

# 烟曲霉脯氨酰内肽酶在巴斯德毕赤酵母中的 分泌表达与重组酶性质

李宁环<sup>1</sup> 仝征<sup>1</sup> 沈微<sup>1</sup> 陈献忠<sup>1</sup> 樊游<sup>1</sup> SINGH Suren<sup>2</sup> 王正祥<sup>1\*</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 生物工程学院 生物资源与  
生物能源研究中心 江苏 无锡 214122)

(2. Department of Biotechnology and Food Technology, Durban University of Technology,  
Durban 4001, South Africa)

**摘要:** 【目的】研究烟曲霉脯氨酰内肽酶 cDNA 基因的异源表达及重组酶性质。【方法】以烟曲霉 CICIM F0044 总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA; 再以 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增去除自身信号肽的脯氨酰内肽酶基因, 构建表达载体 pPIC9K-PEP; 电转化酵母宿主菌 *Pichia pastoris* GS115, 获得重组菌 PEP-09; 纯化并分析重组酶性质。【结果】重组菌摇瓶发酵酶活力最高可达 647.3 U/L。表达产物纯化后的分子量为 63 kD 左右。重组酶最适反应温度为 65 °C, 有较好的温度稳定性, 在 55 °C 保温 8 h 能保留 90% 以上的酶活力。该酶最适 pH 为 5.5, 在 pH 3.0–9.0 范围内有很好稳定性, 在 pH 6.0–8.0 的缓冲液中 37 °C 保温 10 d 酶活没有明显变化。【结论】烟曲霉脯氨酰内肽酶 cDNA 基因在巴斯德毕赤酵母中实现了分泌表达, 重组酶活性稳定, 有一定的应用潜力。

**关键词:** 烟曲霉, 脯氨酰内肽酶, 诱导表达, 酶学性质

基金项目: 科技部国际科技合作项目(No. 2009DFA31300); 国家自然科学基金项目(No. 21006039); 111 引智计划项目(No. 111-2-06)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918121; 信箱: zxwang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2012-05-07; 接受日期: 2012-06-26

# Secreted expression of prolyl endopeptidase from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme

LI Ning-Huan<sup>1</sup> TONG Zheng<sup>1</sup> SHEN Wei<sup>1</sup> CHEN Xian-Zhong<sup>1</sup>  
FAN You<sup>1</sup> SINGH Suren<sup>2</sup> WANG Zheng-Xiang<sup>1\*</sup>

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and Research Center of Biore-source & Bioenergy, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Department of Biotechnology and Food Technology, Durban University of Technology, Durban 4001, South Africa)

**Abstract:** [Objective] The study aims to heterologously express *Aspergillus fumigatus* prolyl endopeptidase cDNA and to characterize the recombinant enzyme. [Methods] The cDNA from *A. fumigatus* CICIM F0044 was obtained by reverse transcription using the total RNA as the template. The PEP gene that encodes the mature prolyl endopeptidase was amplified using polymerase chain reaction with the cDNA as the template. The recombinant expression vector pPIC9K-PEP was constructed by inserting the PEP gene into pPIC9K, which was then transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The resulting recombinant enzyme was purified and characterized. [Results] A maximum yield of 647.3 U/L enzyme activity was obtained from the recombinant yeast. The molecular weight of the purified recombinant enzyme was approximately 63 kD. The optimal reaction temperature of the recombinant enzyme was 65 °C. The enzyme is highly thermostable, retaining 90% of enzyme activity after 8 h of exposure to temperatures 55 °C. The recombinant enzyme exhibited an optimal reaction pH of 5.5 and its activity was highly stable from pH 3.0 to 9.0. No decrease in enzyme activity was observed after 10 days of exposure to pH ranging from 6.0 to 8.0 at 37 °C. [Conclusion] The *A. fumigatus* prolyl endopeptidase cDNA was expressed in *P. pastoris*. The activity of the recombinant enzyme was stable, which indicates that the recombinant yeast has potential value in industrial applications.

**Keywords:** *Aspergillus fumigatus*, Prolyl endopeptidase, Inducible expression, Enzymatic properties

脯氨酰内肽酶(Prolyl endopeptidase, PEP, EC 3.4.21.26)是一种能特异性水解小分子多肽中脯氨酸羧基端肽键的丝氨酸蛋白酶<sup>[1]</sup>。它能有效降解生物体内富含脯氨酸的生物活性肽,如催产

素、促甲状腺激素释放素等,这些活性肽含量的高低与 PEP 的活性升降有关<sup>[2-3]</sup>。在食品与发酵工业,脯氨酰内肽酶可能是一种有价值的酶类,如能通过水解啤酒中富含脯氨酸的蛋白多肽,阻

止其与多酚类物质形成大聚合物浑浊沉淀, 从而提高啤酒的非生物稳定性<sup>[4]</sup>。2005年, Enens等<sup>[5]</sup>证明了该酶在蛋白水解物中的去苦味作用。此外, 鉴于PEP的特异性, 该酶还有可能作为一种分子生物学的工具酶, 用于蛋白质序列测定、特异位点的酶切、肽段的修饰和加工等<sup>[3,6]</sup>。

PEP既存在于细菌、真菌中, 也存在于植物以及动物组织中。在哺乳动物的组织中分布较广, 其中脑部中的PEP含量相对其它组织较高<sup>[7-8]</sup>。尽管PEP在原核生物和真核生物中均有分布, 但在生物体内含量很低, 分离纯化困难<sup>[9]</sup>, 因而限制了对其生理功能和性质的研究。国外已经从脑膜炎脓毒黄杆菌(*Flavobacterium meningosepticum*)<sup>[10-11]</sup>、嗜水气假单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)<sup>[12]</sup>、猪脑<sup>[13]</sup>cDNA库、人淋巴细胞<sup>[14]</sup>以及黑曲霉(*Aspergillus niger*)<sup>[5]</sup>中克隆了脯氨酰内肽酶基因。国内李民等<sup>[15]</sup>也从点状产气单胞菌中克隆了脯氨酰内肽酶基因并在大肠杆菌中进行了表达研究, 路福平等<sup>[16-17]</sup>从黑曲霉中克隆出脯氨酰内肽酶基因, 并实现了其在大肠杆菌及巴斯德毕赤酵母中的表达。2010年底, Sriranganadane等<sup>[18]</sup>运用蛋白质组学等技术, 首次发现了存在于烟曲霉胞外分泌蛋白中的脯氨酰内肽酶, 但没有对其基本酶学性质进行研究。

本文克隆了烟曲霉脯氨酰内肽酶cDNA基因, 并在巴斯德毕赤酵母中实现了异源分泌表达, 研究分析了重组酶的酶学性质, 为脯氨酰内肽酶的工业应用奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

烟曲霉CICIM F0044和大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109为江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心(CICIM-CU)保藏。巴斯德毕赤酵母表达载体pPIC9K以及表达宿主菌巴斯德毕赤酵

母GS115为Invitrogen公司产品。

### 1.2 酶和主要试剂

核酸内切酶、连接酶、碱性磷酸酶(CIAP)等分子克隆工具酶均为大连宝生物工程公司产品; UNIQ-10柱式总RNA抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司; G418为Invitrogen公司产品; PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; Amicon Ultra-15 centrifugal filter为Millipore公司产品; Hiprep™ Phenyl FF (high sub)为GE Healthcare公司产品; 酶特异性底物Ala-Ala-Pro-pNA (pNA为对硝基苯胺)由吉尔生化(上海)有限公司合成; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.3 主要培养基

(1) MD培养基: 1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ %生物素, 2%葡萄糖。

(2) BMGY培养基: 1%酵母浸出物, 2%蛋白胨, 100 mmol/L pH 6.0 磷酸钾, 1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ %生物素, 1%甘油。

(3) BMMY培养基: 1%酵母浸出物, 2%蛋白胨, 100 mmol/L pH 6.0 磷酸钾, 1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ %生物素, 1%甲醇。

### 1.4 RNA的提取

用RNA抽提试剂盒提取烟曲霉总RNA, 具体方法见产品说明书。

### 1.5 基因的PCR扩增

根据烟曲霉脯氨酰内肽酶基因序列设计一对引物: P1: 5'-AATTGAATTCCTCATGCCAGG GCGCCTTT-3'; P2: 5'-AATTGAATTCTCATGGC TTCCTATATTTGGG-3'。以提取的烟曲霉总RNA为模板, 先反转录合成cDNA; 再以该cDNA为模板, 以P1、P2为上下游引物, 进行PCR扩增得到不含自身信号肽的烟曲霉脯氨酰内肽酶基因cDNA片段。PCR扩增条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共30个循

环; 72 °C 10 min。

### 1.6 表达载体的构建及序列测定

将质粒 pPIC9K 用 *EcoR* I 酶切, CIAP 去磷酸化处理进一步纯化后与经 *EcoR* I 酶切纯化的 PCR 产物连接, 转化大肠杆菌 JM109, 在含氨苄青霉素的 LB 培养基上筛选转化子, 转化子提取质粒进一步进行酶切验证, 获得重组质粒 pPIC9K-PEP。经酶切验证的转化子送上海生物工程公司测序。

### 1.7 重组巴斯德毕赤酵母的构建

重组质粒 pPIC9K-PEP 及空载体 pPIC9K, 分别用 *Sal* I 酶切线性化, 按 Invitrogen 公司说明书中的电转化法转化巴斯德毕赤酵母 GS115, 转化液涂布不含组氨酸的 MD 平板, 30 °C 恒温培养 2–4 d, 形成单菌落。随机挑选单菌落分别相对应地点种 MD、MM 平板以及含 3 g/L G418 的 YPD 平板, 30 °C 恒温培养 2–3 d。根据 Invitrogen 公司产品说明书, 在 MD 上正常生长而在 MM 上生长缓慢的重组酵母转化子可能为 Mut<sup>s</sup> 型酵母重组子; 在 MD 和 MM 上均能正常生长的为 Mut<sup>r</sup> 型酵母转化子; 在含 3 g/L G418 平板上生长的转化子可能是高拷贝转化子。随机挑选 10 个在 3 g/L G418-YPD 平板上正常生长的重组酵母转化子, 以空载体 pPIC9K 转化获得的重组酵母 *P. pastoris* GS115/pPIC9K 为对照, 30 °C、200 r/min 摇瓶发酵 5 d, 取上清液检测酶活, 其中酶活相对最高的一株转化子命名为 PEP-09, 该菌株用于后续实验。

### 1.8 重组毕赤酵母的诱导表达

挑取重组酵母 PEP-09 单菌落, 接种到 30 mL BMGY 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h, 发酵液细胞密度( $OD_{600}$ )达到 13–14 时, 离心去上清, 用 30 mL BMMY 培养基悬浮酵母细胞, 30 °C、200 r/min 继续培养 5–7 d, 每 24 h 补加甲醇至终浓度为 1%, 根据需要定时取样离心收集上清。

### 1.9 重组蛋白的纯化

将 300 mL 发酵上清液采用 Amicon Ultra-15 centrifugal filter 超滤管浓缩至 10 mL。浓缩液上 Phenyl FF (high sub) 柱进行分离。具体纯化过程可参照 GE Healthcare 说明书。纯化后的酶液用 SDS-PAGE 检测, 并用于酶学性质的研究。

### 1.10 酶活力测定方法

特异性底物法检测脯氨酰内肽酶酶活<sup>[4,9,24]</sup>: 采用特异性底物 Ala-Ala-Pro-pNA (5 mmol/L) 测定重组酵母发酵上清液中的酶活, 测定时空载体重组酵母发酵上清液为空白对照。酶活单位定义: 在相应条件下, 每分钟释放 1  $\mu$ mol pNA 所需要的酶量, 即 1 个酶活力单位, 以 1 U 表示。具体测定方法如下: 取 500  $\mu$ L 0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.0)加入 200  $\mu$ L 底物溶液和 100  $\mu$ L 发酵液样品。37 °C 反应 10 min, 加 200  $\mu$ L 冰醋酸终止反应。测定其在 410 nm 处的吸光度值。

### 1.11 酶学性质的测定

**1.11.1 最适反应温度及温度稳定性:** 将酶液稀释适当倍数, 分别在 35 °C–85 °C (间隔 5 °C) 条件下检测酶活。以最高酶活力为 100% 计算相对酶活确定酶的最适反应温度。将经过适当稀释后的酶液, 取 1 mL 分别于 45 °C、55 °C、60 °C、65 °C 和 75 °C 保温 8 h, 在 0.5、1、2、3、5 和 8 h 时间点取样, 立即放入冰盒中冰浴 30 min, 最后统一相同条件下测酶活, 以未进行热处理的样品酶活力为 100% 计算相对酶活以研究酶的热稳定性。

**1.11.2 最适反应 pH 及 pH 稳定性:** 分别配制 pH 2.2、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 的缓冲液, 测定酶在不同缓冲液中的酶活力, 以最高酶活为 100% 计算相对酶活。将发酵液分别用 pH 2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的缓冲液稀释适当倍数,

于 37 °C 分别放置 5 d 和 10 d 之后统一条件测酶活。以没有进行处理酶液的酶活力为 100%，考察重组酶的 pH 稳定性。

**1.11.3 金属离子及 EDTA 对酶活性的影响:** 在相同的反应体系中，加入不同金属离子或 EDTA，至终浓度分别为 1 mmol/L 和 5 mmol/L。分别测定酶活力，以未添加任何金属离子的反应体系测得的酶活力为 100% 计算相对酶活力，比较不同金属离子或 EDTA 对酶活力的影响。对于有颜色的金属离子如  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  等，要做相应的对照，对照中以空载体重组酵母上清液代替酶液，其余均相同，排除或减轻离子颜色(尤其是  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ )对实验结果的干扰。

## 2 结果

### 2.1 重组表达载体 pPIC9K-PEP 的构建及转化子的验证

以提取的烟曲霉总 RNA 为模板，反转录合成 cDNA；再以该 cDNA 为模板，P1、P2 为引物，PCR 扩增得到约 1.5 kb 长度的 PCR 产物，与已报道的去除信号肽的烟曲霉脯氨酰内肽酶基因

PEP 大小一致。将该片段与巴斯德毕赤酵母表达载体 pPIC9K 连接，构建重组表达载体 pPIC9K-PEP (图 1A)。转化子提取质粒用限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Xba* I 双酶切。电泳结果显示重组质粒酶切后得到 1.2 kb 及 9.6 kb 的两个片段 (图 1B)，符合 PEP 编码基因在表达载体中以正确方向插入时应有的特征。上述转化子测序结果显示，重组质粒在 *Eco*R I 位点准确插入了 PEP 结构基因，插入片段序列与报道的来源于烟曲霉的脯氨酰内肽酶基因 cDNA 序列一致，不含信号肽和内含子。

### 2.2 重组酵母的构建及其表型的鉴定、重组子的筛选

将重组载体 pPIC9K-PEP 及空载体 pPIC9K 以 *Sal* I 酶切线性化后分别转化巴斯德毕赤酵母 GS115，在不含组氨酸的 MD 培养基上筛选转化子。结果显示(图 2A): MD 和 MM 培养基上相对应的转化子都能正常生长，表明重组子均为  $\text{Mut}^+$ 。在含 3 g/L G418 的 YPD 培养基上随机挑选 10 个能正常生长的酵母重组子(图 2B)，以空载体转化获得的重组酵母 *P. pastoris* GS115/pPIC9K

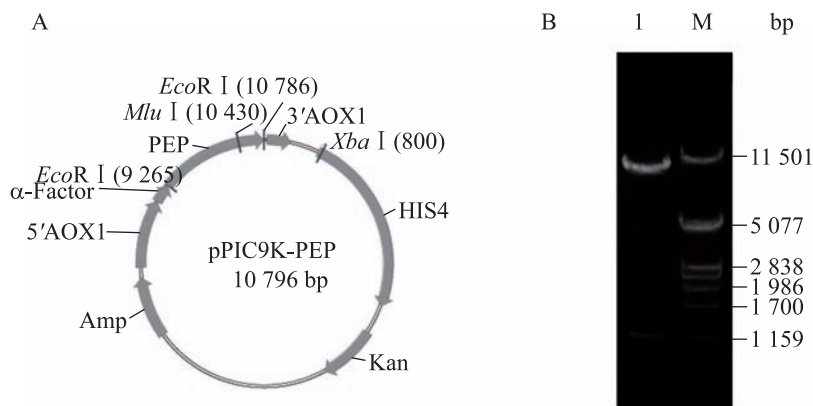


图 1 重组质粒 pPIC9K-PEP 的酶切验证

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant plasmid pPIC9K-PEP

注: A: 重组质粒的结构示意图; B: 重组质粒的酶切验证. 1: pPIC9K-PEP/*Mlu* I+*Xba* I; M: DNA marker.

Note: A: Construction of recombinant plasmid; B: Restriction analysis of recombinant plasmid. 1: Digestion of pPIC9K-PEP by *Mlu* I+*Xba* I; M: DNA marker.

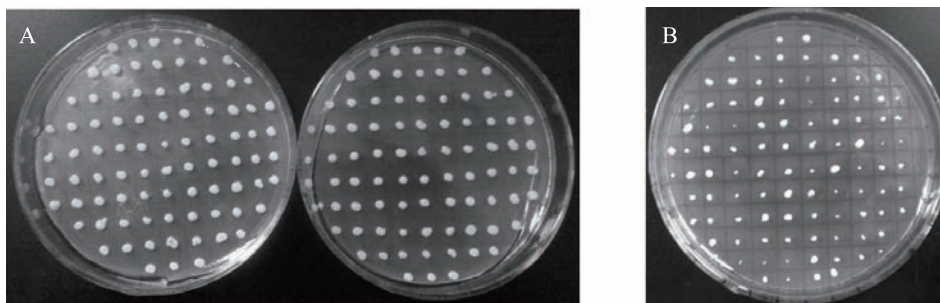


图2 重组酵母转化子表型鉴定及其 G418 抗性筛选

Fig. 2 Phenotypic identification of positive transformants and its screening by G418

注: A: MD/MM 培养基鉴定重组子表型: 左边为 MD 培养基, 右边为 MM 培养基; B: G418 抗性筛选。

Note: A: Phenotypic identification of yeast transformants by MD/MM plate: the left is MD plate, the right is MM plate; B: Screening of positive transformants through G418.

作为对照, 摇瓶发酵, 检测上清液酶活。结果显示对照组转化子上清液均没有酶活。重组质粒 pPIC9K-PEP 的 10 个转化子中有 2 个没有酶活, 其余 8 个重组子均有明显酶活。其中酶活最高的转化子命名为 PEP-09, 用于后续实验。

### 2.3 重组酶的纯化与 SDS-PAGE 分析

取诱导后的发酵上清液, 按 1.9 中的方法进行纯化, SDS-PAGE 蛋白电泳结果如图 3 所示, 在 63 kD 左右显示单一条带, 说明纯化产物为电泳纯的脯氨酰内肽酶。纯化得率为 68%, 纯化产物比酶活约为 4.7 U/mg, 纯化倍数为 2。显示的条带大小与国外报道的预测理论分子大小 55 kD 相比偏大, 可能是由于宿主细胞对表达的目的蛋白进行了糖基化修饰。

### 2.4 重组酵母的诱导表达曲线

将重组菌 PEP-09 接种 BMGY/BMMY 培养基中, 摇瓶发酵 7 d, 分别在 24、48、60、72、84、96、108、120、132、144、156 和 168 h 取样, 特异性底物法(Ala-Ala-Pro-pNA)测上清液酶活。结果如图 4 所示, 诱导 24 h 之内, 重组酵母分泌 PEP 较少, 可能是由于这一阶段酵母细胞正处于由甘油代谢到甲醇代谢途径的转换期。随着诱导时间的延长, 发酵液中 PEP 的活力呈现稳步上升

趋势。与很多重组酶不同, 该重组的 PEP 诱导发酵到第 132 h 时, PEP 活力不再显著增加, 而是逐渐趋于稳定, 直至诱导第 7 天后也仍然没有表现出活力下降的趋势。这可能是发酵液中的 PEP 对酵母本身分泌表达的一些蛋白酶不敏感的表现, 也可能是蛋白酶降解与诱导产酶分别导致酶活

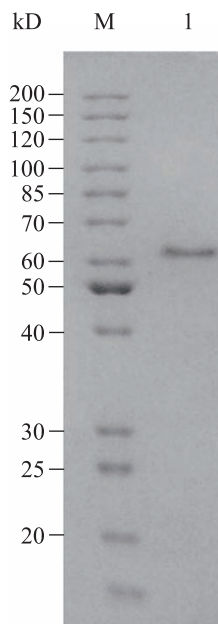


图3 重组 PEP 纯化后的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant PEP

注: M: 蛋白 Marker; 1: 纯化后的 PEP.

Note: M: Protein marker; 1: Purified PEP.

消和长的总结果所致。为此, 将摇瓶发酵 5 d 的含 PEP 的发酵上清液与同批发酵的空载体酵母发酵液以适当比例混匀后继续摇瓶培养 36 h, 测定该段期间 PEP 活性变化。结果表明, 该段期间 PEP 活性基本保持稳定, 没有下降趋势, 这表明本文获得的重组 PEP 对巴斯德毕赤酵母分泌的蛋白酶不敏感。

## 2.5 重组酶的酶学性质

**2.5.1 最适温度:** 由图 5 可知: 在 35 °C–65 °C 时, 重组酶的酶活随着温度的升高而升高, 到 65 °C 时酶活达到最大, 70 °C 之后酶活急剧下降, 80 °C 时酶活降至 26%, 85 °C 时酶活已低于 20%。

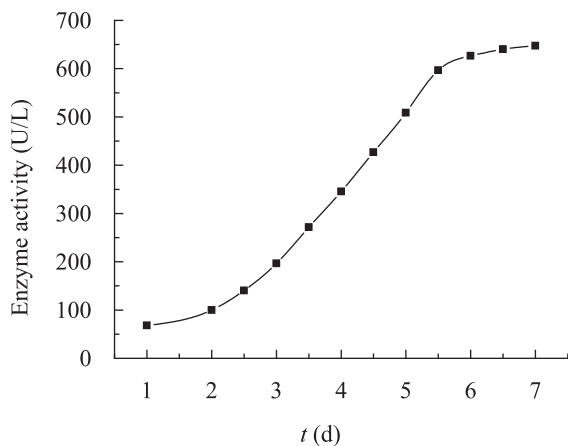


图 4 发酵过程中重组 PEP 酶活随诱导时间的变化图  
Fig. 4 Enzyme activity of the recombinant PEP varied as induced time during fermentation

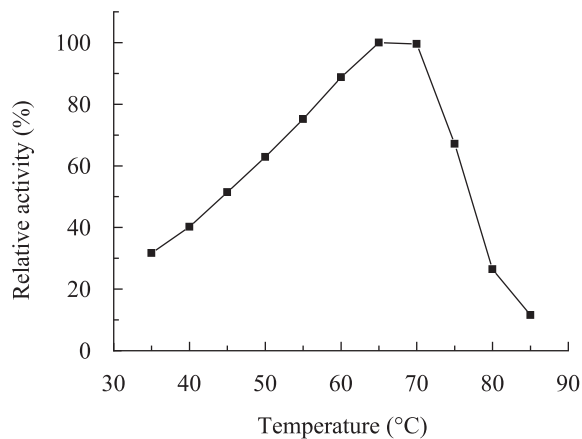


图 5 重组酶的最适温度  
Fig. 5 Optimal temperature of recombinant enzyme

**2.5.2 热稳定性:** 按照 1.11.1 中所述方法考察重组酶在 45 °C、55 °C、60 °C、65 °C、75 °C 的热稳定性。结果如图 6 所示: 该酶在 45 °C 和 55 °C 保温 8 h 仍可以保留 90% 以上的活性; 60 °C 保温 8 h 过程中, 虽然酶活呈现较清楚的下降趋势但保温 3 h 后还保存有 60% 左右的酶活, 保温 8 h 后重组酶也并没有完全失活; 65 °C 时酶活下降较快, 但保温 1 h 仍能保留约 60% 的酶活。重组酶在 75 °C 保温 30 min 才完全失活, 说明该酶具有较好的热稳定性。

**2.5.3 最适 pH:** 由图 7 可知, 重组酶在 pH 2.2–10.0 之间均表现出一定酶活力, 在 pH 5.0–6.5 之间能保持 80% 以上的活性, 最适 pH 为 5.5, 属酸性酶。

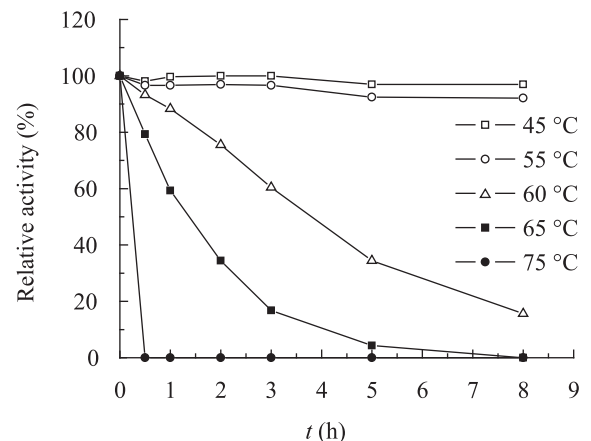


图 6 重组 PEP 酶的温度稳定性  
Fig. 6 Thermostability of recombinant enzyme

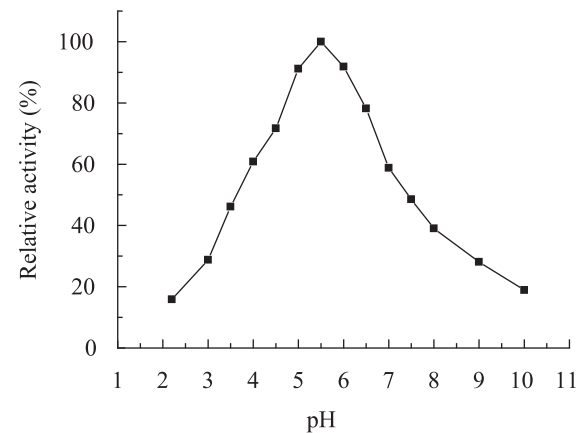


图 7 重组酶的最适 pH  
Fig. 7 Optimal pH of recombinant enzyme



**2.5.4 pH 稳定性:** 如图 8 所示, 重组酶在 pH 6.0–8.0 缓冲液中处理 10 d 后酶活没有明显变化, 在 pH 3.0–9.0 之间的缓冲液中处理 10 d 仍能保持 80% 以上的活性, 说明该酶在这段 pH 范围内有很好的稳定性。当 pH < 3.0 或 pH > 9.0 时该酶不稳定, 酶活下降较快。

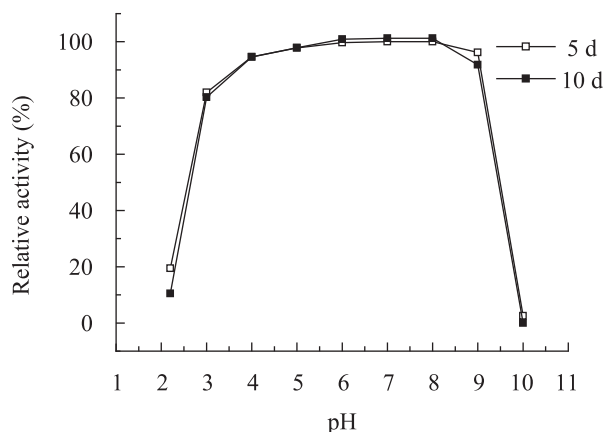


图 8 重组酶的 pH 稳定性

Fig. 8 The pH stability of recombinant enzyme

**2.5.5 金属离子及 EDTA 的影响:** 通过在酶液中添加终浓度为 1 mmol/L、5 mmol/L 的金属离子及 EDTA, 考察其对重组 PEP 活力的影响, 结果如图 9 所示。大部分的金属离子对重组酶有轻微的抑制作用。 $K^+$ 、 $Li^+$  离子和 EDTA 对酶活力没有明显作用;  $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  对该酶的抑制作用相对较明显。但总体来说, 这些金属离子对该酶的抑制作用较轻, 即使在 5 mmol/L 浓度时, 该酶仍能保存 80% 以上的活力。

### 3 讨论

本研究通过构建重组菌, 在巴斯德毕赤酵母 GS115 中实现了烟曲霉脯氨酰内肽酶的分泌表达。重组菌摇瓶发酵酶活最高达 647.3 U/L, 为出发菌株烟曲霉脯氨酰内肽酶酶活 6.1 U/L 的 106.1 倍。2009 年, 向先长等<sup>[17]</sup>克隆了黑曲霉脯氨酰内肽酶基因并实现了其在酵母中的表达, 酶特异性

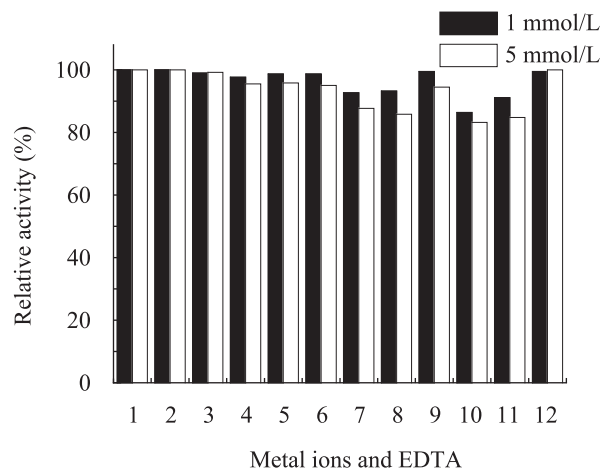


图 9 金属离子和 EDTA 对 PEP 酶活性的影响

Fig. 9 Effect of metal ions and EDTA on the recombinant PEP activity

注: 1: 对照(未添加金属离子); 2: KCl; 3: LiCl; 4:  $CaCl_2$ ; 5:  $MgCl_2$ ; 6:  $MnCl_2$ ; 7:  $CoCl_2$ ; 8:  $CuSO_4$ ; 9:  $ZnSO_4$ ; 10:  $FeCl_2$ ; 11:  $FeCl_3$ ; 12: EDTA.

Note: 1: Control (without metal ions); 2: KCl; 3: LiCl; 4:  $CaCl_2$ ; 5:  $MgCl_2$ ; 6:  $MnCl_2$ ; 7:  $CoCl_2$ ; 8:  $CuSO_4$ ; 9:  $ZnSO_4$ ; 10:  $FeCl_2$ ; 11:  $FeCl_3$ ; 12: EDTA.

底物 Z-Gly-Pro-pNA 测定酶活力最高可达 2 275.4 U/L; 2010 年底, Sriranganadane 等<sup>[18]</sup>运用蛋白质组学等技术, 首次发现了存在于烟曲霉胞外分泌蛋白中的脯氨酰内肽酶, 实现了该酶基因在 GS115 中的表达, 该论文没有提供酶活检测的数据, 但其重组酵母上清液中有明显酶活。本文获得的重组酶酶活数据不高, 部分原因可能是底物不合适。据报道, 该酶更适合作用于分子量稍大的肽段<sup>[18]</sup>, 具体原因还有待考察。

对重组菌表达的 PEP 进行酶学性质研究发现, 该酶有较好的热稳定性, 在 55 °C 保温 8 h 仍能保留 90% 以上的酶活力。该酶在应用方面的一个突出特点是在常温下具有极高的稳定性, 其纯酶在 pH 6.0–8.0 缓冲液中处理 10 d, 酶活力基本不变。进一步实验证实, 将重组菌发酵上清液在常温下放置 10 d, 其酶活也几乎不发生变化。与之相比, 早期已报道的点状产气单胞菌来源的 PEP 在 50 °C 保温 1 h 酶活力仅剩 36.7%, 在



pH 6–10 中常温下分别保温 2 h 也只有 80% 左右的剩余酶活力<sup>[19]</sup>。显然, 本文中烟曲霉来源的 PEP 在稳定性方面的优越性使得它更适合应用于工业生产。该酶的稳定性机制值得深入探究。今后可对该酶的生理生化特性进行更为详细的研究, 为该酶在食品与发酵工业上的应用奠定良好的基础。

## 参 考 文 献

- [1] Cunningham DF, O'Connor B. Proline specific peptidases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1997, 1343(2): 160–186.
- [2] Walter R, Simmons WH, Yoshimoto T. Proline specific endo and exopeptidase[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1980, 30(2): 111–127.
- [3] Wilk S. Prolyl endopeptidase[J]. *Life Science*, 1983, 33(22): 2149–2157.
- [4] Lopez M, Enens L. Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(20): 7944–7949.
- [5] Enens L, Dekker P, van der Hoeven R, et al. Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(20): 7950–7957.
- [6] Chevallier S, Goeltz P, Thibault P, et al. Characterization of a prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. Complete sequence and localization of the active-site serine[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(12): 8192–8199.
- [7] Agirregoitia N, Bizet P, Agirregoitia E, et al. Prolyl endopeptidase mRNA expression in the central nervous system during rat development[J]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2010, 40(1): 53–62.
- [8] Irazusta J, Larrinaga G, Gonzalez-Maeso J, et al. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain[J]. *Neurochemistry International*, 2002, 40(4): 337–345.
- [9] 李民, 修朝阳, 陈常庆. 脯氨酰内肽酶培养条件的优化及高密度发酵[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(2): 183–187.
- [10] Yoshimoto T, Kanatani A, Shimoda T, et al. Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1991, 110(6): 873–878.
- [11] Diefenthal T, Dargatz H, Witte V, et al. Cloning of proline-specific endopeptidase gene from *Flavobacterium meningosepticum*: expression in *Escherichia coli* and purification of the heterologous protein[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 40(1): 90–97.
- [12] Kanatani A, Yoshimoto T, Kitazono A, et al. Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1993, 113(6): 790–796.
- [13] Rennex D, Hemmings BA, Hofsteenge J, et al. cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue[J]. *Biochemistry*, 1991, 30(8): 2195–2203.
- [14] Vanhoof G, Goossens F, Hendriks L, et al. Cloning and sequence analysis of the gene encoding human lymphocyte prolyl endopeptidase[J]. *Gene*, 1994, 149(2): 363–366.
- [15] 李民, 陈常庆. 点状产气单胞菌脯氨酰内肽酶基因的克隆与表达[J]. *微生物学报*, 2000, 40(3): 277–283.
- [16] 周丽娜, 张鹭, 路福平, 等. 黑曲霉 W3350 脯氨酰内肽酶在大肠杆菌中的表达[J]. *生物技术*, 2008, 18(2): 15–17.
- [17] 向先长, 杨迪, 路福平, 等. 黑曲霉脯氨酸蛋白内肽酶基因的克隆及其在酵母中的表达[J]. *工业微生物*, 2009, 39(2): 7–12.
- [18] Sriranganadane D, Waridel P, Salamin K, et al. *Aspergillus* protein degradation pathways with different secreted protease sets at neutral and acidic pH[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(7): 3511–3519.
- [19] Li M, Shen GX, Chen CQ, et al. Properties of recombinant *Aeromonas punctata* prolyl endopeptidase[J]. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 1999, 31(6): 685–688.