

## 米曲霉蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究

马俊阳<sup>1</sup> 诸葛斌<sup>1\*</sup> 方慧英<sup>1</sup> 宗红<sup>1</sup> 孙进<sup>2</sup> 龚星慧<sup>2</sup> 诸葛健<sup>1</sup> 楼笑笑<sup>2</sup> 冯倩<sup>2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 工业微生物研究中心 江苏 无锡 214122)

(2. 浙江正味食品有限公司 浙江省调味食品制造工程技术研究中心 浙江 义乌 322000)

**摘要:**【目的】获得米曲霉蛋白酶主要成分及其酶学性质。【方法】利用硫酸铵盐析, DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析、Phenyl-Sepharose HP 疏水层析和 Superdex-G75/200 凝胶层析对米曲霉所产蛋白酶系进行分离纯化, SDS-PAGE 检测蛋白酶纯度和分子量, 采用高效液相色谱分析两种蛋白酶酶解产物。【结果】从米曲霉所产蛋白酶系中分离纯化获得两种蛋白酶组分 P1 和 P2, 分子质量分别约为 37 kD 和 45 kD。以酪蛋白为底物时, P1 的  $K_m=8.36$  g/L,  $V_m=12.95$   $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ , 最适反应条件为 pH 8.0、45 °C; P2 的  $K_m=4.11$  g/L,  $V_m=4.86$   $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ , 最适反应条件为 pH 7.0、45 °C。两种蛋白酶均对酪蛋白水解活性最高, 而对牛血清蛋白的水解活性很低。P1 和 P2 分别酶解大豆分离蛋白后水解产物中肽分子质量分布呈现出一定的差异。【结论】两种蛋白酶的酶学性质存在差异; 两者对疏水氨基酸构成的肽键具有选择性, 但其作用基团存在特异性。这些研究结果将为米曲霉所产蛋白酶在食品上的应用提供 指导。

**关键词:** 米曲霉, 蛋白酶, 分离纯化, 酶学性质

## Purification and characterization of proteases from *Aspergillus oryzae*

MA Jun-Yang<sup>1</sup> ZHUGE Bin<sup>1\*</sup> FANG Hui-Ying<sup>1</sup> ZONG Hong<sup>1</sup> SUN Jin<sup>2</sup>  
GONG Xing-Hui<sup>2</sup> ZHUGE Jian<sup>1</sup> LOU Xiao-Xiao<sup>2</sup> FENG Qian<sup>2</sup>

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and the Research Centre of Industrial Microbiology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Zhejiang Zhengwei Food Co. Ltd., Research Center of Seasoning Food Processing of Zhejiang, Yiwu, Zhejiang 322000, China)

**Abstract:** [Objective] This study aimed to purify and characterize proteases from *Aspergillus oryzae*. [Methods] Ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose FF anion exchange chromatography, Phenyl-Sepharose HP hydrophobic chromatography and Superdex-G75/200 gel filtration chromatography were used to purify the proteases from *A. oryzae*. The molecular weight and purity were determined by SDS-PAGE, and the enzymatic hydrolyzates of soy protein isolated were assayed by HPLC. [Results] Two proteases (P1 and P2) were obtained from *Aspergillus oryzae* and their molecular weights were approximately 37 kD and 45 kD, respectively. Using casein as a substrate, the optimum conditions of P1 and P2 were pH 8.0, 45 °C and pH 7.0, 45 °C, respectively. The  $K_m$  of P1

基金项目: 浙江省重大科技专项计划项目(No. 2012C12004-3)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918150; 信箱: bzhuge@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-01-27; 接受日期: 2013-04-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

and P2 were 8.36 g/L and 4.11 g/L, respectively. Moreover, the  $V_m$  of P1 and P2 were 12.95  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$  and 4.86  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ , respectively. Both P1 and P2 had the highest hydrolytic activity to casein while lowest activity to BSA (Bull Serum Albumin). Meanwhile, the molecular weight of peptides in soy protein isolated hydrolyzates had different distributions. **[Conclusion]** Purified P1 and P2 have some differences in enzymatic properties. And they both have strong cutting capacity towards the hydrophobic peptide bond, but there are also differences in the specificity of bond groups. These results have a great significance for the application of proteases from *Aspergillus oryzae* in the food industry.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*, Protease, Purification, Enzymatic properties

蛋白酶是可以水解蛋白中的肽键并生成氨基酸或小肽的一类酶,是世界三大酶制剂之一,占全球酶制剂销量的 60%,其主要来源于动物、植物和微生物,一般情况下不含有毒有害物质,而且水解反应完全后自身可以被灭活,因此在食品工业中有着广泛的应用。

蛋白酶水解蛋白质具有效率高、条件温和、能提高蛋白质的营养价值等多项优点。不同的蛋白酶有不同的酶切方式,对氨基酸残基形成的肽键有其酶解专一性,因此当不同的蛋白酶作用于同一底物时,会产生不同的氨基酸或小肽水解物,使蛋白水解物具有不同的口味和功能特性。米曲霉是公认的食品安全菌株,具有很强的蛋白酶合成能力,其蛋白酶在较广的 pH 范围内均具有活性,另外由于米曲霉含有丰富的糖苷水解酶,可以利用淀粉或纤维素等廉价原料高效生产蛋白酶,所以米曲霉是食品用蛋白酶的主要来源菌株。多年来对米曲霉蛋白酶的研究,主要集中在发酵过程中蛋白酶活力测定,诱变菌株提高活力等方面<sup>[1-4]</sup>。另外,张贺迎等<sup>[5]</sup>用活性电泳方法分析发现米曲霉能分泌多种蛋白酶,曾小波等<sup>[6]</sup>用硫酸铵沉淀、凝胶柱层析方法初步分离出一种内肽酶和一种外肽酶,除此很少有关于米曲霉各蛋白酶组分酶解特性的深入研究,影响了对米曲霉蛋白酶的充分利用。

本文对一株米曲霉所产蛋白酶系进行了分离纯化,并对获得的蛋白酶组分进行酶学性质及酶解特性研究,为米曲霉所产蛋白酶在食品上的应用提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**米曲霉(*Aspergillus oryzae*),本研究中心筛选和保藏。

**1.1.2 原料:**麸皮、马铃薯为市售;大豆分离蛋白购自哈尔滨高科大豆食品有限公司;酪蛋白、牛血清蛋白购自国药集团化学试剂有限公司。

**1.1.3 培养基及培养条件:**种子斜面培养基(g/L):马铃薯 200,蔗糖 20,琼脂 20;种子培养条件:30 °C 静置培养 5 d。发酵固体培养基:麸皮与水按 1:1 (体积比)比例搅拌均匀;发酵培养条件:接 3 环斜面菌种于发酵培养基中,充分摇匀,30 °C 培养 36 h,24 h 时扣瓶。

**1.1.4 主要试剂和仪器:**DEAE-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose HP、Sephadex-G75/200 预装柱,购自 Pharmacia 公司;低相对分子质量蛋白质 Marker,购自 TaKaRa 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、十二烷基硫酸钠(SDS)、考马斯亮蓝 R250/G250、TEMED,购自 Sigma 公司;其它试剂均为分析纯或生化试剂。

AKTA 蛋白纯化, Purifer 系统。

### 1.2 方法

**1.2.1 蛋白酶酶活测定:**采用 Folin-酚法<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 蛋白浓度测定:**采用 Brad-Ford 法<sup>[8]</sup>。

**1.2.3 粗酶液的提取:**将发酵好的培养物按照质量体积比 1:3 加入生理盐水,37 °C 摇床振荡 1 h,过滤,滤液即为粗酶液。

**1.2.4 硫酸铵盐析:**取一定体积粗酶液,加入硫酸

铵粉末至 40%饱和度, 4 °C 静置 5 h 后, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液补加硫酸铵至 80%饱和度, 4 °C 静置过夜, 8 000 r/min 离心 10 min 后, 沉淀用 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液溶解。

**1.2.5 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析:** 透析脱盐后的沉淀蛋白, 加样于用 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液平衡的 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱, 用平衡液充分衡洗, 将未挂上柱的蛋白充分洗脱下来(衡洗阶段)后, 用 0.5 mol/L NaCl 溶液以 2.0 mL/min 的流速进行线性梯度(0–30%)洗脱(洗脱阶段), 收集浓缩衡洗阶段和洗脱阶段的酶活组分。

**1.2.6 Phenyl-Sepharose HP 疏水层析:** 将 1.2.5 中的浓缩酶液与 3 mol/L 硫酸铵溶液等体积混和后加样于用 1.5 mol/L 硫酸铵溶液平衡好的 Phenyl-Sepharose HP 疏水柱。用 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液进行线性梯度(0–100%)洗脱, 流速 2.0 mL/min。收集浓缩酶液, 并进行脱盐处理。

**1.2.7 Superdex-G75/200 凝胶层析:** 用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液平衡凝胶柱, 将 1.2.6 中的浓缩酶液加样于凝胶柱, 平衡液洗脱, 流速 0.5 mL/min。收集酶活峰, 即为纯酶液。

**1.2.8 纯度、相对分子质量测定及酶谱检测:** 纯度和相对分子质量测定采用 SDS-PAGE 法<sup>[9]</sup>。酶谱检测按 SDS-PAGE 稍加改进<sup>[10]</sup>, 样品与上样缓冲液混合后不经煮沸处理, 低温电泳后, 脱色摇床上用 2.5% Triton X-100 振荡 30 min 以脱去 SDS, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)洗胶 3 次后, 置于 1%酪蛋白溶液(pH 7.2 磷酸缓冲液配制)中 50 °C 水解 60 min, 染色及脱色。

**1.2.9 酶学性质:** (1) 最适作用 pH 及 pH 稳定性: 分别在不同的 pH 缓冲体系下测定蛋白酶活性, pH 3.0–5.0 (乙酸钠缓冲液)、pH 6.0–7.0 (磷酸盐缓冲液)、pH 8.0–9.0 (Tris 缓冲液)、pH 10–11 (Glycine-NaOH), 确定最适 pH。用不同的缓冲液分别调节酶液的 pH 到 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、

9.0 和 10.0, 于室温放置 60 min, 然后分别在最适 pH 下测酶活, 计算相对酶活。

(2) 最适作用温度及温度稳定性: 分别在不同的温度(30–70 °C)下测定蛋白酶的活性, 确定最适温度。最适 pH 条件下, 将酶液分别于不同温度(40、50、60 °C)保温 30、60、90、120 min, 测定保温后酶活, 计算相对酶活。

(3) 米氏常数测定: 配制不同浓度的酪蛋白溶液(0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、16.0、20.0 g/L), 在最适作用条件下, 以不同浓度酪蛋白溶液为底物测定蛋白酶活性, 采用双倒数作图确定  $V_m$  和  $K_m$ 。

(4) 底物选择性: 分别以酪蛋白(Casein)、大豆分离蛋白(SPI)和牛血清蛋白(BSA)为底物测定 P1 和 P2 的水解活性, 分别设定两种酶对 Casein 的水解活性为 100%, 计算其他底物的相对酶活。

(5) 酶解反应: pH 7.2 磷酸缓冲液配制 5% SPI, 85 °C 热处理 15 min 后, 按酶与底物 700 U/g 加入一定量酶液, 置于 45 °C 反应 5 h, 反应后沸水浴灭活酶 15 min。

(6) 酶解产物分子量分布测定: 高效液相色谱分析。色谱柱: TSKgel 2000 SWXL (300×7.8 mm), 流动相乙腈:水:三氟乙酸=45:55:0.1 (体积比), 紫外检测波长 220 nm, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10  $\mu$ L。

## 2 结果与分析

### 2.1 米曲霉蛋白酶组分的分离纯化

**2.1.1 硫酸铵盐析:** 米曲霉蛋白酶在硫酸铵饱和度为 40%时开始析出, 沉淀蛋白量和蛋白酶酶活力随硫酸铵饱和度的增加而增加, 当饱和度为 80%时沉淀酶活力接近最高值。因此, 采用 40%饱和度除去少量杂蛋白, 80%饱和度用于沉淀蛋白酶。

**2.1.2 色谱分离:** 利用 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析对硫酸铵盐析脱盐后的样品进行纯化, 洗脱结果如图 1 所示, 将各收集峰进行酶谱分析(图 2), 结果表明分离得到两种活性组分, 其中一种酶活较高的蛋白酶在衡洗阶段被洗脱, 另一种则在电

导为 9.04–13.10 mS/cm 阶段被洗脱。由于粗酶液中某蛋白酶活性强,使得水解酪蛋白区域重叠,造成两个条带间有拖尾现象<sup>[5]</sup>。

采用 Superdex-G200 凝胶层析对 DEAE-Sepharose FF 衡洗阶段的活性组分进行进一步纯化(图 3A),活性峰与目的蛋白峰相吻合(命名为 P1);采用 Phenyl-Sepharose HP 疏水层析和 Superdex-G75 凝胶层析对 DEAE-Sepharose FF 洗脱阶段的活性组分进行进一步纯化,Superdex-G75 层析洗脱图谱如图 3B 所示,目的蛋白峰与杂质蛋白峰分开,且与活性峰对应(命名为 P2)。

P1 和 P2 的纯化效果如表 1 和表 2 所示,P1 经纯化后最终比活力达到 2 469.03 U/mg,纯化倍数为 6.33,回收率为 10.61%;P2 经纯化后最终比活力达到 1 427.96 U/mg,纯化倍数为 3.67,回收率为 1.06%。

## 2.2 两种米曲霉蛋白酶的分子量及酶谱分析

将纯化后的 P1、P2 进行 SDS-PAGE 和酶谱分析(图 4),P1、P2 在 SDS-PAGE 图中均显示一条带,说明两种蛋白酶均已达到电泳纯且都只由一条肽链构成,分子量大小分别约为 37 kD 和 45 kD。对照酶谱分析图和 SDS-PAGE 图,两种电泳方法得到的蛋白条带位置不完全一致,可能是由于酶谱检测前未对样品进行变性处理,蛋白质与 SDS 未能充分结合,导致蛋白质所带电荷偏低,使得其迁移速率低于 SDS-PAGE 中,此外两种电泳中蛋白质形状的差异,也会导致迁移速率不同<sup>[11]</sup>。

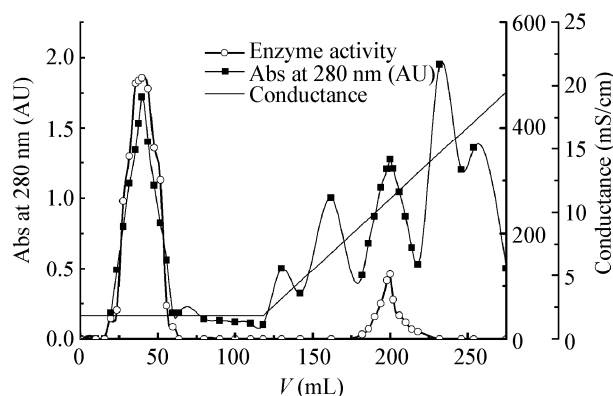


图 1 米曲霉蛋白酶 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析洗脱曲线

Figure 1 Elution profile of *Aspergillus oryzae* protease on DEAE-Sepharose FF

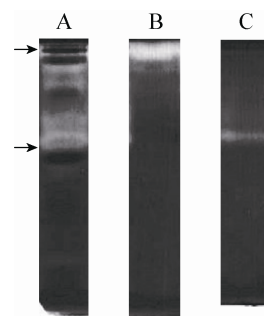


图 2 酶谱检测图谱

Figure 2 Zymography analysis

注: A: 粗酶液; B: 衡洗阶段的酶活组分; C: 洗脱阶段的酶活组分。

Note: A: Crude extracts; B: Protease in equilibrium stage; C: Protease in elution stage.

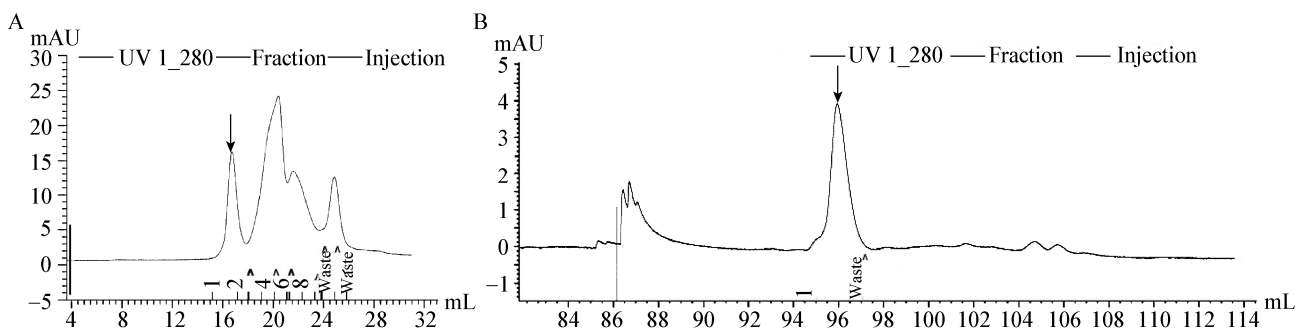


图 3 Superdex-G75/200 凝胶层析曲线

Figure 3 Elution profile of Superdex-G75/200 FC

注: A: P1 的 Superdex-G200 凝胶层析曲线; B: P2 的 Superdex-G75 凝胶层析曲线。

Note: A: Elution profile of P1 on Superdex-G200 FC; B: Elution profile of P2 on Superdex-G75 FC.

表 1 P1 的纯化结果 Table 1 Purification table of P1					
纯化步骤 Purification step	总蛋白 Protein (mg)	总活力 Proteolytic activity (U)	回收率 Recovery (%)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Fold
Crude extracts	83.54	32 567.00	100.00	389.84	1.00
Salting out	74.29	29 227.73	89.75	393.43	1.02
DEAE-Sepharose	4.69	9 057.62	27.82	1 931.10	4.96
Superdex-G200	1.40	3 456.64	10.61	2 469.03	6.33

表 2 P2 的纯化结果 Table 2 Purification table of P2					
纯化步骤 Purification step	总蛋白 Protein (mg)	总活力 Proteolytic activity (U)	回收率 Recovery (%)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Fold
Crude extracts	83.54	32 567.00	100.00	389.84	1.00
Salting out	74.29	29 227.73	89.75	393.43	1.02
DEAE-Sepharose	4.57	4 210.36	12.93	921.87	2.36
Phenyl-Sepharose	1.18	1 194.62	3.67	1 012.39	2.61
Superdex-G75	0.24	342.71	1.06	1 427.96	3.67

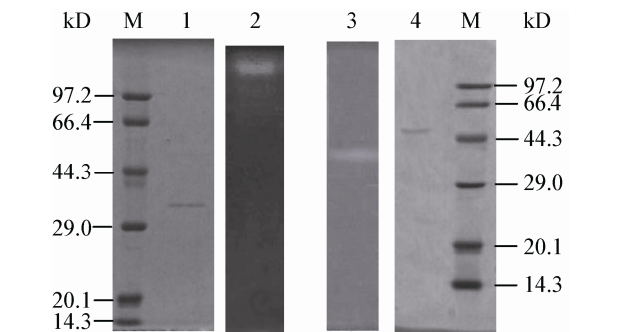


图 4 P1 和 P2 的 SDS-PAGE 和酶谱分析图谱  
Figure 4 SDS-PAGE and zymography analysis of the purified P1 and P2  
注：M：标准蛋白；1：P1 的 SDS-PAGE 图谱；2：P1 的酶谱分析图谱；3：P2 的酶谱分析图谱；4：P2 的 SDS-PAGE 图谱。  
Note: M: Markers; 1: SDS-PAGE of P1; 2: Zymography analysis of P1; 3: Zymography analysis of P2; 4: SDS-PAGE of P2.

2.3 两种米曲霉蛋白酶的 pH 及温度特性

考察了 pH、温度对 P1 和 P2 活性、稳定性的影响，P1 的最适作用条件为 pH 8.0、45℃；P2 的最适作用条件为 pH 7.0、45℃。在 pH 5–10 范围内，P1 稳定性良好，室温放置 60 min 相对酶活均在 85%以上；在 pH 5.0–8.0 范围内，P2 稳定性良好，室温放置 60 min 相对酶活均保持在 85%以上。

P1 和 P2 在 40℃ 放置 120 min 相对酶活均在 95%以上，说明在低于 40℃ 条件下有较好的稳定性；50℃ 放置 120 min，P1 和 P2 会缓慢失活，其相对酶活分别为 63%和 47%；60℃ 放置 30 min，P1 和 P2 活性几乎完全丧失。

2.4 两种米曲霉蛋白酶的米氏常数测定

以酪蛋白为底物，分别在不同底物浓度下测定两种蛋白酶的活性。以底物浓度和产物(酪氨酸)生成量作图，以 1/S 为横坐标，1/V 为纵坐标，得到两种蛋白酶的双倒数曲线如图 5 所示，经米氏方程计算，得到 P1 的表观米氏常数  $K_m=8.36\text{ g/L}$ ， $V_m=12.95\text{ }\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ ；P2 的表观米氏常数  $K_m=4.11\text{ g/L}$ ， $V_m=4.86\text{ }\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。

2.5 两种米曲霉蛋白酶的底物选择性

以不同的蛋白为底物，考察了两种蛋白酶对不同底物的水解活性(表 3)。两种蛋白酶对不同底物的作用效果有很大差异，在所选用的 3 种底物蛋白中，两种蛋白酶对 Casein 的水解活性最高，其次为 SPI，最差的是 BSA。

这可能与底物特性和蛋白酶的肽键选择性有密切联系，Casein 是典型的疏水性蛋白，含有较高

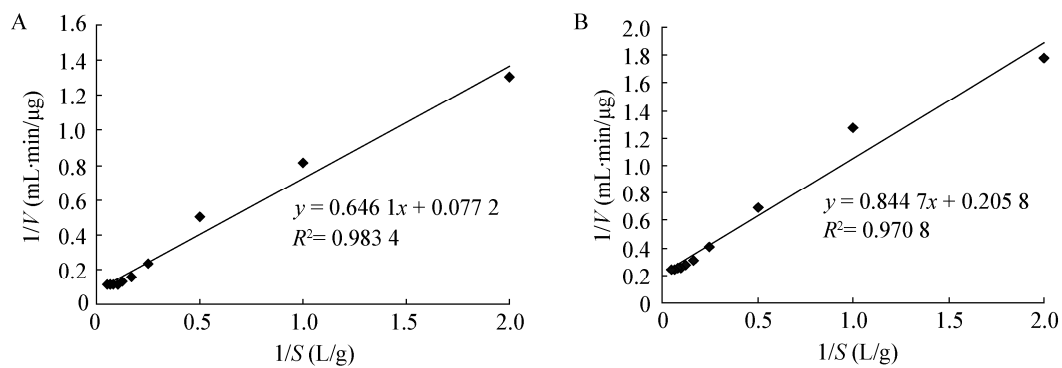


图 5 P1 和 P2 的米氏方程作图

Figure 5 Plot of Michaelis-Menten equation of P1 and P2

注：A：P1 的米氏方程作图；B：P2 的米氏方程作图。  
Note: A: Plot of Michaelis-Menten equation of P1; B: Plot of Michaelis-Menten equation of P2.

表 3 P1 和 P2 对不同蛋白底物的水解活性 Table 3 Activity of protease P1 and P2 against different proteins		
蛋白种类 Protein (2%, W/V)	P1：相对酶活 P1: Relative activity (%)	P2：相对酶活 P2: Relative activity (%)
Casein	100	100
SPI	47.46±0.20	69.1±0.5
BSA	2.2±0.8	6.9±0.3

比例的 Pro 和 Leu，而 BSA 是一种亲水性蛋白，其肽链中疏水性氨基酸的比例相对较低。两种蛋白酶均对 Casein 的水解活性最高而对 BSA 的水解活性较低，说明两者对疏水氨基酸构成的肽键有很强的切割能力。

2.6 两种米曲霉蛋白酶酶解产物多肽分子质量分布

由表 4 可知，SPI 经 P1 和 P2 分别酶解后，分子量大于 10 kD 的多肽所占比例由 83.86%分别降至 9.51%和 7.90%，表明两种酶均能不同程度地降解 SPI。据报道具有活性的大豆肽是以 3–6 个氨基酸组成的小分子肽为主，分子量在 1 kD 以下<sup>[12]</sup>。

经 P1 和 P2 酶解后，分子量小于 1 kD 的小肽所占的比例显著提高，P1 酶解物中小于 1 kD 的小肽占 58.38%，P2 酶解物中小于 1 kD 的小肽占 66.71%。

3 讨论

蛋白酶在食品上有广泛的应用，研究不同蛋白酶的酶解特性对于蛋白水解物口感的提升和功能性小肽的研究具有重要意义。本文利用硫酸铵盐析、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析、Phenyl-Sepharose HP 疏水层析和 Superdex-G75/200 凝胶层析从米曲霉所产蛋白酶系中分离出两种蛋白酶组分 P1 和 P2，均已达到电泳纯，分子量大小分别

表 4 SPI 酶解前后多肽分子量分布及其所占比例 Table 4 The molecular mass distribution and proportion of peptides before/after hydrolyzation of SPI								
类型 Types	≥10 kD (%)	5–10 kD (%)	3–5 kD (%)	2–3 kD (%)	1–2 kD (%)	500–1 000 D (%)	180–500 D (%)	≤180 D (%)
SPI	83.86	4.66	2.74	0.89	0.91	0.48	1.96	4.49
P1 hydrolyzates	9.51	7.24	5.91	5.27	13.70	24.58	28.47	5.32
P2 hydrolyzates	7.90	4.88	4.47	4.63	11.42	20.36	35.30	11.04

约为 37 kD 和 45 kD,与汤鸣强等<sup>[13]</sup>分离纯化出的中性蛋白酶(73.4 kD)和 Vishwanatha 等<sup>[14]</sup>分离纯化出的酸性蛋白酶均不同,推测两种蛋白酶是新发现的蛋白酶,这将为米曲霉蛋白酶的进一步应用提供依据。P1 和 P2 的酶学性质研究表明,两者的酶学性质存在差异:P1 的最适作用条件为 pH 8.0、45 °C;P2 的最适作用条件为 pH 7.0、45 °C。P2 的米氏常数较 P1 的要小,在一定程度上反映 P2 与底物具有较高的亲和力。

以 Casein、SPI 和 BSA 三种天然蛋白为底物时,P1 和 P2 均对疏水性蛋白 Casein 有较高的水解活性,说明 P1 和 P2 对蛋白底物中的疏水性肽键具有很强的切割能力。一般来说,疏水性氨基酸在多肽中的含量越多苦味越强,另外 Ishibashi 等<sup>[15]</sup>认为多肽呈现苦味需要两个位点,其一为含较大疏水基团的氨基酸如 Pro,另一为含疏水基团或较大碱性基团的氨基酸如 Arg,当小肽中含有两者形成的肽键时其苦味会加重,而本研究获得的 P1 和 P2 对疏水性氨基酸构成的肽键具有很强的选择性,因此可在一定程度上降低多肽的苦味;但是,Otagiti<sup>[16]</sup>研究表明疏水性氨基酸残基位于 C 端时苦味比位于中间位置时要明显,而 P1 和 P2 酶解后易形成 C 末端为疏水氨基酸的小肽,因此为提高两种蛋白酶降低苦味的能力,可以考虑将 P1 和 P2 与端肽酶共同使用。

功能性小肽的制备质量及效果取决于所用的底物蛋白,也与蛋白酶的种类有关。本文获得的蛋白酶 P1 和 P2 分别酶解大豆分离蛋白后,酶解产物中的组分分子量分布广泛,这进一步说明 P1 和 P2 是内肽酶,作用于蛋白肽链的内部。P1 和 P2 酶解产物中肽相对分子量分布呈现出一定的差异,这可能是由于两种酶作用基团的不同造成的,它们作用于蛋白质的不同位点,从蛋白质内部按照各自的酶切方式获得酶解产物,以至于产生不同的产物。不同相对分子质量的大豆蛋白肽具有不同的功能特

性,可根据产物的应用选择合适的酶解工艺参数,经分离纯化后可应用于满足不同需要的食品加工。

## 参 考 文 献

- [1] 傅力,章运,涂振东. 米曲霉高产蛋白酶菌株的选育及在酱油酿造中的应用研究[J]. 新疆农业科学, 2009, 46(6): 1274-1278.
- [2] 杨秋明,肖安风,杨远帆,等. 米曲霉的定向发酵[J]. 重庆理工大学学报, 2011, 25(2): 53-58.
- [3] 李艳丽,徐少春,徐尧兴. 中性蛋白酶高产菌株的筛选及产酶酶系分析[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 20-23.
- [4] 黑婷婷,鲁梅芳,王春玲,等. 米曲霉 A100-8 中与低盐固态酱油发酵相关的酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2010, 219(6): 37-40.
- [5] 张贺迎,武金霞,闫博. 活性电泳分析米曲霉沪酿 3.042 蛋白酶组分[J]. 中国酿造, 2010, 225(12): 162-164.
- [6] 曾小波,伍丽瑜,宋小焱,等. 酱油曲蛋白酶的分离及催化性质研究[J]. 中国调味品, 2010, 35(1): 50-52.
- [7] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 北京科学出版社, 1984: 446-447.
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(3): 248-254.
- [9] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-90.
- [10] Anissa H, Ali B, Rym A, et al. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(1): 29-35.
- [11] 潘进权. 毛霉 AS3.2778 胞外蛋白酶组分的纯化、鉴定及性质研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2008.
- [12] 陈星,李晓磊,吴琼. 不同蛋白酶酶解产物活性大豆肽分子量分布状态的研究[J]. 西南大学学报, 2010, 32(7): 1-7.
- [13] 汤鸣强,曾小芳. 米曲霉 F-81 菌株产中性蛋白酶的分离纯化[J]. 生物技术通报, 2010(4): 194-197.
- [14] Vishwanatha KS, Appu Rao AG, Singh SA. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 402-407.
- [15] Ishibashi N, Kubo T, Chiino M, et al. Taste of proline-containing peptides[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(1): 95-98.
- [16] Otagiti K. Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49(4): 1019-1026.