

重组氨肽酶底物特异性及协同水解玉米蛋白质

林颖, 孔峰, 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: 以 9 种不同的氨基酸-对硝基苯胺为底物, 考察重组枯草芽孢杆菌氨肽酶对底物的特异性。结果显示, 该氨肽酶对由疏水氨基酸组成的 Leu-pNA 水解活力最强, 其次是两种由碱性氨基酸组成的 Arg-pNA、Lys-pNA, 对其它几种由疏水氨基酸组成的 Ala-pNA、Ile-pNA、Val-pNA、Phe-pNA、Pro-pNA 表现出较弱的水解活力, 而对酸性氨基酸组成的 Glu-pNA 则无水解活力。在此基础上考察其与内切蛋白酶协同水解玉米蛋白质的效果, 以水解度为指标进行单因素试验, 明确氨肽酶与碱性蛋白酶复配水解玉米蛋白质的效果较佳。双酶水解产物中新增游离氨基酸含量分别为碱性蛋白酶和氨肽酶单独水解的 4.89 倍、6.05 倍; 水解产物中多肽相对分子质量多在 1 000 Da 以下, 其中 500~1 000 Da 的寡肽占 14.57%, 180~500 Da 的小肽质量分数为 68.42%, 水解度达 65%。这些结果表明, 氨肽酶和碱性蛋白酶协同水解蛋白质原料具有良好的应用前景。

关键词: 重组氨肽酶; 底物特异性; 协同水解; 玉米蛋白质

中图分类号: Q 55 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)12—1274—07

Study on Substrate Specificity of Aminopeptidase from Recombinant *Bacillus subtilis* and the Cooperative Hydrolysis of Corn Protein

LIN Ying, KONG Feng, TIAN Ya-ping*

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

Abstract: The substrate specificity of aminopeptidase from the recombinant *Bacillus subtilis* was investigated by employing nine types of p-nitroanilide derivatives of amino acids as substrates. The results indicated that the aminopeptidase shows the highest activity for Leu-pNA, whose amino acid moiety is hydrophobic leucine. The enzyme also shows high hydrolytic activity to Arg-pNA and Lys-pNA, whose amino acid moieties are basic amino acids. Followed are Ala-pNA, Ile-pNA, Val-pNA, Phe-pNA and Pro-pNA, which contain hydrophobic amino acid moiety. However, Glu-pNA which contains acidic amino acid moiety can hardly be hydrolyzed. Then the hydrolysis of corn protein was carried out by the combination of aminopeptidase and endoprotease. With the hydrolysis degree as index by using the single factor experiment, aminopeptidase combined with alkaline

收稿日期: 2013-06-21

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的研究。

E-mail: yapingtian@hotmail.com

protease obtained high efficiency:(1) The content of free amino acid was 4.89 times and 6.05 times than that of alkaline protease aminopeptidase was used alone,respectively.(2)The molecular weight of the peptides was mostly less than 1 000 Da,14.57% is within 500~1 000 Da,and 68.42% is within 180~500 Da.(3)The hydrolysis degree was 65%. These results suggested that aminopeptidase combined with alkaline protease hydrolyzes protein raw material.

Keywords: recombinant aminopeptidase,substrate specificity,collaborative hydrolysis,corn protein

蛋白质经蛋白酶水解以后,水解产物主要为游离氨基酸、寡肽及小分子肽,这些小分子水解产物比大分子蛋白质具有更多的良好特性,如稳定性、水溶性等理化性质,并且其中一些寡肽还具有易吸收、低过敏性、抗血压、抗氧化性,以及降低血脂、胆固醇和抗疲劳等生理功能^[1-10]。因此,将蛋白质原料水解为游离氨基酸和小分子肽可有效提升蛋白质原料的附加值。

酶对底物的催化作用分为专一性和非专一性,由于蛋白酶对底物作用不同以及蛋白质原料组成不同,不同的蛋白酶水解蛋白质的产物也不尽相同。目前酶法水解蛋白质原料的酶主要有木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、风味蛋白酶及复合蛋白酶等,其蛋白质的水解度一般在40%左右,水解程度普遍偏低。蛋白质的深度水解不仅需要内切蛋白酶的作用,还需要外切蛋白酶的协同作用。课题组前期研究发现,枯草芽孢杆菌 Zj016 氨肽酶具有外切酶活性,而内切酶活性相对较低^[11]。故作者考察了重组枯草芽孢杆菌氨肽酶水解小分子底物的特异性,在此基础上探究了与其适宜的内切酶协同水解玉米蛋白质的活力,以便更好地发挥氨肽酶在蛋白质原料水解方面的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 重组枯草芽孢杆菌,本课题组从枯草芽孢杆菌 Zj016 中扩增出氨肽酶的基因,并在枯草芽孢杆菌表达体系中实现了它的高效分泌表达^[12]。

1.1.2 主要试剂 Leu-pNA、Arg-pNA、Lys-pNA、Ala-pNA、Ile-pNA、Val-pNA、Phe-pNA、Pro-pNA、Glu-pNA,美国 Alfa 公司制品;玉米蛋白质,山东瑞星集团有限公司制品;中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰

蛋白酶、木瓜蛋白酶,广西南宁庞博生物工程有限公司制品;其他试剂均为国产分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司(上海)。

1.1.3 主要仪器与设备 BCD-208K 型低温冰箱,青岛海尔股份有限公司制造;722 型分光光度计,上海第三分析仪器厂制造;SHZ-22 型电热恒温水浴锅,上海医疗器械五厂制造;himac CR22G 高速冷冻离心机,日本日立(HITACHI)公司制造;氨基酸分析液相色谱仪,美国安捷伦公司制造;Waters 600 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司制造。

1.2 实验方法

1.2.1 氨肽酶的制备 重组枯草芽孢杆菌氨肽酶的发酵液经过 8 000 r/min,15 min 离心除菌体,上清液中加质量分数 20%的硫酸铵澄清发酵液,然后 8 000 r/min,15 min 离心除杂,上清液经过超滤浓缩、脱盐后,采用体积分数为 20%~65%乙醇沉淀氨肽酶,离心沉淀经真空冷冻干燥获得粉状氨肽酶。

1.2.2 氨肽酶的底物特异性 按照氨肽酶活性测定方法,分别以 Leu-pNA、Arg-pNA、Lys-pNA、Ile-pNA、Phe-pNA、Ala-pNA、Pro-pNA、Val-pNA、Glu-pNA 为底物,测定该氨肽酶对 9 种不同底物的水解能力。

1.2.3 氨肽酶对不同底物的 K_m 及 V_{max} 测定 分别以 Leu-pNA、Arg-pNA、Lys-pNA 为底物,测定不同底物浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mmol/L)时氨肽酶的酶活。按照 Lineweaver-Burk 作图法,计算该酶对不同底物的 K_m 和 V_{max} 。

1.2.4 单酶水解玉米蛋白 选用 4 种蛋白酶(中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶),在表 1 条件下进行单酶水解玉米蛋白质。以酶解后的水解度为指标,从中选择出酶解效果较好的内切型蛋白酶。

表 1 不同蛋白酶的水解条件

Table 1 Hydrolysis conditions of various proteases

酶	酶解条件			
	温度/℃	时间/h	底物质量分数/%	pH 值
中性蛋白酶	50	4	5	7.5
碱性蛋白酶	50	4	5	9.0
胰蛋白酶	50	4	5	10.0
木瓜蛋白酶	50	4	5	6.5

1.2.5 氨基酸酶活力测定 采用 LNA 法^[13]。测定时, 首先加入 2 mL pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液和 1 mL 1 mg/mL 的底物 (L-亮氨酸-4-硝基苯胺 L-Leu-pNA), 然后再加入 1 mL 稀释一定倍数的酶液, 于 50 ℃ 下水浴反应 10 min 后, 在 405 nm 波长处测定吸光值。酶活力定义: 在 50 ℃ 水浴下, 每分钟分解 L-亮氨酸-4-硝基苯胺产生 1 μmol 对硝基苯胺所需酶量定义为一个酶活单位。

1.2.6 水解度(DH)测定 采用 pH-stat 法^[14]。

1.2.7 酶解液中游离氨基酸含量的测定 色谱条件: 色谱柱, ODS HYPERSIL (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A, 将 8.0 g 结晶乙酸钠溶解在 1 L 水里, 向其中加入 0.225 mL 的三乙胺, 用质量分数 5% 的醋酸将溶液 pH 调至 7.2, 再加入 50 mL 四氢呋喃, 混合均匀; B, 将 8.0 g 结晶乙酸钠溶解在 400 mL 水里, 用质量分数 2% 的醋酸将溶液的 pH 调至 7.2, 再加入 800 mL 甲醇和 800 mL 乙腈, 混合均匀。梯度洗脱程序: 0~5 min, 体积分数 92% 的 A 溶液; 5~35 min, 体积分数 8%~100% 的 B 溶液。体积流量为 1 mL/min; 柱温为 40 ℃; 进样量为 10 μL; 检测波长为 338 nm。

1.2.8 酶解液中多肽分布的测定 色谱条件: 色谱柱, TSKgel 2000 SW_{XL} (300 mm×7.8 mm, 5 μm); 流动相, 乙腈/水/三氟乙酸, 体积比 45/55/0.1。检测波长为 220 nm; 体积流量为 0.5 mL/min; 柱温为 30 ℃; 进样量为 10 μL。样品制备: 吸取样品 2 mL 置 10 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 用 0.22 μm 微孔过滤膜过滤后供进样。相对分子质量校正曲线所用标准品: 细胞色素 C (MW12500); 杆菌酶 (MW1450); 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (MW451); 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (MW189)。

2 结果与讨论

2.1 氨基酸酶的底物特异性

用 50 mmol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液将酶

粉稀释到一定倍数后进行底物特异性的研究, 以实验中酶活力最高的一组作为对照, 结果如图 1 所示。

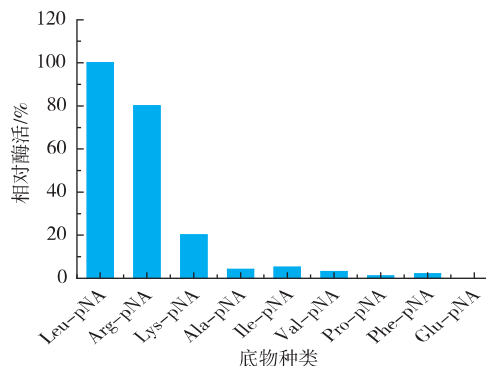


图 1 重组枯草芽孢杆菌氨基酸酶的底物特异性

Fig. 1 Substrate specificity of aminopeptidase from recombinant *Bacillus subtilis*

由图 1 可知, 在所测定的 9 种小分子底物中, 该重组枯草芽孢杆菌氨基酸酶分解由疏水氨基酸组成的 Leu-pNA 活力最强, 其次是两种由碱性氨基酸组成的 Arg-pNA、Lys-pNA, 对其它几种疏水氨基酸组成的 Ala-pNA、Ile-pNA、Val-pNA、Phe-pNA、Pro-pNA 表现出较弱的水解活力, 而对酸性氨基酸组成的 Glu-pNA 则无水解活力。

选择 Leu-pNA、Arg-pNA、Lys-pNA 这 3 种底物, 分别测定不同浓度下氨基酸酶的酶活, 按照 Lineweaver-Burk 作图法计算氨基酸酶对不同底物的米氏常数 K_m 及其最大反应速率 V_{max} , 结果如表 2 所示。

表 2 氨基酸酶对不同底物的 K_m 和 V_{max}

Table 2 K_m and V_{max} of aminopeptidase of different substrates

底物种类	K_m /(mmol/L)	V_{max} /(μmol/(L·min))
Leu-pNA	0.75	2 500
Arg-pNA	1	1 667
Lys-pNA	1.65	435

由表 2 可知, 通过 3 组 K_m 数据的比较, 氨基酸酶对 Leu-pNA 的亲和力最强, 其次是 Arg-pNA、Lys-pNA, 与直接分析该酶对这 3 种底物水解能力的顺序相吻合; 此外, 3 组 V_{max} 的数据表明, 当氨基酸酶完全被底物饱和时, 其对 Leu-pNA 的水解速度也是最高。

作者所在课题组前期考察了枯草芽孢杆菌 Zj016 氨基酸酶协同碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白质, 通过考察大豆分离蛋白水解液的苦味值和疏水值指标, 发现枯草芽孢杆菌 Zj016 氨基酸酶具有明显

的脱苦效果^[15]。从重组枯草芽孢杆菌氨肽酶底物特异性研究发现,此酶能够切除多肽 N 端的疏水性氨基酸,说明氨肽酶在脱除蛋白水解液苦味方面具有较大应用潜力。

2.2 蛋白酶的选择

玉米蛋白质的氨基酸组成见表 3, 其中 Leu、Ala、Phe、Val、Pro 等疏水性氨基酸和 Glu 等含量较高,根据内切蛋白酶具备的主要作用位点不同(表 4),选择合适的内切酶对其水解,通过控制一定水解度可获得多种小分子肽^[16]。

表 3 玉米蛋白质的氨基酸组成

Table 3 Amino acid composition of corn protein

氨基酸	质量分数/%	氨基酸	质量分数/%	氨基酸	质量分数/%
Lys	0.96	Val	3.00	Ile	2.05
His	0.87	Pro	3.00	Ala	4.81
Arg	1.56	Gly	1.36	Met	1.05
Asp	3.21	Trp	0.20	Glu	12.26
Cys-s	0.56	Ser	12.26	Phe	3.09
Leu	8.24	Thr	1.52	Tyr	2.31

表 4 4 种蛋白酶主要作用位点

Table 4 Main active sites of four kinds of proteases

蛋白酶种类	主要作用位点
碱性蛋白酶	Ala-, Leu, Val, Tyr-, Phe, Trp- ¹
中性蛋白酶	Tyr, Phe, Trp-
木瓜蛋白酶	Arg-, Lys-, Phe-
胰蛋白酶	Arg-, Lys-

注:¹表示酶作用的位点在氨基酸羧基端。

从图 2 可知,当使用碱性蛋白酶对玉米蛋白质进行水解时,其水解度最高,为 23.2%,其它蛋白酶对玉米蛋白质的水解活性均低于碱性蛋白酶。由表 3、4 可知,玉米蛋白质中暴露出碱性蛋白酶的酶切位点(Ala-、Leu、Val、Tyr-、Phe、Trp-)多于其他蛋白酶的酶切位点,所以碱性蛋白酶酶解玉米蛋白质的效果最好。

2.3 温度对水解度的影响

配制质量分数为 5% 的玉米蛋白溶液,碱性蛋白酶加量 8.0×10^3 U/g,在不同温度、pH9.0 条件下水解 3 h,测定不同温度对水解度的影响,结果如图 3 所示。

从图 3 可知,从 40 ℃ 上升到 50 ℃ 的过程中,在开始的 80 min 内,水解度升高非常明显;而当温度

达到 60 ℃ 后,在水解开始的 40 min 内,水解度是最高的,但是之后随着水解时间的延长,水解度降低,原因是温度偏高,引起了酶活性降低。因此,最适水解温度为 50 ℃。

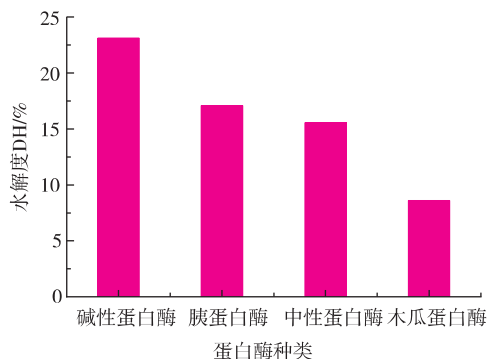


图 2 不同蛋白酶的水解度

Fig. 2 Hydrolysis degree of different proteases

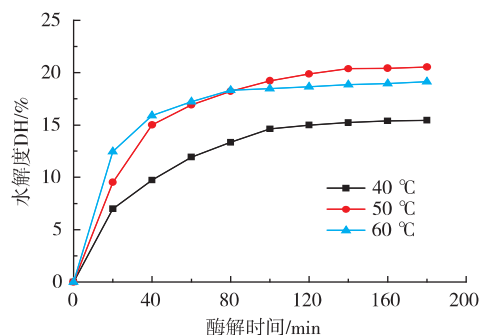


图 3 不同温度对水解度的影响

Fig. 3 Effect of different hydrolysis temperatures on degree of hydrolysis

2.4 pH 值对水解度的影响

配制质量分数为 5% 的玉米蛋白溶液,碱性蛋白酶加量 8.0×10^3 U/g,在反应温度 50 ℃、不同 pH 条件下水解 3 h,测定不同 pH 对水解度的影响,结果如图 4 所示。

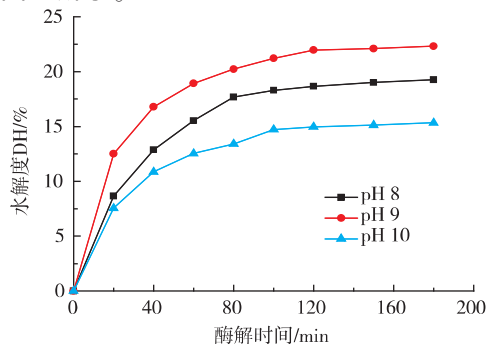


图 4 不同 pH 值对水解度的影响

Fig. 4 Effect of different hydrolysis pH on degree of hydrolysis

由图 4 可知,当水解液 pH 为 9.0 时,玉米蛋白质的水解度最高,为 22.3%;当 pH 低于或高于 9.0 时,水解度均低于 pH 9.0 时的水解度。因此,最适水解 pH 为 9.0。

2.5 底物浓度对水解度的影响

配制不同浓度的玉米蛋白溶液,碱性蛋白酶加量 8.0×10^3 U/g,在温度 50 °C、pH 9.0 条件下水解 3 h,测定不同底物浓度对水解度的影响,结果如图 5 所示。

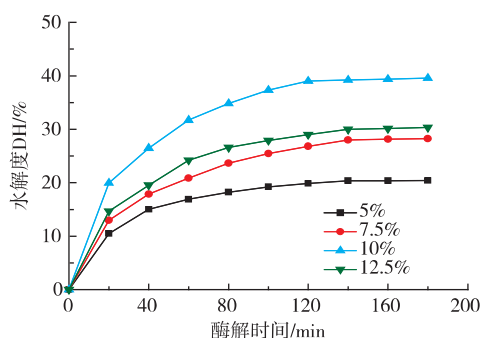


图 5 不同底物质量分数对水解度的影响

Fig. 5 Effect of different substrate concentration on degree of hydrolysis

由图 5 可知,当底物质量分数 $\leq 10\%$ 时,随着底物质量分数的增加,水解度逐渐升高;但是当底物质量分数达到 12.5% 时,水解液粘度增大,影响碱性蛋白酶的扩散,降低酶的作用效果。因此,最适底物质量分数为 10%。

2.6 碱性蛋白酶加酶量对水解度的影响

配制质量分数为 10% 的玉米蛋白溶液,在温度 50 °C、pH 9.0 条件下,分别按 8.0×10^3 、 1.6×10^4 、 3.2×10^4 、 4.8×10^4 U/g 加入不同量的碱性蛋白酶进行酶解,水解 3 h,测定不同碱性蛋白酶加酶量对水解度的影响,结果如图 6 所示。

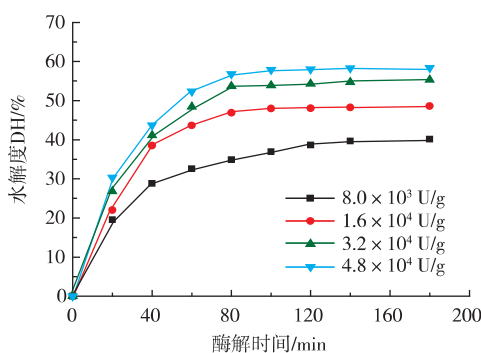


图 6 不同加酶量对水解度的影响

Fig. 6 Effect of different enzyme-substrate ratios on degree of hydrolysis

由图 6 可知,在相同酶解时间下,随着加酶量的增加水解度也逐渐增加;当酶底比由 8.0×10^3 U/g 增加到 3.2×10^4 U/g 时,水解度由 40.1% 增加到 55.3%;然而当加酶量增加到 4.8×10^4 U/g 时,水解度为 58.3%,增加量不明显。考虑到成本因素和提高酶的利用价值,最适酶底比为 3.2×10^4 U/g。

2.7 氨肽酶和碱性蛋白酶协同水解玉米蛋白质

由于氨肽酶最佳酶解反应温度为 50 °C, pH 为 8.5,与碱性蛋白酶的最佳酶解条件基本一致,并且氨肽酶相对碱性蛋白酶来说,价格较高,考虑到成本问题,水解过程中的温度、pH 按照氨肽酶最佳酶解条件进行,底物质量分数和酶解时间按照碱性蛋白酶水解的最佳条件进行。

选用碱性蛋白酶的最佳添加量 (3.2×10^4 U/g) 及较优的水解条件 (温度 50 °C, pH 8.5, 底物质量分数 10%, 水解 3 h), 通过改变氨肽酶的添加量, 考察不同添加量的氨肽酶与碱性蛋白酶协同水解玉米蛋白质的效果, 结果如图 7 所示。

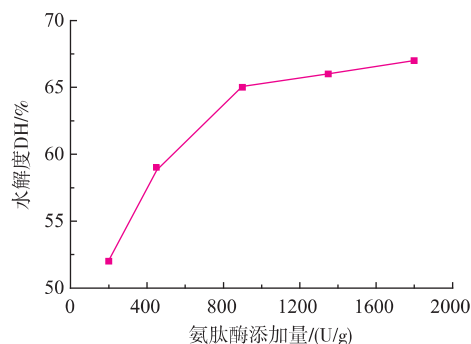


图 7 不同添加量的氨肽酶与碱性蛋白酶协同水解玉米蛋白质

Fig. 7 Aminopeptidase under different amounts of coordination with alkali protease hydrolyzed corn protein

由图 7 可知,当氨肽酶的添加量 ≤ 900 U/g 时,随着氨肽酶添加量的增加,酶的活性基团也增加,酶促反应加快,水解度增加的速度较快;随后继续增加氨肽酶添加量,水解度仍然有所提高,但增加幅度较小。因此考虑到成本因素,选择氨肽酶添加量 900 U/g 较合适,此时水解度达 65%。

2.8 单酶和双酶水解玉米蛋白的比较

配制质量分数为 10% 的玉米蛋白溶液,分别添加 3.2×10^4 U/g 的碱性蛋白酶、900 U/g 的氨肽酶,在温度 50 °C, pH 8.5 条件下水解 3 h, 将水解液分别进行水解度、游离氨基酸、多肽分布分析, 考察单

酶、双酶水解玉米蛋白质的效果,结果如表 5、6 所示。

表 5 游离氨基酸组成比较

Table 5 Comparison of amino acids composition

mg/L

氨基酸种类	未酶解	碱性蛋白酶	氨肽酶	双酶水解
Asp	19.23	21.48	29.70	40.15
Glu	17.34	65.44	86.43	180.10
Ser	0.11	1.19	4.21	10.91
His	0.94	3.10	8.65	11.62
Thr	2.84	22.50	13.13	91.45
Arg	7.33	14.32	13.57	223.42
Tyr	3.30	5.93	46.87	161.96
Cys	0.58	63.13	1.68	64.78
Lys	3.32	24.03	72.49	128.20
Val	6.55	25.63	40.75	216.35
Gly	13.28	15.07	27.09	91.16
Ala	9.43	82.84	49.20	324.49
Met	3.38	61.00	15.42	149.10
Phe	9.57	24.97	54.69	214.46
Ile	3.93	14.65	27.77	173.40
Leu	14.25	215.51	64.82	707.43
Pro	2.09	4.05	3.48	5.15
总量	117.47	664.84	559.95	2 794.13
氨基酸增加量	0	547.37	442.48	2 676.66

由表 5 可知,双酶水解玉米蛋白质时,水解液中新增游离氨基酸含量分别为碱性蛋白酶和氨肽酶单独水解的 4.89 倍、6.05 倍;双酶水解液中 Leu 含量最高,占总氨基酸的 25.32%,其次分别是 Ala 11.61%、Arg 7.99%、Val 7.74%、Phe 7.67%、Glu 6.45%、Ile 6.21%、Tyr 5.79%、Met 5.34%。蛋白水解液中的苦味主要来自水解物中的苦味肽,苦味肽一般是肽链末端带有单个或多个疏水性氨基酸残基的多肽,苦味正是由这些苦味肽末端的疏水性氨基酸暴露出来引起的。双酶水解液中疏水性氨基酸 Leu、Ala、Val、Phe、Ile、Tyr 含量较高,说明该氨肽酶可以通过水解苦味肽末端疏水性氨基酸而达到蛋白水解液的脱苦效果。

由表 6 可知,未酶解的玉米蛋白溶液中主要是

大分子物质,质量分数为 65.77%,小肽、寡肽、多肽的含量较低;碱性蛋白酶与氨肽酶单独水解玉米蛋白质,水解液中大分子物质含量减少,小肽含量有一定增多;双酶复配水解液中则不存在大分子物质,多肽相对分子质量多在 1 000 Da 以下,其中 500~1 000 Da 的寡肽占 14.57%,180~500 Da 的小肽含量占 68.42%,水解度可达 65%。双酶协同水解的效果明显优于单酶水解。

表 6 相对分子质量分布比较

Table 6 Comparison of the molecular weight distribution of the peptides

相对分子质量	未酶解/%	碱性蛋白酶/%	氨肽酶/%	氨肽酶+碱性蛋白酶/%
>5 000	65.77	5.76	27.70	—
5 000~3 000	7.58	3.45	10.26	0.23
2 000~3 000	5.80	2.32	6.58	0.55
2 000~1 000	6.58	5.21	8.69	4.92
1 000~500	4.39	17.26	10.69	14.57
500~180	4.60	56.74	30.65	68.42
<180	5.28	9.26	5.43	11.31

碱性蛋白酶是疏水专一性内切蛋白酶,蛋白质经其水解后,生成较多末端带有疏水性氨基酸的多肽,苦味正是由多肽末端的疏水性氨基酸暴露出来引起的^[15],而该氨肽酶能够切除这些多肽 N 端的疏水性氨基酸,碱性蛋白酶水解的主要位点(亮氨酸、丙氨酸等)恰巧是氨肽酶容易水解的疏水氨基酸残基。这两种蛋白酶的复配使用,不仅能够提高玉米蛋白质的水解度、脱除水解液的苦味,还有利于获得更高比例的小肽。

3 结 语

对重组枯草芽孢杆菌氨肽酶底物特异性的研究表明,该氨肽酶易水解肽链末端带有疏水氨基酸或碱性氨基酸残基的多肽,在提高蛋白质原料的水解度和脱除蛋白水解液苦味方面具有潜力;该氨肽酶与碱性蛋白酶复配水解玉米蛋白质原料,水解度可达 65%,较单酶水解显著提高;氨肽酶与碱性蛋白酶的复配使用,不仅提高了蛋白质原料的水解度,还显著增加了小分子肽的含量,表现出氨肽酶与碱性蛋白酶外切与内切活性互补的协同作用,具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Tavano O L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2013, 90: 1–11.
- [2] Zhou K, Canning C, Sun S. Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2013, 50(1): 331–335.
- [3] 邱芳萍, 王长周, 季晓枫. 林蛙皮胶原蛋白肽酶解工艺数学建模及抗氧化作用的研究[J]. **食品与生物技术学报**, 2013(1): 89–93.
- QIU Fang-ping, WANG Chang-zhou, JI Xiao-feng. Mathematical modeling for the optimum enzymatic hydrolysis of rana skin collagen peptide and its antioxidant research[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013(1): 89–93. (in Chinese)
- [4] He R, Alashi A, Malomo S A, et al. Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates[J]. **Food Chemistry**, 2013, 141(1): 153–159.
- [5] 付莉, 岳喜庆, 宋建新. 酶水解降低牛乳蛋白抗原性的研究[J]. **食品与生物技术学报**, 2013, 32(4): 434–438.
- FU Li, YUE Xi-qing, SONG Jian-xin. Research on the antigenicity reduction of milk protein by enzyme hydrolysis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(4): 434–438. (in Chinese)
- [6] Ahn C B, Je J Y, Cho Y S. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis[J]. **Food Research International**, 2012, 49(1): 92–98.
- [7] Ranamukhaarachchi S, Meissner L, Moresoli C. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by Sequential ultrafiltration and nanofiltration[J]. **Journal of Membrane Science**, 2013, 429: 81–87.
- [8] Zhou K, Sun S, Canning C. Production and functional characterization of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration[J]. **Food Chemistry**, 2012, 135(3): 1192–1197.
- [9] 刘金伟. 酶法制备玉米高 F 值寡肽及其抗疲劳活性的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012.
- [10] Maehashi K, Matsuzaki M, Yamamoto Y, et al. Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties[J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 1999, 63(3): 555–559.
- [11] 王俊, 田亚平. 枯草芽孢杆菌 Zj016 脱苦氨肽酶的发酵控制策略[J]. **生物技术**, 2009, 19(2): 84–88.
- WANG Jun, TIAN Ya-ping. Fermentation control strategy of debittering aminopeptidase from *Bacillus subtilis* Zj016 [J]. **Biotechnology**, 2009, 19(2): 84–88. (in Chinese)
- [12] 周哲敏, 高新星, 崔文璟. 一种高产氨肽酶的重组枯草芽孢杆菌及其构建方法和应用: 中国专利, CN102492645A[P]. 2012–06–13.
- [13] 曹松龙, 田亚平. 枯草芽孢杆菌氨肽酶超滤提取技术[J]. **食品与生物技术学报**, 2013, 32(3): 293–297.
- CAO Song-long, TIAN Ya-ping. Research of the ultrafiltration on the *Bacillus subtilis* aminopeptidase extraction[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(3): 293–297. (in Chinese)
- [14] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food Protein hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1979, 27(1): 256–262.
- [15] 魏亚娟, 田亚平, 须瑛敏. 枯草芽孢杆菌脱苦氨肽酶在水解大豆分离蛋白中的应用研究[J]. **食品工业科技**, 2008, 29(4): 149–151.
- WEI Ya-juan, TIAN Ya-ping, XU Ying-min. Study on hydrolysis of soybean protein isolate by *Bacillus subtilis* aminopeptidase [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, 29(4): 149–151. (in Chinese)
- [16] 吴亚梅, 陈健, 李维锋. 玉米蛋白粉深加工应用的新进展[J]. **现代食品科技**, 2007, 23(4): 97–100.
- WU Ya-mei, CHEN Jian, LI Wei-feng. Recent advances in researches on the application of the deep processing of corn gluten meal[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2007, 23(4): 97–100. (in Chinese)