

## 可溶性乳酸菌蛋白酶的克隆表达及酪蛋白源生物活性肽的制备

李 博<sup>1</sup>, 刘 地<sup>2\*</sup>, 燕平梅<sup>2</sup>, 武晓英<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>太原理工大学 太原 030024

<sup>2</sup>太原师范学院 生物科学与技术学院 山西晋中 030619)

**摘要** 目的:通过可溶性乳酸菌蛋白酶高效制备牛乳蛋白生物活性肽。方法:筛选具备高蛋白水解活性的优势乳酸菌,通过 PCR 技术扩增其蛋白酶基因的 Pre-H 结构域,去除编码细胞壁连接区域的序列,使其转化为可溶性蛋白。构建食品级乳酸乳球菌 NZ9000 表达载体,诱导目的蛋白酶的分泌表达,并分析其酶学特性及酪蛋白水解产物的生物活性。结果:筛选获得的优势乳酸菌菌株被鉴定为德氏乳杆菌乳酸亚种,其蛋白酶基因经改造后得到 *prtB3* 基因,成功构建重组表达载体 pNZ8048-*prtB3*,实现了蛋白酶 PrtB3 在乳酸乳球菌 NZ9000 中的高效分泌表达。与野生型蛋白酶相比,重组蛋白酶 PrtB3 的底物特异性显著拓宽,可有效降解  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\kappa$ -酪蛋白;PrtB3 水解物对血管紧张素转化酶(ACE)抑制率最高可达 78%,为野生型水解产物的 2 倍,半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 1.69 mg/mL,且 ACE 抑制活性在 8 周内保持稳定;同时,水解产物对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和大肠杆菌 K14 IBC 4004 的生长有明显的抑制作用。结论:成功克隆、表达了可溶性的乳酸菌蛋白酶 PrtB3,该酶可高效降解酪蛋白并显著提升水解产物的生物活性与稳定性,在降解酪蛋白制备生物活性肽方面具有潜力,为生物活性肽的高效制备提供了新的技术路径。

**关键词** 生物活性肽;酪蛋白;乳酸菌;可溶性蛋白酶;血管紧张素转化酶抑制肽;抑菌肽

**文章编号** 1009-7848(2026)01-0024-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.003

生物活性肽是由 2~20 个数量不等的氨基酸构成的功能活性片段,具有抑制血管紧张素转化酶(ACE)、抗菌、抗氧化、免疫调节等重要生理活性<sup>[1-7]</sup>。这类肽广泛存在于多种食源性蛋白中,乳制品是其重要且优质的来源之一<sup>[1,4,8-15]</sup>。在乳品领域,随着各类具有不同功能的乳源性生物活性肽陆续被开发,乳源肽正逐渐成为研究热点<sup>[2,16-17]</sup>。以牛乳为例,其蛋白质含量丰富,涵盖酪蛋白、乳清蛋白、乳球蛋白、乳铁蛋白以及一些具有关键生理功能的酶。其中,酪蛋白约占总蛋白含量的 80%,是牛乳蛋白的主体。酪蛋白属于全价蛋白质,由  $\alpha$ s1-和  $\alpha$ s2-酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白组成,能够为生物体的生长发育提供较全面的蛋白质营养<sup>[18-20]</sup>。有研究表明,从酪蛋白中能够分离出多种优质的生物活性肽<sup>[1,3-4,21]</sup>。

当生物活性肽处于前体蛋白中时,尚不具备活性,只有当其从蛋白质中释放后,才能展现生物

活性<sup>[1,22]</sup>。目前,从前体蛋白中获取生物活性肽主要采用酶解法、微生物发酵法以及化学法<sup>[15,23-27]</sup>。然而,不同方法各有优劣。化学法因化学药剂的添加易导致氨基酸变性,影响肽的质量与活性。酶解法具有较强的底物特异性,导致其可用于食品领域的蛋白酶种类较少,并且酶解法制备的生物活性肽往往带有不同程度的苦味<sup>[28-30]</sup>。相比之下,微生物发酵法具有成本低、无毒且安全可靠的优势,还能有效解决酶解产品有苦味的问题。在乳制品发酵过程中,乳酸菌发酵占主导地位。乳酸菌的蛋白水解系统拥有丰富的酶系,在细胞壁蛋白酶及各种胞内肽酶的协同作用下,蛋白质逐渐被水解,转化为各种多肽或游离氨基酸<sup>[8,31-33]</sup>。目前,通过乳酸菌发酵已经成功制得多种生物活性肽,如免疫调节肽、降血压肽、抗氧化肽和抗菌肽等<sup>[1,4,10-11,34-37]</sup>。然而,近年的研究表明,在微生物发酵过程中,产物的活性和稳定性容易受到发酵微生物的影响,而使产物的生物活性大打折扣,这在很大程度上限制了微生物发酵法在活性肽工业生产中的发展和应用<sup>[16,32]</sup>。此外,目前用于食品开发的蛋白酶生产源较为有限,很多优良的产酶菌株尚未被纳入食品安全菌种范畴。开发可以高效获取牛乳蛋白

收稿日期: 2025-02-10

基金项目: 山西省基础研究计划(自由探索类)项目  
(202103021223119)

第一作者: 李博,女,博士,讲师

通信作者: 刘地 E-mail: diliu@tynu.edu.cn

中生物活性肽的蛋白酶资源显得尤为重要。

在借助乳酸菌发酵制备生物活性肽的过程中,蛋白水解系统中的蛋白酶发挥着关键作用。目前,已有 5 种乳酸菌蛋白酶基因完成测序工作,对其结构和功能已有系统研究<sup>[38-44]</sup>。乳酸菌蛋白酶分子质量大约在 180~200 ku 之间,在细胞内,蛋白酶通常以不具备活性的前体蛋白形式存在。只有当蛋白酶 N 端的 Pre-Pro 结构域经肽酶 PrtM 的催化被水解后,蛋白酶才可被激活<sup>[45]</sup>。乳酸菌蛋白酶属于一种细胞壁连接蛋白,其 C 末端的 W 和 AN 结构域能够让蛋白在分泌至细胞外后仍与细胞壁相连。不过,该连接部分不会对蛋白酶的催化活性产生影响<sup>[46]</sup>。基于此,本研究通过基因工程手段,在确保蛋白酶催化活性不受影响的前提下,去除蛋白酶中编码细胞壁连接的部分,从而使蛋白酶被分泌至胞外后与菌体脱离,成为可溶性蛋白酶,用于降解酪蛋白,制备生物活性肽。针对获取可溶性蛋白酶,前期有研究采用降低培养液中钙离子浓度的方法,使蛋白酶与宿主细胞壁分离。此方法虽然可在一定程度上实现乳酸乳球菌蛋白酶与菌体的部分分离,但是对乳杆菌蛋白酶的分离效果极为有限<sup>[47-48]</sup>。

本研究筛选出具有高蛋白水解活性的乳酸菌菌株并对其进行鉴定。运用 PCR 技术分离菌株的蛋白酶编码基因 *prtB3*。改造后构建用于蛋白酶可溶性表达的载体 *pNZ8048prtB3*, 将其转化至食品级表达菌株乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) NZ9000, 借助 Nisin Controlled Gene Expression (NICE) 表达系统,实现重组蛋白酶的可控、分泌表达。随后,研究该可溶性蛋白酶的酶学性质,明确其反应条件、底物特异性等关键参数,并探究酪蛋白水解物的生物活性,包括 ACE 抑制活性和对常见病原菌的抗菌活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

试验中受试菌株源于实验室菌种收藏目录。培养基 MRS、GM17、感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和乳酸乳球菌 NZ9000 细胞、各种克隆过程试剂盒,如 PCR Super Mix、细菌基因组、质粒提取、DNA 连接、DNA 凝胶回收试剂盒、蛋白免疫印迹试验的

第一抗体 (Anti-MBP tag monoclonal antibody)、第二抗体 (Goat anti-mouse IgG/HRP)、Tris-HCl 缓冲液、FITC 荧光标记酪蛋白、三氯乙酸(TCA)、硼酸缓冲液、HEPES 缓冲液、考马斯亮蓝 R250、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、PBST 缓冲液、Tween-20、DAB 显色试剂盒以及诱导蛋白表达的乳酸链球菌素等,均购自北京索莱宝生物科技有限公司。半乳糖、乳糖、麦芽糖、甘糖醇、甘露糖、水杨酸、蔗糖(分析纯),国药集团化学试剂有限公司。 $\alpha$ - $\beta$ -和  $\kappa$ -酪蛋白、血管紧张素转化酶试剂盒,美国 Sigma-Aldrich 公司。克隆质粒 pBad、pNZ048,美国 Invitrogen 公司。Myc 标签(EQK-LISEEDL)蛋白纯化试剂盒,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。DNA 限制性内切酶,加拿大 Fermentas 公司。

### 1.2 仪器与设备

Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf;LS-50B 荧光分光光度计,美国 PerkinElmer;UV-2550 紫外分光光度计,日本岛津;C1000 Touch™ PCR 扩增仪、PowerPac™ Basic 琼脂糖凝胶电泳系统、ChemiDoc™ XRS+凝胶成像分析系统、Mini-PROTEAN® Tetra SDS-PAGE 电泳系统、Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer 湿式转膜仪,美国 Bio-Rad;CX31 生物显微镜,日本奥林巴斯;SW-CJ-2FD 超净工作台,苏州净化设备有限公司;Infinite® 200 PRO 酶标仪,瑞士 Tecan;AKTA Pure 25 蛋白质纯化系统,瑞典 Cytiva;ME204E 电子天平、FE28-Standard pH 计,瑞士梅特勒-托利多;HH-S4 恒温水浴锅,金坛区西城新瑞仪器厂;Alpha 1-2 LD plus 冻干机,德国 Christ;无菌打孔器(直径 4 mm),上海雷磁仪器厂;JY92-IIN 超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;MLS-3750 高压蒸汽灭菌锅,日本 SANYO;TS-100 脱色摇床,海门其林贝尔仪器制造有限公司;ZHUY-2102C 恒温摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;HZQ-F160 恒温振荡培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 菌株的筛选 参照 Kliche 等<sup>[32]</sup>的方法,将待测菌种接种至脱脂牛奶中,于 37 °C 培养,直至

达到稳定期。对菌液进行离心(8 000 r/min, 10 min), 弃上清液后, 将菌体收集至 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。调整菌体浓度使其在波长 600 nm 处的吸光值  $OD_{600nm}$  达到 20。通过测定菌株产蛋白酶活性进行筛选。

**1.3.2 蛋白酶活性测定** 将 20  $\mu$ L 待测样品与 40  $\mu$ L 经 FITC 荧光标记的酪蛋白在 37  $^{\circ}$ C 恒温条件下避光反应 60 min 后, 加入 300  $\mu$ L 三氯乙酸, 继续孵育 30 min 终止反应。反应结束后通过离心(14 000 r/min, 4  $^{\circ}$ C, 10 min) 将变性的蛋白质和细胞分离, 对上清液的荧光强度进行测定。利用 LS-50B 发光光谱仪, 在波长 490 nm 处激发, 并于波长 520 nm 处测量。

底物酪蛋白的转化率可通过公式(1)计算:

$$\text{转化率}(\%) = \frac{F_{\text{样品}} - F_{\text{空白}}}{F_{100\%} - F_{\text{空白}}} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $F_{\text{样品}}$  为待测样品的荧光强度;  $F_{\text{空白}}$  为荧光强度的空白值, 采用蒸馏水代替细菌悬浮液进行测定;  $F_{100\%}$  为荧光强度的 100% 值, 采用 Tris-HCl 缓冲液代替三氯乙酸进行测定。

**1.3.3 菌株分子生物学鉴定** 采用细菌基因组提取试剂盒提取待测菌株的 gDNA。以此为模板, 利用 PCR 对其 16S 全长区域进行扩增并测序。所使用引物为通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') 和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGT ACGACTT-3')。PCR 体系为: Super Mix 15  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L, 通用引物 27F(10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 通用引物 1492R(10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L。扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C, 5 min 预变性, 随后进行 35 个循环, 每个循环包括 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s 和 72  $^{\circ}$ C 90 s。测序由北京六合华大基因科技有限公司完成, 测序结果将在 NCBI 的 Genbank 数据库进行分析, 用 MEGA7.0 开展同源性分析, 以此确定菌株的种属。

**1.3.4 糖发酵试验** 将待测菌株接入不含葡萄糖的 MRS 培养基, 置于 40  $^{\circ}$ C 恒温环境中预培养 24 h。分别向无葡萄糖的 MRS 培养基中添加 20%(质量分数)的半乳糖、乳糖、麦芽糖、甘糖醇、甘露糖、水杨酸以及蔗糖。将预培养的菌种接种至上述含有不同糖类的培养基中, 同时设置 MRS 培养基(无糖)为空白对照组。通过监测菌体  $OD_{600nm}$  的变

化来评估菌体的生长情况。与对照组相比, 若  $OD_{600nm}$  值上升, 则将菌株利用该糖作为碳源的生长情况评定为阳性, 反之为阴性。

**1.3.5 克隆与表达** 以菌株的 gDNA 为模板, 使用引物 F-NcoI-prtB-Pre(5'-AGAAGACCATGG AGAAGAAAAATCCGCAC-3')R-prtB-XbaI-H(5'-TGTTGTTCTAGACTTCTTCGCGCTACT-3')<sup>[49]</sup> 对菌株的蛋白酶基因 Pre-H 区域进行扩增, 所获产物不包含蛋白酶的 W 及 AN 结构域。PCR 体系为: PCR Super Mix with high fidelity polymerase 15  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L, 引物 F-NcoI-prtB-Pre(10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 引物 R-prtB-XbaI-H(10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L。扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 35 个循环, 每个循环包括 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s 和 72  $^{\circ}$ C 5 min, 最后 72  $^{\circ}$ C, 10 min 延伸。为了将 Myc-His 标签融合到目标蛋白的 c 端, 利用 NcoI 和 XbaI 双酶切将目的片段 prtB3 重组于质粒载体 pBad/gIII A, 构建重组质粒 pBadprtB3。将 pBadprtB3 转化至大肠杆菌(*E. coli*)DH5 $\alpha$ , 挑取克隆并进行小量抽提质粒。经 NcoI 和 XbaI 酶切后用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。将完成鉴定的质粒送北京六合华大基因科技有限公司进行基因测序, 验证克隆是否成功。

使用食品级蛋白表达菌种乳酸乳球菌 NZ9000 用于目标蛋白的表达<sup>[50]</sup>。在该菌株中, 在信号肽的引导下, 目标蛋白可被分泌至上清, 从而获得可溶性的目标蛋白。将 pBadprtB3 质粒经 NcoI 和 PmeI 双酶切处理, 通过凝胶电泳分离编码蛋白酶的片段 prtB3Pre-H-MycHis6, 将其与经过 NcoI 和 Eco53ki 酶切处理的 pNZ8048 连接, 得到质粒 pNZ8048prtB3, 转化至乳酸乳球菌 NZ9000。涂板培养过夜后, 挑取单个菌落提取质粒进行酶切与测序验证。将含有 pNZ8048prtB3 质粒的乳酸乳球菌 NZ9000 接种入 GM17 培养基中, 在 30  $^{\circ}$ C, 150 r/min 条件下振荡培养 24 h 后, 扩大培养至 1 L 体系, 培养至  $OD_{600nm}$  为 0.8 时, 通过向培养液中添加 10 ng/mL 乳酸链球菌素诱导目标蛋白表达。继续培养 20 h 后离心收集上清液, 为粗酶液。

**1.3.6 蛋白纯化** 粗酶液通过蛋白纯化仪及 MYC 标签融合蛋白纯化试剂盒进行纯化, 将纯化

后的洗脱液置于含 PBS 缓冲液的透析袋中,透析过夜,随后用 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。

1.3.7 SDS-PAGE 参照 Laemmli<sup>[51]</sup>的方法。分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 4.5%,样品上样量为 15  $\mu\text{L}$ 。电泳开始阶段,设置电压为 45 V,当样品从浓缩胶进入分离胶后,将电压调至 65 V,直到样品距离分离胶末端 1.5 cm 时停止。使用考马斯亮蓝 R250 染色,双蒸水脱色过夜。

1.3.8 蛋白质免疫印迹检测 为进一步验证纯化的蛋白质是否为目标蛋白,对样品进行蛋白质免疫印迹检测。蛋白质经 12% SDS-PAGE 分离后,通过湿式转膜法将蛋白转印至 PVDF 膜上,使用含 5%脱脂奶粉的 PBST 对样品进行封闭 5 h 后;将膜放入含有 1:1 000 稀释的小鼠抗 His 单克隆抗体的 PBST 缓冲液中,在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;使用 PBST 洗膜 3 次,以去除未结合的抗体。继续将膜放入 1:1 500 稀释的第二抗体 (HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG),室温孵育 2 h;PBST 洗膜 3 次,确保去除未结合的第二抗体。最后向 PVDF 膜上滴加 0.5 mL DAB 反应物,对膜上的蛋白质进行显色反应,并记录结果。

1.3.9 蛋白酶降解特异性分析 通过分析蛋白酶对不同组分  $\alpha$ - $\beta$ - $\kappa$ -酪蛋白的降解作用,分析蛋白酶对底物降解的特异性。取 100  $\mu\text{L}$  1 mg/mL 蛋白酶溶液,分别加入 100  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 的  $\alpha$ - $\beta$ - $\kappa$ -酪蛋白标准品中,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下,反应 30 min 后,沸水浴 5 min 灭酶,利用 SDS-PAGE 分析测定蛋白水解程度。

1.3.10 酪蛋白酶解物的制备 称取酪蛋白 0.5 g,溶解于 100 mL 蒸馏水中,制成酪蛋白溶液。构建反应体系,包含 200 mL 酪蛋白溶液、200 mL 硼酸缓冲液和 100 mL 蛋白酶(1 mg/mL)。水解过程维持在 37  $^{\circ}\text{C}$ ,并持续搅拌,分别在 0,6,9,24 h 取样,煮沸 5 min 灭酶终止反应。待样品冷却后离心(4  $^{\circ}\text{C}$ ,4 000 r/min,20 min)收集上清液,于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存,待进一步分析。通过 SDS-PAGE 测定酪蛋白的水解度,并将其余上清液冻干,对其生物活性进行检测。

1.3.11 ACE 抑制活性 参照 Cao 等<sup>[52]</sup>的方法,对 ACE 抑制率进行测定,利用酶标仪测定波长 340 nm 处底物 FAPGG 吸光度的变化,以此来表征待

测样品对 ACE 的抑制程度。在透明的 96 孔板中加入 10  $\mu\text{L}$  0.1 U/mL 的 ACE,将 40  $\mu\text{L}$  待测样品添加至样品孔中,同时将 40  $\mu\text{L}$  80 mmol/L HEPES 缓冲液(pH 8.3)添加至空白对照孔。最后向每个孔加入 50  $\mu\text{L}$  预热的 1 mmol/L FAPGG 底物后,立即将其混合均匀。底物 FAPGG 溶解于含 0.3 mol/L NaCl 的 80 mmol/L 的 HEPES 缓冲液中。在波长 340 nm 下使用酶标仪测定对照孔和样品孔的初始吸光度,在黑暗中 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温条件下反应 30 min 后,再次测定其吸光度。ACE 抑制活性通过公式(2)计算:

$$\text{ACE 抑制率}(\%) = \frac{(A-B)}{A} \times 100 \quad (2)$$

式中:A 为空白对照的吸光度减少值;B 为样品的吸光度减少值。

1.3.12 水活性测定 为测定所制备的蛋白水解物的储存稳定性,按照 Kliche 等<sup>[32]</sup>的方法对样品的水活性( $a_w$  值)进行测定。

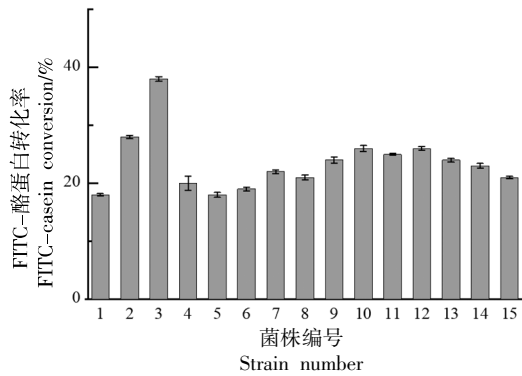
1.3.13 抗菌活性 通过脂孔扩散法<sup>[53]</sup>对样品的抑菌活性进行测定。选用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、阪崎克罗诺杆菌作为指示菌。将 1 mL 指示菌液(菌量约为  $1 \times 10^6$  CFU/mL)接种至 100 mL LB 固体培养基中,混匀后倾注平板,平板冷却凝固后用直径为 4 mm 的无菌打孔器在平板上打孔,然后将 30  $\mu\text{L}$  待测样品注入琼脂孔中,在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h 后,观察并测量抑菌圈直径。试验重复 3 次,取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种的筛选与鉴定

2.1.1 筛选具备高水解活性的优势乳酸菌菌株 利用 FITC 荧光标记的酪蛋白作为反应底物,通过评估菌株对底物蛋白的转化率来衡量菌株的水解活性并进行筛选。对 15 株待测乳酸菌的试验结果显示,这些菌株均具备一定程度的酪蛋白水解活性。各菌株的转化率详见图 1,其中 3 号菌株表现最为突出,在 48 h 内对 FITC 荧光标记蛋白的转化率接近 40%。基于此,本研究选定 3 号菌株作为后续试验的研究对象。

2.1.2 优势菌株鉴定 菌落在 MRS 固体培养基表面呈圆形,凸起,表面光滑,淡黄色,直径约为 0.3



注:以 FITC 荧光标记的酪蛋白作为反应底物,蛋白酶的活性通过底物酪蛋白的转化率表示。

图 1 筛选具备蛋白水解活性的乳酸菌

Fig.1 Screening of lactic acid bacteria with proteolytic activity

表 1 通过对不同种类糖的发酵特性对 3 号菌株进行鉴定

Table 1 Identification of strain 3 through fermentation with different carbohydrate

菌种	半乳糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	甘露糖	水杨酸	蔗糖
德氏乳杆菌德氏亚种	-	-	+/-	-	+	-	+
德氏乳杆菌乳酸亚种	+/-	+	+	-	+	+	+
3 号菌	+	+	+	-	+	+	+

注:“+”表示该菌种可利用对应碳源(生长良好,碳源利用能力强);“-”表示该菌种不能利用对应碳源(无明显生长,碳源利用能力缺失);“+/-”表示该菌种对应碳源的利用能力较弱或不稳定(生长一般,碳源利用效果不显著)。

## 2.2 蛋白酶基因的克隆、表达及蛋白纯化

通过 PCR 对 3 号菌株的基因组 DNA 进行特异性扩增,得到 PCR 产物。经琼脂糖凝胶电泳检测(图 2),其条带位置与理论上乳酸菌蛋白酶基因(Pre-H 结构域)片段大小 5 043 bp 相符。经测序后验证该片段为乳酸菌蛋白酶 PrtBPre-H 结构域的编码基因,且未检测到突变,表明基因 *prtB3Pre-H*(*prtB3*)分离成功。

首先,将 *PrtB3* 基因片段克隆至 pBad/gIII A 质粒。由此,目标基因与质粒 pBad 上的 myc 和 his 标签相融合,这 2 个标签分别用于目标蛋白的纯化和鉴定。为实现目标蛋白的分泌表达,进一步将目标基因及 myc 和 his 标签的片段从 pBad 中克隆至表达质粒 pNZ8048,随后将其转化至表达菌株乳酸乳球菌 NZ9000。对转化后得到的阳性菌落进行 PCR 和测序验证,结果显示,其与目的基因序列一致,表明表达载体 pNZ8048prtB3 构建成功。在表达菌株乳酸乳球菌 NZ9000 中,目标蛋白经乳酸链球菌素诱导,在信号肽的引导下分泌进入上清,从而获得可溶性的目的蛋白。分泌表达不

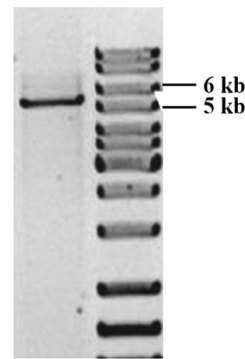


图 2 PCR 产物 *prtB3* 基因的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the PCR product *prtB3* gene

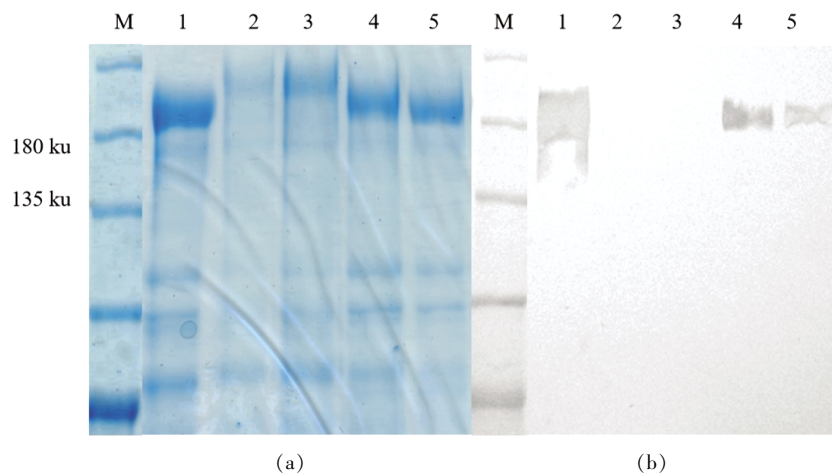
仅利于后续的蛋白分离纯化,还为进一步研究目标蛋白的功能和性质奠定了良好基础。

目标蛋白的表达采用 SDS-Page 进行检测。蛋白酶可溶性衍生物 PrtB3,包含蛋白酶 Pro 结构域至 H 结构域,理论分子质量约为 181 ku。SDS-Page 结果(图 3)显示,在 10 ng/mL 乳酸链球菌素诱导下,菌液上清液泳道的 180 ku 处可见明显条带,与预测的目标蛋白分子质量大小吻合,此结果

mm。分子生物学鉴定以菌株的 16S rDNA 序列为依据,经测序所获 16S rDNA 序列与德氏乳杆菌属(*Lactobacillus. delbrueckii*)的乳酸亚种(*lactis*)和德氏亚种(*delbrueckii*)呈现出较高同源性,由此判断该菌株归属于德氏乳杆菌属,而仅依据其 16S rDNA 序列对于亚种的鉴定尚不明确。为此,进一步比较菌种对不同种类糖的发酵特性差异,以辅助亚种鉴定。表 1 结果显示,3 号菌株在糖的发酵特性方面与德氏乳杆菌乳酸亚种一致。综合分子生物学 16S rDNA 序列与糖发酵特性结果,最终将该菌株鉴定为德氏乳杆菌乳酸亚种。

表明 PrtB3 在上清液中的成功表达。蛋白经 myc-tag 纯化后,在洗脱液中得以富集。Western Blot 结果显示,菌液上清液和洗脱液在 180 ku 处均存在特异性反应条带,纯化后的蛋白呈现单一条带,未

见杂带出现,纯度较高。综上,目标蛋白在表达菌种中经诱导表达后,能够分泌至上清液,实现蛋白酶的可溶性表达。



注: M. 蛋白质 marker; 1. 菌上清液; 2. 流出液; 3. 清洗液; 4 和 5 为洗脱蛋白液。

图 3 纯化蛋白酶 PrtB3 的 SDS-Page(a) 和 Western blot(b) 分析

Fig.3 SDS-PAGE (a) and Western blot (b) analysis of purified PrtB3

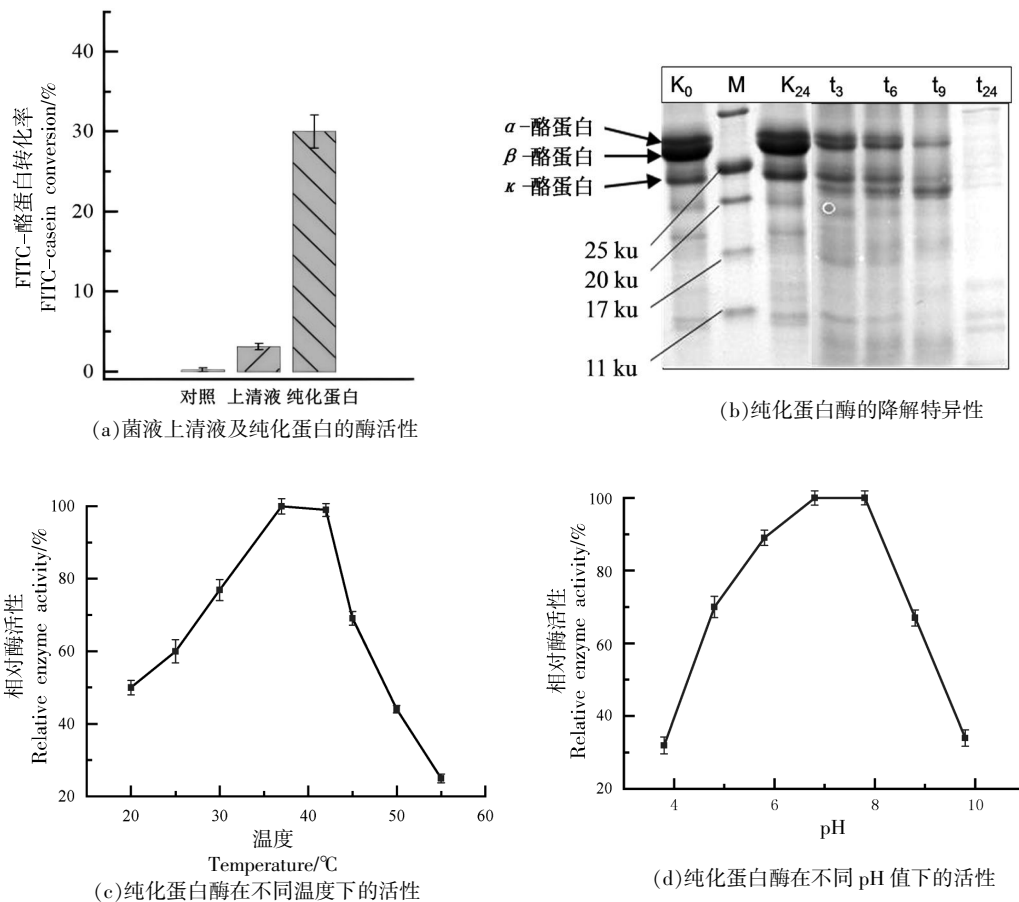
### 2.3 可溶性蛋白酶的催化活性

在对比可溶性蛋白酶纯化前、后的酶活发现,纯化前菌液上清液在 2 h 内对 FITC 酪蛋白的转化率仅为 3.1%,经过纯化后,该转化率显著升高至 30%,达到上清液的 9.6 倍(图 4a)。因为菌液上清液中存在的细菌代谢物可能对酶活性产生不利影响。而经过亲和纯化的蛋白纯度较高,基本不含有其它杂质,这些杂质原本可能会影响正常酶活性,被去除后,酶活性大幅提升。在不含有表达载体的乳酸乳球菌 NZ9000 对照培养物 NC 组中,未检测到蛋白酶活性。结果表明,本试验中所观察到的蛋白酶活性确实是由重组表达的蛋白酶 PrtB3 所产生。

为进一步明确蛋白酶衍生物 PrtB3 对底物酪蛋白降解的特异性,采用 SDS-Page 对其降解过程进行研究。结果显示,可溶性蛋白酶能够在不同程度上降解  $\alpha$ - $\beta$ -和  $\kappa$ -酪蛋白(图 4b)。在反应开始的 3 h 后,可以观察到  $\alpha$ - $\beta$ -酪蛋白所对应的条带变弱,同时出现一些新的小分子质量的条带,这表明  $\alpha$ - $\beta$ -酪蛋白降解并生成新的产物。对  $\kappa$ -酪蛋白的降解集中发生在 9 h 之后,24 h 后底物蛋白

条带基本消失,表明底物蛋白基本被降解。上述结果有力地证实了目标蛋白酶 PrtB3 对不同组分  $\alpha$ - $\beta$ -和  $\kappa$ -酪蛋白的降解能力。与该菌株野生型蛋白酶相比,蛋白酶衍生物的底物特异性发生显著改变,野生型蛋白酶仅可降解  $\alpha$ -酪蛋白<sup>[32]</sup>。这种底物特异性的变化可能归因于可溶性酶的结构以及性质的变化。酶衍生物脱离了细胞后被分泌至上清液,可溶性的状态利于酶与底物的相互作用,促进了酶与原本不易结合的底物能相互作用,由此扩大了酶的底物特异性,从而生成更多的肽<sup>[49]</sup>。

在探讨该酶催化底物酪蛋白降解的最适温度和 pH 值条件时,发现其在 20~55 °C 范围内,蛋白酶具备一定的催化活性,最高酶活性集中在 37~40 °C 之间。当温度降低至 20 °C 或升高至 55 °C 时,活性分别下降到最高活性的 45% 和 25.8% (图 4c)。该酶具有较为宽泛的 pH 值适应性,在 pH 7~8 之间酶活性最高,在偏酸性和碱性环境下,酶活性迅速下降。pH 值为 4 和 10 时,酶活性仅为最高活性的 30% (图 4d)。微生物酶的最适反应条件与菌株的最适生长环境相符,极端的环境条件都会抑制菌株的正常生长和蛋白的正常表达,进而



注:分图 b 中,  $K_0$  为反应时间为 0 的对照样品; M 为蛋白 Marker;  $K_{24}$  为 24 h 后的对照样品;  $t_3$ 、 $t_6$ 、 $t_9$  和  $t_{24}$  分别为反应 3、6、9、24 h 后的待测样品。

图 4 纯化蛋白酶的水解活性

Fig.4 Proteolytic activity of the purified proteinase

影响酶的活性。

#### 2.4 酪蛋白酶解产物的生物活性分析

针对 PrtB3 降解酪蛋白所产生的水解物,开展了抑制血管紧张素 I 转换酶(ACE)和抑菌活性的相关研究。水解物的 ACE 抑制活性随水解物浓度的变化曲线如图 5a 所示。在蛋白质量浓度为 0.5~8 mg/mL 时,随水解液蛋白质量浓度的增大,ACE 抑制活性逐渐增强,抑制率最高达到 78%,半抑制浓度  $IC_{50}$  值为 1.69 mg/mL。然而,该菌株野生型蛋白酶水解液在相同浓度范围内,其 ACE 抑制率最高仅为 38%<sup>[32]</sup>。蛋白酶衍生物水解物的 ACE 抑制活性相较于野生型蛋白酶水解物提升了 1 倍,表明可溶性蛋白酶在水解酪蛋白以生成 ACE 抑制肽方面,具有明显优势。

从水解产物 ACE 抑制活性的稳定性试验结

果可知(图 5b),在 0~8 周内,蛋白酶衍生物水解物的 ACE 抑制活性由最初的 78%下降至 72%,仅出现了 0.08%的轻微下降。然而,野生型蛋白酶水解物的 ACE 抑制活性则从最初初始的 38%大幅下降至 18%,8 周内酶活性降幅高达 52.6%。这一结果清晰表明,可溶性蛋白酶的水解物具有较好的稳定性。在测定水解物 ACE 抑制活性的同时,还对冻干物的水活度进行了检测。结果显示,在储存期间水活度没有明显变化,2 个样品的水活度均稳定保持在 0.11 左右,仅出现非常轻微的回潮现象,对 ACE 抑制活性的变化可以忽略不计。由此可见,可溶性蛋白酶在显著提升酪蛋白水解产物 ACE 抑制活性的同时,还极大地增强了其长期稳定性。在对菌株 92059 的可溶性蛋白酶降解酪蛋白的研究中,也观察到类似现象,PrtB92059 的可

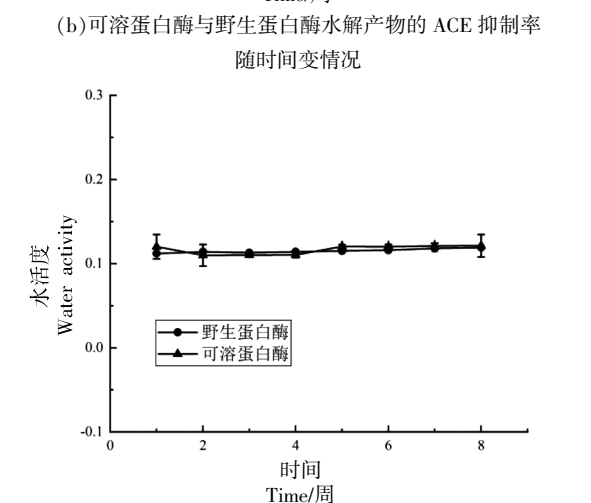
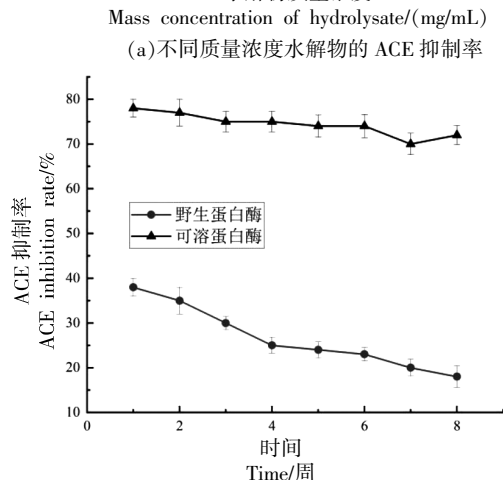
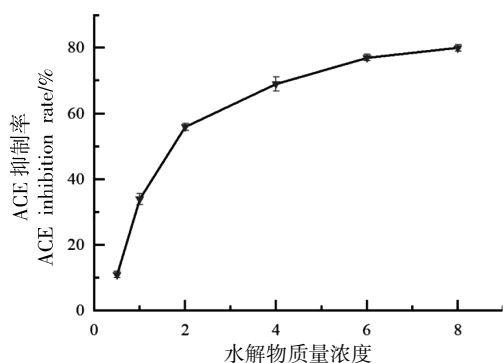


图 5 酪蛋白水解物的 ACE 抑制活性

Fig.5 ACE-inhibition of casein hydrolysate

溶性衍生物 PrtBb 与 PrtB2 可以实现对底物酪蛋白的深度降解,生成更多的小肽,并且产物的生物活性包括抗炎活性和抗 ACE 活性,均有显著提升<sup>[49]</sup>。前期研究已经证实,可从酪蛋白中分离出多种 ACE 抑制肽,包括常见的源自  $\beta$ -酪蛋白的 Ile-

Pro-Pro 和 Val-Pro<sup>[54]</sup>、集中于  $\beta$ -酪蛋白 f58-68 和 f166-209 区域的肽<sup>[55-59]</sup>,以及源自  $\alpha$ s1/s2-和  $\kappa$ -酪蛋白的一系列 ACE 抑制肽<sup>[60-62]</sup>。本研究结果中 ACE 抑制活性的提升归因于多方面因素。首先,蛋白酶衍生物降解底物特异性有所扩展,除了对  $\beta$ -酪蛋白的降解外,对  $\alpha$ -以及  $\kappa$ -酪蛋白的降解使蛋白酶的水解物具有更高的 ACE 抑制活性。其次,可溶性蛋白酶与细菌的分离是导致水解物 ACE 活性升高的重要因素。一方面,在水解过程中,释放出的肽不会被细胞吸收,提高了生物活性肽在水解物中的占比<sup>[32]</sup>;另一方面,水解产物的生物活性不再受细菌影响。相关研究报道,细菌共存会对水解产物的生物活性(如抗 TNF $\alpha$  活性)产生负面影响。

蛋白酶衍生物 PrtB3 水解酪蛋白所产生的水解物,对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和大肠杆菌 K14 IBC 4004 以及阪崎克罗诺杆菌的抑菌效果见表 2。该水解物对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和大肠杆菌 K14 IBC 4004 生长具有明显的抑制作用,这表明水解产物中含有能够抑制革兰氏阳性和革兰氏阴性微生物生长的有效成分。酪蛋白是抗菌肽的重要来源。目前,已从  $\alpha$ s1/s2-、 $\beta$ -酪蛋白中分离出多种抗菌肽,如伊斯拉西肽 (Isradicin),  $\alpha$ s1-酪蛋白 (16~38)<sup>[63-64]</sup>、 $\alpha$ s-酪蛋白 (165~181)<sup>[65]</sup>,来自  $\beta$ -酪蛋白 (184~210) 的 Casocidin-I 卡索西丁-I<sup>[66]</sup>等。这些抗菌肽能够有效抑制枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和李斯特菌等细菌的增殖。这些抗菌肽结构相似,含 26~29 个氨基酸,带轻微正电荷。它们可通过破坏细菌细胞壁磷脂的通透性,致细胞死亡<sup>[36]</sup>。而哺乳动物的细胞膜以中性磷脂为主,抗菌肽不易与之结合,故对哺乳动物的危害很小<sup>[67]</sup>。此外,抗菌肽还含有较多非极性疏水氨基酸残基,其 C 末端的脯氨酸可以保

表 2 可溶性 PrtB3 蛋白酶酪蛋白水解物的抑菌圈直径

Table 2 Biosphere diameter of the soluble PrtB3 proteinase produced casein hydrolysate

菌种	抑菌圈直径/mm
金黄色葡萄球菌 ATCC 25923	21 ± 2.2
大肠杆菌 K14 IBC 4004	18 ± 1.0
阪崎克罗诺杆菌	6 ± 1.0

护其不被降解<sup>[68]</sup>。本研究已经证实 $\alpha$ - $\beta$ -及 $\kappa$ -酪蛋白发生了水解,水解产物可能包含一些已知或者未知的抗菌肽片段。然而,由于未对水解产物进行分离与鉴定,无法确定单个肽的生物活性,其抗菌活性可能是由肽混合物中的1种或多种肽产生。近年来,抗菌肽因其具有广谱的抗菌活性,不易产生耐药性,并且无毒副作用,有潜力成为抗生素的有效替代品<sup>[67]</sup>。

### 3 结论

本研究成功筛选并鉴定出1株具备高蛋白水解活性的乳酸菌德式乳杆菌乳酸亚种。通过基因工程技术对其蛋白酶基因 $prtB3$ 进行分离与改造,构建重组表达载体后,在食品级乳酸菌NZ9000中实现了可溶性乳酸菌蛋白酶PrtB3的高效诱导表达。通过myc-tag纯化获得目标蛋白PrtB3,该酶在37~40℃,pH 7~8的范围内酶活性达到最高,可降解 $\alpha$ - $\beta$ -和 $\kappa$ -酪蛋白。与野生型蛋白酶相比,PrtB3的底物降解特异性发生改变,其催化产生的酪蛋白水解物的ACE抑制活性、稳定性均显著提升。同时,该水解产物对金黄色葡萄球菌ATCC 25923和大肠杆菌K14 IBC 4004的生长具有显著抑制作用。综上,本研究制备的可溶性乳酸菌蛋白酶PrtB3显著增强了对酪蛋白的降解能力,有效提升了水解物的生物活性及稳定性,为酪蛋白源生物活性肽的制备提供了新思路。

### 参 考 文 献

- [1] SINGH N, GAUR S. New insights into multifunctional aspects of milk derived bioactive peptides: A review [J]. Food Chemistry Advances, 2024, 4: 100628.
- [2] BELLAVER E H, REDIN E E, DA COSTA I M, et al. Food peptidomic analysis of bovine milk fermented by *Lactocaseibacillus casei* LBC 237: In silico prediction of bioactive peptides and anticancer potential [J]. Food Research International, 2024, 180: 114060.
- [3] 傅丽娟, 邢路娟, 张万刚. 食源性抗炎活性肽的研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(8): 343-352.
- [4] 沈圆圆, 于福田, 赵笑颖, 等. 食源性抗炎活性肽对肠道炎症的作用研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(7): 305-316.
- [5] SHEN Y Y, YU F T, ZHAO X Y, et al. Progress in the study of the effect of food-derived anti-inflammatory peptides on intestinal inflammation [J]. Food Science, 2022, 43(7): 305-316.
- [6] SINGH B P, ALUKO R E, HATI S, et al. Bioactive peptides in the management of lifestyle-related diseases: Current trends and future perspectives [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(17): 4593-4606.
- [7] 高正杰, 焦叶, 刘岩杰, 等. 豌豆肽生物活性与作用机制研究进展[J]. 中国食品学报, 2024, 24(7): 377-386.
- [8] GAO Z J, JIAO Y, LIU Y J, et al. Research progress on bioactivity and mechanism of pea peptide [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(7): 377-386.
- [9] 李龙, 傅志宇, 姜鹏飞, 等. 海参肽的生物活性及作用机制[J]. 中国食品学报, 2023, 23(12): 407-420.
- [10] LI L, FU Z Y, JIANG P F, et al. Biological functions and mechanism of sea cucumber peptide [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(12): 407-420.
- [11] ABD EL-SALAM M H, EL-SHIBINY S. Reduction of milk protein antigenicity by enzymatic hydrolysis and fermentation. A review [J]. Food Reviews International, 2021, 37(3): 276-295.
- [12] AMORIM F G, COITINHO L B, DIAS A T, et al. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules [J]. Food Chemistry, 2019, 282: 109-119.
- [13] SAH B N P, VASILJEVIC T, MCKECHNIE S, et al. Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(5): 726-740.
- [14] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins [J].

- Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410 (15): 3407–3423.
- [12] BECHAUX J, GATELLIER P, LE PAGE J F, et al. A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications [J]. Food and Function, 2019, 10(10): 6244–6266.
- [13] SHIVANNA S K, NATARAJ B H. Revisiting therapeutic and toxicological fingerprints of milk-derived bioactive peptides: An overview[J]. Food Bioscience, 2020, 38: 100771.
- [14] 邢路娟, 郝月静, 左庆翔, 等. 金华火腿中生物活性肽的血管紧张素转化酶调节功能及其分离纯化[J]. 中国食品学报, 2023, 23(5): 78–86.
- XING L J, HAO Y J, ZUO Q X, et al. Angiotensin-converting enzyme regulatory function of bioactive peptides in Jinhua dry-cured ham and its isolation and purification[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23 (5): 78–86.
- [15] 王瑞雪, 伊丽, 吉日本图. 驼乳生物活性肽的研究进展[J]. 中国食品学报, 2020, 20(7): 299–306.
- WANG R X, YI L, JIRIMUTU. Research progress on the bioactive peptides in camel milk [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(7): 299–306.
- [16] ANAL A K, PERPETUINI G, PETCHKONGKAEW A, et al. Food safety risks in traditional fermented food from South-East Asia[J]. Food Control, 2020, 109: 106922.
- [17] 李新科, 高亚男, 王加启, 等. 五种特色乳中活性蛋白及活性肽的生物活性功能研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(8): 3331–3343.
- LI X K, GAO Y N, WANG J Q, et al. Research advances in the biological activities of active proteins and peptides in five specialty milk [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2024, 55 (8): 3331–3343.
- [18] SHEN W L, MATSUI T. Intestinal absorption of small peptides: A review[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(6): 1942–1948.
- [19] HAFEEZ Z, CAKIR-KIEFER C, ROUX E, et al. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products[J]. Food Research International, 2014, 63: 71–80.
- [20] 贤歌, 刘慧敏, 王加启, 等. 牛奶中 A1 和 A2  $\beta$ -酪蛋白的结构、功能和检测方法研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(12): 5440–5451.
- XIAN G, LIU H M, WANG J Q, et al. Structures, functions and detection methods of A1 and A2  $\beta$ -casein in milk[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2024, 55(12): 5440–5451.
- [21] MILLAN-LINARES M C, RIVERO-PINO F, GONZALEZ-DE LA ROSA T, et al. Identification, characterization, and molecular docking of immunomodulatory oligopeptides from bioavailable hempseed protein hydrolysates[J]. Food Research International, 2024, 176: 113712.
- [22] CHEN Y X, CHEN J C, CHEN J, et al. Recent advances in seafood bioactive peptides and their potential for managing osteoporosis[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(5): 1–17.
- [23] VALENCIA P, VALDIVIA S, NUÑEZ S, et al. Assessing the enzymatic hydrolysis of salmon frame proteins through different by-product/water ratios and pH regimes[J]. Foods, 2021, 10(12): 3045.
- [24] GALLEGO M, MORA L, ESCUDERO E, et al. Bioactive peptides and free amino acids profiles in different types of European dry-fermented sausages [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 276: 71–78.
- [25] LE T D, SUTTIKHANA I, ASHAOLU T J. Unconventional production strategies, action mechanisms, and structure-functional attributes of food-derived peptides[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 144: 109054.
- [26] CRUZ-CASAS D E, AGUILAR C N, ASCACIO-VALDÉS J A, et al. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides [J]. Food Chemistry, 2021, 3: 100047.
- [27] 王宝丽, 张开屏, 刘嘉琪, 等. 发酵肉制品中生物活性肽的研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, 21 (6): 350–359.
- WANG B L, ZHANG K P, LIU J Q, et al. Research progress on the bioactive peptides in fermented meat products[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21 (6): 350–359.
- [28] 张玉红, 王左. 生物活性肽制备方法的研究进展[J]. 食品科技, 2024, 49(2): 255–262.
- ZHANG Y H, WANG Z. Recent advances in the production of bioactive peptides[J]. Food Science and

- Technology, 2024, 49(2): 255–262.
- [29] GE H F, CAI Z Z, CHAI J L, et al. Egg white peptides ameliorate dextran sulfate sodium-induced acute colitis symptoms by inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines and modulation of gut microbiota composition [J]. Food Chemistry, 2021, 360: 129981.
- [30] 高婧昕, 李天歌, 郭凯睿, 等. 乳酸菌发酵对乳清蛋白酶解物风味和免疫调节活性的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(8): 258–264.
- GAO J X, LI T G, GUO K R, et al. Effects of lactic acid bacteria fermentation on flavor improvement and immunomodulatory activity of whey protein hydrolysate[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(8): 258–264.
- [31] SAVIJOKI K, INGMER H, VARMANEN P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(4): 394–406.
- [32] KLICHE T, LI B, BOCKELMANN W, et al. Screening for proteolytically active lactic acid bacteria and bioactivity of peptide hydrolysates obtained with selected strains [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(20): 7621–7633.
- [33] PATIL S, KUMARI V B C, PRADEEP S, et al. Bioactive peptides: Its production and potential role on health[J]. International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology, 2020, 7(1): 167–182.
- [34] GOLKAR A, MILANI J M, VASILJEVIC T. Altering allergenicity of cow's milk by food processing for applications in infant formula[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(1): 159–172.
- [35] FITZGERALD R J, MURRAY B A. Bioactive peptides and lactic fermentations[J]. International Journal of Dairy Technology, 2006, 59(2): 118–125.
- [36] KORHONEN H, PIHLANTO A. Bioactive peptides: Production and functionality [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 945–960.
- [37] 邢路娟, 左庆翔, 郝月静, 等. 金华火腿中生物活性肽的抗高血压活性研究[J]. 中国食品学报, 2023, 23(1): 135–142.
- XING L J, ZUO Q X, HAO Y J, et al. Studies on the antihypertensive activity of bioactive peptides in Jinhua dry-cured ham[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(1): 135–142.
- [38] GILBERT C, ATLAN D, BLANC B, et al. A new cell surface proteinase: Sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(11): 3059–3065.
- [39] VOS P, SIMONS G, SIEZEN R J, et al. Primary structure and organization of the gene for a procaryotic, cell envelope-located serine proteinase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(23): 13579–13585.
- [40] KOK J, LEENHOUTS K J, HAANDRIKMAN A J, et al. Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(1): 231–238.
- [41] PASTAR I, TONIC I, GOLIC N, et al. Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 5802–5811.
- [42] HOLCK A, NAES H. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. paracasei NCDO 151 [J]. Journal of General Microbiology, 1992, 138(7): 12.
- [43] FERNANDEZ-ESPLA M D, GARAUULT P, MONNET V, et al. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: Release, purification, and biochemical and genetic characterization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 4772–4778.
- [44] PEDERSON J A, MILESKI G J, WEIMER B C, et al. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CN-RZ32 [J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(15): 4592–4597.
- [45] SIEZEN R J. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999, 76(1/2/3/4): 139–155.
- [46] GERMOND J E, DELLEY M, GILBERT C, et al. Determination of the domain of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus cell surface proteinase PrtB involved in attachment to the cell wall after heterologous expression of the prtB gene in *Lacto-*

- coccus lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3377–3384.
- [47] LUO L L, ZHONG A, WANG Q, et al. Structure-based pharmacophore modeling, virtual screening, molecular docking, ADMET, and molecular dynamics (MD) simulation of potential inhibitors of PD-L1 from the library of marine natural products[J]. Marine Drugs, 2022, 20(1): 29.
- [48] SCOLARI G, VESCOVO M, ZACCONI C, et al. Extraction and partial characterization of proteolytic activities from the cell surface of *Lactobacillus helveticus* Zuc2[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(10): 3800–3809.
- [49] LI B, HABERMANN D, KLICHE T, et al. Soluble *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus 92059 PrtB proteinase derivatives for production of bioactive peptide hydrolysates from casein[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(6): 2731–2743.
- [50] CHRISTIAENS H, LEER R J, POUWELS P H, et al. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(12): 3792–3798.
- [51] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.
- [52] CAO S M, WANG Y, HAO Y J, et al. Antihypertensive effects *in vitro* and *in vivo* of novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from bovine bone gelatin hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(3): 759–768.
- [53] 谭才邓, 朱美娟, 杜淑霞, 等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. 食品工业, 2016, 37(11): 122–125.
- TAN C D, ZHU M J, DU S X, et al. Study on the inhibition zone method in antimicrobial test[J]. The Food Industry, 2016, 37(11): 122–125.
- [54] PUNIA H, TOKAS J, MALIK A, et al. Identification and detection of bioactive peptides in milk and dairy products: Remarks about agro-foods [J]. Molecules, 2020, 25(15): 3328.
- [55] MEISEL H, BOCKELMANN W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: Proteolytic activation and thropho-functional properties[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999, 76(1/2/3/4): 207–215.
- [56] GOBBETTI M, FERRANTI P, SMACCHI E, et al. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. cremoris FT4[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 3898–3904.
- [57] MINERVINI F, ALGARON F, RIZZELLO C G, et al. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5297–5305.
- [58] EBNER J, ARSLAN A, FEDOROVA M, et al. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or Kefir grains[J]. Journal of Proteomics, 2015, 117: 41–57.
- [59] HA G E, CHANG O K, JO S M, et al. Identification of antihypertensive peptides derived from low molecular weight casein hydrolysates generated during fermentation by *Bifidobacterium longum* KACC 91563[J]. Korean Journal of Food Science of Animal Resources, 2015, 35(6): 738–747.
- [60] 胡志和, 夏磊, 孙振刚, 等. 酪蛋白水解物中 ACE 抑制肽分离及氨基酸序列分析[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 156–163.
- HU Z H, XIA L, SUN Z G, et al. Separation of ACE inhibitory peptides from casein hydrolysate and analysis of their amino acid sequences[J]. Food Science, 2015, 36(24): 156–163.
- [61] PARK Y W, NAM M S. Bioactive peptides in milk and dairy products: A review[J]. Korean Journal of Food Science of Animal Resources, 2015, 35(6): 831–840.
- [62] MARTINI S, SOLIERI L, CATTIVELLI A, et al. An integrated peptidomics and *in silico* approach to identify novel anti-diabetic peptides in parmigiano-reggiano cheese[J]. Biology (Basel), 2021, 10(6): 563.
- [63] LAHOV E, REGELSON W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Cidin, isracidin peptides[J]. Food and Chemical Toxicology, 1996, 34(1): 131–145.
- [64] YAMAUCHI K, TOMITA M, GIEHL T J, et al. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-de-

- rived lactoferrin peptide fragment [J]. Infection and immunity, 1993, 61(2): 719-728.
- [65] AMIRI E O, FARMANI J, AMIRI Z R, et al. Antimicrobial activity, environmental sensitivity, mechanism of action, and food application of  $\alpha$ s165-181 peptide[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 358: 109403.
- [66] ZUCHT H D, RAIDA M, ADERMANN K, et al. Casocidin-I: A casein- $\alpha$ s2 derived peptide exhibits antibacterial activity[J]. FEBS Letters, 1995, 372(2/3): 185-188.
- [67] 王亚贝, 刘亚彬, 丁兰卉, 等. 牛血抗菌肽的制备及应用[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(13): 147-152.
- WANG Y B, LIU Y B, DING L H, et al. Preparation and application of bovine blood antimicrobial peptides[J]. Food Research and Development, 2023, 44(13): 147-152.
- [68] WALKER J R, ROTH J R, ALTMAN E. An *in vivo* study of novel bioactive peptides that inhibit the growth of *Escherichia coli* [J]. The Journal of Peptide Research, 2001, 58(5): 380-388.

### Cloning and Expression of Soluble Lactic Acid Bacterial Proteinase and Production of Casein-Derived Bioactive Peptides

LI Bo<sup>1</sup>, LIU Di<sup>2\*</sup>, YAN Pingmei<sup>2</sup>, WU Xiaoying<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024

<sup>2</sup>College of Biological Science and Technology, Taiyuan Normal University, Jinzhong 030619, Shanxi)

**Abstract** Objectives: The efficient release of bioactive peptides (BPs) from bovine milk proteins is of great significance. This study aimed to explore the potential of using the soluble proteinase of lactic acid bacteria (LAB) for production of BPs. Methods: A LAB strain exhibiting high proteolytic activity was screened and identified. The gene encoding the proteinase in the selected LAB was amplified via PCR and then modified by removing the sequence encoding the cell-wall-associated region, enabling it to be a soluble protein. Subsequently, the modified gene *prtB3* was cloned and expressed in the food-grade expression strain *Lactococcus lactis* NZ9000. After purification, a comprehensive evaluation was conducted on the enzymatic properties of the recombinant proteinase PrtB3 and the biological activities of the hydrolysates resulting from casein degradation. Results: The screened LAB strain was identified as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. A soluble, secreted, C-terminally Myc and His-tagged derivative PrtB3 was constructed and expressed in *Lactococcus lactis* via the NICE<sup>®</sup> Expression System. Compared with the wild-type proteinase, PrtB3 demonstrated a significant expansion in substrate specificity. It was proteolytically active in the hydrolysis of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein. Regarding biological activity, the casein hydrolysate produced by PrtB3 showed remarkable angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. The maximum ACE inhibition rate reached 78%, which was twice that of the hydrolysate produced by the wild-type proteinase. The half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was 1.69 mg/mL, and the ACE inhibitory activity remained stable over an 8-week period. Furthermore, the enzymatically produced hydrolysate showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Conclusions: In this study, the soluble proteinase PrtB3 was successfully cloned and expressed. It effectively enhanced the degradation of casein and significantly improved the biological activity and stability of the casein hydrolysate. PrtB3 demonstrated great potential in producing BPs by degrading casein, providing a novel approach for the preparation of bioactive peptides.

**Keywords** bioactive peptides; casein; lactic acid bacteria; soluble proteinase; ACE inhibitory peptides; antibacterial peptides