

· 食品生物技术 ·

一种来自乳酸乳球菌的新型氨肽酶 A 的制备及特性分析

田鑫^{1#}, 刘金洲^{2#}, 何忠会¹, 陈琳方¹, 刘梦元^{1*}

1 湖北大学生命科学学院 生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

2 湖北中医药大学检验学院, 湖北 武汉 430065

田鑫, 刘金洲, 何忠会, 陈琳方, 刘梦元. 一种来自乳酸乳球菌的新型氨肽酶 A 的制备及特性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3494-3507.

TIAN Xin, LIU Jinzhou, HE Zhonghui, CHEN Linfang, LIU Mengyuan. Production and characterization of a novel aminopeptidase A from *Lactococcus lactis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3494-3507.

摘要: 氨肽酶 A (aminopeptidase A, Pep A)能特异性地水解 N 末端为谷氨酸(glutamic acid, Glu)或天冬氨酸(aspartic acid, Asp)的肽链, 提高蛋白质的水溶性和食物的风味, 在食品工业和肉类加工中具有一定的应用前景。本研究采用全基因合成的方式获得了乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) IL1403 氨肽酶 A (*Lactococcus lactis*-Pep A, *Lc*-Pep A)的编码基因, 将该基因克隆并导入毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 (His4), 在毕赤酵母中实现了 *Lc*-Pep A 的高效分泌表达, 表达产物经鉴定和纯化制备后, 进行了生物学特性的分析。结果表明, *Lc*-Pep A 具有较强的底物特异性, 对 2 种底物谷氨酸对硝基苯胺(glutamic acid-p-nitroaniline, Glu-pNA)和天冬氨酸对硝基苯胺(aspartic acid-p-nitroaniline, Asp-pNA)具有相似的催化活力和酶动力学参数。*Lc*-Pep A 是一种金属蛋白酶, 最适反应温度为 60 °C, 最适 pH 为 8.0, 具有较宽的热稳定性和酸碱稳定性。金属离子 Co²⁺、Mn²⁺及 Zn²⁺等对酶活力具有不同程度的激活作用, 而 Ni²⁺和 Cu²⁺对酶活力具有强烈的抑制作用。*Lc*-Pep A 对常规蛋白酶抑制剂不敏感, 但能被金属蛋白酶抑制剂、EDTA 及二硫键还原剂抑制。这些研究为 *Lc*-Pep A 的生产和指导该酶的应用打下了坚实的基础。

关键词: 氨肽酶 A; 乳酸乳球菌; 食品工业; 肉类加工

资助项目: 国家自然科学基金(30973669); 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室开放基金(SKLBEE2020023)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (30973669) and the Open Fund of the State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzymatic Engineering (SKLBEE2020023).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: 20050109@hubu.edu.cn

Received: 2023-04-17; Accepted: 2023-06-01; Published online: 2023-06-26

Production and characterization of a novel aminopeptidase A from *Lactococcus lactis*

TIAN Xin^{1#}, LIU Jinzhou^{2#}, HE Zhonghui¹, CHEN Linfang¹, LIU Mengyuan^{1*}

1 State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzymatic Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 School of Laboratory Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China

Abstract: Aminopeptidase A (Pep A) is a metal-dependent enzyme that specifically hydrolyze peptides with the N-terminal amino acids glutamic acid (Glu) and aspartic acid (Asp). A possible application of PepA is the hydrolysis of Glu/Asp-rich food proteins such as wheat gluten and casein, increasing the flavor and solubility of food protein. In the present study, the gene encoding a Pep A from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 was synthesized and introduced into *Pichia pastoris* GS115 (His4). *Lc*-Pep A was successfully expressed and secreted to the culture medium, followed by identification and purification to homogeneity. Characteristics study demonstrated that *Lc*-Pep A could specifically hydrolyze the substrates Glu-pNA and Asp-pNA with similar catalytic activity, and this was further confirmed by the kinetics parameters measured. Additionally, *Lc*-Pep A showed a broad thermostability and pH stability with an optimum temperature of 60 °C and an optimum pH of 8.0. The enzyme activity of *Lc*-Pep A was activated by metal ions Co^{2+} , Mn^{2+} , and Zn^{2+} but was strongly inhibited by Ni^{2+} and Cu^{2+} . The routine proteinase inhibitor had no effect on the activity of *Lc*-Pep A. However, *Lc*-Pep A was strongly inhibited by the metalloproteinase inhibitor, EDTA, and disulfide bond-reducing agents. The study may facilitate production and application of *Lc*-Pep A.

Keywords: aminopeptidase A; *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*; food industry; meat processing

氨肽酶(aminopeptidase)是一类外肽酶,从蛋白质或肽链的 N 末端选择性切割氨基酸残基,一般作用范围较广,是较早发现的一类酶。其广泛分布于高等动物、植物和微生物界,一些种类的微生物可向胞外分泌氨肽酶以获取氨基酸来维持生长繁殖,故氨肽酶在维持细胞的生理功能方面起到重要的作用^[1]。根据水解 N 端氨基酸残基专一性程度的不同,将氨肽酶分为 2 大类:一类对 N 端氨基酸残基具有严格的专一性,只能将某一种或几种氨基酸残基特异地水解,如天冬氨酸(aspartic acid, Asp)和谷氨酸(glutamic acid, Glu)残基只能用氨肽酶 A

(aminopeptidase A, Pep A)水解;这类氨肽酶包括:Pep P(水解 N 末端为脯氨酸残基的肽)、Pep X(水解 N 末端第二位为脯氨酸残基的肽)、Pep I(水解 N 末端脯氨酸亚氨基)^[2-4]。另一类对 N 端氨基酸残基专一性弱,几乎所有的氨基酸残基都能够水解,如赖氨酸氨肽酶(lysyl aminopeptidase, Pep N)^[2]、亮氨酸氨肽酶(leucyl aminopeptidase, LAP)^[5]、苯丙氨酸氨肽酶(phenylalanyl aminopeptidase, Pep M)^[6]等。氨肽酶的酶解产物为小肽和游离氨基酸,由于小肽和游离氨基酸是食品中重要的营养物质和风味,氨肽酶可应用于牛乳的脱苦^[7],还能有效提高肉类加工中的风味及营养价

值,改善调味品如酱油、酱料及鱼露的风味^[8-9],在食品工业中具有广泛的应用价值。Pep A 是一种金属依赖的蛋白酶,专一性地水解以 Asp/Glu 为 N 末端的多肽,可应用于富含 Glu/Asp 的食物蛋白的水解,如面筋和酪蛋白等^[10-12]。与其他的外肽酶和内肽酶复合使用,Pep A 可显著提高蛋白质的水解程度,提高蛋白质如面筋和肉类的水溶性^[2,13],而且还能极大地提高 Glu 的含量,使食物的味道更为鲜美,在食物烹饪上具有较好的应用前景^[14-15]。

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类异源性革兰氏阳性细菌的总称,其共同的特征是发酵碳水化合物形成终产物乳酸,是国际上公认的通常被认为是安全(generally recognized as safe, GRAS)微生物^[16]。大多数的 LAB 都是氨基酸的营养缺陷型,但具有强大的蛋白水解系统,能在复合蛋白质的培养基上生长,是蛋白水解酶类的重要微生物资源。目前,已从 LAB 中分离到了多种不同底物特异性的氨肽酶如 Pep C、Pep Y、Pep N、Pep O、Pep X、Pep P 及 Pep A 等,是目前氨肽酶被发掘和分离最多的微生物。乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, *Lc. lactis*)是 LAB 家族中的重要成员,广泛应用于风味奶酪的制备,在食物蛋白的脱苦和增味上具有应用潜力。目前,有关 LAB 来源 Pep A 的研究报道极少。从 1985 年至今,仅有的 5 篇文献分别报道了乳球菌属乳脂亚种(*Lc. lactis* subspecies *cremoris* HP、AM2)及乳酸亚种(*Lc. lactis* ssp. *Lactis* GM1363、DSM 20481、NCDO712)等不同菌株的 Pep A 的分离制备和酶学特性^[4,10,17-19]。其中, Pep A 的制备主要采用从菌株细胞中直接分离的方式,收率不高,未能工业化应用。2001 年,科学家完成了一个新的乳球菌乳酸亚种(*Lc. lactis* ssp. *lactis*)菌株 IL1403 的全基因组测序,在 UniProt 数据库中提供了其 Pep A (*Lc-Pep A*)氨基酸序列

(UniProt ID: Q9CIH3),但迄今仍没有该酶的制备和功能方面的研究报道。本研究合成了该 *Lc-Pep A* 编码基因,实现了 *Lc-Pep A* 在毕赤酵母中的高效分泌表达,并对 *Lc-Pep A* 进行了纯化制备及生物学特性的研究,为该酶的工业化生产和指导该酶的应用打下了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和试剂

质粒载体 pMD18-T 和 pHB905M,由本实验室构建并保存,分别用于基因的克隆及蛋白质表达。大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10 购自天根生化科技(北京)有限公司,用于分子克隆和质粒的保存。毕赤酵母(*Pichia pastori*, *P. pastori*)宿主细胞 GS115 (His4)由本实验室保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Pfu* DNA 聚合酶、DNA 回收试剂盒等购自大连宝生物(TaKaRa)。Ni-NTA 亲和层析凝胶购自 Amersham Pharmacia 公司。酰胺化合物氨基酸-对硝基苯胺(amino acid-p-nitroaniline, AA-pNA)由强耀生物(武汉)有限公司合成。蛋白酶抑制剂及二硫键还原剂等购自 Sigma 公司。

1.2 *Lc-Pep A* 基因合成及表达载体的构建

以毕赤酵母偏爱密码子对 *Lc. lactis* ssp. *lactis* IL1403 Pep A (*Lc-Pep A*)的氨基酸序列(UniProt ID: Q9CIH3)进行反向翻译,获得编码 *Lc-Pep A* 核苷酸序列,在 *Lc-Pep A* 核苷酸序列下游加上组氨酸标签(histidine tag, His-tag)的编码序列,并在 5'端和 3'端分别引入 *Cpo* I 和 *Not* I 位点,形成重组 *Lc-Pep A* 的完整编码核苷酸序列。采用全合成的方式获得 *Lc-Pep A* 的编码基因,经 TA 克隆连入质粒 pMD18-T,形成重组质粒 pMD-18T/PepA,转化大肠杆菌 Top10 进行载体的扩增和保存。*Lc-Pep A* 表达载体的构建如图 1 所示,用 *Cpo* I 和 *Not* I 双酶切质粒

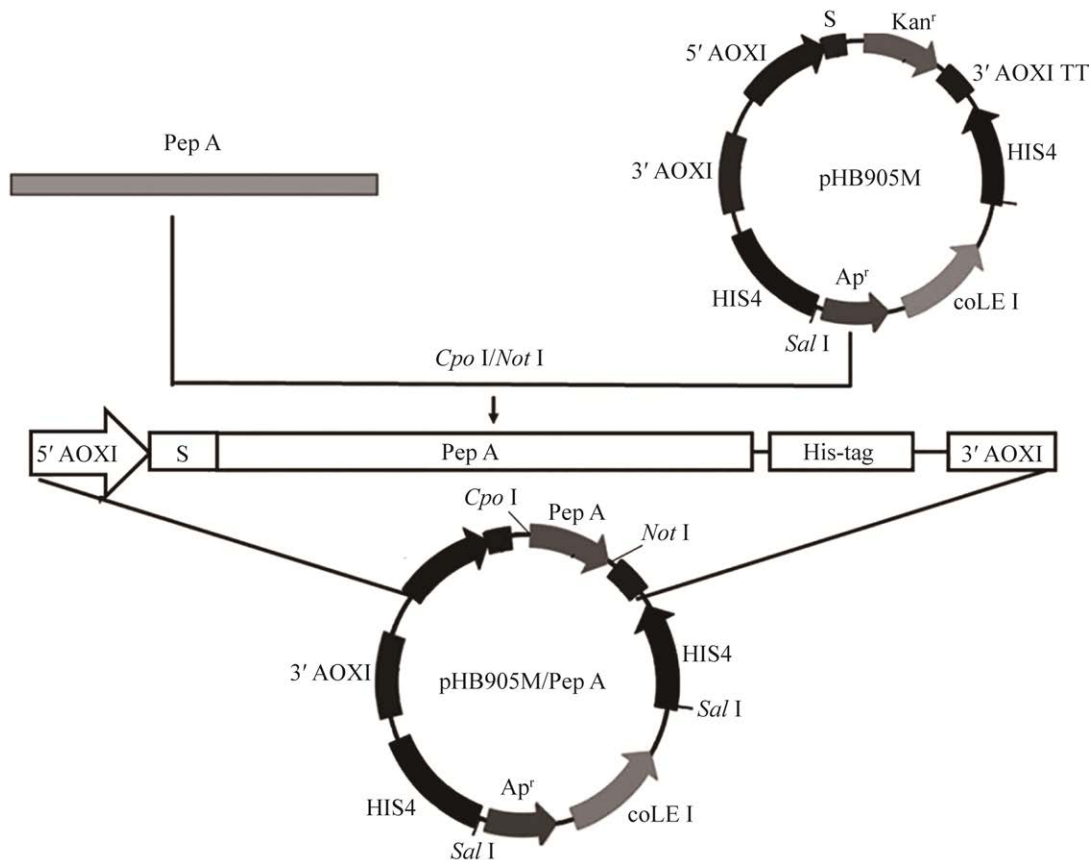


图1 *Lc-Pep A* 表达载体的构建程序

Figure 1 Construction scheme of the expression vector of *Lc-Pep A*. The gene encoding *Lc-Pep A* was synthesized and cloned into pHB905M via *Cpo I* and *Not I* sites, fused with the His-tag at the carboxyl terminal, resulting the expression vector pHB905M/*Pep A*. *Lc-Pep A* is at the downstream of the α -factor signal and is controlled by the promoter of yeast AOX1 allowing *Lc-Pep A* to be expressed and secreted into culture medium.

pMD-18T/*PepA* 及质粒 pHB905M, 回收酶切片段, 将 *Lc-Pep A* 编码基因连入质粒 pHB905M 中, 形成 *Lc-Pep A* 的重组表达载体 pHB905M/*PepA*, 转化大肠杆菌 Top10, 进行质粒的扩增、提取和序列测定。确保 *Lc-Pep A* 编码基因的定点插入和序列正确。

1.3 *Lc-Pep A* 的转化、分泌表达及鉴定

质粒 pHB905M/*PepA* 经 *Sal I* 酶切线性化, 电转化(电压 1.5 kV, 电容 25 μ F, 电阻 400 Ω) *P. pastoris* GS115 (His4) 细胞, 涂布 MD 平板 [0.67% (质量体积分数) YNB, 2% (质量体积分

数)葡萄糖, 1.5% (质量体积分数)琼脂], 28 $^{\circ}$ C 培养箱倒置培养, 直至长出单个菌落。阳性重组子经扩大培养, 提取基因组 DNA, 经 PCR 进一步鉴定。挑取鉴定的阳性重组子, 接种 25 mL BMGY 培养基[100 mmol/L 磷酸二氢钾, pH 6.0, 1% (质量体积分数)酵母提取物, 2% (质量体积分数)蛋白胨, 4×10^{-5} % (质量体积分数)生物素, 1% (质量体积分数)甘油], 30 $^{\circ}$ C 摇动培养至 OD_{600} 为 6-8, $3\ 000 \times g$ 离心 10 min 收集细胞, 重悬于 250 mL BMMY 培养基[100 mmol/L 磷酸二氢钾, pH 6.0, 1% (质量体积分数)酵母提取

物, 2% (质量体积分数) 蛋白胨, 4×10^{-5} % (质量体积分数) 生物素, 0.5% (质量体积分数) 甲醇] 中, 30 °C 继续摇动培养 120 h, 每隔 24 h 加入终浓度为 0.5% 的甲醇, 保持对 *Lc-Pep A* 的连续诱导表达。10 000×g 离心 10 min, 收集上清, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析, 分离胶浓度为 12%。电转凝胶上的蛋白质至硝酸纤维膜(0.45 μm, Pall Gelman), 5%的脱脂牛奶 4 °C 封闭过夜, 1×PBS 洗膜 3 次, 每次 3 min。将膜浸泡于含 anti-His-tag HRP-IgG (1:1 000) 的 1×PBS 中, 37 °C 孵育 2 h, 1×PBS 洗膜 3 次, 每次 3 min。加入 DAB 显色剂, 待显色至理想的程度, 自来水冲洗终止反应。

1.4 *Lc-Pep A* 的纯化制备

于 250 mL 上述表达上清中加入等体积的 100%饱和硫酸铵, 置于 4 °C 缓慢摇动过夜, 确保蛋白充分沉淀。12 000×g 离心 30 min 收集沉淀, 沉淀重悬于 20 mL 透析缓冲液[20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl]中, 装入透析袋, 置于 1 000 mL 透析缓冲液中, 4 °C 搅拌透析 24 h, 每 8 h 更换一次透析缓冲液, 充分去除蛋白质中的硫酸铵及其他离子。随后, 蛋白质通过固定化的 Ni^{2+} 亲和层析进行纯化。简要地, 透析后的蛋白质上样于经 10 倍体积透析缓冲液平衡的 Ni^{2+} 亲和层析柱(Ni-NTA), 流速 0.5 mL/min。样品流穿后, 用缓冲液[20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑]洗涤至基线, 流速为 1 mL/min, 充分去除非结合的蛋白质。最后, 蛋白质用缓冲液[20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑]洗脱, 流速为 1 mL/min。收集蛋白质峰, 行 SDS-PAGE 检测, 并用 100 倍体积的 1×PBS 缓冲液透析 24 h, 每 8 h 更换一次缓冲液, 充分去除蛋白质中的咪唑及其他无机

离子。透析后的蛋白质经 12 000×g 离心 20 min, 0.22 μm 滤膜过滤以去除少量的蛋白沉淀物和潜在的微生物, 用 Bradford 法定量蛋白浓度, 冷冻干燥备用。

1.5 *Lc-Pep A* 的标准酶特异性及酶活力测定

为了分析 *Lc-Pep A* 的底物特异性和催化活力, 合成了一系列 L-氨基酸和对硝基苯胺(p-nitroaniline, pNA)的氨酰化合物(AA-pNA)。不同特异性的氨肽酶可选择性水解 L-氨基酸的羧基与 pNA 的氨基形成的酰胺键, 释放出有特征吸收的黄色物质 pNA, 通过对 pNA 的定量即可对 *Lc-Pep A* 的底物特异性和活力进行分析。标准的反应体系为 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L CoCl_2 。于 200 μL 标准反应体系中加入 1 μg *Lc-Pep A* 及 0.5 mmol/L 酰胺化合物(AA-pNA), 50 °C 水浴中反应 10 min, 加入等体积的醋酸终止反应, 冷却后于 405 nm 波长测定吸光值。配制 10、20、40、60、80、100 μmol/L 的标准 pNA 溶液, 于 405 nm 波长测定吸光值, 以浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线。将上述各酶促反应测定的吸光值代入标准曲线, 计算 pNA 的产量。酶活力定义为: 1 min 水解 AA-pNA 产生 1 μmol pNA 所需要的酶量为一个酶活力单位(IU), 酶活力用 IU/mg 表示。于 200 μL 标准反应体系中加入 1 μg *Lc-Pep A*, 0.5 mmol/L Asp-pNA 或 Glu-pNA, 50 °C 水浴中分别反应 10、20、30 min, 加入等体积的醋酸终止反应, 冷却后于 405 nm 波长测定吸光值, 计算不同反应时间 *Lc-Pep A* 水解 Asp-pNA 或 Glu-pNA 的转化率。

1.6 *Lc-Pep A* 的酶动力学分析

于 200 μL 标准反应体系中加入不同终浓度的天冬氨酸对硝基苯胺(aspartic acid-p-nitroaniline, Asp-pNA) 或谷氨酸对硝基苯胺(glutamic acid-p-nitroaniline, Glu-pNA) (0.5–100 μmol/L)

和 1 μg *Lc-Pep A*, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 10 min, 加入等体积的醋酸终止反应, 冷却后于 405 nm 波长测定吸光值, 计算不同底物浓度下酶促反应的 pNA 产量, 以平均 1 min 产生 pNA 的量 ($\mu\text{mol/L}$)作为不同底物浓度下的酶促反应速度。以底物浓度为横坐标, 反应速度为纵坐标, 用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行 Michaelis-Menten 方程回归, 获得酶的动力学曲线和动力学参数。

1.7 温度对 *Lc-Pep A* 活力和稳定性的影响

于 200 μL 上述标准反应体系中加入 0.5 mmol/L Glu-pNA 和 1 μg *Lc-Pep A*, 置 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 10 min, 加入等体积的醋酸终止反应, 按上述酶活力标准测定方法测定和计算不同温度下的相对酶活力(%), 确定酶的最佳反应温度。将 *Lc-Pep A* 于 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中孵育 1 h, 以未处理的酶活力作为对照, 用标准测定方法测定残余酶活力, 确定酶的热稳定性。

1.8 pH 对 *Lc-Pep A* 活力和稳定性的影响

于 200 μL 的 50 mmol/L 甘氨酸-HCl (pH 2.0–5.0)、乙酸钠 (pH 5.0–6.0)、磷酸钠 (pH 6.0–8.0)、Tris-HCl (pH 8.0–9.0)及甘氨酸-NaOH (pH 9.0–11.0)缓冲液中分别加入 1 μg *Lc-Pep A*, 0.5 mmol/L Glu-pNA, 100 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L CoCl_2 , 在酶的最佳温度下反应 10 min, 加入等体积的醋酸终止反应, 按上述酶活力标准测定方法测定和计算不同 pH 的相对酶活力(%), 确定酶的最佳反应 pH。于上述不同 pH (2.0–11.0)的缓冲液中加入终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 *Lc-Pep A*, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 以未处理的酶活力作为对照, 用标准测定方法测定残余酶活力, 确定酶的 pH 稳定性。

1.9 金属离子对 *Lc-Pep A* 活力的影响

改变标准反应体系中的二价金属离子, 分

别用 0.1、1.0 mmol/L 不同二价金属离子取代标准反应体系中的 0.1 mmol/L CoCl_2 。于 200 μL 该反应体系中加入 1 μg *Lc-Pep A* 和 0.5 mmol/L Glu-pNA, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 10 min, 加入等体积的醋酸终止反应, 冷却后于 405 nm 波长测定吸光值。以未加金属离子的酶活力作为对照, 按标准测定方法测定和计算不同二价金属离子下的相对酶活力(%)。

1.10 化学试剂及蛋白酶抑制剂对 *Lc-Pep A* 活力的影响

于 200 μL 标准反应体系中分别加入终浓度为 0.1、1.0 mmol/L 的不同的化学试剂或蛋白酶抑制剂、1 μg *Lc-Pep A* 和 0.5 mmol/L Glu-pNA, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 10 min, 加入等体积的醋酸终止反应, 冷却后于 405 nm 波长测定吸光值。以未加有机试剂或蛋白酶抑制剂的酶活力作为对照, 按上述标准测定方法测定和计算不同浓度化学试剂或蛋白酶抑制剂下的相对酶活力(%)。

2 结果与分析

2.1 *Lc-Pep A* 表达载体的构建、表达与制备

Lc-Pep A 表达载体 pHB905M/PepA 的构建流程见图 1。*Lc-Pep A* 基因位于酵母醇脱氢酶 (AOX1)强启动子控制之下, 并与酵母 α -因子分泌信号肽融合, 处于同一阅读框内, 使 *Lc-Pep A* 在甲醇的诱导下能够在毕赤酵母细胞中高效表达并分泌至培养基中。*Lc-Pep A* 经甲醇诱导不同时间在培养物上清中的表达见图 2A, 其表达量与诱导时间正相关, 最大表达量在 120 h, 大约占整个上清中蛋白的 15%, 继续诱导未见表达量有显著增加。分子量大约为 41 kDa, 与理论大小一致。Western blotting 进一步证实 41 kDa 的蛋白条带为目的蛋白(图 2B)。*Lc-Pep A* 经固定化的 Ni^{2+} 亲和层析(immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)一步纯化可以达

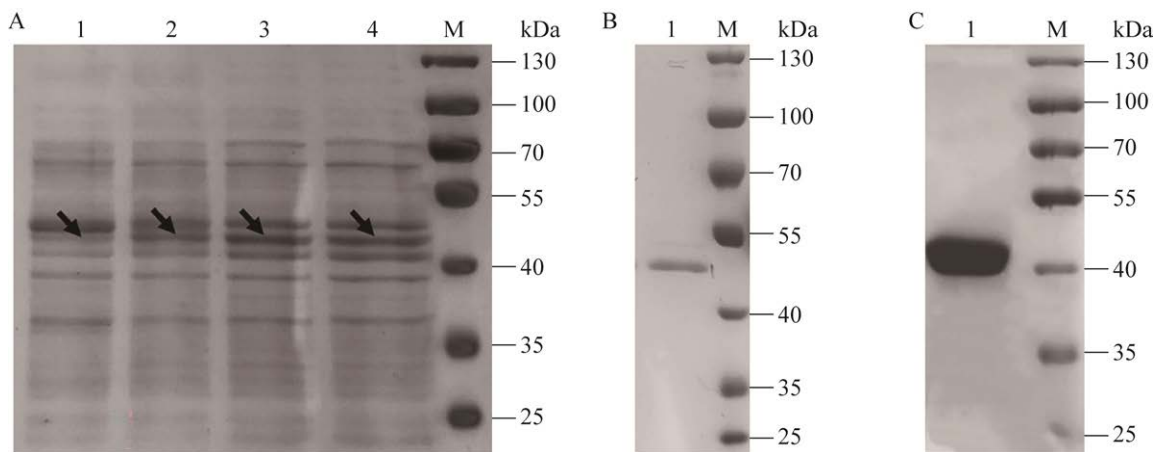


图2 *Lc-Pep A* 的表达、鉴定及纯化

Figure 2 Expression, identification, and purification of *Lc-Pep A*. A: SDS-PAGE analysis of the expression of *Lc-Pep A*. The arrows indicate the expected *Lc-Pep A*. 1–4: Corresponding to 24 h, 48 h, 96 h and 120 h. B: Identification of *Lc-Pep A* by Western blotting. 1: *Lc-Pep A*. C: SDS-PAGE showing the purification of *Lc-Pep A*. 1: *Lc-Pep A*. M: The molecular mass standards (kDa). The molecular weight is on the right of the gel.

到 95% 的纯度(图 2C)。从 1 L 的酵母细胞培养上清中可常规地获得 40–50 mg 的 *Lc-Pep A*。

2.2 *Lc-Pep A* 的活力及酶促动力学

Pep A 专一性作用于以 Asp/Glu 为 N 端的肽链, 水解 Asp/Glu 的羧基与下游氨基酸氨基形成的肽键(酰胺键), 释放出游离的 Asp 或 Glu。如图 3A、3B 所示, 通过对 pNA 的定量分析 *Pep A* 的酶活力。在标准反应条件下, *Lc-Pep A* 对碱性氨基酸精氨酸(arginine, Arg)、芳香族氨基酸色氨酸(tryptophan, Trp)、非极性脂肪族氨基酸亮氨酸(leucine, Leu)、不带电荷的极性侧链氨基酸丝氨酸(serine, Ser)及含硫氨基酸半胱氨酸(cysteine, Cys)与 pNA 形成的氨酰化合物均没有水解作用, 而对酸性氨基酸的氨酰化合物 Asp-pNA 或 Glu-pNA 具有较强的水解作用, 对应的酶活力分别为 4.65 IU/mg 和 4.82 IU/mg, 说明 *Lc-Pep A* 具有较强的底物特异性(图 3C)。*Lc-Pep A* 水解 Asp-pNA 或 Glu-pNA 的转化效率见图 3D, 经过 10 min 的反应, 40% 以上的 Asp-pNA 或 Glu-pNA 被水解, 30 min 后则有

90% 以上的 Asp-pNA 或 Glu-pNA 的被水解, 且在各时间点, *Lc-Pep A* 对 Asp-pNA 及 Glu-pNA 的转化率没有显著性的差异($P > 0.05$)。*Lc-Pep A* 对 Asp-pNA 及 Glu-pNA 的酶促动力学及动力学参数如图 4 和表 1 所示, 可以看出, *Lc-Pep A* 对 Asp-pNA 及 Glu-pNA 具有较强的催化活性, 对 2 种底物的各项动力学参数基本相似, 表明 *Lc-Pep A* 对 Asp 或 Glu 为 N 端的肽链具有相似的催化活性。

2.3 温度和 pH 对 *Lc-Pep A* 活力及稳定性的影响

Glu-pNA 用作底物分析了温度和 pH 对 *Lc-Pep A* 活力及稳定性的影响。如图 5 所示, *Lc-Pep A* 在 30–70 °C 能保持较好的催化活力(40% 以上), 最适反应温度为 60 °C, 在 70 °C 仍有 65% 的活力, 但随温度升高活力则迅速下降, 在 90 °C 则活力几乎为零。*Lc-Pep A* 在 50 °C 以下非常稳定, 经过 1 h 的孵育其活力基本没有变化。当温度为 50–70 °C 时, *Lc-Pep A* 表现为中度稳定, 60 °C 孵育 1 h 仍有 60% 以上的残余

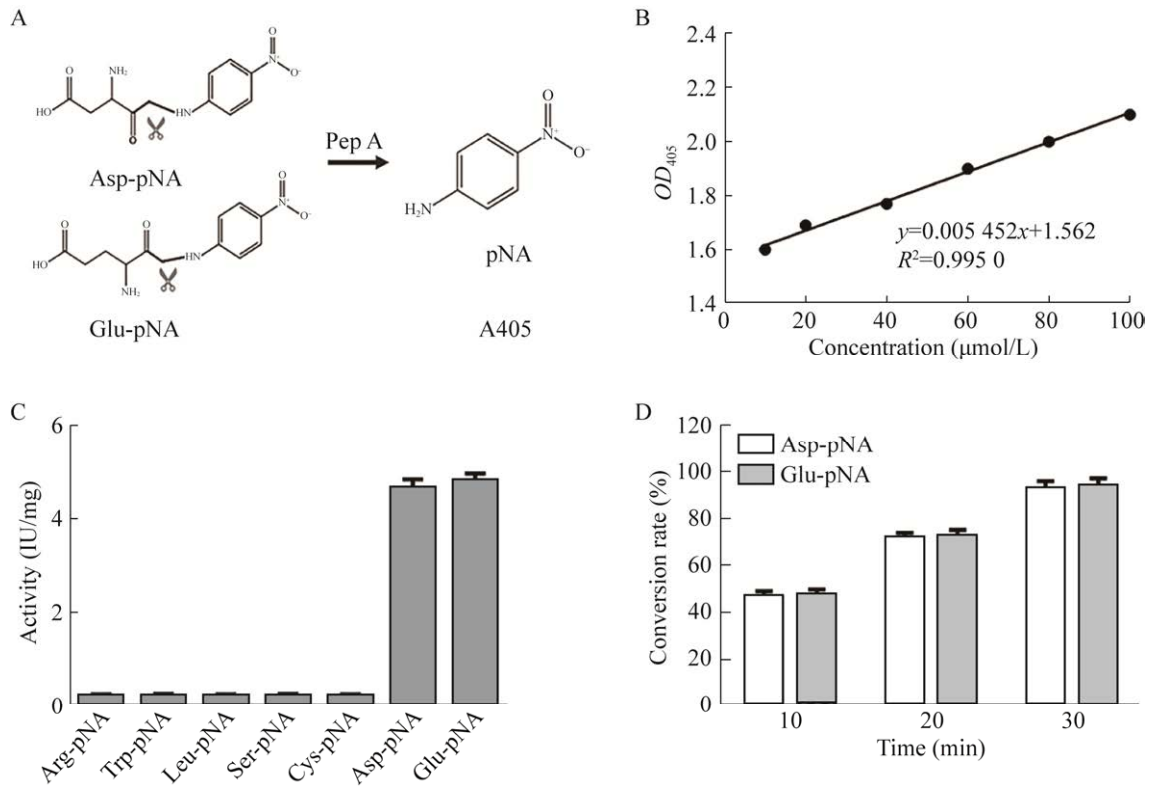


图3 *Lc*-Pep A 底物特异性及活力

Figure 3 Substrate specificity and activity of *Lc*-Pep A. A: The principle for activity measurement of *Lc*-Pep A. B: The standard curve for the detection of pNA production. Mean values of three independent experiments are fitted to a linear regression. C: Activities of *Lc*-Pep A to different type of substrates. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). D: Conversion rates of Asp-pNA and Glu-pNA hydrolysis with *Lc*-Pep A at different times. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=5$). The difference of two groups is determined with Student's *t* test and is considered as significant at $P<0.05$.

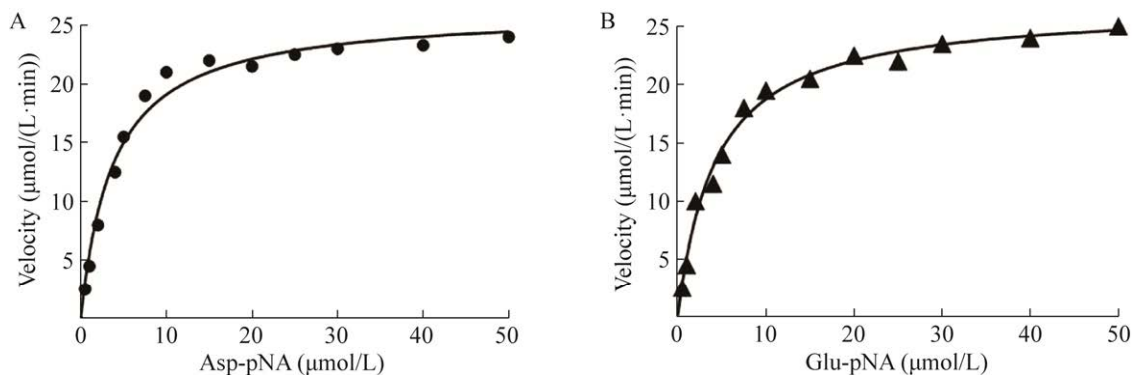


图4 *Lc*-Pep A 酶促动力学

Figure 4 Kinetics analysis of *Lc*-Pep A. A: Kinetics of *Lc*-Pep A toward Asp-pNA. B: Kinetics of *Lc*-Pep A toward Glu-pNA. Mean values of three independent experiments were fitted to the Michaelis-Menten equation by nonlinear regression, defining the K_m and V_{max} values.

表1 *Lc-Pep A* 的动力学参数Table 1 Kinetic parameters of *Lc-Pep A* towards Asp-pNA and Glu-pNA

Substrate	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat} ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{g})$)	k_{cat}/K_m ($/\text{min}\cdot\text{g}$)	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$)
Asp-pNA	3.9	2.6×10^7	1.5×10^{-7}	26.3
Glu-pNA	4.1	2.7×10^7	1.5×10^{-7}	26.8

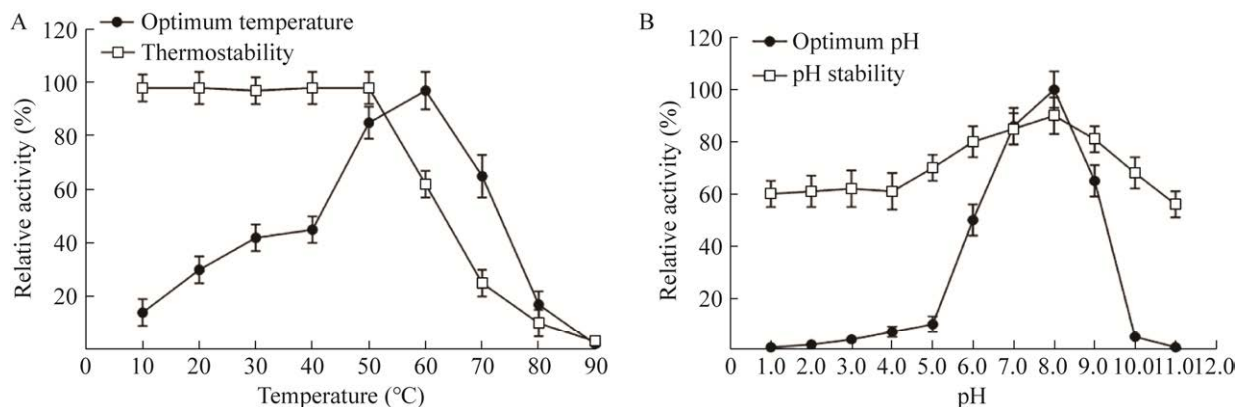
图5 温度(A)和 pH(B)对 *Lc-Pep A* 的活力及稳定性的影响

Figure 5 Effect of temperature (A) and pH (B) on the activity and stability of *Lc-Pep A*. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

活力,但当温度高于 60 °C时,活力则迅速下降。90 °C孵育 1 h,其残余活力不足 5%。*Lc-Pep A* 最适 pH 为 8.0,在 pH 6.0–9.0 内较为稳定,孵育 1 h,残余活力仍在 80%以上。在 pH 1.0–11.0 孵育 1 h,其残余活力始终在 50%以上,说明 *Lc-Pep A* 具有较宽的酸碱稳定性。

2.4 二价金属离子对 *Lc-Pep A* 活力的影响

不同的二价金属离子对 *Lc-Pep A* 活力的影响见图 6,为了避免阴离子对酶活力的影响,所有的二价金属离子都使用氯化物。可以看出,无论是高浓度还是低浓度的 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 对 *Lc-Pep A* 的活力都具有激活作用,且 Co^{2+} 的作用最强,其次是 Mn^{2+} , Zn^{2+} 的作用则最弱。高浓度和低浓度的 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 对 *Lc-Pep A* 的活力几乎没有影响,而无论是高浓度还是低浓度的 Ni^{2+} 或 Cu^{2+} 对 *Lc-Pep A* 的活力都具有显著的抑制作用。

2.5 有机试剂及蛋白酶抑制剂对 *Lc-Pep A* 活力的影响

不同的化学试剂及蛋白酶抑制剂对 *Lc-Pep A* 活力的影响见图 7。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E64、丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟

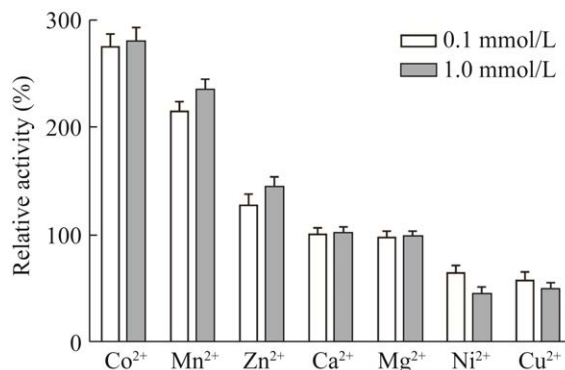
图6 二价金属离子对 *Lc-Pep A* 活力的影响

Figure 6 Effect of metal ions on *Lc-Pep A* activity. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

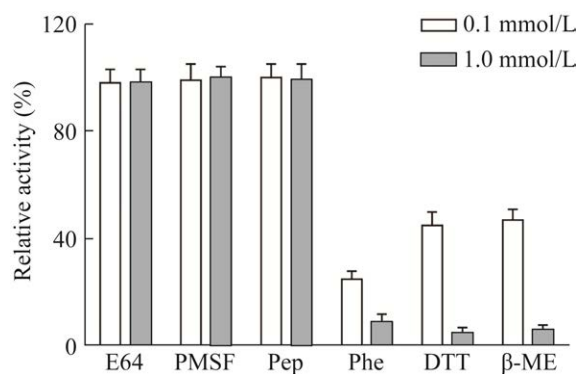


图7 抑制剂及化学试剂对 *Lc-Pep A* 活力的影响
Figure 7 Effect of inhibitors and chemical reagents on *Lc-Pep A* activity. Pep, Phe, and β -ME corresponding to pepstatin A, 1,10-phenantroline, and β -mercaptoethanol, respectively. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)及羧肽酶抑制剂 pepstatin A 对 *Lc-Pep A* 的活力没有显著影响。然而,金属蛋白酶的抑制剂 1,10-菲罗啉(phenantroline)、金属螯合剂乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetra-acetic acid, EDTA)及二硫键还原剂二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)或 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, β -ME)则对 *Lc-Pep A* 的活力具有较为显著的抑制作用。

3 讨论

首先需要说明的是 *Pep A* 的分类问题(<http://www.brenda-enzymes.org>)。目前,将能特异性水解以 Asp 或 Glu 为 N 端的肽链并释放游离 Asp 或 Glu 的外肽酶统称为 *Pep A*^[4,10,17-21]。在酶的分类上,往往把来源于真核细胞的 *Pep A* 称为 Asp 氨肽酶,属于 M18 肽酶家族,其分类号为 EC 3.4.11.21,而把来源于乳酸菌或乳制品相关微生物的 *Pep A* 称为 Glu 氨肽酶,属于 M42 肽酶家族,其分类号为 EC 3.4.11.7。因而,本研究中的 *Lc-Pep A* 属于一种 Glu 氨肽酶。尽管 2 种来源的 *Pep A* 氨基酸同源性不高,但可折叠

成相似的三维结构,并都具有 2 个保守 Asp、2 个保守 Glu 及 3 个保守的 His。其中 2 个 Asp、2 个 His 和 1 个 Glu 负责二价金属离子的结合,与结合的二价金属离子以及另一个 Glu 及 His 一起形成酶的活性中心,对底物肽发挥酸碱催化作用^[20-21]。因而,2 种不同来源的 *Pep A* 在三维结构和催化机制上是非常相似的。微生物来源的 *Pep A* 编码基因相对较小,活力较高,适合于真核和原核的表达,具有更好的应用价值^[16]。

目前,已报道乳球菌来源的 *Pep A* 多数是直接从乳球菌细胞中分离而获得^[4,10,17-18],仅有一例是来源于大肠杆菌的胞内表达^[19],在分离过程中都需要破碎细胞,操作繁琐,收率低,而且大肠杆菌表达体系极易形成没有酶活力的包涵体,这在一定程度上阻碍了 *Pep A* 的工业化应用。本研究合成了带有 His-tag 的 *Lc-Pep A* 的编码基因,构建了 *Lc-Pep A* 的表达载体,实现了 *Lc-Pep A* 在毕赤酵母中的高效分泌表达,表达产物存在于培养基中,经固定化的 Ni^{2+} 亲和层析一步分离,可达到 95% 以上的纯度,极大地简化了 *Pep A* 的分离制备过程。而且,毕赤酵母分泌表达的 *Lc-Pep A* 具有较高的生物学活性和稳定性。这些结果表明毕赤酵母表达系统是生产微生物来源 *Pep A* 的理想工具,因为毕赤酵母不仅具有真核细胞多种翻译后的修饰功能,如折叠、二硫键形成、糖基化及分泌等,而且还能像原核细胞一样高密度的培养,与大肠杆菌和其他真核表达系统相比,在重组蛋白的生产上具有无可替代的优势。因而,本研究为微生物来源的 *Pep A* 提供了一个新的制备方法。

本研究对 *Lc-Pep A* 的底物特异性、活力、最适反应温度、热稳定性、最适反应 pH、酸碱稳定性及金属离子、化学试剂和抑制剂对酶的影响进行了较为全面分析。结果表明, *Lc-Pep A* 能特异性地水解 Asp-pNA 或 Glu-pNA,而对碱

性氨基酸、芳香族氨基酸、脂肪族氨基酸、非带电荷的极性氨基酸及含硫氨基酸的 pNA 酰胺化合物都不具有水解作用,说明其具有较强的底物特异性,与目前报道的其他 Pep A 的底物特异性一致^[4,10,17-21]。目前多数微生物来源的 Pep A 水解 Asp-pNA 的活力高于 Glu-pNA^[10,17,19],提示以 Asp 为氨基端的肽链是多数 Pep A 的最适底物。然而,本研究中 *Lc-Pep A* 对 Asp-pNA 和 Glu-pNA 具有相似的催化活力,水解 Glu-pNA 的活力较多数 Pep A 更高^[10,17,19]。*Lc-Pep A* 的最适反应温度为 60 °C,最适 pH 为 8.0,与多数微生物来源的 Pep A 相当,但能在较宽的温度范围内保持稳定,在最适反应温度下作用 1 h 仍有 60% 以上的活力。同时,*Lc-Pep A* 在 pH 为 6.0–9.0 的环境下相对稳定,使得该酶非常适合于食物蛋白的水解,因为多数食物都是酸性或中性 pH。这些发现充分表明 *Lc-Pep A* 在食物烹饪或调味品加工中具有较好的应用潜力。还原剂如 DTT、 β -巯基乙醇等能强烈抑制 *Lc-Pep A* 的活性,说明 *Lc-Pep A* 中存在具有活性必需的二硫键,提示该酶在应用时要避免还原剂的存在。本研究中的 *Lc-Pep A* 与已发现的乳球菌来源 Pep A 酶特性的比较见表 2。

真核细胞和微生物来源的 Pep A 均为金属

蛋白酶,需要二价金属离子的配合才能形成稳定的催化中心^[4]。本研究中,*Lc-Pep A* 能被金属蛋白酶的抑制剂 1,10-菲罗啉及 EDTA 强烈抑制充分地说明了这一点。微生物来源的 Pep A 尽管在氨基酸序列上同源性不高,但都具有保守的金属离子结合位点,主要包括 Glu、Asp 及 His,这些氨基酸除了结合金属离子外还是酶的底物结合位点的重要组成成员,与其他氨基酸共同组成酶的活性中心^[20]。 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Zn^{2+} 对 *Lc-Pep A* 具有激活作用, Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 对 *Lc-Pep A* 活力没有任何影响,而 Ni^{2+} 或 Cu^{2+} 对 *Lc-Pep A* 则具有显著的抑制作用。金属离子与金属蛋白酶的相互作用具有复杂性,不同金属蛋白酶所含的金属离子不尽相同,如胰蛋白酶含 Ca^{2+} ,中性蛋白酶含 Zn^{2+} ,胶原蛋白酶含 Ca^{2+} 或 Zn^{2+} ,而大多数氨肽酶含 Co^{2+} 或 Zn^{2+} 。目前,从二价金属离子与亮氨酸氨肽酶(LAP)相互作用的构效关系研究中发现无论是动物、植物及微生物 LAP 的活性中心都具有由保守的氨基酸组成的 2 个 Zn^{2+} 结合位点,即 Zn^{2+} 结合位点 1 和位点 2,形成 Zn^{2+} - Zn^{2+} 双核中心。其中位点 1 与 Zn^{2+} 松散结合,可被环境中的二价金属离子(Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 或 Cu^{2+} 等)置换,位点 2 则与 Zn^{2+} 紧密结合,不易被其

表 2 乳球菌不同亚种 Pep A 的酶特性

Table 2 Summary of selected characteristics of Pep A from *Lactococcus lactis*

Pep A source	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	Inhibitors	Preferred substrate	References
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 20481	65	8.0	1,10-phenantroline, EDTA, DTT, β -mercaptoethanol	Asp-pNA	[19]
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> NCDO 712	65	8.0	EDTA	Asp-pNA	[17]
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> HP	55	n.d.	1,10-phenantroline, EDTA, DTT	n.d.	[4]
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> AM2	n.d.	8.3	1,10-phenantroline, EDTA	Asp-pNA	[10]
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IL1403	60	8.0	1,10-phenantroline, EDTA, DTT, β -mercaptoethanol	Asp-pNA, Glu-pNA	Current study

n.d.: Not determined.

他二价金属离子置换。在催化过程中,位点 2 的 Zn^{2+} 负责结合底物肽的 N 端氨基,位点 1 和位点 2 的 Zn^{2+} 同时与底物肽需被水解的肽键羰基氧相互作用,位点 1 的 Zn^{2+} 通过亲电作用激活底物肽的羰基氧,并配合活性中心 Arg336 发挥酸碱催化,2 个 Zn^{2+} 还都可以激活 H_2O 分子形成活性羟基(OH^-)对羰基碳进行亲核攻击,有利于肽键的断裂^[22-25]。由于位点 1 的 Zn^{2+} 易被其他二价金属离子置换形成 $Co^{2+}-Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}-Zn^{2+}$ 或 $Cu^{2+}-Zn^{2+}$ 等异源双核中心,而不同的金属离子对羰基氧和 H_2O 分子的激活作用不同,LAP 在不同金属离子的环境中表现出不同的催化活性。*Lc-Pep A* 同样是一种氨肽酶,也有 2 个金属离子结合位点,其与金属离子的相互作用是否与 LAP 具有相似性需要作进一步研究,但至少知道由 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Zn^{2+} 组成的双离子中心对酶的活力发挥具有积极作用。当然,这还依赖于对 *Lc-Pep A* 的结构进行解析。Kim 等^[20] 对肺炎链球菌 S6 的 *Pep A* 结构进行了研究,发

现该酶中 His66 和 Asp236 配合一个 Zn^{2+} 、Glu214 和 His318 配合另外一个 Zn^{2+} ,Asp181 同时参与 2 个 Zn^{2+} 的配合作用,这些氨基酸及其结合的 Zn^{2+} 与 Ser238、Leu255、Arg257、Thr309 和 Gly311 共同组成酶的催化中心,其中 Arg257 在底物结合口袋中形成一个带正电荷的界面,负责结合以酸性氨基酸(Glu/Asp)为 N 端的底物肽。由于微生物来源 *Pep A* 具有保守的金属离子结合位点和底物结合的 Arg,本研究推导了 *Lc-Pep A* 的相应位点,并与部分已发现微生物来源的 *Pep A* 进行了对比,见表 3。通过比较可以看出,不同来源的 *Pep A* 拥有保守的活性基团,在催化机制上非常相似,但由于氨基酸同源性不高,在酶的其他性质如最适温度、最适 pH、稳定性上有一定的差异。最后需要指出的是,本研究对 *Lc-Pep A* 的生物学特性的研究都是基于 Asp-pNA 或 Glu-pNA 作为底物进行的,这是目前对此类酶进行生物学特性分析的通用方法^[4,10,19,26]。*Lc-Pep A* 对其底物肽的水解及其在食物蛋白水

表 3 不同微生物来源的 *pep A* 基因与 *Pep A* 蛋白的比较

Table 3 Comparison of the *pep A* gene and *Pep A* protein from different microorganisms

<i>Pep A</i> source	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 20072	<i>St. pneumoniae</i> R6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IL1403 (current study)
UniProt ID	Q48677 ^[18]	F0HXE4 ^[19]	Q8DNJ7 ^[20]	Q9CIH3
<i>pep A</i> gene (bp)	1 068	1 086	1 065	1 068
<i>Pep A</i> protein (aa)	355	361	354	355
Gene homology (%)	100	26	38	85
Protein homology (%)	100	30	60	94
Residue to create a positive patch (Arg)	258	258	257	258
Metal binding site:				
His	65	67	66	65
Asp	181	181	181	181
Glu	214	216	214	214
Asp	236	232	236	236
His	319	324	318	319

The *pep A* gene/*Pep A* protein from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 was used as a reference.

解中的应用将在后续工作中作进一步研究。综上所述,本研究基于重组 DNA 技术制备一种来源于乳球菌的 Pep A, 对 *Lc-Pep A* 的生物学特性进行了较为全面的研究, 为 *Lc-Pep A* 的工业化生产和指导该酶的应用打下了坚实的基础。

REFERENCES

- [1] HOOPER NM. Proteases: a primer[J]. *Essays in Biochemistry*, 2002, 38: 1-8.
- [2] STRESSLER T, EISELE T, SCHLAYER M, LUTZ-WAHL S, FISCHER L. Characterization of the recombinant exopeptidases PepX and PepN from *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 important for food protein hydrolysis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e70055.
- [3] STRESSLER T, EISELE T, SCHLAYER M, FISCHER L. Production, active staining and gas chromatography assay analysis of recombinant aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DSM 20481[J]. *AMB Express*, 2012, 2(1): 39.
- [4] EXTERKATE FA, de VEER GJCM. Purification and some properties of a membrane-bound aminopeptidase A from *Streptococcus cremoris*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(3): 577-583.
- [5] ZHANG S, CAI X, LUO X, WANG S, GUO A, HOU J, WU R. Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase gene from *Taenia pisiformis*[J]. *Experimental Parasitology*, 2018, 186: 1-9.
- [6] BERGIN JD, CLAPP CH. Inhibition of aminopeptidase M by alkyl D-cysteines[J]. *Journal of Enzyme Inhibition*, 1989, 3(2): 127-131.
- [7] SATO Y, SEKIGUCHI Y, CHIBA Y, IKAI M. Studies on enzymic degradation of bitter compounds from casein part 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.
- [8] ZHAO GZ, DING LL, YAO YP, CAO YP, PAN ZH, KONG DH. Extracellular proteome analysis and flavor formation during soy sauce fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1872.
- [9] YONGSAWATDIGUL J, CHOI YJ, UDOMPORN S. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*)[J]. *Journal of Food Science*, 2004, 69(4): FCT312-FCT319.
- [10] BACON CL, JENNINGS PV, NI FHAOLAIN I, O'CUINN, G. Purification and characterisation of an aminopeptidase A from cytoplasm of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* AM2[J]. *International Dairy Journal*, 1994, 4: 503-519.
- [11] ROMBOUITS I, LAMBERTS L, CELUS I, LAGRAIN B, BRIJS K, DELCOUR JA. Wheat gluten amino acid composition analysis by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(29): 5557-5562.
- [12] SALES MG, de FREITAS O, ZUCOLOTO S, OKANO N, PADOVAN GJ, dos SANTOS JE, GREENE LJ. Casein, hydrolyzed casein, and amino acids that simulate casein produce the same extent of mucosal adaptation to massive bowel resection in adult rats[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1995, 62(1): 87-92.
- [13] MERZ M, EWERT J, BAUR C, APPEL D, BLANK I, STRESSLER T. Wheat gluten hydrolysis using isolated flavourzyme peptidases: product inhibition and determination of synergistic effects using response surface methodology[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 122: 218-226.
- [14] DALL AASLYNG M, MARTENS M, POLL L, NIELSEN PM, FLYGE H, LARSEN LM. Chemical and sensory characterization of hydrolyzed vegetable protein, a savory flavoring[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(2): 481-489.
- [15] SCHLICHTERLE-CERNY H, AMADÒ R. Analysis of taste-active compounds in an enzymatic hydrolysate of deamidated wheat gluten[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(6): 1515-1522.
- [16] CARR FJ, CHILL D, MAIDA N. The lactic acid bacteria: a literature survey[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2002, 28(4): 281-370.
- [17] NIVEN GW. Purification and characterization of aminopeptidase A from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NCDO 712[J]. *The Journal of General Microbiology*, 1991, 137:1207-1212.
- [18] I'ANSON KJA, MOVAHEDI S, GRIFFIN HG, GASSON MJ, MULHOLLAND F. A non-essential glutamyl aminopeptidase is required for optimal growth of *Lactococcus lactis* MG1363 in milk[J]. *Microbiology*, 1995, 141(11): 2873-2881.
- [19] STRESSLER T, EWERT J, MERZ M, FUNK J, CLAAßEN W, LUTZ-WAHL S, SCHMIDT H, KUHN

- A, FISCHER L. A novel glutamyl (aspartyl)-specific aminopeptidase A from *Lactobacillus delbrueckii* with promising properties for application[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0152139.
- [20] KIM D, SAN BH, MOH SH, PARK H, KIM DY, LEE S, KIM KK. Structural basis for the substrate specificity of PepA from *Streptococcus pneumoniae*, a dodecameric tetrahedral protease[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 391: 431-436.
- [21] CHAIKUAD A, PILKA ES, de RISO A, von DELFT F, KAVANAGH KL, VÉNIEN-BRYAN C, OPPERMANN U, YUE WW. Structure of human aspartyl aminopeptidase complexed with substrate analogue: insight into catalytic mechanism, substrate specificity and M18 peptidase family[J]. BMC Structural Biology, 2012, 12: 14.
- [22] GU YQ, HOLZER FM, WALLING LL. Overexpression, purification and biochemical characterization of the wound-induced leucine aminopeptidase of tomato[J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 263(3): 726-735.
- [23] KIM H, LIPSCOMB WN. Differentiation and identification of the two catalytic metal binding sites in bovine lens leucine aminopeptidase by X-ray crystallography[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(11): 5006-5010.
- [24] MORTY RE, MOREHEAD, J. Cloning and characterization of a leucyl aminopeptidase from three pathogenic *Leishmania* species[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(29): 26057-26065.
- [25] IL KIM K, HEE BAEK S, HONG YM, KANG MS, BONG HA D, GOLDBERG AL, HA CHUNG C. Purification and characterization of protease ci, a cytoplasmic metalloendoprotease in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(50): 29799-29805.
- [26] SANZ Y, TOLDRÁ F. Purification and characterization of an arginine aminopeptidase from *Lactobacillus sakei*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1980-1987.

(本文责编 郝丽芳)