0 mol/L NaCl, the residual activity was more than 55%. When the recombinant aminopeptidase *EcPepN* worked synergistically with alkaline protease to hydrolyze soybean protein and casein, its hydrolysis efficiency was similar to that of the combination of commercial aminopeptidase and alkaline protease. More than 70% of the constituents of hydrolysate were peptides with molecular weight of less than 500 Da and it also

contained more than 2 000 mg/L of free amino acids. **[Conclusion]** The recombinant strain containing aminopeptidase *EcPepN* was developed. The recombinant *EcPepN* shows pH and temperature stability and strong tolerance to NaCl of high concentration. It can efficiently catalyze the hydrolysis of soybean protein and casein and release small molecular active peptides and abundant free amino acids. This study provides important methods for enhancing deep protein hydrolysis and improving the values of protein-rich bioresources.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*; aminopeptidase; *Escherichia coli*; enzymatic properties; protein hydrolysis

氨肽酶(aminopeptidases, APs, EC 3.4.11)是一类外切蛋白酶,它能够选择性地降解多肽链和蛋白质 N 末端氨基酸残基,释放出游离氨基酸<sup>[1]</sup>。其具有降低蛋白质水解液苦味的用途<sup>[2]</sup>,可提高乳制品、虾肌肉等食品的风味<sup>[3]</sup>,被广泛应用于食品加工等行业。此外,氨肽酶可以生产具有特殊功能的生物活性多肽,如酪氨酸磷酸肽、降压肽等<sup>[4]</sup>,还具有结合 DNA 的功能,作为转录抑制因子在基因表达调控上扮演着重要的角色<sup>[5-6]</sup>。

氨肽酶来源广泛、种类繁多,大量存在于植物、动物、微生物中,目前已报道的氨肽酶主要来源于微生物,如米曲霉(*Aspergillus oryzae*)<sup>[7-8]</sup>、*Streptomyces septatus*<sup>[9]</sup>、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[10]</sup>。目前市场上氨肽酶的供应主要来自诺维信、天野等几家国际公司,价格比较昂贵,影响了相关产业的生产成本和行业竞争力。除了氨肽酶自身底物特异性的影响,大部分氨肽酶在高温环境下容易失活。稳定且耐高温的高催化活性氨肽酶相对匮乏,阻碍了其工业化应用。因此,挖掘高催化活力、高稳定性且具有工业化应用价值的氨肽酶具有重要的研究意义。

碱性蛋白酶是内切型蛋白酶,能够水解蛋白质肽键,被广泛应用于蛋白质水解中,但其对大豆蛋白、小麦蛋白等植物蛋白水解效果不理想,存在水解度较低、口感不佳等问题<sup>[11]</sup>。

利用氨肽酶对碱性蛋白酶水解产物进一步酶切,不仅能够提高水解度,而且增加了水解液中小肽和游离氨基酸的释放,改善产物风味,提高营养价值<sup>[12]</sup>。亮氨酸氨肽酶协同碱性蛋白酶水解大米蛋白,水解液中游离氨基酸含量是碱性蛋白酶单独水解时的 3 倍,水解液中分子量小于 180 Da 的小肽比碱性蛋白酶单独水解时提高了 25%<sup>[13]</sup>。

目前,大量研究聚焦于产氨肽酶菌株的筛选、异源表达、酶学性质表征等。Huang 等<sup>[14]</sup>在毕赤酵母中过表达了来源于酱油曲霉 GIM3.30 的亮氨酸氨肽酶 Lap1。Lin 等<sup>[15]</sup>在黑曲霉中异源表达来源于 *Thermomyces lanuginosus* 的高活性和耐热性的亮氨酸氨肽酶。Liu 等<sup>[8]</sup>在大肠杆菌异源表达来源于米曲霉 JN-412 的脯氨酸氨肽酶,并利用随机突变和饱和定点突变等手段对其进行改造,借助高通量技术筛选高催化活性的突变体,得到了催化性能更优的氨肽酶。该脯氨酸氨肽酶在酸性环境的稳定性与热稳定性得到了显著提高,能够更好地与酸性和中性内切蛋白酶协同作用。

本实验室前期筛选获得一株产氨肽酶菌株地衣芽孢杆菌 E7,并利用染色体步移技术从其基因组中克隆出氨肽酶基因 *pepN*<sup>[16]</sup>。大肠杆菌作为基因工程菌,具有遗传背景清晰、安全易培养、繁殖速度快、蛋白表达水平高且稳定等优点,是外源蛋白高效表达的理想宿主<sup>[17]</sup>。

本研究通过在大肠杆菌中异源表达氨肽酶 PepN, 研究其酶学性质, 以大豆蛋白和酪蛋白等富含蛋白的生物物质为底物, 利用重组氨肽酶与碱性蛋白酶协同作用进行水解, 获得活性小分子肽和丰富的游离氨基酸。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

#### 1.1.1 菌株和质粒

菌株地衣芽孢杆菌 E7 由本实验室筛选与保藏; 菌株大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 BL21(DE3)和质粒 pET-28a 由本实验室保藏。

#### 1.1.2 主要的试剂

Primestar、限制性核酸内切酶(*Bam*H I 和 *Xho* I)、DNA Marker、Premixed Protein Marker (Low)购于宝生物工程(大连)有限公司; 单片段同源重组试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 卡那霉素、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、感受态细胞制备试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 对硝基苯胺衍生物购于 Bachem 公司; 碱性蛋白酶和商品化氨肽酶购于安琪酵母股份有限公司; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

#### 1.1.3 培养基和主要溶液

LB 培养基: 蛋白胨 1.0% (W/V), 酵母提取物 0.5% (W/V), NaCl 1.0% (W/V)。

缓冲液 A: 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0。

缓冲液 B: 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mol/L 咪唑, pH 8.0。

### 1.2 重组氨肽酶表达载体的构建

以地衣芽孢杆菌 E7 基因组 DNA 为模板, 设计合成引物 P1 (5'-CAAATGGGTCGCGGATC

CATGGGCCTCTTCAAGAAAAGTA-3') 和 P2 (5'-GTGGTGGTGCTCGAGTTACAGGTTCCCACTAAACCGCTC-3'), 引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I, PCR 扩增目的基因 *pepN*。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保温。利用单片段同源重组试剂盒将目的基因 *pepN* 与经双酶切处理的线性化载体 pET-28a 进行连接, 构建表达载体 pET28-pepN, 转化进感受态细胞大肠杆菌 JM109。经 DNA 测序验证后, 将重组质粒 pET28-pepN 转化进感受态细胞大肠杆菌 BL21(DE3), 构建重组表达菌株 *E. coli* BL21/pET28-pepN。

### 1.3 重组氨肽酶的诱导表达和纯化

挑取单克隆于含 50 μg/mL 卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 7–8 h。按照 1%接种量转接到含 50 μg/mL 卡那霉素的 200 mL LB 液体培养基中扩大培养, 当  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 于 20 °C、200 r/min 振荡培养 12–14 h。离心收集菌体, 用缓冲液 A 将细胞重悬。在冰浴条件下, 使用超声破碎仪对细胞进行破碎处理, 破碎条件为: 350 W 功率, 工作 2 s, 间隔 3 s, 破碎时间 10–15 min。将细胞破碎液于 4 °C、10 000×g 条件下离心 30 min 获得上清液, 即为粗酶液 *EcPepN*。粗酶液经 0.22 μm 水系滤膜过滤, 滤液用于蛋白纯化。

用缓冲液 A 将镍离子亲和层析柱平衡 5 个柱体积。粗酶液上样后, 用 2%缓冲液 B 洗脱杂蛋白, 接着用 10%缓冲液 B 洗脱并收集目的蛋白。再利用超滤管对收集的酶液进行脱盐处理, 除去酶液中的咪唑。脱盐后的纯酶液 *EcPepN* 进行 SDS-PAGE 验证。蛋白纯化操作在 4 °C 下进行。

## 1.4 重组氨肽酶酶学性质的测定

### 1.4.1 酶活测定

酶活测定参考 Lei 等<sup>[11]</sup>的方法, 并在其基础上有所调整。反应体系为: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液, 2 mmol/L 底物 Ala-pNA 和适量的酶液, 37 °C 进行反应。利用酶标仪连续测定 405 nm 处的吸光值, 以测定数值呈线性部分的斜率计算酶活。酶活定义为 37 °C 下每分钟催化底物生成 1 μmol 对硝基苯胺所需的酶量为一个酶活单位(U)。

### 1.4.2 重组氨肽酶 *EcPepN* 的最适反应 pH 和 pH 稳定性

测定不同 pH 条件下重组氨肽酶的酶活力, 探究重组氨肽酶 *EcPepN* 的最适反应 pH。不同 pH 缓冲液为: 0.2 mol/L 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.0), 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0 和 8.0), 50 mmol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0 和 10.0)。

用不同 pH 缓冲液稀释纯酶液, 将其放于 4 °C 静置 2 d, 测定重组酶 *EcPepN* 残余酶活力, 研究氨肽酶 *EcPepN* 的 pH 稳定性。

### 1.4.3 重组氨肽酶 *EcPepN* 的最适反应温度和温度稳定性

将 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)和 2 mmol/L 底物 Ala-pNA 置于 30–55 °C (间隔 5 °C)保温 3 min, 加入适量酶液, 测定不同温度条件下重组氨肽酶 *EcPepN* 的酶活力, 研究氨肽酶 *EcPepN* 的最适反应温度。

将等量酶液分别置于 30–55 °C (间隔 5 °C) 1 h, 然后加入其余反应物, 测定重组酶 *EcPepN* 的残余酶活力, 研究其温度稳定性。

### 1.4.4 重组氨肽酶 *EcPepN* 的半衰期测定

将重组酶 *EcPepN* 置于 50 °C 和 45 °C 金属浴, 间隔一段时间测定其酶活, 直到残留酶活力降低到 50%以下, 酶活降至 50%的时间即为半衰期。

### 1.4.5 NaCl 对重组氨肽酶 *EcPepN* 酶活力的影响

在反应体系中加入适量的固体 NaCl, 使体系中的 NaCl 终浓度达到 0–3 mol/L。测定不同 NaCl 浓度下重组氨肽酶 *EcPepN* 的酶活, 探究 NaCl 对重组酶活力的影响。将酶液置于 3 mol/L NaCl 溶液中, 间隔一段时间测定残余酶活力, 研究重组酶 *EcPepN* 的 NaCl 稳定性。

### 1.4.6 重组氨肽酶 *EcPepN* 的底物特异性

以 aminoacyl-p-nitroanilines (Ala-pNA、Arg-pNA、Lys-pNA、Leu-pNA、Val-pNA、Met-pNA、Pro-pNA)为底物, 测定重组酶 *EcPepN* 的酶活力。以 Ala-pNA 为底物时测定酶活为 100%, 计算酶催化其他底物的相对酶活。

### 1.4.7 重组氨肽酶 *EcPepN* 的动力学测定

在最适反应条件下, 测定重组氨肽酶 *EcPepN* 的动力学参数。将反应体系(除酶外)在金属浴孵育 5 min, 测定不同浓度(0.2–5.5 mmol/L) Ala-pNA 的初始反应速率。利用 Origin 9.0 软件处理数据, 采用非线性模拟方法计算重组酶 *EcPepN* 对 Ala-pNA 的  $K_M$  和  $k_{cat}$  值。

## 1.5 重组氨肽酶 *EcPepN* 催化蛋白水解

以商品化氨肽酶(亮氨酸氨肽酶)为对照组, 利用重组氨肽酶 *EcPepN*, 组合或不组合碱性蛋白酶对大豆分离蛋白和酪蛋白进行水解反应。取一定量蛋白样品溶于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)中, 使得反应体系终浓度为 1% (W/V)。在沸水浴中煮沸 5 min, 确保蛋白完全溶解。待冷却至室温后, 在反应体系中加入 0.5 g/L 碱性蛋白酶(酶活力为 400 000 U/g, 即 E/S=20 000 U/g)和 0.5 g/L 的重组氨肽酶 *EcPepN* 或商品化氨肽酶。反应结束后, 将反应体系放入沸水中煮沸 5 min 以终止反应。将反应液于 10 000×g 离心 5 min, 分离上清, 用 0.22 μm 水系滤膜处理后, 样品进行高效液相色谱(HPLC)分析水解液中多肽分布和疏水性氨基酸的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组氨肽酶表达菌株的构建与表达

以地衣芽孢杆菌 E7 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增氨肽酶基因 *pepN*, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, 1 500 bp 左右有清晰的单一条带, 与目的片段理论分子大小(1 446 bp)相一致。载体 pET28a 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切处理后, 利用同源重组法与目的基因 *pepN* 连接, 构建重组质粒 pET28-pepN。测序正确后, 将重组质粒转化到感受态细胞大肠杆菌 BL21, 构建重组氨肽酶表达菌株 *E. coli* BL21/pET28-pepN。

将重组菌经过 0.2 mmol/L IPTG 诱导培养, 经超声破碎后离心获得细胞破碎液上清液, 即粗酶液。用镍离子亲和层析柱对粗酶液进行分离纯化, 100 mmol/L 咪唑将目标蛋白洗脱。洗脱蛋白经脱盐处理, SDS-PAGE 电泳结果(图 1)显示目标蛋白基本为单一条带, 分子量为 52 kDa 左右, 与重组氨肽酶理论分子量(52.45 kDa)相吻合。

### 2.2 pH 和温度对重组酶 *EcPepN* 酶活力的影响

测定了不同 pH 和温度对重组酶 *EcPepN* 酶

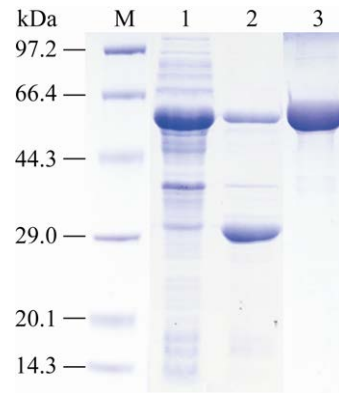


图 1 重组酶 *EcPepN* 的表达纯化

Figure 1 SDS-PAGE analysis of expression and purification of *EcPepN* in *E. coli* BL21/pET28-pepN. M: protein marker; lane 1: the cell-free extracts; lane 2: the sediments; lane 3: the purified *EcPepN*.

活力的影响。*EcPepN* 在 pH 9.0 时酶活力达到最高, 且在 pH 6.0–9.0 范围内酶活力非常稳定, 孵育 2 d 后相对酶活力仍保持 85% 以上(图 2A)。重组酶 *EcPepN* 表现出较好的 pH 稳定性, 能够在较宽的 pH 范围内发挥功能。

随着反应温度的提高, *EcPepN* 酶活力逐渐增加, 在 50 °C 时达到最高, 当温度高于 50 °C 酶活力迅速降低(图 2B)。将 *EcPepN* 置于不同温度条件下温浴 1 h, 测定重组酶的温度稳定

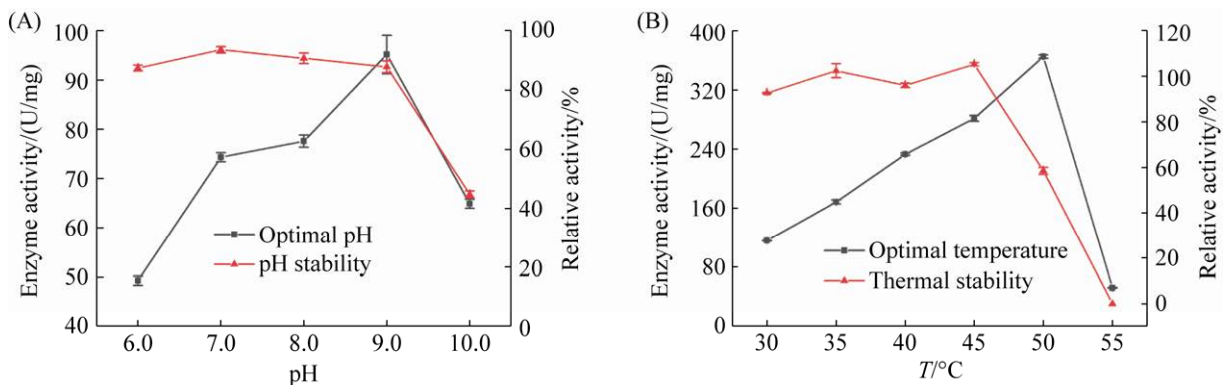


图 2 pH (A) 和温度 (B) 对重组酶 *EcPepN* 酶活和稳定性的影响

Figure 2 Effects of pH (A) and temperature (B) on activity and stability of *EcPepN*.

性。当温度不高于 45 °C 时, *EcPepN* 残留酶活力几乎不变, 而当温度高于 45 °C 时酶活力逐渐丧失。*EcPepN* 在 50 °C 条件下温浴 1 h, 残留酶活力保持 58%。

### 2.3 重组酶 *EcPepN* 的半衰期

氨肽酶广泛应用于蛋白质水解, 酶在特定温度条件下稳定催化对实现高效水解具有重要意义, 因此有必要测定重组酶 *EcPepN* 的半衰期。*EcPepN* 在 50 °C 条件下的半衰期为 1 h, 在 6 h 后酶活力几乎完全丧失(图 3A)。在 45 °C 下 36 h, *EcPepN* 酶活力下降约 50% (图 3B)。值得关注的是, 热处理 12 h 后, *EcPepN* 酶活力显著上升。这可能是由于酶分子具有较高的整

体稳定性, 导致其热失活率较低, 且随着热处理时间的增加, 活性位点趋向更灵活、更利于催化反应的变化, 使其展现出更好的催化效率<sup>[18]</sup>。随着时间的增加, 体系中失活的酶占大多数, 从而导致酶活力的降低<sup>[19]</sup>。重组酶 *EcPepN* 在 45 °C 环境下具有良好的热稳定性, 因此选择 45 °C 来进行大豆分离蛋白和酪蛋白的水解实验。

### 2.4 NaCl 对重组酶 *EcPepN* 酶活力的影响

耐盐氨肽酶被广泛地应用于各种发酵食品的生产中, 如酱油、豆瓣酱等。探究 NaCl 对重组酶 *EcPepN* 酶活力的影响具有重要的研究意义。从图 4A 可知, 低浓度的 NaCl 对重组酶活

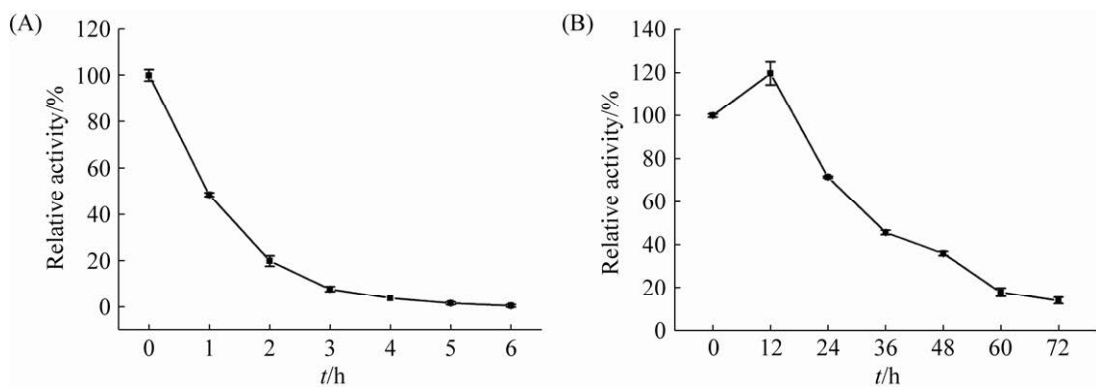


图 3 重组酶 *EcPepN* 的半衰期

Figure 3 Half-lives of *EcPepN* at 50 °C (A) and 45 °C (B).

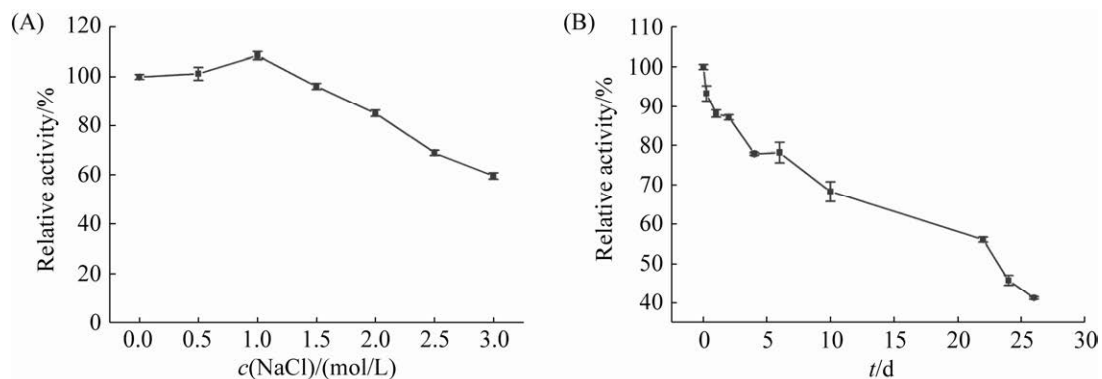


图 4 NaCl 对重组酶 *EcPepN* 酶活力的影响

Figure 4 Effect of NaCl on activity (A) and stability (B) of *EcPepN*.



力有一定的促进作用。当 NaCl 浓度为 1.0 mol/L 时, *EcPepN* 酶活力达到最高, 相对酶活力为 108.5%。随着 NaCl 浓度的增加, 酶活力逐渐降低。当 NaCl 浓度为 3.0 mol/L 时, *EcPepN* 的相对酶活力为 59.8%。将 *EcPepN* 置于 3.0 mol/L NaCl 条件下 22 d, 其残留酶活力仍能保持 55% 以上(图 4B), 表明重组酶 *EcPepN* 具有良好的盐耐受性。

## 2.5 重组酶 *EcPepN* 的底物特异性和动力学测定

以 Ala-pNA、Arg-pNA、Lys-pNA、Leu-pNA、Val-pNA、Met-pNA、Pro-pNA 为底物, 测定重组酶 *EcPepN* 的底物特异性。*EcPepN* 对底物 Ala-pNA 表现出最高酶活力, 然后依次为 Lys-pNA 和 Arg-pNA, 其相对酶活力分别为 26.6% 和 17.2% (图 5)。*EcPepN* 对底物 Met-pNA 和 Leu-pNA 的催化活性较低, 均不高于 4%。酶催化底物 Pro-pNA 和 Val-pNA 几乎检测不到酶活力。因此, 该重组氨肽酶 *EcPepN* 被认定为丙氨酸氨肽酶。在最适反应条件 pH 9.0 和 50 °C 下, 重组酶 *EcPepN* 催化 Ala-pNA 底物的  $K_M$  值为 1.2 mmol/L,  $k_{cat}$  为 598.3 s<sup>-1</sup>,  $k_{cat}/K_M$  为 499.0 L/(mmol·s)。

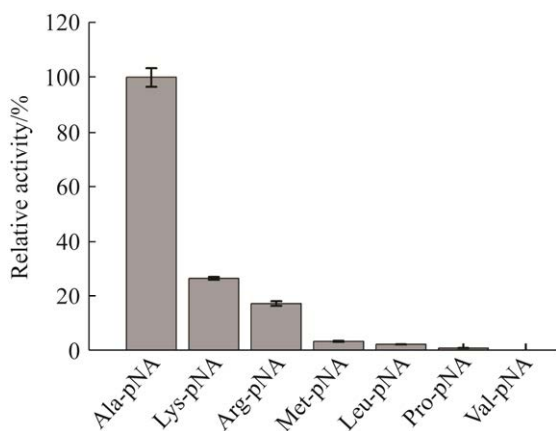


图 5 重组酶 *EcPepN* 的底物特异性  
Figure 5 Substrate specificity of *EcPepN*.

## 2.6 重组酶 *EcPepN* 在蛋白质水解中的应用

碱性蛋白酶是一类内切蛋白酶, 它能将蛋白质从内部水解成短肽。由于其作用的蛋白质水解液水解度低、口感欠佳, 易产生苦味, 因此通常采用碱性蛋白酶和氨肽酶进行协同水解<sup>[11,20]</sup>。氨肽酶作为外切蛋白酶, 能够以碱性蛋白酶切割的短肽作为底物, 特异性地催化 N 末端氨基酸残基的释放, 将短肽进一步切割成更小的小肽或游离氨基酸<sup>[21]</sup>。蛋白质水解液的苦味通常来自于水解液中的苦味肽, 其在 N 末端带有疏水性氨基酸<sup>[22]</sup>。氨肽酶将苦味肽上的疏水性氨基酸进行水解释放, 可以极大程度地改善蛋白质水解液的风味。选择大豆分离蛋白和酪蛋白作为底物, 协同碱性蛋白酶进行水解, 并以商品化氨肽酶作为对照组, 对比分析, 探究重组氨肽酶 *EcPepN* 的水解能力。

以大豆分离蛋白作为底物, 碱性蛋白酶单独水解 6 h 底物剩余量为 47.3%, 而重组酶 *EcPepN* 协同碱性蛋白酶水解底物剩余量为 11.9%, 商品化氨肽酶协同碱性蛋白酶水解为 12.8% (图 6A)。碱性蛋白酶单酶水解的大豆分离蛋白底物剩余量是协同重组酶 *EcPepN* 或商品化氨肽酶双酶水解底物剩余量的 4 倍。当碱性蛋白酶单独作用时, 大豆蛋白水解液中的多肽分子量分布主要集中在 1 000–2 000 Da (~10%)、500–1 000 Da (~25%)、150–500 Da (~43%) 以及 <150 Da (~12%) (图 6B)。其中, 绝大部分多肽集中在 150–1 000 Da 范围内, 占比为 68%。当碱性蛋白酶协同重组酶 *EcPepN* 或商品化氨肽酶共同水解时, 大豆蛋白水解液中的多肽分子量分布则主要集中在 1 000–2 000 Da (~7%)、500–1 000 Da (~13%)、150–500 Da (~30%) 以及 <150 Da (~42%)。其中, 小于 500 Da 的多肽分子量占比高达 72%。

以酪蛋白作为底物, 碱性蛋白酶单独水解



6 h 的底物剩余量为 26.2%，是协同重组酶 *EcPepN* 或商品化氨肽酶双酶水解的 2 倍左右 (图 6C)。当碱性蛋白酶单独作用时，酪蛋白水解液中的多肽主要分布为 1 000–2 000 Da (~13%)、500–1 000 Da (~28%)、150–500 Da (~50%)以及 <150 Da (~4%) (图 6D)。绝大部分多肽集中在 150–1 000 Da 范围，为 78%。当进行双酶水解时，酪蛋白水解液中的多肽主要分布在 1 000–2 000 Da (~8%)、500–1 000 Da (~13%)、

150–500 Da (~55%)以及 <150 Da (~23%)。此时，双酶协同水解释放的 <150 Da 大小的小肽含量是碱性蛋白酶单酶水解时的 6 倍。小于 500 Da 的多肽分子量占绝大部分，约为 78%。

利用 HPLC 测定蛋白质水解液中的游离氨基酸含量。对大豆分离蛋白进行水解，碱性蛋白酶单独作用的水解液中游离氨基酸含量为 43.81 mg/L，而协同重组酶 *EcPepN* 或商品化氨肽酶双酶水解产生的游离氨基酸含量分别为

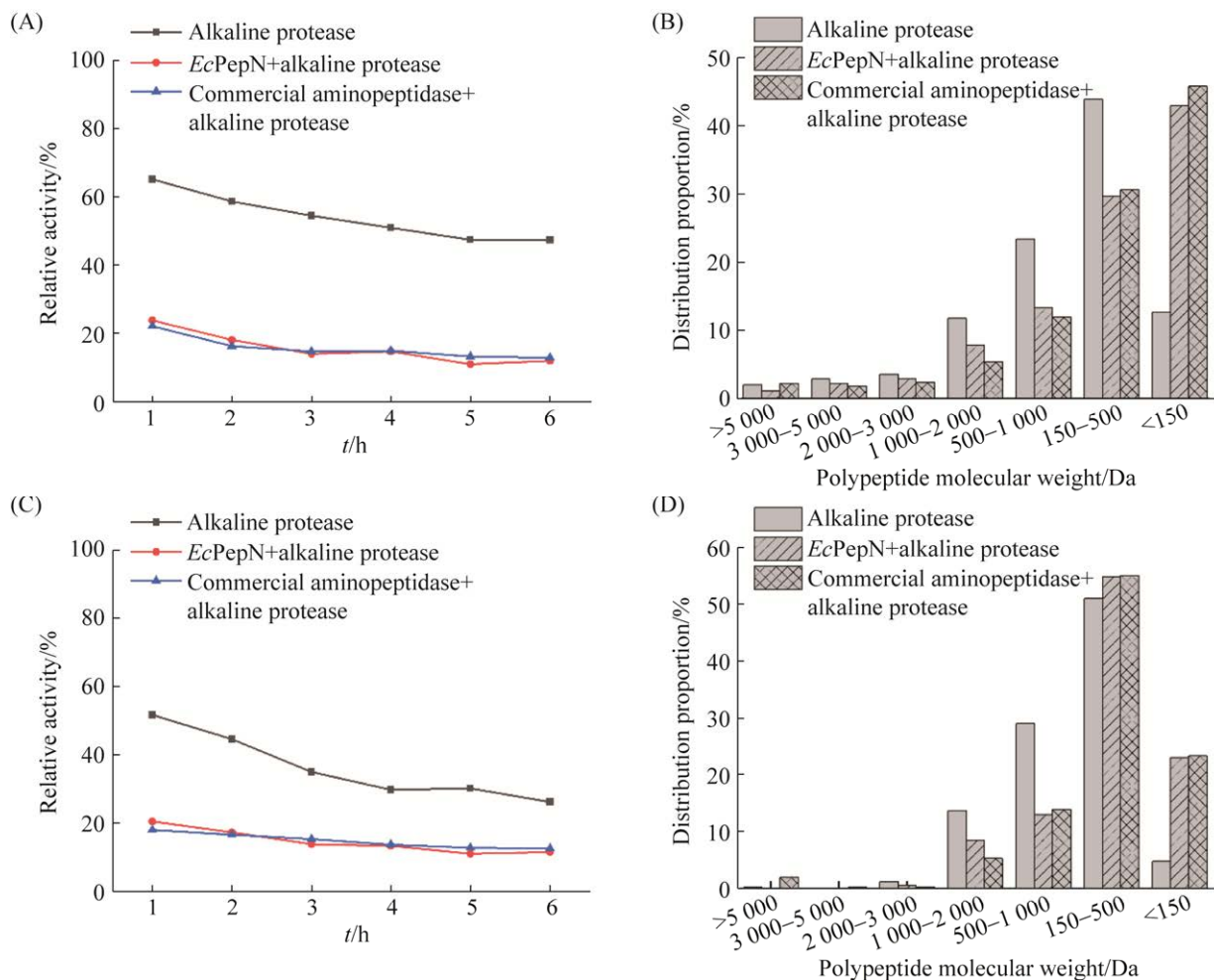


图 6 蛋白水解液的底物剩余量和多肽分子量分布

Figure 6 Substrate residue and molecular weight distribution of peptides in protein hydrolysate. A: residual soybean protein hydrolyzed by alkaline protease alone or its combination with *EcPepN* or commercial aminopeptidase; B: the distribution of polypeptide molecular weight in soybean protein hydrolysates; C: residual casein hydrolyzed by alkaline protease alone or its combination with *EcPepN* or commercial aminopeptidase; D: the distribution of polypeptide molecular weight in casein hydrolysates.

2 277.46 和 2 284.66 mg/L (表 1)。其中, His、Arg、Cys 和 Leu 含量增加最为明显, 在 200–500 mg/L 范围内; 其次 Ser、Gly、Ala、Tyr、Ile 和 Lys 的含量也有明显增加, 在 100–200 mg/L 范围之间。以酪蛋白作为底物进行水解, 水解液中检测到的游离氨基酸含量较大豆分离蛋白水解液的氨基酸含量大幅度降低。碱性蛋白酶单独水解时, 酪蛋白水解液中的游离氨基酸含量未达到检测最低值。在添加重组酶 *EcPepN* 或商品化氨肽酶后, 游离氨基酸含量上升到 182.38 和 205.90 mg/L (表 2)。游离氨基酸中 Tyr 和 Leu 的增加最为明显, 达到 40–60 mg/L, 约占总游离氨基酸含量的 50%。

上述结果表明, 不论是植物蛋白或是动物蛋白, 氨肽酶的加入不仅能够提高蛋白质水解

**表 1** 大豆分离蛋白水解液游离氨基酸含量分布  
Table 1 The free amino acid contents of soybean protein hydrolysates

Amino acids	Alkaline protease/(mg/L)	<i>EcPepN</i> /alkaline protease/(mg/L)	Commercial aminopeptidase/alkaline protease/(mg/L)
Asp	0.06	8.50	14.63
Glu	7.20	70.05	39.32
Ser	–	144.66	123.78
His	–	210.48	197.78
Gly	–	146.40	49.96
Thr	–	20.36	54.84
Arg	–	308.89	314.29
Ala	8.21	131.36	98.87
Tyr	0.03	119.65	107.99
Cys	–	263.88	303.37
Val	–	90.92	128.72
Met	–	39.59	40.10
Phe	–	23.47	30.38
Ile	–	100.00	144.68
Leu	28.31	434.13	471.76
Lys	–	165.11	164.20
Total	43.81	2 277.46	2 284.66

–: not detected.

**表 2** 酪蛋白水解液游离氨基酸含量分布

Table 2 The free amino acid contents of casein hydrolysates

Amino acids	Alkaline protease/(mg/L)	<i>EcPepN</i> /alkaline protease/(mg/L)	Commercial aminopeptidase/alkaline protease/(mg/L)
Asp	–	–	–
Glu	–	0.52	–
Ser	–	–	–
His	–	17.50	22.55
Gly	–	2.50	3.46
Thr	–	29.39	17.23
Arg	–	26.99	28.18
Ala	–	2.60	2.14
Tyr	–	50.16	60.00
Cys	–	–	–
Val	–	–	6.18
Met	–	2.54	4.17
Phe	–	–	–
Ile	–	–	–
Leu	–	40.98	51.79
Lys	–	9.20	10.20
Total	–	182.38	205.90

–: not detected.

程度, 而且进一步促进了水解液中小肽以及游离氨基酸的释放。重组氨肽酶 *EcPepN* 的水解效果与商品化氨肽酶相当, 与其他报道的氨肽酶相比较(表 3)具有较为突出的优势, 因此, *EcPepN* 与碱性蛋白酶协同作用具有良好的蛋白水解能力, 在多种蛋白水解中具有广泛的应用价值。

### 3 讨论

本研究从实验室前期筛选到的一株产氨肽酶地衣芽孢杆菌出发, 通过分子克隆、同源重组、转化等手段, 成功构建重组大肠杆菌, 实现重组酶 *EcPepN* 在胞内的可溶性表达。利用镍离子亲和层析柱纯化目标蛋白。重组酶在 pH 9.0、50 °C 条件下达到最大比酶活 365.04 U/mg。

表 3 不同氨肽酶协同碱性蛋白酶的水解情况

Table 3 Hydrolysis of different aminopeptidases with alkaline protease

Enzyme	<i>T</i> /°C	pH and time	Substrate	Hydrolysis efficiency*
<i>EcPepN</i> +alkaline protease	45	8.0; 6 h	Soybean protein isolate	4.0 times
<i>EcPepN</i> +alkaline protease	45	8.0; 6 h	Casein	2.3 times
Commercial aminopeptidase+alkaline protease	45	8.0; 6 h	Soybean protein isolate	3.7 times
Commercial aminopeptidase+alkaline protease	45	8.0; 6 h	Casein	2.1 times
rLap1+Alcalase <sup>[14]</sup>	50	8.5; 6 h	Soybean protein isolate	1.2 times
rLap1+Alcalase <sup>[14]</sup>	50	7.5; 6 h	Casein	2.3 times
Thelap+alkaline protease <sup>[15]</sup>	65	8.0; 6 h	Soybean protein isolate	1.8 times
BLAP+Alcalase <sup>[11]</sup>	50	8.0 for Alcalase, 8.5 for BLAP; 12 h	Soybean protein isolate	2.0 times

\*: The hydrolysis efficiency refers to the multiple of improvement of the sample compared with that of alkaline protease alone.

来源于米曲霉的脯氨酸氨肽酶在枯草芽孢杆菌中异源表达, 其最适温度也为 50 °C, 最适 pH 7.5, 纯化酶比酶活为 247.3 U/mg<sup>[23]</sup>。

重组酶 *EcPepN* 具有较好的 pH 稳定性和温度稳定性, 能在 pH 6.0–9.0 范围内 2 d 保持 85% 以上的残留酶活力, 在 30–45 °C 环境下温浴 1 h 酶活力基本保持不变。45 °C 时重组酶 *EcPepN* 的半衰期为 36 h。因此, *EcPepN* 可以在 45 °C 稳定地发挥其催化活性, 具有良好的工业应用潜力。据报道米曲霉 3.042 氨肽酶在 pH 6.0–9.0 条件下孵育 1 h 残留酶活力高于 70%<sup>[24]</sup>。沙克乳酸杆菌精氨酸氨肽酶的最适反应温度为 37 °C, 在 45 °C 温浴 20 min 后残余酶活只剩下 80% 左右<sup>[25]</sup>。酱油曲霉 GIM3.30 的亮氨酸氨肽酶在毕赤酵母中过表达, 在 50 °C 下温浴 1 h 残留酶活力为 50%<sup>[14]</sup>。来源于黑曲霉的天冬氨酸氨肽酶在 40 °C 保温 3 h, 残留酶活力低于 70%<sup>[26]</sup>。重组酶 *EcPepN* 还具有较强的耐盐性, 在 3.0 mol/L NaCl 存在时, *EcPepN* 的相对酶活力为 59.8%。然而在 3.0 mol/L NaCl 条件下维持 22 d, 残留酶活力仍能保持 55% 以上。已报道米曲霉 3.042 的天冬氨酸氨肽酶在 3.0 mol/L NaCl 中 15 d, 残留酶活力约为 30%<sup>[24]</sup>。重组酶

*EcPepN* 对底物 Ala-pNA 表现出最佳的催化活性, 是一种丙氨酸氨肽酶。目前丙氨酸氨肽酶的相关报道较少, 绝大部分为亮氨酸氨肽酶<sup>[14,27–28]</sup>、赖氨酸氨肽酶<sup>[29]</sup>、脯氨酸氨肽酶<sup>[30]</sup>等。重组酶 *EcPepN* 对多肽链 N 末端丙氨酸的高特异性和催化活性, 给丙氨酸特异性催化(如蛋白质 N 端测序等)提供了更多的选择。此外, 重组丙氨酸氨肽酶的蛋白水解效果与商业化的亮氨酸氨肽酶相当。

重组酶 *EcPepN* 与碱性蛋白酶的组合使用, 大幅度提高了蛋白质的水解程度, 并促进活性小分子多肽和丰度游离氨基酸的释放。在大豆分离蛋白水解液和酪蛋白水解液中, 以碱性蛋白酶单独水解底物为对照, 碱性蛋白酶协同重组氨肽酶 *EcPepN* 或协同商品化氨肽酶水解底物的效率提高 2–4 倍。在毕赤酵母中异源表达的亮氨酸氨肽酶与碱性蛋白酶协同水解, 其大豆分离蛋白水解液的水解度比碱性蛋白酶单独水解提高了 5% 左右<sup>[14]</sup>。碱性蛋白酶协同重组氨肽酶 *EcPepN* 或商品化氨肽酶作用的水解液中多肽分子量主要集中在 <500 Da 范围内, 占比高达 72%, 并且其释放的游离氨基酸含量是碱性蛋白酶单独水解所释放游离氨基酸的 50 倍,

疏水性氨基酸主要为 Leu、Ala 和 Ile。已报道的耐热亮氨酸氨肽酶 Thelap 协同碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白，其水解液中氨基酸总量是碱性蛋白酶单独水解时的 1.6 倍<sup>[15]</sup>。在酪蛋白水解液中，双酶协同水解更是极大地促进了游离氨基酸的增加。碱性蛋白酶单独水解底物，其水解液中的游离氨基酸未达到检测范围。双酶协同水解产生的游离氨基酸为 180–200 mg/L，疏水性氨基酸主要为 Leu，约占总游离氨基酸含量的 20%。因此，重组氨肽酶 *EcPepN* 在蛋白质水解上具有较强的水解能力，能够释放出丰富多样的游离氨基酸，与商品化氨肽酶的水解效果相当。此外，由于 *EcPepN* 具有较好的盐耐受性，可以在含盐度较高的环境中稳定发挥其催化活性，这赋予重组酶更广阔的蛋白水解应用范围。因此，基于上述重组酶 *EcPepN* 的高催化活力、稳定性以及高效的蛋白水解能力；考虑到本研究重组酶在大肠杆菌中表达纯化，增加了下游蛋白纯化成本，在蛋白水解应用方面也具有一定的局限性，我们后续将研究氨肽酶在枯草芽孢杆菌中的重组表达，降低酶的提纯成本，保证重组氨肽酶在食品应用领域的安全性。本研究为重组酶 *EcPepN* 的使用和蛋白水解应用提供了理论基础。

## 参考文献

- [1] Rahulan R, Dhar KS, Nampoothiri KM, Pandey A. Aminopeptidase from *Streptomyces gedanensis* as a useful tool for protein hydrolysate preparations with improved functional properties. *Journal of Food Science*, 2012, 77(7): C791–C797.
- [2] 朱强, 吴警涛, 田亚平. 亮氨酸氨肽酶的制备及在大米肽脱苦中的协同应用. *食品工业科技*, 2017, 38(19): 109–113.  
Zhu Q, Wu JT, Tian YP. Preparation of leucine aminopeptidase and collaborative application of debitterizing in rice peptides. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(19): 109–113. (in Chinese)
- [3] Zhang L, Cai QF, Wu GP, Shen JD, Liu GM, Su WJ, Cao MJ. Arginine aminopeptidase from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle: purification and characterization. *European Food Research and Technology*, 2013, 236(5): 759–769.
- [4] Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*, 2004, 21(1/2/3/4): 55–61.
- [5] Matsui M, Fowler JH, Walling LL. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological Chemistry*, 2006, 387(12): 1535–1544.
- [6] Nguyen Le Minh P, Nadal M, Charlier D. The trigger enzyme PepA (aminopeptidase A) of *Escherichia coli*, a transcriptional repressor that generates positive supercoiling. *FEBS Letters*, 2016, 590(12): 1816–1825.
- [7] Yang HY, Zhu Q, Zhou ND, Tian YP. Optimized expression of prolyl aminopeptidase in *Pichia pastoris* and its characteristics after glycosylation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2016, 32(11): 176.
- [8] Liu DH, Zhang DW, Huang QQ, Gu LL, Zhou ND, Tian YP. Mutagenesis for improvement of activity and stability of prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191(4): 1483–1498.
- [9] ARIMA J, Uesugi Y, Iwabuchi M, Hatanaka T. Alteration of leucine aminopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2 to phenylalanine aminopeptidase by site-directed mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 7229–7235.
- [10] Xi HX, Tian YP, Zhou ND, Zhou ZM, Shen W. Characterization of an N-glycosylated *Bacillus subtilis* leucine aminopeptidase expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(2): 236–246.
- [11] Lei FF, Zhao QZ, Sun-Waterhouse D, Zhao MM. Characterization of a salt-tolerant aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 that improves hydrolysis and debittering efficiency for soy protein isolate. *Food Chemistry*, 2017, 214: 347–353.
- [12] Gao XX, Liu ZM, Cui WJ, Zhou L, Tian YP, Zhou ZM. Enhanced thermal stability and hydrolytic ability of *Bacillus subtilis* aminopeptidase by removing the thermal sensitive domain in the non-catalytic region. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92357.
- [13] Wang KD, Tian YP, Zhou ND, Liu DH, Zhang DW. Studies on fermentation optimization, stability and application of prolyl aminopeptidase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 2018, 74: 10–20.

- [14] Huang WQ, Zhong LF, Meng ZZ, You ZJ, Li JZ, Luo XC. The structure and enzyme characteristics of a recombinant leucine aminopeptidase rLap1 from *Aspergillus sojae* and its application in debittering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177(1): 190–206.
- [15] Lin XT, Dong LB, Yu D, Wang B, Pan L. 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. *Protein Expression and Purification*, 2020, 167: 105544.
- [16] 张荣珍, 徐岩, 陈雅惠. 一种产氨肽酶的重组菌株及其在高效蛋白水解中的应用. 中国: 202210079394.9. 2022-01-24.
- [17] 严伟, 聂尧, 徐岩. 长野芽孢杆菌(*Bacillus naganensis*) 普鲁兰酶在大肠杆菌中的活性表达与分泌调控. 微生物学报, 2013, 53(2): 145–153.  
Yan W, Nie Y, Xu Y. Expression and secretion regulation of *Bacillus naganensis* pullulanase in recombinant *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(2): 145–153. (in Chinese)
- [18] Daniel RM, Peterson ME, Danson MJ, Price NC, Kelly SM, Monk CR, Weinberg CS, Oudshoorn ML, Lee CK. The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *The Biochemical Journal*, 2009, 425(2): 353–360.
- [19] Tijssens LMM, Greiner R, Biekman ESA, Konietzny U. Modeling the effect of temperature and pH on activity of enzymes: the case of phytases. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 72(3): 323–330.
- [20] Chen L, Chen JS, Ren JY, Zhao MM. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(6): 2600–2609.
- [21] Gao XX, Cui WJ, Tian YP, Zhou ZM. Over-expression, secretion, biochemical characterisation, and structure analysis of *Bacillus subtilis* aminopeptidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(11): 2810–2815.
- [22] 白云, 郭兴凤. 苦味肽的形成及其脱苦研究进展. 粮食加工, 2015, 40(5): 28–33.  
Bai Y, Guo XF. The forming and debittering research of bitter peptides. *Grain Processing*, 2015, 40(5): 28–33. (in Chinese)
- [23] 汪克红, 王开道, 田亚平. 脯氨酸氨肽酶枯草芽孢杆菌分泌表达及特性表征. 食品与生物技术学报, 2018, 37(11): 1135–1140.  
Wang KH, Wang KD, Tian YP. Secretory expression and characterization of prolyl aminopeptidase in *Bacillus subtilis*. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2018, 37(11): 1135–1140. (in Chinese)
- [24] Gao XL, Yin YY, Zhou CS. Purification, characterisation and salt-tolerance molecular mechanisms of aspartyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* 3.042. *Food Chemistry*, 2018, 240: 377–385.
- [25] Sanz Y, Toldrá F. Purification and characterization of an arginine aminopeptidase from *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1980–1987.
- [26] 乔雅丽, 董自星, 宋鹏, 刘晓光, 路福平. 黑曲霉天冬氨酸氨肽酶的分子克隆与酶学性质解析. 食品研究与开发, 2017, 38(24): 181–187.  
Qiao YL, Dong ZX, Song P, Liu XG, Lu FP. Molecular cloning and biochemical characterization of an aspartyl aminopeptidase from *Aspergillus niger*. *Food Research and Development*, 2017, 38(24): 181–187. (in Chinese)
- [27] Gu YQ, Walling LL. Identification of residues critical for activity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(6): 1630–1640.
- [28] 张大伟, 刘德华, 黄钦钦, 田亚平. 食品级高产亮氨酸氨肽酶重组 *Bacillus subtilis* 的构建和发酵优化. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 1–6.  
Zhang DW, Liu DH, Huang QQ, Tian YP. Construction and fermentation optimization of food-grade recombinant *Bacillus subtilis* for the production of leucine aminopeptidase. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(8): 1–6. (in Chinese)
- [29] 吴延涛, 丁国伟, 席宏星, 田亚平. 耐热赖氨酸氨肽酶菌株筛选、鉴定及基因克隆. 食品与生物技术学报, 2014, 33(8): 821–826.  
Wu YT, Ding GW, Xi HX, Tian YP. Strain with thermo-stable lysine aminopeptidase: isolation, identification and gene cloning. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(8): 821–826. (in Chinese)
- [30] Nandan A, Pandey A, Nampoothiri KM. Proline-specific extracellular aminopeptidase purified from *Streptomyces lavendulae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 163(8): 994–1001.

(本文责编 李磊)