

# 黑曲霉丝氨酸羧肽酶的重组表达及其水解大豆蛋白的效果分析

喻豆, 潘力, 王斌\*

(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:** 丝氨酸羧肽酶能够剪切肽链 C 末端的氨基酸, 在大豆蛋白脱苦中有着广泛的应用。该研究将黑曲霉中 3 个丝氨酸羧肽酶基因 (CPG, CPF, CPA) 在低背景的空胞黑曲霉 HL-1 中进行重组表达。利用启动子 *Pna II*、终止子 *Ttef* 和营养缺陷型筛选标记 *pyrG* 构建分别含自身信号肽和糖化酶信号肽的丝氨酸羧肽酶表达载体; 利用 PEG 介导的转化法转化无孢黑曲霉宿主 HL-1, 构建了丝氨酸羧肽酶重组表达菌株。通过摇瓶发酵筛选得到高表达重组菌株 HL-CPG, 其丝氨酸羧肽酶酶活达到 163.71 U/mL。利用 6 × His 标签进行镍柱亲和层析得到单一的丝氨酸羧肽酶 CPG 并研究了其酶学性质, 该酶最适反应温度为 40 °C, 最适 pH 为 3.5, Cu<sup>2+</sup> 具有明显抑制效果。另外, 将重组表达的丝氨酸羧肽酶 CPG 与胃蛋白酶复配水解大豆蛋白, 水解液中疏水性氨基酸 Leu、Tyr 和 Phe 的含量分别增加 606.47 μg/mL、434.06 μg/mL 和 205.11 μg/mL。综上所述, 该研究在黑曲霉中成功实现丝氨酸羧肽酶的高效表达, 对大豆蛋白水解液脱苦处理工艺具有一定的借鉴意义。

**关键词:** 丝氨酸羧肽酶; 黑曲霉; 重组表达; 蛋白脱苦

文章编号: 1673-9078(2022)01-173-180

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0546

## Recombinant Expression of Serine Carboxypeptidase in *Aspergillus niger* and Analysis of Hydrolysis Effect on Soybean Protein

YU Dou, PAN Li, WANG Bin\*

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

**Abstract:** Serine carboxypeptidase could cleave the amino acid at the C-terminus of the peptide chain and has a wide range of applications in debittering soybean protein. In this study, three serine carboxypeptidase genes (CPG, CPF, CPA) from *Aspergillus niger* were recombinantly expressed in low-background *Aspergillus niger* HL-1; promoter *Pna II*, terminator *Ttef* and auxotrophic selection marker *pyrG* were used to construct serine carboxypeptidase expression vector containing its own signal peptide and glucoamylase signal peptide; PEG-mediated transformation method was used to transform into host HL-1 to construct a serine carboxypeptidase recombinant expression strain; the high expressional recombinant strain HL-CPG was obtained by fermentation screening, and its serine carboxypeptidase activity reached 163.71 U/mL; the 6 × His tag was used for nickel column affinity chromatography to obtain a single serine carboxypeptidase CPG and its enzymatic properties. The optimal reaction temperature of the enzyme was 40 °C, the optimal pH was 3.5, and Cu<sup>2+</sup> had a significant inhibitory effect. In addition, when serine carboxypeptidase CPG and pepsin were compounded to hydrolyze soybean protein, the content of hydrophobic amino acids Leu, Tyr and Phe in the hydrolysate increased by 606.47 μg/mL, 434.06 μg/mL and 205.11 μg/mL, respectively. In summary, this study successfully achieved high-efficiency expression of serine carboxypeptidase, and provided support for solving the debittering treatment process

引文格式:

喻豆,潘力,王斌.黑曲霉丝氨酸羧肽酶的重组表达及其水解大豆蛋白的效果分析[J].现代食品科技,2022,38(1):173-180,+158

YU Dou, PAN Li, WANG Bin. Recombinant expression of serine carboxypeptidase in *Aspergillus niger* and analysis of hydrolysis effect on soybean protein [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 173-180, +158

收稿日期: 2021-05-24

基金项目: 广州市科技计划项目 (202002030207)

作者简介: 喻豆 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 工业酶表达, E-mail: 13032285735@163.com

通讯作者: 王斌 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程与酶工程, E-mail: btbinwang@scut.edu.cn

of soybean protein hydrolysate.

**Key words:** serine carboxypeptidase; *Aspergillus niger*; recombinant expression; protein debittering

羧肽酶(Carboxypeptidases, E.C.3.4.16-E.C.3.4.18)是一种外肽酶,能够依次水解释放蛋白质和多肽C末端的氨基酸<sup>[1]</sup>。根据羧肽酶的活性中心可以分为丝氨酸羧肽酶(E.C.3.4.16)、金属性羧肽酶(E.C.3.4.17)和半胱氨酸羧肽酶(E.C.3.4.18)<sup>[2]</sup>。丝氨酸羧肽酶是一种能够在酸性条件下逐个水解肽链C末端氨基酸的外肽酶,属于丝氨酸羧肽酶的S10家族,能够参与蛋白质在生物体内的运输、靶向和加工过程,在酸性条件下除了能够水解肽链末端之外还具有酯酶和脱酰胺酶的活性<sup>[3]</sup>。除此之外丝氨酸羧肽酶具有许多共同的结构特征,有一个S-D-H(丝氨酸、天冬氨酸、和组氨酸)组成的三联体结构,其中Ser是活性中心。目前已报道的丝氨酸羧肽酶来源很广泛,存在于动植物组织和各种微生物中<sup>[4-6]</sup>。丝氨酸羧肽酶在曲霉中的研究较少,且产量较低<sup>[7-14]</sup>。已报道的文献中表达量较高的是Morita<sup>[8]</sup>等将*Aspergillus oryzae*的丝氨酸羧肽酶基因*cpl*在*Aspergillus nidulans*中进行过量表达测得的85.31 U/mL。

大豆蛋白是食品加工行业中应用广泛的原材料,其水解液中含有许多活性多肽,可作为功能性食品成分和营养添加剂等。但在大豆蛋白水解过程中会产生大量的苦味肽,严重限制其在食品加工行业的应用。苦味主要源于蛋白水解过程中生成的苦味肽,而苦味肽中的疏水性氨基酸是苦味产生的主要因素。在蛋白质中由于疏水性氨基酸被包埋在分子内部,故而不会被品尝出苦味,这也是分子量大于6000 u的多肽不会呈现出苦味的原因。当疏水性氨基酸在分子表面的暴露程度越高,产生的苦味越重。但当疏水性氨基酸位于肽链内部和以游离形式存在时,其结构较少能与苦味受体结合,因此呈现的苦味较轻。与游离形式相比,当疏水性氨基酸位于肽链末端时的苦味较重。当疏水性氨基酸位于肽链的C末端时产生的苦味较位于N末端时更重,这表明氨基酸的顺序与苦味值相关。此外肽链的长度、疏水值和氨基酸的组成也会对苦味产生较大的影响<sup>[15,16]</sup>。在大豆蛋白的水解液中含有Gly-Leu、Leu-Lys、Arg-Leu、Phe-Leu、Arg-Leu-Leu等多种苦味肽。降低苦味的方法主要有物理法和生物酶解法,其中生物酶解法具有反应条件温和、产物安全可靠等优点。生物酶解法中使用的蛋白酶主要分为内肽酶、外肽酶和plastein蛋白酶<sup>[17-20]</sup>。内肽酶主要包括胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶

等,氨基酶是在脱苦研究中使用较多的一类外肽酶。单独使用一种生物酶时水解液中仍会存在较多苦味肽,但将内肽酶与外肽酶协同酶解大豆蛋白时的苦味降低最明显。

黑曲霉(*Aspergillus niger*)具有强大的蛋白分泌能力,使其能够承担蛋白高表达时的分泌压力;具有完善的转录后和翻译后修饰系统(在表达真核基因产物时具有明显的优势);被认为是GRAS(Generally Regarded as Safe)安全菌株,具有生物安全性;基因编辑技术在黑曲霉中广泛应用,使得基因操作更加简单可靠;黑曲霉因环境适应能力较强,发酵时所用的培养基由价格相对廉价的基础营养物质组成;最后黑曲霉可进行高密度发酵且发酵放大技术较成熟<sup>[21-25]</sup>。因此黑曲霉是优秀的蛋白表达宿主。

本研究以低蛋白背景的非孢黑曲霉*A.niger* HL-1为宿主,表达*A.niger* CBS 513.88中3个丝氨酸羧肽酶基因(*CPA*、*CPF*、*CPG*),筛选得到高活力的丝氨酸羧肽酶基因*CPG*,并研究了重组酶*CPG*的酶学性质,最后将其应用于大豆蛋白脱苦,研究了胃蛋白酶与重组酶*CPG*复配所产生的脱苦效果,为解决大豆蛋白水解液脱苦处理工艺提供支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

黑曲霉宿主菌株*A.niger* HL-1( $\Delta$ *pyrG*、 $\Delta$ *glaA*)由本实验室构建并保藏,通用表达载体UEV由本实验构建并保藏,大肠杆菌*Escherichia coli* Match1 T1购自美国Invitrogen公司

#### 1.1.2 试剂

限制性内切酶*Apa I*和*Xba I*,美国Thermo Fisher Scientific公司;Prime STAR HS DNA Polymerase (premix),日本TaKaRa公司;HiFi DNA Assembly Cloning Kit试剂盒,美国NEB公司;DreamTaq Green PCR Master Mix,美国Thermo Fisher Scientific公司;胃蛋白酶、茛三酮和氯化镉,上海麦克林生化科技有限公司;FA-Phe-Ala,成都云希化工有限公司合成;大豆分离蛋白,广州普博欣生物科技有限公司;DNA marker (250 bp Ladder、DL 5000<sup>TM</sup>)和26616 Protein Marker,日本TaKaRa公司。

表1 引物

Table 1 Primer

引物名称	引物序列(5'-3')
CPG-g-F	CCTCTATATACACAACCTGGGATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGCGGCCTCGTCTGCACAGGG TTGGCACTCCAAAATCCTCATCGTCGGG
CPG-g-R	GGCATAAAATCGAATGTCCGCTCAGTGATGATGATGATGATGAGA
CPF-g-F	GGCATAAAATCGAATGTCCGCTTAGTGATGATGATGATGATGATGCAG
CPF-g-R	CCTCTATATACACAACCTGGGATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGCGGCCTCGTCTGCACAGGGTT GGCAGCTAAACATGGTCGATTTGGCCA
CPA-g-F	CCTCTATATACACAACCTGGGCCTCTATATACACAACCTGGGATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGC GGCCTCGTCTGCACAGGGTTGGCA CCTCCCTTCCAGCAGGTCCTT
CPA-g-R	GGCATAAAATCGAATGTCCGCTTAGTGATGATGATGATGATGATGGAAC
CPG-F	CCTCTATATACACAACCTGGGATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGC
CPG-R	GGCATAAAATCGAATGTCCGCTCAGTGATGATGATGATGATGATGAGAGGTATAGTCCCTTCG
CPF-F	CCTCTATATACACAACCTGGGATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGC
CPF-R	GGCATAAAATCGAATGTCCGCTTAGTGATGATGATGATGATGATG CAGGGTATCCCGCCGGC
CPA-F	CCTCTATATACACAACCTGGGATGAGAGTCCTTCCAGCTGCTAT
CPA-R	GGCATAAAATCGAATGTCCGCTTAGTGATGATGATGATGATGATG GAACCATTCACCTCCCAACC
Pna II -F	ATCTACTAGTCATATGGATTGGGCCCAATTCATGGTGTGTTTGTATCATTTTAA
Pna II -R	CCCAGTTGTGTATATAGAGGATTG
CP-F	CCCAGTTGTGTATATAGAGGATTG
CP-R	AGCGGATTTGAAGTTCAGGAA

表2 丝氨酸羧肽酶基因序列

Table 2 The sequence of serine carboxypeptidase genes

名称	Gene ID	cDNA 长度/bp	氨基酸数目	预测分子量/ku
CPG	An02g04690	1563	520	57.8
CPF	An07g08030	1596	531	59.5
CPA	An08g08750	1674	557	62.1

1.1.3 培养基

LB 培养基: 1%蛋白胨、1%氯化钠、0.5%酵母提取物。

DPY 培养基: 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。

CD 培养基: 2%葡萄糖、0.3% NaNO<sub>3</sub>、0.2% KCl、0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2%琼脂粉。

发酵培养基: 5%玉米淀粉、3%玉米浆、2%豆粕粉。

1.1.4 引物

实验中所使用的引物如表 1 所示。

1.2 仪器

Veriti 96-Well Thermal Cycler 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; AKATA 层析仪, 美国通用电气公司;

浸入式水平电泳系统, 美国 Bio-Rad 公司; M200 多功能酶标仪, 德国 TECAN 公司; 移液枪和高速离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 丝氨酸羧肽酶表达载体的构建

1.3.1.1 本章所选取的羧肽酶基因

从 Uniprot 上筛得到的黑曲霉丝氨酸羧肽酶基因序列如表 2 所示。

1.3.1.2 表达载体构建

通过 SignalP 4.0 server 信号肽预测基因原有信号肽, 分别构建信号肽为自身信号肽和糖化酶信号肽的丝氨酸羧肽酶表达载体。以黑曲霉 *A.niger* CBS 513.88 的基因组为模板, 以 CPG-F 和 CPG-R, CPF-F 和 CPF-R, CPA-F 和 CPA-R 为引物扩增信号肽为自身信号肽的 CPG, CPF 和 CPA 基因片段, 以 CPG-g-F 和 CPG-g-R, CPF-g-F 和 CPF-g-R, CPA-g-F 和 CPA-g-R

为引物扩增信号肽为糖化酶信号肽的 *CPG-g*、*CPF-g* 和 *CPA-g* 基因片段(每个目的基因的 C 端均通过引物加入 6 × His 标签),用 Pna II -F 和 Pna II -R 为引物扩增杂合启动子片段 *Pna II*。将目的基因(*CPG*、*CPF*、*CPA*、*CPG-g*、*CPF-g* 或 *CPA-g*)、杂合启动子 *Pna II* 和线性化的通用载体 UEV (含 *pyrG* 筛选标记、*Tref* 终止之和 *amyA* 同源臂)通过 HiFi DNA 连接酶的作用连接成环形质粒,转化至大肠杆菌 *E.coli* Match1 T1 感受态细胞,经过氨苄青霉素的抗性筛选、菌液电泳、酶切验证和测序验证后筛选出正确的表达载体。构建正确的表达载体命名为 UEV-CPG/CPF/CPA/CPG-g/CPF-g/CPA-g。

### 1.3.2 丝氨酸羧肽酶重组菌株的构建

将 6 个丝氨酸羧肽酶表达载体(UEV-CPG、UEV-CPF、UEV-CPA、UEV-CPG-g、UEV-CPF-g 和 UEV-CPA-g)经过质粒大量提取、浓缩后,通过 PEG 介导转化至无孢黑曲霉 *A.niger* HL-1 原生质体中,30 °C 恒温培养。将转化子挑至 CD 板上继续培养。待转化子长大之后提取基因组。以转化子基因组模板,利用验证引物 CP-F 和 CP-R 验证目的基因表达框是否完整整合至转化子基因组上。筛选正确的丝氨酸羧肽酶重组菌株,并将正确的菌株命名为 HL-CPG/CPF/CPA/CPG-g/CPF-g/CPA-g。

### 1.3.3 丝氨酸羧肽酶酶活测定

将鉴定正确的丝氨酸羧肽酶菌株在发酵培养基中发酵 168 h (30 °C, 250 r/min),每 24 h 取样一次。利用 镉-茛三酮法测定丝氨酸羧肽酶的酶活。以 FA-Phe-Ala 为底物,将其溶于 pH 4.5, 45 mmol 的乙酸钠缓冲液中配制成 0.5 mmol 的底物溶液。取已用乙酸钠缓冲液稀释的粗酶液 100 μL 加入 900 μL FA-Phe-Ala 溶液,混匀,30 °C 反应 30 min。向 450 μL 无菌水中加入 50 μL 反应液,然后加入 1 mL 显色液即 镉-茛三酮溶液,84 °C 水浴 5 min,冰上冷却至室温,用酶标仪测量 A506 nm 的吸光值,对照组将 100 μL 粗酶液煮沸 15 min 使酶失活,其余操作与实验组相同。酶活定义:30 °C, pH 4.5 的条件下,每小时水解 1 μmol 丙氨酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

### 1.3.4 丝氨酸羧肽酶的纯化

因在构建表达载体时在目的基因中加入 6 × His 标签,故可以利用镍柱亲和层析的方法进行丝氨酸羧肽酶的纯化。将重组菌株在发酵培养基中培养 96 h,将发酵培养基离心取上清后用 0.45 μm 的滤膜过滤,将其用于纯化。使用 HisTrap™ HP 层析柱,上样量为 20 mL,流速为 1 mL/min。采用梯度洗脱法(洗脱液中咪唑的浓度为 0~0.5 mol/L)收集不同的洗脱峰。利

用 SDS-PAGE 检验每个洗脱峰,得到单一的丝氨酸羧肽酶溶液。

### 1.3.5 丝氨酸羧肽酶的酶学性质研究

#### 1.3.5.1 温度对丝氨酸羧肽酶的影响

最适温度测定:在 pH 值为 4.5 的条件下,将纯化得到的蛋白酶液分别在 20、40、50、60、70、80 °C 条件下测定丝氨酸羧肽酶的酶活,以最高的酶活力为 100%。温度稳定性测定:将酶液在上述温度下保温处理 2 h,测定剩余的酶活力,以未经处理组的酶活力为 100%。

#### 1.3.5.2 pH 对丝氨酸羧肽酶的影响

最适 pH 值测定:配制不同 pH 值(2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0) 0.5 mmol 的 FA-Phe-Ala 底物溶液,在测量得到的最适温度下,测定不同 pH 值条件的酶活变化,以最高的酶活力为 100%。pH 稳定性测定:将酶液在上述 pH 条件下保温处理 2 h,测定酶液剩余的酶活力,以未经处理组的酶活力为 100%。

#### 1.3.5.3 金属离子对丝氨酸羧肽酶的影响

在标准的酶液反应体系下,加入不同的金属离子(Ba<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>),在反应体系中每种离子的终浓度为 5.0 mmol,测定丝氨酸羧肽酶的酶活,以未经处理组的酶活力为 100%。

### 1.3.6 丝氨酸羧肽酶在大豆蛋白脱苦中的应用

#### 1.3.6.1 甲醛滴定法测定水解度

取 5 mL SPI 水解样品加入 60 mL 超纯水,用 0.1 mol/L NaOH 调节样品 pH 至 8.2。向溶液中缓慢加入 10 mL pH 值为 8.2 中性甲醛溶液,用 0.01 mol/L NaOH 进行滴定实验,滴定至 pH 9.2,记录 NaOH 标准溶液的消耗体积 V。空白对照组为将 5 mL SPI 样品换成 5 mL 超纯水,其他步骤与样品组一致,记录 NaOH 标准溶液的消耗体积 V<sub>0</sub>。按以下公式计算水解样品的水解度<sup>[23]</sup>:

$$DH/\% = (1000 \times 0.01 \times \frac{V - V_0}{5.00} / C - 0.33) / 7.8 \times 100\%$$

式中:

C——样品中原大豆分离蛋白浓度, g/L;

0.33——大豆分离蛋白中游离氨基的浓度, mmol/g;

7.8——每克大豆分离蛋白的肽键当量数, mmol/g。

#### 1.3.6.2 不同 pH 值条件下胃蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究

配制 pH 为 3、3.5、4、4.5 的缓冲液溶解大豆分离蛋白。胃蛋白酶的添加量为 1:100 (酶:底物),温度为 37 °C,每隔 1 h 测定其水解度,酶解时间为 8 h。

### 1.3.6.3 胃蛋白酶与丝氨酸羧肽酶复配水解大豆分离蛋白

在pH为3.5时测定胃蛋白酶与丝氨酸羧肽酶复配对大豆分离蛋白的影响。实验组：向经过预处理的大豆分离蛋白中按照 1:100 的酶量加入胃蛋白酶，酶解处理 6 h，再加入 300 U/g 的丝氨酸羧肽酶酶液 CPG 反应 6 h，反应结束时测量水解度。对照组处理方法为经过预处理的大豆分离蛋白中加入相同酶量的胃蛋白酶，反应 12 h，反应结束时测量水解度并测定水解液中游离氨基酸的含量。

### 1.3.7 数据处理与分析

所有试验重复三次，所有的实验数据采用采用 SPSS 19.0 进行方差分析，Origin 进行图表的绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组丝氨酸羧肽酶菌株的筛选

将黑曲霉 *A.niger* CBS 513.88 中 3 个丝氨酸羧肽酶基因 (*CPA*、*CPF*、*CPG*) 在 SignalP 5.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析工具上进行信号肽预测发现 3 个基因均含有 N 端的分泌信号。

为构建正确的丝氨酸羧肽酶表达载体，根据表 1 中的引物进行 PCR 扩增得到分别含自身信号肽和糖化酶信号肽的丝氨酸羧肽酶基因片段 (图 1a)，将丝氨酸羧肽酶基因片段、启动子 *Pna II* 和线性化的 UEV 通用载体片段进行连接构建表达载体，最终得到测序正确的表达载体 UEV-CPG/CPF/CPA/CPG-g/CPF-g/CPA-g。为了筛选得到高表达的丝氨酸羧肽酶重组菌株，将 6 个表达载体 (UEV-CPG/CPF/CPA/CPG-g/CPF-g/CPA-g) 转化至黑曲霉 HL-1 宿主中得到 6 种丝氨酸羧肽酶重组菌株，经 PCR 验证正确后的阳性转化子接种至发酵培养基培养 96 h 后测定丝氨酸羧肽酶酶活 (图 1c)。信号肽为自身信号肽的重组菌株 (HL-CPG、HL-CPF、HL-CPA) 的酶活均比信号肽为糖化酶信号肽的重组菌株 (HL-CPG-g、HL-CPF-g、HL-CPA-g) 的酶活高，可能是因为在丝氨酸羧肽酶的 N 端含有约 90 个残基的失活前结构域，该结构域能够保护蛋白质不被其他内肽酶切割且与蛋白质的折叠有关，更换信号肽之后可能会影响蛋白质的结构导致羧肽酶的活性部位被剪切<sup>[25]</sup>。在两个系列的重组菌株中含 *CPG* 基因的重组菌株酶活最高，且在 6 株不同的丝氨酸羧肽酶菌株中酶活最高的为 HL-CPG 菌株，酶活为 163.71 U/mL，与 Morita 等<sup>[8]</sup>报道的 85.31 U/mL 相比，丝氨酸羧肽酶酶活提高了 96.61%，说明筛选得到的丝氨酸羧肽酶重组菌株能达到较高的表达水平。

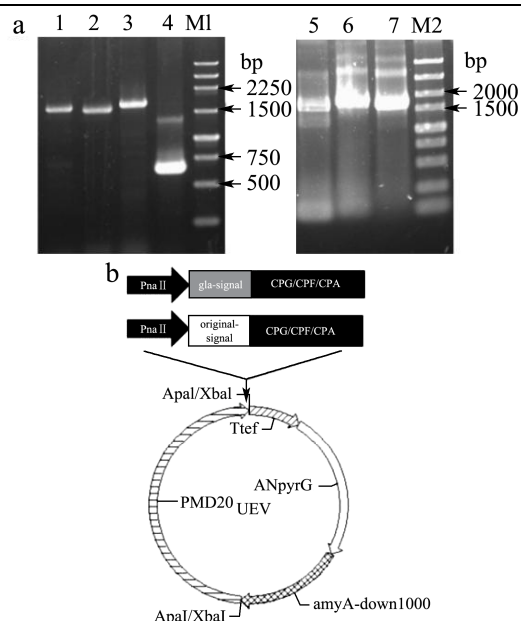


图 1 丝氨酸羧肽酶重组菌株的筛选

Fig.1 Screening of serine carboxypeptidase strains

注：a：丝氨酸羧肽酶各基因片段及启动子 *Pna II* 片段电泳图 (1 为 *CPF*；2 为 *CPG*；3 为 *CPA*；4 为杂合启动子；5 为含糖化酶信号肽的 *CPG-g*；6 为含糖化酶信号肽的 *CPF-g*；7 为含糖化酶信号肽的 *CPA-g*；M1 为 250 bp Ladder；M2 为 DL 5000™)；b：丝氨酸羧肽酶表达载体构建图谱；c：不同丝氨酸羧肽酶重组菌株酶活测定。

### 2.2 重组酶 CPG 的纯化

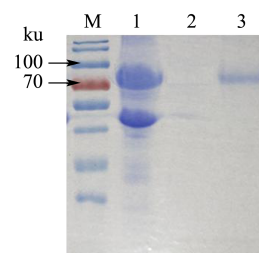


图 2 丝氨酸羧肽酶 CPG 的纯化图

Fig.2 SDS-PAGE of serine carboxypeptidase CPG

注：1 为 HL-CPG 菌株 96 h 发酵液上清液蛋白条带；2 为上样穿过液蛋白条带；3 为 HL-CPG 菌株 96 h 发酵液上清液纯化后蛋白条带；M 为 #26616 蛋白 Marker。

将经过预处理的HL-CPG菌株的发酵上清液经过镍柱亲和层析并将纯化之后的样品进行SDS-PAGE电泳检测,结果如图2所示,泳道3为纯化之后的蛋白样品,蛋白条带大小与发酵上清液中的大小一致。

### 2.3 重组丝氨酸羧肽酶CPG的酶学性质

#### 2.3.1 温度对重组酶CPG的影响

重组酶CPG在40℃时酶活最高,当温度为80℃时仅具有10%左右的相对酶活力(图3a)。另外重组酶在20~50℃时酶活相对稳定,在此范围内处理2h后能保持60%以上的相对酶活力(图3b)。

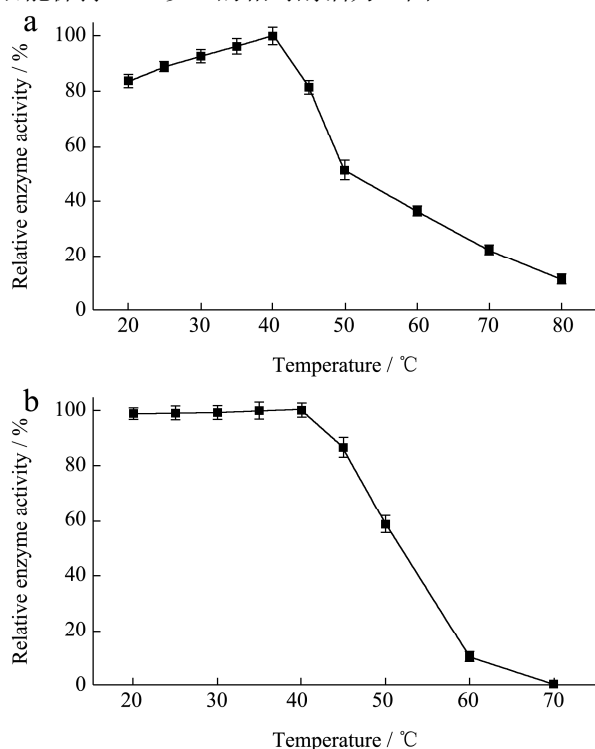


图3 温度对纯化后重组酶CPG酶活的影响

Fig.3 The effect of temperature on purified recombinant CPG

注: a: 重组酶CPG的最适反应温度; b: 重组酶CPG的热稳定性。

#### 2.3.2 pH值对重组酶CPG的影响

重组酶CPG在pH为3.5时酶活最高且随着pH值的升高酶活迅速下降,在pH值为9时仅保持10%的相对酶活(图4a)。将重组酶CPG在各pH条件下反应2h后,在pH值为3~5时保持50%以上的相对酶活力,在中性条件及碱性条件下不能稳定存在(图4b)。

#### 2.3.3 金属离子对重组酶CPG的影响

在各金属离子的浓度为5mmol/L时,实验结果如表3所示。Cu<sup>2+</sup>对重组酶CPG具有明显的抑制效果,Ba<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>对重组酶CPG具有轻微的抑制效果,K<sup>+</sup>对CPG的作用效果非

常小,Na<sup>+</sup>对羧肽酶CPG有激活的作用,能够提高10%的酶活力。

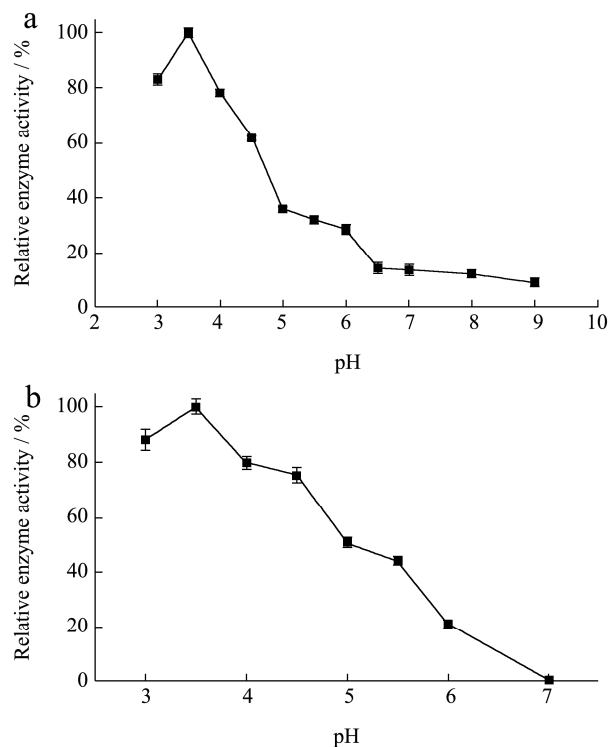


图4 pH值对纯化后重组酶CPG酶活的影响

Fig.4 The effect of pH on purified recombinant CPG

注: a: 重组酶CPG的最适反应pH值; b: 重组酶CPG的pH值稳定性。

表3 金属离子对纯化后重组酶CPG酶活的影响

Table 3 The effect of metal ions on the activity of purified recombinant CPG

金属离子	浓度/(mmol/L)	相对酶活力/%
Ba <sup>2+</sup>	5.00	90.23±0.45
Mn <sup>2+</sup>	5.00	87.47±0.41
K <sup>+</sup>	5.00	98.45±1.89
Mg <sup>2+</sup>	5.00	81.16±0.83
Ni <sup>2+</sup>	5.00	92.71±0.15
Co <sup>2+</sup>	5.00	94.64±0.81
Ca <sup>2+</sup>	5.00	93.79±1.63
Na <sup>+</sup>	5.00	110.75±0.04
Zn <sup>2+</sup>	5.00	93.53±1.31
Cu <sup>2+</sup>	5.00	11.58±1.54
Control	-	100.00±1.57

### 2.4 重组丝氨酸羧肽酶CPG在大豆蛋白脱苦

中的应用

#### 2.4.1 胃蛋白酶在不同pH值条件下水解大豆蛋白

用胃蛋白酶水解不同pH值条件的大豆分离蛋白,结果如图5所示。在pH值为3时大豆分离蛋白的水解最高。且随着pH值的升高,胃蛋白酶的水解能力逐渐下降,大豆分离蛋白的水解度降低。在所有条件下,前3h的水解度变化较大,随后趋于稳定并在第6h时水解度达到最高。在pH值为3.5时大豆分离蛋白的水解度略低于pH值为3时的水解度,但考虑重组酶CPG的酶学性质,选择pH3.5作为重组酶CPG与胃蛋白酶复配实验的水解条件。

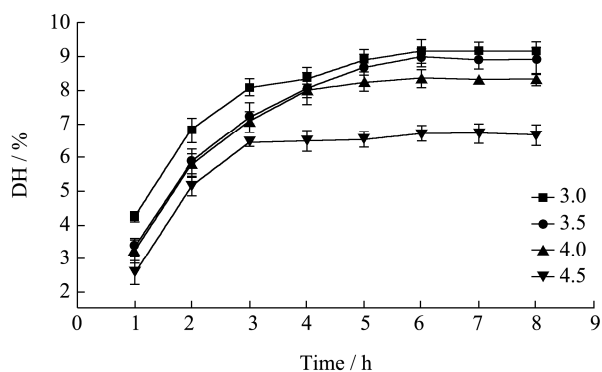


图5 不同pH值下胃蛋白酶酶解效果

Fig.5 Pepsin digestion effect under different pH

### 2.4.2 重组酶CPG与胃蛋白酶联合水解大豆蛋白

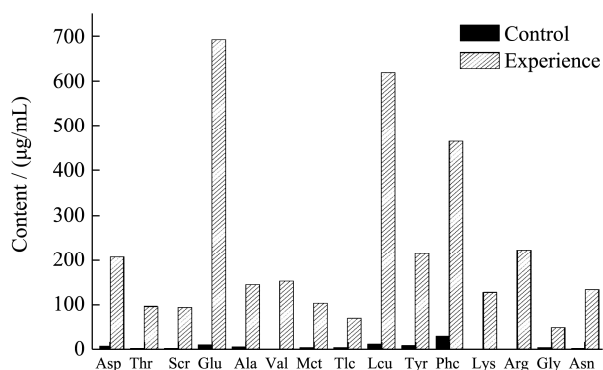


图6 蛋白水解液中氨基酸含量对比

Fig.6 Comparison of amino acid content

实验组中加入胃蛋白酶处理6h之后继续加入重组酶CPG进行处理6h,对照组中加入相同酶量的胃蛋白酶处理12h后分别测量水解液的水解度和氨基酸含量。对照组中水解液的水解度为10.17%,而实验组的水解度为19.72%,水解度明显提高。实验组中氨基酸的种类和含量明显高于对照组(图6)。在实验组中Glu、leu、Phe、Tyr和Arg氨基酸的含量较高,疏水性氨基酸Ala、Val、Met、Ile、Leu、Tyr和Phe的含量增加明显,特别是Phe的含量增加最明显,其次是Leu和Tyr,含量分别增加606.47 µg/mL、434.06 µg/mL和205.11 µg/mL。另外实验组中鲜味氨基酸Glu等的含量也明显增加。因此将胃蛋白酶和重组酶CPG复配

水解大豆蛋白会明显降低水解液的苦味同时水解液中鲜味也明显增加。

## 3 结论

3.1 黑曲霉是优秀的蛋白表达宿主,具有强大的蛋白分泌能力,完善的蛋白修饰体系和生物安全性等优点。本研究利用启动子*Pna II*、终止子*Tref*和双向筛选标记*pyrG*筛选高表达量的丝氨酸羧肽酶基因,并尝试更换信号肽来增高丝氨酸羧肽酶的表达量。通过PCR鉴定挑选表达正确的重组丝氨酸羧肽酶菌株,通过摇瓶发酵筛选高表达量的菌株,最终成功筛选得到重组丝氨酸羧肽酶菌株HL-CPG,其酶活达到163.71 U/mL。对重组丝氨酸羧肽酶CPG进行镍柱亲和层析并进行SDS-PAGE检测,得到单一的蛋白条带。对重组酶CPG进行酶学性质研究,重组酶CPG在40℃时酶活最高,在20℃~50℃时具有较好的热稳定性;在pH值为3.5时酶活最高,pH值在3.0~5.0时具有较好的稳定性;Na<sup>+</sup>对重组酶CPG具有激活作用,而Cu<sup>2+</sup>具有较强的抑制作用。

3.2 将胃蛋白酶和丝氨酸羧肽酶CPG复配后应用于大豆蛋白脱苦,其水解度比仅使用胃蛋白酶时高9.55%,水解液中疏水性氨基酸(Ala、Val、Met、Ile、Leu、Tyr和Phe)含量明显增加,鲜味氨基酸(Glu)含量也明显增加,不仅降低了水解液的苦味,还明显增加了鲜味。因此重组酶CPG能够改善苦味,在食品工业上拥有较好的应用前景。

## 参考文献

[1] 吴静,闵柔,郭敏辰,等.羧肽酶研究进展[J].食品与生物技术学报,2012,31(8):793-801  
WU Jing, MIN Rou, WU Minchen, et al. Research progresses on the carboxypeptidase [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(8): 793-801

[2] 付静.*A.elegans*、*A.oryzae*和*R.oligosporus*肽酶系统及其脱苦机理的比较研究[D].广州:华南理工大学,2011  
FU Jing. A comparative study on the peptidase systems and debittering mechanism among *A.elegans*, *A.oryzae* and *R.oligosporus* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011

[3] 叶玲飞,罗光宇,向建华,等.丝氨酸羧肽酶及其类蛋白的研究进展[J].植物生理学报,2013,49(2):122-126  
YE Lingfei, LUO Guangyu, XIANG Jianhua, et al. Research progress of serine carboxypeptidases and serine carboxypeptidase-like proteins [J]. Plant Physiology Journal, 2013, 49(2): 122-126

- [4] Mahoney J A, Ntolosi B, DaSilva R P, et al. Cloning and characterization of CPVL, a novel serine carboxypeptidase, from human macrophages [J]. *Genomics*, 2001, 72(3): 243-251
- [5] Tabuchi M, Iwaihara O, Ohtani Y, et al. Vacuolar protein sorting in fission yeast: cloning, biosynthesis, transport, and processing of carboxypeptidase Y from *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(13): 4179-4189
- [6] 冯英,刘庆坡,贾佳,等.拟南芥丝氨酸羧肽酶类蛋白家族的基因组学分析[J].*遗传学报*,2005,8:864-873  
FENG Ying, LIU Qingpo, JIA Jia, et al. Genomics analysis of serine carboxypeptidase-like protein family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 8: 864-873
- [7] Morita H, Tomita S, Maeda H, et al. Serine-type carboxypeptidase KexA of *Aspergillus oryzae* has broader substrate specificity than *Saccharomyces cerevisiae* Kex1 and is required for normal hyphal growth and conidiation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(22): 8154-8157
- [8] Morita H, Okamoto A, Yamagata Y, et al. Heterologous expression and characterization of Cpl, OcpA, and novel serine-type carboxypeptidase OcpB from *Aspergillus oryzae* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 85(2): 335-346
- [9] 陈丹,游子娟,黄伟谦,等.重组米曲霉丝氨酸羧肽酶 O 的性质鉴定及脱苦应用研究[J].*广东农业科学*,2015,42(5):103-108  
CHEN Dan, YOU Zijuan, HUANG Weiqian, et al. Characteristics of carboxypeptidase O from *Aspergillus oryzae* expressed in *Pichia pastoris* and its application in protein hydrolysis and debittering [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(5): 103-108
- [10] Morita H, Kuriyama K-I, Akiyama N, et al. Molecular cloning of ocpO encoding carboxypeptidase O of *Aspergillus oryzae* IAM2640 [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2010, 74(5): 1000-1006
- [11] Chiba Y, Yamagata Y, Iijima S, et al. The carbohydrate moiety of the acid carboxypeptidase from *Aspergillus saitoi* [J]. *Curr Microbiol*, 1993, 27(5): 281-288
- [12] Morita H, Abo H, Okamoto A, et al. Enzymatic properties of the recombinant serine-type carboxypeptidase OcpC, which is unique to *Aspergillus oryzae* [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75(4): 662-668
- [13] Ohsumi K, Matsuda Y, Nakajima H, et al. Cloning and characterization of the cpyA gene encoding intracellular carboxypeptidase from *Aspergillus nidulans* [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65(5): 1175-1180
- [14] Ishida K, Kuboshima M, Morita H, et al. Diversity in mRNA expression of the serine-type carboxypeptidase ocpG in *Aspergillus oryzae* through intron retention [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2014, 78(8): 1328-1336
- [15] Fu Y, Chen J R, Bak K H, et al. Valorisation of protein hydrolysates from animal by-products: perspectives on bitter taste and debittering methods: a review [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2019, 54(4): 978-986
- [16] Soltani S, Haghaei H, Shayanfar A, et al. QSBR study of bitter taste of peptides: application of GA-PLS in combination with MLR, SVM, and ANN approaches [J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013(501310)
- [17] Sun-Waterhouse D, Wadhwa S S. Industry-relevant approaches for minimising the bitterness of bioactive compounds in functional foods: a review [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6(3): 607-627
- [18] Ley J P. Masking bitter taste by molecules [J]. *Chemosensory Perception*, 2008, 1(1): 58-77
- [19] Sun X D. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46(12): 2447-2459
- [20] FitzGerald R J, O'Cuinn G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates [J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(2): 234-237
- [21] Juturu V, Wu J C. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications [J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2018, 19(1): 7-21
- [22] 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
- [23] 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)

(下转第 158 页)