3种氨肽酶基因在大肠杆菌中的重组表达与比较研究

张 洁[1]，张 梁[1]，黄武宁[2]，石贵阳[1,*]
(1.粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，工业生物技术教育部重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；
2.义乌市海之纳生物工程有限公司，浙江 义乌 322006)

摘 要：PCR扩增*Bacillus licheniformis* 14580、*Bacillus subtilis* 168、*Geobacillus stearothermophilus* IFO12589氨肽酶基因，分别酶切连接表达质粒pET-28a，构建重组表达载体pET28a-BLAP、pET28a-BSAP、pET28a-GSAP，酶活力检测表明3个氨肽酶基因均在大肠杆菌宿主BL21(DE3)中获得重组表达。进一步对3株重组菌的氨肽酶粗酶液反应条件进行比较研究，结果表明：重组氨肽酶BSAP与GSAP的粗酶活较高，达到1500U/L以上；BLAP、BSAP、GSAP粗酶的最适酶反应温度分别为50、75、60℃，BSAP温度稳定性最好，在30～70℃时比较稳定；3种重组氨肽酶的最适pH值都是9.0，pH值在8.5～9.0时比较稳定；0.lmmol/L Co^{2+}对酶活有较强的激活作用，BSAP的相对酶活力最高达到195.6%，其他二价金属离子对酶活均有不同程度的抑制，其中Zn^{2+}抑制作用最大；重组质粒pET28a-BSAP、pET28a-GSAP在大肠杆菌中较pET28a-BLAP稳定。

关键词：氨肽酶；重组表达；酶反应

A Comparative Study of Recombinant Expression of Three Aminopeptidases in *Escherichia coli*

ZHANG Jie[1]，ZHANG Liang[1]，HUANG Wu-ning[2]，SHI Gui-yang[1,*]
(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China；2. Yiwu Haizhina Bioengineering Co. Ltd., Yiwu 322006, China)

Abstract：The genes encoding aminopeptidase *GSAP*, *BSAP* and *BLAP* were respectively amplified from *Geobacillus stearothermophilus* IFO12589, *Bacillus subtilis* 168 and *Bacillus licheniformis* 14580. These amplified DNA fragments were individually inserted into the expression vector *E. coli* pET-28a to construct plasmids pET28a-BLAP, pET28a-BSAP and pET28a-GSAP, respectively. The expression of these genes was confirmed by activity analysis, and then the expressed enzymes were characterized. The activities of both recombinant BSAP and GSAP were 1500 U/L, which were higher than that of BLAP. The optimum temperatures were 50, 75 ℃ and 60 ℃ for BSAP, GSAP and BLAP, respectively, and the optimum pH values were all 9.0. They were stable at pH 8.5—9.0. BSAP was obviously activated by 0.l mmol/L Co^{2+}, reaching a maximum of 195.6% of its original activity, but inhibited to different extents by other divalent metal ions, with Zn^{2+} being the strongest inhibitor. In addition, the recombinant plasmids pET28a-BSAP and pET28a-GSAP were more stable than pET28a-BLAP in *E. coli*.

Key words：aminopeptidase；recombinant expression；enzymatic reaction
中图分类号：Q786 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)23-0200-06
doi:10.7506/spkx1002-6630-201323042

氨肽酶(aminopeptidase)是一类蛋白水解酶，它可以从蛋白或多肽链的N端由外向内逐个游离出氨基酸来，所以又称为肽链外切酶(expeptidase)[1]。氨肽酶的种类很多，不同的氨肽酶对N端氨基酸残基的水解能力存在差异性，同一种氨肽酶对不同的N端氨基酸残基的水解能力也不同，根据最易反应的底物不同可分为亮氨酸氨肽酶、缬氨酸氨肽酶、苯丙氨酸氨肽酶、脯氨酸氨肽酶等，它们可切除苦味肽氨端的疏水氨基酸从而脱除苦味[2-4]。自1936

收稿日期：2012-12-14
基金项目：国家“863”计划项目(2011AA100905；2012AA021201)；教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-11-0665)
作者简介：张洁(1988—)，女，硕士研究生，研究方向为轻工技术与工程。E-mail：rain880207jie@163.com
*通信作者：石贵阳(1963—)，男，教授，博士，研究方向为再生资源生物转化、发酵过程控制、酶技术。
E-mail：cbbshi@139.com

年Johnson等[5]第1次从*Aspergillus parasiticus*中分离出3种肽酶，已从大约30种微生物中提取到不同的氨肽酶。自1990年至今，一些微生物产生的各种氨肽酶基因相继被克隆并测序[6-8]。氨肽酶最显著的作用在于脱除蛋白水解液的苦味，如大豆蛋白水解液[9]，多肽的苦味与其N端疏水性氨基酸的量成正比，外肽酶可以有效的切除这些疏水性氨基酸，对制备低苦味的水解物有重要意义。Sato等[10]用不同蛋白酶处理酪蛋白水解液，发现亮氨酰氨肽酶可以脱去蛋白质酶解液的苦味。氨肽酶与蛋白酶复合使用，可以大幅度提高蛋白质的水解度及游离氨基酸的含量[11]，在酱油酿造、干酪生产及其他蛋白水解产品的制备过程中，可以提高蛋白质的利用率，节省成本。另外，氨肽酶还可应用于制备功能性多肽、蛋白质序列测定的分子工具等。

本研究分别从*Bacillus licheniformis*、*Bacillus subtilis*、*Geobacillus stearothermophilus*中克隆出氨肽酶基因(*ap1*、*ap*2、*ap3*)，利用大肠杆菌表达系统进行表达，对这3种不同来源的氨肽酶的粗酶液反应条件等进行了初步的比较和分析，旨在为氨肽酶的进一步研究利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株和质粒

*E. coli*菌株：JM109、BL21(DE3)由本实验室保存；*Bacillus licheniformis* ATCC 14580、*Geobacillus stearothermophilus* IFO12589、*Bacillus subtilis* 168保藏于江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心，质粒pET-28a(＋)由本实验室保存(含T7启动子的高效表达载体)。

1.1.2 工具酶和试剂

Taq DNA聚合酶、dNTP、T_4-DNA连接酶、限制性内切酶(*Eco*R Ⅰ、*Eco*R Ⅴ、*Nco* Ⅰ、*Bam*H I、*Hin*d Ⅲ)宝生物工程(大连)有限公司；DNA分子质量标准、纯化DNA片段的琼脂糖凝胶回收试剂盒、蛋白质分子质量标准　北京博大泰克生物基因有限公司；引物合成及测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成；其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基和培养条件

LB液体培养基用于细菌培养，在液体培养基中添加1.5g/100mL的琼脂即为LB固体培养基，LB固体和液体培养基在需要时加入卡那霉素至30μg/mL；培养*B. licheniformis* ATCC 14580的液体培养基(g/L)：胰蛋白胨15、大豆胨5、NaCl 5，pH7.3，在液体培养基中添加1.5g/100mL的琼脂即为固体培养基，55℃培养2d。

1.1.4 氨肽酶基因的PCR引物

根据NCBI公开的*B. licheniformis*、*B. subtilis*、*G. stearothermophilus*氨肽酶基因(*ap1*、*ap2*、*ap3*)序列设计合成PCR所需引物。*ap1*基因所需引物F1：5′-CGCGATATCCGCATGTTTTATGCCTTTA-3′引入*Eco*R Ⅴ酶切位点，R1：5′-CGCGGATCCAAGGGGATGAAAGACTACAA-3′引入*Bam*H Ⅰ酶切位点；*ap2*基因所需引物F2：5′-GAATTCAAGCTTCCATGGTACAAATATCAAATAGCGAG-3′引入*Nco*Ⅰ酶切位点，R2：5′-AGACTGCAGGGATCCTATTATTTGATATCTTCAAAAATGTCAGATGC-3′引入*Bam*HⅠ酶切位点；*ap3*基因所需引物F3：5′-TAGGAATTCCGCTGGGAAAAAGAAT-3′引入*Eco*RⅠ酶切位点，R3：5′-CCCAAGCTTTT-CGAATGCCCAGTTG-3′引入*Hin*d Ⅲ酶切位点；引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取

细菌总DNA的提取参考文献[12]；质粒DNA快速提取参考文献[13]。

1.2.2 PCR扩增

反应体系：10×*Taq* Buffer 5μL，dNTPs (2.5mmol/L) 4μL，上游引物F (10μmol/L) lμL，下游引物R (10μmo/L) lμL，总DNA模板 lμL，*Taq*酶0.5μL，补超纯水至总体积50μL。

扩增条件：95℃预变性5min；94℃变性30s，BLAP 57℃(GSAP 60℃，BSAP 60℃)退火30s，72℃延伸1.5min，30个循环；72℃延伸10min。所得扩增产物分别用PCR产物纯化试剂盒进行纯化。

1.2.3 重组质粒的构建及氨肽酶基因的诱导表达

将片段*ap1*、*ap2*、*ap3*分别用*Hin*d III和*Bam*HⅠ、*Nco* Ⅰ和*Bam*H Ⅰ、*Eco*R I和*Hin*d Ⅲ进行双酶切，割胶回收所需片段，将其分别与对应酶切的质粒pET-28a(+)连接获得重组质粒pET28a-BLAP、pET28a-BSAP、pET28a-GSAP，转化*E. coli* JM109，筛选阳性转化子，酶切验证正确连接后，提取质粒转化*E. coli* BL21(DE3)，挑选阳性转化子接入含卡那霉素抗性的LB液体培养基中，37℃振荡培养过夜后按2%接种量转接，37℃振荡培养至OD_{600nm}值0.6～0.8时添加IPTG至终浓度0.1mmol/L，置于25℃继续培养12h。

取一定体积BL21/pET28a-BLAP、BL21/pET28a-BSAP、BL21/pET28a-GSAP 菌液8000r/min、4℃离心5min，分别收集发酵上清液和菌体，上清液用于测定胞外酶活，用0.1mol/L pH8.5的Tris-HCl缓冲液洗涤2次，离心后用适量的Tris-HCl缓冲液重悬菌体，超声破碎。破碎

液12000r/min、4℃离心5min，上清液即为细胞破碎液，用于测定胞内酶活，并采用SDS-PAGE电泳观察目的蛋白的表达。运用到的基因操作方法参考文献[13]。

1.2.4 氨肽酶活力的测定

取1mL待测酶液(对照用缓冲液代替)加入2mL pH8.5的Tris-HCl缓冲液，再加入1mL的*L*-亮氨酸-对硝基苯胺溶液置于50℃水浴反应10min，立即加入1mL冰醋酸终止反应，冷却后于405nm波长测定吸光度。

酶活力单位定义：在50℃条件下，1min分解*L*-亮氨酸-对硝基苯胺[14]产生1μmol对硝基苯胺所需酶量为一个酶活力单位，即1U。

1.2.5 重组氨肽酶产酶曲线的测定

分别接种重组氨肽酶于LB液体培养基37℃培养过夜，转接2mL于新鲜的LB液体培养基，菌体OD_{600nm}达到0.6时添加IPTG诱导剂25℃培养，每隔2h取样测定菌体浓度OD_{600nm}，另取一定量的菌体超声波破碎测酶活。

1.2.6 重组氨肽酶粗酶液反应条件的比较

1.2.6.1 最适温度

分别在30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80℃，pH8.5条件下测定酶活，考察温度对酶活性的影响。

1.2.6.2 热稳定性

分别在30、40、50、60、70、80℃保温3h，pH 8.5测定剩余酶活，观察氨肽酶在不同温度下的稳定性。

1.2.6.3 最适pH

配制pH值7.0～10.0的反应缓冲液，50℃测定氨肽酶在不同pH值反应体系中的酶活，观察不同pH值对酶促反应的影响。

1.2.6.4 pH值稳定性

分别在pH值7.0～10.0的反应缓冲液中保温3h，再在50℃测定剩余酶活力，考察重组氨肽酶在不同pH值条件下的稳定性。

1.2.7 金属离子对粗酶酶活的影响

将酶液分别用含0.1、1mmol/L的不同二价金属离子的pH8.5的Tris-HCl缓冲液稀释适当倍数，未加金属离子的酶液作对照，测定酶活，计算相对酶活力。

1.2.8 重组菌质粒在*E. coli* BL21(DE3)中稳定性的分析

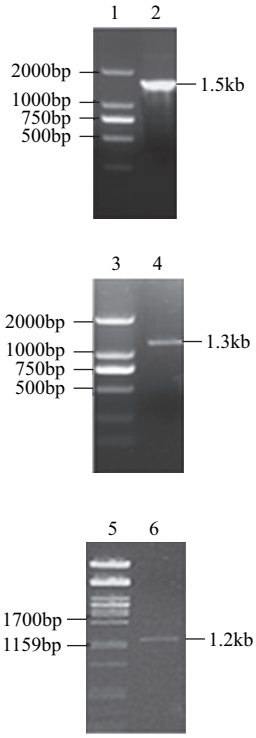
接种3种新鲜重组菌单菌落到50mL不含抗生素的LB液体培养基中，每培养12h，按照体积分数1%的接种量转接到新鲜LB液体培养基培养，在转接4代、6代、8代后，取样稀释一定倍数后分别涂布无抗和有抗2种LB平板培养12h，分别计数形成的单菌落数，以此判断重组质粒的稳定性。

$$质粒稳定性/\% = \frac{有抗菌落数}{无抗菌落数} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 氨肽酶基因的克隆

分别提取基因组DNA，用对应的上下游引物进行扩增，分别得到长度约为1.5、1.3、1.2kb的DNA片段(图1)。



1、3、5. DNA Marker；2. *ap1*；4. *ap2*；6. *ap3*。

图1 目的基因的扩增产物

Fig.1 Amplification of target genes

2.2 重组质粒的构建

分别将3个扩增片段与相应酶切线性化的载体连接，转化进入大肠杆菌JM109中。挑取阳性克隆子并提取质粒，经酶切验证重组质粒pET28a-BLAP、pET28a-BSAP、pET28a-GSAP构建成功(图2)。

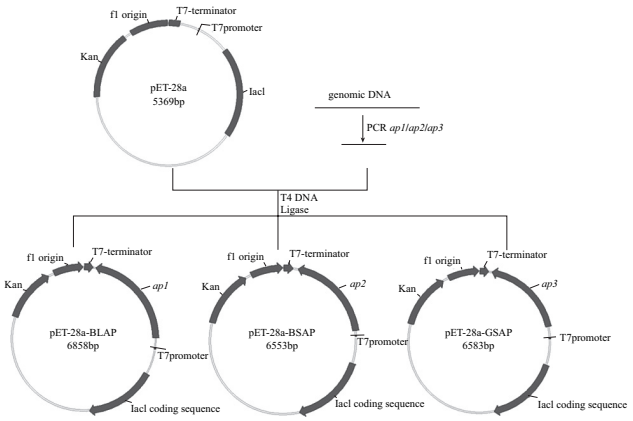
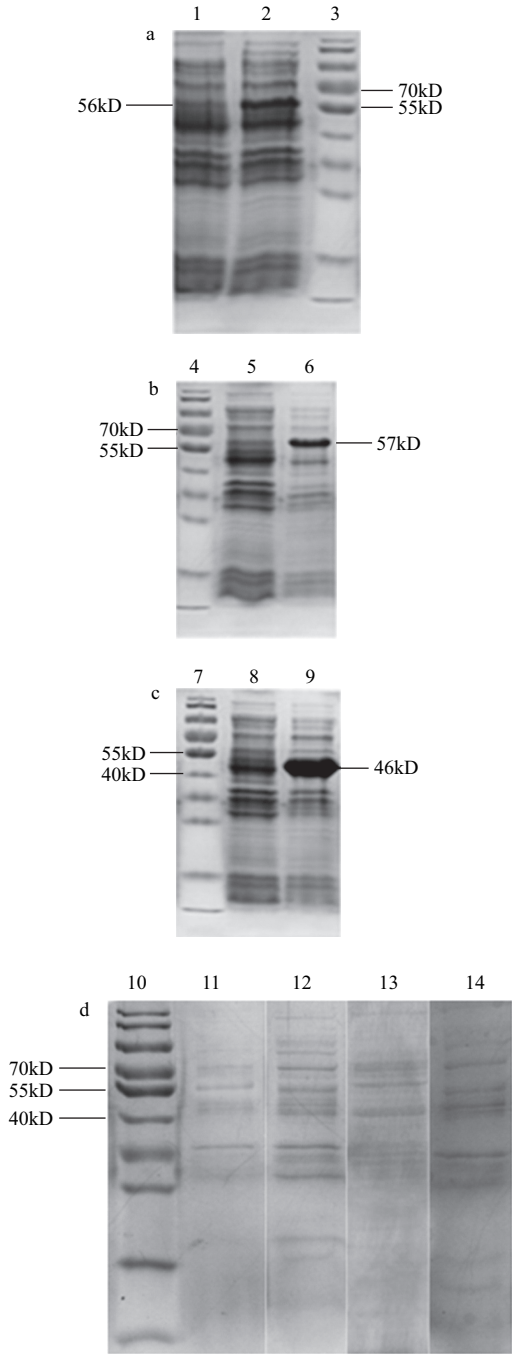


图2 重组质粒的构建流程

Fig.2 Construction of the recombinant plasmids



a～c.破碎上清液SDS-PAGE测定；d.离心后上清液SDS-PAGE测定；1、5、8. 对照BL21/pET-28a破碎上清液；2. BL21/pET28a-BLAP破碎上清液；6. BL21/pET28a-BSAP破碎上清液；9. BL21/pET28a-GSAP破碎上清液；3、4、7、10. 蛋白Marker；11. 对照BL21/pET-28a发酵上清液；12. BL21/pET28a-BLAP发酵上清液；13. BL21/pET28a-BSAP发酵上清液；14. BL21/pET28a-GSAP发酵上清液。

图3 SDS-PAGE测定

Fig.3 SDS-PAGE analysis

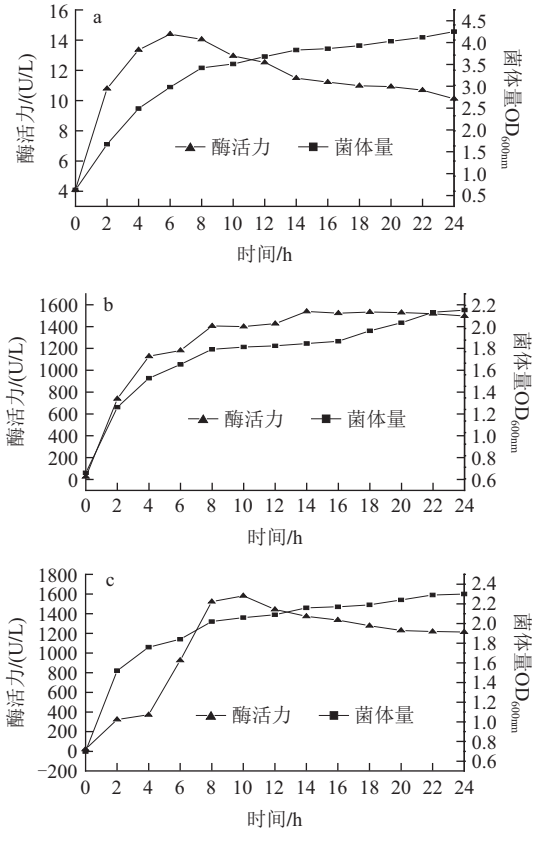
将重组质粒pET28a-BLAP、pET28a-BSAP、pET28a-GSAP转入大肠杆菌BL21(DE3)，在卡纳霉素抗性LB平板上挑选阳性转化子，即BL21/pET28a-BSAP、BL21/pET28a-BSAP、BL21/pET28a-GSAP。分别用IPTG诱导培养后的菌液经超声波破碎，破碎上清液及离心后的发酵上清液经SDS-PAGE分析，破碎上清液BL21/pET28a-BLAP检测到1条分子质量约为56kD的特异性条带，与预测的蛋白大小一致；BL21/pET28a-BSAP、BL21/pET28a-GSAP分别检测到1条分子质量约为57kD、46kD的特异性条带，与相关文献所报道的大小一致[2]，发酵上清液没有检测到明显特异性条带，如图3所示，分别收集发酵液上清和细胞破碎上清液测定3种重组氨肽酶(BLAP、BSAP、GSAP)酶活，如表1所示，细胞破碎上清液重组氨肽酶BSAP与GSAP较BLAP酶活力高，达1580U/L。

表1 3种来源的重组氨肽酶酶活力

Table 1 Enzymatic activities of three different recombinant aminopeptidases

重组氨肽酶	BLAP	GSAP	BSAP
发酵上清液/(U/L)	10.28	14.68	9.68
细胞破碎上清液/(U/L)	15	1540	1580

2.3 重组氨肽酶产酶曲线的测定



a.BLAP；b.BSAP；c.GSAP

图4 重组氨肽酶产酶曲线与菌体量

Fig.4 Enzyme production and bacterial biomass curves for the recombinant amino peptidases

重组氨肽酶液体培养至OD_{600nm} 0.6加IPTG诱导剂后每隔2h测酶活及菌体量，得产酶曲线如图4所示，重组氨肽酶BLAP在加入IPTG诱导剂后6h达到了最高酶活，菌体量增

加也较快；重组氨肽酶BSAP在14h达到最高酶活，菌体量在前8h增加迅速，酶活力也增加较快；重组氨肽酶GSAP在10h达最高酶活，BSAP、GSAP酶活力达1500U/L。

2.4 重组氨肽酶粗酶液反应条件比较

2.4.1 最适反应温度

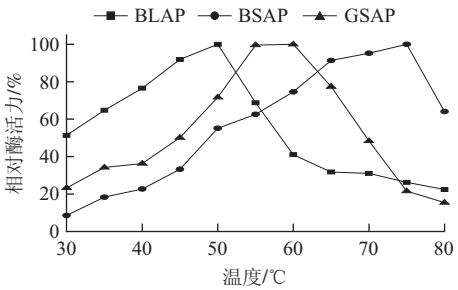


图5 重组氨肽酶的最适反应温度

Fig.5 Effect of temperature on aminopeptidase activity

将各氨肽酶与底物分别在各个温度下反应，确定重组酶的最适温度，以最高酶活力为100%。由图5可知，重组氨肽酶BLAP最适反应温度为50℃，在40～50℃有较高的酶活；重组氨肽酶BSAP最适反应温度为75℃，在60～75℃有较高的酶活；重组氨肽酶GSAP最适反应温度为60℃，在50～65℃有较高的酶活。

2.4.2 温度稳定性

分别将重组氨肽酶以pH8.5 Tris-HCl缓冲液稀释适当倍数，置于各个温度保温3h后，50℃条件下测定其剩余酶活力，以未处理的酶液为对照，即100%。由图6可知，重组氨肽酶BLAP在30、40℃条件下保温3h后仍具有79%的酶活力，但在50℃以上保温3h后酶活力迅速降至5%以下；重组氨肽酶BSAP在70℃保温3h仍剩余41%的酶活，但80℃时降至16.9%；重组氨肽酶GSAP在50℃保温3h后仍剩余56.5%的酶活力，但60℃时迅速下降。3种重组氨肽酶中，BSAP的热稳定性最好。

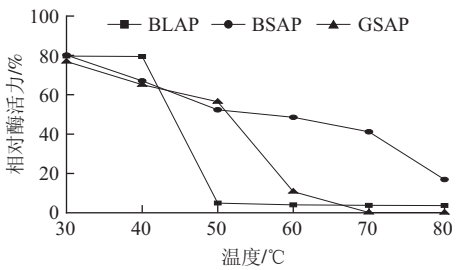


图6 重组氨肽酶的温度稳定性

Fig.6 Effect of temperature on aminopeptidase stability

2.4.3 最适反应pH值

将酶液分别与pH7.0～10.0的反应缓冲液混合，在50℃反应，测定氨肽酶在不同pH值反应体系中的酶活，结果如图7所示。3种重组氨肽酶的最适pH值均为9.0。

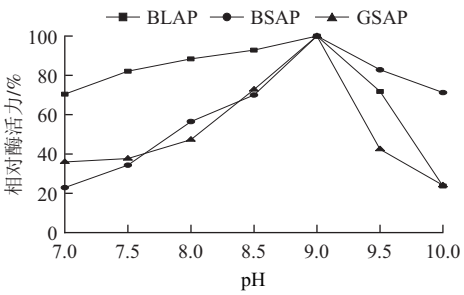


图7 氨肽酶的最适反应pH值

Fig.7 Effect of pH on aminopeptidase activity

2.4.4 pH值稳定性

在37℃条件下，将重组酶放置于各个不同的pH值缓冲液中保温3h后，50℃、pH8.5条件下测定其酶活力，以未处理的酶液为对照即100%。如图8所示，重组氨肽酶BLAP、BSAP在pH 8.5～9.0范围内有良好的稳定性，酶活力仍然能够维持在80%以上，重组氨肽酶GSAP在pH 9.0有较好的稳定性，在其他pH值条件下稳定性很差。

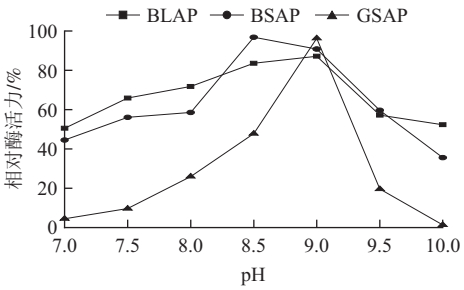


图8 氨肽酶不同pH值反应稳定性

Fig.8 Effect of pH on aminopeptidase stability

2.5 金属离子对酶反应条件的影响

将酶液分别用含0.1、1mmol/L的不同二价金属离子的pH8.5 Tris-HCl缓冲液稀释适当倍数，未加金属离子的酶液作对照，测定酶活，计算相对酶活力，如表2所示。较高浓度1mmol/L的二价金属离子，除Co^{2+}对酶活影响不大，其他离子对酶活均有不同程度的抑制，Zn^{2+}抑制作用最大，相对酶活力分别剩余6.7%、10.6%、4.7%，Ni^{2+}对BSAP和GSAP的抑制作用较大。0.1mmol/L的二价金属离子作用不一，Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}对BLAP酶活影响不大，Ni^{2+}对酶活性有一定的抑制，Zn^{2+}、Cu^{2+}有较大的抑制作用；Ni^{2+}、Mn^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}对BSAP酶活有较大的抑制作用，Ca^{2+}、Mg^{2+}对酶活性有一定的抑制作用；Ca^{2+}、Mg^{2+}对GSAP酶活影响不大，Cu^{2+}对酶活性有一定的抑制，Mn^{2+}、Zn^{2+}对GSAP酶活有较大的抑制作用；Co^{2+}则对3种氨肽酶的酶活都有较强的激活作用，BSAP的相对酶活达195.6%。据相关文献Co^{2+}对芽孢杆菌所产的氨肽酶有一定的激活作用[15]，与此结果一致。

表 2 金属离子对氨肽酶的影响

Table 2 Effects of metal ions on the stability of the recombinant aminopeptidase

金属离子	浓度/(mmol/L)	相对酶活力/%		
		BLAP	BSAP	GSAP
Zn^{2+}	0.1	19.9	36.7	14.7
	1.0	6.7	10.6	4.7
Mg^{2+}	0.1	92.5	63.9	83.9
	1.0	69.3	48.4	66.9
Ca^{2+}	0.1	93.8	81.8	90.3
	1.0	83.4	50.2	71.9
Mn^{2+}	0.1	97.7	35.6	44.6
	1.0	56.9	20.0	14.2
Co^{2+}	0.1	165.6	195.6	125.8
	1.0	91.0	92.5	77.7
Ni^{2+}	0.1	71.9	53.0	93.2
	1.0	60.1	11.4	7.9
Cu^{2+}	0.1	34.6	53.2	20.0
	1.0	18.9	10.1	48.2
对照	—	100.0	100.0	100.0

2.6 重组菌质粒在*E. coli* BL21(DE3)中稳定性的分析

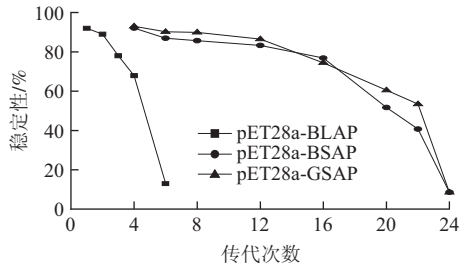


图 9 重组质粒传代稳定性

Fig.9 Genetic stability of the recombinant plasmids

由图9可知，在无选择压力条件下重组质粒pET28a-BLAP在大肠杆菌中的稳定性很差，重组质粒pET28a-BSAP传代20代后稳定性只有51.7%，重组质粒pET28a-GSAP传代22代之后稳定性53.4%，说明重组质粒在大肠杆菌中并不稳定，易于丢失，因此为了保证重组质粒的稳定性必须在保藏和培养过程中添加Kan抗生素，以保持质粒的稳定性。尽管重组质粒pET28a-BSAP、pET28a-GSAP具有一定的不稳定性，但它在无抗生素Kan的选择压力下，连续传代16代保持近80%的稳定性，可以满足工业生产的需要。

3 结 论

本实验对3种重组氨肽酶的产酶量、粗酶性质、金属离子对酶活的影响以及重组质粒的稳定性进行了比较，结果显示：重组氨肽酶BSAP粗酶活力最高达到1500U/L以上，热稳定性最好，在30～70℃时比较稳定，在pH 8.5～9.0范围内有良好的稳定性且重组质粒pET28a-BSAP虽具有一定的不稳定性，但在无抗生素选择压力下，连续传代16代保持近80%的稳定性，可以满足工业生产的需要，重组氨肽酶BLAP酶活较低且重组质粒稳定性很差，重组氨肽酶GSAP热稳定性较差，在60℃保温3h酶活力迅速下降，且仅在pH9.0有较好的稳定性，在其他pH值条件下稳定性很差。比较说明*B. subtilis* 168来源的重组氨肽酶更适合用来做进一步的应用研究。

蛋白质水解产生的肽类物质和少量氨基酸，可使其营养特性得到明显改善，而且某些寡肽不仅能提供人体生长发育所需的营养物质，还具有调节人体生理机能等功效。但在制备蛋白多肽的过程中，蛋白酶解后，肽链中含有的疏水性氨基酸暴露出来，产生不同程度的苦味，这些疏水性氨基酸一般都位于肽链末端，外肽酶可以有效的解离肽链末端的疏水性氨基酸而降低苦味。国内对于氨肽酶水解大米蛋白的研究还比较少，所以进一步将氨肽酶与碱性蛋白酶协同水解大米蛋白，降低碱性蛋白酶单独水解时产生的苦味，后续水解实验结果显示氨肽酶与碱性蛋白酶复合水解较碱性蛋白酶单酶水解的水解度提高了约12%；碱性蛋白酶单酶水解的产物游离氨基酸含量为2278.47mg/L，两酶复合水解的产物游离氨基酸含量为12378.72mg/L，说明碱性蛋白酶可将大米蛋白水解成大量的多肽链，而氨肽酶作为一种外切酶，能解离出多肽链末端的氨基酸，随着氨肽酶的加入苦味值明显降低，表明氨肽酶在降低水解产物苦味值方面有明显的效果。

参考文献：

[1] MIKIKO M, JONATHAN H F, LINDA L W. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function[J]. Biological Chemistry, 2006, 387: 1535-1544.
[2] YIFAT FH, LARISA R, SMADAR S. The ywad gene from *Bacillus subtilis* encodes a double-zinc aminopeptidase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 243: 157-163.
[3] MARIO C, VINCENZO A, PIETRO A, et al. Metal ion substitution in the catalytic site greatly affects the binding of sulfhydryl-containing compounds to leucyl aminopeptidase[J]. Biochemistry, 2006, 45: 3226-3234.
[4] WILK S, WILK E, MAGNUSSON R P. Identification of histidine residues important in the catalysis and structure of aspartyl aminopeptidase[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 407: 176-183.
[5] JOHNSON J, PETERSON H. The peptidase system of *Aspergillus parasiticus*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1936, 112(1): 25-34.
[6] JIRO A, MASAKI I, TADASHI H. Gene cloning and overproduction of an aminopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2 and comparison with a calcium-activated enzyme from *Streptomyces griseus*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 317: 531-538.
[7] TADASHI H, JIRO A, MISUGI U, et al. Characterization, cloning, sequencing, and expression of an aminopeptidase N from *Streptomyces* sp. TH-4[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74: 347-356.
[8] ELLY S, JOSEPH R P, GULHAN U. Cloning and characterization of debittering peptidases, PepE, PepO, PepO2, PepO3, and PepN, of *Lactobacillus* WSU19[J]. International Dairy Journal, 2007, 17: 1096-1106.
[9] 魏亚娟, 田亚平, 须瑛敏. 枯草芽孢杆菌脱苦氨肽酶在水解大都分离蛋白中的应用研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(4): 149-151.
[10] SATO Y, SEKIGUCHI Y, CHIBA Y, et al. Studies on enzymatic degradation of bitter compounds from casein.I. Degradation of bitter compounds by enzymes extracted from pancreas and various dairy lactic acid bacteria[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1969, 43(5): 286-291.
[11] 林勉, 刘通讯. 内肽酶与端解酶水解花生粕蛋白的研究[J]. 食品科学, 2000, 21(1): 22-24.
[12] JACOBS M, ELIASSON M, UHLEN M. Cloning, sequence and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*[J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13: 8913-8926.
[13] 刘箭. 分子生物学及基因工程实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
[14] YASUKO K, MASAHIRO O, TAKAKO H, et al. Family M42 aminopeptidase from the syntrophic bacterium *Symbiobacterium thermophilum*: characterization using recombinant protein[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(2): 134-139.
[15] STOLL E, WEDER H G, ZUBER H. Aminopetidase II from *Bacillus stearothermophilus*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1976, 438(1): 213-220.