

牛乳铁蛋白肽衍生物的设计及其在毕赤酵母中表达与活性分析

王亮¹, 郭爱珍¹, 吕自力², 李晓波³, 钟浩¹, 胡曼¹, 齐向辉¹, 蔡梅红¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013) (2. 成都中医药大学第二附属医院, 四川成都 610041)

(3. 中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆乌鲁木齐 830011)

摘要: 本文利用抗菌肽数据库以及蛋白质分析软件等工具, 根据抗菌肽结构与功能的关系, 对牛乳铁蛋白肽衍生肽(LfcinBD)的结构进行优化设计。将设计得到的LfcinBD基因片段与pPIC9K质粒构建重组表达载体, 线性化后电转化毕赤酵母细胞GS115, 利用甲醇诱导表达。实验对发酵上清液进行了分离纯化和活性测试, SDS-PAGE电泳检测到了目标蛋白的有效表达。实验还对优化设计得到的牛乳铁蛋白肽衍生肽与同等发酵条件下产生的天然牛乳铁蛋白肽的抑菌活性进行了对比分析, 结果证明该衍生肽对金黄色葡萄球菌有更强的抑菌活性。研究表明经色氨酸 Trp 替换的牛乳铁蛋白肽中第 10, 14 位氨基酸获得的牛乳铁蛋白肽衍生肽具有很好的抑菌活性, 实验为进一步探究牛乳铁蛋白肽衍生肽生物活性的改进奠定了基础。

关键词: LfcinBD 设计; 毕赤酵母表达; 抗菌活性

文章编号: 1673-9078(2017)1-74-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.012

Design of Bovine Lactoferricin-Derived Peptide and Its Expression and Activity in *Pichia pastoris*

WANG Liang¹, GUO Ai-zhen¹, LV Zi-li², LI Xiao-bo³, ZHONG Hao¹, HU Man¹, QI Xiang-hui¹, CAI Mei-hong¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2. The Second Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China)

(3. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China)

Abstract: Antimicrobial peptide databases and protein analysis software were used to optimize the design of bovine lactoferricin-derived peptide (LfcinBD), based on knowledge of the relationship between the structure and function of antimicrobial peptides. The designed lactoferricin-derived peptide gene fragment was inserted into a pPIC9K plasmid to construct a recombinant expression vector. After linearization, *Pichia pastoris* GS115 cells were transfected by electroporation, and expression was induced with methanol. Isolation, purification, and activity measurements of fermentation supernatants were performed. SDS-PAGE analysis confirmed efficient expression of the target protein. Comparing the optimally designed LfcinBD derivative with natural LfcinB, it was confirmed that the derived peptide had stronger bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus*. This study indicated that the LfcinB in which amino acid 10 and 14 were replaced with Trp has better antibacterial activity. This work lays the foundation for further exploration to improve the biological activities of LfcinBD.

Key words: lactoferricin-derived peptide design; *Pichia pastoris* expression; antibacterial activity

牛乳铁蛋白肽(LfcinB)是牛乳铁蛋白(LfB)在正常的消化环境下从 N 端释放的 25 个氨基酸残基短肽(N17-41:FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF), 分子量 3126.4 u, 疏水残基比例 48%, 电荷数+8, 可作为食品添加剂、抗氧化剂、营养强化剂和免疫强化剂

收稿日期: 2015-10-14

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 四川省科学院科技成果转化资金项目(15010116); 江苏大学高级专业人才培养启动资金(12JJD069)

作者简介: 王亮(1966-), 男, 博士, 研究员, 主要从事生化及分子生物学研究

剂等^[1]。Bellamy 等研究发现 LfcinB 比 LfB 表现为更加广谱的抑菌和杀菌作用, 且发现 LfcinB 的抗菌性是 LfB 的 400 多倍^[2]; 多个研究表明 LfcinB 比 LfB 具有更全面更高效的生物活性^[3-5], 可广泛应用于食品添加剂和以及婴幼儿配方奶粉。目前抗生素耐药性的威胁已经亟需控制, 新的抗菌性药物寻找已迫在眉睫^[6], LfcinB 无耐药性特点表明 LfcinB 是极具潜力的抗菌药物。由于天然来源有限, 合成价格高昂, 因此利用基因工程技术开发 LfcinB 已经成为趋势。

目前, 关于 LfcinB 的规模化生产存在两方面的难

点：(1) LfcinB 自身携带大量正电荷易受宿主蛋白酶降解，表达产量低^[7]；(2) 如何提高 LfcinB 本身的抑菌活性。针对第一个难点，实验研究中采用 LfcinB 融合蛋白表达方式来提高表达稳定性，已有成功先例^[8,9]。对于第二个难点，研究人员不断探索，通过结构优化来提高 LfcinB 抗菌活性。LfcinB 是一种两亲性的阳离子抗菌肽，正电荷数与疏水性强度决定其抗菌能力^[10]。LfcinB 自身的正电荷与细菌细胞膜上带负电的磷脂相互作用，通过增加膜的通透性使细菌细胞内容物流失起到抑菌效果，但这种特性具有限制性，净电荷增加只在一定范围内提高其抗菌活性，呈正相关性^[11,12]。抗菌肽疏水性同样如此，疏水性要适中，既可溶解于水中快速运送到靶微生物（要求低的疏水性），又要与细胞质膜双分子层的疏水区域作用（要求高的疏水性）^[13]，因此在 LfcinB 衍生肽结构优化设计中，存在一个最优的疏水强度范围，在这个范围内，疏水性与抗菌活性呈正相关。

本研究利用生物信息学工具及软件对 LfcinBD 进行结构优化设计。通过对比分析，发现将 LfcinB 第 10 位 Met，第 14 位 Gly 替换为 Trp，可以保持 LfcinBD 与 LfcinB 相似的二级结构，且正电荷数不变，疏水性比例从 48% 提高到 52%，抗菌肽数据库分析预测其抗菌活性优于 LfcinB。将优化的基因构建 pPIC9K 表达载体，导入毕赤酵母 GS115 诱导表达，结果证明与天然 LfcinB 相比，LfcinBD 对金黄色葡萄球菌具有更强的抑菌活性，SDS-PAGE 电泳检测到目标蛋白的有效表达。实验研究为进一步分析和优化 LfcinBD 表达奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

毕赤酵母表达质粒 pPIC9K、大肠杆菌 DH5 α 、毕赤酵母菌株 GS115、天然 LfcinB 重组菌株和金黄色葡萄球菌 ATCC25923 均由本实验室保存。T₄DNA 连接酶，Nde I，EcoR I，Avr II，Not I 限制性内切酶、质粒 DNA 小剂量抽提试剂盒 Ezup 柱式酵母基因组 DNA 抽提试剂盒均购自上海生工生物有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 LfcinBD 基因设计

利用抗菌肽数据库的 prediction 工具分析 LfcinB 衍生肽的净电荷、疏水性氨基酸残基比例；使用 ExPASy 的 ProtParam 预测软件分析 LfcinB 衍生肽的理化参数；利用 HyperChem 8.0 软件模拟肽的空间结

构；使用 APD 抗菌肽数据库和 CAMP 抗菌肽数据库的 prediction 工具预测设计肽的抗菌活性，获得最优 LfcinBD。根据毕赤酵母表达对密码子的偏好性，按照优化得到的 LfcinBD 氨基酸序列，设计获得相应的基因序列。实验在 LfcinBD 基因 N-末端添加 His-Tag 分离纯化标签序列，在 5' 和 3' 端加上 EcoR I 和 Not I 酶切位点，如图 1 所示，该序列交由生物公司合成。

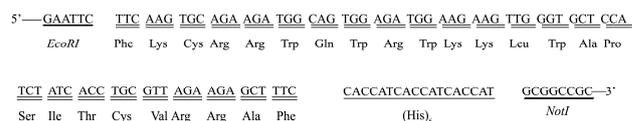


图 1 基因序列合成

Fig.1 Gene sequence synthesis

1.2.2 重组质粒的构建及鉴定

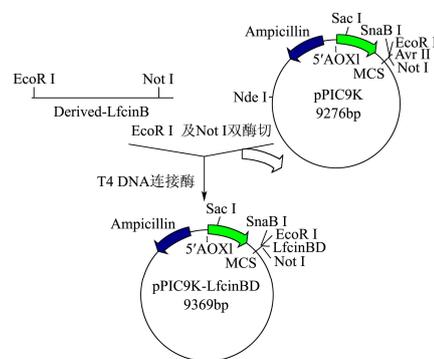


图 2 重组质粒的构建

Fig.2 Construction of recombinant plasmid

EcoR I 和 Not I 双酶切含目的基因的 pUC57 质粒，经琼脂糖凝胶电泳检测并回收，将回收基因片段与同样经 EcoR I 和 Not I 双酶切的 pPIC9K 质粒连接构建表达载体质粒 pPIC9K-LfcinBD（图 2），pPIC9K-LfcinBD 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 进行扩增。用质粒抽提试剂盒提取重组质粒，1% 琼脂糖凝胶电泳检测。并进一步对其进行双酶切及测序鉴定。

1.2.3 重组质粒电转化毕赤酵母 GS115

挑取毕赤酵母 GS115 单菌落先后接种到 5 mL 及 1000 mL 新鲜 YPD 培养基中，过夜培养至 OD₆₀₀=1.3~1.5。使用预冷的无菌去离子水与山梨醇反复清洗离心，最后将菌体重悬于 200 μ L、1 mol/L 的山梨醇溶液中。

已鉴定的阳性重组质粒 pPIC9k-LfcinBD 用 Sal I 单酶切，加入醋酸钠，无水乙醇以及 70% 乙醇静置，离心弃上清，于 10 μ L 灭菌水溶解沉淀。

取 10 μ L 线性化的重组质粒与 80 μ L 感受态 GS115 细胞混合，转入预冷的电转杯中，1500 V 电击，之后立刻加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇，混匀静置片刻后涂布 MD 培养基，30 $^{\circ}$ C 培养。

1.2.4 多重转化筛选法筛选高拷贝转化子及转化子 Mut 型鉴定

制备 4 个 G418 浓度依次为 1.0、2.0、3.0 和 4.0 mg/mL 的 YPD 培养基筛选 MD 上长出的转化子。对 G418 抗性的转化子对应接种于 MM 和 MD 上, 观察菌落大小确定其甲醇利用类型。

1.2.5 PCR 鉴定转化子

PCR 检测 LfcinBD 基因与毕赤酵母 GS115 染色体基因组的整合情况。实验中设置转化 pPIC9K 空质粒的重组酵母基因组为阳性对照, GS115 原菌株酵母基因组为阴性对照。PCR 反应体系中所用引物为分别是 5'AOX I : 5'-GACTGGTCCAATTGACAAGC-3' 与 3'AOX I : 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'。

1.2.6 LfcinBD 的诱导表达

挑取 G418 抗性高、PCR 鉴定为阳性的转化子菌落于 20 mL BMGY 培养液中, 于 30 °C、200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀=2.5 左右, 3000 g、5 min 离心, 弃上清、将菌体转移至 25 mL BMMY 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 继续震荡培养, 1% 甲醇诱导, 每隔 24 h 取样并同时补充甲醇, 使甲醇浓度维持 1%。使用 TCA 沉淀法, 将表达上清液浓缩, 用于抑菌活性检测和置于超低温冰箱保存备用。

1.2.7 目标蛋白的纯化与 SDS-PAGE 检测

带有 His-Tag 标签的 LfcinBD 的纯化: 收集的发酵上清超滤膜浓缩, 浓缩液与 50 mmol/L Tris-HCL 缓冲液按 1:1 体积比混合上样, 将 10 mL 的样品液加到 Ni-NTA 亲和层析柱中进行梯度洗脱, 收集液经浓缩后 20% SDS-PAGE 检测。

1.2.8 抑菌活性检测

10 μL 金黄色葡萄球菌的新鲜培养液加入到 6 mL LB 中混合均匀, 倒入已灭菌的培养皿中。待凝固后用打孔器打孔, 每孔点样 10 μL 发酵上清液, 以 10 μL、100 mg/mL 的氨苄青霉素作阳性对照, 以未转化的酵母 GS115 发酵上清液做阴性对照, 于 37 °C 恒温培养箱中培养观察其抑菌活性。

1.2.9 LfcinB 与 LfcinBD 抑菌性对比检测

将实验室现有的 LfcinB 重组酵母菌株与上述实验挑选出的抑菌性较好的 LfcinBD 转化子在相同条件下诱导培养, 取等量的发酵上清液同上述方法做抑菌圈试验, 37 °C 培养观察二者的抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 LfcinBD 的理化特性、结构与抗菌活性预

测

76

研究表明, LfcinB 抗菌肽是通过位于 4、5 和 9 位的带正电荷精氨酸侧链与细胞膜上带正负电荷磷脂吸引而靠近, 同时通过色氨酸 (Trp) 的芳香环结构与磷脂头部的甘油相互作用来发挥功能的^[14]。Trp 残基的改变可以在很大程度上影响肽的抗菌性^[15,16]。本研究通过对 LfcinB 及其衍生肽的各项理化参数, 空间结构和抗菌性预测等对比分析之后, 将 LfcinB 第 10 位 Met, 第 14 位 Gly 替换为 Trp 获得优化的 LfcinBD。

用 APD (The Antimicrobial Peptide Database <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) 抗菌肽数据库的 prediction 工具和 ExPASy 的 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测软件分析 LfcinBD 理化参数如下表 2 所示, LfcinBD 与 LfcinB 相比, 净电荷数不变, 疏水性比例由 48% 提高至 52%, 其他参数基本一致。

表 1 LfcinB 及 LfcinBD 理化特性分析

Table 1 Physical and chemical characteristics of LfcinB and

理化特性	LfcinBD	
	LfcinB	LfcinBD
净电荷	+8	+8
疏水残基比例	48%	52%
相对分子量	3125.8	3310.0
理论等电点	11.84	11.84
半衰期 (哺)	1 h	1 h
半衰期 (酵)	3 min	3 min
半衰期 (大)	2 min	2 min
脂肪指数	50.80	50.80
GRAVY	-0.576	-0.708

注: GRAVY: Grand average of hydropathicity, 亲水性指数。

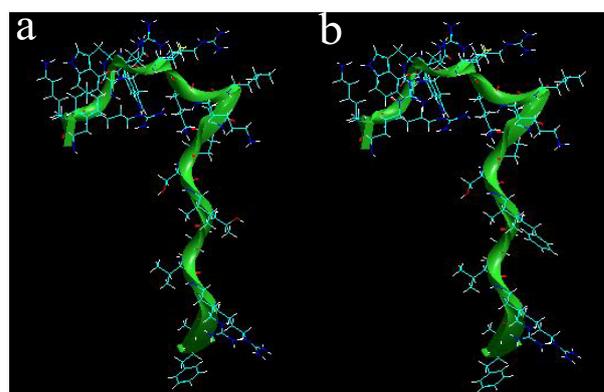


图 3 LfcinB 及 LfcinBD 空间结构

Fig.3 Spatial structure of LfcinB and LfcinBD

注: a 为 LfcinB, b 为 LfcinBD

HyperChem 8.0 模拟得到的 LfcinBD 空间结构如图 3 所示。一般情况下, 生物活性物质的功能是由其

高级结构决定的。该 LfcinBD 模拟得到的空间结构与 LfcinB 在宏观上是一致的，因此在调整氨基酸分布之后得到的 LfcinBD 仍保留有与 LfcinB 相同的折叠结构，使优化后的 LfcinBD 具备 LfcinB 原有的生物功能活性。

使用 APD (The Antimicrobial Peptide Database,

<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) 抗菌肽数据库和 CAMP (Collection of Anti-Microbial Peptides, <http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) 抗菌肽数据库的 prediction 工具预测 LfcinBD 的抗菌活性如下表 3 所示。结果显示，LfcinBD 的各项预测数据均高于 LfcinB, 表明抗菌肽 LfcinBD 设计有较好的理论基础。

表 2 LfcinB 及 LfcinBD 抗菌活性预测

Table 2 Predictions of LfcinB and LfcinBD antibacterial activity

肽	SVM probability	RF probability	DA	ANN 预测	CAMP 预测
LfcinB	0.842	0.9945	0.963	AMP	AMP
LfcinBD	0.968	0.9955	0.969	AMP	AMP

注: SVM, Support Vector Machine; RF, Random Forest; DA, Discriminant Analysis; ANN, Artificial Neural Network.

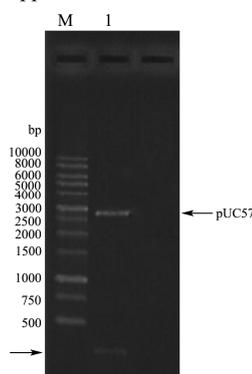


图 4 目的基因酶切

Fig.4 Restriction digestion of target gene

注: M 代表 DNA Maker; 1 代表 pUC57。

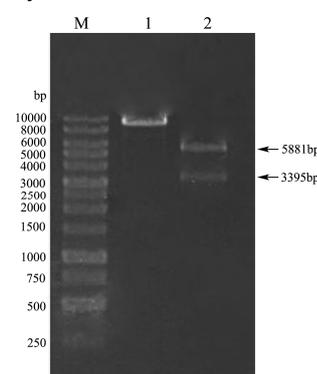


图 5 双酶切鉴定

Fig.5 Identification by double digestion

注: M 表示 DNA Maker; 1 表示重组质粒; 2 表示 pPIC9K。

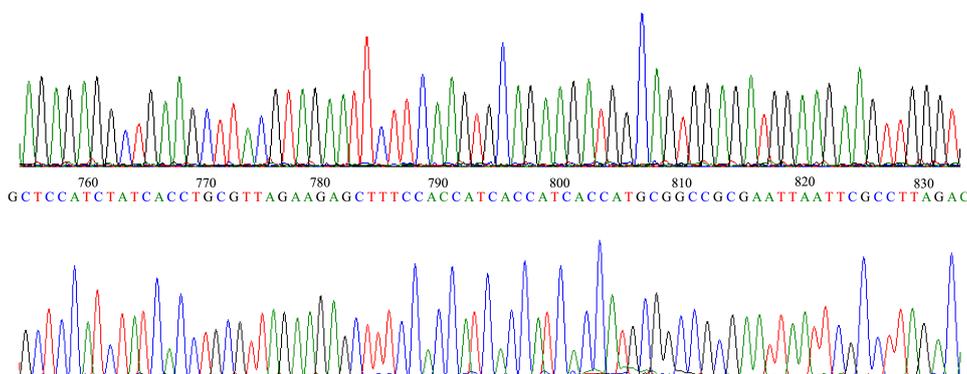
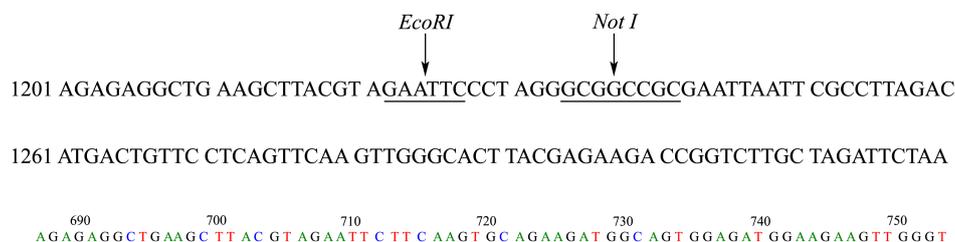


图 6 DNA 测序鉴定

Fig.6 DNA sequencing

2.2 目的基因的获得及重组质粒鉴定

将生物公司合成的重组 pUC57 质粒用 EcoR I 和

Not I 双酶切, 2%琼脂糖凝胶电泳检测 (如图 4), 扩增得到的 pPIC9K 同样用 EcoR I 及 Not I 双酶切, 双酶切后 pPIC9K 与回收的目的基因经 T4 DNA 连接酶

连接,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,扩增、提取重组质粒。用 Avr II (1228 处)和 Nde I (7109 处)分别对重组质粒与空质粒进行双酶切对重组质粒进行酶切验证,重组质粒由于缺失 Avr II 酶切位点,酶切结果为线性 DNA 片段(图 5 中 1),而 pPIC9K 空质粒存在 Avr II (1228 处)和 Nde I (7109 处)两处酶切位点,酶切结果呈现两条电泳条带(如图 5 中 2),充分证明目的基因与质粒载体连接成功,另将重组质粒进行基因测序,结果如图 6 所示,通过对比原 pPIC9K 序列可知,目的基因序列正确插入到质粒载体中,获得阳性重组子。

2.3 G418 高抗性转化子筛选及 Mut 型鉴定

按 G418 筛选浓度与重组质粒携带目的基因拷贝数的关系,G418 筛选浓度为 2 mg/mL 时重组质粒携带目的基因拷贝数约为 8。挑选 G418 浓度为 2 mg/mL 的 YPD 平板上长出的 G418 高抗性转化子,利用 MM 与 MD 培养基培养观察鉴定发现均为 His⁺Mut⁺转化子。

2.4 重组转化子的 PCR 鉴定

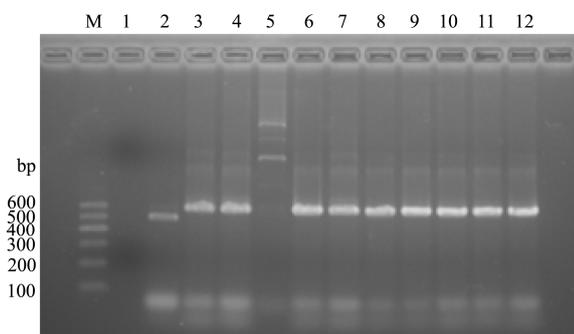


图 7 转化子 PCR 鉴定

Fig.7 Detection of transformants by PCR

注: M 表示 DNA Maker; 1 表示阴性对照; 2 表示阳性对照; 3~12 表示转化子 PCR 结果。

将 G418 筛选浓度为 2 mg/mL 的 YPD 培养基上长出的转化子进行 PCR 检测(如图 7),1 号泳道为空 GS115 菌株,2 号泳道为 GS115-pPIC9K 菌株,3~12 号泳道为 GS115-Ppic9K-LfcinBD 菌株,PCR 结果表明,筛选的 10 个转化子中,有 9 个为阳性克隆。

2.5 LfcinBD 的 SDS-PAGE 检测

对纯化浓缩后的的发酵液进行 SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝染色,乙醇与冰醋酸混合脱色,成像观察。结果如下图 8 所示,泳道 1 是 LfcinBD 转化子发酵上清液,泳道 2 为 LfcinB 重组菌株发酵液,结果显示在 3.2 ku 附近明显有条带显现,结果检测到目标蛋白的

表达。

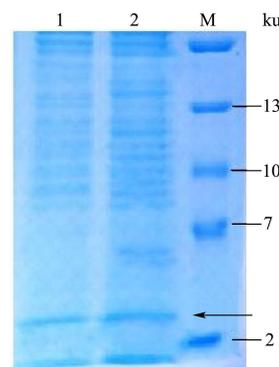


图 8 转化子表达产物 SDS-PAGE

Fig.8 SDS-PAGE of transformant expression products

2.6 发酵上清液抑菌性检测

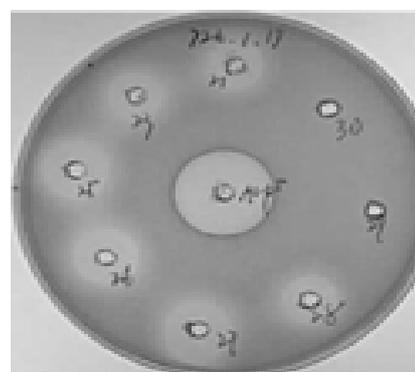


图 9 发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌性

Fig.9 Antimicrobial activity of LfcinBD against *Staphylococcus aureus*

对甲醇利用型为 Mut⁺型的阳性转化子进行甲醇诱导表达,对发酵上清液做抑菌性测定。如图 9 所示,图中心为 10 μ L、100 mg/mL 氨苄青霉素 Amp 产生的抑菌圈,其余抑菌圈为转化子发酵上清液所产生,实验结果表明 LfcinBD 具有很好的抑菌活性,而未转化重组质粒毕赤酵母 GS115 在同样诱导条件下的发酵上清液(孔 29 和 30)并无抑菌圈出现。

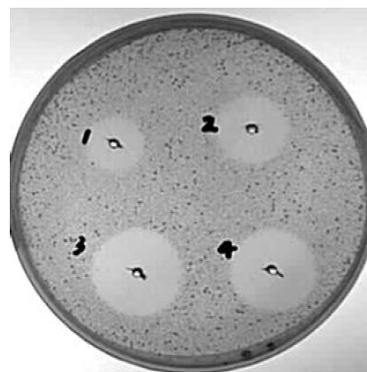


图 10 发酵液抑菌性对比

Fig.10 Comparison of LfcinBD and LfcinB antimicrobial activity

2.7 LfcinB 与 LfcinBD 抑菌性对比分析

在同等发酵条件下,将实验室保存的 LfcinB 重组酵母菌株的发酵上清液与优化设计的 LfcinBD 转化子发酵上清液抑菌活性进行了对比,结果如图 10 所示。1 和 2 号为 LfcinB 发酵液所产生的抑菌圈,3 和 4 号分别为 LfcinBD 发酵液所产生的抑菌圈。实验结果显示,LfcinBD 的发酵液抑菌圈明显大于 LfcinB 的抑菌圈,表明经过优化设计的 LfcinBD 具有比 LfcinB 更强的抑菌活性。

3 结论

3.1 实验利用真核表达系统能使目的蛋白 LfcinBD 得到很好的糖基化修饰,更类似天然状态,从而使其具有更好的生物活性和应用价值。本实验在研究 LfcinB 抗菌机制的基础上,进行优化设计,调整了关键氨基酸 Trp 数目,以期获得 LfcinB 高抗菌活性;实验根据毕赤酵母表达的密码子偏好性,对氨基酸编码的密码子进行了调整,设计合成目的基因序列,并加入 His-Tag 标签,便于实验后期的分离纯化操作。将已合成的基因片段与 pPIC9K 构建重组质粒,经 Sac I 酶线性化后电转化感受态毕赤酵母 GS115 诱导表达^[17-19],实验结果表明,经色氨酸 Trp 替换牛乳铁蛋白肽中第 10 和 14 位氨基酸获得的 LfcinBD 抗菌活性优于 LfcinB,证明了 LfcinBD 设计的合理性,也为进一步探究 LfcinBD 的生物活性和优化设计奠定基础。

3.2 实验下一步将对培养温度,甲醇浓度,培养时间等发酵条件进行优化,以使得 LfcinBD 稳定高效表达。在已知的许多抗菌肽中,Trp 都占有较大比例,但还不很清楚它除了增加肽链的正电荷和疏水性之外还可能给抗菌肽带来哪些属性^[20],因此将进一步深入探究 Trp 与 LfcinBD 的结构与功能的关系并进行验证,期待获得更强抑菌生物活性的牛乳铁蛋白肽衍生物。

参考文献

- [1] 韩兆莲,许晓曦.新型食品添加剂 LfcinB 对肿瘤细胞生长的抑制作用[J].食品研究与开发,2014,35(23):17-20
HAN Zhao-lian, XU Xiao-xi. Inhibitional effects of LfcinB as one new food additives on cell growth of cancer [J]. Food Research and Development, 2014, 35(23): 17-20
- [2] Bellamy W, Takase M, Wakabashi K. Antibacteria spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin [J]. J. Applied Bacteriology, 1992, 73: 472-479
- [3] 任国艳,张凡,郭金英,等.乳铁蛋白及其多肽对淋巴细胞增

殖活性的影响[J].食品科技 2015,40(3):260-263

- REN Guo-yan, ZHANG fan, GUO Jin-ying, et al. Effects of lactoferrin and lactoferricin on lymphocyte proliferation [J]. Food Science and Technology, 2015, 40(3): 260-263
- [4] León-Calvijo M A, Leal-Castro A L, Almanzar-Reina G A, et al. Antibacterial activity of synthetic peptides derived from lactoferricin against escherichia coli ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [J]. Biomed Res. Int., 2015: 1-8
- [5] Siqueiros-Cendón T, Arévalo-Gallegos S, Iglesias-Figueroa B F, et al. Immunomodulatory effects of lactoferrin [J]. Acta Pharmacol Sin., 2014, 35(5): 557-566
- [6] Roca I, Akova M, Baquero F. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention [J]. New Microbes New Infect, 2015, 16(6): 22-29
- [7] CHEN Gen-hung, CHEN Wei-ming, HUANG Guo-ting, et al. Expression of recombinant antibacterial lactoferricin- related peptides from pichia pastoris expression system [J]. J. Agric. Food Chem., 2009, 57(20): 9509-9515
- [8] Moon J Y, Henzler-Wildman K A, Ramamoorthy A. Expression and purification of a recombinant LL-37 from Escherichia coli [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2006, 1758(9): 1351-1358
- [9] Lv L H, Luo X G, Ni M, et al. Independent and tandem expression of a novel antimicrobial peptides plectasin in *Escherichia coli* [J]. Advanced Materials Research, 2012, 345: 134-138
- [10] Panteleev P V, Bolosov I A, Balandin S V, et al. Structure and biological functions of β -hairpin antimicrobial peptides [J]. Acta Naturae, 2015, 7(1): 37-47
- [11] 李莉蓉.以 DNA 为靶标的抗菌肽设计及抑菌机制研究[D].无锡:江南大学,2013
LI Li-rong. The studies on the design of antibacterial peptides targeted with DNA and antimicrobial mechanism [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013
- [12] Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, et al. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge [J]. FEBS Letters, 2001, 501(2): 146-150
- [13] Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides [J]. FEBS Letters, 1997, 403(2): 208-212
- [14] Gifford J L, Hunter H N, Vogel H J. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral,

- antitumor and immunological properties [J]. *Cel. Mol. Life Sci.*, 2005, 62(22): 2588-2598
- [15] Strøm M B, Haug B E, Rekdal Ø, et al. Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2002, 80(1): 65-74
- [16] Lejon T, Stiberg T, Strøm M B, et al. Prediction of antibiotic activity and synthesis of new pentadecapeptides based on lactoferricins [J]. *Journal of Peptide Science*, 2004, 10(6): 329-335
- [17] Laukens B, De Wachter C, Callewaert N. Engineering the pichia pastoris N-Glycosylation pathway using the glycoswitch technology [J]. *Methods Mol. Biol*, 2015, 13(21): 103-122
- [18] 吴晖,陈艺,肖俊梅,等.人 β -防御素 3 基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达[J].现代食品科技,2012,28(9):1123-1127
- WU Hui, CHEN Yi, XIAO Jun-mei, et al. Secreted expression of human beta-defensin-3 in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(9): 1123-1127
- [19] 刘西常,张玉军,于红.甜蛋白 Monellin 在毕赤酵母中的分泌表达[J].现代食品科技,2008,24(1):20-22
- LIU Xi-chang, ZHANG Yu-jun, YU Hong. Secretary expression of Monellin in yeast pichia pastoris [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(1): 20-22
- [20] 赵晓燕.类牛乳铁蛋白衍生抗菌肽的合成及其性质[D].郑州:河南工业大学,2012
- ZHAO Xiao-yan. Synthesis and proper ties of the mimic bovine lactoferrin-based antibacterial peptides [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2012

(上接第 86 页)

- [6] 朱洪康,孙军勇,陆健.绍兴腐乳发酵过程中蛋白质水解及其对成品白点影响的研究[J].食品工业科技,2015,36(14): 175-179
- ZHU Hong-kang, SUN Jun-yong, LU Jian. Study on the hydrolysis of proteins in the process of Shaoxing sufu fermentation and the influence on white particles in products [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(14): 175-179
- [7] Fu J, Li L, Yang X Q. Specificity of carboxypeptidases from *Actinomucor elegans* and their debittering effect on soybean protein hydrolysates [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(5-6): 1201-1210
- [8] Timothy M R, Jorja G H, Steven H. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3763-3766
- [9] Chen Z Q, He S H. Cloning and expression of human colon mast cell carboxypeptidase [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(3): 342-347
- [10] Winther J R, Sørensen P. Propeptide of carboxypeptidase Y provides a chaperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(20): 9330-9334
- [11] Cayo R, Jakob R W, Morten C K B. Requirement of the propeptide for *in vivo* formation of active yeast carboxypeptidase Y [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(9): 7006-7012
- [12] VanDenHazel H B, KiellandBrandt M C, Winther J R. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases [J]. *Yeast*, 1996, 12(1): 1-16
- [13] Idiris A, Tohda H, Bi K W, et al. Enhanced productivity of protease-sensitive heterologous proteins by disruption of multiple protease genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(3): 404-420
- [14] Shin S Y, Bae Y H, Kim S K, et al. Effects of signal sequences and folding accessory proteins on extracellular expression of carboxypeptidase Y in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37(6): 1065-1071