

DOI: 10.12264/JFSC2025-0122

南极磷虾亮氨酸氨肽酶基因的克隆、异源表达及其酶学性质研究

谭佳豪^{1,2}, 邹华英^{1,2}, 盛军², 王芳^{2*}, 陈梦瑶^{1,2}, 宋佳^{2,3}, 徐甲坤^{2*}

1. 上海海洋大学, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部极地渔业可持续利用重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 青岛科技大学, 山东 青岛 266061

摘要: 本研究旨在从南极磷虾(*Euphausia superba*)基因转录组中筛选克隆获得一种亮氨酸氨肽酶基因 *EsLAP*, 构建重组表达载体 *EsLAP*-pET-28a, 通过共表达分子伴侣在大肠杆菌中实现可溶性表达。采用三因素三水平响应面法对诱导条件进行优化, 并对其重组酶学性质进行系统表征。*EsLAP* 基因全长 1569 bp, 编码 522 个氨基酸, 理论分子量为 55302.67 Da, 等电点为 6.16。序列与结构分析表明, *EsLAP* 具有 M17 家族肽酶的典型肽酶催化结构域及底物特异性结合位点。通过响应面优化确定 *EsLAP* 最佳表达条件为: IPTG 浓度 0.7 mmol/L、接种量 3%、诱导时间 19 h。酶学性质分析显示, *EsLAP* 最适反应温度为 60 °C, 最适 pH 为 8.5, 其中粗酶活为 265.6 U/mL, 比酶活为 33.15 U/mg。金属离子 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 可显著增强其酶活, 其中 Co^{2+} 可使酶活提高至原始水平的 296%。EDTA 可以显著抑制其酶活, 表明 *EsLAP* 是金属蛋白酶。 β -mercaptoethanol、 NaBH_4 、DTT 等强还原剂显著抑制酶活, 可以使剩余酶活降低至 10% 以下。底物特异性分析显示, *EsLAP* 对 Leu-pNA 具有最高的催化效率, 进一步验证其为亮氨酸氨肽酶。本研究首次报道南极磷虾来源的亮氨酸氨肽酶的克隆表达及酶学特性, 相关结果可作为其在食品与医药工业中用于降解 N-端含亮氨酸的功能肽的潜在应用基础。

关键词: 南极磷虾; 氨肽酶; 异源表达; 酶学性质

中图分类号: S986

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)08-1079-14

南极磷虾(*Euphausia superba*)是南大洋生态系统的關鍵物种, 其生物量达 6~10 亿 t, 不仅是鲸类、企鹅等顶级捕食者的主要食物来源, 更是人类开发海洋蛋白资源的战略目标^[1-2]。作为“海上金矿”, 南极磷虾富含高营养价值蛋白质、脂质及生物活性物质, 在食品、医药及工业领域展现出巨大潜力^[3-5]。然而, 全球气候变化与人类捕捞活动的双重压力正威胁其种群稳定性, 亟需通过生物技术创新提升资源利用效率。其中, 南极磷虾内源性酶的挖掘与开发成为突破传统加工瓶颈的关键方向。南极海域独特的环境条件塑造了南极磷虾酶的高活性和耐低温的特性^[6-7]。近年来,

通过基因克隆和异源表达技术, 科学家已成功在多种宿主系统中表达南极磷虾酶, 如胰蛋白酶^[8]、几丁质脱乙酰酶^[9]、果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶^[10]等, 并对其功能特性、优化策略和应用潜力进行了深入研究, 同时也为探索以南极磷虾为来源的酶作为工业生物催化剂创造了更多契机。

氨肽酶(aminopeptidases, APs; EC 3.4.11.)是一类可以催化多肽或蛋白质 N 端氨基酸逐步水解的外切蛋白酶^[11]。它在蛋白质降解、代谢调控及信号转导等生物过程中发挥关键作用, 广泛应用于食品风味调控、生物活性肽制备、蛋白质结构功能研究以及药物开发等多个领域。氨肽酶能够

收稿日期: 2025-04-30; **修订日期:** 2025-05-08.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFC2807500).

作者简介: 谭佳豪(2000–), 男, 硕士研究生, 研究方向为酶催化. E-mail: jht2516@163.com

通信作者: 徐甲坤, 研究员, 主要从事生物催化与转化研究. E-mail: xujk@ysfri.ac.cn; 王芳, 副研究员, 研究方向为海洋生物学. E-mail: wangfang@ysfri.ac.cn

特异性识别并水解多肽链 N-末端的疏水性氨基酸残基,有效减少苦味肽的积累,是实现蛋白水解产物脱苦的重要风味修饰酶^[12-13]。此外,氨肽酶在合成和修饰生物活性肽、蛋白质 N 端序列测定等方面亦展现出重要的实用价值^[14-15]。

关于氨肽酶的研究始于 20 世纪初,早在 1935 年,Johnson 等^[16]首次从米曲霉中分离获得了 3 种肽酶,并证实了氨肽酶的存在。随着研究的深入,此后科学家们陆续从植物、动物及微生物体内纯化分离出了多种不同类型的氨肽酶^[17-18]。1974 年,Balerna 等^[19]从耐热芽孢杆菌体内提取纯化得到了 1 种具有良好热稳定性的氨肽酶。1993 年,McDonnell 等^[12]从乳酸乳球菌中分离得到 1 种特异性作用于赖氨酸为 N 端的氨肽酶。2005 年,Basten 等^[20]从黑曲霉中成功纯化出 1 种脯氨酸氨肽酶。然而,传统分离方法普遍面临酶产量低、纯化成本高及工艺复杂性等技术瓶颈,严重制约了氨肽酶在工业化生产中的应用发展^[21-22]。相较之下,微生物表达系统因其生长周期短、发酵条件可控、遗传操作简便等优势,成为当前氨肽酶规模化生产的主要平台。随着分子生物学及合成生物学技术的发展,氨肽酶基因的克隆、表达调控、异源表达系统构建和功能改造等方面已取得重要进展^[23-25],但其原核表达仍存在包涵体形成及酶活低等问题^[26]。因此,优化表达载体、融合标签及共表达分子伴侣以提高其可溶性表达水平,仍是当前氨肽酶规模化制备的核心策略。

本研究首次从南极磷虾中克隆得到亮氨酸氨肽酶基因 *EsLAP*,并结合响应面法优化重组蛋白的表达条件,克服了天然酶提取效率低的限制。同时,对南极磷虾亮氨酸氨肽酶(*EsLAP*)的酶学性质进行系统分析,揭示其在南极极端环境中的适应机制,并为开发耐低温、高稳定性的工业酶提供了理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用南极磷虾由辽渔集团于 2022 年 10 月在南极海域捕捞,置于 -80°C 超低温冷冻贮存。

1.2 试剂和化学品

限制性内切酶 *Xho* I、*Ned* I、 $2\times\text{Taq Mix DNA}$

聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司。亮氨酸-对硝基苯胺(*Leu-pNA*),精氨酸-对硝基苯胺(*Arg-pNA*),蛋氨酸-对硝基苯胺(*Met-pNA*)等 9 种氨肽酶底物购自上海麦克林生化科技股份有限公司。动物组织总 RNA 提取试剂盒购自成都福际生物技术有限公司。FastKing cDNA 第一链合成试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒快速提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自 Omega Bio-Tek 公司。DH5 α 感受态细胞购自生工生物(上海)有限公司,RTS BL21 (DE3)大肠杆菌感受态细胞购自新海基因生物科技(深圳)有限公司,所有其他化学品均为分析级。

1.3 仪器

ZQZY-C8V 恒温震荡培养箱(知楚仪器有限公司)、SHP-250 生化恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)、071-851 定性梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司)、GS-680J 凝胶成像分析仪(上海培青科技有限公司)、G154DS 高压蒸汽灭菌锅(厦门致微仪器有限公司)、CR21GIII 大型高速离心机(日本 Hitachi 株式会社日立制作所)、VCF-1500 超声破碎仪(Sonics, 索尼克斯公司)、Infinite 多功能全波长微孔板检测仪[瑞士帝肯(Tecan)公司]、ORION Model 818 pH 计(美国奥立龙公司)、THZ-C-1 涡旋振荡器(苏州培英实验设备有限公司)。

1.4 *EsLAP* 基因克隆与重组载体构建

1.4.1 南极磷虾 RNA 提取 采用 FOREGENE 动物组织总 RNA 提取试剂盒,按照其操作手册的标准步骤在无菌且无 RNA 酶的条件下提取南极磷虾的总 RNA。

1.4.2 南极磷虾 cDNA 合成 使用天根 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒的步骤合成南极磷虾 cDNA。

1.4.3 *EsLAP* 基因克隆 以南极磷虾总 RNA 为模板,反转录合成 cDNA,并进行转录组测序。根据测序结果验证亮氨酸氨肽酶的基因序列,并在 NCBI 库进行 Blast 序列比对分析,获得南极磷虾 *EsLAP* 的完整基因序列。以南极磷虾 cDNA 为模板,依据转录组测序数据分别设计正向引物(5'-ATGGGGGGTTCCAAAATAA-3')和反向引物(5'-TCAAGCAAGCCTCATTTTC-3'),通过 BLASTN

对 NCBI 数据库验证引物的特异性以避免非特异性结合, 验证完毕后进行 PCR 扩增。聚合酶链式反应(PCR)在 25.0 μL 的溶液中进行, 其中含有 10 μL 混合 *Taq* DNA 聚合酶溶液、1 μL cDNA 模板、1 μL 正向引物、1 μL 反向引物和 12 μL ddH₂O。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 通过凝胶成像系统观察目标条带。从琼脂糖凝胶中切下单一 DNA 条带并进行胶回收, 随后对胶回收产物进行基因序列验证。利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)测定 EsLAP 分子量、亲水性和等电点等生化特性, 使用 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)分别对 EsLAP 进行保守结构域和蛋白三维结构分析, 系统发育树由 MEGA 软件构建。

1.4.4 EsLAP 重组载体构建 选择 pET-28a 为表达载体, 根据大肠杆菌的密码子偏好性对目的基因进行密码子优化, 并进行基因合成。在 *Xho*I 和 *Nde*I 限制性酶切位点之间插入目的基因片段, 得到命名为 *EsLAP*-pET-28a 的重组表达载体。

1.5 EsLAP 重组载体的表达

1.5.1 质粒提取 使用 Omega 快速质粒提取试剂盒从重组菌中提取 *EsLAP*-pET-28a 质粒, 然后对其进行 DNA 凝胶电泳验证。

1.5.2 转化表达 将 *EsLAP*-pET-28a 质粒转化到大肠杆菌感受态细胞 RTS BL21(DE3) *chaperone* 中, 随后将感受态细胞涂布于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 琼脂板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。单菌落长出后, 挑取单个菌落, 接种于 50 mL LB 含相应抗生素的液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下扩大培养 12 h; 再以 3%接种比例接种于 500 mL LB 含相应抗生素的液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至菌体密度 OD₆₀₀ 值至 0.3 (约 2 h),

加入终浓度 2 ng/mL 四环素诱导分子伴侣蛋白表达; 当菌体密度 OD₆₀₀ 值达到 0.6~0.8 时(约 4~5 h), 加入 0.7 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达, 细胞在 15 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下诱导培养 19 h。

1.5.3 重组表达条件优化 利用响应面分析法, 通过 Design Expert 13.0 软件进行三因素三水平实验设计, 以确定最佳诱导条件^[27]。在 IPTG 浓度(0.1~1 mmol/L)、诱导时间(12~24 h)和接种比例(0.5%~5%) 3 个关键因素的基础上探索最佳诱导表达条件。

1.6 EsLAP 粗酶液的制备

收集诱导表达的大肠杆菌, 在 8000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 后回收菌体; 使用 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.5)洗涤三次并重悬菌体; 超声裂解 20 min, 破碎后的菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 r/min 离心 60 min; 去除沉淀, 收集上清液, 所得上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后即粗酶液。收集含有可溶性 EsLAP 蛋白的粗酶液上清进行后续的分析。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白质的分子质量, 蛋白浓度采用 Bradford 法测定^[28-29]。

1.7 EsLAP 酶活测定

将酶液用 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液稀释一定倍数, 然后再取 20 μL 稀释后的酶液加入 160 μL 缓冲液, 再加入 20 μL 10 mmol/L Leu-pNA (Leucine-p-nitroanilide)乙醇溶液(对照使用灭活酶), 放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中反应 10 min。反应结束后立即加入 200 μL 乙酸至反应体系中终止反应, 取 200 μL 反应液至酶标板孔, 于 405 nm 波长处测定吸光值。亮氨酸氨肽酶酶活定义: 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 每分钟水解底物亮氨酸对硝基苯胺产生 1 μmol 对硝基苯胺所消耗的酶量定义为一个酶活单位(U), 其酶活测定原理如图 1 所示。

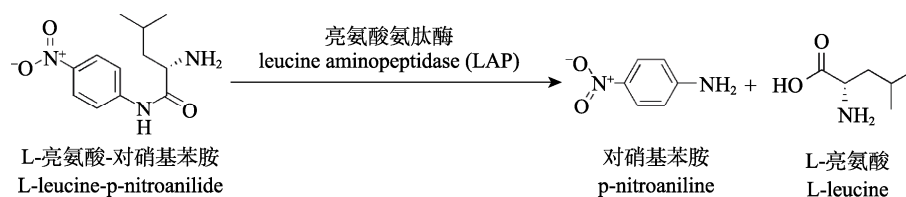


图 1 EsLAP 酶活测定原理

Fig. 1 Principle of EsLAP enzyme activity assay

1.8 EsLAP 的酶学性质研究

1.8.1 EsLAP 最适反应温度与温度稳定性 最适温度的测定: 为确定 EsLAP 的最佳反应温度, 将其分别置于 4 °C、10 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C 和 80 °C 下的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.5)中, 在 pH 8.5 的条件下反应 10 min 测定酶活, 每组温度进行 3 次平行实验, 以评估 EsLAP 的最适温度。

温度稳定性的测定: 将 EsLAP 置于 4 °C、20~80 °C(每升高 10 °C 为一个梯度)温度下分别孵育 240 min, 每 30 min 取一次样品, 在 60 °C 和 pH 8.5 的条件下反应 10 min 测定酶活以评估温度稳定性。将剩余酶活的百分比与未孵育 EsLAP 的酶活(设置为 100%)进行比较, 计算剩余酶活百分比, 每组样品进行 3 次平行实验, 以评估 EsLAP 的温度稳定性。

1.8.2 EsLAP 最适反应 pH 及 pH 稳定性 最适 pH 的测定: 为确定 EsLAP 的最佳 pH, 将其分别置于 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、8.5、9.0、10.0 的缓冲液中, 所用缓冲液为 50 mmol/L 的柠檬酸缓冲液(pH 4.0~6.0)、磷酸盐缓冲液(pH 6.0~8.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0~9.0)和甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0~10.0), 在 60 °C 的条件下反应 10 min 测定酶活, 每组 pH 进行 3 次平行实验, 以评估 EsLAP 的最适 pH。

pH 稳定性的测定: 将 EsLAP 放置在不同 pH 的缓冲液中在 4 °C 下分别孵育 240 min, 每 30 min 取一次样品, 在 60 °C 和 pH 8.5 的条件下反应 10 min 测定酶活以评估 pH 稳定性。将剩余酶活的百分比与未孵育 EsLAP 的酶活(设置为 100%)进行比较, 计算剩余酶活百分比, 每组样品进行 3 次平行实验, 以评估 EsLAP 的 pH 稳定性。

1.8.3 EsLAP 金属离子、抑制剂和表面活性剂稳定性 金属离子稳定性的测定: 为了研究金属离子对酶活的影响, 将 EsLAP 放置在浓度为 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的 Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ba²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺、Mn²⁺、Co²⁺ 和 Fe³⁺ 的缓冲液中孵育 30 min, 在 60 °C 和 pH 8.5 的条件下反应 10 min 测定酶活, 将剩余酶活的百分比与未用金属离子孵育的 EsLAP 的酶活(设置为 100%)进行比较, 每组样品进行 3 次平行实验, 以评估 EsLAP

的金属离子稳定性。

抑制剂和表面活性剂稳定性的测定: 为了研究蛋白抑制剂和表面活性剂对酶活性的影响。将 EsLAP 放置在浓度为 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的 EDTA、NaBH₄、PMSF、SDS 和 β-巯基乙醇缓冲液中孵育 30 min, 在 60 °C 和 pH 8.5 的条件下反应 10 min 测定酶活, 将剩余酶活的百分比与未用抑制剂孵育的 EsLAP 的酶活(设置为 100%)进行比较, 每组样品进行 3 次平行实验, 以评估 EsLAP 的抑制剂和表面活性剂稳定性。

1.8.4 EsLAP 的底物特异性 底物特异性测定: 将 EsLAP 与各种对硝基苯胺底物反应来评估底物特异性。分别配置浓度为 10 mmol/L 的不同底物, 具体为 Leu-pNA, Glu-pNA, Arg-pNA, Met-pNA, Lys-pNA, Ile-pNA, Val-pNA, Ala-pNA, Pro-pNA, 各取 20 μL 加入 200 μL 反应体系中, 在 60 °C 和 pH 8.5 的条件下反应 10 min 测定酶活, 每组样品进行 3 次平行实验, 以评估 EsLAP 的底物特异性。

2 结果与分析

2.1 EsLAP 基因克隆和生物信息学分析

以南极磷虾 cDNA 为模板, 成功克隆并验证了亮氨酸氨肽酶 *EsLAP* 基因, 序列验证无误后将编码 *EsLAP* 的序列存入 GenBank, 登录号为 WL76376.1。经琼脂糖凝胶电泳验证, 在 1600 bp 左右检测到明显条带(图 2), 与预测片段大小相符。

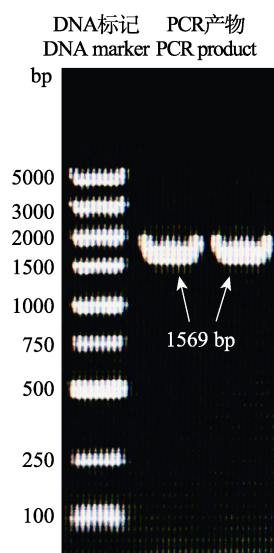


图 2 *EsLAP* 基因 PCR 扩增条带
Fig. 2 *EsLAP* gene PCR amplification bands

EsLAP 基因全长 1569 bp, 编码 522 个氨基酸, 分子量为 55302.67 Da。EsLAP 蛋白理论等电点为 6.16。蛋白质稳定性分析表明 EsLAP 不稳定系数为 34.07, 该数值小于 40, 这表明蛋白质的稳定性较好。ProtScale 程序疏水性预测显示其平均亲水指数为 -0.072, 脂肪族指数为 84.73, 表明 EsLAP 不仅具有良好的亲水性, 而且在脂质中具有优越的溶解度。

NCBI Blast 比对发现, 南极磷虾 EsLAP 与北方磷虾(*Meganyctiphanes norvegica*)来源的氨肽酶相似性最高(89.46%), 其次为红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)来源的氨肽酶(76.82%)、凯氏对虾(*Palaemon carinicauda*)来源的氨肽酶(76.63%)、南

美白对虾(*Penaeus vannamei*)来源的氨肽酶(76.25%)和日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)来源的氨肽酶(76.05%), 将 EsLAP 的氨基酸序列提交至 MEGA 软件构建系统发育树(图 3)。采用自举法(bootstrap)等方法评估树的可靠性, 从南极磷虾 EsLAP 在与北方磷虾分支的进化关系上可以看出, 这两个物种之间的同源性最高, 且置信度为 100%; 相对而言, 南极磷虾 EsLAP 与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中国对虾(*Penaeus chinensis*)、南美白对虾的同源性较低。从这些重要参数可以初步判断, EsLAP 基因可能与物种适应特定环境(如低温、高压等)有关。

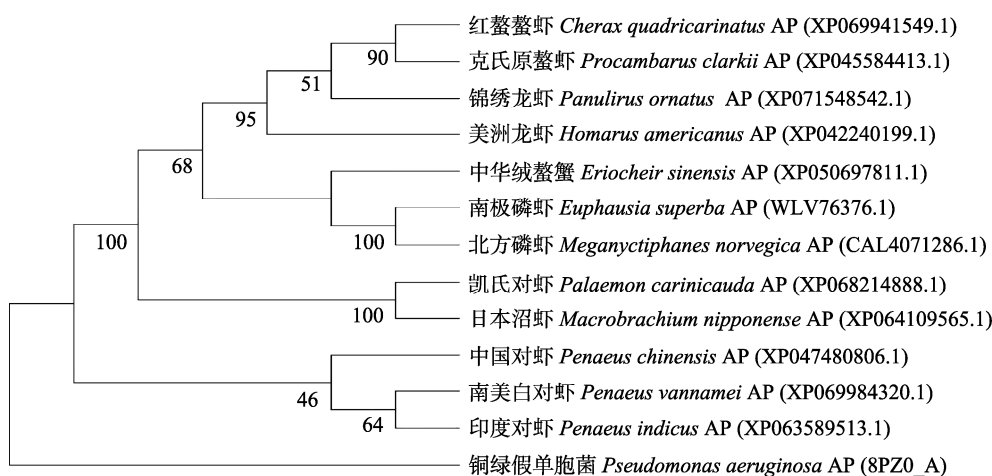


图 3 南极磷虾 EsLAP 与其他物种来源氨肽酶的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of EsLAP in *Euphausia superba* and aminopeptidases from other species

CD-Search 蛋白保守结构预测表明, EsLAP 是一种六聚体, 催化结构域聚集在三重轴周围, 两个三聚体通过两重旋转相互连接。两个相关的锌离子和催化活性位点完全封闭在亮氨酸氨肽酶的 C 端催化结构域内(图 4), 根据蛋白家族分类, EsLAP 属于 M17 外肽酶家族。SWISS-MODEL 同

源建模 EsLAP 三维结构(图 5a), 预测的三维结构包含 13 条主 β -链和 20 个 α -螺旋, 其独特的螺旋构象增强了整个蛋白质结构的稳定性和功能性。与铜绿假单胞菌 LAP (PDB ID: 8PZ0)的三维结构相比(图 5b), 两者均有相似的结构特征, 并在活性区域有较高的重叠度(图 5c)。EsLAP 的三维结

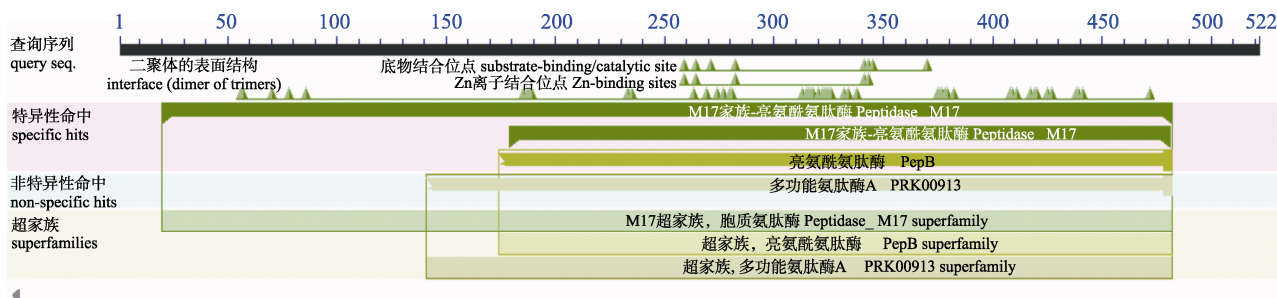


图 4 EsLAP 保守结构域分析

Fig. 4 EsLAP conserved domain analysis

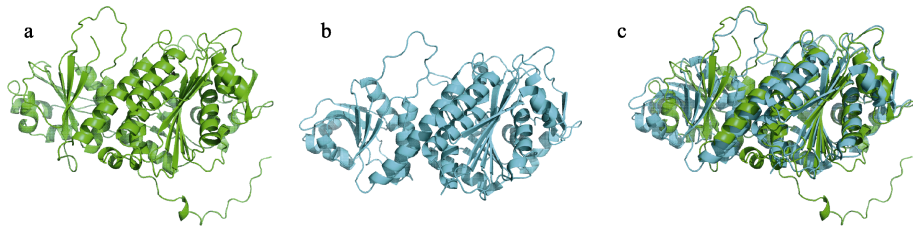


图 5 南极磷虾与铜绿假单胞菌 LAP 蛋白三维结构
a. 南极磷虾 LAP 蛋白三维结构; b. 铜绿假单胞菌 LAP 蛋白三维结构; c. 蛋白三维结构叠加.
Fig. 5 The 3D structure of *Euphausia superba* EsLAP and *Pseudomonas aeruginosa* LAP
a. The 3D structure of EsLAP; b. The 3D structure of *Pseudomonas aeruginosa* LAP; c. The superposition of 3D structure maps between EsLAP and *Pseudomonas aeruginosa* LAP.

构多了一段 C 末端柔性 loop 区, 这可能与南极磷虾所处的极端环境相关, 增加柔性以适应低温, loop 区带有特定的亲水残基可以帮助其在低温下保持溶解度和构象灵活性。

2.2 *EsLAP* 重组表达载体的构建与表达

本研究采用 pET-28a 质粒作为表达载体, 构建重组表达系统, 通过分子克隆技术将目的基因片段整合到了 pET-28a 表达载体上, 如质粒图谱(图 6)所示, 重组载体质粒分子量为 6865 bp, 其

中目的基因片段为 1569 bp, 琼脂糖凝胶电泳(图 7)可以观察得到重组载体质粒分子量大小符合预期结果, 重组表达载体 *EsLAP*-pET-28a 构建成功。

构建完成的重组质粒经测序确认序列无误后, 将其转化进大肠杆菌 RTS BL21 (DE3) chaprone 中。将重组工程菌诱导培养, 破碎后获得粗酶液上清, 通过 SDS-PAGE 对蛋白进行检测。从蛋白电泳结果(图 8)中能够观察到, 经诱导表达后,

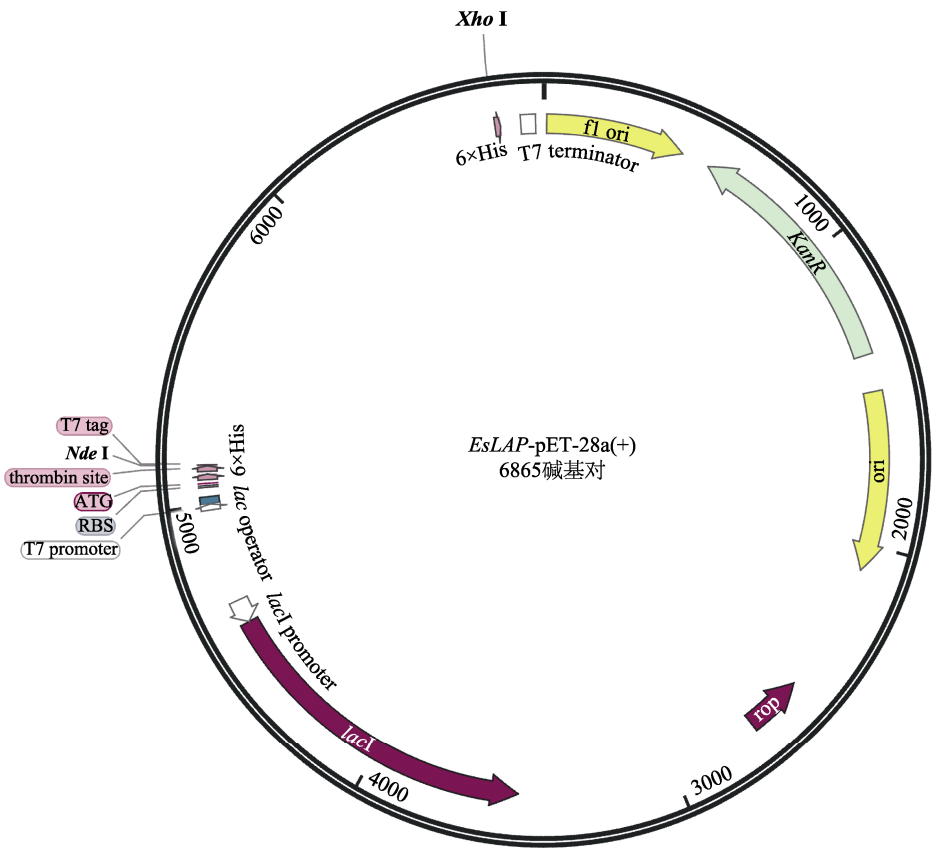


图 6 *EsLAP* 重组表达载体
Fig. 6 Recombinant expression vector of *EsLAP*

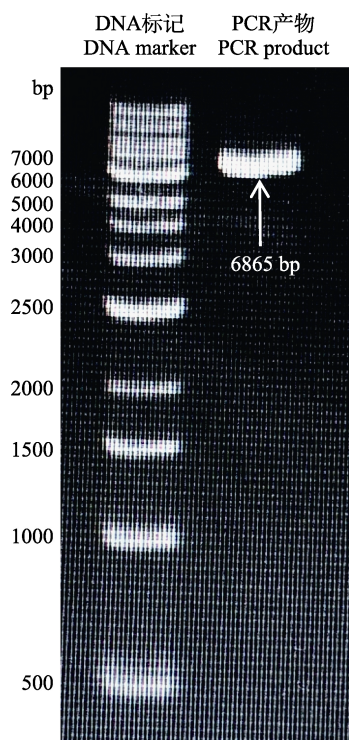


图 7 琼脂糖凝胶电泳验证重组 *EsLAP* 表达载体构建结果

Fig. 7 Validation of *EsLAP* recombinant expression vector construction using agarose gels electrophoresis

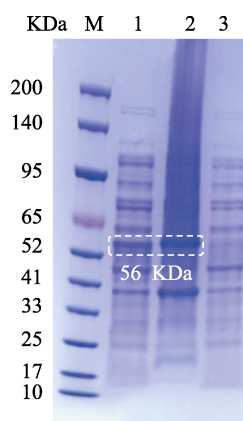


图 8 诱导 *EsLAP* 的 SDS-PAGE 蛋白电泳图

M: 蛋白 marker; 泳道 1: 转化后大肠杆菌裂解液的上清; 泳道 2: 转化后大肠杆菌裂解液的沉淀; 泳道 3: pET-28a 空载体裂解后上清.

Fig. 8 SDS-PAGE protein electrophoresis of *EsLAP* after induction

M: protein marker; lane 1: supernatant of the *E. coli* lysis after transformation; lane 2: precipitation of the *E. coli* lysis after transformation; lane 3: supernatant after pET-28a empty vector lysis.

EsLAP 重组表达载体转化大肠杆菌裂解液的上清液中呈现出清晰可辨的目的蛋白条带。此目的蛋白的分子量约为 56 kDa, 对应的分子量与先前预

测的值基本相符。而转入 pET-28a 空载体的大肠杆菌裂解液上清在 56 kDa 处并无出现明显的目的条带, 这意味着在经过连接转化并诱导后, pET-28a 空载体中已成功插入了目的基因片段, 并且成功实现了目的蛋白的可溶性表达。

2.3 *EsLAP* 重组表达条件优化

采用响应面法对诱导条件进行优化, 回归方程的显著性检验表明, 模型极显著 ($P < 0.01$), 决定系数高 ($R^2 = 0.947$), 表明 94.7% 的响应变异性可以用模型解释。缺乏拟合检验 ($P = 0.94 > 0.05$) 无显著性, 进一步证实了模型的有效性。分析表明, 回归模型拟合数据较好, 实验误差不显著, 验证了数学模型在预测和评价 *EsLAP* 酶活性方面的可靠性和适用性。*EsLAP* 活性的多元二次回归模型方程表示为: $\text{EsLAP 活性} = 32.60 + 1.02A + 4.54B + 1.58C + 0.0275AB + 0.9600AC - 0.1325BC - 5.46A^2 - 7.61B^2 - 6.23C^2$ (其中 A 为接种比例; B 为 IPTG 浓度; C 为诱导时间)。模型方程中接种比例, IPTG 浓度和诱导时间的系数分别为 +1.02、+4.54、+1.58, 由此可以得出 IPTG 浓度对蛋白表达的影响最大, 其次为诱导时间和接种比例。如图 9 所示, 响应面呈现向下开口的凸曲面特征, 且存在极值点, 其中 IPTG 浓度和诱导时间响应面的斜率变化最大, 且等高线呈明显椭圆形分布, 这充分说明二者之间存在显著的相互作用。

响应面法成功地优化了 *EsLAP* 的诱导条件, 在接种比例为 3%、中等 IPTG 浓度为 0.7 mmol/L 和诱导时间为 19 h 时可使酶活性最大化, 优化后酶活提升了 1.6 倍, 为最佳表达条件。

2.4 *EsLAP* 的基础酶学性质研究

如图 10 所示, *EsLAP* 的最适反应温度为 60 °C。当在 4 °C~40 °C 温度范围内保持 4 h 时, 剩余酶活仍保持在 92% 以上; 在 60 °C 保持 4 h 时, 酶活保留 31.22%; 而在 70 °C 和 80 °C 保持 1 h 后, 酶活迅速下降, 剩余酶活仅为原始活性的 20% 左右, 说明随着温度升高剩余酶活逐渐降低, 但 *EsLAP* 在低温条件下具有良好的稳定性。

如图 11 所示, *EsLAP* 的最适 pH 为 8.5, 在 pH 8.0~9.0 范围内都保留了较高的活性, 当 pH 低于 7 时, 剩余酶活小于 45%, 超过 10 时, 剩余酶

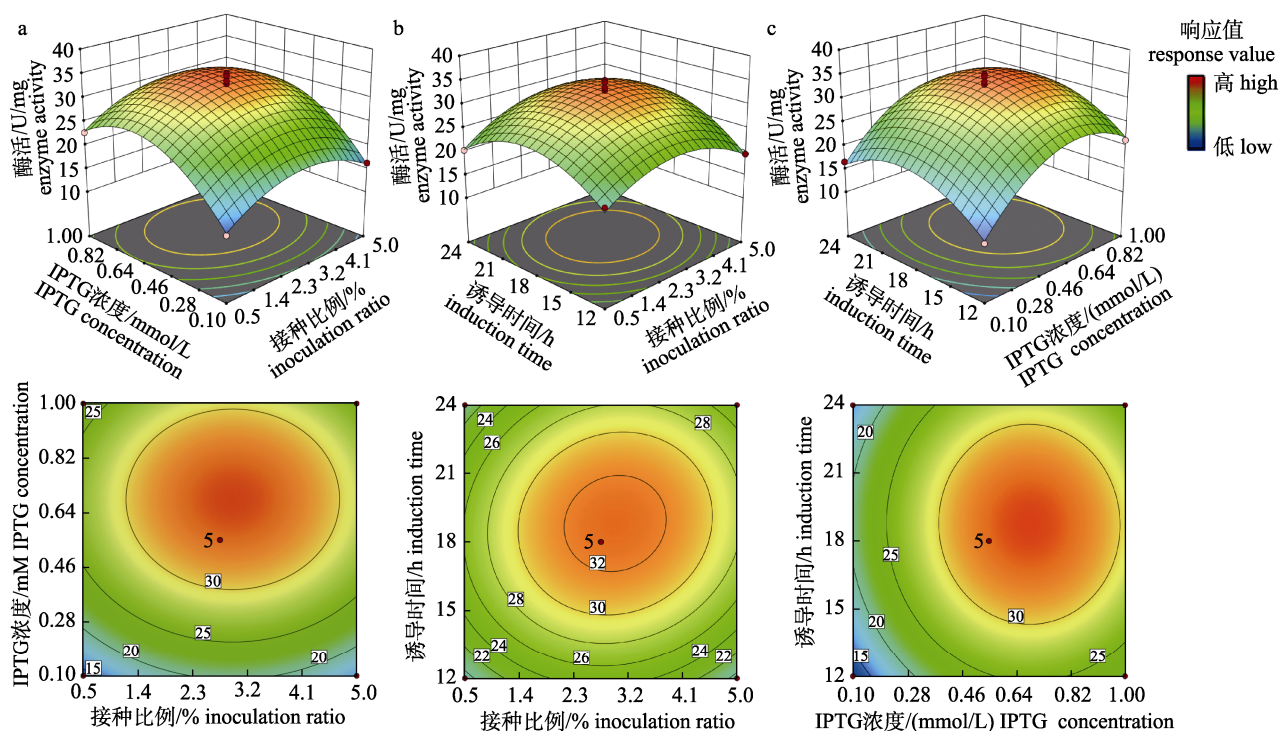


图 9 各因素对 EsLAP 酶活影响的响应面图和等高线图

- a. IPTG 浓度和接种比例共同作用对酶活的影响; b. 诱导时间和接种比例共同作用对酶活的影响;
c. 诱导时间和 IPTG 浓度共同作用对酶活的影响. 响应值: 酶活.

Fig. 9 Response surface diagram and contour surface diagram of EsLAP enzyme activity influenced by various factors
a. The combined effect of IPTG concentration and vaccination ratio on enzyme activity; b. The combined effect of induction time and vaccination ratio on enzyme activity; c. The combined effect of induction time and ITPG concentration on enzyme activity. Response value: enzyme activity.

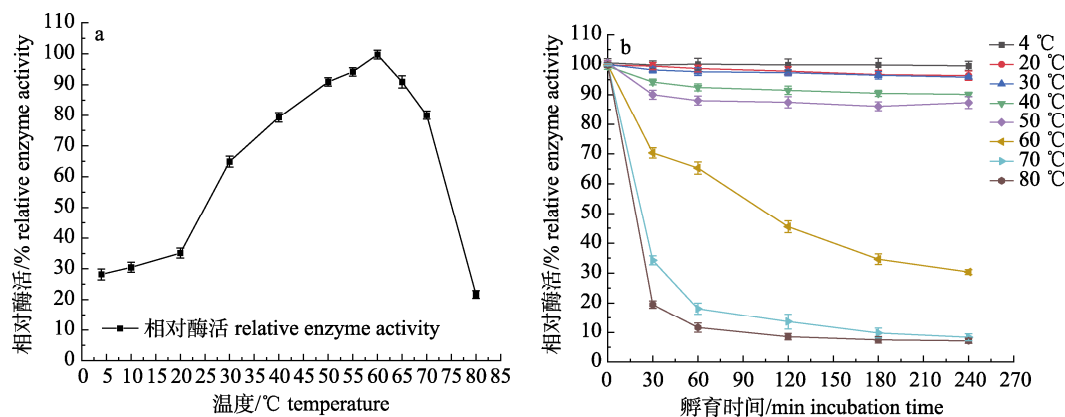


图 10 EsLAP 最适反应温度和温度稳定性

- a. 最适反应温度; b. 温度稳定性.

Fig. 10 EsLAP optimum reaction temperature and temperature stability
a. Optimum reaction temperature; b. Temperature stability.

活小于 20%。EsLAP 的 pH 稳定性测定结果显示, 该酶在 pH 8.5~9.0 的缓冲液中最稳定。孵育 240 min 后, 剩余酶活均大于 90%, 而置于 pH 4 的缓冲液中孵育 240 min 后, 剩余酶活已不足 40%。

如图 12 所示, Co^{2+} 对 EsLAP 具有激活作用,

在 1 mmol/L 浓度时, 相对酶活高达 296%。当金属离子浓度为 10 mmol/L 时, Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 对 EsLAP 有激活作用, 剩余酶活分别为 114.32%, 109.65%; Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{3+} 对 EsLAP 具有较强的抑制作用, 剩余酶活分别为 53.67%, 65.32% 和

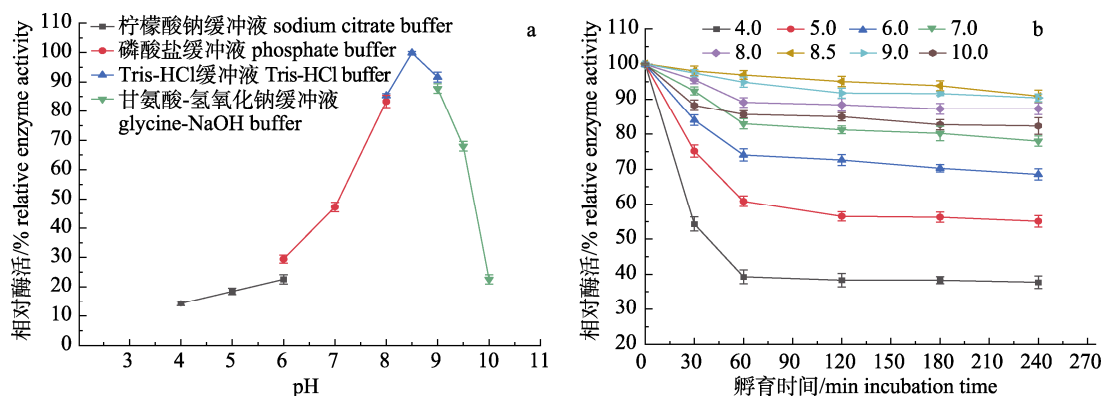


图 11 EsLAP 最适反应 pH 和 pH 稳定性

a. 最适反应 pH; b. pH 稳定性.

Fig. 11 Optimum reaction pH and pH stability of EsLAP

a. Optimum reaction pH; b. pH stability.

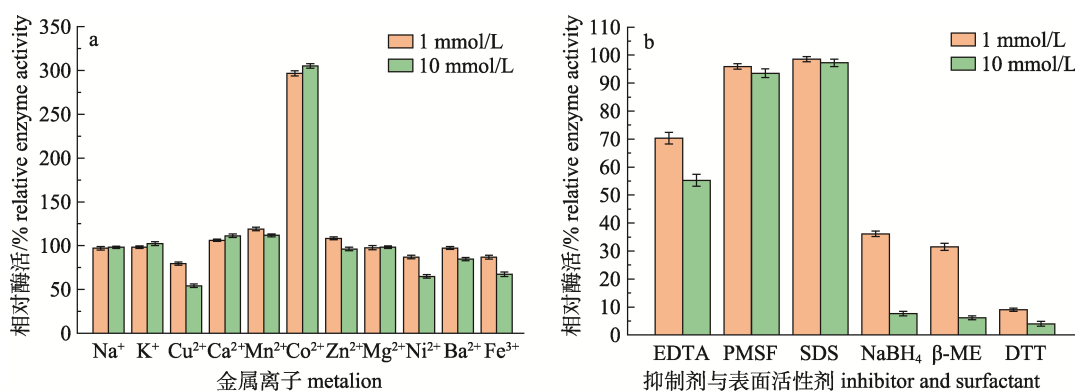


图 12 金属离子和抑制剂、表面活性剂影响下 EsLAP 稳定性

a. 金属离子稳定性; b. 抑制剂、表面活性剂稳定性.

Fig. 12 Stability of EsLAP under the influence of metal ion, inhibitor and surfactant.

a. Metal ion stability; b. Inhibitor and surfactant stability.

68.44%。SDS 和 PMSF 对 EsLAP 的酶活几乎没影响, 浓度为 1 mmol/L 的 EDTA、NaBH₄、β-ME、DTT 对 EsLAP 有明显的抑制作用, 剩余酶活分别为 70.95%, 36.49%, 31.76%, 8.95%; 在 10 mmol/L 浓度下, β-ME、NaBH₄、DTT 对酶活性的抑制作用更加明显, 导致 EsLAP 的剩余酶活均降低至 10% 以下。

如图 13 所示, 在浓度为 10 mmol/L 的 9 种氨肽酶底物中, 重组氨肽酶对 Leu-pNA 的相对分解能力最强(100%), 其次是 Glu-pNA (42.59%)、Arg-pNA (18.32%)、Met-pNA (12.96%)和 Lys-pNA (9.25%), 对其余 4 种底物则没有分解作用, 表明该氨肽酶具有较强的底物特异性。如图 14 所示, EsLAP 以 Leu-pNA 为底物, 催化其分解成 Leu(亮氨酸)和

pNA(对硝基苯胺, 呈黄色), 能够验证 EsLAP 对以 N 端为亮氨酸的多肽有降解作用。

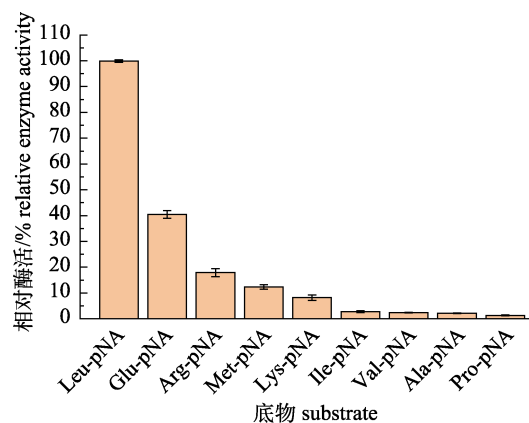


图 13 EsLAP 底物特异性

Fig. 13 EsLAP substrate specificity



图 14 EsLAP 催化分解亮氨酸对硝基苯胺
产物对硝基苯胺呈黄色。

Fig. 14 Catalytic decomposition of leucine p-nitroaniline by EsLAP
The product p-nitroaniline is yellow.

3 讨论

3.1 表达系统与表达条件对 EsLAP 酶活的影响

相较于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和酵母表达系统,大肠杆菌因操作简便、安全稳定、培养成本低廉等被广泛应用于异源表达中。然而大肠杆菌缺乏对重组蛋白翻译后修饰的能力,蛋白多以包涵体形式存在,如张守涛等^[30]在对一种纤溶酶进行包涵体变复性工作后,复性收率仅为 25%,并且复性步骤繁琐、耗资较大。为提高 EsLAP 的产量和酶活力,本研究在大肠杆菌宿主细胞中引入分子伴侣共表达系统,将 EsLAP 可溶性表达比例提升至 72.3%,通过 Box-Behnken 响应面法优化发现,适宜的 IPTG 浓度、诱导时间、接种比例是影响 EsLAP 活性和蛋白表达量的关键因素。在大肠杆菌表达系统中, IPTG 通常会发挥作为诱导剂的核心作用,低浓度可能无法充分启动 T7 启动子,而高浓度可能引发代谢负担或毒性效应^[31], 0.7 mmol/L IPTG 浓度介于常见诱导 IPTG 浓度范围(0.1~1.2 mmol/L IPTG),表明中等的诱导浓度可以平衡诱导强度与细胞毒性,促进重组蛋白的表达。本研究最佳诱导蛋白表达的时间为 19 h,大于多数大肠杆菌系统 4~12 h 诱导表达时间,如陈焕基等^[32]在优化重组降氰酶在大肠杆菌中的表达条件时,发现诱导 12 h 就可以达到最大酶活。而 EsLAP 较长的诱导时间可能与磷虾特殊的生存环境有关,其体内特殊的核糖体翻译机制需要在低温环境下平衡蛋白折叠效率,延长诱导时间有助于蛋白的充分表达。适当提高接种比例可缩短细胞迟缓期,但过高接种比例可能引发营养竞争或溶氧限制,因此 3% 的接种比例

是细菌平衡生长速率与产物积累的最佳选择。该优化策略使 EsLAP 比酶活达到 265.6 U/mL,较初始条件提升 1.6 倍,为极地来源酶的高效异源表达提供了范例。

3.2 温度与 pH 对 EsLAP 酶活的影响

EsLAP 的最适反应温度为 60 °C,绝大部分原核生物来源(如枯草芽孢杆菌 ZJ-016^[23]、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) CZ^[33]、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) SWJS33^[34])和真核生物来源[如米曲霉(*Aspergillus oryzae*) JN-412^[24]]的氨肽酶与 EsLAP 的最适温度都在 60 °C 左右,均为中温酶,这说明氨肽酶的催化机制和活性中心结构可能在进化中高度保守,导致最适温度趋同。当催化温度从 25 °C 上升至 30 °C,南极磷虾来源的氨肽酶酶活变化速率快速增加,且 30 °C 时,其酶活就能达到最高酶活的 65%,而米曲霉^[25]和绦虫^[35]等其他来源的在 30 °C 时酶活仅为最高酶活的 30% 左右。这说明 EsLAP 可能在低温的南极海域环境下就能保持较高的活性,进化出了更强的快速催化能力和底物亲和力,以有效地获取能量。EsLAP 的最适 pH 为 8.5,这与从细菌物种^[23-34]和一些植物^[36]中分离的 LAP 的最佳 pH 相似,EsLAP 在弱碱性 pH 范围内具有良好的稳定性,与枯草芽孢杆菌 BSP1 来源的 LAP 相似^[37],体现了其与细菌、植物同源酶类的进化保守性。在蛋白质水解液脱苦或生物活性肽制备中,反应体系常需维持中性至弱碱性(pH 7.0~9.0)。EsLAP 的 pH 适应性与此类工艺天然匹配,无需额外调节 pH 即可高效应用,节约了工业应用成本。

3.3 金属离子、抑制剂与表面活性剂对 EsLAP 酶活的影响

1 mmol/L 的 Co^{2+} 可提高 EsLAP 酶活近 3 倍,这与 Hayman 等^[38]研究中提出的金属离子置换机理一致,氨肽酶活性中心的 Zn^{2+} 被相似的离子半径和更具配位偏好性的 Co^{2+} 替代之后,催化活性中心能够更高效地结合底物,从而提高活性。1 mmol/L 的 Zn^{2+} 对 EsLAP 有激活作用,但当 Zn^{2+} 浓度增加至 10 mmol/L 时,相对酶活只有原来的 80%,Maret 等^[39]通过取代其中一个锌离子(如 Zn_2)

形成三锌复合物, 导致催化位点的几何构型畸变, 这一研究说明过量锌可能打破 Zn1/Zn2 的协同配位模式, 从而抑制酶活。SDS 是一种表面活性剂, SDS 处理 EsLAP 后保留了 96.15% 的剩余酶活, 这可能提示 EsLAP 的活性中心可能被高度有序的 α -螺旋或 β -桶状结构包裹, SDS 难以穿透疏水核心, 如地衣芽孢杆菌 SWJS33 来源酶在 0.5% SDS 中活性保留了 95%^[40]。PMSF 是一种经典的丝氨酸蛋白酶共价抑制剂, 但其对 EsLAP 的酶活影响较少, 说明其催化机制不依赖丝氨酸残基。浓度为 10 mmol/L 的 β -mercaptoethanol、NaBH₄、DTT 对酶活性的抑制作用非常显著, 可使 EsLAP 剩余酶活降低至 10% 以下, 这些强还原剂通过破坏分子内维持构象的二硫键从而使活性中心结构变得松散, 导致酶活降低。与此同时, 由于 EDTA 是一种金属离子螯合剂, 其对酶活的抑制作用也间接证明 EsLAP 是一种金属蛋白酶。

3.4 EsLAP 的底物特异性与应用前景

底物特异性研究表明, EsLAP 可有效水解 N 端为亮氨酸、谷氨酸、精氨酸、蛋氨酸、赖氨酸的多肽, 其中对亮氨酸残基的偏好性最强, 这为定向肽工程提供了新策略, 如可以利用 EsLAP 的底物选择性, 定向作用于多肽 N 端生成兼具抗氧化、抗炎和免疫调节的多肽。李梦卓等^[41]研究表明, 苦味主要由含疏水性氨基酸如 N 端为亮氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸的小肽(分子量 < 6 kDa)引起, 其疏水基团与舌面苦味受体 T2R 家族结合后触发苦味感知, EsLAP 水解底物的疏水特性与苦味肽的分子结构特征高度适配。因此, 在食品工业中, EsLAP 与风味酶、碱性蛋白酶复配处理, 可显著降低产物苦味值, 有助于减少不良风味并提高蛋白水解产物的生物利用度, 同时还可以生成谷氨酸等鲜味氨基酸, 弥补传统脱苦工艺导致的滋味损失。EsLAP (265.6 U/mL) 表现出高酶活的特征, 显著高于其他物种来源如枯草芽孢杆菌 ZJ-016^[24] (226 U/mL)、米曲霉 JN-412^[24] (61.26 U/mL) 和缘虫^[35] (46 U/mL) 等氨肽酶。枯草芽孢杆菌 168^[21] (387.3 U/mL) 来源的氨肽酶表现出了优于 EsLAP (265.6 U/mL) 的酶活, 但是枯草芽孢杆菌 168 来源氨肽酶仅依赖 Co²⁺ 激活, 而 EsLAP 的酶

活还可被 Mg²⁺ (食品级添加剂) 显著激活, 这一特性使 EsLAP 的应用更加符合国家食品安全生产标准, 避免终产品中重金属残留风险, 因此 EsLAP 会有更加广泛的应用潜力。

4 结论

本研究以带有分子伴侣的大肠杆菌为宿主菌, 将南极磷虾来源的亮氨酸氨肽酶基因整合进带有分子伴侣的大肠杆菌载体 pET-28a 中, 成功实现了南极磷虾来源亮氨酸氨肽酶 EsLAP 的可溶性表达, 通过系统研究其酶学性质, 发现该酶具有较高的催化活性和良好的低温反应能力, 特别偏好以亮氨酸为 N 端的多肽底物。以上结果为 EsLAP 在低温加工、生物活性肽制备等食品工业领域的潜在应用提供了理论依据与实验支持。

参考文献:

- [1] Ellingsen T E, Mohr V. Biochemistry of the autolytic processes in Antarctic krill post mortem. Autoproteolysis[J]. The Biochemical Journal, 1987, 246(2): 295-305.
- [2] Chen X Z, Xu Z L, Huang H L. Development strategy on Antarctic krill resource utilization in China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(3): 451-458. [陈雪忠, 徐兆礼, 黄洪亮. 南极磷虾资源利用现状与中国的开发策略分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 451-458.]
- [3] Gigliotti J C, Davenport M P, Beamer S K, et al. Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*)[J]. Food Chemistry, 2011, 125(3): 1028-1036.
- [4] D'Amato R, Regni L, Falcinelli B, et al. Current knowledge on selenium biofortification to improve the nutraceutical profile of food: A comprehensive review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(14): 4075-4097.
- [5] Yu Y, Liu X F, Miao J K, et al. Chitin from Antarctic krill shell: Eco-preparation, detection, and characterization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 4125-4137.
- [6] Möller L, Vainshtein Y, Wöhlbrand L, et al. Transcriptome-proteome compendium of the Antarctic krill (*Euphausia superba*): Metabolic potential and repertoire of hydrolytic enzymes[J]. PROTEOMICS, 2022, 22(18): 2100404.
- [7] Shao C W, Sun S, Liu K Q, et al. The enormous repetitive Antarctic krill genome reveals environmental adaptations and population insights[J]. Cell, 2023, 186(6): 1279-1294. e19.

- [8] Xin S L, Zhang H Y, Sun J N, et al. Characterization and hydrolysis mechanism analysis of a cold-adapted trypsin-like protease from Antarctic krill[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(17): 9955-9966.
- [9] Wang X T, Tan J H, Zou H Y, et al. Cloning and characterization of chitin deacetylase from *Euphausia superba*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(4): 2075.
- [10] Xia J K, Xin W M, Wang F, et al. Cloning and characterization of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase from *Euphausia superba*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10478.
- [11] Sanderink G J, Artur Y, Siest G. Human aminopeptidases: A review of the literature[J]. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry Zeitschrift Fur Klinische Chemie und Klinische Biochemie, 1988, 26(12): 795-807.
- [12] McDonnell M, Bouchier P, Fitzgerald R J, et al. Purification and characterization of a lysine-p-nitroanilide hydrolase, a broad specificity aminopeptidase, from the cytoplasm of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris AM2[J]. The Journal of Dairy Research, 1999, 66(2): 257-270.
- [13] Saha B C, Hayashi K. Debitting of protein hydrolyzates[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19(5): 355-370.
- [14] Tavano O L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 90: 1-11.
- [15] Zhou K Q, Canning C, Sun S. Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 50(1): 331-335.
- [16] Johnson M J, Peterson W H. The peptidase system of *Aspergillus parasiticus*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1935, 112(1): 25-34.
- [17] Mei C S, Zhang Y H, Wu G N. Changes of aminopeptidase activity during leaf senescence in rice [J]. Acta Physiologica Sinica, 1987, 13(1): 60-65. [梅传生, 张远海, 吴光南. 水稻叶片衰老过程中氨基酶活性的变化 [J]. 植物生理学报, 1987, 13(1): 60-65.]
- [18] Taylor A. Aminopeptidases: Structure and function[J]. The FASEB Journal, 1993, 7(2): 290-298.
- [19] Balerna M, Zuber H. Thermophilic aminopeptidase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. International Journal of Peptide and Protein Research, 1974, 6(6): 499-514.
- [20] Basten D E J W, Moers A P H A, van Ooyen A J J, et al. Characterisation of *Aspergillus niger* prolyl aminopeptidase[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2005, 272(6): 673-679.
- [21] Song G C. Heterologous expression, molecular modification and application of the aminopeptidase from *B.subtilis*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2023. [宋广超. B.subtilis 氨基酶的异源表达、分子改造及应用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2023.]
- [22] De Brabander P, Uitterhaegen E, Delmulle T, et al. Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: A review[J]. Biotechnology Advances, 2023, 64: 108121.
- [23] Xi H X. High level expression of leucine aminopeptidase from *Bacillus subtilis* in *Pichia pastoris* and fermentation optimization[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015. [席宏星. 重组毕赤酵母高效表达细菌亮氨酸氨基酶及发酵优化[D]. 无锡: 江南大学, 2015.]
- [24] Yang H Y, Zhu Q, Zhou N D, et al. Optimized expression of prolyl aminopeptidase in *Pichia pastoris* and its characteristics after glycosylation[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(11): 176.
- [25] Song T T, Wu Z Z, Zong H, et al. Heterologous expression of a novel AAP gene from *Aspergillus oryzae* and characterization of the enzyme[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(5): 38-44. [宋婷婷, 吴珍珍, 宗红, 等. 米曲霉 AAP 新基因的异源表达及其酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5): 38-44.]
- [26] Xu M B, Yao Z J. Inclusion bodies in prokaryotic genetic engineering[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1992, 19(2): 89-92. [徐明波, 姚志建. 原核基因工程中的包涵体[J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(2): 89-92.]
- [27] Huang J F, Ou Y X, Zhang D F, et al. Optimization of the culture condition of *Bacillus mucilaginosus* using *Agaricus bisporus* industrial wastewater by Plackett-Burman combined with Box-Behnken response surface method[J]. AMB Express, 2018, 8(1): 141.
- [28] Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid[J]. Analytical Biochemistry, 1985, 150(1): 76-85.
- [29] Kapoor K N, Barry D T, Rees R C, et al. Estimation of peptide concentration by a modified bicinchoninic acid assay[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 393(1): 138-140.
- [30] Zhang S T, Shi J, Guo A G. Refolding of recombinant snake venoms fibrinolytic enzyme fibrolase[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2007, 7(4): 761-766. [张守涛, 史婧, 郭蔼光. 重组蛇毒纤溶酶 Fibrolase 的复性[J]. 过程工程学报, 2007, 7(4): 761-766.]

- [31] Behravan A, Hashemi A. RSM-based model to predict optimum fermentation conditions for soluble expression of the antibody fragment derived from 4D5MOC-B humanized Mab in SHuffle™ T7 *E. coli*[J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2021, 20(1): 254-266.
- [32] Chen H J, Li Q Y, Yin Y X, et al. Optimization of induction conditions of recombinant cyanide-degrading enzyme expressed in *E. coli*[J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(4): 737-743. [陈焕基, 李青云, 尹业兴, 等. 重组大肠杆菌表达降氰酶的诱导条件优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(4): 737-743.]
- [33] Liu J, Cui T B. Expression, characterisation, homology modelling and molecular docking of a novel M17 family leucyl-aminopeptidase from *Bacillus cereus* CZ[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(21): 15939.
- [34] Lei F F. An aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 and its application[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017. [雷芬芬. 海洋来源 *Bacillus licheniformis* SWJS33 所产氨肽酶的研究及应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.]
- [35] Zhang S H, Cai X P, Luo X N, et al. Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase gene from *Taenia pisiformis*[J]. Experimental Parasitology, 2018, 186: 1-9.
- [36] Vujčić Z, Lončar N, Dojnov B, et al. Characterisation of leucyl aminopeptidase from *Solanum tuberosum* Tuber[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 418-423.
- [37] Tang W, Li Z Z, Li C H, et al. High-level expression and characterization of the *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. BSP1 YwaD aminopeptidase in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 122: 23-30.
- [38] Hayman S, Patterson E K. Purification and properties of a mouse ascites tumor dipeptidase, a metalloenzyme[J]. Journal of Biological Chemistry, 1971, 246(3): 660-669.
- [39] Maret W. Inhibitory zinc sites in enzymes[J]. BioMetals, 2013, 26(2): 197-204.
- [40] Batool H, Akhthar M W, Saleem M. Characterization of a microbial keratinase with leather dehairing and feather waste management potential [J]. Journal of Animal & Plant Sciences, 2021, 31(4): 1132-1144.
- [41] Li M Z, Duan X Y, Wang J J, et al. Research progress on the bitter taste formation mechanism in protein hydrolysates and their enzymatic debittering and flavor improvement[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(6): 417-426. [李梦卓, 段雪妍, 王俊娟, 等. 蛋白质水解物的苦味形成机制及其酶解脱苦和风味改善的研究进展[J]. 食品工业科技, 2025, 46(6): 417-426.]

Gene cloning, heterologous expression and enzymatic properties of leucine aminopeptidase from *Euphausia superba*

TAN Jiahao^{1,2}, ZOU Huaying^{1,2}, SHENG Jun², WANG Fang^{2*}, CHEN Mengyao^{1,2}, SONG Jia^{2,3}, XU Jiakun^{2*}

1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266061, China

Abstract: The objective of this study was to screen and clone a leucine aminopeptidase gene (*EsLAP*) from the transcriptome of *Euphausia superba*, construct the recombinant expression vector *EsLAP*-PET-28A, and achieve soluble expression in *Escherichia coli* through co-expression of a molecular chaperone. The induction conditions were optimized by using the three-factor and three-level response surface method, and the enzymatic properties of the recombinant enzyme were systematically characterized. The total length of the *EsLAP* gene was 1569 bp, and it encoded 522 amino acids, with a theoretical molecular weight of 55302.67 Da and an isoelectric point of 6.16. Sequence and structural analysis indicated that EsLAP possesses typical peptidase catalytic domains and substrate-specific binding sites of M17 family peptidases. The optimal expression conditions of EsLAP were determined through response surface optimization as follows: IPTG concentration of 0.7 mmol/L, inoculation dose of 3%, and induction time of 19 h. Enzymatic property analysis showed that the optimal reaction temperature of EsLAP was 60 °C, the optimal pH was 8.5, the crude enzyme activity was 265.6 U/mL, and the specific enzyme activity was 33.15 U/mg. Metal ions Co^{2+} and Mn^{2+} can significantly enhance enzyme activity, among which Co^{2+} can increase enzyme activity to 296% of the original level. EDTA can significantly inhibit its enzymatic activity, indicating that EsLAP is a metalloproteinase. Strong reducing agents such as β -mercaptoethanol, NaBH_4 , and DTT significantly inhibit enzyme activity and can reduce the remaining enzyme activity to less than 10%. Substrate specificity analysis showed that EsLAP had the highest catalytic efficiency for Leu-pNA, further verifying that it was leucine aminopeptidase. This is the first report on the heterologous expression and enzymatic characteristics of leucine aminopeptidase derived from *Euphausia superba*. The related results provide a potential application basis for its use in the food and pharmaceutical industries to degrade N-terminal leucine-containing functional peptides.

Key words: *Euphausia superba*; aminopeptidase; heterologous expression; enzymatic properties

Corresponding author: XU Jiakun. E-mail: xujk@ysfri.ac.cn; WANG Fang. E-mail: wangfang@ysfri.ac.cn