

耐热赖氨酸氨肽酶的原核表达及特性表征

黄浩^{1,2}, 周楠迪^{1,2}, 田亚平^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 铜绿假单胞菌 NJ-814 (*Pseudomonas aeruginosa* NJ-814) 所产氨肽酶具有良好的热稳定性。克隆出该氨肽酶编码基因 (*lap*), 测序得知该基因长度为 1 461 bp, 编码 486 个氨基酸。将 *lap* 与表达载体 pET-42a(+) 连接构建重组基因 pET-42a-*lap*, 重组基因转化进入原核表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 构建重组菌 BLAP, BLAP 在 16 °C 低温诱导下成功表达出重组氨肽酶。通过镍柱 (Ni-NTA) 亲和层析对重组酶进行分离纯化, 得到电泳纯的重组酶液, 纯化倍数和回收率分别为 4.7 和 83.5%。考察该重组氨肽酶的酶学特性, 发现该酶的最适 pH 为 8.3, 在 pH 6.5~9.5 之间具有较好的稳定性; 最适反应温度为 80 °C, 经过 70 °C 热处理 1 h 仍能保留 60% 以上的酶活性; 底物特异性研究表明该重组酶能够水解 Arg-pNA、Leu-pNA 和 Lys-pNA, 对 Lys-pNA 的水解能力分别是其他 2 种的 6.6 倍和 2.4 倍, 通过酶动力学分析证实了该酶对赖氨酸底物具有最强的亲和力, 与野生菌所产的酶一致属于一种赖氨酸氨肽酶。

关键词: 赖氨酸氨肽酶; 热稳定性; 原核表达; 酶学特性

中图分类号: Q 556+.3 文章编号: 1673-1689(2019)12-0110-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.016

Prokaryotic Expression and Characterization of a Thermo-stable Lysine Aminopeptidase

HUANG Hao^{1,2}, ZHOU Nandi^{1,2}, TIAN Yaping^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Aminopeptidase produced by *Pseudomonas aeruginosa* NJ-814 shows excellent thermo-stable feature. The gene encoding this peptidase was cloned and symbolized as *lap* in this paper. Sequencing results revealed *lap* consists of 1461 nucleotides coding 486 amino acids. Recombinant gene pET-42a-*lap* was constructed by connecting *lap* with pET-42a (+) expression vector. Recombinant strain BLAP was generated by transferring pET-42a-*lap* into *E. coli* BL21 (DE3), BLAP successfully express aminopeptidase after cultivated in proper condition. The recombinant aminopeptidase was purified 4.7-fold to homogeneity with a recovery of 83.5 % from cell free extract using Ni²⁺-NAT affinity column chromatography. The properties of the recombinant aminopeptidase were investigated and the results showed that the optimal reaction pH and

收稿日期: 2016-12-14

基金项目: 江苏省产学研前瞻性联合研究项目 (BY2014023-22)。

* 通信作者: 田亚平 (1964—), 女, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物活性物质方面的研究。E-mail: yapingtian@hotmail.com

引用本文: 黄浩, 周楠迪, 田亚平, 等. 耐热赖氨酸氨肽酶的原核表达及特性表征[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(12): 110-115.

temperature were pH 9.0 and 80 °C respectively, and it was extraordinary stable within pH 7.0~9.5 or below 70 °C. According to substrate specificity analysis and enzymatic reaction kinetics, this recombinant enzyme belongs to lysine aminopeptidase, which is same as *P. aeruginosa* NJ-814 aminopeptidase reported before.

Keywords: lysine aminopeptidase, thermo-stable, gene engineering, enzymatic characteristics

氨肽酶(Aminopeptidases, 简称 AP)是一类能够水解多肽 N 末端附近肽键释放出游离氨基酸的外切蛋白酶^[1]。对于蛋白质水解物苦味的去除^[2]、提高营养价值以及深加工等方面具有良好的作用,可应用于乳制品、肉制品行业促进食品风味;此外在医疗行业,氨肽酶检测也可作为一项疾病诊断指标^[3]。氨肽酶广泛存在于动植物和微生物中^[4],根据不同的标准可以分成很多种类。赖氨酸氨肽酶是指切割多肽链 N 末端赖氨酸残基效率最高的一类氨肽酶^[5],水解释放出的游离赖氨酸是人和动物的必需氨基酸,对于人体代谢水平的调节、钙离子的吸收和积累及增强体质等方面具有重要作用^[6]。因此,赖氨酸氨肽酶在食品工业领域具有广泛的应用价值。

耐热酶是一类能够在高温下保持活性的酶,在工业领域具有降低制备成本、提高反应速率、生产工艺简化等优势,应用前景广阔^[7-8]。因此自从 70 年代发现产生耐热酶的嗜热菌以来,耐热酶迅速成为一个重要的研究领域^[9]。目前,大多数研究仍集中在耐热酶产生菌的筛选及分离纯化上^[10-11],由于野生嗜热菌的培养条件严格、生长速度较慢,实现耐热酶在常温宿主中的表达成为一个新的研究方向。

作者在筛选得到一株耐热赖氨酸氨肽酶产生菌 *P.sdfdsafda* 的基础上^[12],克隆得到该耐热酶的编码基因,构建重组基因并实现了重组酶在原核宿主 *E.coil* 中的异源表达,纯化得到电泳纯的酶液并初步研究了其特性表征,为进一步研究实现耐热赖氨酸氨肽酶的工业化应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 *Pseudomonas aeruginosa* NJ-814: 实验室筛选与保藏; 菌株 *E.coil* JM109、*E.coil* BL21(DE3):Novagen 公司产品; 质粒 pET-42a(+): 大连宝生物公司产品。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白胨、酵母粉:英国 oxoid 公

司产品;基因组提取试剂盒:天根生化科技公司产品;质粒抽提试剂盒、DNA 纯化试剂盒、硫酸卡那霉素:上海生工公司产品;限制性内切酶、DNA marker、T4 DNA 连接酶:大连宝生物公司产品;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒:碧云天生物技术研究产品。

1.1.3 培养基 LB 液体培养基(g/dL):1 胰蛋白胨, 0.5 酵母粉,1NaCl;自然 pH。

TB 液体培养基 (g/dL):1.2 胰蛋白胨,2.4 酵母粉; 体积分数 0.5% 甘油,72mmol/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 17mmol/L KH_2PO_4 。

LBK、TBK 培养基: 分别对应应在 LB 液体培养基、TB 液体培养基中添加终质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 过滤除菌的硫酸卡那霉素(Kan)。

固体培养基即在对应液体培养基基础上添加 1.5 g/dL 的琼脂粉。

1.2 赖氨酸氨肽酶基因的获取

1.2.1 *P. aeruginosa* 基因组的提取 实验室前人从土壤中筛选得到一株氨肽酶产生菌铜绿假单胞菌 NJ-814(*Pseudomonas aeruginosa* NJ-814)。取甘油冷冻保藏的 *P. aeruginosa* NJ-814,划线于 LB 平板 37 °C 活化培养,挑取活化好的单菌落转接到 LB 液体培养基,37 °C、220 r/min 振荡过夜培养。取适量培养液,根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作方法提取 *Pseudomonas aeruginosa* 基因组。

1.2.2 编码基因的克隆 根据 NCBI 公布的铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* GF31 氨肽酶基因序列设计引物:lap-s:5' CCGgaattcATGGTCAGCACCC CGCTTGGCCTGCCGC 3' (小写字母表示 EcoR I 酶切位点);lap-a:5' CCGctcgagTACTTGATGAAGTC GTGACC 3' (小写字母表示 Xho I 酶切位点)。利用 1.2.1 中提取的基因组作为模板,PCR 扩增 lap 基因。PCR 反应体系(50 μL):模板 2 μL ,lap-s 2 μL , lap-a 2 μL ,ddH₂O 19 μL ,PrimeSTAR MAX 25 μL 。PCR 反应条件:95 °C 5 min 预变性;95 °C 15 s 变性,55 °C 30 s 退火,72 °C 90 s 延伸,循环 35 次;72 °C 5 min

后延伸。

1.3 重组菌的构建与表达

1.3.1 基因的连接与转化 PCR产物通过纯化试剂盒纯化,与质粒 pET-42a (+) 用限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 同条件双酶切,酶切产物经过琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收,胶回收产物通过 T4 DNA 连接酶于 16 °C 过夜连接,连接液 42 °C 热击转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布到 LBK 平板上 37 °C 过夜培养,筛选出具有 Kan 抗性的转化菌株。菌落 PCR 筛选阳性转化子,培养后用质粒抽提试剂盒提取重组质粒,双酶切验证并送检上海生工测序。

1.3.2 重组酶的诱导表达与检测 重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞获得重组菌 BLAP。挑取单菌落接种于 5 mL LBK 液体培养基,37 °C、220 r/min 振荡过夜培养,再以 1% 的接种体积分数转接到 50 mL TBK 液体培养基中培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的诱导剂 IPTG,16 °C 低温诱导 36 h。诱导培养结束后,取发酵液离心得到发酵液上清和菌体沉淀,沉淀用 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7.5) 缓冲液漂洗后超声破碎,破碎液离心收集上清液。

通过 LNA 比色法^[13]测定发酵液上清中的胞外氨肽酶酶活和破碎液上清中的胞内氨肽酶酶活。2 mL Tris-HCl (50 mmol/L, pH 9.0) 缓冲液加入 1 mL 底物亮氨酸对硝基苯胺 (L-Leu-pNA) 和 1 mL 适量稀释的上清液,80 °C 水浴条件反应 10 min,405 nm 波长下比色测定吸光值。

取发酵液上清和破碎液上清作为实验组进行 SDS-PAGE 电泳,以未连接 *lap* 的质粒 pET-42a(+) 转化 *E. coli* BL21(DE3) 后经过同条件处理作为对照组,验证重组酶的表达情况。

1.4 重组酶的纯化与酶学性质

通过 Ni-NTA 亲和层析对重组酶进行纯化分离并进行 SDS-PAGE 电泳验证。

初步研究了纯化后的重组酶的酶学性质。

1.5 酶活定义

在 80 °C 水浴条件下每分钟分解亮氨酸对硝基苯胺 (L-Leu-pNA) 产生 1 μmol 对硝基苯胺所需的酶量,即为 1 个酶活单位。

2 结果与讨论

2.1 重组菌的构建

根据 NCBI 公布的 *Pseudomonas aeruginosa*

GF31 氨肽酶 DNA 序列设计引物,以 *Pseudomonas aeruginosa* NJ-814 基因组为模板,PCR 扩增出大小约 1.5 kb 的 DNA 条带。纯化的 PCR 产物与质粒 pET-42a(+) 经过 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,成为两端带有相同粘性末端的基因片段,在 T4 DNA 连接酶的作用下部分连接形成重组质粒。重组质粒转化进入 *E. coli* 感受态细胞后能使转化子在含有卡那霉素的 LB 平板上长出单菌落,通过菌落 PCR 进一步将阳性转化子从空载质粒转化菌株中筛选出来,能够扩增出目标条带的即对应构建成功的重组菌 BLAP。

BLAP 经过培养提取重组质粒进行双酶切验证。重组质粒在上海生工测序后得到 *lap* 基因的 DNA 序列,通过 DNAMAN 翻译出其所对应的氨基酸序列,如图 1 所示。该基因长度为 1 461 bp,与凝胶电泳结果相符,共编码 486 个氨基酸,通过分析软件 ExPASy 预测其相对分子质量大小约为 54×10³。将序列提交到 NCBI 通过 Blast 比对,确认 PCR 扩增得到的目的基因为编码 *Pseudomonas aeruginosa* 氨肽酶的 DNA。

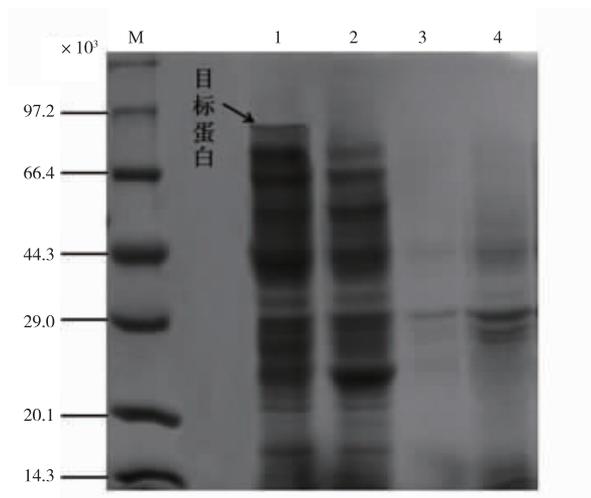
1	ATGGTCAGCACCCCGCTGGCTGCGCGCTGCTGCAAGCAGCAAGCTGGTCAAGCGCCCTGAGAGCTGGAGGACTCGCCAGTCT
2	MVSTPLGLPRCLQASNVVKRLQKLEDIASL
31	AACGACGGCAACCGCCCGCCCGCCGCTACCAGCGCTCCGCTGACTAGTGAAGCAGACCTGCAAGAGCCGCTACAGAGTCT
31	N D G N R A A A T P G Y Q A S V D Y V R K Q T L Q R A G Y K V
181	AGCGTGCAGCTCCGCTGACCGCTACTACCCGAGAGCGCGGGTACGCTGAGCCAGCAGCTCCGCGCCGCTGACTACAGATGG
671	S Y Q P P F P T A Y Y P K G P G S L S A T V P P P V T Y E W
21	GAGAAGGATTCACCTACTGTCGAGCGAGGCGAGCGAGCTCACCGCAAGGTGGCTCGGCTGGACCTGCTCCTCGCCGCGGCAAC
91	E K D F T Y L S Q T E A G D V T A K V V P V D L S L G A G N
361	ACCTCCAGCAGCGGTGGAGGCGGAGACTTCGCCAAGTCCGCGCGCTGATCGCGCTGATCAGCGCGGCACTGCACTTCGAG
121	T S T S G C E A E D F A N F P A G S I A L I Q R C T C N F E
451	CAGAACCGCGAGACCGCCCGCCCGCCCGCGGGTACGATCTCAACCGAGGCGAGACCCGCGCAAGCGCTGAGAGAC
151	Q K A E N A A A A G A A G A G V I F N Q G N T D D R K G L E N
541	GTCACCGTGGCGAGTCTACGAGGCGGCTCCCGGTGATCTTCGCGACTAGCAGACCGGCTGGCTGCTGCGAGCCCGGACCTG
181	V T V G E S Y E G G I P V I F A T Y D N G V A W S Q T P D L
631	CAHTGCACTGGTGGTGGCTGAGTGGTACGCAAGAGAGAGACTCAAGGTGGTCCGCGGACCGCTCGCGGCAACCGCAAGAGTGT
211	Q L H L V V D V V R K R T E T Y N V V A E T R R G N P N N V
721	GTCATGGTGGCGGCTGCTGACTGGTGGTGGAGCGCGGTATCAACGAGCAGCGGCTGGCGAGCGCGCCGCAAGTGGAGATGGCC
241	V M V G A H L D S V F E G P G I N D N G S G S A A Q L E M A
811	GTCCTCTGGCAAGGCGCTGCGCGTCAACAAGTGGCTTCCGCTGGTGGCGGCGGAGGAGCGCGCTGGTGGCTGACCCATAC
271	V L L A K A L P V N K V R F A W W G A E E A G L V G S T H Y
901	GTCGAAACTCGCCCGGAGAGAGAGAGATCAAGGCTCACTGAACTTGACATGATCGGCTCGCCGCACTCGGCACTCATC
301	V Q N L A P E E K K K I R A Y L N F D M I G S P N F G N F I
991	TATGACCGCGAGCTTGCAGCTCGGCTCGAGGCTCGCCCGCTCGCGGCTCGAGGCTGCTGCAAGCTACTTCCGCTCGCC
331	Y D G D G S D F G L Q G P P G S A I E R L F E A Y F R L R
1081	GGCCAGCATGGAGGACCGAGATGACTTCCGCTCCGACTGCGCGGCTTCTTCAACAGGGGATCGGCTTCGCGCGGCTTCAAC
361	G Q Q S E G T E I D F R S D Y A E F F N S G I A F G L F T
1171	GGCGCGAGGGCTGAGAGCGAAG
391	G A E G L K T E E Q A Q K Y G G T A G R A Y D E C Y H S K C
1281	GAGCATGGCCAGATGACGAGCGCGCTGGAGTCAAG
421	D G T A N I N Q D A L E I H S D A M A F V T S W L S L S T K
1351	GTCGTCAGATGAGATCGCCCGCGGCGGAG
451	V V D D E I A A A G Q K A Q S R S L Q M Q K S A S Q I E R W
1441	GGTCAGCATCATCAAGTAA
481	G H D F I K *

图 1 *lap* 基因的核酸序列和氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of gene *lap*

2.2 重组酶的表达

BLAP 按 1.3.2 所述条件诱导培养后,测得胞内氨肽酶酶活约 2.5 U/mL,胞外未测到氨肽酶酶活。已知重组酶相对分子质量大小约为 54×10³,同时载体质粒 pET-42a(+) 上 GST 标签能够表达出约 26×10³ 的融合蛋白,共 80×10³ 左右,SDS-PAGE 对重组酶表达情况的验证结果见图 2,可以观察到破碎液上清电泳在 66.4×10³ 与 97.2×10³ 之间出现一条对照组没有的条带,可以证明重组酶的成功表达。



M: 蛋白质相对分子质量标准;1: 实验组破碎液上清液;2: 对照组破碎液上清液;3: 实验组发酵液上清;4: 对照组发酵液上清液

图 2 重组酶 SDS-PAGE 验证

Fig. 2 Identification of the recombinant enzyme by SDS-PAGE

2.3 重组酶的纯化

载体质粒 pET-42a(+)带有 His-tag,使得表达的重组酶能够通过镍柱亲和层析进行分离纯化,纯化结果如表 1 所示,重组酶纯化倍数为 4.7 倍,回收率为 83.5%。纯化后的酶液进行 SDS-PAGE 分析得到电泳纯,见图 3。

表 1 重组酶镍柱纯化结果

Table 1 Ni-NTA purification results of the recombinant

纯化步骤	总酶活/ U	总蛋白质质量/ mg	比酶活/ (U/mg)	回收率/ %	纯化倍数
粗酶液	191.1	54.3	3.5	100	1.0
镍柱层析	159.6	9.7	16.5	83.5	4.7

2.4 重组酶的酶学性质

2.4.1 最适反应 pH 和 pH 稳定性 室温条件下配制不同 pH(3.0~11.0)的缓冲液,测定重组酶在各缓冲液体系中的酶活,如图 4,以 pH 值为横坐标、相对酶活为纵坐标,确定该酶的最适反应 pH 为 8.3;将酶液置于不同 pH 条件下,30 °C 水浴保温 1 h 后,测定其残留酶活,由图 5 可知该酶在 pH 6.5~9.5 之间具有较好的稳定性。与课题组报道的野生菌所产氨肽酶最适 pH 为 9.0、在 pH 7.5~10.5 之间具有稳定性^[14]是一致的。

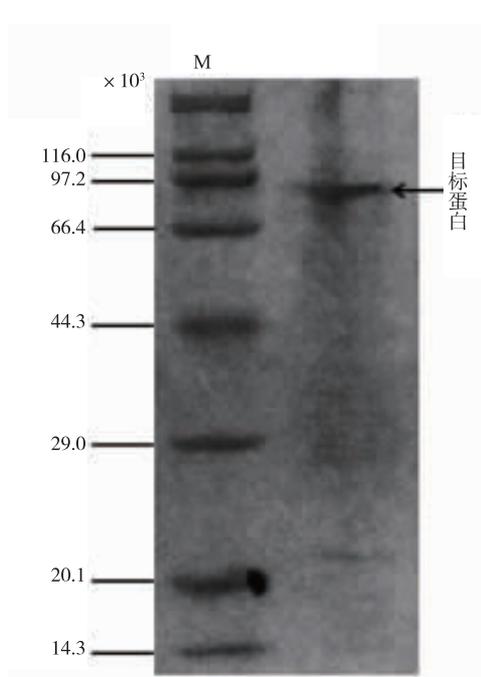


图 3 镍柱纯化后的重组酶 SDS-PAGE 验证

Fig. 3 SDS-PAGE identification of the Ni-NTA purified recombinant enzyme

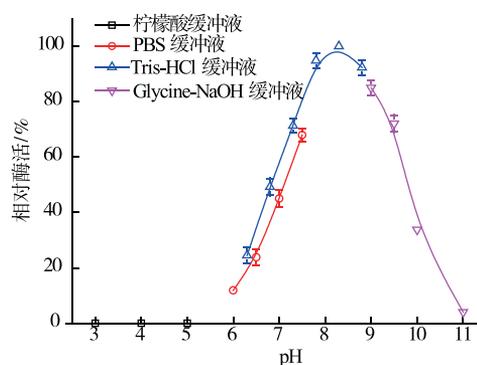


图 4 重组酶最适反应 pH

Fig. 4 Optimal reaction pH of the recombinant enzyme

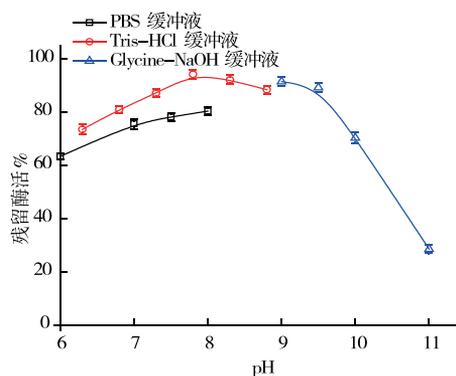


图 5 重组酶 pH 稳定性

Fig. 5 pH stability of the recombinant enzyme

2.4.2 最适反应温度和温度稳定性 将重组酶与底物置于不同温度条件下反应测定酶活, 根据图 6 可知 80 °C 为最适反应温度。将酶液于梯度温度中分别水浴 1 h, 再按照标准方法测定处理后的剩余酶活, 以 4 °C 酶液保存温度下的酶活作为对照, 如图 7 所示, 该重组酶经过 70 °C 热处理 1 h 能保留 60% 以上的酶活性, 与野生菌所产氨肽酶经过 70 °C 热处理 2 h 后保留约 70% 酶活^[12, 15]相比, 热稳定性略有降低, 但仍比多数常温酶具有更好的耐热性。

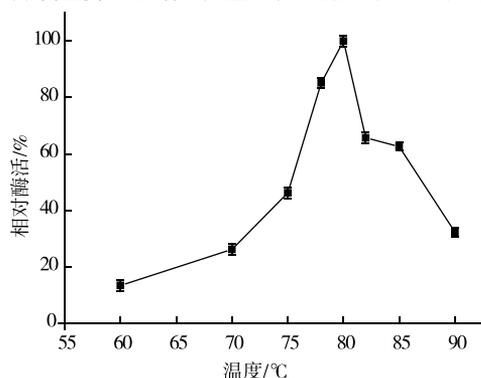


图 6 重组酶最适反应温度

Fig. 6 Optimal reaction temperature of the recombinant enzyme

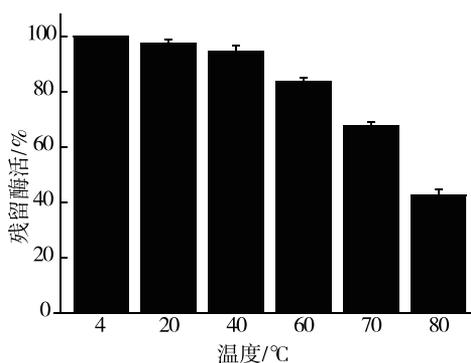


图 7 重组酶温度稳定性

Fig. 7 Temperature stability of the recombinant enzyme

2.4.3 底物特异性、动力学分析

分别用 Ala-pNA、Arg-pNA、Ile-pNA、Leu-pNA、Lys-pNA、Met-pNA、Pro-pNA、Val-pNA 作为底物, 考察重组酶的底物特异性, 如图 8 所示, 该酶能够水解 Arg-pNA、Leu-pNA 和 Lys-pNA, 对 Lys-pNA 的水解能力分别是 Arg-pNA 的 6.6 倍、Leu-pNA 的 2.4 倍。

以不同浓度 (0.2~1.4 mmol/L) 的 Leu-pNA 和 Lys-pNA 作为底物, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 见图 9-图 10, 算得以 Leu-pNA 为底物的米

氏常数 K_m 为 15.07 mmol/L、最大反应速率 V_{max} 为 12.77 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 以 Lys-pNA 为底物的 K_m 和 V_{max} 分别为 4.86 mmol/L、8.76 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。

结果表明该重组酶对 Lys-pNA 亲和力更强, 与野生菌所产的酶表现出相似的底物特异性, 同属赖氨酸氨肽酶。

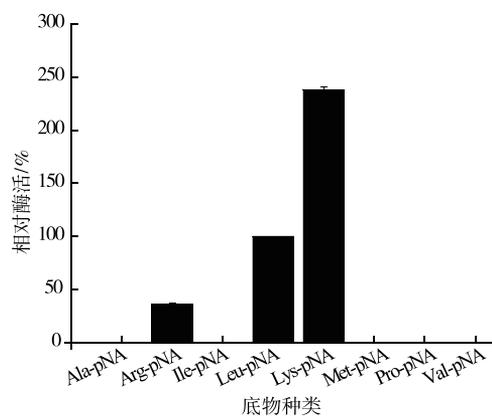


图 8 重组酶底物特异性

Fig. 8 Substrate specificity of the recombinant enzyme

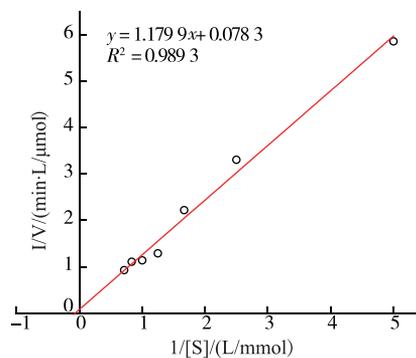


图 9 Leu-pNA 底物的重组酶双倒数图

Fig. 9 Lineweaver-Burk plot of the recombinant enzyme with Leu-pNA as substrate

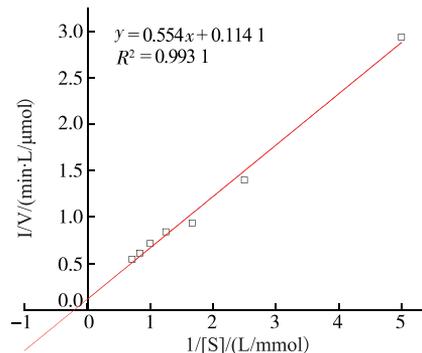


图 10 Lys-pNA 底物的重组酶双倒数图

Fig. 10 Lineweaver-Burk plot of the recombinant enzyme with Lys-pNA as substrate

3 结 语

论文从野生菌 *Pseudomonas aeruginosa* 中克隆出编码一种氨肽酶的基因 *lap*, 利用该基因构建的重组质粒 pET-42a-*lap* 转化到异源宿主 *E.coli* BL21(DE3)中,形成能够表达重组氨肽酶的工程菌

BLAP。重组酶经过 Ni-NTA 分离纯化后得到氨肽酶纯酶液。对重组酶的酶学性质研究发现,该酶和野生菌所产酶一样都属于赖氨酸氨肽酶,在碱性条件下表现出活性,并且具有良好的热稳定性。为进一步研究该重组酶的高效分泌表达和热稳定性氨肽酶的构效及进一步的应用奠定了基础。

参 考 文 献:

- [1] SANDERINK G J, ARTUR Y, SIEST G. Human aminopeptidases; a review of the literature[J]. **Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry Zeitschrift Für Klinische Chemie Und Klinische Biochemie**, 1988, 26(12): 795-807.
- [2] XU Yingmin, Study on debittering effect of aminopeptidase[J]. **Food and Drug**, 2007, 9(11): 36-39. (in Chinese)
- [3] HU Wangping, HU Yingying, HUANG Yanfang, et al. Significance of serum leucine aminopeptidase in hepatic disease tumor diagnose[J]. **Journal of Clinical Hepatology**, 2004, 7(1): 35-36. (in Chinese)
- [4] ZHANG L, CAI Q F, WU G P, et al. Arginine aminopeptidase from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle: purification and characterization[J]. **European Food Research and Technology**, 2013, 236(5): 759-769.
- [5] HUI M, HUI K S. A novel aminopeptidase with highest preference for lysine[J]. **Neurochemical Research**, 2006, 31(1): 95-102.
- [6] LIU X F, GAO X J, LIU Y, et al. Research progress on microbial production of Lysine[J]. **Journal of Northeast Agricultural University**, 2010, 41(1): 157-160.
- [7] WANG Shunmin, DONG Wenbin. Application and research progress of thermoenzymes [J]. **Nature Magazine**, 2004, 26(6): 339-342. (in Chinese)
- [8] WU Junlin, Lin Weitie, Yang Jiguo. Application and research progress of thermozymes [J]. **Guangzhou Food Science and Technology**, 2003, 19(1): 60-62. (in Chinese)
- [9] ROTHSCHILD L J, MANCINELLI R L. Life in extreme environments[J]. **Nature**, 2001, 409(6823): 1092-1101.
- [10] ANDO S, ISHIKAWA K, ISHIDA H, et al. Thermostable aminopeptidase from *Pyrococcus horikoshii*[J]. **FEBS Letters**, 1999, 447(1): 25-28.
- [11] WANG T F, LIN M G, LO H F, et al. Biophysical characterization of a recombinant aminopeptidase II from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*[J]. **Journal of Biological Physics**, 2014, 40(1): 25-40.
- [12] WU Yantao, DING Guowei, XI Hongxing, et al. Strain with thermo-stable lysine aminopeptidase: isolation, identification and gene cloning[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(8): 821-826. (in Chinese)
- [13] ZHANG Jing, TIAN Yaping. Chemical modification of the *Bacillus subtilis* aminopeptidase by succinicanhydride and its enzyme properties[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(6): 622-627. (in Chinese)
- [14] 吴延寿. 耐热氨肽酶产生菌的筛选、酶的特性及基因克隆[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [15] YAN T W, NAN D Z, ZHE M Z, et al. A thermo-stable lysine aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*: Isolation, purification, characterization, and sequence analysis[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2014, 54(10): 1110 - 1119.

科 技 信 息

欧盟认可一种乳酸乳球菌作为饲料添加剂的安全性

2019年11月4日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,应欧盟委员会要求,欧盟动物饲料添加剂和产品(FEEDAP)研究小组就乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)NCIMB 30160作为饲料添加剂的安全性发表科学意见。

据了解,申请人提议将聚乙二醇添加到可用于冷冻干燥步骤的潜在防冻剂列表中(PEG 4000)来修改制造工艺,最大浓度为0.025 mg PEG 4000 / kg 青贮饲料。经过评估,专家小组认为,在以上使用用途和水平下,预计不会对环境造成安全问题。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟认可一种乳酸乳球菌作为饲料添加剂的安全性 [EB/OL]. (2019-11-4). <http://news.foodmate.net/2019/11/539386.html>