

耐热赖氨酸氨肽酶毕赤酵母表达及培养条件优化

刘 强, 田亚平*

(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: 为实现耐热耐氨酸氨肽酶的异源表达, 通过 PCR 扩增技术从 *Pseudomonas aeruginosa* NJ-814 基因组中克隆获得耐热的赖氨酸氨肽酶基因(PLAP), 构建重组载体 pPIC9K-PLAP, 并最终实现在毕赤酵母 GS115 中的分泌表达。对重组毕赤酵母进行初步筛选, 单因素实验优化获得重组毕赤酵母最佳诱导条件如下: 诱导培养基初始 pH 为 5.0、甲醇质量浓度 1.5 g/dL、诱导温度 28 ℃、装液量 25 mL/250 mL、Co²⁺ 浓度 50 μmol/mL、山梨醇添加量 9 g/L。在最优条件下, 氨肽酶酶活提高了 5.2 倍, 比酶活 2.74 U/mg。实验结果表明: PLAP 基因已成功转入毕赤酵母 GS115 并获得表达。

关键字: 铜绿假单胞杆菌; 耐热氨肽酶; 基因克隆; 培养条件优化

中图分类号: Q 55 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)06-0589-06

Expression and Optimization Thermo-Stable Lysine Aminopeptidase in *P. pastoris*

LIU Qiang, TIAN Yaping*

(key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The aim of this study was to achieve heterologous expression of thermo-stable Lysine Aminopeptidase (PLAP), the PLAP gene that have been investigated producing a thermo-stable Lysine Aminopeptidase was cloned from the genomic DNA of *Pseudomonas aeruginosa* NJ-814 by PCR. The expression vector pPIC9K-PLAP was constructed to express extracellular protein in *P. pastoris* GS115. After preliminary screening of the recombinant *P. pastoris*, the optimized fermentation conditions based on single factor experiment were identified as follows: induction methanol concentration was 15 g/L, induction pH was 5.0, induction temperature was 28 ℃, the medium volume was 25 mL/250 mL, the amount of Co²⁺ was 50 μmol/mL, induction sorbitol was 9 g/L. Finally, the enzyme activity was 5.2 times as in original conditions, the specific activity was 2.74 U/mg. The result showed that PLAP gene has been successfully transferred and expressed in the *Pichia pastoris* GS115.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, thermo-stable aminopeptidase, gene cloning, optimization of culture condition

收稿日期: 2015-11-12

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA100905); 江苏省政策引导类计划(产学研合作)前瞻性联合研究项目(BY2014023-22)。

* 通信作者: 田亚平(1964—), 女, 江苏无锡人, 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: 刘强, 田亚平. 耐热赖氨酸氨肽酶毕赤酵母表达及培养条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(06): 589-594.

氨肽酶是能够顺序水解蛋白质 N 末端氨基酸,使其依次释放的外切蛋白酶^[1]。氨肽酶广泛分布于自然界中^[2]。目前人类已成功提取了多种具有不同性质的氨肽酶,并进行了不同的分类。氨肽酶在食品行业用途广泛,可用于肉制品和生物活性肽的制备^[3-4],常作为一种饲料酶制剂,增加饲料的营养成分和养分利用率。氨肽酶还是一些疾病的诊断用酶以及测定蛋白质序列的分子工具。赖氨酸氨肽酶(Lysine aminopeptidase)是一种可以水解多种氨基酸的氨肽酶,它能够作用于多肽链 N-末端水解释放出赖氨酸,提高酶解液中氨基酸含量,而且对 N 末端疏水性氨基酸有较强的水解能力,而这些疏水残基的存在会造成一定的苦味,因此赖氨酸氨肽酶在食品和饲料行业有较高的应用价值^[5-6]。耐热氨肽酶因其耐热性能具有广阔的应用市场,它能够降低生产成本、简化生产过程、提高反应速率与产品质量。目前已有多种热稳定性氨肽酶被报道^[7-9],但研究方向主要是对野生菌所产酶的分离及特征研究,鲜有异源表达的研究。毕赤酵母是一种成功表达多种外源蛋白质的宿主,具有诱导简单、遗传稳定和自身表达蛋白质少等特点^[10]。毕赤酵母表达过程中会对表达产物进行修饰,而这往往会使所表达的蛋白酶的稳定性及酶催化效率有所提升^[11]。

作者所在实验室前期筛选、分离得到一种来源于铜绿假单胞杆菌的氨肽酶,特性研究发现该酶与其他的氨肽酶最大差别是温度稳定性。该酶是一种耐热赖氨酸氨肽酶,最适温度为 80 ℃,且在 80 ℃保温 120 min 后酶活保留 49.78%。底物特异性考察发现,其对 Lys-pNA 和 Leu-pNA 有较强的分解能力。随后对酶的结构进行研究,并在大肠杆菌中实现异源表达^[12]。作者在此基础上,通过基因克隆的手段成功构建表达载 pPIC9K-PLAP,并实现毕赤酵母胞外分泌表达。通过优化培养条件,提高赖氨酸氨肽酶的表达水平。为深入研究热稳定性氨肽酶的异源表达以及糖基化对蛋白质的影响创造基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基 LB 培养基(组分 g/L):胰蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 10,pH 7.0;121 ℃灭菌 20 min。

毕赤酵母诱导表达前培养基(BMGY):1 g/dL 酵母膏,2 g/dL 鱼粉蛋白胨,1.34 g/dL YNB,4×10⁻⁵

g/dL 生物素,1 g/dL 甘油,1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0)。

毕赤酵母诱导表达培养基(BMMY):1 g/dL 酵母膏,2 g/dL 鱼粉蛋白胨,1.34 g/dL YNB,4×10⁻⁵ g/dL 生物素,0.5 g/dL 甲醇,1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0)。

最小葡萄糖培养基(MD):2 g/dL 葡萄糖,1.34 g/dL YNB,4×10⁻⁵ g/dL 生物素,2 g/dL 琼脂。

最小甲醇培养基(MM):0.5 g/dL 甲醇,1.34 g/dL YNB,4×10⁻⁵ g/dL 生物素,2 g/dL 琼脂。

1.1.2 菌株及质粒 铜绿假单胞杆菌:作者所在实验室筛选并保藏;*E. coli* JM109:宝生物工程有限公司;毕赤酵母 GS115、质粒 pPIC9K:Novagen 公司产品。

1.1.3 主要试剂 DNA 提取试剂盒、YNB:上海生物工程有限公司;细菌质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒:天跟生化科技有限公司;限制性内切酶:宝生物公司;L-亮氨酸-对硝基苯胺:美国 Alfa 公司;其他试剂:国药集团化学试剂公司。

1.2 主要仪器与设备

UH5300 分光光度计、CF15RN 离心机:日本 HITACHI 公司;Bio-Rad T-100 系列高性能 PCR 仪、蛋白质电泳系统、GelDoc 凝胶成像系统、电转仪、核酸电泳仪:美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 氨肽酶基因的克隆表达

1.3.1 基因的克隆 按照全基因组提取步骤提取 *P. aeruginosa* NJ-814 基因组,根据 NCBI 上报道的氨肽酶基因使用 Primer Premier 5.0 设计引物,分别加入 *Eco*RI、*Avr* II 酶切位点及保护碱基。引物 P1、P2 如下:P1:5'-CCGGAATTCATGGGCAAACCCAA CCC-3';P2:5'-TCCCCTAGGTTACTTGATGAAGTC GTGACCCC-3'。PCR 反应条件:预变性 95 ℃ 5 min、95 ℃ 15 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 90 s,共 33 个循环;72 ℃ 10min。

1.3.2 重组质粒构建及转化 分别对 PCR 产物和 pPIC9K 载体双酶切、回收、按比率混合过夜连接,产物转入 *E. coli* JM109 感受态细胞。对阳性克隆子进行菌落 PCR 筛选和质粒双酶切,并送到上海生工进行测序验证。测序正确的 pPIC9K-PLAP 载体经 *Bgl* II 进行酶切后,与感受态细胞一起进行电击转化(1 500 V,200 Ω,25/50 μF,4~6 ms)。电转液涂布于 MD 平板,30 ℃培养 3 d,转接于 MD 和 MM 平板进行筛选,获得产氨肽酶菌株。

1.3.3 重组氨肽酶的诱导 挑取 MD 平板上的单菌落于 25 mL BMGY 培养基中,30 ℃、230 r/min 培养 18 h;将培养液置于预先灭菌的离心管中离心收集沉淀,将沉淀重溶于 25 mL BMMY 培养基中,30 ℃、230 r/min 培养 120 h,每隔 24 小时向 BMMY 中添加 0.5 g/dL 的甲醇进行诱导。将获得的发酵液 10 000 r/min 离心 10 min,即得赖氨酸氨肽酶粗酶液。以原始毕赤酵母 GS115 为对照,浓缩一定倍数后用于 SDS-PAGE 电泳检测。

1.3.4 酶活测定方法及定义 通过 LAN^[13]法对氨肽酶活性进行测定。试管中加入 2 mL pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液、1 mL 稀释适当倍数的酶液和 1 mL 底物 (2 mmol/L L⁻L-leu-pNA),80 ℃恒温反应 10 min,405 nm 处测吸光值,计算酶活。

氨肽酶酶活定义:在上述反应条件下,每分钟内分解 L-leu-pNA 底物产生 1 μmol/L 的对硝基苯胺所需的酶量,即为一个酶活单位。

1.4 发酵条件的优化

1.4.1 诱导起始 pH 对氨肽酶产量的影响 将重组毕赤酵母于 25 mL/250 mL BMGY 培养基 30 ℃、230 r/min 培养 18 h,分别转接于用 5 mol/L KOH 和纯 H₃PO₄ 调配的 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0 的 BMMY 培养基中于 30 ℃、230 r/min 培养,每 24 小时向 BMMY 中加入 0.5 g/dL 甲醇诱导并酶活。

1.4.2 诱导温度对产氨肽酶的影响 将重组毕赤酵母于 25 mL/250 mL BMGY 培养基 30 ℃、230 r/min 培养 18 h,分别转接到 pH 5.0 的 BMMY 培养基中,分别于 20、23、25、28、30 ℃下于 230 r/min 进行发酵培养,每 24 小时向摇瓶添加 0.5 g/dL 甲醇诱导并取样测发酵上清液酶活。

1.4.3 诱导甲醇浓度对氨肽酶表达的影响 将重组毕赤酵母于 25 mL/250 mL BMGY 培养基 30 ℃、230 r/min 培养 18 h,分别转接入 pH 5.0 BMMY 培养基 28 ℃、230 r/min 培养,每隔 24 小时分别向 BMMY 中加入 0.5、1.0、1.5、2.0 g/dL 的甲醇进行诱导,并取样测发酵上清液酶活。

1.4.4 装液量对氨肽酶表达的影响 将重组毕赤酵母于 25 mL/250 mL BMGY 培养基 30 ℃、230 r/min 培养 18 h,分别转接于 25 mL/500 mL (5%)、25 mL/250 mL (10%)、50 mL/250 mL (20%) 的 pH 5.0 BMMY 培养基中 28 ℃、230 r/min 培养,每隔 24 小时向 BMMY 中加入 1.5 g/dL 甲醇诱导并取样测发

酵上清液酶活。

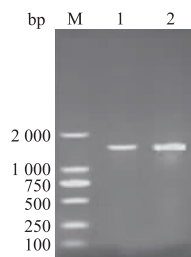
1.4.5 Co²⁺添加量对产酶量的影响 对该氨肽酶研究发现,Co²⁺对酶活的影响比较明显,进一步考察钴离子对产酶的影响。将重组毕赤酵母于 25 mL/250 mL BMGY 培养基培养 18 h,在 pH 5.0 诱导培养基中加入不同初始浓度的 Co²⁺(10、20、30、40、50、60 μmol/mL)28 ℃、230 r/min 培养,每隔 24 小时向 BMMY 中加入 1.5 g/dL 甲醇诱导并取样测发酵上清液酶活。

1.4.6 山梨醇添加量对产酶量的影响 将重组毕赤酵母培养 18 h,在 pH 5.0 BMMY 培养基中添加不同初始质量浓度的山梨醇 (3、6、9、12 g/L)28 ℃、230 r/min 培养,每隔 24 小时向 BMMY 中加入 1.5 g/dL 甲醇诱导并取样测发酵上清液酶活。

2 结果与分析

2.1 *P. aeruginosa* NJ-814 氨肽酶基因的克隆

2.1.1 氨肽酶基因克隆及 pPIC9K-PLAP 载体构建 根据引物的 T_m 值,以获得的基因组为模板,扩增该氨肽酶基因。PCR 扩增出与预期相符合的 1 500 bp 大小的目的条带,见图 1。将双酶切的目的基因与载体进行连接、转化并抗性筛选,对质粒酶切鉴定。电泳结果显示,双酶切后存在两个条带,小条带为 1 500 bp 左右,见图 2,结果表明氨肽酶基因已连入 pPIC9K 载体上。按 1.3.2 所述方法进行电转及筛选获得重组毕赤酵母。

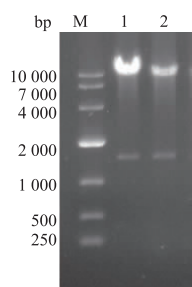


M:Marker; 1,2:PCR 产物

图 1 氨肽酶基因的 PCR 扩增产物

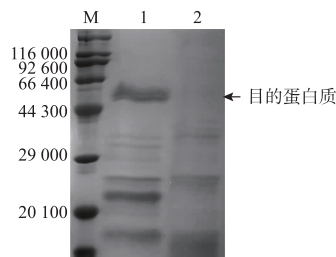
Fig. 1 Amplification of aminopeptidase gene by PCR

2.1.2 重组毕赤酵母的 SDS-PAGE 验证 分别挑取重组毕赤酵母和原始菌诱导培养 120 h,得到的发酵液经离心和超滤管浓缩后,各吸取 10 μL 进行 SDS-PAGE 验证,见图 3。重组菌上清液在 44 300~66 400 之间有蛋白质条带,相同条件下的原始菌上清液中却无条带,这正与预测的氨肽酶相对分子质量 54 000 相符合。这表明该赖氨酸氨肽酶已在毕赤



M: Marker; 1, 2: 重组质粒

图2 重组质粒的双酶切验证

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid digested with *EcoR* I and *Avr* II

M: Marker; 1: 重组毕赤酵母; 2: GS115 原始菌

图3 原始菌和重组毕赤酵母发酵上清液的 SDS-PAGE 验证

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fermentation supernatant from the wild and recombinant *P. pastoris*

酵母中实现了胞外表达。

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 诱导初始 pH 对氨肽酶表达的影响 诱导培养基初始 pH 通过影响细胞膜的带电荷状态、培养基中营养成分的解离以及胞内酶的催化效率来影响细胞的生长状态和蛋白质表达水平^[14]。图4结果可以看出,酸性条件更有利于赖氨酸氨肽酶的表达,碱性条件下氨肽酶表达量降低。当诱导初始 pH 为 5.0 时,上清液氨肽酶酶活最高,诱导 120 h 时氨肽酶酶活达到 0.64 U/mL。

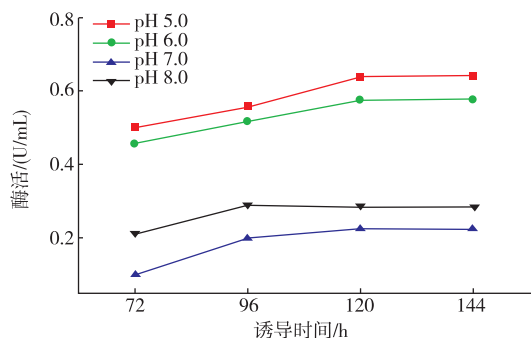


图4 诱导初始 pH 对产氨肽酶的影响

Fig. 4 Effect of initial pH on the expression of recombinant aminopeptidase

2.2.2 诱导温度对产氨肽酶的影响 毕赤酵母生长范围为 20~30 ℃,廖锡豪^[15]等研究发现低温促进毕赤酵母分泌表达外源蛋白质。低温延长目的蛋白质在内质网中折叠和加工的滞留时间;提高蛋白质表达速率,减少自身表达蛋白质对目的蛋白质降解;减少甲醇对菌体的伤害。但温度过低将抑制菌体生长,导致氨肽酶的表达量降低。图5结果表明,随着诱导温度的降低,氨肽酶酶活先升高后降低,且均高于 30 ℃,这说明低温有利于重组外源蛋白质的分泌表达。28 ℃最有利于氨肽酶的表达,诱导 120 h 时氨肽酶的酶活达到 0.89 U/mL。

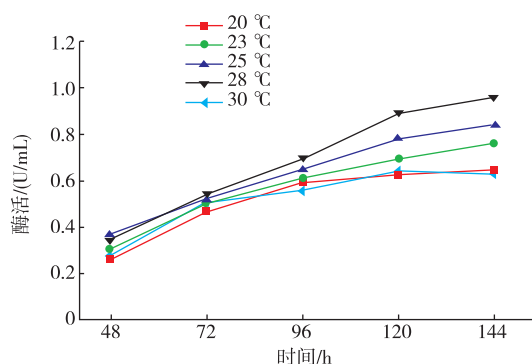


图5 诱导温度和时间对产氨肽酶的影响

Fig. 5 Effect of temperature and time on the expression of recombinant aminopeptidase

2.2.3 诱导剂甲醇质量浓度对氨肽酶表达的影响 在诱导阶段,甲醇作为唯一碳源与诱导剂影响毕赤酵母生长和产酶。由图6可知,氨肽酶酶活随甲醇质量浓度的上升先升高后降低。当甲醇质量浓度 0.5 g/dL 和 1 g/dL 时,氨肽酶表达量偏低,这是因为低质量浓度的甲醇不仅不能够满足菌体自身的生

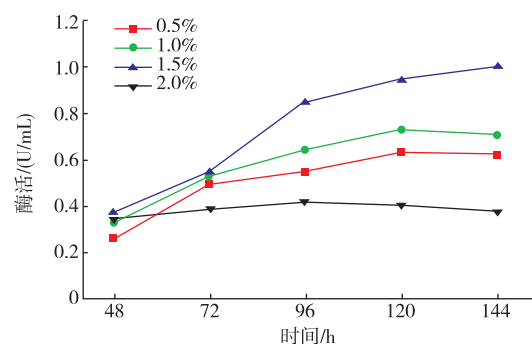


图6 诱导甲醇质量浓度对产氨肽酶的影响

Fig. 6 Effect of methanol concentration on the expression of recombinant aminopeptidase

长需求,而且难以诱导 AOX 基因的表达。当甲醇质量浓度为 2 g/dL 时,氨肽酶表达量明显偏低,是由于过高质量浓度的甲醇抑制醇氧化物酶的活性,影响氨肽酶的表达,同时会对毕赤酵母产生毒害作用。甲醇质量浓度为 1.5 g/dL 时酶活最高,达到 0.95 U/mL。

2.2.4 摇瓶装液量对氨肽酶表达的影响 摇瓶装液量的多少会影响培养基中的溶氧水平,而溶氧对毕赤酵母的生长及发酵有着重要影响。诱导阶段,重组毕赤酵母需要氧气来激活体内的过氧化氢酶体,进而诱导外源重组蛋白质的表达。

从图 7 可知,装液量为 5% 时,培养基中溶氧过高抑制毕赤酵母生长与产酶。装液量为 15% 时,低浓度溶氧抑制过氧化氢酶体,从而抑制重组蛋白质表达。装液量 10%、诱导 120 h 时重组耐热氨肽酶表达量最高,酶活为 1.26 U/mL。

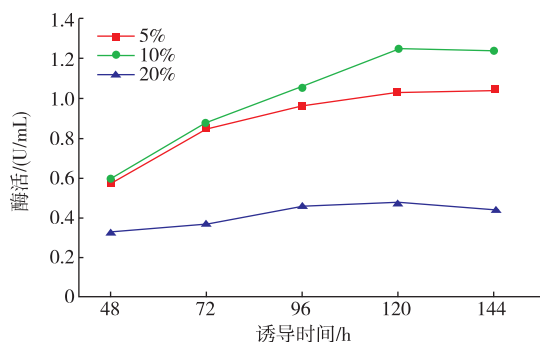


图 7 装液量对产氨肽酶的影响

Fig. 7 Effect of liquid volume on the expression of recombinant aminopeptidase

2.2.5 Co^{2+} 浓度对产酶量的影响 Wu 等^[16]对铜绿假单胞杆菌研究中发现: Co^{2+} 对产酶有促进作用,原因可能是 Co^{2+} 为该氨肽酶的辅因子或者对该酶结构有促进作用。故考察 Co^{2+} 浓度对氨肽酶表达水平的影响。

图 8 结果表明:添加一定浓度 Co^{2+} 能促进氨肽酶的表达。 Co^{2+} 浓度为 10~30 $\mu\text{mol/mL}$ 时,氨肽酶酶活变化不大。在 40~60 $\mu\text{mol/mL}$ 浓度范围内,酶活先升高后降低,可能是高浓度的钴离子抑制菌株的新陈代谢,导致产酶量下降。最终确定加入 Co^{2+} 浓度 50 $\mu\text{mol/mL}$ 。

2.2.6 山梨醇添加量对产酶量的影响 山梨醇不会抑制慢型重组子的 AOX 基因,相反会促进启动子的起始转录,同时山梨醇能够提高毕赤酵母活

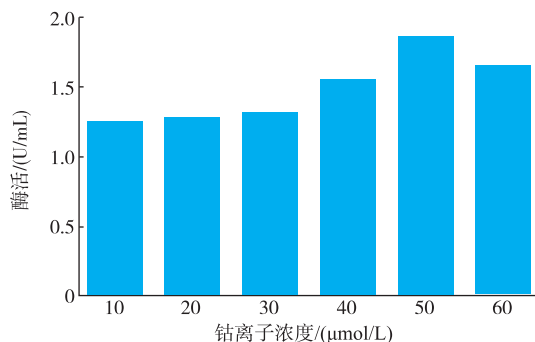


图 8 Co^{2+} 浓度对产氨肽酶的影响

Fig. 8 Effect of the amount of Co^{2+} on the expression of recombinant aminopeptidase

力,减少有毒副产品以及诱导剂甲醇对酵母自身的损伤作用,进而降低细胞死亡释放的蛋白酶对目的蛋白质的降解^[17]。从图 9 可知,山梨醇的添加一定程度上促进氨肽酶的表达,当质量浓度为 9 g/L 时,氨肽酶产量达到 3.02 U/mL。

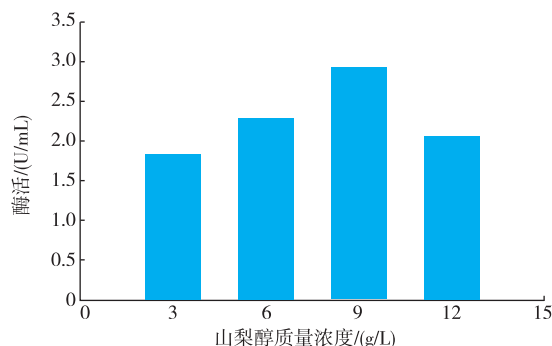


图 9 山梨醇质量浓度对产氨肽酶的影响

Fig. 9 Effect of the amount of sorbitol on the expression of recombinant aminopeptidase

3 结 语

作者将铜绿假单胞杆菌的赖氨酸氨肽酶基因通过分子克隆、电转化整合到毕赤酵母染色体上,构建重组毕赤酵母,实现稳定胞外表达。毕赤酵母具有诱导简单、遗传稳定和自身表达蛋白质少等特点。毕赤酵母表达过程中的蛋白质加工修饰会提高产物的稳定性和催化效率。通过单因素实验对毕赤酵母表达赖氨酸氨肽酶的培养条件进行优化,初始 pH、 Co^{2+} 浓度、装液量、温度、诱导甲醇质量浓度和山梨醇添加量均对氨肽酶的表达量有一定的影响。在发酵最佳条件下,上清液中氨肽酶酶活从 0.58 U/mL 提高到了 3.02 U/mL,提高了 5.2 倍,比酶活为 2.74

U/mg。相对于其他种类的氨肽酶^[18],该酶表达水平偏低,这跟目前对耐热氨肽酶的研究情况相一致,后期可通过毕赤酵母的高密度发酵进一步提高该赖

氨酸氨肽酶的表达水平。本研究为深入研究耐热氨肽酶的异源表达、热稳定性和糖基化作用提供了良好的基础。

参考文献:

- [1] SANDERINK G J, ARTUR Y, SIEST G. Human aminopeptidases: a review of the literature[J]. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine**, 1988, 26(12): 795-808.
- [2] TAYLOR A. Aminopeptidases: structure and function[J]. **The FASEB Journal**, 1993, 7(2): 290-298.
- [3] TOLDR F, ARISTORY M C, FLORES M. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham[J]. **Food Research International**, 2000, 33(3): 181-185.
- [4] LIN Yin, KONG Feng, TIAN Yaping. Study on substrate specificity of aminopeptidase from recombinant *Bacillus subtilis* and the cooperative hydrolysis of corn protein[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(12): 1274-1280. (in Chinese)
- [5] RAKSAKULTHAI R, HAARD N F. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2003, 43(4): 401-445.
- [6] LV Guanglin, TIAN Yaping. Study on hydrolysis of soybean protein isolate by aminopeptidase and neutral protease[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011(1): 101-105. (in Chinese)
- [7] LIN L L, HSU W H, WU C P, et al. A thermostable leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223 [J]. **Extremophiles**, 2004, 8(1): 79-87.
- [8] GAUR R, GROVER T, SHARMA R, et al. Purification and characterization of a solvent stable aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and analysis of aminopeptidase gene conferring solvent stability[J]. **Process Biochemistry**, 2010, 45(5): 757-764.
- [9] YU X, HAO W, XIE G, et al. Clone, purification and characterization of thermostable aminopeptidase ST1737 from *Sulfolobus tokodaii*[J]. **Chemical Research in Chinese Universities**, 2015, 31(1): 98-102.
- [10] MACAULEY P S, FAZENDA M L, MCNEIL B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. **Yeast**, 2005, 22(4): 249-270.
- [11] XI H X, TIAN Y P, ZHOU N D, et al. Characterization of an N-Glycosylated *Bacillus subtilis* leucine aminopeptidase expressed in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2015, 55: 236-246.
- [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 succinic anhydride and its enzyme properties[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(6): 622-627. (in Chinese)
- [14] LI Zengting, XIE Li, FENG Shunli. Optimization of expression conditions of hybrid antimicrobial peptide LPCB in *Pichia pastoris* [J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 2012, 18(1): 65-69. (in Chinese)
- [15] LIAO Xihao, CHEN Mingxiang, XIE Wanyong. Influence of low inducing temperature on foreign protein production in recombinant *Pichia pastoris* [J]. **China Brewing**, 2013(2): 9-12. (in Chinese)
- [16] WU Y T, ZHOU N D, ZHOU Z M, 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.
- [17] SINHA J, PLANTZ B A, INAN M, et al. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- τ [J]. **Biotechnol Bioeng**, 2005, 89(1): 102-112.
- [18] KONG Feng, TIAN Yaping. Strategy to obtain high yield of aminopeptidase from recombinant *Bacillus subtilis* and its extraction process optimization[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015(8): 864-872. (in Chinese)