

研究报告

沙质微泡菌脯氨酰寡肽酶的异源表达及酶学性质

李元慧¹, 黄平¹, 杨绍青¹, 闫巧娟², 江正强^{1*}

1 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 中国轻工业食品生物工程重点实验室, 北京 100083

2 中国农业大学 工学院, 北京 100083

李元慧, 黄平, 杨绍青, 闫巧娟, 江正强. 沙质微泡菌脯氨酰寡肽酶的异源表达及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 102-114.

LI Yuanhui, HUANG Ping, YANG Shaoqing, YAN Qiaojuan, JIANG Zhengqiang. Heterologous expression and enzymatic characterization of a prolyl oligopeptidase from *Microbulbifer arenaceus*[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 102-114.

摘要:【背景】脯氨酰寡肽酶是一类能在脯氨酸残基羧基侧水解多肽的丝氨酸蛋白酶, 在食品工业领域有重要的应用价值, 但现有酶种类少, 产量水平低。【目的】在大肠杆菌中异源表达沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceus*)肽酶 S9 家族脯氨酰寡肽酶基因(*mapop*), 研究其相关酶学性质。【方法】*MaPOP* 在大肠杆菌中异源表达, 经亲和层析纯化后测定酶学性质, 制备血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制肽。【结果】一步纯化获得了重组酶 *MaPOP*。*MaPOP* 最适反应 pH 和温度分别为 7.5 和 37 °C, 在 pH 3.5–11.0 和低于 40 °C 时保持稳定; 在 1.5 mol/L NaCl 浓度时具有最高的酶活力, 是无 NaCl 时的 2 倍; 丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)和 Co^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 对 *MaPOP* 具有抑制作用。*MaPOP* 特异性识别寡肽内部的 Pro, 切割 L-Pro 羧基侧的肽键, 而不能切割 D-Pro 羧基侧和 Pro-Pro 之间的肽键。*MaPOP* 分别与风味蛋白酶、中性蛋白酶、AopepA、AoproS8 复合水解罗非鱼鱼鳞, ACE 抑制率为 55.85%–87.71%。【结论】*MaPOP* 的异源表达和酶学性质为 *MaPOP* 在食品工业中的应用提供了理论支持。

关键词: 沙质微泡菌; 脯氨酰寡肽酶; 异源表达; 酶学性质

资助项目: 国家自然科学基金(32272913)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32272913).

*Corresponding author. E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

Received: 2025-06-19; Accepted: 2025-08-04; Published online: 2025-08-29

Heterologous expression and enzymatic characterization of a prolyl oligopeptidase from *Microbulbifer arenaceus*

LI Yuanhui¹, HUANG Ping¹, YANG Shaoqing¹, YAN Qiaojuan², JIANG Zhengqiang^{1*}

1 Key Laboratory of Food Bioengineering (China National Light Industry), College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Prolyl oligopeptidases are serine proteases that cleave peptide bonds at the carboxyl side of proline. They have important applications in the food industry. However, the available prolyl oligopeptidases are limited, and their production levels are low. [Objective] To investigate the enzymatic properties of the peptidase family S9 prolyl oligopeptidase (*MaPOP*) from *Microbulbifer arenaceus*. [Methods] *MaPOP* was heterologously expressed in *Escherichia coli*. After purification by affinity chromatography, *MaPOP* was characterized and used for the preparation of ACE inhibitory peptides. [Results] *MaPOP* demonstrated the highest activity at pH 7.5 and 37 °C. It was stable in the range of pH 3.5–11.0 and at temperatures up to 40 °C. In the presence of 1.5 mol/L NaCl, *MaPOP* showed the highest enzyme activity, which was twice that in the absence of NaCl. The serine protease inhibitor PMSF and metal ions Co²⁺, Hg²⁺, and Zn²⁺ showed inhibitory effects on *MaPOP*. *MaPOP* specifically recognized proline residues in oligopeptides and cleaved the peptide bonds at the carboxyl side of internal L-prolines rather than those at the carboxyl side of D-prolines or between two proline residues. *MaPOP* was used in combination with flavor protease, neutral protease, AopepA, and AoproS8 to hydrolyze tilapia scales, achieving ACE inhibition rates of 55.85%–87.71%. [Conclusion] The heterologous expression and enzymatic characterization of *MaPOP* provide theoretical support for its application in the food industry.

Keywords: *Microbulbifer arenaceus*; prolyl oligopeptidase; heterologous expression; enzymatic characterization

脯氨酸独特的环状和亚氨基结构可以影响肽链的构象,从而保护生物活性肽不被蛋白酶降解^[1]。脯氨酰寡肽酶,也称脯氨酰内肽酶(prolyl oligopeptidase, POP, EC 3.4.21.26)是一种独特的丝氨酸蛋白酶,在脯氨酸残基的羧基侧特异性水解含脯氨酸的多肽^[2]。POP在MEROPS数据库中归类为POP或S9家族,不同于典型丝氨酸蛋白酶家族其他成员,该家族成员最显著的特性是底物的选择性,绝大多数POP只能水解30个以下氨基酸残基组成的寡肽^[3]。POP广泛分布于动物、原生生物、细菌和真菌中,如牛脑^[4]、猪肝^[5]、鹿丝状虫(*Setaria cervi*)^[6]、嗜麦芽

寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)^[7]、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)^[8]。由于天然POP产量低、纯化步骤烦琐,难以实现酶的大规模应用,异源表达POP成为当前研究热点之一。目前,皱纹盘鲍^[9]、嗜麦芽寡养单胞菌^[7]以及橙黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*)^[10]等多数来源的POP主要在大肠杆菌(*Escherichia coli*)系统表达;其中,橙黄色黏球菌来源的POP也在干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)中表达^[11]。大多数POP由大约700个氨基酸组成,分子量在65–85 kDa,最适温度一般为20–47 °C,耐受温度一般低于43 °C,最适pH值为6.0–8.5,并在该范围内保

持稳定^[9,12-14]。

POP 可用于水解蛋白质制备生物活性肽。黑曲霉(*Aspergillus niger*) POP 水解鸡蛋清蛋白,水解产物具有抗氧化、血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制和黄嘌呤氧化酶抑制活性^[13]。嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*) POP 与胰蛋白酶复配水解酪蛋白,水解产物的 ACE 抑制率达 83%^[7]。POP 也在食品加工中展现了广阔应用前景。在啤酒发酵过程中添加 POP,可以有效预防啤酒生产过程中的浑浊问题,提高其非生物稳定性,同时啤酒的泡沫稳定性不受影响^[8]。麸质中富含脯氨酸,使用 POP 降解麸质使其转换成非过敏性多肽,生产无麸质食品受到广泛关注^[12,15]。迄今,已经鉴定了多种来源的 POP,只有少数几种酶具有工业应用潜力^[15-17],并且都是实验室水平。为了扩大 POP 的种类,获得性质优良的 POP,发掘新型 POP 具有重要的理论和实际意义。

沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceus*) BH1 是一株从海洋泥土中筛选和鉴定的革兰氏阴性细菌。课题组前期已报道了沙质微泡菌 BH1 来源 POP 的晶体结构和催化、底物调节机制^[18],但其酶学性质未见报道。因此本研究将沙质微泡菌 BH1 来源 POP 在大肠杆菌中表达,进一步研究重组酶的酶学性质和应用,以期 *MaPOP* 在食品工业中的应用提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 样品、主要试剂和仪器

沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceus*) BH1, 本实验室保藏;大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21(DE3), 上海唯地生物技术有限公司; pET-15b 质粒, 上海诺今生物技术有限公司。

BM 无缝克隆试剂盒, 北京博迈德基因技术有限公司; Bradykinin 肽, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Z-Gly-Pro-pNA, 上海船夫生物技术有限公司; 人工合成(7-D-Pro)血管紧

张素 I, 南京肽业生物科技有限公司; 罗非鱼鱼鳞, 北京盛美诺生物技术有限公司; 其余试剂均为分析纯。

梯度 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 纳升电喷雾串联质谱仪, Waters 公司。

1.2 脯氨酰寡肽酶蛋白序列分析

利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库对氨基酸序列进行相似性搜索; 利用 MEGA X 软件进行多重序列比对和系统发育树构建。选取相似性较高且具有代表性的序列, 采用邻接(neighbor-joining)法构建系统发育树, 并通过 1 000 次重复的自举法(bootstrap method) 检验计算各分支的置信度。

1.3 *mapop* 的克隆与重组表达载体的构建

采用 CTAB 法提取沙质微泡菌 BH1 的基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 使用引物 POP-F (5'-agaaggagatataccatgagaaagcctgccatt-3')/POP-R (5'-aaggggttatgctagttagtgatgatgatg-3') 和 pET-15b-F (5'-ctagcataacccttggggcc-3')/pET-15b-R (5'-ggtatatctccttcttaagttaaacaaatt-3') (下划线标注部分为同源臂) 分别扩增目的基因和载体骨架。PCR 反应体系(50 μ L): H₂O 32 μ L, 5 \times Trans Start Fast *Pfu* buffer 10 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, Fast *Pfu* DNA Polymerase 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C, 60 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 切胶回收。使用 BM 无缝克隆试剂盒连接目的基因和载体骨架, 热激转化于大肠杆菌 DH5 α 中, 涂布于含 50 μ g/mL 氨苄霉素的 LB 平板筛选阳性克隆。挑取单克隆进行菌落 PCR 测序验证, 从阳性转化子中提取质粒, 获得重组表达载体 pET-15b-*mapop*。

1.4 *MaPOP* 的表达与纯化

重组表达载体 pET-15b-*mapop* 转化于大肠

杆菌 BL21(DE3)中, 获得重组菌株 BL21(DE3)-pET-15b-*mapop*。重组菌株接种于 10 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄霉素的液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 12 h 作为种子液。以 1% 接种量接种于 200 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄霉素的液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 达 0.6–0.8, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 12 h。10 000 $\times g$ 离心 10 min 收集菌体, 用缓冲液 A (20 mmol/L HEPES, pH 7.5, 550 mmol/L NaCl, 5 mmol/L imidazole) 重悬, 超声波粉碎细胞(功率 270 W, 工作 3 s、停 4 s, 共 15 min)。裂解液经 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 离心 15 min 后, 收集上清液, 并于 Ni-NTA 亲和层析柱上以 1 mL/min 的流速上样。用缓冲液 B (20 mmol/L HEPES, pH 7.5, 550 mmol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole) 洗脱未结合蛋白, 最后用缓冲液 C (20 mmol/L HEPES, pH 7.5, 550 mmol/L NaCl, 50 mmol/L imidazole) 洗脱目的蛋白。合并纯度高的组分, 超滤浓缩并更换缓冲液为 20 mmol/L HEPES, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5。纯化后的蛋白利用 SDS-PAGE 与 Native-PAGE 检测纯度^[19]。

1.5 *MaPOP* 的分子量鉴定

SDS-PAGE 法测定变性状态下分子量, 分别计算标准蛋白中各条带和纯酶相对迁移率 R_f 值。以相对迁移率为横坐标, 以标准蛋白相对分子质量的对数值 $\lg(\text{MW})$ 为纵坐标, 得到标准曲线, 根据目标蛋白相对迁移率计算目标蛋白分子量。

凝胶过滤法测定活性状态下分子量^[10], 所用层析柱为 Sphacryl S-300 HR (GE Healthcare 公司) (1 cm \times 40 cm)。洗脱缓冲液为含 150 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液, 0.3 mL 标准蛋白和目标蛋白(2 mg/mL)分别上样于缓冲液预平衡的层析柱, 流速为 0.3 mL/min。以洗脱体积 V_e 为横坐标, 以标准蛋白相对分子质量的对数值 $\lg(\text{MW})$ 为纵坐标作图, 得到标准蛋白曲线。根据目标蛋白洗脱体积计算其分子量。

标准蛋白包括牛甲状腺素蛋白(670 kDa)、牛血 γ 球蛋白(150 kDa)、磷酸酶 b (97.2 kDa)、鸡卵清白蛋白(44.3 kDa)、牛胰腺核糖核酸酶 A (13.7 kDa)。

1.6 *MaPOP* 酶活力的测定

MaPOP 的酶活力测定参照 Chevallier 等^[20]的方法并稍作改动。取 20 μL 去离子水、300 μL 5 mol/L NaCl、500 μL 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 和 50 μL 2 mmol/L Z-Gly-Pro-pNA (溶解于 40% 1,4-二氧六环) 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 3 min。加入 50 μL 适当稀释的酶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后, 加入 80 μL 1,4-二氧六环终止反应。冷却至室温后, 用分光光度计测定 OD_{410} 。空白对照用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液代替酶液。酶活力单位(U)定义: 上述条件下, 每分钟生成 1 μmol 对硝基苯胺所需酶量为 1 个酶活力单位。比酶活为每毫克蛋白的酶活力(U/mg)。以牛血清蛋白为标准蛋白质, 采用 Lowry 法^[21]测定酶液蛋白质浓度。

1.7 *MaPOP* 的酶学性质测定

最适 pH 和 pH 稳定性的测定: 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 测定 *MaPOP* 在不同缓冲液中的酶活力。待测缓冲液(浓度均为 50 mmol/L)及对应缓冲范围分别为: 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0–6.0)、 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液(pH 6.0–7.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0–9.0) 和 3-(环己胺)-1-丙磺酸(N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid, CAPS) 缓冲液(pH 10.0–11.0)。以酶活力最高值为 100%, 计算在不同 pH 条件下的相对酶活力; 用上述不同缓冲液对酶液进行适当稀释, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min, 迅速在冰水中冷却 30 min, 测定残余酶活力。以未经处理的 *MaPOP* 酶活力作为 100%, 计算经过不同处理后的相对酶活力。

最适温度和温度稳定性的测定: 在 pH 7.5 条件下, 按照酶活力测定方法测定不同温度(15–50 $^{\circ}\text{C}$) *MaPOP* 的酶活力。以酶活力最高值为 100%, 计算在不同温度下的相对酶活力。酶液置于 15–50 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育 30 min, 迅速置于冰浴中 30 min, 测定残余酶活力。以未经处理的 *MaPOP*

酶活力作为 100%，计算经过不同处理后的相对酶活力。

盐浓度的影响：在反应体系中添加不同体积的 5 mol/L NaCl，最终盐浓度分别为 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mol/L，其他步骤同酶活力测定方法。

金属离子和抑制剂的影响：酶液用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)适当稀释，与不同金属盐溶液或蛋白酶抑制剂(终浓度为 1 mmol/L)，包括 MgSO₄、CaCl₂、BaCl₂、NiCl₂、MnCl₂、HgSO₄、ZnCl₂、CoCl₂、Na₂EDTA、二硫苏糖醇、邻菲咯啉(*o*-phenanthroline)、碘乙酰胺(2-iodoacetamide, IAM)、磷酰二肽(phosphoranido)、胰凝乳蛋白酶抑制剂(chymostatin)、抑肽酶(aprotinin)、大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor)、对氯汞基苯甲酸盐(*p*-chloromercuribenzoate, PCMB)和苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)混匀，在 30 °C 保温 30 min 后立即冰浴 30 min。对照组加入等体积的超纯水，按照标准酶活力测定方法测定不同金属离子和抑制剂处理后的残余酶活力。以对照组的酶活力为 100% 计算相对酶活。

以 Z-Gly-Pro-pNA 作为底物(0.02–0.20 mmol/L)，在最适条件下进行酶反应，使用 GraphPad Prism 软件计算得到酶的反应动力学参数 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 。

1.8 MaPOP 水解特性的测定

MaPOP 的水解特性通过鉴定其对寡肽的水解产物成分进行分析。两种寡肽分别为舒缓激肽(氨基酸序列：¹Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg⁹)和(7-D-Pro)血管紧张素 I (氨基酸序列：¹Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-D-Pro-Phe-His-Leu¹⁰)。(7-D-Pro)血管紧张素 I 是人工合成的血管紧张素 I 衍生物，其与血管紧张素 I 的差别在于第 7 位的脯氨酸残基的构型为 D 型，而不是 L 型。500 μL 20 mmol/L HEPES (pH 7.5)缓冲液，50 μg 舒缓激肽和 4 μg 纯酶混合后，在 37 °C 孵育 10 min，反应结束后沸水浴 5 min 终止反应；而对于水

解(7-D-Pro)血管紧张素 I，则加入 26 μg 血管紧张素 I 和 4.6 μg 纯酶，在 37 °C 孵育 12 h。酶解液用 0.22 μm 滤器过滤后上样于纳升电喷雾串联质谱(nanoLC-MS/MS)，分析水解产物成分。

1.9 MaPOP 与其他蛋白酶复配水解罗非鱼鱼鳞制备 ACE 抑制肽

称取罗非鱼鱼鳞(水分含量 12%)，用去离子水冲洗 2 遍后沥干，加入 8 倍体积的去离子水，加热至 85 °C 处理 1 h，降温和调节 pH 至各酶的酶解条件。分别向各样品中加入 MaPOP (pH 7.5, 37 °C, 4 U/g)、风味蛋白酶(pH 7.0, 50 °C, 1 500 U/g)、中性蛋白酶(pH 7.0, 50 °C, 1 500 U/g)、米曲霉酸性蛋白酶 AoepA (pH 3.0, 40 °C, 1 000 U/g)^[22]和米曲霉碱性蛋白酶 AoproS8 (pH 9.0, 40 °C, 1 000 U/g)^[23]，酶解 9 h 后 85 °C 加热 15 min 灭酶。蛋白酶与 MaPOP 复配水解实验如下：蛋白酶水解产物灭酶后调节 pH 至 7.5，温度 37 °C，加入 4 U/g 的 MaPOP 水解 9 h，灭酶。灭酶后的水解产物冷却后 10 000×g 离心 10 min，取上清液冷冻干燥，检测其水解度和 ACE 抑制率^[24]。

1.10 数据分析与统计

每组实验进行 3 次独立重复，使用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计分析和作图，数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

2 结果与分析

2.1 脯氨酰寡肽酶蛋白序列分析结果

基于蛋白质序列比对的系统发育分析表明 MaPOP 与其他来源的 POP 处于不同分支(图 1)。MaPOP 与已报道同类酶的同源性均较低，经 BLAST 比对，MaPOP 与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的 POP (UniProt: Q06903)具有最高的相似性，为 43%，与来源于脑膜脓毒伊丽莎白金菌(*Elizabethkingia meningoseptica*) (UniProt: P27028)、和平空间站伊丽莎白金菌(*Elizabethkingia miricola*) (UniProt: P27195)、猪(UniProt: P23687)、人(UniProt: P48147)、

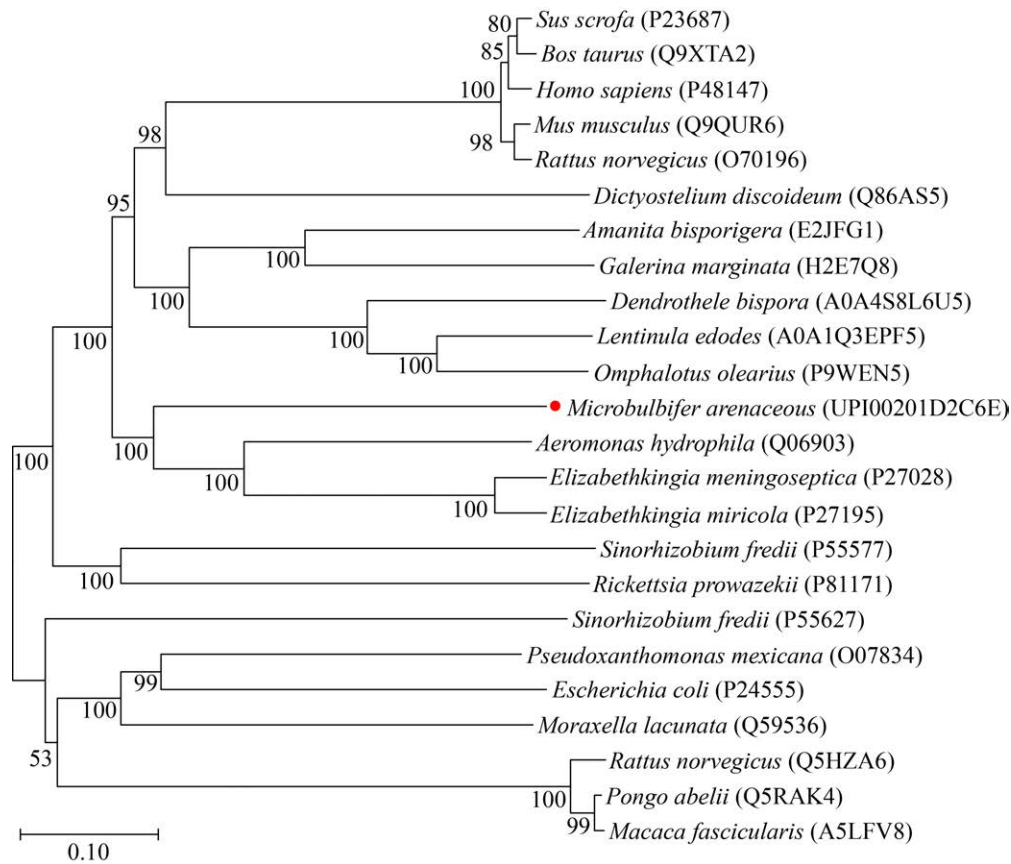


图 1 沙质微泡菌来源脯氨酰寡肽酶的氨基酸序列系统发育分析 通过 BLAST 分析获得不同来源脯氨酰寡肽酶的氨基酸序列，采用系统邻接法构建系统发育进化树；分支处数值代表 bootstrap 值；括号内为登录号；标尺代表序列的进化差异。

Figure 1 Phylogenetic analysis of *Microbulbifer arenaceus* prolyl oligopeptidase (*MaPOP*) based on the amino acid sequence. The amino acid sequences of prolyl oligopeptidases from different sources were obtained through BLAST analysis, and a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. The number in parentheses is the accession number; Scale 0.10 represents the evolutionary difference of the sequence.

鼠(UniProt: Q9QUR6)、牛(UniProt: Q9XTA2)和香菇(UniProt: A0A1Q3EPF5)的 POP 的相似性分别为 42%、42%、41%、40%、40%、40%、33%。*MaPOP* 具有 S9A 家族典型的高度保守序列 560GXSNGGLL567 和催化三联体(Ser562, Asp646, His681)。因此该酶是一个 S9A 家族新型 POP。

2.2 *MaPOP* 的表达和纯化结果

粗酶液通过亲和层析一步纯化得到电泳级纯酶(图 2A), SDS-PAGE 表明其分子量为 81 kDa,

凝胶过滤法测定其分子量为 165 kDa, 表明该酶为同源双亚基蛋白。Native-PAGE 中只有单一条带(图 2B), 进一步表明了 *MaPOP* 的高纯度和均一性。纯化后的 *MaPOP* 比酶活力从 2.3 U/mg 提高至 3.9 U/mg, 纯化倍数 1.7, 回收率为 74%(表 1)。

2.3 *MaPOP* 的酶学性质

MaPOP 的最适催化 pH 值为 7.5 (图 3A), 在 pH 6.0–8.5 时相对酶活力在 60%以上, 当 pH 小于 4.0 或大于 10.5 时, 基本没有活性。*MaPOP* 在 pH 3.5–11.0 的缓冲液中处理后, 残余酶活力

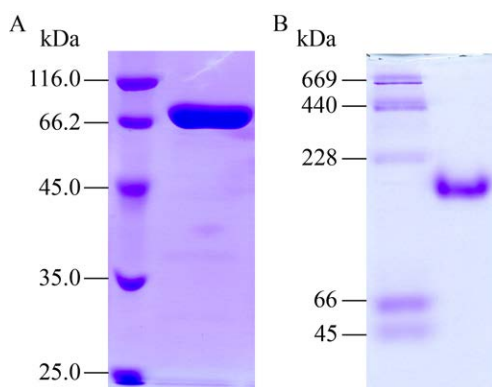


图 2 沙质微泡菌来源脯氨酰寡肽酶的 SDS-PAGE (A)和 Native-PAGE (B)分析

Figure 2 SDS-PAGE (A) and Native-PAGE (B) analysis of *Microbulbifer arenaceus* prolyl oligopeptidase (*MaPOP*).

仍保持在 80%以上(图 3B), 说明 *MaPOP* 的 pH 稳定性较好。*MaPOP* 的最适反应温度为 37 °C (图 3C), 高于 37 °C 时酶活力急剧下降。该酶在 15–40 °C 孵育 30 min 后仍能够保持 80% 以上的初始酶活, 而在 45 °C 孵育 30 min 后, 其活性急剧下降, 只保留 6.8% 的初始酶活(图 3D)。*MaPOP* 在 1.5 mol/L NaCl 时具有最高酶活力, 比酶活为 3.9 U/mg, 是无 NaCl 时的 2 倍;*MaPOP* 在 0.5–2.5 mol/L NaCl 时酶活力均高于不含 NaCl 时的酶活力(图 4), 说明 NaCl 能够显著提高 *MaPOP* 的酶活力, 并且 *MaPOP* 具有一定的耐盐性。不同金属离子和酶抑制剂对 *MaPOP* 酶活力的影响结果表明, Co^{2+} (相对酶活力为 74%) 和 Hg^{2+} (相对酶活力为 72%) 部分抑制酶活力, 而 Zn^{2+} (相对酶活力为 23%) 强烈抑制酶活力; 其

他金属离子处理则对酶活力无明显影响(表 2)。只有广谱丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 对 *MaPOP* 酶活力有明显的抑制作用(相对酶活力为 31%), 但不能完全抑制其酶活力。当 Z-Gly-Pro-pNA 作为底物时, *MaPOP* 的 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 分别为 (0.100 ± 0.007) mmol/L、 (0.434 ± 0.013) mmol/(L·s)、 (6.2 ± 0.2) s⁻¹。

2.4 *MaPOP* 的水解特性

为确定 *MaPOP* 的水解特性, 用 *MaPOP* 水解了舒缓激肽和人工合成(7-D-Pro)血管紧张素 I, 并通过 nanoLC-MS/MS 分析水解产物成分。在舒缓激肽水解产物中同样只有 3 种肽段, 分子量分别是 1 059.5、709.3、756.3 Da。其中分子量为 1 059.5 Da 的肽段是未被水解的舒缓激肽 (¹Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg⁹) (图 5A); 分子量为 709.3 Da 的肽段是六肽(⁴Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg⁹) (图 5B), 该六肽是舒缓激肽中第 3 位 Pro 和第 4 位 Gly 之间的肽键断裂后的羧基侧部分; 而分子量为 756.3 Da 的肽段是七肽 (¹Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro⁷) (图 5C), 该七肽是舒缓激肽中第 7 位 Pro 和第 8 位 Phe 之间的肽键断裂后的氨基侧部分。另外在水解产物中没有 ³Pro-Gly-Phe-Ser-Pro⁷ 或 ³Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg⁹ 肽段, 说明舒缓激肽中第 2 位 Pro 和第 3 位 Pro 之间的肽键没有断裂。因此, *MaPOP* 能够切割其他 Pro 羧基侧的肽键, 但不能切割舒缓激肽中 Pro-Pro 之间的肽键。(7-D-Pro)血管紧张素 I (¹Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-D-Pro-Phe-His-Leu¹⁰) 水解产物中只有分子量为 1 295.6 Da 的

表 1 沙质微泡菌来源脯氨酰寡肽酶纯化过程

Table 1 Purification summary of *Microbulbifer arenaceus* prolyl oligopeptidase (*MaPOP*)

纯化步骤	总酶活力	总蛋白	比酶活力	纯化倍数	回收率
Purification step	Total enzyme activity (U)	Total protein (mg)	Specific enzyme activity (U/mg)	Fold purification	Recovery yield (%)
粗酶液	359.1	158.2	2.3	1.0	100.0
Crude enzyme					
Ni-NTA 纯化	265.8	68.2	3.9	1.7	74.0
Ni-NTA affinity purification					

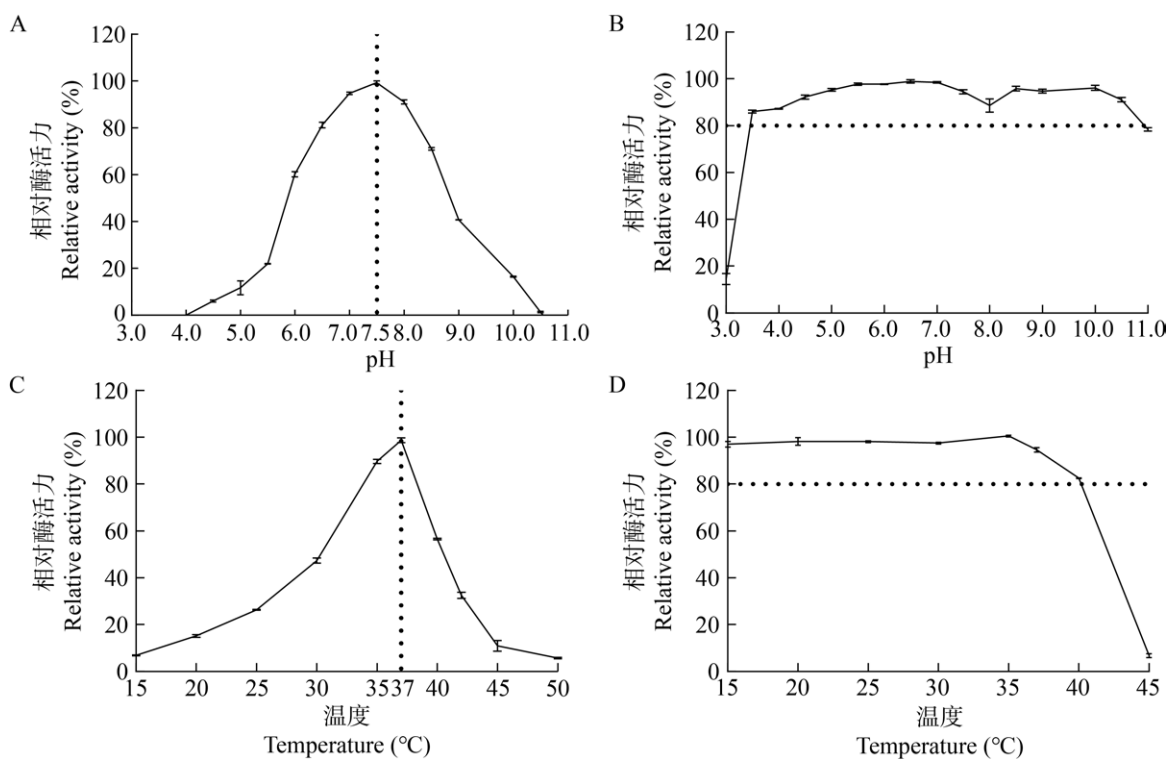


图3 沙质微泡菌来源脯氨酰寡肽酶的最适 pH (A)、pH 稳定性(B)、最适温度(C)和温度稳定性(D)
Figure 3 Optimal pH (A), pH stability (B), optimal temperature (C) and thermostability (D) of *Microbulbifer arenaceus* prolyl oligopeptidase (MaPOP).

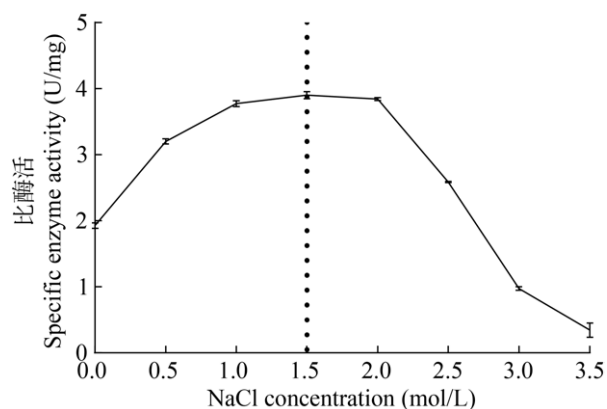


图4 NaCl 对沙质微泡菌来源脯氨酰寡肽酶酶活力的影响
Figure 4 Effect of NaCl on the activity of *Microbulbifer arenaceus* prolyl oligopeptidase (MaPOP).

肽段(图 6), 该肽段是未被水解的(7-D-Pro)血管紧张素 I。结果表明 MaPOP 不能切割第 7 位 D-Pro 羧基侧的肽键。因此, MaPOP 对 Pro 具

有严格的特异性, 并且只切割 L-Pro 羧基侧的肽键, 而不切割 D-Pro 羧基侧的肽键和 Pro-Pro 之间的肽键。

2.5 MaPOP 与其他蛋白酶复配水解罗非鱼鱼鳞制备 ACE 抑制肽活性分析

MaPOP 与其他蛋白酶复配水解罗非鱼鱼鳞制备 ACE 抑制肽的结果如表 3 所示。MaPOP 水解物的水解度和 ACE 抑制率均较低(2.56%和 14.33%)。其他蛋白酶水解时, AopepA 的水解度最高(27.02%), AoproS8 的 ACE 抑制率最高(56.29%)。进一步 MaPOP 与其他蛋白酶复配进行水解, 相较于单独使用风味蛋白酶、中性蛋白酶、AopepA 或 AoproS8, MaPOP 与其他蛋白酶复配水解产物的水解度和 ACE 抑制率均有上升, 水解度和 ACE 抑制率最高为 38.46% (AoproS8+MaPOP)和 87.71% (风味蛋白酶+MaPOP)。

表 2 金属离子和抑制剂对沙质微泡菌来源脯氨酰寡肽酶活力的影响

Table 2 Effects of metal ions and inhibitors on the activity of *Microbulbifer arenaceous* prolyl oligopeptidase (*MaPOP*)

金属离子与化合物 Metal ions and compounds (1 mmol/L)	比酶活 Specific enzyme activity (U/mg)	相对酶活力 Relative activity (%)
对照 Control	3.9±0.2	100
Ni ²⁺	3.9±0.1	100
Ba ²⁺	4.2±0.1	108
Co ²⁺	2.9±0.1	74
Mg ²⁺	4.2±0.2	108
Mn ²⁺	4.2±0.1	108
Ca ²⁺	4.2±0.2	108
Hg ²⁺	2.8±0.1	72
Zn ²⁺	0.9±0.1	23
苯甲基磺酰氟 PMSF	1.2±0.3	31
乙二胺四乙酸二钠 Na ₂ EDTA	3.9±0.1	100
二硫苏糖醇 Dithiothreitol	3.9±0.1	100
邻菲咯啉 o-phenanthroline	3.9±0.1	100
对氯汞基苯甲酸盐 PCMB	4.0±0.1	103
碘乙酰胺 IAM	4.0±0.0	103
磷酸二肽 Phosphoranido	4.0±0.0	103
胰凝乳蛋白酶抑制剂 Chymostatin	4.0±0.1	103
抑肽酶 Aprotinin	4.2±0.2	108
大豆胰蛋白酶抑制剂 Soybean trypsin inhibitor	4.2±0.1	108

3 讨论

POP 能水解含有脯氨酸的多肽, 在活性肽制备^[25]、预防啤酒浑浊^[8]、无麸质制品生产加工^[12]等领域中展现了广阔的应用前景, 受到广泛关注。发掘酶学性质优良的新型 POP 具有重要的应用价值。本文将沙质微泡菌 BH1 来源 POP 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中异源表达, 纯化后用 SDS-PAGE 法和凝胶过滤法测定其分子量分

别为 81 kDa 和 165 kDa (图 2), 表明 *MaPOP* 为同源双亚基蛋白。

MaPOP 在 pH 7.5 具有最高酶活力(图 3), 比米曲霉(pH 5.0)^[8]、皱纹盘鲍(pH 6.0)^[9]来源 POP 的最适 pH 更高, 与牛脑(pH 7.5)^[4]来源 POP 最适 pH 相近。*MaPOP* 显示出了较好的 pH 稳定性, 在 pH 3.5–11.0 处理后均能保持 80% 以上酶活力, 比其他来源 POP 的 pH 稳定范围更广, 如嗜热球杆菌(*Sphaerobacter thermophilus*)^[17] (pH 5.0–8.0), 牛脑^[4] (pH 5.0–9.0) 和猪肝^[5] (pH 6.0–7.0)。因此 *MaPOP* 在酸性或碱性条件下具有更好的应用潜力。*MaPOP* 的最适温度为 37 °C, 在 40 °C 时能保持 80% 以上的酶活力, 与嗜麦芽寡养单胞菌^[7] (37 °C, <40 °C) 和橙黄色黏球菌^[10] (37 °C, <37 °C) 来源 POP 相似。除一些极端嗜热微生物来源 POP 如小宝岛热球菌 (*Thermococcus kodakarensis*)^[12] (77 °C, <80 °C) 外, POP 普遍对温度敏感, 最适温度和温度稳定性均较低。与多数 POP 不同的是, NaCl 能够显著提高 *MaPOP* 的酶活力(图 4), 这可能与海洋微生物沙质微泡菌 BH1 所处的生态环境有关, 海洋微生物在高盐条件下生存与进化导致其所产生的酶在盐分存在时酶的活性更高且稳定^[26], 较高浓度 NaCl 可能促进了 *MaPOP* 构象的正确折叠^[27]。在猪肌肉 POP 中也发现了酶活力对离子强度非常敏感的现象, 酶促动力学分析表明, NaCl 浓度的增加大大提高了反应过程中的酰基化速率, 二级速率常数增大, 从而提高了酶活力^[28]。*MaPOP* 的耐盐性拓宽了其在食品行业中的应用范围。*MaPOP* 酶活力受 Co²⁺、Hg²⁺ 和 Zn²⁺ 抑制, 其中 Zn²⁺ 的抑制作用最强(表 2)。白绒拟鬼伞(*Coprinopsis clastophylla*) POP^[29] 抑制效果与之相似。许多来源 POP 如米曲霉(*Aspergillus oryzae*)^[8] 和嗜热球形杆菌 (*Sphaerobacter thermophiles*)^[17] 的酶活力受到 Zn²⁺ 和 Mn²⁺ 的抑制, 而 Mn²⁺ 对 *MaPOP* 无明显影响。*MaPOP* 酶活力被丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 抑制, 而大部分抑制剂均无明显影响, 与

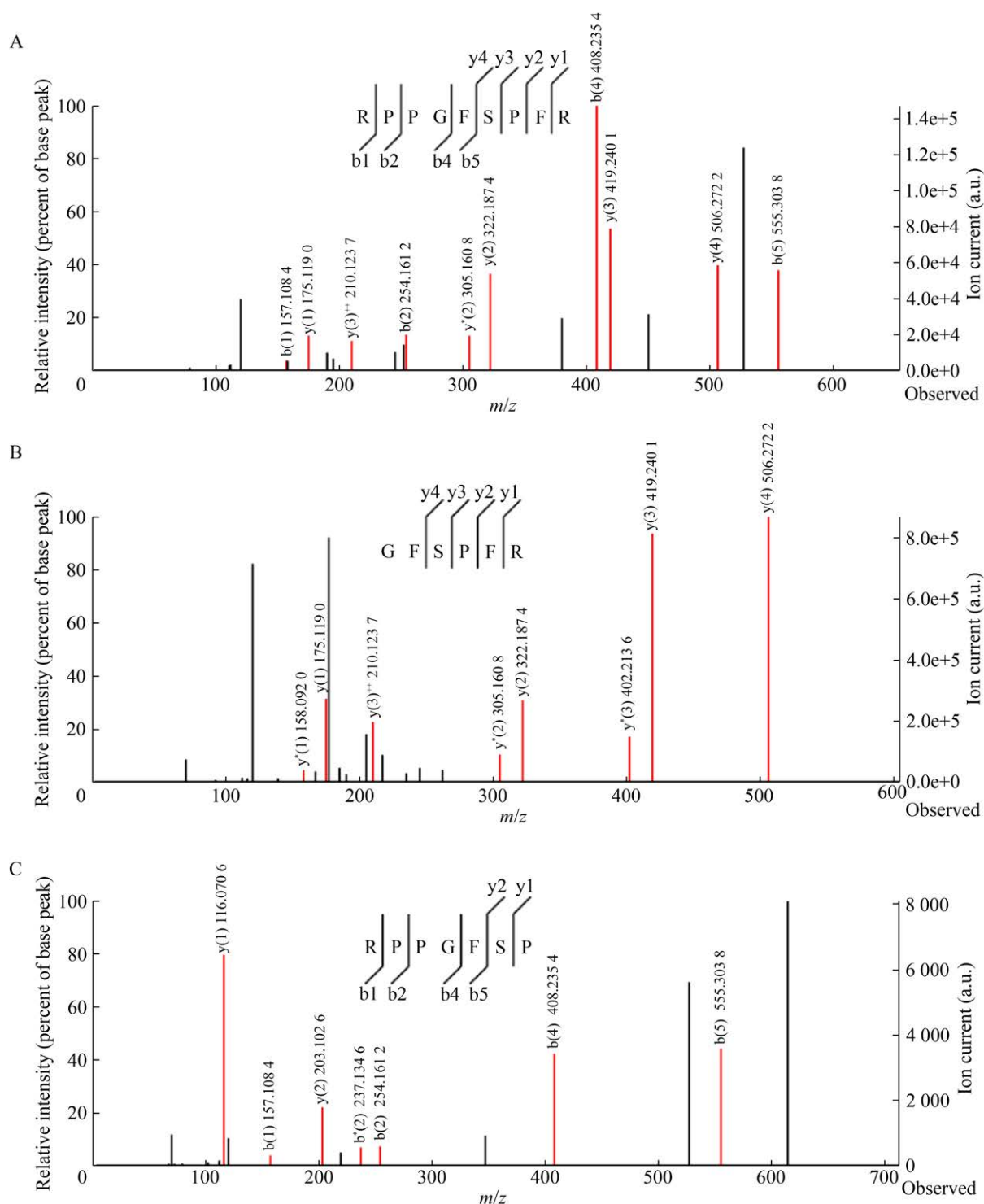


图5 舒缓激肽水解产物质谱分析 A: 未被水解的舒缓激肽(¹Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg⁹); B: 六肽(⁴Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg⁹); C: 七肽(¹Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro⁷)。

Figure 5 Mass spectrometry analysis of the hydrolysates of bradykinin by *MaPOP*. A: Bradykinin (¹Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg⁹); B: ⁴Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg⁹; C: ¹Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro⁷.

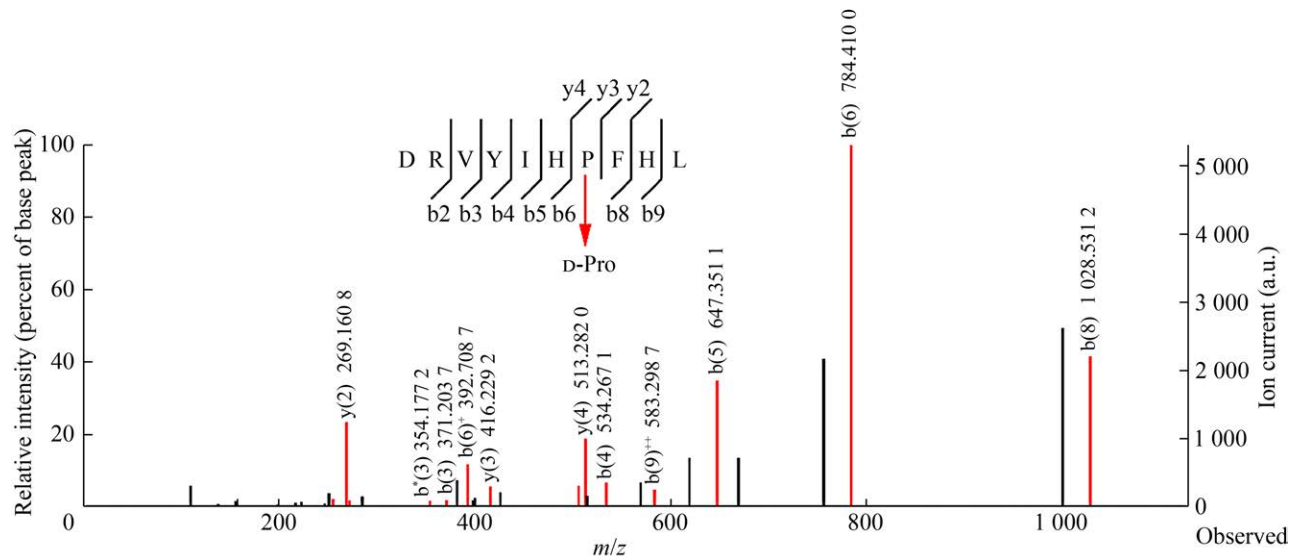


图 6 (7-D-Pro)血管紧张素 I 水解产物的质谱分析

Figure 6 Mass spectrometry analysis of the hydrolysates of (7-D-Pro) angiotensin I.

表 3 不同蛋白酶水解罗非鱼鱼鳞的水解度及酶解产物血管紧张素转换酶抑制率

Table 3 Hydrolysis degrees and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory rates of *Oreochromis niloticus* fish scale hydrolysates

蛋白酶 Protease	水解度 Hydrolysis degrees (%)	ACE 抑制率 ACE inhibitory rate (%)
MaPOP	2.56±0.37f	14.33±2.54e
风味蛋白酶 Flavor protease	17.85±0.33e	55.41±3.79c
中性蛋白酶 Neutral protease	23.27±0.76d	47.81±2.51c
AopepA	27.02±1.30c	37.57±5.67d
AoproS8	23.99±0.32d	56.29±2.78c
风味蛋白酶+MaPOP Flavor protease+MaPOP	28.87±0.88c	87.71±3.79a
中性蛋白酶+MaPOP Neutral protease+MaPOP	35.67±0.55b	67.40±2.38b
AopepA+MaPOP	34.80±0.28b	55.85±2.74c
AoproS8+MaPOP	38.46±0.28a	72.51±2.19b

酶解产物浓度为 2 mg/mL, 不同小写字母表示水解物间的差异显著 ($P < 0.05$).

The concentration of the enzymatic hydrolysate was 2 mg/mL. Different lowercase letters indicate significant differences among the hydrolysates ($P < 0.05$).

橙黄色黏球菌 POP 的表现相似, 而一些 POP 对碘乙酰胺^[6]和 PMCB^[29]更敏感。PMSF 能够强烈抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶等典型丝氨酸蛋白酶的活性, 说明 MaPOP 是一种不同于胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的丝氨酸蛋白酶。此外, MaPOP 的活性不受金属螯合剂 EDTA 和邻菲咯啉的影响, 说明 MaPOP 不需要金属离子作为辅因子来发挥催化功能。当 Z-Gly-Pro-pNA 作为底物时, MaPOP 的 K_m 小于嗜麦芽窄食单胞菌 POP (0.187 mmol/L) 和 *Sphaerobacter thermophiles* POP (1.5 mmol/L), 表明 MaPOP 对该底物具有更强的亲和性, 但催化效率较二者 (24.2 s^{-1} , 60 s^{-1}) 均低^[7,17]。

MaPOP 对 Pro 具有严格的特异性, 并且只切割 L-Pro 羧基侧的肽键, 不能切割 D-Pro 羧基侧和 Pro-Pro 之间的肽键(图 5-图 6), 与皱纹盘鲍^[9]、*Thermococcus kodakarensis*^[12]来源 POP 的水解特性相似。MaPOP 不能水解人工合成的 (7-D-Pro)血管紧张素 I, 说明 MaPOP 对 Pro 的构型同样具有选择性, 而目前 POP 对 Pro 构型选择性的研究罕见报道。

MaPOP 水解罗非鱼鱼鳞, 水解度和 ACE 抑制率均较低, 说明 *MaPOP* 对鱼鳞蛋白的直接水解作用较差, 与前期研究中 *MaPOP* 无法水解 30 个氨基酸以上的底物结果^[19]一致。*MaPOP* 与其他蛋白酶(风味蛋白酶、中性蛋白酶、*AopepA* 和 *AoproS8*)协同水解鱼鳞较其他蛋白酶单独水解时 ACE 抑制率均有显著上升。风味蛋白酶、中性蛋白酶、*AopepA* 和 *AoproS8* 能将鱼鳞蛋白水解成小肽段, *MaPOP* 进一步特异性切割 L-Pro 羧基侧的肽键, 产生具有更高 ACE 抑制活性的肽段^[30]。嗜麦芽窄食单胞菌 POP 与胰蛋白酶协同水解酪蛋白时 ACE 抑制率达到 83%, 比 POP 单独水解时产物 ACE 抑制率显著提高^[7], 本研究与其现象一致。黑曲霉 POP 水解鸡蛋清蛋白 ACE 抑制率最高为 45%^[13], *MaPOP* 水解鱼鳞蛋白时 ACE 抑制率更高。

4 结论

沙质微泡菌中肽酶 S9 家族脯氨酰寡肽酶基因 *mapop* 在大肠杆菌中异源表达, 一步纯化后比活力为 3.9 U/mg。*MaPOP* 最适反应 pH 值和温度分别为 7.5 和 37 °C, 在 pH 3.5–11.0 和低于 40 °C 时保持稳定。*MaPOP* 在 1.5 mol/L NaCl 浓度时具有最高的酶活力, 拓宽了其在食品工业中的应用范围。*MaPOP* 切割位点具有严格特异性, *MaPOP* 切割 L-Pro 羧基侧的肽键, 而不能切割 D-Pro 羧基侧和 Pro-Pro 之间的肽键。*MaPOP* 能够提高其他蛋白酶水解罗非鱼鱼鳞产物的 ACE 抑制活性, 表明其在 ACE 抑制肽等生物活性肽的生产中具有潜在的应用价值。

作者贡献声明

李元慧: 实验操作, 撰写文章; 黄平: 数据分析, 数据收集与监管, 验证; 杨绍青: 数据管理, 执行调研; 闫巧娟: 项目管理, 监督指导; 江正强: 提出概念, 提供资源, 稿件润色修改, 审阅, 获取基金。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] MENTLEIN R. Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides[J]. FEBS Letters, 1988, 234(2): 251-256.
- [2] POLGÁR L. The prolyl oligopeptidase family[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002, 59(2): 349-362.
- [3] MORIYAMA A, NAKANISHI M, SASAKI M. Porcine muscle prolyl endopeptidase and its endogenous substrates[J]. Journal of Biochemistry, 1988, 104(1): 112-117.
- [4] YOSHIMOTO T, NISHIMURA T, KITA T, TSURU D. Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain[J]. The Journal of Biochemistry, 1983, 94(4): 1179-1190.
- [5] MORIYAMA A, SASAKI M. Porcine liver succinyltrialanine *p*-nitroanilide hydrolytic enzyme. Its purification and characterization as a post-proline cleaving enzyme[J]. Journal of Biochemistry, 1983, 94(5): 1387-1397.
- [6] WADHAWAN M, TIWARI S, SHARMA S, RATHAUR S. Identification and characterization of a novel prolyl oligopeptidase in filarial parasite *Setaria cervi*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 495(3): 2235-2241.
- [7] YU JJ, WU JJ, XIE DW, DU L, TANG YJ, XIE JL, WEI DZ. Characterization and rational design for substrate specificity of a prolyl endopeptidase from *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 138: 109548.
- [8] KANG C, YU XW, XU Y. Cloning and expression of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus oryzae* and its application in beer stabilization[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(2): 263-272.
- [9] LI WY, LI Y, CHEN YL, HU JJ, MENGIST HM, LIU GM, JIN TC, CAO MJ. Characterization and crystal structure of prolyl endopeptidase from abalone (*Haliotis discus* Hannai)[J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127452.
- [10] KOCADAG KOCAZORBAZ E, ZIHNIÖGLU F. Purification, characterization and the use of recombinant prolyl oligopeptidase from *Myxococcus xanthus* for gluten hydrolysis[J]. Protein Expression and Purification, 2017, 129: 101-107.
- [11] ALVAREZ-SIEIRO P, MARTIN MC, REDRUELLO B, del RIO B, LADERO V, PALANSKI BA, KHOSLA C, FERNANDEZ M, ALVAREZ MA. Generation of food-grade recombinant *Lactobacillus casei* delivering *Myxococcus xanthus* prolyl endopeptidase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(15): 6689-6700.
- [12] SHETTY R, HEINER BANG-BERTHELSEN C, CIURKOT KW, VESTERGAARD M, HÄGGLUND PM, PRAKASH HS, HOBLEY TJ. Characterization of gluten-degrading prolyl endoprotease from

- Thermococcus kodakarensis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2022, 368(21/22/23/24): fnac006.
- [13] JIANG B, WANG MC, WANG XJ, WU S, LI DM, LIU CH, FENG ZB, LI J. Effective separation of prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* by aqueous two phase system and its characterization and application[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 169: 384-395.
- [14] LASSE C, AZEVEDO CS, de ARAÚJO CN, MOTTA FN, ANDRADE MA, ROCHA AP, SAMPAIO I, CHARNEAU S, GÈZE M, GRELLIER P, SANTANA JM, BASTOS IMD. Prolyl oligopeptidase from *Leishmania infantum*: biochemical characterization and involvement in macrophage infection[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1060.
- [15] SESTAK K, THWIN H, DUFOUR J, LIU DX, ALVAREZ X, LAINE D, CLARKE A, DOYLE A, AYE PP, BLANCHARD J, MOEHS CP. Supplementation of reduced gluten barley diet with oral prolyl endopeptidase effectively abrogates enteropathy-associated changes in gluten-sensitive macaques[J]. Nutrients, 2016, 8(7): 401.
- [16] LOPEZ M, EDENS L. Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(20): 7944-7949.
- [17] SHETTY R, VESTERGAARD M, JESSEN F, HÄGGLUND P, KNORR V, KOEHLER P, PRAKASH HS, HOBLEY TJ. Discovery, cloning and characterisation of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerobacter thermophiles*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2017, 107: 57-63.
- [18] HUANG P, LV A, YAN QJ, JIANG ZQ, YANG SQ. The structure and molecular dynamics of prolyl oligopeptidase from *Microbulbifer arenaceus* provide insights into catalytic and regulatory mechanisms[J]. Acta Crystallographica Section D, 2022, 78(6): 735-751.
- [19] LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [20] CHEVALLIER S, GOELTZ P, THIBAUT P, BANVILLE D, GAGNON J. Characterization of a prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. complete sequence and localization of the active-site serine[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(12): 8192-8199.
- [21] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275.
- [22] XUE YB, YAN QJ, TIAN XT, HAN D, JIANG ZQ. High-level secretory expression and characterization of an acid protease in *Komagataella phaffii* and its application in soybean meal protein degradation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282: 137011.
- [23] WANG SN, XUE YB, ZHANG P, YAN QJ, LI YX, JIANG ZQ. CRISPR/Cas9 system-mediated multi-copy expression of an alkaline serine protease in *Aspergillus niger* for the production of XOD-inhibitory peptides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(41): 15194-15203.
- [24] NORRIS R, O'KEEFFE MB, POYARKOV A, FITZGERALD RJ. Peptide identification and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity in prolyl endoproteinase digests of bovine α -casein[J]. Food Chemistry, 2015, 188: 210-217.
- [25] YU DY, WANG C, SONG YF, ZHU JX, ZHANG XJ. Discovery of novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Todarodes pacificus* and their inhibitory mechanism: in silico and in vitro studies[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(17): 4159.
- [26] GHATTAVI S, HOMAEI A. Marine enzymes: classification and application in various industries[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 230: 123136.
- [27] CEN YK, ZHANG L, LIU MP, XIANG C, LU TX, XUE YP, ZHENG YG. Salt-driven dynamic folding of halophile-origin enzymes: insights into evolution and protein exploitation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 302: 140527.
- [28] POLGAR L. pH-dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle[J]. European Journal of Biochemistry, 1991, 197(2): 441-447.
- [29] CHEN JT, CHAO ML, WEN CY, CHU WS. Screening, purification, and characterization of an extracellular prolyl oligopeptidase from *Coprinopsis clastophylla*[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(4): 652-659.
- [30] NORRIS R, POYARKOV A, O'KEEFFE MB, FITZGERALD RJ. Characterisation of the hydrolytic specificity of *Aspergillus niger* derived prolyl endoproteinase on bovine β -casein and determination of ACE inhibitory activity[J]. Food Chemistry, 2014, 156: 29-36.