DOI:10.12441/spyswjs.20230308001 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0043-11

氨肽酶YwaD的异源表达及其在玉米肽脱苦中的应用

戴 林[1,2] 宗 红[1,2] 陆信曜[1,2] 诸葛斌[1,2*]

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡,214122;2. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡,214122)

摘要:【目的】制备一种性能优良的新型氨肽酶,并初步评价其对玉米肽的脱苦能力。**【方法】**选取地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*,*B. licheniformis*)SQ1来源的氨肽酶YwaD在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*,*B. subtilis*)WB600中进行表达,纯化后探究其酶学性质及其对玉米肽的脱苦效果。**【结果】**氨肽酶YwaD均在*B. subtilis* WB600中分泌表达,其相对分子质量约为49 000。氨肽酶YwaD最适反应温度为80 ℃,半衰期为24 h,且在4.0 mol/L的NaCl条件下相对酶活力高于90%,表明该酶具有较强的耐热和耐盐性能;氨肽酶YwaD具有底物特异性,以Leu-*p*NA为底物时,K_m为0.093 mol/L,V_{max}为18.975 μg/(L·min)。与碱性蛋白酶单酶酶解法制备的玉米肽(ZA)相比,氨肽酶YwaD联合碱性蛋白酶分步双酶酶解法制备的玉米肽(ZAAP)的水解度增加了12.14%;苦味氨基酸质量浓度提高了4.85倍,鲜味氨基酸质量浓度提高了4.74倍;相对分子质量小于500的肽段占比增加了21.14%;DPPH自由基清除率增加了34.53%,羟基自由基清除率增加了16.59%;苦味值降低了约80%,鲜味值提高了约27%。**【结论】**氨肽酶YwaD可将苦味肽N端疏水性氨基酸(多为苦味氨基酸)释放出来,显著去除玉米肽的苦味并增强其抗氧化性,该酶在功能性植物肽制备中有良好的应用前景。

关键词:氨肽酶;耐高温;耐高盐;蛋白质水解;脱苦;抗氧化活性

Heterologous Expression of Aminopeptidase YwaD and Its Application in Debittering Zein Peptides

DAI Lin[1,2] *ZONG Hong*[1,2] *LU Xinyao*[1,2] *ZHUGE Bin*[1,2*]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study was to prepare a novel aminopeptidase with excellent properties and evaluate its performance in debittering zein peptides. [**Method**] Aminopeptidase aminopeptidase YwaD derived from *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) SQ1 was expressed in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) WB600, and the enzymatic properties and debittering effect on zein peptides were investigated after purification. [**Result**] Aminopeptidase YwaD was expressed in a secretory form in *B. subtilis* WB600, with the relative molecular mass of about 49 000. Aminopeptidase YwaD showed the optimum reaction temperature of 80 ℃, the half-life of 24 h, and the relative activity higher than 90% in the presence of 4.0 mol/L NaCl, which indicated that aminopeptidase YwaD had strong tolerance to high temperatures and salt. Aminopeptidase YwaD had substrate specificity, with the K_m of 0.093 mol/L and the V_{max} of 18.975 μg/(L·min) in the case of Leu-*p*NA as the substrate. Compared with zein peptides produced by single-enzyme hydrolysis using alkaline protease alone (ZA), the hydrolysis degree of zein peptides produced by aminopeptidase YwaD combined with alkaline protease in two

通信作者:诸葛斌(1969—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物研究。E-mail:bzhuge@126.com

收稿日期:2023-03-08 **修回日期:**2023-04-18

steps (ZAAP) increased by 12.14%, the mass concentration of bitter amino acids by 4.85 times, the mass concentration of umami amino acids by 4.74 times, the proportion of peptides with molecular mass less than 500 by 21.14%, the DPPH free radical scavenging rate by 34.53%, and the hydroxyl radical scavenging rate increased by 16.59%, while decreasing the bitter value by approximately 80% and increasing the umami value by 27%. [**Conclusion**] Aminopeptidase YwaD could release hydrophobic amino acids (mostly bitter amino acids) at the N-terminus of bitter peptides to significantly remove the bitterness and enhance the antioxidant activity of zein peptides, demonstrating a good application prospect in the preparation of functional plant peptides.

Keywords: aminopeptidase; high temperature tolerance; high salt tolerance; protein hydrolysis; debittering; antioxidant activity

氨肽酶是一类重要的外切蛋白酶，专一性催化蛋白质或肽N端氨基酸水解，广泛分布于动物、植物及微生物中[1]。微生物因物种资源丰富、生产周期短、易大规模培养等优势成为新型酶制剂的重要来源[2]。已报道的产氨肽酶的微生物种类较多，但大多数野生菌株都存在产量低的问题，且部分菌株因具有致病性，其所产氨肽酶不能直接用于多肽苦味去除、生物活性肽制备、蛋白质过敏源降解等食品加工过程[3]，需要克隆目的基因在安全宿主中异源表达。Wang等[4]在*B. subtilis* WB600中表达了米曲霉来源的氨肽酶PAP；Yan等[5]在*B. subtilis* WS9中表达了链霉菌来源的氨肽酶ScAPase；Zhao等[6]在*B. subtilis* WB800N中表达了球形芽孢杆菌来源的氨肽酶Amp0279。但目前成功应用于生产中的氨肽酶种类相对匮乏，仅限于亮氨酸氨肽酶，因此发掘更多性能优良的氨肽酶不仅能丰富氨肽酶种类，还能提升其规模化应用价值。

玉米蛋白质营养丰富，含多种人体必需氨基酸，是生物活性肽的潜在来源[7]。目前，玉米肽主要通过酶法水解制备，在玉米蛋白质水解过程中，原本存在于蛋白质内部的疏水性氨基酸随肽键断裂而暴露出来，达到一定阈值后使人感受到苦味[8]。疏水性是影响肽苦味的一个关键因素[9]，当疏水性氨基酸位于肽链非端基位置时，呈现出的苦味最强，位于N端或C端时，呈现出的苦味次之，释放后作为游离氨基酸存在时，呈现出的苦味最弱[10]。外切酶能切割苦味肽末端疏水性氨基酸来降低苦味，目前利用外切酶的酶法脱苦是降低肽类苦味的主要方法[11]。黄伟谦[12]利用结合氨肽酶rSLAP1的双酶法将酪蛋白肽苦味降低了59.62%；宋婷婷等[13]利用结合氨肽酶AAP的双酶法将大豆肽苦味降低了28.72%。

作者旨在制备一种性能优良的新型氨肽酶，研究其酶学性质及其在玉米肽脱苦中的应用，为低苦味功能性植物肽的工业化制备及应用提供理论依据[14]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

B. licheniformis SQ1：作者前期试验筛选得到；pMA5质粒、*E. coli* JM109、*B. subtilis* WB600：作者所在实验室前期保藏；质粒抽提和DNA纯化试剂盒：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；T4连接酶、DNA Marker 2501：日本Takara公司；Protein Marker P0060M：上海碧云天生物技术有限公司；对硝基苯胺衍生物（AA-*p*NA）：南京莱昂生物科技有限公司；玉米蛋白质：上海源叶生物科技有限公司；碱性蛋白酶：北京索莱宝科技有限公司；酵母粉、蛋白胨：美国Oxoid公司；镍柱、脱盐柱：嘉兴千纯生物科技有限公司；其他试剂：分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

LB培养基：NaCl 10.00 g/L、蛋白胨10.00 g/L、酵母粉5.00 g/L；TB培养基：KH_2PO_4 2.30 g/L、K_2HPO_4 12.54 g/L、酵母粉24.00 g/L、蛋白胨12.00 g/L、甘油5.00 g/L。

磷酸盐缓冲液：先配制0.20 mol/L的$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$溶液和0.20 mol/L的$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$溶液，再组合配制并稀释成0.02 mol/L、不同pH的磷酸盐缓冲液。

Tris-HCl缓冲液：先配制0.05 mol/L Tris溶液和0.10 mol/L盐酸溶液，再组合配制并稀释成0.02 mol/L、不同pH的Tris-HCl缓冲液。

甘氨酸-氢氧化钠缓冲液：先分别配制0.20 mol/L的甘氨酸溶液和氢氧化钠溶液，再组合配制并稀释成0.02 mol/L、不同pH的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。

缓冲液A：含0.50 mol/L NaCl的Tris-HCl缓冲液（pH 7.5，0.02 mol/L）；缓冲液B：含0.50 mol/L NaCl和0.60 mol/L咪唑的Tris-HCl缓冲液（pH 7.5，0.02 mol/L）。

1.2　仪器与设备

PCR扩增仪：ALS1296型，美国BIO-RAD公司；核酸电泳仪：DYY-8C型，北京六一仪器厂；pH计：STARTER3100型，美国奥豪斯公司；高速离心机：ALS1296型，美国Thermo Fisher Scientific公司；高速冷冻离心机：H1850R型，湖南湘仪实验室仪器开发公司；蛋白质电泳系统：PowerPac Basic型，美国BIO-RAD公司；高效液相色谱仪：Waters 2695型，美国Waters公司；味觉分析系统：SA402B型，日本INSENT公司；高效液相色谱仪：Agilent 1100型，美国安捷伦科技有限公司；蛋白质纯化系统：AKTA avant 25型，美国通用电器医疗集团。

1.3　方法

1.3.1　重组菌株的构建

以*B. licheniformis* SQ1基因组为模板设计引物，PCR扩增获得氨肽酶Ywad的基因*ywad*（下游带6×His标签并引入载体对应的双酶切位点）。将目的基因和质粒pMA5用*Bam*H I和*MIu* I双酶切，回收目的片段并用T4连接酶连接过夜，构建重组表达载体pMA5-*ywad*，转化至*E. coli* JM109。将其涂布于含50 μg/mL卡那霉素的LB培养基中过夜培养，随机挑选5个转化子，菌落PCR验证后将阳性转化子划线分离，放大培养并提取质粒进行核苷酸测序。核苷酸序列验证无误后，将重组质粒pMA5-*ywad*电击转入*B. subtilis* WB600感受态细胞[15]，得到重组表达菌株*B. subtilis* WB600/pMA5-*ywad*。

1.3.2　氨肽酶YwaD的重组表达与纯化

将重组菌株*B. subtilis* WB600/pMA5-*ywad*在含50 μg/mL卡那霉素的LB平板上进行平板划线培养，挑取单菌落至10 mL含50 μg/mL卡那霉素的LB培养基中扩大培养（37 ℃、200 r/min、12 h），按体积分数1%转接至含50 μg/mL卡那霉素的50 mL TB培养基中进行发酵表达（37 ℃、200 r/min、24 h）。发酵液于8 000 r/min离心10 min，吸取上清液，即得到重组氨肽酶YwaD粗酶液，将其浓缩后用0.22 μm水系微孔滤膜过滤，于4 ℃保存备用。采用AKTA蛋白质纯化系统纯化蛋白质，先用缓冲液A将镍柱平衡5个柱体积，然后上样，再用缓冲液B梯度洗脱杂质并收集目的蛋白质，最后使用脱盐柱除去收集液中的盐离子和咪唑。纯化操作均在4 ℃下进行，纯化效果通过SDS-PAGE验证。

1.3.3　氨肽酶YwaD的酶学性质与序列分析

1）氨肽酶YwaD酶活力的测定：将氨肽酶YwaD加入缓冲液中，50 ℃保温5 min，加入检测底物Leu-*p*NA，反应10 min，加入体积分数40%乙酸终止反应，立即冷却[16]。在pH 8.5、50 ℃的条件下，每分钟水解底物生成1 μg对硝基苯胺消耗的酶量定义为1个酶活力单位，用U表示。

2）最适温度和温度稳定性的测定：将氨肽酶YwaD分别置于20~90 ℃下，测定不同温度（间隔10 ℃）下氨肽酶YwaD的相对酶活力，探究其最适温度，将最高相对酶活力定义为100%。将氨肽酶YwaD在上述各温度下放置1 h，在最适温度下测定氨肽酶YwaD相对酶活力，探究其温度稳定性[17]。

3）最适pH和pH稳定性的测定：将氨肽酶YwaD加入不同pH的缓冲液中，在最适温度下测定不同pH条件下氨肽酶YwaD的相对酶活力，探究其最适pH，将最高相对酶活力定义为100%。将氨肽酶YwaD置于不同pH下放置1 h，在最适pH下测定氨肽酶YwaD相对酶活力，探究其pH稳定性。

4）NaCl对相对酶活力的影响：将未添加NaCl反应体系的相对酶活力定义为100%，在缓冲液中加入NaCl使总反应体系中NaCl浓度为0.5~4.0 mol/L，每间隔0.5 mol/L加入氨肽酶YwaD，在最适反应条件下反应，测定氨肽酶YwaD相对酶活力，探究NaCl对氨肽酶YwaD相对酶活力的影响。

5）金属离子对相对酶活力的影响：将未添加金属离子反应体系（CK）的相对酶活力定义为100%，在缓冲液中加入不同金属离子（Co^{2+}、Mn^{2+}、

Ca^{2+}、Mg^{2+}、Ni^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}），使得总反应体系中金属离子的浓度分别为0.1、1.0 mmol/L，加入氨肽酶YwaD在最适反应条件下反应，测定氨肽酶YwaD相对酶活力，探究金属离子对氨肽酶YwaD相对酶活力的影响[18]。

6）抑制剂对相对酶活力的影响：将未添加抑制剂反应体系的相对酶活力定义为100%，在缓冲液中加入不同抑制剂（EDTA、PMSF、DTT、苯丁抑制素、β-巯基乙醇），使得总反应体系中抑制剂的浓度分别为1、10 mmol/L，加入氨肽酶YwaD在最适反应条件下反应，测定氨肽酶YwaD相对酶活力，探究抑制剂对氨肽酶YwaD相对酶活力的影响。

7）最适底物和动力学分析：以Leu-*p*NA、Glu-*p*NA、Val-*p*NA、Ala-*p*NA、Lys-*p*NA、Phe-*p*NA、Pro-*p*NA为底物，测定氨肽酶YwaD相对酶活力，定义最高相对酶活力为100%，探究其最适底物。向反应体系中加入不同浓度（10~150 mmol/L）的Leu-*p*NA，在最适反应条件下测定氨肽酶YwaD相对酶活力，采用双倒数法作图并计算氨肽酶YwaD对Leu-*p*NA的K_m和V_{max}。

8）氨基酸序列分析：使用PSIPRED在线网站预测氨肽酶的二级结构，通过NCBI数据库BLAST工具比对其氨基酸序列同源性，再利用MEGA 7.0、ESPript 3.0等工具对同家族中同源性较高但不同来源的氨肽酶进行多序列比对分析及着色。

1.3.4 氨肽酶YwaD催化玉米蛋白质水解及相关指标测定

1）玉米蛋白质未酶解物（ZK）的制备：配制50 g/L玉米蛋白质溶液，用恒温磁力搅拌器搅拌均匀后超声处理30 min，90 ℃水浴10 min，然后冷却至室温。8 000 r/min离心10 min，预处理后未经酶解的玉米蛋白质溶液上清液即为ZK。

2）ZA的制备：将装有预处理后的玉米蛋白质溶液的三角瓶置于恒温搅拌器上，调节pH至碱性蛋白酶的最适pH（9.0），调节温度至碱性蛋白酶的最适温度（50 ℃），加入碱性蛋白酶（8 000 U/g），酶解4 h后立即煮沸10 min终止反应，溶液离心后的上清液即为ZA。

3）ZAAP的制备：第一步碱性蛋白酶酶解步骤同前，碱性蛋白酶酶解结束后煮沸10 min终止反应，用冷水冷却至氨肽酶YwaD的最适反应温度（80 ℃），调节pH至氨肽酶YwaD的最适pH（8.5），加入氨肽酶YwaD（8 000 U/g），酶解4 h后立即煮沸10 min终止反应，溶液离心后的上清液即为ZAAP。

4）水解度的测定：采用邻苯二甲醛（OPA）法[19]测定玉米蛋白质酶解液的水解度。

5）游离氨基酸的测定：用高效液相色谱仪检测玉米蛋白质酶解液中的游离氨基酸质量浓度[20]。

6）多肽相对分子质量分布的测定：使用高效液相色谱仪检测玉米蛋白质酶解液中的多肽相对分子质量分布[21]。

7）抗氧化活性的测定：参照文献[22]的方法测定DPPH自由基清除率和羟基自由基清除率。

8）苦味值和鲜味值的测定：以标准液为对照，使用SA402B味觉分析系统[23]对玉米蛋白质酶解液的苦味值进行测定。

2 结果与讨论

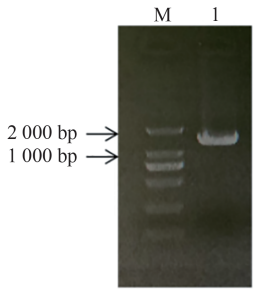
2.1 氨肽酶YwaD的重组表达与纯化

目的基因PCR产物经1 g/dL琼脂糖凝胶电泳验证的结果见图1，约1 400 bp处有清晰的单条带，与预期相符。以pMA5为载体，*B. subtilis* WB600为宿主，构建重组氨肽酶YwaD表达菌株*B. subtilis* WB600/pMA5-*ywad*，重组菌株发酵后，检测到发酵上清液中氨肽酶YwaD酶活力为1 769.16 U/mL，说明氨肽酶YwaD在*B. subtilis* WB600中分泌表达。将发酵上清液浓缩后使用镍柱纯化，用300 mmol/L咪唑洗脱收集目的蛋白质，脱盐后SDS-PAGE验证结果见图2，发现存在单一的蛋白质条带，其相对分子质量约为49 000，与理论相对分子质量相符，说明氨肽酶YwaD纯化成功，并将其用于后续研究。

2.2 氨肽酶YwaD的酶学性质与序列分析

2.2.1 氨肽酶YwaD的最适反应温度和温度稳定性

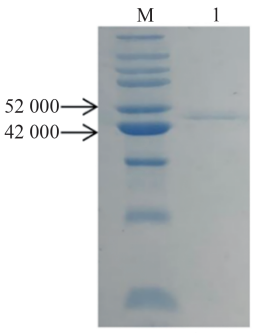
如图3（a）所示，氨肽酶YwaD最适反应温度为80 ℃，当温度为50~80 ℃时，其相对酶活力均



M—DL2000 DNA marker；1—*ywad*基因。

图1　PCR产物琼脂糖凝胶电泳验证

Fig. 1　Verification by agarose gel electrophoresis of the PCR product



M—P0060M；1—氨肽酶YwaD。

图2　氨肽酶YwaD纯化结果的SDS-PAGE验证

Fig. 2　SDS-PAGE verification of the purified results of aminopeptidase YwaD

高于80%。如图3(b)所示，该酶在80 ℃孵育1 h后相对酶活力高于65%，半衰期为24 h。结果表明，氨肽酶YwaD在高温(80 ℃)下的耐受性和稳定性好，且优于目前已报道的氨肽酶，如李进等[24]报道的铜绿假单胞菌来源的耐热氨肽酶最适温度为80 ℃，但在80 ℃孵育2 h便失活。Uliho等[25]报道的枯草芽孢杆菌来源的耐热氨肽酶在80 ℃孵育2 h后，其相对酶活力仅为20%。工业反应过程的温度通常高于50 ℃[26]，高温条件下稳定的氨肽酶YwaD在工业上应用前景较好，如在植物蛋白双酶分步水解中，第一步酶解结束后需高温灭活，再冷却调至第二步外肽酶的反应温度，氨肽酶YwaD的耐高温特性可减少降温过程所需的冷凝水和耗电量，从而节约生产成本，有助于实现经济效益的最大化[27]。

2.2.2　氨肽酶YwaD的最适反应pH和pH稳定性

如图4(a)所示，氨肽酶YwaD的最适反应pH为8.5。如图4(b)所示，氨肽酶YwaD在偏碱性环境(pH 7.5~8.5)中稳定性较好，此特性有利于其与碱性蛋白酶协同水解植物蛋白。

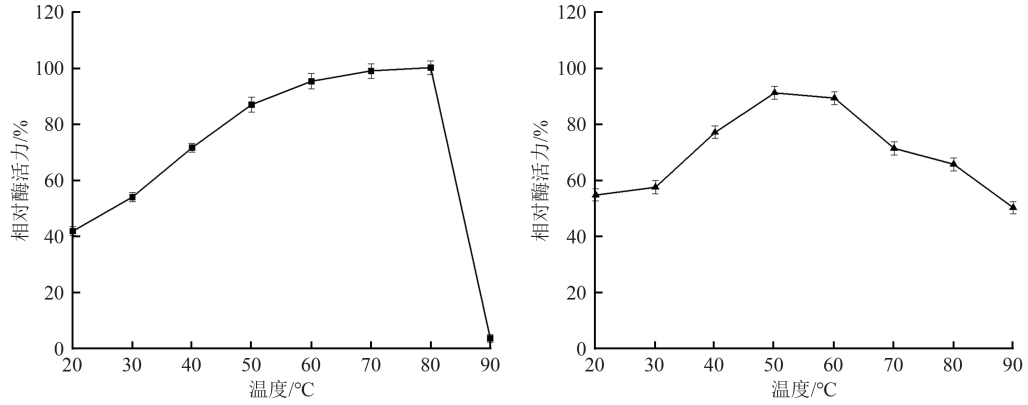
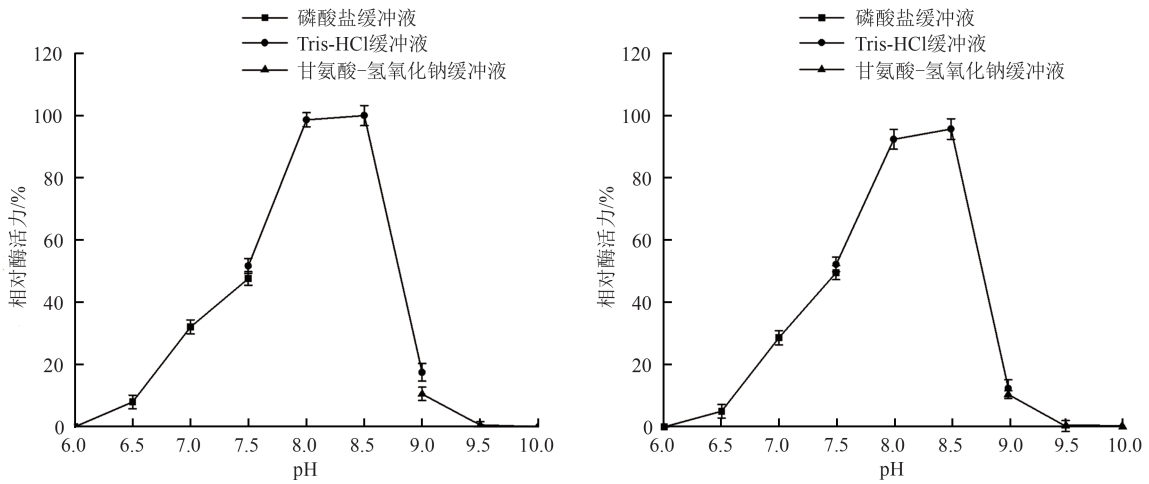


图3　氨肽酶YwaD的最适反应温度及温度稳定性

Fig. 3　Optimum reaction temperature and thermal stability of aminopeptidase YwaD

2.2.3　NaCl浓度对氨肽酶YwaD相对酶活力的影响

如图5所示，氨肽酶YwaD的最适NaCl浓度为1.5 mol/L，相对酶活力为119.97%，当NaCl浓度提升至3.0 mol/L时仍可提高其相对酶活力，NaCl浓度提升至4.0 mol/L时，其相对酶活力大于90%，表明氨肽酶YwaD具有较强的耐盐性能。陈雅惠等[17]发现NaCl浓度提升至1.5 mol/L时就能抑制氨肽酶pepN的酶活力。在高盐食品行业，如酱油的高盐稀态发酵中，高浓度食盐能够抑制杂菌生长、防止酱醅变质，但也会抑制部分蛋白酶的活性，导致蛋白质原料水解不彻底[28]。因此具有强耐盐性能的氨肽酶YwaD可适用于高盐食品行业，在加速进料蛋白质水解的同时有利于提升产品的口感与风味[29]。



(a) 最适反应pH (b) pH稳定性

图 4 氨肽酶 YwaD 的最适反应 pH 及 pH 稳定性

Fig. 4 Optimum reaction pH and pH stability of aminopeptidase YwaD

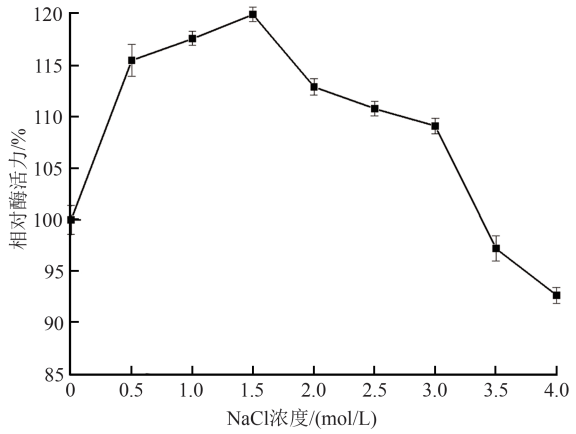


图 5 NaCl 浓度对氨肽酶 YwaD 相对酶活力的影响

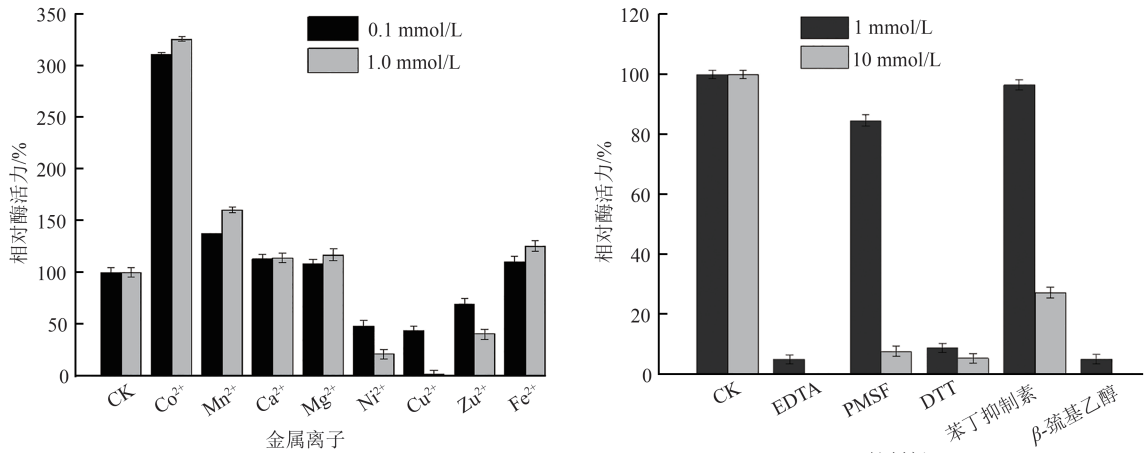
Fig. 5 Effect of NaCl concentration on the relative enzyme activity of aminopeptidase YwaD

2.2.4 金属离子和抑制剂对氨肽酶 YwaD 相对酶活力的影响

如图 6(a)所示，一定浓度的 Co^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}能提高氨肽酶 YwaD 的相对酶活力，而一定浓度的 Ni^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}会抑制其相对酶活力。1.0 mmol/L Co^{2+}对氨肽酶 YwaD 相对酶活力的促进作用最强，相对酶活力提高了 2.3 倍。如图 6(b)所示，10 mmol/L EDTA 和 10 mmol/L β-巯基乙醇能够使氨肽酶 YwaD 完全失活，表明氨肽酶 YwaD 属于金属蛋白酶，其相对酶活力可能对巯基浓度有剂量依赖性。

2.2.5 氨肽酶 YwaD 的底物特异性和动力学分析

如图 7 所示，氨肽酶 YwaD 对底物 Leu-*p*NA 表



(a) 金属离子的影响 (b) 抑制剂的影响

图 6 金属离子和抑制剂对氨肽酶 YwaD 相对酶活力的影响

Fig. 6 Effects of metal ions and inhibitors on the relative enzyme activity of aminopeptidase YwaD

现出最高的相对酶活力，其次为Glu-*p*NA和Ala-*p*NA，其相对酶活力分别为21.67%和14.63%，而对Lys-*p*NA和Val-*p*NA的催化活性较低，均低于5%，对其他底物几乎没有催化活性。表明氨肽酶YwaD属于亮氨酸氨肽酶，其底物谱较广。在最适反应条件下，氨肽酶YwaD催化Leu-*p*NA的K_m为0.093 mol/L，V_{max}为18.975 μg/(L·min)。

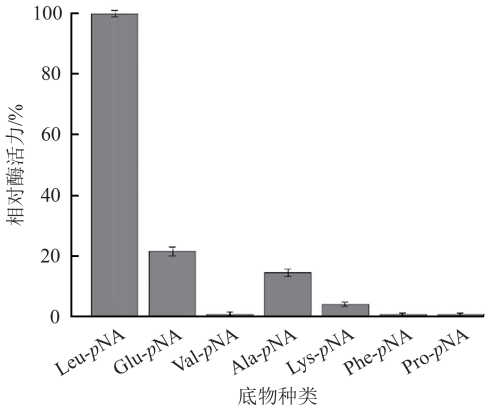


图7　氨肽酶YwaD的底物特异性

Fig. 7　Substrate specificity of YwaD

2.2.6　氨肽酶YwaD的序列分析

如图8所示，*B. licheniformis* SQ1来源的氨肽酶YwaD属于金属蛋白酶M28家族，含499个氨基酸，与同家族中氨肽酶BSAP（来自*B. subtilis*

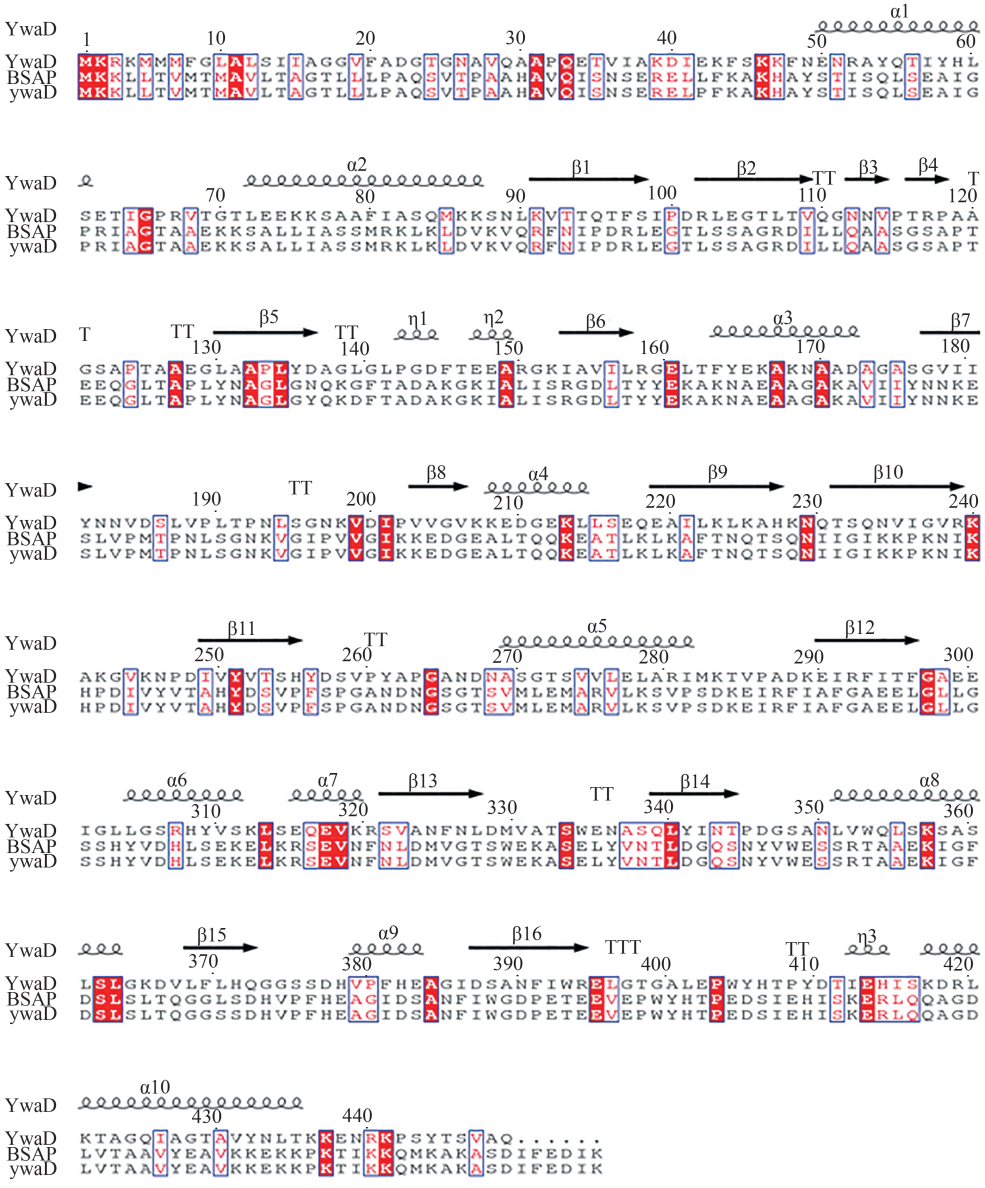


图8　M28家族不同来源氨肽酶的氨基酸序列比对和二级结构预测

Fig. 8　Amino acid sequence alignment and secondary structure prediction of aminopeptidases from different sources in the M28 family

zj016）和氨肽酶 ywaD（来自 *B. subtilis* 168）的氨基酸序列同源性较高，同源性分别为 65.90% 和 65.83%。氨肽酶 YwaD 残基和二级结构见图 8，氨肽酶 YwaD 的氨基酸残基（His255、Asp267、Glu300、Asp328、His406）与氨肽酶 ywaD 和 BSAP 的氨基酸残基（His250、Asp262、Glu295、Asp323、His401）具有一致性，均含 M28 家族催化中心特征保守序列“HDEDH”。二级结构预测结果表明，氨肽酶 YwaD 为单体，含 10 个 α 螺旋和 16 个 β 折叠。

2.3 氨肽酶 YwaD 在玉米肽脱苦中的应用

2.3.1 水解度

如图 9 所示，以玉米蛋白质为底物，ZA 的水解度为 20.37%，ZAAP 的水解度为 32.51%，水解度增加了 12.14%，水解程度更深。

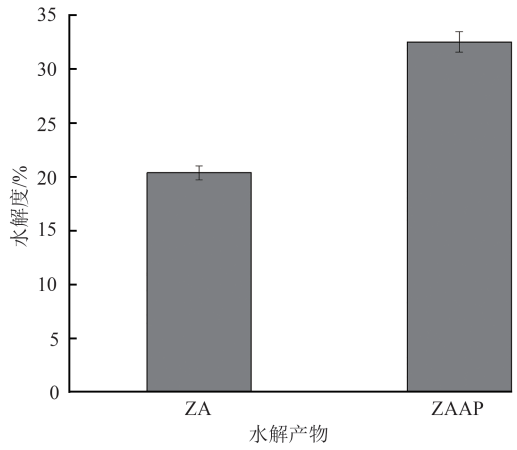


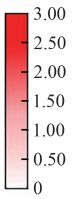
图 9 玉米蛋白质酶解液的水解度

Fig. 9 Hydrolysis degree of zein protease hydrolysate

2.3.2 游离氨基酸质量浓度

如图 10 所示，ZAAP 总游离氨基酸、苦味氨基酸（Ser、His、Arg、Val、Met、Ile、Leu）、鲜味氨基酸（Asp、Glu、Gly、Ala、Tyr、Phe）的质量浓度分别为 15.20、7.78、5.97 mg/mL，是 ZA 的 5.41 倍、5.85 倍、5.74 倍。相较于 ZK，ZAAP 中 Leu、Glu 和 Ala 质量浓度增加较明显（均大于 8 倍），与氨肽酶 YwaD 底物水解偏好性特征相符（见图 7），表明加入氨肽酶 YwaD 再次水解，能促进疏水性氨基酸（多为苦味氨基酸）和鲜味氨基酸释放，通过降低苦味肽的平均疏水性来减弱苦味，同时通过鲜味掩盖苦味，从而改善玉米肽的风味。

氨基酸种类	ZK	ZA	ZAAP
Asp	0.05	0.18	0.56
Glu	0.04	0.29	2.33
Ser	0.01	0.09	0.51
His	0.01	0.16	0.26
Gly	0.01	0.01	0.36
Thr	0.03	0.11	0.30
Arg	0.01	0.11	0.64
Ala	0.01	0.12	1.32
Tyr	0.01	0.22	0.32
Cys	0.02	0.22	0.26
Val	0.03	0.11	0.51
Met	0.03	0.18	0.27
Phe	0.01	0.22	1.08
Ile	0.03	0.11	0.62
Leu	0.02	0.57	4.97
Lys	0.04	0.09	0.77
Pro	0.01	0.02	0.12



图中数据为各游离氨基酸质量浓度，单位为mg/mL。

图 10 玉米蛋白质酶解液游离氨基酸质量浓度热图

Fig. 10 Heat map of free amino acid mass concentration in zein protease hydrolysate

2.3.3 多肽相对分子质量分布

如图 11 所示，与 ZA 相比，ZAAP 中相对分子质量为 500~<1 500 的肽段占比减少了 14.91%，该范围内的肽段具有较强的苦味，表明氨肽酶 YwaD 有降低玉米肽苦味的潜在能力；ZAAP 中相对分子质量在 150~<500 以及相对分子质量<150 的肽段占比分别增加了 10.70% 和 10.44%，可见氨肽酶 YwaD 能促进易被人体吸收利用的小分子物质（游离氨基酸和短肽）的释放，有利于发挥其功能活性。

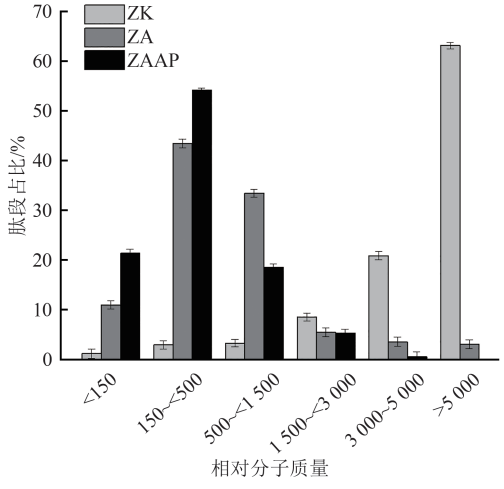


图 11 玉米蛋白质酶解液的肽相对分子质量分布

Fig. 11 Molecular mass distribution of zein protease hydrolysate

2.3.4 抗氧化活性

植物肽能清除诱发人体氧化应激反应的自由

基，具备抗氧化活性，作者选取常用的抗氧化活性评价方法（DPPH自由基清除能力和羟基自由基清除能力）[30]探究玉米肽的抗氧化活性，结果见图12。ZAAP的DPPH自由基清除率和羟基自由基清除率分别为87.61%、92.11%，比ZA分别增加了34.53%、16.59%，表明氨肽酶YwaD可提升酶解产物的抗氧化能力。相对分子质量较小的肽段通常对自由基清除能力更强，与ZA相比，ZAAP中相对分子质量<500的肽段占比增加了21.14%（见图11），因此ZAAP对自由基清除能力增强[31]，抗氧化能力更强。

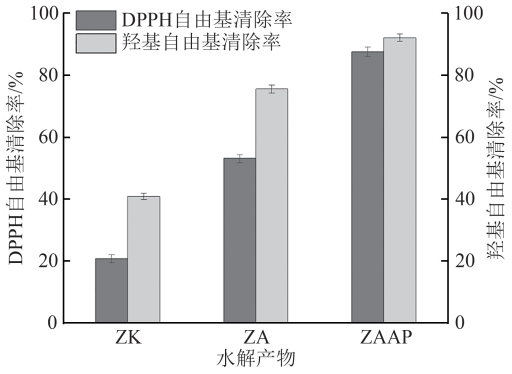


图12　玉米蛋白质酶解液的抗氧化活性

Fig. 12　Antioxidant activity of zein protease hydrolysate

2.3.5　苦味值和鲜味值

大多数外切蛋白酶单独酶解制备的植物肽具有苦味，而利用氨肽酶再次酶解能降低苦味，使风味发生变化[32]。作者利用电子舌技术来分析多肽的苦味和鲜味，探究氨肽酶YwaD二次酶解对玉米肽苦味值和鲜味值的影响。如图13所示，相较于ZA，ZAAP的苦味值由12.04降低至2.36，降低了约80%；鲜味值由12.87增加至16.35，提高了约27%。ZAAP风味变化明显，苦味降低，鲜味提升，表明氨肽酶YwaD具有较好的抑苦增鲜作用，在植物蛋白水解物脱苦中具有较大的应用潜力。

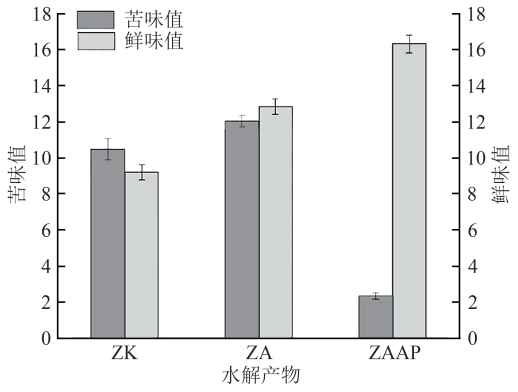


图13　玉米蛋白质酶解液的味觉分析

Fig. 13　Gustatory analysis of zein protease hydrolysate

3　结论

作者实现了氨肽酶YwaD的分泌表达（胞外酶活力为1 769.16 U/mL），并对其酶学性质及其在玉米肽制备中的脱苦效果进行了研究。结果表明，氨肽酶YwaD耐高温且热稳定性好，其最适反应温度为80 ℃，半衰期为24 h，该特性有利于其在功能性植物肽工业生产中的应用，可压缩降温过程的生产成本，有助于实现工厂经济效益最大化；氨肽酶YwaD耐高盐且活性高，在4.0 mol/L NaCl下其相对酶活力仍大于90%，可规避大多数氨肽酶因高盐耐受性差导致的蛋白质水解不彻底、风味不佳的问题，提升高盐腌制食品的品质；氨肽酶YwaD为金属蛋白酶，Co^{2+}对其活性的促进作用最强；氨肽酶YwaD具有底物特异性，偏好性水解Leu-*p*NA、Glu-*p*NA和Ala-*p*NA。与ZA相比，ZAAP水解度增加了12.14%；苦味氨基酸和鲜味氨基酸质量浓度分别增加了4.85倍和4.74倍；相对分子质量小于500的肽段占比增加了21.14%；DPPH自由基清除率和羟基自由基清除率分别增加了34.53%和16.59%；苦味值降低了约80%，鲜味值提高了约27%。这些结果表明，氨肽酶YwaD与碱性蛋白酶联合水解玉米蛋白质，促进了活性短肽和游离氨基酸的释放，一些氨基酸和小分子肽类物质又将作为底物参与各类酶促反应，产生具有强烈鲜味的风味产物，有利于风味的提升，同时疏水性氨基酸（多为苦味氨基酸）释放也显著降低了玉米肽的苦味。因此，氨肽酶YwaD在低苦味功能性植物肽的制备中具有较好的应用潜力。

参考文献

[1] RAHULAN R，DHAR K S，NAMPOOTHIRI K M，et al. Aminopeptidase from *Streptomyces gedanensis* as a useful tool for protein hydrolysate preparations with improved functional properties[J]. Journal of Food Science，2012，

77(7):791-797.

[2] 雷芬芬. 海洋来源 *Bacillus licheniformis* SWJS33 所产氨肽酶的研究及应用[D]. 广州:华南理工大学,2017.

[3] 李冬琪. 皖北豆酱中氨肽酶产生菌的分离鉴定及其发酵效果研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2022.

[4] WANG K D, WANG K H, ZHOU N D, et al. Secretory expression, purification, characterization, and application of an *Aspergillus oryzae* prolyl aminopeptidase in *Bacillus subtilis*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017,181(4):1611-1623.

[5] YAN Z F, YUAN S, QIN Q, et al. Enhancement of rice protein hydrolysate quality using a novel dual enzyme system[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 158:113110.

[6] ZHAO P Y, ZHANG M, WAN X F, et al. Characterization and heterologous expression of a novel Co^{2+}-dependent leucyl aminopeptidase Amp0279 originating from *Lysinibacillus sphaericus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022,106(3):1139-1149.

[7] 梁秋芳. 玉米多肽制备技术及其抗氧化和抗炎活性的研究[D]. 镇江:江苏大学,2018.

[8] 郭兴峰,魏芳,周祥山,等. 苦味肽的形成机理及脱苦技术研究进展[J]. 食品研究与开发,2017,38(21):207-211.
GUO X F, WEI F, ZHOU X S, et al. Review on the formation mechanism and debittering technology of bitter peptide[J]. Food Research and Development, 2017, 38(21): 207-211.(in Chinese)

[9] 石慧. 羧肽酶在大豆蛋白水解中的脱苦作用[J]. 食品安全导刊,2020(18):183-184.
SHI H. The debittering effect of carboxypeptidase in the hydrolysis of soy protein[J]. China Food Safety Magazine, 2020(18):183-184.(in Chinese)

[10] 佟海涛,齐海萍. 乳清多肽饮料的开发[J]. 饮料工业,2005,8(4):18-21.
TONG H T, QI H P. Development of whey poly-peptides drink[J]. Beverage Industry, 2005, 8(4): 18-21.(in Chinese)

[11] 孟雅潇,吕加平,周俊清. 乳蛋白肽微生物脱苦的研究概述[J]. 中国乳品工业,2008,36(3):38-41.
MENG Y X, LV J P, ZHOU J Q. Review on the microbial debittering of milk protein peptide[J]. China Dairy Industry, 2008, 36(3):38-41.(in Chinese)

[12] 黄伟谦. 酱油曲霉亮氨酸氨肽酶 sLAP1 在毕赤酵母中表达及其酶学性质研究[D]. 广州:华南理工大学,2014.

[13] 宋婷婷,吴珍珍,宗红,等. 米曲霉 AAP 新基因的异源表达及其酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业,2019,45(5):38-44.
SONG T T, WU Z Z, ZONG H, et al. Heterologous expression of a novel AAP gene from *Aspergillus oryzae* and characterization of the enzyme[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(5): 38-44.(in Chinese)

[14] 李双,魏思雯,吴凤凤. 植物活性肽的研究进展[J]. 食品科技,2022,47(11):85-92.
LI S, WEI S W, WU F F. Research progress of plant active peptides[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(11):85-92.(in Chinese)

[15] 汪克红. 枯草芽孢杆菌脯氨酸氨肽酶高效表达与特性表征[D]. 无锡:江南大学,2016.

[16] 马纳纳. 基于 RNA-Seq 的雅致放射毛霉 AS3.2778 氨肽酶研究[D]. 广州:华南理工大学,2015.

[17] 陈雅惠,柳志永,张荣珍,等. 地衣芽孢杆菌 E7 氨肽酶的异源表达及其在高效蛋白水解中的应用[J]. 微生物学报,2022,62(8):3079-3091.
CHEN Y H, LIU Z Y, ZHANG R Z, et al. Heterologous expression of *Bacillus licheniformis* E7 aminopeptidase and its application for efficient proteolysis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(8): 3079-3091.(in Chinese)

[18] LIU F, YASUDA M. Debittering effect of *Monascus* carboxypeptidase during the hydrolysis of soybean protein [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2005,32(10):487-489.

[19] 马伟. 玉米低聚肽的制备、分离及其生物活性研究[D]. 无锡:江南大学,2015.

[20] QIN Q, TANG C Y, WU J, et al. A dual-functional aminopeptidase from *Streptomyces canus* T20 and its application in the preparation of small rice peptides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167:214-222.

[21] WU H Y, CHEN S W, JI M H, et al. Activation of colanic acid biosynthesis linked to heterologous expression of the polyhydroxybutyrate pathway in *Escherichia coli* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019,128:752-760.

[22] WANG Z X, LIU X Y, XIE H K, et al. Antioxidant activity and functional properties of alcalase-hydrolyzed scallop protein hydrolysate and its role in the inhibition of cytotoxicity *in vitro*[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128566.

[23] 丁沈利,毛炳杰,陆信曜,等. 利用一种新型羧肽酶 M32 制备低苦味豌豆低聚肽[J]. 食品与发酵工业,2023,

49(1):154-159.
DING S L,MAO B J,LU X Y,et al. Preparation of low bitterness pea oligopeptide by a new carboxypeptidase M32 [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(1):154-159.(in Chinese)

[24] 李进,李青云,刘幽燕,等. 铜绿假单胞菌耐热亮氨酸氨肽酶基因在大肠杆菌中的克隆、表达及表达产物的酶学特性鉴定[J]. 基因组学与应用生物学,2022,41(Suppl.1):1903-1913.
LI J,LI Q Y,LIU Y Y,et al. Cloning, expression of thermostable leucine aminopeptidase gene of *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* and identification of enzymatic properties of expressed products [J]. Genomics and Applied Biology,2022,41(Suppl.1):1903-1913.(in Chinese)

[25] ULIHO Alphonse,杨套伟,苑曼曼,等. 通过改造底物结合区氨基酸疏水性提高氨肽酶热稳定性[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(3):9-15.
ULIHO A,YANG T W,YUAN M M,et al. Enhancing thermostability of aminopeptidase by improving the hydrophobic interactions in the substrate binding region [J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2020,39(3):9-15.(in Chinese)

[26] 秦琴. *Streptomyces canus*氨肽酶的表达、酶学性质及其在大米肽制备中的应用[D]. 无锡:江南大学,2021.

[27] 黄浩,周楠迪,田亚平. 耐热赖氨酸氨肽酶的原核表达及特性表征[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(12):110-115.
HUANG H, ZHOU N D, TIAN Y P. Prokaryotic expression and characterization of a thermo-stable lysine aminopeptidase [J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2019,38(12):110-115.(in Chinese)

[28] 周婉婷,侯宏伟,贺瑞琦,等. 豆豉中产蛋白酶菌株的酶学性质及风味酶基因挖掘[J]. 食品与发酵工业,2022,48(24):181-193.
ZHOU W T, HOU H W, HE R Q, et al. Enzymatic properties of protease-producing strains in Douchi and mining of flavor enzyme genes[J]. Food and Fermentation Industries,2022,48(24):181-193.(in Chinese)

[29] 刘艳凤. 米曲霉盐胁迫机制解析和耐盐蛋白酶分离纯化、酶学性质研究[D]. 无锡:江南大学,2018.

[30] 曾文俊,吕彩梦,丁建宝,等. 体外抗氧化活性评价方法的反应机理研究进展[J]. 化学与生物工程,2022,39(12):13-19.
ZENG W J,LV C M,DING J B,et al. Research progress in reaction mechanism of evaluation method for antioxidant activity *in vitro* [J]. Chemistry & Bioengineering,2022,39(12):13-19.(in Chinese)

[31] 刘辉,童星. 大豆水解蛋白中抗氧化肽的研究进展[J]. 中国调味品,2021,46(1):191-195.
LIU H, TONG X. Research progress of antioxidant peptides in hydrolyzed soybean protein [J]. China Condiment,2021,46(1):191-195.(in Chinese)

[32] 林颖,孔峰,田亚平. 重组氨肽酶底物特异性及协同水解玉米蛋白质[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(12):1274-1280.
LIN Y, KONG F, TIAN Y P. 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)

（责任编辑:闫林红）