白曲酸性蛋白酶在无孢黑曲 SH-2 中的克隆表达及酶学性质分析

董文超，王斌，潘力

（华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510006）

摘要：白曲霉酸性蛋白酶在白酒酿造发酵过程中具有溶解发酵原料的颗粒，促进微生物繁殖，分解蛋白质生成香味物质，降解酵母菌体蛋白等多种功能，可以提高白酒风味，因此被广泛应用于白酒生产中。本研究利用经基因工程改造的低内源蛋白背景的黑曲霉宿主 SH-2，表达白曲霉酸性蛋白酶基因 pepB。通过 PCR 技术获得 pepB 以及表达元件糖化酶启动子 PglaA、糖化酶终止子 TglaA、乳清酸核苷-5-磷酸脱羧酶标记基因 pyrG，在 pMD18-T 载体基础上，构建了 pepB 表达载体，通过 PEG 介导转化法转化无孢黑曲酶 SH-2。重组菌株经发酵罐发酵 240 h，发酵粗酶液酶活达 9722 U/mL，是报道的白曲原始菌株酶活的 8.5 倍，SDS-PAGE 结果显示表达产物分子量约为 47 ku。酶学性质分析结果表明，该酸性蛋白酶最适反应温度为 35 ℃，最适 pH 为 4.0，Mn^{2+}、Cu^{2+}对酶活有显著地激活作用。最后，探究了在不同发酵初始 pH 下重组菌株酶活的变化，结果显示，在 pH 4.5~6.5 范围内，适当提高发酵初始 pH，酸性蛋白酶酶活会提高。以上结果表明，本研究成功构建了一株能胞内高效表达白曲酸性蛋白酶的菌株。

关键词：白曲酸性蛋白酶；无孢黑曲 SH-2；重组表达

文章篇号：1673-9078(2018)06-80-87 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.012

Cloning and Expression of Acidic Protease of *Aspergillus kawachii* in *non-spore Aspergillus niger SH-2* and Analysis of Enzymatic Properties

DONG Wen-chao, WANG Bin, PAN Li

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Acid protease of *Aspergillus kawachii*, which has the functions of dissolving the particles of the fermentation raw material , promoting microbial propagation, degrading yeast cell protein and other functions to improve liquor flavor, has been widely used in liquor production in the process of fermentation. *Aspergillus niger SH-2*, which had the property of low endogenous protein expression after genetic engineering transformation, was used in this study to express acid protease gene pepB from *Aspergillus kawachii*.. The gene pepB and expression elements glucoamylase promoter PglaA, glucoamylase terminator TglaA, orotic acid nucleoside-5-phosphate decarboxylase marker gene pyrG were obtained by PCR., and the pepB expression vector was constructed on the basis of pMD18-T vector. The recombinant strains were fermented for 240 h in the fermentor and the enzyme activity of the fermented crude enzyme was 9722 U/g, which was 8.5 times as much as that of the reported original enzyme strain, and SDS-PAGE pattern showed that the molecular weight of the expressed product was about 47 ku. The results of enzyme properties analysis showed that the optimum reaction temperature of the acidic protease was 35 ^{o}C and the optimum pH was 4.0. Mn^{2+} and Cu^{2+} had significant activation effect on the enzyme activity. Finally, the changes in the enzyme activity of recombinant strains under different fermentation pH were investigated. The results showed that in the range of pH 4.5-6.5, the initial pH of the fermentation was properly increased, and the activity of acid protease increased. Consequently, this study has successfully constructed a strain that can express the acid protease of *Aspergillus kawachii*.

Key words: acid protease of *Aspergillus kawachii*; *non-spore Aspergillus niger SH-2*; recombinant expression

收稿日期：2017-10-31

基金项目：广东省科技计划项目-粤港联合创新项目（2016A050503016）；广东省自然科学基金项目（2017A030313097）；华南理工大学中央高校基本科研业务费资助项目（2015ZP032）

作者简介：董文超（1991-），男，硕士研究生，研究方向：生物工程

通讯作者：潘力（1967-），男，博士，教授，研究方向：微生物基因工程

白曲作为一种重要的麸曲，酸性蛋白酶对粮食原料颗粒的溶解作用，促进了糖化作用，提高了淀粉的利用率，在一定程度上提高了出酒率，在酸性条件下，将植物蛋白分解为各类氨基酸，为堆积过程中的美拉德反应提供前提物质[1]。并且白曲酸性蛋白酶影响着芝麻香酒中杂环化合物的数量和种类，对芝麻香酒的

风味有极其重要的影响。提高白曲酸性蛋白酶含量，对提高芝麻香酒的生产效率及稳定和提高质量都有重要的意义[2]。因此构造一株能高效表达酸性蛋白酶，而不引入其他无关蛋白的菌株对白酒生产工艺的改进具有很好的应用价值。

目前国内生产的酸性蛋白酶基因来源主要是黑曲霉、宇佐美曲霉和米曲霉。费笛波[3]等对黑曲霉变异菌株 6042 进行液体深层发酵，经 4 批次 2300 L 发酵罐扩大，使得酸性蛋白酶酶活达到了 2535 U/mg，方春玉等[4]采用固体发酵技术，以黑曲霉为菌种，全面优化发酵条件，使发酵产物酸性蛋白酶酶活达 24350 U/g，平均酶活提高 64.6%，杨琥等[5]以毕赤酵母为宿主，表达宇佐美曲霉酸性蛋白酶基因（GenBankTM accession number XM_001401056），产物经纯化后比活性为 4127.3 U/mg。胡稳奇等[6]从土壤中分离出一株米曲霉菌株，在实验室最适产酶条件下酶活达 6789.6 U/g。

运用诱变、基因重组及发酵优化手段来提高黑曲霉、宇佐美曲霉和米曲霉源的酸性蛋白酶的报道，比较常见，但白曲霉源的酸性蛋白酶相关的报道很少见。其中，李杰等[7]构建了黑曲霉表达载体 pSZHG-pepB，通过农杆菌介导法转化黑曲霉 CICC2462，其发酵产物酸性蛋白酶酶活达 5543 U/mL。杨猛等[8]白曲是以麸皮为原料，通过单因素试验和正交试验确定白曲的最佳配方，用此配方培养白曲 36 h，酸性蛋白酶活力为 l173 U/g。

本研究采用丝状真菌表达系统，以经基因工程改造的低内源蛋白背景的无孢黑曲霉 SH-2 为宿主，表达白曲霉酸性蛋白酶基因 pepB，并且研究了表达产物的酶学性质及酶活随发酵 pH 的变化情况，为在酿酒工业中提高白曲酸性蛋白酶活力找到一个具有参考意义的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

黑曲酶 SH-2 和 pMD18 表达载体由本实验室改造并保存，pepB 目的片段由广州艾基生物技术有限公司合成。

1.1.2 工具酶、试剂盒和试剂

PCR 反应预混酶 Prime STAR HS(premix)购自 TaKaRa 公司；抗生素 Amp 购自北京普博欣生物科技有限公司；质粒小量提取试剂盒和质粒大量提取试剂盒购自广州捷倍斯生物科技有限公司；胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司；福林酚试剂购自北京普博生物科技有限公司。

1.1.3 培养基

CD 培养基（g/L）：葡萄糖 20，$NaNO_3$ 3，KCl_2，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5，KH_2PO_4 0.01，pH 5.5（固体含 1.7% 琼脂，液体含 0.05%琼脂）。

蔗糖高渗培养基（g/L）：蔗糖 400，$NaNO_3$ 3，KCl_2，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5，KH_2PO_4 0.01，pH 5.5（软琼脂含 0.5%琼脂，固体含 1.7%琼脂）。

淀粉发酵培养基（g/L）：玉米淀粉 50，玉米浆 30，豆粕粉 20。

淀粉培养基（g/L）：牛肉膏 3，蛋白胨 10，酵母粉 2，NaCl 2，可溶性淀粉 5，pH 5.5。

1.1.4 引物

实验所用的引物如表 1 所示。

表 1 引物

Table 1 Primer

引物名称	序列	用途	大小
pepA-F	ATGGTCGTCTTCAGCAAAACCG	扩增目的片段	22
pepA-R	CTAAGCTTGAGCAGCGAAGCCC	扩增目的片段	22
PglaA-F	CAAGTATATGATGCGGTAGTGGAA	扩增启动子	24
PglaA-R	TGCCAACCCTGTGCAGACGAG	扩增启动子	21
glaA-pepB-F	CTGCACAGGGTTGGCAGCACCGGCTCCCACTCGCAAGG	延伸	38
pMD18-pepB-R	AAATGGATTGATTGTCTAAGCTTGAGCAGCGAAGCCCA	延伸	39
gyrG-F	CAAGCGGGTCTTTGGGGATTGAGCG	鉴定转化子	27
gyrG-R	ACCGCCGACCCAGGTGTCTGATACT	鉴定转化子	26

1.2 方法

1.2.1 pMD18-pepB 表达载体构建

表达载体图谱如图 1。以黑曲霉基因组为模板 PCR 扩增糖化酶启动子 PglaA，以广州艾基生物技术有限公司合成的 pepB 质粒为模板扩增 pepB 片段。PCR 反应条件：98 ℃预变性 10 min；98 ℃变性 30 s，68 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 90 s，共 30 个循环；第 30

个循环 72 ℃延伸 7 min。PCR 产物经 1%凝胶电泳鉴定，将鉴定正确的 PCR 产物凝胶回收。PglaA、pepB、线性化后带有表达元件的 pMD18-T 三片段在 Infusion 酶作用下进行连接，55 ℃反应，15 min 后得到连接液。用热激法将连接液转入大肠杆菌感受态 Match1 T1，涂板于含有 Amp 抗生素的 LB 平板上，过夜培养后将阳性转化子液体 LB 培养 12 h。然后进行菌液 PCR 鉴定，挑取条带正确的转化子，送到广州艾基生物技术有限公司测序。

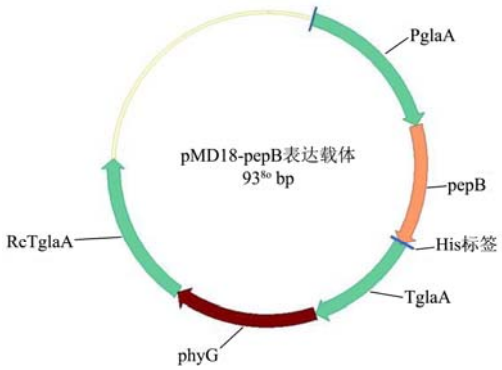


图 1 pMD18-pepB 表达载体图谱

Fig.1 Map of pMD18-pepB expression vector

1.2.2 PEG 介导转化

黑曲霉常用的遗传转化方法包括孢子电转化法、农杆菌介导转化法、原生质体介导的转化法等[9]。Meyer[10]对这些转化方法的利弊进行了系统的分析，认为孢子电转化法操作简单，但转化效率低。农杆菌介导转化虽具有转化受体形式多样、转化效率较高、转化子稳定、可转移大片段、单拷贝比例高等优点，但其操作复杂，周期长，转化过程受多种因素影响。Michielse 等[11]明确指出了农杆菌介导转化方法在黑曲霉中的转化效率较低。原生质体 PEG 介导转化具有操作简单，转化效率高的特点，对黑曲霉菌株而言是较为有效的遗传操作方法。李秀鹏[18]、许晓红[12]用 PEG 介导转化法在无孢黑曲 SH-2 中都得到了成功实践。

原生质体的制备及转化步骤详见参考文献[9,13]。转化实验设置如下：实验组：将制得的原生质体、pMD18-pepB 质粒和 PEG 缓冲液的转化液加入到 CD 高渗软琼脂培养基中，混合均匀后，铺在 CD 高渗培养基上，30 ℃培养观察。再生组：同实验组，唯一不同的是将 CD 高渗软琼脂培养基中预先加入尿嘧啶核苷，该实验组是检验原生质体的制备效果，30 ℃培养观察。阴性组：同实验组，唯一不同的是将上述 pMD18-pepB 质粒用无菌水代替，30 ℃培养观察，记录生长情况。

1.2.3 转化子鉴定

随机实验组 CD 高渗培养基上至普通固体 CD 板进行扩大培养，5 d 后挑取菌落，提取基因组，进行 PCR 鉴定。鉴定引物设置三对：gyrG-F/gyrG-R、pepA-F/pepA-R、PglaA-F/PglaA-R 之后将定位都正确的转化子保种。

1.2.4 转化子发酵

发酵罐投料（30 L）：玉米浆 3%、豆饼粉 2%、玉米淀粉 2%、麦芽糖浆（分消）3%、消泡剂 30 mL。除玉米浆和分消外，将原料投入发酵罐，调 pH 6.0~6.2，加中温淀粉酶和高温淀粉酶，70 ℃保温 20 min，90 ℃保温 30 min，加入玉米浆，121 ℃~123 ℃，灭菌 35 min。

发酵罐发酵相关参数：罐压：0.05~0.06 MPa；罐温：初始 34 ℃；转速：200~800 r/min（根据溶氧可调）；溶氧：前期控制 50%以上，中后期按最大转速、风量运转；pH：初始 pH 5.5，当 pH 降至 4.5 时，补氨控制在 4.8。在发酵 48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、192 h、216 h、240 h 发酵上清液 5 mL，-20 ℃保存。

1.2.5 发酵初始 pH 对产酶的影响

淀粉发酵培养基 100 mL，分装于 500 mL 锥形瓶中，用磷酸缓冲液调节 pH 分别至 4.5、5.5、6.5，115 ℃灭菌。分别接种液体 CD 培养的重组菌株菌液 1 mL 于淀粉发酵培养基中，于 30 ℃、250 r/min 条件下培养，分别在摇瓶 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h 取发酵上清液 5 mL，-20 ℃保存。

1.2.6 酶活测定与 SDS-PAGE 分析

采用 Folin 法测定蛋白酶酶活，以酪蛋白为底物，将其用乳酸缓冲液溶解，终浓度为 10.0 g/L。反应体系为4 mL，将 1 mL 酪蛋白溶液加入 1 mL 酶液中 42 ℃条件下反应 10 min，加 2 mL 三氯乙酸终止反应，对照组先向酶液中加入三氯乙酸以使酶失活。取过滤液 1 mL 加碳酸钠溶液 5.0 mL，再加福林试剂 1 mL，42 ℃显色 20 min，于 680 nm 波长测定吸光度，根据标准曲线计算酶活。酶活定义：温度 42 ℃条件下，1 min 水解酪素，产生 1 μmol 酪氨酸所需要的酶量为一个酶活力单位。

重组转化子发酵上清液清液 40 μL，加入 10 μL SDS loading，加热煮沸 5 min，取 10 μL 点样，进行 4~20% SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝 R 250 染色，脱色后检测目的蛋白条带，分析重组蛋白分子量。SDS-PAGE 电泳方法参考《分子克隆手册》。

2 结果与分析

2.1 pMD18-pepB 表达质粒构建

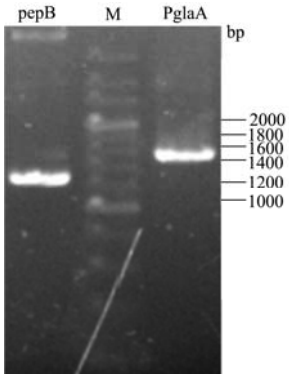


图 2 PglaA 片段和 pepB 片段 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of PglaA fragment and pepB fragment

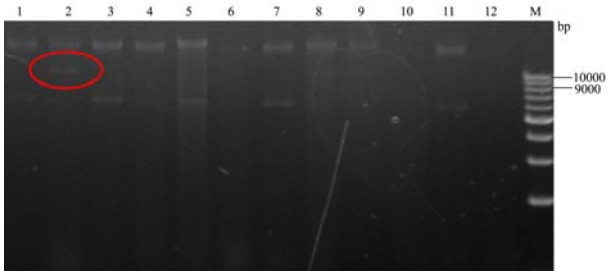


图 3 菌液电泳

Fig.3 Escherichia coli electrophoresis

分别以黑曲霉基因组和含有 pepB 的质粒为模板，PCR 得到 PglaA 片段和 pepB 片段。PCR 产物凝胶电泳如图 2 所示，分别在 1500 bp 附近和 1000 bp~1200 bp 处扩增出特异性条带，与预期的 PglaA 片段（1500 bp）、pepB 片段（1185 bp）大小相符。PglaA 片段和 pepB 片段进行重叠 PCR，产物片段回收。PglaA、pepB 和 pMD18 连接后转入大肠感受态细胞，挑取阳性转化子，液体 LB 培养后，进行菌液 PCR，电泳结果如图 3，2 号泳道菌液在 10000 bp 附近出现特异性条带，与 pMD18-pepB 质粒（9380 bp）大小相符。将该菌液送广州艾基生物技术有限公司测序，比对测序结果无基因突变，表明 pMD18-pepB 表达质粒构建成功，可以用于转化曲霉。

2.2 转化子鉴定

在丝状真菌遗传操作中，pyrG 是常用的选择性标记，其编码的乳清苷-5-磷酸脱羧酶（OMP）尿嘧啶核苷酸合成途径中的关键酶，pyrG 缺失菌株不具备尿嘧啶核苷酸合成能力。宿主无孢黑曲 SH-2 是 gyrG 缺陷菌株，pMD18-pepB 表达载体带有 pyrG，因此阳性转化子可以在不含尿嘧啶核苷的普通 CD 板上生长。转化后培养 10 d，从实验组转化板上随机挑阳性转化子，至普通 CD 板。提取基因组，用三对引物 pepB-F/pepB-R、PglaA-F/PglaA-R、gyrG-F/gyrG-R 进行 PCR 鉴定。PCR 产物凝胶电泳结果如图 4，对应的 pepB、PglaA、gyrG 泳道分别在 1000 bp~1200 bp、1400 bp~1600 bp、1000 bp~1200 bp 处扩增出了明亮的特异性条带，这与预期的 pepB（1185 bp）、PglaA（1500 bp）gyrG（1100 bp）条带大小相符，说明目的基因表达框整合到了黑曲霉 SH-2 基因组上。鉴定正确的转化子用于发酵培养，以检测目的蛋白。

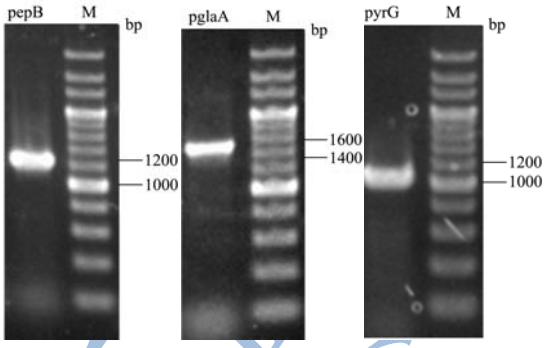


图 4 转化子 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification of transformant

2.3 表达产物检测

将定位正确的阳性转化子在 30 L 发酵罐中进行发酵，取 48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、192 h、216 h、240 h 发酵上清液，稀释 10 倍后，进行 SDS-PAGE 检测及酶活测定。如图 5，SDS-PAGE 分析，47 ku 附近处均有条带，与已知报道的酸性蛋白酶条带相符[14,15]，这说明白曲霉酸性蛋白酶与黑曲霉和宇佐美曲霉来源的酸性蛋白酶在分子量上没有明显差别。随着发酵时间的增加，酸性蛋白酶条带逐渐加深，并且酶活逐渐增加。在 48 h~96 h 内，酶活增加较缓慢，96 h 后酶活呈直线趋势增加，在发酵 240 h 后，发酵粗酶液酶活达 9972 U/mL。这与杨猛等[8]对白曲原始菌株进行优化培养所得酸性蛋白酶酶活数据相比，酶活显著提高，是原始菌株的 8.5 倍。李杰等[7]用基因工程技术，使白曲酸性蛋白酶基因在黑曲 CICC2462 中得到了表达，重组菌株酶活为 5543 U/mL，与之相比，本实验所得的重组菌株酶活提高了 79.9%，与文献报道[5,6,16,17]的其他来源的酸性蛋白酶酶活数据相比，也存在一定的优势，这主要与本研究中采用的宿主有关。黑曲酶具有很强的糖化酶分泌能力，使得其内源表达自身的糖化酶过程中，消耗掉很多中间代谢物和能量，同时过量表达的糖化酶会对内质网和高尔基体等蛋白分泌途径产生一定的压力，若不能正确及时加工修饰成成熟蛋白分泌到胞外，将严重影响到其他蛋白的生成和分泌，限制外源蛋白的表达[18]。本研究中采用的宿主菌无孢黑曲 SH-2，已敲除多拷贝糖化酶基因，为外源蛋白的表达提供了有力条件。

同时，从重组菌株发酵液 SDS-PAGE 图谱可以看出，其他分泌蛋白表达量很少，这为其作为添加菌用于酿酒工业提高白曲酸性蛋白酶酶活提供了可能。

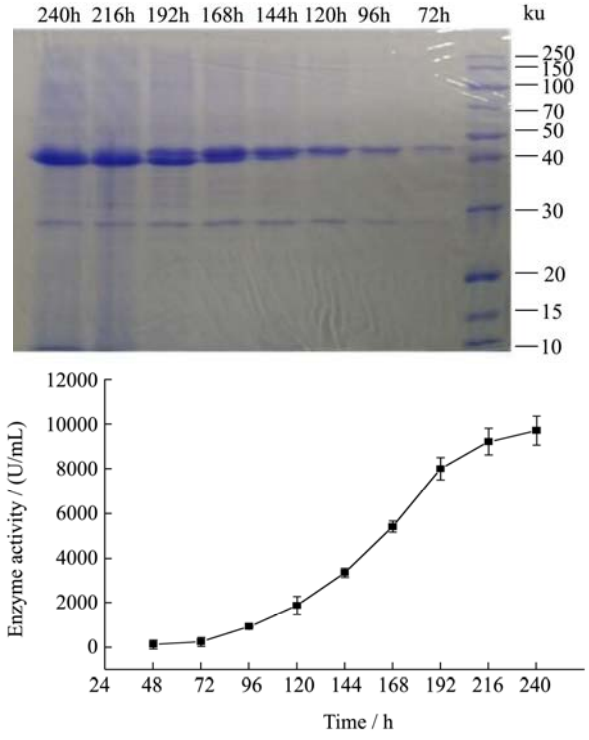


图 5 白曲酸性蛋白酶 SDS-PAGE 分析及酶活测定

Fig.5 Analysis of SDS-PAGE and enzymatic activity determination of acid protease

2.4 酶学性质分析

2.4.1 最适温度

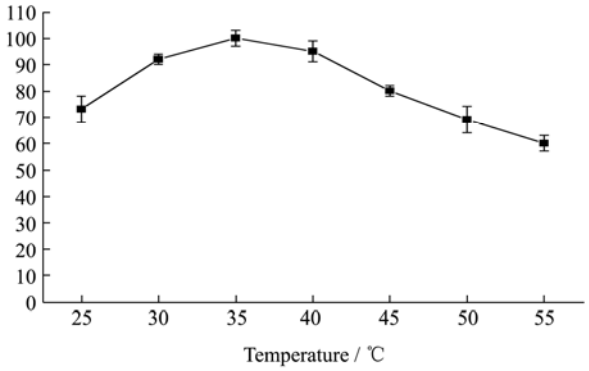


图 6 温度对酶活的影响

Fig.6 Effect of temperature on enzyme activity

水浴锅设置 25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃ 7 个温度梯度。在 pH 恒定条件下，测定在不同催化温度下的酶活。结果如图 6 所示，最适反应温度为 35 ℃，在 25 ℃~55 ℃范围内，酶活都保持在 60%以上。酸性蛋白酶的活性一般在 50 ℃以下可以保持稳定，但也随产酶的微生物菌源不同而有所差异[19]。黑曲霉 SL22-111 所产酸性蛋白酶最佳反应温度为 50 ℃。低于 45 ℃或高于 60 ℃，酶活急剧下降，70 ℃时酶活性完全丧失[14]，米曲霉 MTCC5341 所产酸性蛋白酶最适温度为 55 ℃，在 30 ℃~60 ℃时酶活力较稳定[20]，宇佐美曲霉 L336 酸性蛋白酶最适温度较高，在 60 ℃以上[21]。因此白曲酸性蛋白酶与其他来源酸性蛋白酶相比，最适反应温度偏低。

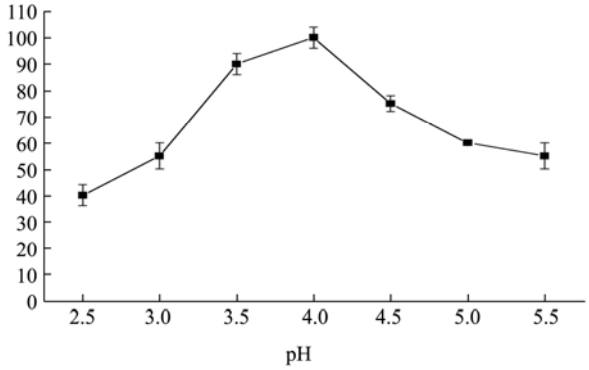


图 7 pH 对酶活的影响

Fig.7 Effect of pH on enzyme activity

2.4.2 最适 pH

用 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 不同配比得到 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 的磷酸缓冲液，然后用其稀释酶液，并配成不同 pH 的 1%酪蛋白底物，在恒定温度下，测定酶活。结果如图 7，可以看出当 pH 为 4 时，酶的活性最高，pH 低于或高于 4，酶活都会降低。pH 值对白曲酸性蛋白酶活力影响非常显著，pH 值小幅下降会引起酶活迅速下降，当 pH 值为 2.5 时，酶基本失活，这均与酶结构改变有关。与丛毛红曲霉 M.pilosus 胞外酸性蛋白酶规律相似[22]，pH 值改变导致酶蛋白空间构象改变，甚至引起酶变性失活。在最适 pH 值时，酶的解离状态往往是最有利于该酶与底物结合并发生催化反应，使酶活力达到最大。袁康培等[23]对黑曲霉 HU53 酸性蛋白酶进行研究，得出其最适反应 pH 为 3.0、曾黎明等[24]报道的米曲霉酸性蛋白酶最适 pH 为 6.0，杨琥[5]对宇佐美曲霉酸性蛋白酶酶学性质研究，表明其最适反应 pH 为 2.5。不同来源的酸性蛋白酶最适反应 pH 不同，可能与其酶活性中心含有的羧基有关[25]。

2.4.3 金属离子的影响

探究 Mn^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}、Cd^{2+}、Cu^{2+}对酶活的影响，使以上各离子分别溶解于酶液中，终离子浓度为 5 mmol/L。如图 8，CK 为空白对照组，可以看出，Mn^{2+}、Cu^{2+}对酶活有显著的激活作用，酶活分别是对照组的 3 倍和 2.5 倍，Zn^{2+}、Mg^{2+}对酶活的影响作用不明显，而 Cd^{2+}则对酶有明显的抑制作用，使酶活低于对照组的 50%。戚淑威[15]研究的结果表明，Mn^{2+}对该酶有明显的激活作用，可使原始酶活提高 2 倍以

上，张秀江[17]研究表明，在 5.0 mmol/L 的浓度下，Mn^{2+}对黑曲霉所产酸性蛋白酶有强烈的激活作用，达到对照酶活力的 150%。可见，作为能显著提高酸性蛋白酶酶活的金属离子，Mn^{2+}具有很大的应用潜力。

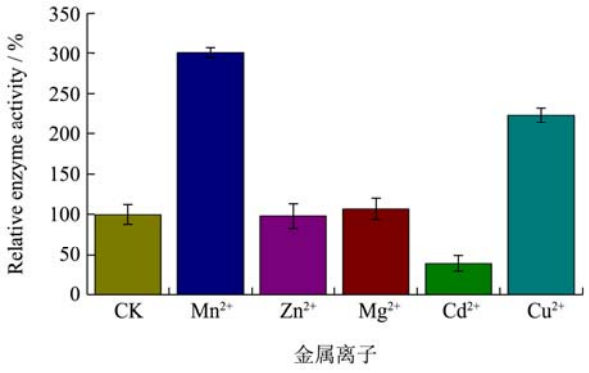
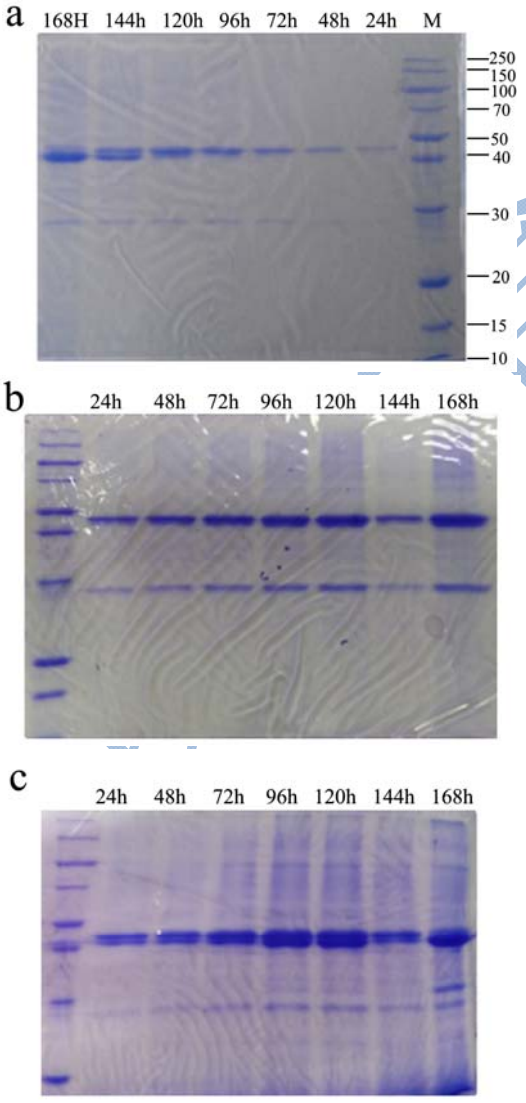


图 8 金属离子对酶活的影响

Fig.8 Effect of ion types on enzyme activity

2.4.4 发酵初始 pH 对产酶的影响

用磷酸缓冲液调节淀粉发酵培养基的 pH，来研究 pH 对产酶的影响。



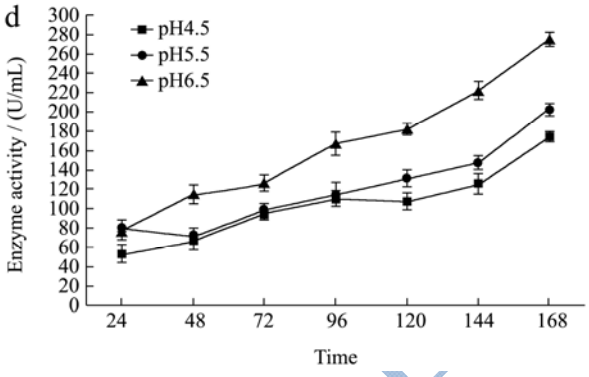


图 9 不同发酵初始 pH 下的酶活测定

Fig.9 Determination of enzyme activity under different initial pH of fermentation

注：a、b、c 对应的发酵初始 pH 分别为 pH 4.5、pH 5.5、pH 6.5，d 为相应的酶活测定。

设置 pH 4.5、pH 5.5、pH 6.5 三个梯度，取 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h 发酵上清液样品。SDS-PAGE 分析，结果如图 9，a、b、c 对应的发酵初始 pH 条件分别为 pH 4.5、pH 5.5、pH 6.5，d 相应的酶活测定。可以看出，在时间维度上，随着发酵时间的增加，酸性蛋白酶表达量及酶活性逐渐增加。在初始 pH 4.5~6.5 范围内，提高发酵液初始 pH，表达量及酶活性会有所增加。与方春玉等[4]、袁康培等[23]的报道相比偏高，这可能与宿主菌的生长最适条件有关。本研究采用的宿主无孢黑曲 SH-2 最适生长 pH 为 5.5[18]，在其发酵过程中酸度会积累，从而解释了发酵初始 pH 为 6.5 酶活会更高的情况。在酸性范围内，适当地增加重组菌株发酵液初始pH有利于酶活的提高。

3 结论

3.1 有关白曲酸性蛋白酶表达研究的报道比较少，本研究利用基因工程技术，使白曲霉酸性蛋白酶基因，在无孢黑曲 SH-2 中得到了表达。经 30 L 发酵罐发酵 240 h 后，重组菌株发酵粗酶液酶活为 9972 U/mL。酶活性质研究表明，该酶的最适温度为 35 ℃，最适 pH 为 4，Mn^{2+}、Cu^{2+}对酶活有显著的激活作用。在 pH 4.5~6.5 范围内，适当增大 pH 可以提高重组菌株在摇瓶发酵条件下酸性蛋白酶酶活。

3.2 本研究所用的宿主无孢黑曲 SH-2 经过了糖化酶基因多拷贝的敲出，具有高表达、背景干净的特点。重组菌株粗发酵液酶活是出发菌株酶活的 8.5 倍，与李杰等报道相比，酶活提高了 79.9%，与报道的其他来源的酸性蛋白酶表达也存在一定的优势，并且重组菌株背景单一，其他分泌蛋白表达量较少。因此，本研究所得的重组菌株有望用于白酒生产中调节糖化力和酸性蛋白酶活力的比例，来提高芝麻香酒的风味。

参考文献

[1] 蔡鹏飞,于文娟.丢糟水在白曲生产中的应用[J].中国酿酒,2010,37(3):73-74
CAI Peng-fei, YU Wen-juan. Application of losing bad water in the production of white melon [J]. Chinese Brewery, 2010, 37(3): 73-74

[2] 信春晖,马素果,李沙沙,等.应用统计技术分析白曲性能的相关性[J].酿酒,2011,38(5):51-58
XIN Chun-hui, MA Su-guo, LI Sha-sha, et al. Study on the correlation of performance of white qumbs by using statistics [J]. Chinese Brewery, 2011, 38(5): 51-58

[3] 费笛波,冯观泉,叶玲玲.黑曲霉 6042 液体发酵生产饲用复合酶的工艺研究[J].浙江农业学报,1996,8(3):357-361
FEI Di-bo, FENG Guan-quan, YE Ling-ling. Study on the process of production fermentation compound enzymes by *Aspergillus niger* 6042 Liquid Fermentation [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 1996, 8(3): 357-361

[4] 方春玉,周健,邓静,等.泸型大曲黑曲霉产酸性蛋白酶条件的优化及其酶学性质的研究[J].食品与发酵科技,2011,47(2):12-17
FANG Chun-yu, ZHOU Jian, DENG Jing, et al. Optimization of acidic protease production by *Aspergillus niger* and its enzymatic properties [J]. Food Science and Technology, 2011, 47(2): 12-17

[5] 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
YANG Hu. Expression of *Escherichia coli Aspergillus* acidic protease in Pichia pastoris and its enzymatic properties [D]. Wuhan: Hubei University, 2014

[6] 胡稳奇,王磊.米曲霉(Aspergillusoryzae)A-9005 酸性蛋白酶的初步研究[J].湖南师范大学自然科学学报,1995,18(3)
HU Wen-qi, WANG Lei. A preliminary study on aspergillus oryzae A-9005 acidic protease [J]. Journal of Hunan Normal University, 1995, 18(3)

[7] 李杰,吴婷,马南,等.白曲霉酸性蛋白酶在黑曲霉中的表达[J].东北农业大学学报,2016,47(5):29-35
LI Jie, WU Ting, MA Nan, et al. Expression of *Aspergillus oryzae* acidic protease in *Aspergillus niger* [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2016, 47(5): 29-35

[8] 杨猛,孙颖,卢海伦.白曲生产最佳工艺的研究[J].酿酒科技,2014,5:25-27
YANG Meng, SUN Ying, LU Hai-lun. Study on the optimum process of white currant production [J]. Chinese Brewery Technology, 2014, 5: 25-27

[9] 张晓丽,郑小梅,满云,等.黑曲霉柠檬酸工业菌株原生质体制备与转化[J].生物技术通报,2015,31(3):171-177
ZHANG Xiao-li, ZHENG Xiao-mei, MAN Yun, et al. Preparation and transformation of protoplasts of industrial strains of *Aspergillus niger* [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(3): 171-177

[10] Meyer V, Mueller D, Till S, et al. Comparison of different transformation methods for Aspergillus giganteus [J]. Curr Genet, 2003, 43(5): 371-377

[11] Michielse C B, Hooykaas P J, van den Hondel C A, et al. Agrobacterium mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi [J]. Curr Genet, 2005, 48: 1-17

[12] 许晓红.高产脯氨酰内肽酶的黑曲霉菌株研究[D].广州:华南理工大学,2016
XU Xiao-hong. Study on *Aspergillus niger* producing prolyl endopeptidase [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016

[13] 陈振明,郭泽建,林福呈,等.以潮霉素抗性为选择标记的毛壳霉原生质体转化[J].浙江大学学报,2001,27(1):19-22
CHEN Zhen-ming, GUO Ze-jian, LIN Fu-cheng, et al. Study on protoplast transformation of Chaetoceros by using hygromycin resistance as a selective marker [J]. Journal of Zhejiang University, 2001, 27(1): 19-22

[14] 谢必峰,曹治云,郑腾,等.黑曲霉 Aspergillus niger SL2-111 所产酸性蛋白酶的分离纯化及酶学特性[J].应用与环境生物学报,2005,11(5):618-622
XIE Bi-feng, CAO Zhi-yun, ZHENG Teng, et al. Isolation, purification and enzymatic properties of acid protease from *Aspergillus niger* SL2-111 [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology 2005, 11(5): 618-622

[15] 戚淑威.黑曲霉酸性蛋白酶酶学性质的研究[D].昆明:云南师范大学,2006
QI Shu-wei. Studies on the enzymatic properties of *Aspergillus niger* acid protease [D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2006

[16] 路博.酸性蛋白酶基因在毕赤酵母及黑曲霉中的表达[D].哈尔滨:东北农业大学,2010
LU Bo. Expression of Acid Protease gene in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2010

[17] 张秀江,胡虹,范国歌,等.酸性蛋白酶高产菌株选育及酶学性质的研究[J].河南科学,2012,30(3):328-332
ZHANG Xiu-jiang, HU Hong, FAN Guo-ge, et al. Studies on the breeding and enzymatic properties of acidic protease producing strain [J]. Henan Science, 2012, 30(3): 328-332

[18] 李秀鹏.无孢黑曲霉 SH-2 菌株改造及疏棉状嗜热丝孢菌耐热脂肪酶表达的研究[D].广州:华南理工大学,2015
LI Xiu-peng. Study on transformation of *Aspergillus niger* SH-2 strain and expression of thermostable lipase from *Thermomyces lanuginosus* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015

[19] 阎致远,张益庆,程志娟,等.酸性蛋白酶的性质及在白酒生产中应用的研究酿酒科技,1995,45(6):56-60
YAN Zhi-yuan, ZHANG Yi-qing, CHENG Zhi-juan, et al. Studies on the properties of acid protease and its application in liquor production [J]. Wine Technology, 1995, 45(6): 56-60

[20] Vishwanatha K S, Rao A G A, Singh S A. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 [J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 402-407

[21] 翁醒华,徐晨明,李永泉.宇佐美曲霉 L336 酸性蛋白酶的动力学性质[J].菌物系统,1999,1:61-66
WENG Xing-hua, XU Chen-ming, LI Yong-quan. Kinetic properties of L336 acid protease from *Aspergillus oryzae* [J]. Mycelial Systems, 1999, 1: 61-66

[22] Nilantha L P L, Yoichi T, Hirohide T, et al. Purification and characterisation of two extracellular acid proteinases from *Monascus pilosus* [J]. Food Chemistry, 2010, 121(4): 1216-1224

[23] 袁康培,郑春丽,冯光明.黑曲霉 HU53 菌株产酸性蛋白酶的条件和酶学性质[J].食品科学,2003,8:46-48
YUAN Kang-pei, ZHENG Chun-li, FENG Guang-ming. Conditions and enzymatic properties of acid protease produced by *Aspergillus niger* HU53 strain [J]. Food Science, 2003, 8: 46-48

[24] 曾黎明,胡春燕,徐平,等.饲料用米曲霉酸性蛋白酶研究[J].安徽农业科学,2009,37(1):20-22
ZENG Li-ming, HU Chun-yan, XU Ping, et al. Studies on acid protease from *Aspergillus oryzae* in feed [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(1): 20-22

[25] Malab R, Aparnam T, Mohinis G, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 597-63

现代食品科技