

# 毛霉亮氨酸氨肽酶的纯化及性质研究

潘进权

(湛江师范学院生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

**摘要:** 采用硫酸铵盐析、离子交换层析、疏水层析、凝胶层析及超滤方法对毛霉胞外蛋白酶组分进行分离纯化, 从毛霉的发酵麸曲中分离纯化得到氨肽酶组分, 并对其性质进行探讨。结果表明: 纯化的毛霉氨肽酶是亮氨酸氨肽酶, 其对小肽 N 端的亮氨酸有非常强的水解活性; 该氨肽酶在 40℃、pH6.5 有最大催化活性, 在 40℃ 以内, pH5.0~8.0 有很好的稳定性; 在所实验的几种蛋白酶抑制剂(PMSF、EDTA、E-64、Pepstatin A)中, 仅 EDTA 可以完全抑制该氨肽酶的活性, 由此说明, 纯化的毛霉氨肽酶是一种金属蛋白酶; 常见的金属离子中,  $\text{Ca}^{2+}$  对该氨肽酶有激活作用, 而  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  及  $\text{Mn}^{2+}$  对其有强的抑制作用; 该氨肽酶对大豆多肽的苦味有明显的去除效果, 大豆多肽脱苦处理 4h 后其苦味基本消除。

**关键词:** 毛霉; 亮氨酸氨肽酶; 纯化; 性质; 脱苦

## Purification and Characterization of Leucine Aminopeptidase from *Mucor*

PAN Jin-quan

(School of Life Science and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China)

**Abstract:** An aminopeptidase was purified and characterized from crude extracellular protease extract from wheat bran koji of *Mucor* through ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration chromatography and ultra-filtration. The purified aminopeptidase was identified as leucine aminopeptidase, which was very active in hydrolyzing N-terminal leucine of peptides. Its maximum activity was observed at pH 6.5 and 40 °C. In addition, the leucine aminopeptidase was stable in the pH range of 5.0–8.0 and at temperatures below 40 °C. However, it could be completely inhibited by the metal protease inhibitor EDTA, indicating that it belongs to the metal protease family.  $\text{Ca}^{2+}$  had an activating effect on it, while  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  were very active in inhibiting it. The enzyme was effective in removing bitter taste from soybean polypeptides and basic elimination of bitter taste was achieved after 4 h of treatment with it.

**Key words:** *Mucor*; leucine aminopeptidase; purification; properties; debittering

中图分类号: Q814.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0163-05

毛霉是腐乳发酵生产的主要菌种之一, 在腐乳生产工艺中其主要作用是分泌蛋白酶水解豆腐胚内的大豆蛋白。腐乳成品中的蛋白质主要是以多肽形式存在的, 具有相当高的水解程度, 并且已经从中分离出多种具有生理活性的多肽<sup>[1-2]</sup>; 而对众多腐乳产品的感官分析则表明, 腐乳产品通常不具有一般蛋白水解物所特有的苦味。综合以上结果来看, 毛霉蛋白酶在解决植物蛋白(尤其是大豆蛋白)水解率低、水解产物具有强烈的苦味等难题方面具有很大的潜力。

毛霉虽然在工业生产中有很悠久的历史, 但是对这类微生物胞外蛋白酶系的研究却并未完全展开。仅有少数学者对该菌种的发酵产酶特性及粗酶的催化、水解特性进行过探讨<sup>[3-4]</sup>。然而, 毛霉由于长期受到高蛋

白环境条件的驯化, 它通常具有合成及分泌多种胞外蛋白酶的能力, 其胞外蛋白酶是由多种蛋白酶所构成的复杂体系, 因此单纯从总体上研究(即粗酶的研究)并不能完全了解其内在的特性。为了更加全面的了解这一蛋白酶系的组分构成、各组分的催化特性以及相互之间的作用, 本课题组开展了这方面的研究工作。在前期的工作中, 对毛霉胞外的内肽酶组分进行了分离纯化及性质分析, 并考察了它们对大豆蛋白的水解特性<sup>[5-6]</sup>。结果表明, 毛霉胞外主要有 3 个内肽酶组分, 包括一个碱性蛋白酶和两个酸性蛋白酶, 碱性蛋白酶与酸性蛋白酶之间有一定的肽键选择互补性, 两者共同作用于大豆蛋白可以实现大豆蛋白的深度水解。然而, 感官分析却发现大豆蛋白的毛霉内肽酶水解物也有强烈的苦味。由此

收稿日期: 2011-04-29

基金项目: 广东省自然科学基金项目(9452404801001943); 湛江师范学院基金项目(ZL0912)

作者简介: 潘进权(1978—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为酶与发酵工程。E-mail: pj78@tom.com

看来,在毛霉胞外可能存在一些具有脱苦作用的蛋白酶组分<sup>[7]</sup>,为此,本研究对毛霉胞外的氨肽酶组分进行分离纯化及性质探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

雅致放射毛霉 AS3.2778 湛江师范学院生命科学与技术学院发酵工程实验室保藏菌种;大豆分离蛋白(SPI, 蛋白含量为 87.35%) 哈尔滨高科大豆食品有限公司。

DEAE-Sepharose、Phenyl-Sepharose、Sephadex G50 美国 Pharmacia 公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)、乙二胺四乙酸(EDTA)、*N*-(反式-环氧丁二酰基)-*L*-亮氨酸-4-胍基丁基酰胺(E-64)、抑肽素(Pepstatin A) 美国 Amersco 公司;Gly-Pro-pNA、Gly-pNA、Pro-pNA、Arg-pNA、Leu-pNA、Val-pNA 美国 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯或生化试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蛋白酶活力测定

采用 Folin-酚法<sup>[8]</sup>。1.5mL 离心管中加入 0.3mL 适当稀释的酶液及 0.3mL 1.5g/100mL 酪蛋白(溶于 0.05mol/L pH5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液),40℃反应 10min,再加 0.6mL 0.4mol/L 的三氯乙酸终止反应,静置 15min 后 14000 × *g* 离心 10min,取上清液 0.6mL,加入 3mL 0.4mol/L 碳酸钠溶液及 0.6mL 福林酚试剂,于 40℃显色 20min,于波长 680nm 处测其吸光度。根据标准曲线( $y = 0.0104x$ ,  $R^2 = 0.9991$ )计算酶活力。

#### 1.2.2 氨肽酶活力测定<sup>[9]</sup>

150μL 酶液加入 150μL 0.2mmol/L *L*-亮氨酸-对硝基苯胺(Pro-pNA),混匀后置于 40℃水浴反应 20min,沸水浴灭活 3min。然后用微量比色皿测定波长 405nm 处吸光度。以 150μL 灭活的酶液加 150μL 0.2mmol/L *L*-亮氨酸-对硝基苯胺作为空白对照。根据标准曲线( $y = 0.0676x$ ,  $R^2 = 0.995$ )计算酶活力。

酶活力单位定义:实验条件下,每分钟水解 *L*-亮氨酸-对硝基苯胺产生 1μg 对硝基苯胺所需酶量即为 1 个酶活力单位 /U。

#### 1.2.3 粗酶的提取

称取一定量干麸曲(发酵方法见文献<sup>[10]</sup>)加入 10 倍体积的 0.3mol/L NaCl 溶液,混匀后于 30℃水浴中抽提 1.5h,纱布过滤后在 4℃、7000 × *g* 离心 10min,取上清液即得到粗酶液。

#### 1.2.4 毛霉氨肽酶的纯化

##### 1.2.4.1 硫酸铵分段盐析

取一定体积的粗酶液,在冰水浴上缓慢加入固体硫酸铵到饱和度为 50%,充分溶解后在 4℃冰箱中静置

4h,于 4℃、12000 × *g* 离心 20min,取上清液继续加入固体硫酸铵至饱和度为 70%,4℃冰箱中静置过夜,然后于 4℃、12000 × *g* 离心 20min,蛋白沉淀用 0.02mol/L、pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液溶解,并透析脱盐。

##### 1.2.4.2 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析

用 0.02mol/L、pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液平衡阴离子交换柱(3.0cm × 30cm),取一定量盐析脱盐后的酶液,加样阴离子交换柱。用平衡缓冲液充分洗柱后,用 A 液(0.02mol/L、pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液)和 B 液[0.5mol/L NaCl 溶液(溶于 0.02mol/L、pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液)]进行阶梯等度洗脱,流速 1.5mL/min,收集 50% B 阶梯洗脱蛋白峰,然后用超滤离心管浓缩收集液。

##### 1.2.4.3 Phenyl-Sepharose 疏水层析

用 1.2mol/L 硫酸铵溶液(溶于 0.05mol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液)平衡 Phenyl-Sepharose 疏水层析柱(1.6cm × 20cm)。将 1.2.4.2 节收集的浓缩酶液与 2.4mol/L 硫酸铵溶液(硫酸铵溶于 0.1mol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液)等体积混和后加样疏水层析柱,用平衡缓冲液充分冲洗疏水柱,然后用 A 液(0.05mol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液)和 B 液[1.2mol/L 硫酸铵溶液(硫酸铵溶于 0.05mol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液)]进行阶梯等度洗脱,流速 1.0mL/min。收集 20% B 阶梯洗脱蛋白峰(即氨肽酶蛋白峰)。

##### 1.2.4.4 Sephadex G50 凝胶过滤层析

用 0.02mol/L pH7.5 的 PBS 缓冲液平衡凝胶柱(1.6cm × 100cm),加样 1.2.4.3 节中收集的浓缩酶液,用 0.02mol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液洗脱,流速 0.5mL/min。收集活性蛋白峰,用超滤离心管浓缩收集样品。

### 1.2.5 毛霉氨肽酶的催化性质

#### 1.2.5.1 毛霉氨肽酶底物选择性

按照氨肽酶活力测定方法,分别以 Gly-Pro-pNA、Gly-pNA、Pro-pNA、Arg-pNA、Leu-pNA、Val-pNA、Phe-pNA、Lys-pNA、Ala-pNA、Ile-pNA、Glu-pNA 为底物,测定毛霉氨肽酶对不同底物的水解活性。以最大酶活力为 100%,计算相对酶活力。

#### 1.2.5.2 毛霉氨肽酶的最适作用温度

按照氨肽酶活力测定方法分别于不同的温度(25~60℃)条件下测定毛霉氨肽酶的活力,考察温度对毛霉氨肽酶活性的影响。以最大酶活力为 100%,计算相对酶活力。

#### 1.2.5.3 毛霉氨肽酶的最适作用 pH 值

按照氨肽酶活力测定方法分别于不同 pH 值(pH3.0~10.0)条件下测定毛霉氨肽酶的活力,考察 pH 值对毛霉氨肽酶活性的影响。以最大酶活力为 100%,计算相对酶活力。

#### 1.2.5.4 毛霉氨肽酶的热稳定性

在毛霉氨肽酶的稳定 pH 值条件下,将酶液分别于

不同温度(25~55℃)条件下保温 30min, 测定保温前后氨肽酶活力的变化, 考察温度对毛霉氨肽酶稳定性的影响。以最大酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

#### 1.2.5.5 pH 值对毛霉氨肽酶稳定性的影响

用不同的缓冲液分别调节酶液 pH 值为 pH3.0~10.0, 于室温(25℃)放置约 1h, 测定放置前后酶活力变化, 考察 pH 值对毛霉氨肽酶稳定性的影响。以最大酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

#### 1.2.5.6 抑制剂对毛霉氨肽酶活性的影响

在酶的稳定 pH 值条件下, 将酶液与不同类型的抑制剂混和, 然后在室温中放置约 30min, 测定加入抑制剂保温后氨肽酶的活力。以未加抑制剂组为对照, 其酶活力计为 100%, 计算抑制剂组的相对酶活力, 考察抑制剂对毛霉氨肽酶活性的影响。

#### 1.2.5.7 金属离子对毛霉氨肽酶活性的影响

在酶的稳定 pH 值条件下, 将酶液与不同的金属离子溶液混和, 于室温放置 30min 后测定氨肽酶活力, 以未加金属离子组为对照, 其酶活力计为 100%, 计算加金属离子组的相对酶活力, 比较各种金属离子对氨肽酶活性的影响。

#### 1.2.6 大豆多肽的制备

配制 5g/100mL 大豆分离蛋白, 用 1mol/L NaOH 调节 pH 值到 11.0, 置于 90℃ 恒温水浴中预处理 15min, 冷却后按 3000U/g 加入 Alcalase 碱性蛋白酶, 置于 50℃ 的水浴中保温水解 5h。水解结束后直接加热煮沸, 并趁热过滤, 滤液冷冻干燥, 即得到大豆多肽样品。

#### 1.2.7 苦味评价方法

以硫酸奎宁为标准对照物, 采用感官分析的方法对大豆多肽的苦味进行评价, 大豆多肽苦味强度以具有相同苦味的硫酸奎宁浓度表示<sup>[11]</sup>。配制一定浓度的硫酸奎宁溶液, 分别稀释到  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ mol/L, 对应的苦味强度分别为: 强、较强、中、弱、无。感官评定小组由 8 人组成, 评定人员用蒸馏水漱口后, 取待测水解液 3~5mL 置于口中, 10s 后吐出, 漱口后取与之苦味程度相近的标准品溶液品尝, 如确认两苦味相近, 即可把待测水解液定义为该标准品溶液的苦味值, 否则取其他标准品溶液品尝, 直至确定其苦味值。

#### 1.2.8 毛霉氨肽酶脱苦效果的分析

用 pH6.5、0.02mol/L 磷酸盐缓冲液配制 3g/100mL 大豆多肽溶液, 按 3000U/g 加入纯化后的氨肽酶, 置于 35℃ 水浴保温 4h, 每隔一定时间取样进行苦味感官分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 毛霉氨肽酶的纯化

采用层析法对毛霉氨肽酶进行初步分离及纯化。首

先, 采用 DEAE-Sephrose 阴离子交换层析对盐析后样品进行初步的分离纯化, 通过对其洗脱方法进行优化, 最终使氨肽酶组分完全集中在 50% B 的洗脱峰(图 1), 并实现了内肽酶与氨肽酶的分离, 同时使氨肽酶得到了浓缩; 然后, 采用疏水层析的方法对上一步收集的氨肽酶样品做进一步的分离(图 2), 结果发现在疏水层析中可以分离得到两个有活性的洗脱峰, 即 60% B 洗脱峰(活性峰 1)和 20% B 洗脱峰(活性峰 2), 相比而言, 峰 1 的亮氨酸氨肽酶活性较弱, 仅为峰 2 的 30% 左右<sup>[17]</sup>, 因此在后续研究中主要针对峰 2 氨肽酶组分进行纯化及性质探讨; 最后, 采用凝胶过滤层析的方法对疏水层析收集的活性峰 2 进行进一步的纯化并同步对样品进行脱盐, 结果见图 3。可以看出, 疏水层析收集的样品中仍然有较多的杂蛋白, 而且杂蛋白的分子质量与氨肽酶的分子质量较为接近, 用凝胶层析的方法并不能将它们完全分开。

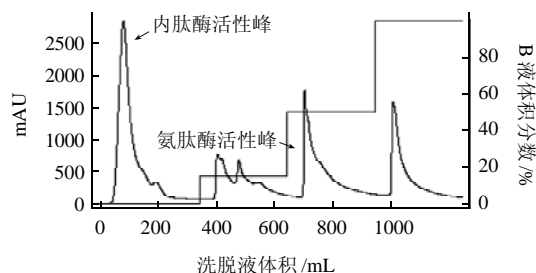


图 1 氨肽酶 DEAE-Sephrose 阴离子交换洗脱曲线

Fig.1 Elution profile of aminopeptidase on DEAE-Sephrose column

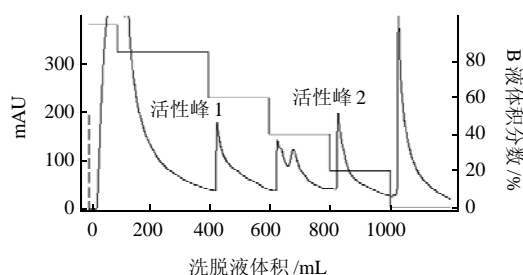


图 2 氨肽酶 Phenyl-Sephrose 疏水层析洗脱曲线

Fig.2 Elution profile of aminopeptidase on Phenyl-Sephrose column

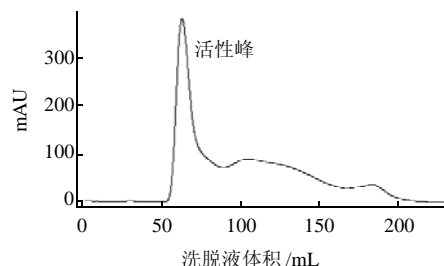


图 3 氨肽酶 Sephadex G50 凝胶过滤层析洗脱曲线

Fig.3 Elution profile of aminopeptidase on Sephadex G50 column

通过以上一系列的纯化操作,虽然可以实现内肽酶与氨肽酶的分离,两个氨肽酶组分之间也得以分开,氨肽酶的纯度有所提高,但是最终并不能完全纯化出目标蛋白酶。纯化得到的氨肽酶样品中仍然含有一定量的杂蛋白。因此,对毛霉氨肽酶的纯化还需考虑其他的方法。

## 2.2 毛霉氨肽酶的底物专一性

由表1可知,毛霉氨肽酶对不同底物的水解活性显示出一定的差异。总的来看,毛霉氨肽酶主要对于小肽N端疏水性氨基酸,如Leu、Ile、Phe构成的肽键有很强的水解活性(Val例外);而对于小肽N端非疏水性氨基酸,如Arg、Ala构成的肽键水解活性非常弱,甚至无水解活性;除此外,该氨肽酶对于小肽N端的Pro、Glu、Gly也有一定的水解活性。比较毛霉氨肽酶对表中各底物的水解活性,该氨肽酶对Leu-pNA有最大的水解活性,确定其是亮氨酸氨肽酶。

## 2.3 抑制剂及金属离子对氨肽酶活性的影响

由表2可见,在所实验的几种蛋白酶抑制剂中,仅10mmol/L的EDTA可以完全抑制该氨肽酶的活性。由此说明,纯化的毛霉氨肽酶是一种金属蛋白酶。金属离子 $\text{Ca}^{2+}$ 对该氨肽酶有一定的激活作用,而 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 及 $\text{Mn}^{2+}$ 对其有非常显著的抑制作用。

## 2.4 pH值对毛霉氨肽酶活性及稳定性的影响

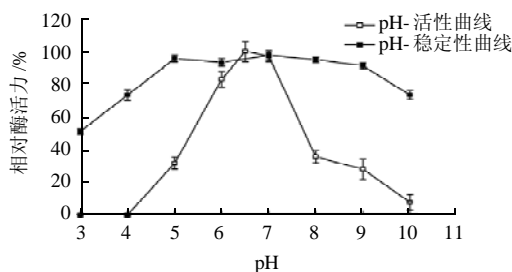


图4 pH值对毛霉氨肽酶活性及稳定性的影响

Fig.4 Effect of pH on the activity and stability of aminopeptidase from *Mucor*

由图4可知,pH值对毛霉氨肽酶活性的影响非常显著,该氨肽酶在pH6.5左右有最大催化活性;而在

pH5.0时,氨肽酶的相对酶活力为30%左右,当pH值低于4时则基本上没有活性。稳定性实验结果表明,毛霉氨肽酶在中性pH值附近(pH5.0~8.0)有相对较好的稳定性,偏离这一范围该氨肽酶会迅速失活。

## 2.5 温度对氨肽酶活性及稳定性的影响

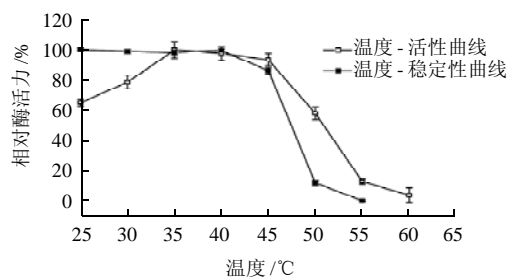


图5 温度对毛霉氨肽酶活性及稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature on the activity and stability of aminopeptidase from *Mucor*

由图5可知,该氨肽酶在40°C有最大催化活性,温度高于45°C活性会迅速下降。此外,该氨肽酶在相对较低的温度下也显示出较强活性,在25°C时,该氨肽酶的相对酶活力为63%。稳定性实验结果表明:该毛霉氨肽酶具有相对较好的热稳定性,在温度低于40°C的条件下保温30min,该氨肽酶的活性基本上无损失,在45°C保温30min后,相对酶活力依然可高达90%左右;若保温温度超过45°C,则该氨肽酶会迅速失活。

## 2.6 毛霉氨肽酶脱苦效果的分析

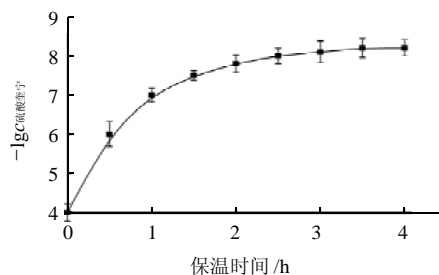


图6 毛霉氨肽酶对大豆多肽脱苦过程中苦味的变化

Fig.6 Bitterness change of soybean polyptides during treatment with aminopeptidase from *Mucor*

表1 毛霉氨肽酶的底物专一性

Table 1 Substrate specificity of aminopeptidase from *Mucor*

底物类型	Leu-pNA	Pro-pNA	Arg-pNA	Phe-pNA	Val-pNA	Lys-pNA	Ala-pNA	Ile-pNA	Glu-pNA	Gly-pNA	Gly-Pro-pNA
相对酶活力/%	100.00	29.51 ± 2.10	0.05 ± 0.01	53.14 ± 0.10	2.87 ± 0.30	21.30 ± 0.21	4.50 ± 0.14	80.40 ± 0.31	31.40 ± 0.22	15.74 ± 0.15	0.41 ± 0.16

表2 抑制剂及金属离子对毛霉氨肽酶活性的影响

Table 2 Effects of inhibitors and metal ions on the activity of aminopeptidase from *Mucor*

项目	对照	抑制剂				5mmol/L金属离子						
		10mmol/L EDTA	10μmol/L E-64	10μmol/L PepstatinA	1mmol/L PMSF	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
相对酶活力/%	100.00	0 ± 0.10	97.43 ± 1.50	102.21 ± 2.40	92.28 ± 2.20	123.28 ± 1.40	83.07 ± 2.10	10.58 ± 3.10	94.71 ± 2.70	58.73 ± 2.40	81.48 ± 3.30	0 ± 0.10

由图6可知,毛霉亮氨酸氨肽酶对大豆多肽有明显的苦味去除效果。在脱苦之前,3g/100mL的大豆多肽有非常强烈的苦味,用毛霉氨肽酶脱苦处理0.5h后,其苦味有明显的减轻,接近中等苦味强度;脱苦处理1.5h后,大豆多肽的苦味强度变弱;继续处理到4h后其苦味基本上消失。

毛霉亮氨酸氨肽酶对大豆多肽有显著的脱苦效果,这应该与该酶选择性切除小肽N端的疏水性氨基酸有密切的关系。已有的研究表明,多肽之所以有苦味主要与其疏水性有关,尤其是位于小肽分子两端的疏水性氨基酸对肽的苦味有很大的贡献<sup>[12-13]</sup>。因此,氨肽酶对小肽N端疏水性氨基酸的切除可以从根本上解除小肽的苦味,这一结论已为较多的实验结果所证实<sup>[14-16]</sup>。相比而言,毛霉亮氨酸氨肽酶的脱苦效率要比毛霉脯氨酸氨肽酶的脱苦效率低,这应该与它们的底物选择性差异有关系<sup>[17]</sup>。虽然这两种氨肽酶都对疏水性氨基酸构成的肽键有较强的水解活性,但是对不同的氨基酸(尤其是脯氨酸)其水解活性有明显差异。毛霉亮氨酸氨肽酶对小肽N端的Pro水解活性太低(仅为Leu水解活性的30%),而小肽N端的Pro对小肽苦味有非常突出的贡献<sup>[18]</sup>,这就是为什么该氨肽酶脱苦进程较缓慢的主要原因了。另外,用亮氨酸氨肽酶脱苦后的多肽液有很明显的“鲜味”,这可能是由于脱苦时间太长,大量Glu从小肽末端释放的结果。

比较毛霉脯氨酸氨肽酶<sup>[17]</sup>与亮氨酸氨肽酶的底物选择性可以看出,它们两者之间存在一定的底物选择互补性:毛霉脯氨酸氨肽酶对小肽N端的Pro有很强的水解活性,而对N端的Leu水解活性相对较低(仅为Pro水解活性的58%);而毛霉亮氨酸氨肽酶则对小肽N端Leu有很强的水解活性,而对N端Pro的水解活性很低。因此,这两种氨肽酶在小肽脱苦过程中可以实现优势互补,加速脱苦进程,从而提高脱苦效率,并可以有效防止脱苦过程中小肽的过度水解而丧失其原有的生理活性<sup>[19]</sup>。

### 3 结 论

利用多种层析相结合的方法从毛霉的发酵麸曲中分离纯化出一氨肽酶组分,并对其性质及脱苦效果进行了分析。结果表明:该酶是一亮氨酸氨肽酶;在40℃、pH6.5有最大催化活性,在40℃以内,pH5.0~8.0有很好的稳定性;该氨肽酶对小肽N端的疏水性氨基酸(如Leu、Ile、Phe等)有很强的水解活性,而对小肽N端非疏水性氨基酸的水解活性较弱;脱苦实验结果表

明,毛霉氨肽酶对大豆多肽有很明显的脱苦效果。在3g/100mL的大豆多肽溶液中,按3000U/g加入毛霉氨肽酶处理4h可以消除大豆多肽的苦味。底物专一性的结果表明,毛霉亮氨酸氨肽酶与毛霉脯氨酸氨肽酶之间存在一定的底物选择互补性,两者共同作用于多肽可以实现各自优势互补,提高脱苦效率。

### 参考文献:

- [1] 陈躬瑞,陈儒明,赵晴,等.毛霉红腐乳蛋白质的研究[J].营养学报,1997,19(1):100-103.
- [2] 倪莉,饶平凡,王璋.腐乳中生理活性多肽的分离和表征[J].浙江农业大学学报,1997,23(增刊1):93-97.
- [3] 鲁绯,孙君社,王丽英.雅致放射毛霉胞外蛋白酶特性的研究[J].中国酿造,2004(12):8-10.
- [4] 李理,罗泽民,卢向阳.梨形毛霉蛋白酶在大豆多肽制备中的应用[J].中国粮油学报,2001,16(1):55-58.
- [5] 潘进权,罗晓春,谢明权.雅致放射毛霉AS3.2778碱性蛋白酶的纯化及水解特性[J].华南理工大学学报,2008,36(12):106-111.
- [6] 潘进权,罗晓春,谢明权.毛霉蛋白酶的组分特性及对大豆蛋白水解的研究[J].中国粮油学报,2009,24(5):1-35.
- [7] LI Li, YANG Zuoyi, YANG Xiaoquan, et al. Debittering effect of actinomucor elegans peptidases on soybean protein hydrolysates[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, 35(1): 41-47.
- [8] SIERECHEA J K. Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1998, 30(5): 579-595.
- [9] 田亚平,须瑛敏.一种枯草芽孢杆菌氨肽酶的纯化及酶学性质[J].食品与发酵工业,2006,32(3):7-10.
- [10] 潘进权,罗晓春,谢明权.基于序贯设计的毛霉AS3.2778发酵产蛋白酶工艺优化[J].食品科学,2008,29(12):481-485.
- [11] HIROATSU M, YOKO F, SHUICHI K, et al. Purification and debittering effect of aminopeptidase II from *Penicillium caseicolum*[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39: 1392-1395.
- [12] ISHIBASHI N, ONO I, KATO K, et al. Role of the hydrophobic amino acid residue in the bitterness of peptides[J]. Agric Biol Chem, 1988, 52(1): 91-94.
- [13] ALDLER-NISSEN J. A review of food protein hydrolysis specific areas in enzymic hydrolysis of food proteins[M]. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 57-107.
- [14] FITZGERALD R J, O'CUINN G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates[J]. Biotechnol Adv, 2006, 24: 234-237.
- [15] MINAGAWA E. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T[J]. J Food Sci, 1989, 54(5): 1125-1129.
- [16] LZAWA N. Debittering of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 543-545.
- [17] 潘进权.毛霉AS3.2778脯氨酸氨肽酶的部分纯化及性质研究[J].食品与发酵工业,2011,37(4):26-31.
- [18] ISHIBASHI N, KUBO T, CHINO M, et al. Taste of praline-containing peptides[J]. Agric Biol Chem, 1988, 52(1): 95-98.
- [19] 陈成,刘文玉,杨青.大豆蛋白活性肽的生物学功能及其应用[J].黑龙江农业科学,2004(3):40-42.