

脯氨酸氨肽酶枯草芽孢杆菌分泌表达及特性表征

汪克红, 王开道, 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: 构建重组枯草芽孢杆菌大量分泌米曲霉脯氨酸氨肽酶, 纯化后对其基本酶学性质进行表征。将脯氨酸氨肽酶 cDNA 序列从载体 pMD19-pap 上克隆后连接到载体 pMA5 上得到重组质粒, 转化枯草芽孢杆菌 WB600 后进行分泌表达。通过在培养基中加入 5% D-山梨醇和 2 mmol/L CaCl_2 , 胞外酶活由 7.5 U/mL 提高到 36 U/mL。通过硫酸铵盐析、Hitrap Q 和 Superdex™ 75 对重组脯氨酸氨肽酶进行了纯化, 纯化后的比酶活为 247.3 U/mg, 纯化倍数达到 8.8 倍。该酶最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 7.5, 米氏常数 K_m 和最大反应速率 $V_{\max}$ 分别为 0.171 mmol/L 和 55.99 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

关键词: 脯氨酸氨肽酶; 枯草芽孢杆菌; 分泌表达; 特性表征

中图分类号: Q 55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)11-1135-06

Secretory Expression and Characterization of Prolyl Aminopeptidase in *Bacillus Subtilis*

WANG Kehong, WANG Kaidao, TIAN Yaping*

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

Abstract: Construct recombinant *Bacillus subtilis* to over-expression *Aspergillus oryzae* prolyl aminopeptidase, then purified and characterized its basic enzyme properties. The pap gene was cloned from pMD19-pap vector and ligated into pMA5 to generate recombinant pMA5-pap expression vector. Then the vector was transformed into *Bacillus subtilis* WB600 competent cells and secretory expressed. By adding 5% D-sorbitol and 2 mmol/L CaCl_2 in TB medium, the enzyme activity in fermented supernatant increased from 7.5 to 36.0 U/mL. The recombinant prolyl aminopeptidase was purified by ammonium sulfate, Hitrap Q anion exchange chromatography and Superdex™ 75 gel chromatography, the purification factor was 8.8 and the specific activity of the purified enzyme was 247.3 U/mg. The purified enzyme has the highest activity at pH 7.5 and 50 °C, the K_m and $V_{\max}$ was estimated to be 0.171 mmol/L and 55.99 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ respectively.

Keywords: prolyl aminopeptidase, *Bacillus subtilis*, secretory expression, characterization

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA100905)。

* 通信作者: 田亚平(1964—), 女, 安徽淮南人, 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研究。

E-mail: yapingtian@hotmail.com

引用本文: 汪克红, 王开道, 田亚平. 脯氨酸氨肽酶枯草芽孢杆菌分泌表达及特性表征[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(11): 1135-1140.

脯氨酸氨肽酶 (prolyl aminopeptidase, PAP, EC3.4.11.5) 是一类能特异地水解多肽或蛋白 N-端脯氨酸残基的氨肽酶, 具有严格的底物特异性, 在蛋白类食品水解加工产物苦味的去除^[1], 胶原蛋白水解等方面都有着较好的应用前景^[2]。脯氨酸氨肽酶的来源广泛, 在动物^[3]、植物和微生物中都有存在, 但目前大多数报道的脯氨酸氨肽酶都来源于微生物^[4-6]。

目前有关脯氨酸氨肽酶的研究主要集中在基因克隆、分离纯化和性质描述方面, 而对脯氨酸氨肽酶的异源表达研究较少, 表达量较低, 无法进行大规模生产^[7]。*Bacillus subtilis* 作为食品安全菌种^[8], 由于其遗传背景清晰, 无致病性, 蛋白分泌能力强, 无密码子偏好性以及发酵周期短等优点已被广泛用于外源基因的表达宿主^[9-10]。本研究将前期从日式酱油成品曲中筛选到的米曲霉胞内脯氨酸氨肽酶的 cDNA 基因克隆到枯草芽孢杆菌中进行表达, 并通过优化培养基组成提高胞外分泌量, 从而为工业化生产脯氨酸氨肽酶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

E. coli JM109、枯草芽孢杆菌 WB600、穿梭质粒 pMA5、含目的基因的载体 pMD19-pap。

1.2 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0。

TB 培养基: 蛋白胨 12 g/L, 酵母粉 24 g/L, 甘油 4 g/L, 17 mmol/L KH_2PO_4 , 72 mmol/L K_2HPO_4 。

分泌培养基: 蛋白胨 12 g/L, 酵母粉 24 g/L, 甘油 4 g/L, D-山梨醇 50 g/L, 2 mmol/L CaCl_2 , 17 mmol/L KH_2PO_4 , 72 mmol/L K_2HPO_4 。

1.3 主要试剂

质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司; 所有的底物均购自瑞士 Bachem 公司; PrimeSTAR[®] DNA Polymerase、限制性内切酶、T4 连接酶、DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; 蛋白胨、酵母粉购自 Oxoid 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.4 酶活测定

以 L-脯氨酸-对硝基苯胺为底物 (底物储藏液用 Tris-HCl 7.5 配制, 浓度为 4.25 mmol/L), 反应体

系包括 2 mL Tris-HCl 7.5 缓冲液, 1 mL 底物储藏液和 1 mL 稀释后的酶液, 50 °C 水浴 10 min, 在 405 nm 处测定吸光值。50 °C 下每分钟分解 Pro-pNA 产生 1 $\mu\text{mol/L}$ 对硝基苯胺所需的酶量为一个酶活单位(U)。

1.5 重组菌株的构建

根据脯氨酸氨肽酶基因序列设计一对引物: 上游引物 5' CGGGATCCATGGCTGCCAAAC 3' (*Bam*H I); 下游引物 5' CGCGACGCGTCTAATCAATAG AGTC 3' (*Mlu* I), 从载体 pMD19-pap 上扩增含酶切位点的目的基因。将目的基因与质粒 pMA5 分别用 *Bam*H I 和 *Mlu* I 进行双酶切, 胶回收纯化后按一定比例混合在 16 °C 金属浴下连接 12~16 h 并转化 *E. coli* JM109 感受态, 涂布氨苄抗性的 LB 固体培养基, 待长出转化子后先经菌落 PCR 初步验证, 将验证正确的重组子提取质粒双酶切验证后进行测序。将构建成功的重组质粒电转化进 *Bacillus subtilis* WB600 中得重组菌。

1.6 重组菌的发酵表达

将重组 *Bacillus subtilis* WB600 (pMA5-pap) 接种于 50 mL 含卡那抗性的 TB 培养基, 37 °C, 220 r/min 振荡培养 24 h。发酵结束后在 4 °C 条件下 8 000 r/min 冷冻离心 10 min, 上清液进行胞外酶活的测定。菌体沉淀用 Tris-HCl 7.5 的缓冲液洗涤两遍后用相同体积的缓冲液重悬, 菌悬液按照一定倍数稀释超声破碎后进行胞内酶活的测定。重组菌脯氨酸氨肽酶的表达情况用 SDS-PAGE 进行检测。

1.7 重组菌胞外分泌策略

通过对 TB 培养基成分的调整, 增加胞外重组脯氨酸氨肽酶的分泌量。

1.8 重组脯氨酸氨肽酶分离纯化

重组菌在分泌培养基中发酵结束后离心得到上清液, 上清液经硫酸铵盐析后用 50 mmol/L Tris-HCl 6.5 缓冲液溶解, 然后在此缓冲液中 4 °C 透析过夜, 透析后过膜 (0.22 μm) 作为离子交换层析上样样品。

Hitrap Q HP 离子交换层析柱经 50 mmol/L Tris-HCl 6.5 缓冲液平衡后, 上样 1 mL, 流速 1 mL/min, 控制 NaCl 的浓度为 0.2、0.3 和 1 mol/L 分三个阶段洗脱各洗 10 个柱体积, 每管收集 0.5 mL 洗脱液。

将酶活最高的几管合并后用超滤管浓缩, 浓缩液用于跑 SuperdexTM 75 10/300 GL 凝胶柱, 上样

0.5 mL,流速 0.5 mL/min,50 mmol/L Tris-HCl 6.5 缓冲液进行洗脱,每管收集 0.5 mL。上述各部收集液进行 SDS-PAGE 验证其纯度。

1.9 重组脯氨酸氨肽酶酶学性质

将分离纯化所得脯氨酸氨肽酶于不同 pH 值下测定其活性,以酶活最高者定义为 100%,分别考察其最适 pH 和 pH 稳定性。在不同的温度下对重组脯氨酸氨肽酶的酶活进行测定以确定其最适反应温度,将其在系列温度下保温 1 h 后用 1.4 节所述方法测定剩余酶活力,以 4 ℃保温的为 100% 以确定其温度稳定性。

将纯酶液与相应浓度的金属离子 $MnCl_2$ 、 $MgCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $CuSO_4$ 、 $CoCl_2$ 、 $NiSO_4$ 及蛋白酶抑制剂 PMSF、DTT、 β -巯基乙醇和 EDTA 在 50 mmol/L Tris-HCl 7.5 缓冲液中 30 ℃温浴 30 min 后用标准方法测定剩余活性以考察金属离子及蛋白酶抑制剂对重组脯氨酸氨肽酶的影响。

将纯酶液分别与 0.5 mol/L 的 NaCl、KCl、 Na_2SO_4 和 K_2SO_4 (溶于 50 mmol/L Tris-HCl 7.5 缓冲液中) 30 ℃温浴 30 min 后用标准方法测定酶活以考察盐的种类对重组脯氨酸氨肽酶的影响,在 0~4.36 mol/L NaCl 下考察其耐盐性。

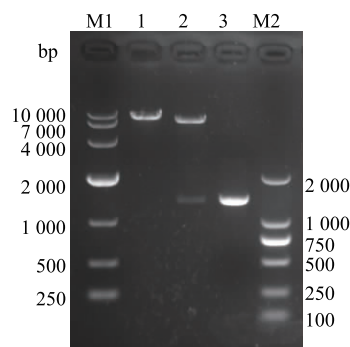
分别配置 Lys-pNA, Leu-pNA, Ala-pNA, Met-pNA, Ile-pNA, Val-pNA, Arg-pNA 和 Pro-pNA 以考察其底物特异性,以酶活最高者为 100%。以不同浓度的 L-脯氨酸-对硝基苯胺为底物 (0.2~1.4 mmol/L),用标准方法测定酶活,利用双倒数作图法计算重组脯氨酸氨肽酶的米氏常数 K_m 及其最大反应速率 V_{max} 。

2 结果与讨论

2.1 重组菌株的构建

根据脯氨酸氨肽酶 cDNA 序列设计引物,将脯氨酸氨肽酶基因从载体 pMD19-pap 上扩增了下来,两端分别带上了 *Bam*H I 和 *Mlu* I 酶切位点。按 1.5 节所述方法构建重组质粒,其双酶切验证结果如图 1 所示,重组质粒切出了大、小两条带,其大小分别与空质粒和脯氨酸氨肽酶 PCR 产物相对应,表明重组质粒构建成功。将重组质粒送上海生工测序,测序结果与脯氨酸氨肽酶 cDNA 序列一致,表明序列没有发生突变。将重组质粒用电转仪在 12.5 kV/cm,25 μ F,200 Ω ,4.5~5.0 ms 条件下电转化进

Bacillus subtilis WB600,并在卡那抗性的 LB 固体培养基上挑选重组子,重组子经 PCR 快速验证和双酶切验证后表明已构建成功,该重组菌用于脯氨酸氨肽酶发酵表达。



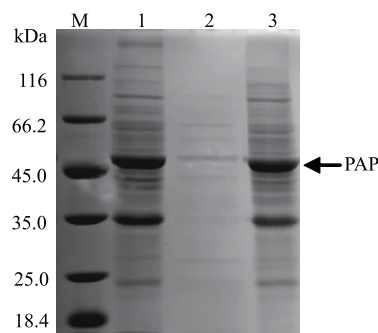
M1-10 000 DNA Marker;1-单酶切;2-双酶切;3-PCR 产物;
M2-2 000 DNA Marker

图 1 重组质粒双酶切验证

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmid by *Bam*H I and *Mlu* I

2.2 重组菌发酵表达

重组 *Bacillus subtilis* WB600(pMA5-pap)按 1.6 节所述方法进行发酵表达后,测得其胞外酶活的值为 7.5 U/mL,胞内酶活为 40.0 U/mL,SDS-PAGE 验证结果见图 2,由图可以看出在 50 kDa 处出现了明显的蛋白条带,表明脯氨酸氨肽酶在枯草芽孢杆菌中成功实现了表达。由表达结果看出,虽然有一部分脯氨酸氨肽酶分泌到了胞外,但分泌量较少,大多数还集中在胞内,不利于工业化生产和制备,因此后续将采用一定的手段提高胞外表达量从而简化纯化步骤。



M-Marker;1-全细胞;2-胞外;3-胞内

图 2 重组脯氨酸氨肽酶表达 SDS-PAGE 验证

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant prolyl aminopeptidase expression

2.3 重组脯氨酸氨肽酶胞外分泌

由于该脯氨酸氨肽酶自身为胞内酶,前期也尝试过加信号肽,但信号肽的添加导致其不能正常表达,因此本研究采用在培养基中添加渗透剂的方法改变细胞膜的通透性以提高胞外分泌量。前期通过实验探索发现 D-山梨醇和 CaCl₂ 对胞外分泌有促

进作用,因此进一步对该两种物质的添加量做了研究,其结果如表 1 所示,综合考虑对细胞生长的影响确定 5%为 D-山梨醇的最适添加量,当 CaCl₂ 的最终浓度为 2 mmol/L 时脯氨酸氨肽酶的胞外分泌量达到最大为 36.0 U/mL,相比于 TB 培养基时(7.5 U/mL)提高了 4.8 倍。

表 1 培养基组成对胞外酶活的影响

Table 1 Effect of medium composition on extracellular enzyme activity

培养基	胞外酶活/(U/mL)	培养基	胞外酶活/(U/mL)
TB	7.5	TB+ D-山梨醇 (5%)+CaCl ₂ (0.3 mmol/L)	28.3
TB+D-山梨醇 (1%)	21.8	TB+ D-山梨醇 (5%)+CaCl ₂ (0.9 mmol/L)	33.1
TB+D-山梨醇 (5%)	25.6	TB+ D-山梨醇 (5%)+CaCl ₂ (1.5 mmol/L)	34.2
TB+D-山梨醇 (10%)	29.3	TB+ D-山梨醇 (5%)+CaCl ₂ (2.0 mmol/L)	36.0
TB+D-山梨醇 (15%)	21.7	TB+ D-山梨醇 (5%)+CaCl ₂ (2.4 mmol/L)	34.2

2.4 胞外脯氨酸氨肽酶的纯化

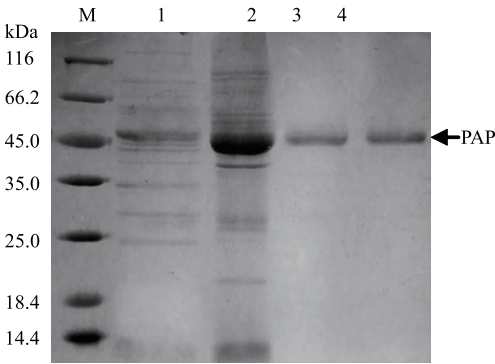
采用分泌培养基对重组菌进行发酵培养后离心得上清发酵液,发酵液按 1.8 节所述方法进行纯化,所用硫酸铵盐析的饱和度为 40%~50%,纯化结果如表 2 所示,由表可知,最终纯化所得脯氨酸氨

肽酶的比酶活为 247.3 U/mg,纯化倍数为 8.8 倍,收率为 1.7%。各步纯化的 SDS-PAGE 验证结果如图 3 所示,由图可以看出经 superdex 纯化后重组脯氨酸氨肽酶达到了电泳纯。

表 2 重组脯氨酸氨肽酶纯化结果

Table 2 Purification of recombinant prolyl aminopeptidase

纯化步骤	总酶活/U	总蛋白/mg	比酶活/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
发酵液	7 319.1	261.6	28.0	100	1.0
硫酸铵盐析	4 711.0	60.8	77.5	64.4	2.8
Hitrap Q	910.2	7.2	126.4	12.4	4.5
Superdex™ 75	123.6	0.5	247.3	1.7	8.8



M-Marker; 1-发酵液; 2-硫酸铵盐析; 3-Hitrap Q; 4-Superdex™ 75

图 3 重组脯氨酸氨肽酶各步纯化 SDS-PAGE 验证

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified prolyl aminopeptidase

2.5 重组脯氨酸氨肽酶的酶学性质

该脯氨酸氨肽酶在枯草芽孢杆菌中重组表达

后其基本酶学性质变化不大,在 50 ℃时表现出最大的催化活性,在 50 ℃及以下保温后剩余酶活仍有 75%以上,当 60 ℃保温 1 h 后活性基本丧失,说明该酶对高温的耐受性还有待提高^[11]。该酶的最适 pH 值为 7.5,与来源于 *Debaryomyces hansenii* (pH 7.5), *Penicillium camemberti* (pH 7.0) 和 *Arthrobacter nicotianae* 9458 (pH 8.0) 的脯氨酸氨肽酶的最适 pH 相近^[5, 12-13],在 pH 6~11 之间稳定,在酸性环境中酶活丧失严重。在金属离子当中,只有 ZnSO₄ 和 CuSO₄ 对该酶有较强的抑制作用,在 1 mmol/L 的浓度下 30 ℃保温 30 min 后相对酶活仅为 2%和 5%。该酶为非金属依赖型酶,也不含二硫键,因此 EDTA 和 β-巯基乙醇对酶活性均没有影响。

研究发现该酶具有一定的耐盐性,首先考察了几种盐类对酶活性的影响,结果如图 4 所示,由图

可以看出一定浓度的盐不但对该酶没有抑制作用,反而还有一定的激活作用,且这种激活作用与盐的种类关系不大。进一步用 NaCl 考察了该酶的耐盐性,发现当 NaCl 的浓度达到 4.36 mol/L 时仍有 109.5% 的相对酶活,说明该酶能耐受较高的盐浓度。脯氨酸氨肽酶的这种耐盐性在别的菌株里也有过报道,Uraji 等人^[14]发现来源于 *Streptomyces aureofaciens* TH-3 的脯氨酸氨肽酶能耐受 4 mol/L 的 NaCl,且推测脯氨酸氨肽酶的这种耐盐机制可能与其 N 端氨基酸残基的疏水作用有关,Matsushita-Morita 等人^[15]报道的米曲霉脯氨酸氨肽酶也具有一定的耐盐性,其盐浓度也能达到 4 mol/L,Fukuuchi 等人^[16]对嗜盐菌里蛋白的氨基酸组成进行了研究,指出蛋白表面的酸性残基可能有助于其适应高盐环境,且过多的具有较小 pKa 值的天冬氨酸的存在会导致其在高盐浓度下带电形式的酸性残基增加。利用该特性在一些酶解过程中可适量提高盐浓度以更好地发挥酶活性^[17]。另外由于米曲霉自身产的脯氨酸氨肽酶只存在于胞内且含量甚微,如果额外添加适量氨肽酶与酱油曲复合使用可提高酱油中氨基酸含量并获得更好的风味。

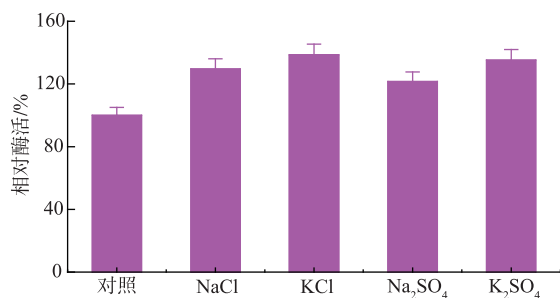


图 4 盐种类对重组脯氨酸氨肽酶的影响

Fig. 4 Effects of several salts on recombinant prolyl aminopeptidase activity

通过对 8 种 AA-pNA 进行水解,其结果如图 5 所示,说明该酶只对 Pro-pNA 有水解作用,而对其他几种底物均无水解作用,说明该酶对脯氨酸具有严格的底物特异性。用 L-脯氨酸-对硝基苯胺为底物,重组脯氨酸氨肽酶的动力学方程如图 6 所示,根据图中方程计算得米氏常数 K_m 和最大反应速率

V_{max} 分别为 0.171 mmol/L 和 55.99 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$,与大肠杆菌表达的重组脯氨酸氨肽酶(K_m 和 V_{max} 分别为 0.06 mmol/L 和 28.70 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$) 相比^[18],虽然其对底物亲和力有所降低,却表现出更高的催化效率。

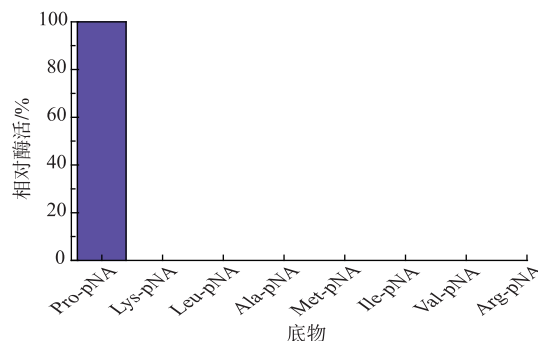


图 5 重组脯氨酸氨肽酶的底物特异性

Fig. 5 Substrate specificity of recombinant prolyl amino-peptidase

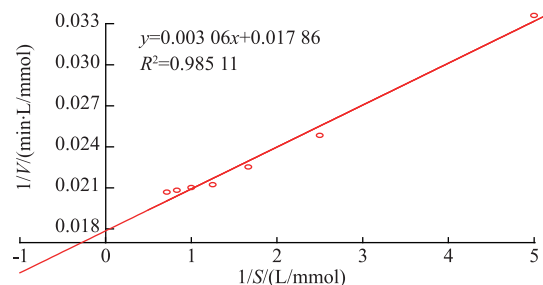


图 6 重组脯氨酸氨肽酶 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 6 Lineweaver-Burk plot of recombinant prolyl amino-peptidase

3 结 语

本研究成功实现了脯氨酸氨肽酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达,并通过分泌培养基大大提高了胞外表达量,相比于大肠杆菌其安全性、胞外分泌能力、以及表达量均有所提高。随着生物技术的发展,各种不同类型的氨肽酶的应用和需求也越来越广泛,除了用于蛋白水解和改善风味之外,在医疗诊断与检测、蛋白测序等领域也发挥着日益重要的作用。后续通过带标签表达简化纯化过程,优化放大发酵条件可实现脯氨酸氨肽酶的生产。

参考文献:

- [1] DUAN Gang, ZHAO Zhengfeng, QIAN Ying. Enzyme application in the protein processing industries [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(4): 104-110. (in Chinese)

- [2] NANDAN A, PANDEY A, NAMPOOTHIRI K M. Proline-specific extracellular aminopeptidase purified from *Streptomyces lavendulae*[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2011, 163(8):994-1001.
- [3] WANG Shuhao, SUN Manji. The biochemical properties of prolidase[J]. **Military Medical Sciences**, 2002, 27(6):470-474. (in Chinese)
- [4] MURAI A, TSUJIMOTO Y, MATSUI H, et al. An *Aneurinibacillus* sp. strain AM-1 produces a proline-specific aminopeptidase useful for collagen degradation[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2004, 96(4):810-818.
- [5] BOLUMAR T, SANZ Y, ARISTOY M C, et al. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003, 69(1):227-232.
- [6] PAN Jinquan. Partial purification and properties of one prolyl-aminopeptidase from *Mucor* AS3. 2778 [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2011, 37(4):26-31. (in Chinese)
- [7] TANG Wenzhu, DONG Changhui, HOU Yingmin, et al. Optimization of fermentation condition for aminopeptidase production with *Aspergillus oryzae*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2014, 40(5):82-86. (in Chinese)
- [8] JIA Min, MU Wanmeng, ZHANG Tao, et al. Expression of D-Psicose 3-Epimerase in *Bacillus subtilis* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(11):1129-1135. (in Chinese)
- [9] GAO X X, CUI W J, TIAN Y P, et al. Over-expression, secretion, biochemical characterisation, and structure analysis of *Bacillus subtilis* aminopeptidase[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013, 93(11):2810-2815.
- [10] WESTERS L, WESTERS H, QUAX W J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2004, 1694(1-3):299-310.
- [11] 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)
- [12] FUKU Y, MATSUOKA H. The purification and characterization of prolyl aminopeptidase from *Penicillium camemberti* [J]. **Journal of Dairy Science**, 1993, 76(9):2478-2484.
- [13] SMACCHI E, GOBBETTI M, LANCIOTTI R, et al. Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Arthrobacter nicotianae* 9458[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1999, 178(0378-1097(Print)):191-197.
- [14] URAJI M, ARIMA J, UESUGI Y, et al. Effect of salt on the activity of *Streptomyces* prolyl aminopeptidase [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2007, 1774(11):1462-1469.
- [15] MATSUSHITA-MORITA M, FURUKAWA I, SUZUKI S, et al. Characterization of recombinant prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2010, 109(1):156-165.
- [16] FUKUCHI S, YOSHIMUNE K, WAKAYAMA M, et al. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2003, 327(2):347-357.
- [17] LIN Ying, 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)
- [18] 丁国伟. 米曲霉脯氨酸氨肽酶基因克隆及其异源表达[D]. 无锡:江南大学, 2014.