

# 哈茨木霉酸性蛋白酶基因的克隆表达及其水解应用

陈宇琛<sup>1,2</sup>, 杨李<sup>1</sup>, 谷敏<sup>1</sup>, 陈凯欣<sup>1</sup>, 胡秋怡<sup>1</sup>, 邱小娴<sup>1</sup>, 彭靖怡<sup>1</sup>, 柯野<sup>1\*</sup>

(1. 韶关学院生物与农业学院, 广东韶关 512005) (2. 仲恺农业工程学院资源与环境学院, 广东广州 510225)

**摘要:** 为了对哈茨木霉酸性蛋白酶 (Acid Protease, Ap) 的性质研究, 采用 RT-PCR 克隆了哈茨木霉 Ap 基因, 转化至毕赤酵母 GS115 菌株中获得高效表达, 然后对该重组蛋白酶 (Recombinant Acid Protease, rAp) 的酶学性质和水解大豆分离蛋白的效果进行测定。结果表明, 重组毕赤酵母在 500 mL 三角瓶中诱导表达时, 发酵液中 rAp 酶活力达到 21.50 U/mL。该 rAp 为天冬氨酸蛋白酶, 最适温度为 55 °C, 在 40 °C 处理 120 min 仍具有较强的热稳定性; 最适 pH 值为 2.50, 在不同 pH 缓冲液中处理 24 h 后, pH 值 2.00~5.00 具有较强稳定性。Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 能显著促进活性, 相对酶活分别高达 116.21%、113.79% 和 117.44%; 而 Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、0.50% SDS 和 5.00% Trion X-100 显著抑制活性, 其相对酶活分别 78.02%、79.26%、2.6% 和 13.19%。rAp 和胃蛋白酶对大豆分离蛋白水解后, 水解产物中蛋白相对含量分别为 14.67% 和 3.64%, β- 伴大豆球蛋白抗原性分别降低了 30.01% 和 26.10%, 球蛋白抗原性分别降低了 22.37% 和 15.63%。从以上结果可知, rAp 对大豆分离蛋白具有较强水解和降低抗原性的能力, 具有潜在的应用开发价值。

**关键词:** 哈茨木霉; 酸性蛋白酶; 酶学性质; 大豆分离蛋白; 水解作用

文章编号: 1673-9078(2024)05-84-91

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.1292

## Enzymatic Properties of Recombinant Acid Protease Obtained from *Trichoderma harzianum* and Its Hydrolytic Performance for Soybean Protein Isolate

CHEN Yuchen<sup>1,2</sup>, YANG Li<sup>1</sup>, GU Min<sup>1</sup>, CHEN Kaixin<sup>1</sup>, HU Qiuyi<sup>1</sup>, QIU Xiaoxian<sup>1</sup>, PENG Jingyi<sup>1</sup>, KE Ye<sup>1\*</sup>

(1. Henry Fok School of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)(2. College of Resources and Environment, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** In order to study the properties of acid protease (Ap) from *Trichoderma harzianum*, the acid protease gene was cloned using RT-PCR and then transferred to the *Pichia pastoris* GS115 strain to obtain high expression. Subsequently, the enzymatic properties of this recombinant acid protease (rAp) and its performance in hydrolyzing soybean protein isolate were determined. It was observed that the activity of rAp in the fermentation broth reached 21.5 U/mL when the recombinant *P. pastoris* was induced in a 500 mL triangular flask. This rAp is an aspartic protease with an optimal temperature of 55 °C and an optimum pH value of 2.5, which exhibited strong thermal stability after treatment at 40 °C for 120 min. After 24 h treatments in buffers of different pH, rAp still demonstrated excellent stability in the pH range of 2.00~5.00. The relative

引文格式:

陈宇琛, 杨李, 谷敏, 等. 哈茨木霉酸性蛋白酶基因的克隆表达及其水解应用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(5): 84-91.

CHEN Yuchen, YANG Li, GU Min, et al. Enzymatic properties of recombinant acid protease obtained from *Trichoderma harzianum* and its hydrolytic performance for soybean protein isolate [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 84-91.

收稿日期: 2022-10-11

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2018A0303130108); 韶关学院大学生创新创业训练计划国家级项目 (202210576016); 广东大学生科技创新培育专项资金资助项目 (pdjh2023b0474)

作者简介: 陈宇琛 (1996-), 男, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 污水处理理论与技术, E-mail: 18027195075@163.com

通讯作者: 柯野 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 酶工程, E-mail: keye518@126.com

activity of rAp significantly increased to 116.21%, 113.79%, and 117.44% by  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$ , respectively. In the meantime, rAp activity was significantly inhibited by  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , 0.50% SDS, and 5.00% Triton X-100, and the resulting relative enzyme activity was 78.02%, 79.26%, 2.6%, and 13.19%, respectively. After hydrolysis of soybean protein isolates by rAp and pepsin, the relative protein contents of the hydrolyzed products were 14.67% and 3.64%, respectively. Moreover, the  $\beta$ -conglycinin antigenicity is reduced by 30.01% and 26.11%, respectively, and the antigenicity of globulin is decreased by 22.37% and 15.63%, respectively. Based on these results, it is clear that rAp has a strong ability to hydrolyze and reduce the antigenicity of soybean isolates, demonstrating its potential development and application value.

**Key words:** *Trichoderma harzianum*; acid protease; enzymatic properties; soybean protein isolate; hydrolysis

哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 是最具代表性的生物防治菌之一。该菌能促进植物的生长<sup>[1]</sup>、控制植物病害<sup>[2-4]</sup>、促使植物启动防御反应<sup>[5]</sup>等多方面的应用,而且能分泌产生多种胞外酶(如纤维素酶<sup>[6]</sup>、漆酶<sup>[7]</sup>、几丁质酶、 $\beta$ -1,3 葡聚糖酶<sup>[8]</sup>等);同时也能分泌多种蛋白酶<sup>[9]</sup>,如中性丝氨酸蛋白酶<sup>[10]</sup>、Subtilisin-like 类丝氨酸蛋白酶<sup>[11]</sup>、以及其他类型的丝氨酸蛋白酶<sup>[12]</sup>,对其分泌的胞外酸性蛋白酶的研究报道主要与其抗菌作用相关<sup>[13]</sup>。如2005年,Suárez等<sup>[14]</sup>对 *T. harzianum* CECT 2413 菌株的蛋白质组学分析发现,在真菌细胞壁的诱导下能产生一种新型天冬氨酸蛋白酶。2009年,Samolksi等<sup>[15]</sup>利用基因芯片技术发现,哈茨木霉在番茄植物、几丁质或葡萄糖存在下多种酸性蛋白酶基因表达上调。Szabo等<sup>[16]</sup>在2013年发现,哈茨木霉在寄生线虫卵的过程中有多种蛋白酶表达,对其寄生过程中发挥关键作用,但是对这些酸性蛋白酶的性质和开发应用鲜见报道。

大豆蛋白具有非常高的营养价值,备受消费者青睐,广泛应用于饲料、食品等各类行业;但是大豆蛋白中存在大量致敏原,这些致敏原诱发机体产生的过敏反应仍无特效治疗手段。为了降低大豆蛋白的过敏危害,研制低致敏或脱敏的大豆蛋白制品备受关注。目前常采用高温、高压、高强度超声波等方法减少大豆蛋白致敏性,但降低致敏性的效果不理想<sup>[17]</sup>。采用蛋白酶水解大豆蛋白,切断蛋白质分子肽键,能有效降低致敏性,这是目前较好的一种手段。当前主要利用的蛋白酶为碱性或中性蛋白酶,但是水解产物中仍含有大量高致敏的抗水解肽<sup>[18,19]</sup>;因此,筛选、研制出新型蛋白酶成为人们关注的热点。

本文根据 *T. harzianum* 全基因组序列,采用 RT-PCR 技术克隆了酸性蛋白酶 (Acid Protease, ap) 基因,连接至表达载体 pICH 上后,电转整合

至 *P. pastoris* 基因组上,筛选出高效表达的工程菌株,并对其诱导表达获得重组酸性蛋白酶 (Recombinant Acid Protease, rAp),进一步对该 rAp 的酶学性质、对大豆蛋白水解、降低大豆蛋白致敏性进行了研究,这为开发出新型酸性蛋白酶的提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

哈茨木霉 (*T. harzianum*) 购自中国微生物菌种保藏中心。

Trizol 试剂,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;RNA 和 DNA 操作相关的酶,宝日医生物技术(北京)有限公司;酵母提取物、胰蛋白酶、YNB、Pepstatin、PMSF、Aprotinin、Leupeptin、AOX 引物、P1 和 P2 引物,生工生物工程(上海)股份有限公司;GS115 菌株和表达载体由本实验室保藏提供;Sephadex G-75,美国 GE Healthcare;Glycinin ELISA KIT,  $\beta$ -conglycinin ELISA KIT,上海纪宁实业有限公司;其余化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

T100 PCR 仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;基因脉冲 XCell 系统,美国 Bio-rad 公司;AKTA prime plus 蛋白纯化系统,美国通用 GE;MULiskan Go 全波长酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;IS-RDS4 叠加式恒温摇床,苏州捷美电子有限公司;Mini-PROTEAN 微型垂直电泳槽,中国 BIO-RAD;Fresco17 小型高速离心机,德国 Thermo Scientific;PYX-190M-13 霉菌培养箱,韶关科力实验仪器公司等。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 哈茨木霉 ap 基因的克隆及其表达载体的构建

取一小块哈茨木霉菌丝块接种在马铃薯葡萄糖

琼脂培养基平板上, 28 °C 培养 48 h, 用镊子刮取约 200 mg 菌丝放置研钵中, 添加液氮冷却, 在液氮中研磨菌丝体为粉末后, 将其收集至预先装有 1 mL Trizol 的 2 mL Eppendorf 离心管中, 采用旋涡混匀仪高速混合 5 min; 据 Trizol 试剂指导, 提取、鉴定总 RNA; 利用 Prime Script™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将 RNA 反转录合成 cDNA。参考 *T. harzianum* 全基因组序列 (Accessionno. JOKZ01000069 REGION:110313..111532), 去掉其 1~17 信号肽序列, 采用 Oligo 6.0 软件设计引物 P1: 5'CGGAATTCTCGCCTGTAAAGCCAAGT-3', P2: 5'-ATCGCTCGAGAGCGGCGGTAGCAAAGCCGAT-3', 斜粗体分别为 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点。以 cDNA 为模板, P1 和 P2 为引物, 进行 PCR 扩增; 采用如下程序进行 PCR 扩增: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s; 32 个循环, 72 °C 保温 5 min。对纯化的 PCR 产物进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后, 连接至载体上构建出 pICH/ap 重组表达载体, 化转至大肠杆菌 DH 5 $\alpha$  中测序确认。

### 1.3.2 重组毕赤酵母菌株的构建、筛选和诱导表达

用 *Stu* I 线性化 pICH/ap 表达质粒后, 电转入 *P. pastoris* GS115 菌株中。将电转后 GS115 菌株涂布在 MD 平板上, 30 °C 培养 2~4 d, 挑取单菌落至 MM 牛奶培养基 (1.34% YNB, 1.00% 甲醇, 1.50% 脱脂牛奶, 1.50% 琼脂, 20 mmol/L pH 值 5.0 柠檬酸缓冲液) 培养 2~4 d, 以重组酵母菌周围产生透明水解圈作为筛选标志, 筛选具有透明圈的重组 GS115 菌株, 提取其基因组, 分别以 AOX 引物、P1 和 P2 引物进行基因组 PCR, 确认 ap 基因整合到 GS115 菌株基因组中。空表达载体 pICH 电转入 GS115 菌株, 获得重组转化子作为对照。

将重组 GS115 菌株接种入 BMGY 培养基 (pH 值 6.00) 中, 28 °C 振荡培养 1 d 后, 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 转接 (初始接种量 OD<sub>600</sub> 约为 5.00~6.00) 至 BMMY 培养基 (pH 值 5.00) 的摇瓶中培养, 每 24 h 补加 1.00% (体积分数) 的甲醇诱导表达 7 d 后, 离心收集发酵上清液, 即为粗酶液。

### 1.3.3 rAp的纯化及其活性测定

将粗酶液经过切向流膜过滤分离系统进行浓缩, 向浓缩液中添加硫酸铵至质量分数 85.0% 饱和度过夜盐析, 离心, 收集沉淀, 溶解于 20 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 值 3.00) 后透析, 再超滤离心

浓缩去杂。以 20.00 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 值 3.00) 为洗脱液, 30.00 mL/h 流速, 对浓缩液进行 Sephadex G-75 层析后, 超滤浓缩收集洗脱液, 获得纯化的 rAp, 以 SDS-PAGE 电泳鉴定纯化过程。蛋白酶活性的测定方法见参考文献<sup>[20]</sup>。

### 1.3.4 rAp的生化特性测定

测定温度、pH 值、金属离子和化学试剂对 rAp 影响的方法见参考文献<sup>[20]</sup>。

### 1.3.5 rAp对大豆分离蛋白的水解

用 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 值 2.2) 配制 3.00% 大豆分离蛋白溶液后, 分别加入 rAp 和 Pepsin (每毫升大豆分离蛋白溶液中加入 23.00 U 酶量), 35 °C 分别水解 0、5、60、180 和 360 min 后, 取出水解液置于沸水中 10 min 灭酶, 12 000 r/min 离心 30 min, 收集水解产物上清液, 采用 Bradford 法<sup>[21]</sup>测定其蛋白质含量, 并且观察分析其水解过程中蛋白条带的变化 (SDS-PAGE 法, 12.00% 分离胶, 5.00% 浓缩胶<sup>[21]</sup>)。采用抗原性试剂盒, 测定水解产物中大豆球蛋白或  $\beta$ - 伴大豆球蛋白致敏性抗原性的变化情况。

### 1.3.6 数据分析

本试验中的所有数据均为三次重复试验获得, 利用 SPSS 14.0 软件对这些数据进行方差分析和误差值计算, 利用 OriginPro 2021 软件绘制酶学性质结果图。

## 2 结果与分析

### 2.1 ap基因的克隆及其序列分析结果

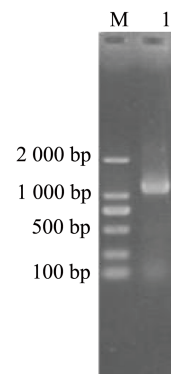


图 1 ap 基因的 RT-PCR 产物电泳图

Fig.1 RT-PCR products electrophoretic patterns of the ap gene

注: M: DNA marker; 1: ap 基因的 RT-PCR 产物。

将哈茨木霉菌株接种平板培养后, 挑取其菌丝体, 采用 Trizol 试剂对其总 RNA 进行提取, 总



RNA 的 28 s 和 18 s 两个条带清晰，且 28 s 条带比 18 s 宽，这表明提取的总 RNA 质量较好，达到反转录质量要求。以总 RNA 为模板进行 RT-PCR，将 PCR 产物（见图 1）连接至载体上后，测序表明重组表达载体 pICH/ap 构建成功。ap 基因测序

结果推导编码的氨基酸序列，与 Genbank 序列比对发现，除 V68A 和 R152S 两个位点的氨基酸残基发生突变外，其余位点未见突变；利用 <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> 预测 Ap 为天冬氨酸蛋白酶（见图 2）。

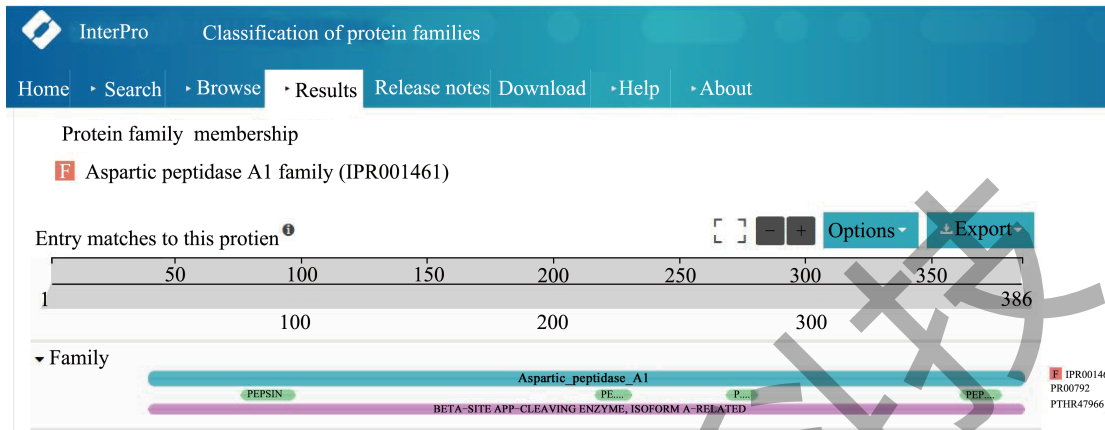


图 2 基于 Ap 氨基酸序列预测为天冬氨酸蛋白酶的结果图片

Fig.2 Results predicted as aspartic acid protease based on amino acid sequence of Ap

2.2 重组毕赤酵母的构建及其诱导表达结果

数转化子培养 1~2 d 后，周围会出现凝乳现象，然后会变为透明水解圈（见图 4）。而电转入空表达载体 pICH 的转化子菌落周围未出现透明水解圈。挑取水解圈直径最大的转化子进行基因组 PCR 鉴定，PCR 产物大小与预期一致，P1 和 P2 引物扩增出 ap 基因；AOX 引物扩增出 2 个 PCR 产物，分别为 GS115 菌株的 AOX1 基因以及含有 ap 基因的表达载体 pICH/ap 序列（见图 5），这表明 ap 基因已整合至 GS115 基因组中，获得成功表达。

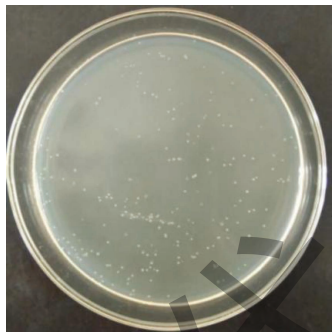


图 3 在 MD 平板上生长的毕赤酵母转化子

Fig.3 *P. pastoris* transformants grown on MD plates



图 4 重组毕赤酵母工程菌株产生的水解圈图

Fig.4 Hydrolysis zone produced by recombinant

*P. pastoris* engineering strain

将重组表达载体 pICH/ap 电转入 GS115 菌株后，在 MD 平板上约长出 200 多个转化子（见图 3）；转化子转接至 MM 牛奶平板上培养观察可见，大多

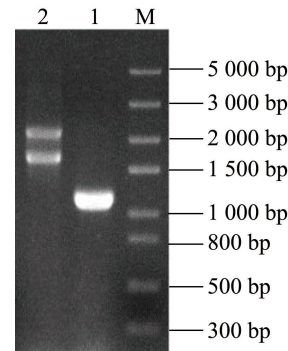


图 5 重组毕赤酵母 GS115 基因组 PCR 产物鉴定结果

Fig.5 Genomic PCR identification of recombinant

*P. pastoris* GS115

注：M：DNA marker；1：引物 P1 和引物 P2 的 PCR 产物；2：引物 5'AOX 和引物 3'AOX 的 PCR 产物。

将重组毕赤酵母在三角瓶中进行诱导表达时，在 500 mL 三角瓶中诱导 144 h 时，发酵液的蛋白酶活性最高为 21.50 U/mL，重组 *P. pastoris* 在

96 h 时湿重最重约为 29.00 g/L 左右, 而后基本保持恒定。Dou 等<sup>[22]</sup>从 *T. asperellum* 中克隆了一个天冬氨酸蛋白酶基因 Asp55, 并在 *Escherichia coli* BL21 中表达, 获得重组 Asp55 最高酶活才为 9.52 U/mL, 这表明本文获得的 rAp 表达量高, 为其应用研究提供了来源保障, 并且 *P. pastoris* 表达系统属于真核表达系统, 可能更适合霉菌蛋白酶的异源表达。

### 2.3 rAp的纯化结果

将发酵上清液经切向流膜系统(膜包分别为 50.00 ku 和 10.00 ku) 浓缩后, 盐析、超滤浓缩, 再通过 Sephadex G-75 纯化后, 其 SDS-PAGE 电泳结果见图 6。基于相对迁移率与分子质量的关系<sup>[23]</sup>, 推算图 3 泳道 3、4 中的单一蛋白条带分子量约为 32.00~34.00 ku 之间, 与 rAp 大小基本一致。由此可见, 该单一蛋白条带为 rAp。

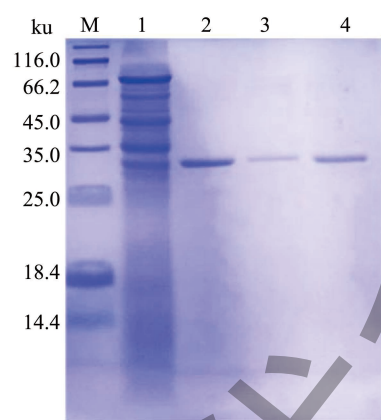


图 6 纯化 rAp 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.6 SDS-PAGE analysis of the purified rAp

注: M: 蛋白质 markers; 1: 粗酶液; 2: 盐析超滤浓缩; 3、4: Sephadex G75 柱层析纯化。

### 2.4 rAp的生化特性结果

#### 2.4.1 温度和pH值对rAp活性和稳定性的影响结果

温度和 pH 值对 rAp 活性和稳定性的影响结果见图 7。由图 7a 和 7b 可见, rAp 最适反应温度为 55 °C。在热稳定性方面, 低于 40 °C 时情况下, 120 min 后相对酶活为 100% 几乎保持不变; 45 °C 保温 120 min 后, 残留的相对活性有 84.65%, 高于 55 °C 保温 20 min 后, 酶几乎完全失活。由此可见, rAp 在高于 40 °C 以上热稳定性降低, 该性质与来源于其他霉菌(如 *Rhizopus oryzae*<sup>[24]</sup>、*Talaromyces leycettanus*<sup>[25]</sup>) 的酸性蛋白酶基本一致。

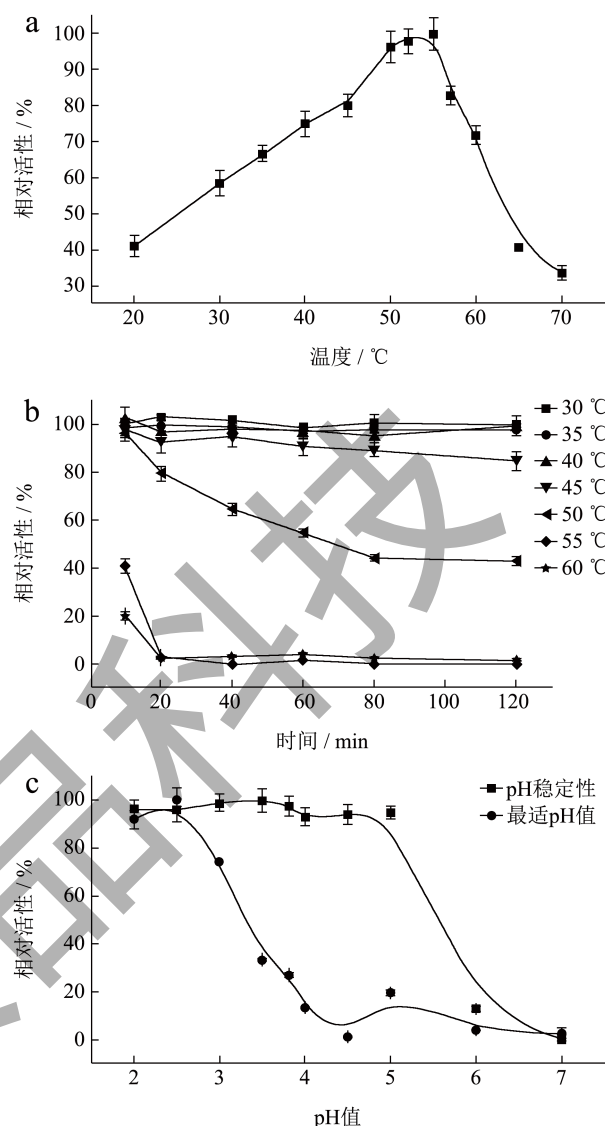


图 7 温度和 pH 值对 rAp 的活性和稳定性的影响

Fig.7 Effects of temperature and pH value on activity and stability of rAp

注: (a) 温度对 rAp 活性的影响; (b) 温度对 rAp 稳定性的影响; (c) pH 值对 rAp 的活性及稳定性影响。

由图 7c 可见, rAp 最适反应 pH 值 2.50, 反应 pH 值为 2.00 仍具有 96.47% 相对活性。在 pH 值稳定性上, 将 rAp 放置于不同 pH 缓冲液 24 h 后, pH 值 2.00~5.00 之间保持 90.00% 以上相对活性, pH 值高于 5.00 后稳定性下降, pH 值 7.00 几乎完全失活。在大多数酸性蛋白酶中 pH 值小于 3.00 后, 最适合 pH 值和 pH 稳定性的相对活性都会急剧下降, 如 *T. leycettanus* 中的一种酸性蛋白酶最适合 pH 值 3.00, 反应 pH 值于 2.50 和 2.00 时相对活性分别下降了约 35.00% 和 75.00%, 而 pH 值为 2.0 时该酶失去活性, 无稳定性<sup>[25]</sup>; 相比较而言, rAp 更具有耐酸性、

适应酸性环境,其结构机理有待于进一步研究。

#### 2.4.2 金属离子与抑制剂对rAp活性的影响

不同金属离子和抑制剂对 rAp 活性的影响结果见表 1。Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 金属离子对 rAp 的活性影响不大。这与金属蛋白酶不同,二价金属或者一价金属离子(K<sup>+</sup>和Na<sup>+</sup>)通常对天冬氨酸蛋白酶没有影响,如米曲霉天冬氨酸蛋白酶,其活性不受Ca<sup>2+</sup>的影响,仅受Zn<sup>2+</sup>和Cu<sup>2+</sup>的轻微影响<sup>[24]</sup>,黑曲霉 BCRC 32720 菌株产生的蛋白酶也有类似结果<sup>[26]</sup>。在本研究中,Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>显著提高 rAp 活性,而Fe<sup>2+</sup>和Fe<sup>3+</sup>显著抑制 rAp 活性,这可能是由于这几种金属离子对 rAp 三级结构稳定性的影响所致,该结果同 *T. leycettanus* JCM12802 菌株产生的天冬氨酸蛋白酶性质相似<sup>[25]</sup>。

rAp 能被 Pepstantin 显著抑制,而 PMSF、Aprotinin、Leupeptin 和 EDTA 对活性影响不显著,这表明 rAp 属于天冬氨酸蛋白酶,与其氨基酸序列预测的结果一致。表面活性剂 SDS 和表面活性剂 Triton X-100 对 rAp 具有显著抑制作用,当 SDS 质量分数为 0.50% 时,rAp 仅残留了 2.60% 活性。

#### 2.5 rAp对大豆分离蛋白的水解作用

rAp 和胃蛋白酶对大豆分离蛋白水解后,水解产物 SDS-PAGE 电泳见图 5。图 5 可见,水解 5 min,大豆分离蛋白的  $\beta$ - 伴大豆球蛋白( $\alpha'$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$  亚基)和球蛋白(A、B 亚基)均被水解;胃蛋白酶水解产物中生成约 35.00、25.00 ku 左右的多条新条带;而

rAp 水解产物中未见明显条带,仅在 18.40 ku 条带产生较粗的弥散条带。随着水解时间延长,两种酶水解产物中蛋白条带逐步降解甚至消失,最后只有弥散小于 14.40 ku 条带,rAp 水解产物中弥散条带未有胃蛋白酶的浓和粗。图 5 电泳表示的结果与水解产物中蛋白含量一致(即大豆分离蛋白水解 0、5、60、180 和 360 min,胃蛋白酶水解产物中蛋白质相对含量分别为 100.00%、71.97%、52.89%、27.07% 和 14.67%,rAp 水解产物中蛋白质相对含量分别为 100.00%、47.98%、13.06%、11.16% 和 3.64%)。对大豆分离蛋白水解产物中抗原性测定结果表明,胃蛋白酶水解后  $\beta$ - 伴大豆球蛋白和球蛋白的抗原性分别下降了 26.11% 和 15.63%,而 rAp 水解后抗原性分别下降了 30.01% 和 22.37%。

大豆蛋白抗原性主要是由构象型抗原表位和序列型抗原表位共同决定<sup>[27]</sup>,蛋白酶对大豆蛋白的酶解作用破坏和酶切这两种抗原表位,从而降低了大豆蛋白抗原性。木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶<sup>[28]</sup>对大豆蛋白水解不彻底,产生新的抗蛋白酶水解肽。本实验中,rAp 和胃蛋白酶水解 360 min 后,未见明显抗酶解蛋白质条带,这表明这两种蛋白酶对大豆分离蛋白具有较强水解能力。虽然 rAp 和胃蛋白酶水解产物未见明显蛋白条带,仍含较高抗原性,这可能是由于这两种酶将大豆分离蛋白的降解为小于 14.40 ku 的肽链后,这些肽链中含有序列型抗原表位(一般为十几个或者几十个氨基酸构成)<sup>[27]</sup>,导致水解产物中仍含有抗原性。

表 1 金属离子及化学试剂对rAp活性的影响

Table 1 Effects of metal ion and chemical reagent on activity of rAp

金属离子	浓度/(mmol/L)	相对活性/%	试剂	浓度	相对活性/%
None	5.00	100.00 ± 4.65 <sup>a</sup>	Aprotinin	0.10 μg/mL	104.91 ± 2.93 <sup>a</sup>
Mn <sup>2+</sup>	5.00	117.44 ± 3.46 <sup>b</sup>	Aprotinin	2.00 μg/mL	92.66 ± 5.56 <sup>c</sup>
Cu <sup>2+</sup>	5.00	116.21 ± 8.13 <sup>b</sup>	Leupeptin	0.50 μg/mL	102.43 ± 2.72 <sup>a</sup>
Ni <sup>2+</sup>	5.00	113.79 ± 6.74 <sup>b</sup>	PMSF	1.00 mmol/L	98.89 ± 4.48 <sup>a</sup>
Zn <sup>2+</sup>	5.00	101.59 ± 3.54 <sup>a</sup>	Pepstantin	3.00 μmol/L	66.60 ± 2.82 <sup>e</sup>
Na <sup>+</sup>	5.00	100.35 ± 4.28 <sup>a</sup>	EDTA	1.00 mmol/L	103.86 ± 3.78 <sup>a</sup>
K <sup>+</sup>	5.00	99.18 ± 4.54 <sup>a</sup>	EDTA	5.00 mmol/L	95.79 ± 4.64 <sup>c</sup>
Ca <sup>2+</sup>	5.00	98.35 ± 2.41 <sup>a</sup>	TritonX-100	1.00%(m/V)	97.30 ± 3.88 <sup>e</sup>
Mg <sup>2+</sup>	5.00	95.29 ± 4.54 <sup>c</sup>	TritonX-100	5.00%(m/V)	13.19 ± 1.32 <sup>g</sup>
Fe <sup>3+</sup>	5.00	79.26 ± 2.49 <sup>d</sup>	SDS	0.10%(m/V)	41.39 ± 1.51 <sup>f</sup>
Fe <sup>2+</sup>	5.00	78.02 ± 3.24 <sup>d</sup>	SDS	0.50%(m/V)	2.60 ± 0.18 <sup>h</sup>

注:相对酶活的上标 a、b、c 等小写字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ),相同的小写字母表示组内差异不显著 ( $P > 0.05$ )。



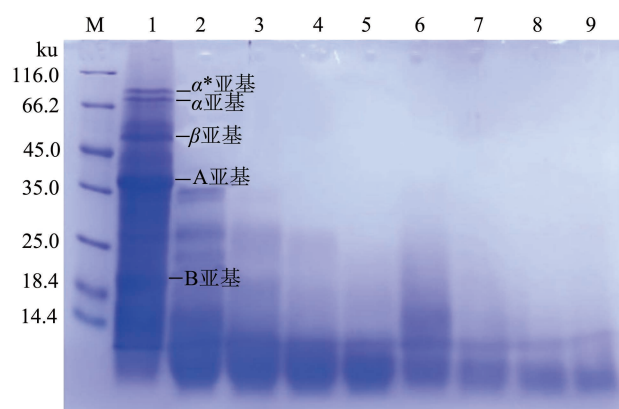


图8 rAp 和胃蛋白对大豆分离蛋白的水解产物电泳图

Fig.8 SDS-PAGE analysis of SPI hydrolysates at different hydrolysis time by rAp and pepsin

注: M: 蛋白质 markers; 1: 水解 0 min 的大豆分离蛋白; 2~5: 胃蛋白酶分别水解 5、60、180 和 360 min 的水解产物; 6~9: rAp 分别水解 5、60、180 和 360 min 的水解产物。

### 3 结论

本文采用 RT-PCR 获得哈茨木霉 *ap* 基因, 电转入毕赤酵母 GS115 菌株获得高效表达, 进一步对 rAp 分离纯化和性质测定。结果表明 rAp 为天冬氨酸类蛋白酶, 最适反应温度和最适合 pH 值分别为 55 °C 和 2.50; 在低于 40 °C、pH 值 2.00~5.00 环境中, 酶结构稳定、相对活性保持在 90.00% 以上;  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  能提高酶活, 而  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$ 、SDS 和 Trion X-100 显著抑制其活性。rAp 对大豆分离蛋白水解后, 水产产物中  $\beta$ - 伴大豆球蛋白和球蛋白的抗原性分别下降 30.01% 和 22.37%。这表明 rAp 具有较强地降低大豆分离蛋白抗原性能力, 对大豆分离蛋白的深加工具有开发潜力。

### 参考文献

- [1] 董斯琳, 姚桐桐, 谢琳淼, 等. 哈茨木霉对镉胁迫下草地早熟禾的促生和增抗效应及其生理机制[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(9): 2046-2053.
- [2] 扈进冬, 杨在东, 吴远征, 等. 哈茨木霉拌种对冬小麦生长、土传病害及根际真菌群落的影响[J]. 植物保护, 2021, 47(5): 35-40.
- [3] SÁNCHEZ-ESPINOSA A C, VILLARRUEL-ORDAZ J L, MALDONADO-BONILLA L D. Mycoparasitic antagonism of a *Trichoderma harzianum* strain isolated from banana plants in Oaxaca, Mexico X1-Antagonismo micoparasítico de una cepa de *Trichoderma harzianum* aislada de plantas de plátano en Oaxaca, México [J]. Biotecnica, 2021, 23(1): 127-134.
- [4] CEIRO-CATASU W G, VEGA-GONZALEZ Y, TACO-

SANCHEZ M E, et al. Antagonism of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on isolates of *Fusarium* spp. from *Nicotiana tabacum* [J]. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, 2021, 38(4): 867-886.

- [5] 罗梅, 陈欣瑜, 董章勇. 全基因组预测哈茨木霉的效应子[J]. 西南农业学报, 2020, 33(9): 1964-1968.
- [6] 宋以梅, 刘晶晶, 高翠娟. 哈茨木霉生物降解木质纤维素研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2021, 52(5): 886-892.
- [7] 卢庆华, 江梦宇, 寇冠, 等.  $\text{Ce}^{3+}$  对哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)产漆酶影响的机制研究[J]. 中国稀土学报, 2018, 36(4): 498-503.
- [8] MEZADRI E T, KUHN K R, SCHMALTZ S, et al. Evaluation of ultrasound waves for the production of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase by *Trichoderma harzianum* through SSF [J]. 3 Biotech, 2022, 12(5): 1-9.
- [9] SHARMA V S R, SHARMA P. Differential response of extracellular proteases of *Trichoderma harzianum* against fungal phytopathogens [J]. Current Microbiology, 2016, 73(3): 419-425.
- [10] AISSAOUI NCJ-M, HAERTLÉ T, MARZOUKI M N, et al. Purification and biochemical characterization of a neutral serine protease from *Trichoderma harzianum*. Use in antibacterial peptide production from a fish by-product hydrolysate [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 182(2): 831-845.
- [11] FAN H J, LIU Z H, ZHANG R S, et al. Functional analysis of a subtilisin-like serine protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* [J]. Journal of Microbiology, 2014, 52(2): 129-138.
- [12] LIU Y, YANG Q, SONG J Z. A new serine protease gene from *Trichoderma harzianum* is expressed in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2009, 45(1): 22-26.
- [13] YAN L, QIAN Y. Cloning and heterologous expression of aspartic protease SA76 related to biocontrol in *Trichoderma harzianum* [J]. Fems Microbiology Letters, 2007, 277(2): 173-181.
- [14] SUÁREZ M B, SANZ L, CHAMORRO M I, et al. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*: Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(11): 924-934.
- [15] SAMOLSKI I, DE LUIS A, VIZCAINO J A, et al. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray [J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 217.
- [16] SZABO M, URBAN P, VIRANYI F, et al. Comparative

- gene expression profiles of *Trichoderma harzianum* proteases during *in vitro* nematode egg-parasitism [J]. *Biological Control*, 2013, 67(3): 337-343.
- [17] 邓涵,祖琴琴,朱杰瑞,等.超声处理对大豆7S蛋白潜在致敏性的影响[J].*食品科学*,2017,38(5):32-37.
- [18] BU G H, HUANG T, LI T H. The separation and identification of the residual antigenic fragments in soy protein hydrolysates [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(3): e131444.
- [19] HUANG T, BU G H, CHEN F S. The influence of composite enzymatic hydrolysis on the antigenicity of  $\beta$ -conglycinin in soy protein hydrolysates [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2018, 42(5): e12544.
- [20] KE Y, WEI M Y, FU Y T, et al. Enzymatic characteristics of a recombinant protease (rPepD) from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2019, 162: 67-71.
- [21] 陈均辉,李俊.生物化学实验(第五版) [M].北京:科学出版社,2016.
- [22] DOU K, WANG Z, ZHANG R, et al. Cloning and characteristic analysis of a novel aspartic protease gene Asp55 from *Trichoderma asperellum* ACCC30536 [J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(12): 915-923.
- [23] TRIPATHI P, TOMAR R, JAGANNADHAM M V. Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin [J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(3): 1005-1012.
- [24] HSIAO N W, CHEN Y, KUAN Y C, et al. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2014, 17(2): 89-94.
- [25] GUO Y, TU T, YUAN P, et al. High-level expression and characterization of a novel aspartic protease from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and its potential application in juice clarification [J]. *Food Chemistry*, 2019, 281: 197-203.
- [26] YIN L J, HSU T H, JIANG S T. Characterization of Acidic Protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(3): 662-666.
- [27] 王章存,袁路阳,张露,等.酶解大豆分离蛋白的抗原活性变化及其抗原表位分析[J].*食品科学*,2019,40(10):64-69.
- [28] 王章存,贺志铮,章银良,等.不同酶解方式对豆粕大豆蛋白组分和抗原活性的影响[J].*食品研究与开发*,2022, 43(4):17-21.