



Aspergillus oryzae RIB40 氨肽酶(AoAPase)异源表达及在鳕鱼肽脱苦中的应用

袁帅^{1,2,3#}, 陈晓倩^{1,2,3#}, 吴敬^{1,2,3}, 宿玲恰^{1,2,3*}, 颜正飞^{1,2,3*}

- 1 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 2 江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 3 江南大学教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

袁帅, 陈晓倩, 吴敬, 宿玲恰, 颜正飞. *Aspergillus oryzae* RIB40 氨肽酶(AoAPase)异源表达及在鳕鱼肽脱苦中的应用. 微生物学报, 2022, 62(12): 4943–4952.

Yuan Shuai, Chen Xiaoqian, Wu Jing, Su Lingqia, Yan Zhengfei. Heterologous expression of aminopeptidase (AoAPase) from *Aspergillus oryzae* RIB40 and the application in debittering cod peptides. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4943–4952.

摘要: 【目的】针对鳕鱼肽苦味这一不足之处, 本研究旨在获得一种高效特异性脱苦氨肽酶, 实现对鳕鱼肽苦味的去除进而提升其附加值。【方法】本研究选取 *Aspergillus oryzae* RIB40 来源的氨肽酶 AoAPase 在毕赤酵母 KM71 中进行异源表达并探究其酶学性质; 荧光探针法与电子舌技术联用评估 AoAPase 对鳕鱼肽的脱苦效果; 高效液相色谱测定鳕鱼肽酶解液中游离氨基酸含量及分子量的分布变化; 利用扫描电镜观察鳕鱼肽表面微观结构的差异性; 通过评价 DPPH、羟基及 ABTS 自由基清除能力, 探究鳕鱼肽经 AoAPase 处理后抗氧化活性的变化。【结果】AoAPase 在毕赤酵母 KM71 中成功异源表达, 其分子量约 41 kDa。最适温度和 pH 分别为 70 °C 和 8.0, 在最适条件下 AoAPase 酶活可达到 2 238 U/mL, Ca²⁺能够提高其酶活; AoAPase 具有底物特异性, 以 Leu-pNA 为底物时, K_m 为 5.95 mmol/L, V_{max} 为 43.58 μmol/(mL·min); AoAPase 通过切除鳕鱼肽段 N 端疏水性氨基酸残基和降低苦味显著的肽段(500–1 000 Da)含量, 进而完全消除其苦味; 经 AoAPase 处理后的鳕鱼肽粉质地更加细腻、松散, 且抗氧化活性无明显差异。【结论】重组氨肽

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20200599)

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20200599)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. Tel: +86-510-85326653; E-mail: SU Lingqia, sulingqia@jiangnan.edu.cn, YAN Zhengfei, zhengfeiyan@jiangnan.edu.cn

Received: 30 March 2022; Revised: 10 May 2022; Published online: 17 June 2022

酶 AoAPase 能够特异性去除鳕鱼肽苦味且不影响其生物活性, 本研究为 AoAPase 在蛋白脱苦中的应用奠定理论基础。

关键词: 氨肽酶; 异源表达; 脱苦; 鳕鱼肽; 抗氧化性

Heterologous expression of aminopeptidase (AoAPase) from *Aspergillus oryzae* RIB40 and the application in debittering cod peptides

YUAN Shuai^{1,2,3#}, CHEN Xiaoqian^{1,2,3#}, WU Jing^{1,2,3}, SU Lingqia^{1,2,3*}, YAN Zhengfei^{1,2,3*}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Joint Laboratory of Food Safety International Cooperation, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To explore a specific aminopeptidase that can debitter cod peptides and further increase the value of this fish. **[Methods]** *Aspergillus oryzae* RIB40-derived aminopeptidase (AoAPase) was expressed in *Pichia pastoris* KM71, and its characteristics were investigated. The cod peptides-debittering ability of AoAPase was evaluated by ANS probe and electronic tongue. The content and molecular weight of free amino acids in the cod peptides hydrolysate were detected by high performance liquid chromatography (HPLC), and the surface microstructure of cod peptides was observed under scanning electron microscope (SEM). Moreover, the DPPH-, hydroxyl- and ABTS-scavenging activities were determined to evaluate the antioxidant properties of cod peptides before and after AoAPase treatment. **[Results]** AoAPase was successfully expressed in KM71, with the molecular weight of about 41 kDa. AoAPase activity reached 2 238 U/mL under optimal conditions of 70 °C and pH 8.0. Its activity was enhanced by Ca²⁺. In addition, AoAPase exhibited substrate specificity, and its K_m and V_{max} values towards Leu-pNA were 5.95 mmol/L and 43.58 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, respectively. AoAPase could completely eliminate the bitterness of cod peptides by removing N-terminal hydrophobic amino acids and reducing the content of bitter peptides (500–1 000 Da). The cod peptide powder after AoAPase treatment became more delicate and loose with no significant change in antioxidant activity. **[Conclusion]** The recombinant AoAPase can remove the bitter taste of cod peptides without influencing their bioactivity. This study lays a theoretical foundation for the application of AoAPase in protein debittering.

Keywords: aminopeptidase; heterologous expression; debittering; cod peptides; antioxidant activity

鳕鱼是北太平洋海产量很高的经济鱼类, 富含蛋白质、维生素和矿物质^[1]。鳕鱼肉主要制成生鱼片, 鱼皮等边角料通常被丢弃或制成饲料添加剂, 造成环境污染或资源浪费。将鳕

鱼加工过程中的边角料进一步水解成具有生物活性的蛋白肽, 是目前提高其附加值的主流方法。研究已表明鳕鱼肽具有抑制黑色素生成活性^[2]、抗氧化活性^[3]、免疫调节活性^[4]和血管紧

张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE)抑制活性等生理功能^[5]。但鳕鱼肽具有明显的苦味, 进而影响食用口感, 限制其在食品市场中的应用范围。因此, 苦味的脱除是提高鳕鱼肽附加值的关键所在。

目前脱苦方法包括活性炭吸附、美拉德反应、类蛋白反应以及酶法脱苦。前 3 种脱苦方法会影响肽的营养价值, 且后期会重现苦味。相较而言, 酶法通过降低苦味肽的含量来提高苦味肽的阈值, 从源头去除苦味^[6]。其中, 氨肽酶(Aps; EC 3.4.11)属于外肽酶, 能够水解肽段 N 端带有苦味的 Leu、Pro 等疏水性氨基酸残基, 脱苦效果最佳^[7]。目前已报道的氨肽酶主要来源于微生物, 包括链霉菌^[8]、假单胞菌^[9]、曲霉属真菌^[10]、芽孢杆菌^[11]、乳酸菌^[12]等, 例如 *Streptomyces canus* T20 来源氨肽酶 ScAP 对大米蛋白有显著的脱苦作用, 其苦味强度降低了 49%^[13]。海洋地衣芽孢杆菌 SWJS33 来源氨肽酶 BLAP 使大豆蛋白苦味强度降低了 88.89%^[11]。

天然菌株存在着氨肽酶生产成本高、提取复杂、产量低(0.4 U/mg)等问题, 限制了氨肽酶规模化应用。基于此, 研究人员开展了大量工作来提升氨肽酶产量, 例如米曲霉 CICC2066 菌株经紫外诱变后, 突变株的氨肽酶活力是原始菌株的 1.24 倍^[14], 但菌株的产孢量少, 代谢缓慢。此外, 特定的工程菌也能够异源表达氨肽酶, 从而快速简便获取氨肽酶。例如 *S. canus* T20 来源氨肽酶 ScAP 在大肠杆菌中异源表达, 其酶活由 20 U/mL 提高至 1 200 U/mL^[13]。但大肠杆菌异源表达的氨肽酶存在较多的杂蛋白, 会增加下游纯化成本。相对而言, 毕赤酵母表达系统更具优势, 包括诱导剂价格低廉, 可实现胞外的高效表达、高密度发酵以及自身分泌蛋白少, 易于后期纯化等。例如将枯草芽孢杆菌 Zj016 来源氨肽酶 BSAP 在毕赤酵母中表达,

甲醇诱导 96 h 最高活性达到 28.4 U/mL, 是野生菌株的 7.1 倍^[15]。

本研究将 *Aspergillus oryzae* RIB40 来源的氨肽酶 AoAPase (GenBank 登录号: XP_001825745) 在毕赤酵母表达系统进行异源表达并分析其酶学性质, 探究 AoAPase 对鳕鱼肽的脱苦效果、对鳕鱼肽抗氧化性的影响及其在食品工业中的潜在应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

大肠杆菌 JM109、毕赤酵母 KM71 均保藏于本研究室。鳕鱼肽由山东海龙元生物科技有限公司提供, 商品氨肽酶分别购于河北仟盛生物科技有限公司、沧州夏盛酶生物技术有限公司以及四川绵阳禾本生物工程有限公司(分别简称为 QS、XS 和 HB)。质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒等购于北京天根生化科技有限公司; 2×Phanta Max Master Mix、限制性内切酶(*EcoR* I 和 *Not* I)、单片段同源重组试剂盒等购于诺唯赞(南京)生物科技有限公司; 酵母粉、蛋白胨等购自 Oxoid 公司; L-Leu-4-硝基苯胺 (Leu-pNA) 等底物购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 其他国产分析纯试剂均购自国药集团。

1.2 AoAPase 的克隆表达

AoAPase 基因序列经 Signal IP 预测去除信号肽后, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成到 pPIC9K 载体上, PCR 扩增目的基因 AoAPase 后进行纯化, 表达载体 pPIC9K 进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切之后纯化, 利用单片段同源重组试剂盒将目的基因与双酶切后的线性载体进行连接, 获得重组质粒 pPIC9K-AoAPase 并将其转入 *E. coli* JM109 感受态细胞。将测序正确的质粒线性化后电转入毕赤酵母 KM71 感受态细

胞中,电转后的细胞涂布于 MD 平板在 30 °C 条件下培养 2 d,得到阳性转化子。将高酶活转化子接种至 50 mL BMGY 培养基中 30 °C 培养 1.5 d,离心获得菌体,用 25 mL BMMY 培养基重悬菌体,在 30 °C 培养 4 d,每 24 h 补加终浓度为 1% (V/V)的甲醇诱导,于 5 000 r/min 离心 5 min 取上清液,即为 AoAPase 酶液。

1.3 AoAPase 酶活与蛋白浓度测定

采用 Qin 等^[13]的方法,反应体系为 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液和适量的酶液以 200 mmol/L 的 Leu-pNA 为底物在 50 °C 反应 10 min,利用酶标仪检测 405 nm 处的吸光值。酶活定义:每分钟释放 1 μg pNA 所需的酶量为一个酶活单位(U)。根据二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术)测定蛋白质的含量。

1.4 AoAPase 酶学性质

1.4.1 最适温度及温度稳定性

将 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液稀释的 AoAPase,置于 20–80 °C (间隔 10 °C)保温 5 min,加入 200 mmol/L 底物 Leu-pNA,测定不同温度条件下 AoAPase 的酶活,研究其最适温度。将 AoAPase 置于 50、60、70 °C 条件下,间隔 1 h 测定 AoAPase 的残余酶活,研究其温度稳定性。

1.4.2 最适 pH 及 pH 稳定性

经 pH 3.0–11.0 的缓冲液(pH 3.0–7.0 citrate-phosphate, pH 7.0–9.0 Tris-HCl 和 pH 9.0–11.0 glycine-NaOH)稀释的 AoAPase 置于最适温度下测定酶活,探究 AoAPase 的最适 pH。将 pH 7.0–9.0 的缓冲液稀释的 AoAPase 置于最适温度下,间隔 1 h 测定 AoAPase 残余酶活,研究其 pH 稳定性。

1.4.3 金属离子对 AoAPase 酶活的影响

向反应体系中分别加入 0.1 和 1.0 mmol/L 不

同的金属离子(Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Ni^{2+}),置于 50 °C 条件下测定 AoAPase 的酶活,以无金属离子的酶活为 100%。

1.4.4 底物特异性及动力学参数

以 Ala-pNA、Pro-pNA、Trp-pNA、Val-pNA、Phe-pNA、Leu-pNA、Met-pNA 和 Ile-pNA 为底物,测定 AoAPase 的酶活,以 Leu-pNA 为底物时测定酶活为 100%,计算 AoAPase 催化其他底物时的相对酶活。在最适反应条件下,向反应体系中加入不同浓度的 Leu-pNA (2–200 mmol/L)测定 AoAPase 的酶活,利用 Origin 9.0 软件处理数据,采用非线性模拟方法计算 AoAPase 对 Leu-pNA 的 K_m 、 k_{cat} 及 k_{cat}/K_m 值。

1.5 AoAPase 对鳕鱼肽的脱苦评价

取一定量的鳕鱼肽粉末溶于去离子水中,使得反应体系终浓度为 2% (W/V),按酶与底物比(E/S)为 700 U/g 向反应体系中分别加入商品氨肽酶和 AoAPase,在 50 °C、180 r/min 的条件下反应 5 h,反应结束后,将反应体系置于沸水中煮沸 10 min 终止反应。将反应液于 8 000 r/min 离心 10 min 取上清液,进行后续评价实验。

1.5.1 苦味评价

采用 Xie 等^[16]的方法并稍作修改,将上述溶液用磷酸盐缓冲液(0.1 mmol/L, pH 7.0 稀释至浓度为 0.01–0.10 mg/mL,取 0.5 μL 8 mmol/L ANS (1-苯氨基-8-萘基磺酸盐)磷酸盐缓冲液加入到 100 μL 溶液中,利用荧光酶标仪在激发波长为 390 nm、发射波长为 470 nm、增益值为 135 的条件下,测定 ANS 与肽复合物的荧光强度,以荧光强度对肽浓度作图,斜率为肽的疏水性指数。电子舌测定苦味采用 Qin 等^[13]的方法,使用味觉传感系统 SA 402B 检测样品苦味。

1.5.2 游离氨基酸测定

选取 AoAPase 处理肽溶液 0、4 和 8 h 后的反应液沸水浴 10 min,离心取上清。按照 Qin

等^[13]所述方法, 采用 HPLC (安捷伦 1100) 分析检测其中的游离氨基酸含量。

1.5.3 显微结构特性

上清液经冷冻干燥获得粉末并采用扫描电镜(Quanta 200, 赛默飞)观察其微观特征。

1.5.4 分子量分布

参照 Qin 等^[13]的方法, 使用 Waters 2695 高效液相色谱仪装配 TSK gel 2000SW_{XL} 色谱柱(7.8 mm×30 mm, Tosoh)测定上清液的分子量分布。

1.6 抗氧化活性测定

采用 Wang 等^[17]方法测定样品对 DPPH·、OH 和 ABTS· 自由基的清除率。

2 结果与分析

2.1 氨肽酶 AoAPase 的重组表达

如图 1 所示, 重组毕赤酵母 KM71 发酵液中存在 1 条明显的蛋白条带, 其分子量与 AoAPase 的理论分子量(41.0 kDa)接近, 说明 AoAPase 在毕赤酵母 KM71 中成功异源表达。AoAPase 酶

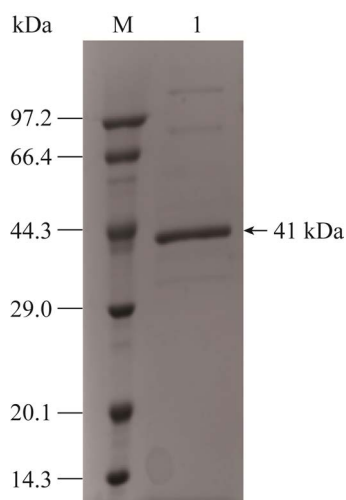


图 1 AoAPase 的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of AoAPase. M: protein molecular weight marker; Lane 1: fermentation supernatant of recombinant *P. pastoris* KM71.

活达到 545 U/mL, 其蛋白浓度为 0.763 mg/mL。重组 AoAPase 分子量略高于野生菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 产生的氨肽酶(33.0 kDa)^[18], 这可能与 N-端糖基化作用相关^[19]。由于发酵液中目标蛋白条带清晰, 杂蛋白含量少, 因此本研究使用毕赤酵母发酵液进行后续实验。

2.2 AoAPase 酶学性质

2.2.1 温度和 pH 对 AoAPase 酶活的影响

如图 2 所示, AoAPase 在 70 °C 时酶活达到最高(2 238 U/mL), 在 50–60 °C 的范围内 AoAPase 相对酶活仍保持 70% 以上, 当温度高于 80 °C 时, 其酶活迅速降低(图 2A)。在 50、60、70 °C 条件下, AoAPase 酶活半衰期分别为 3、0.5、0.25 h, 因此 AoAPase 在 50 °C 条件下具有良好的热稳定性(图 2B)。在 pH 8.0 时, AoAPase 酶活达到最高(2 238 U/mL), 表明 AoAPase 适合弱碱性环境(图 2C)。AoAPase 在 pH 7.0 时稳定性较好, 半衰期为 3 h, 在 pH 8.0–9.0 时半衰期仅为 50 min (图 2D)。

2.2.2 金属离子对 AoAPase 酶活的影响

如表 1 所示, 添加 0.1 mmol/L Ca²⁺ 使 AoAPase 的酶活增加了 16.44%, 其他二价金属离子对酶活均有抑制作用, 其中 Ni²⁺ 能够强烈抑制 AoAPase 的酶活。

2.2.3 AoAPase 底物特异性和动力学参数

如图 3 所示, AoAPase 对底物 Leu-pNA 表现出最高的酶活, 然后依次为 Met-pNA 和 Ile-pNA, 其相对酶活分别为 19.67% 和 10.78%, AoAPase 对其余 5 种底物的催化活性较低, 均小于 10%, 表明 AoAPase 属于亮氨酸氨肽酶, 具有显著的底物特异性^[18]。在 70 °C 和 pH 8.0 最适条件下, AoAPase 催化 Leu-pNA 的 K_m 值为 5.95 mmol/L, V_{max} 为 43.58 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, k_{cat} 为 43.207 s^{-1} 和 k_{cat}/K_m 为 7.262 $\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 。

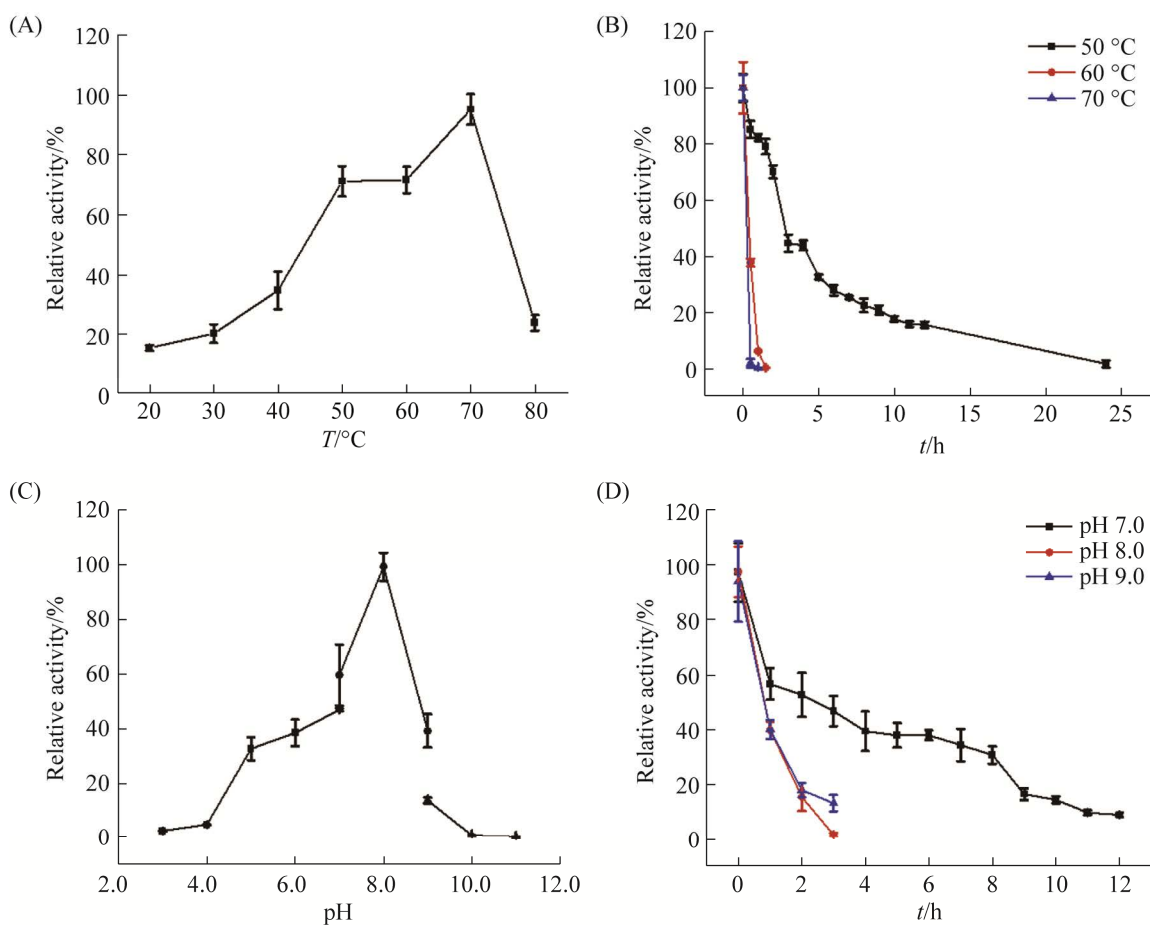


图 2 温度和 pH 对 AoAPase 酶活及稳定性的影响

Figure 2 Effects of temperature and pH on the activity (A and C) and stability (B and D) of AoAPase. The maximal activity was taken as 100%. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

表 1 金属离子对 AoAPase 酶活的影响

Table 1 Effects of metal ions on AoAPase activity

Chemicals	Relative activity (\pm SD%)	
	0.1 mmol/L	1.0 mmol/L
None	100.00 \pm 2.27	0.00
Ca ²⁺	116.44 \pm 3.57	84.36 \pm 5.15
Cu ²⁺	26.98 \pm 1.43	8.62 \pm 0.42
Co ²⁺	36.12 \pm 2.62	10.58 \pm 1.45
Zn ²⁺	39.06 \pm 2.71	60.47 \pm 0.50
Mn ²⁺	41.72 \pm 2.86	18.00 \pm 1.15
Ni ²⁺	2.38 \pm 0.37	3.34 \pm 0.51
Mg ²⁺	90.37 \pm 1.42	30.99 \pm 0.38

2.3 氨肽酶对鳕鱼肽苦味的影响

2.3.1 苦味评价

如图 4A 所示, 氨肽酶能够降低鳕鱼肽的苦味。其中, AoAPase 脱苦效果最佳, 明显优于商品氨肽酶(苦味强度降低 4.41%–56.55%), 其苦味强度降低至 0, 无苦味。此外, 鳕鱼肽酶解液疏水性指数与苦味强度变化趋势相一致, 这可能是肽段 N 端疏水性氨基酸残基被切割, 进而提升了肽段整体亲水性。

2.3.2 游离氨基酸含量

如图 4B 所示, AoAPase 处理鳕鱼肽 4 h 后,

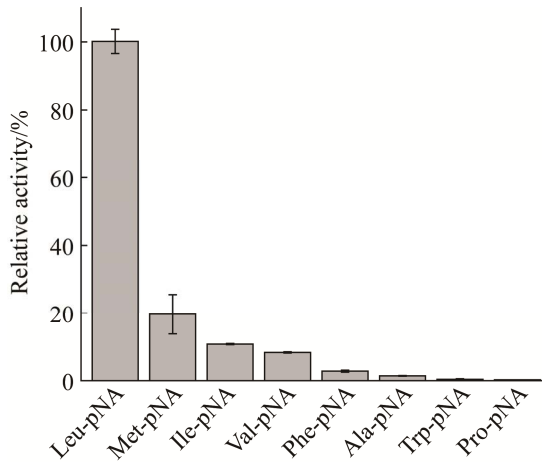


图3 AoAPase 底物特异性

Figure 3 Substrate specificity of AoAPase. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

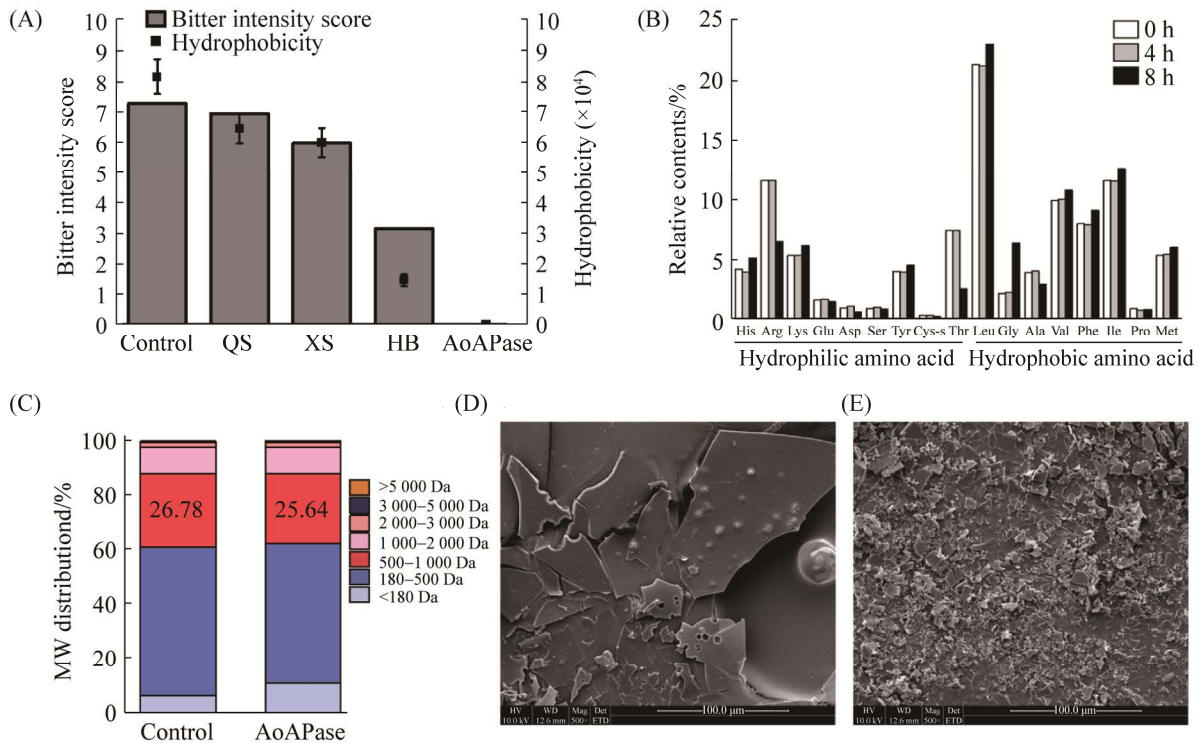


图4 AoAPase 对鳕鱼肽的脱苦作用

Figure 4 Debittering effect of AoAPase on cod peptides. A: effect of different aminopeptidase on relieving bitterness of cod peptides. Control: cod peptides without aminopeptidase treatment. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”; B: changes of contents of free amino acids in cod peptides with different hydrolysis times; C: the molecular weight distribution of cod peptides before and after gastrointestinal digestion; D: SEM micrographs analysis of cod peptides before aminopeptidase treatment; E: SEM micrographs of cod peptides after aminopeptidase treatment.

疏水性游离氨基酸 Gly、Ala、Val 和 Met 含量增多。处理 8 h 后, 疏水性游离氨基酸 Leu、Gly、Val、Phe、Ile 和 Met 含量高于未处理的鳕鱼肽。AoAPase 处理中部分游离氨基酸含量反而降低, 甚至低于未处理的鳕鱼肽, 可能是由于高浓度的游离氨基酸和小肽在酶的介导下形成肽键^[20]而导致游离氨基酸含量降低。

2.3.3 分子量分布

如图 4C 所示, 鳕鱼肽中的多肽主要分布为 <180 Da (6.17%), 180–500 Da (54.94%), 500–1 000 Da (26.78%), 及 1 000–2 000 Da (9.81%)。其中, 绝大部分肽段集中在 180–1 000 Da, 占比为 81.72%。经过 AoAPase 处理后, 500–1 000 Da 的肽段占比较处理前降低 1.14%, 而这范围内

的肽段具有较强的苦味。由此可推测 AoAPase 是具有降低鳕鱼肽苦味的潜在能力。

2.3.4 显微结构

如图 4D–4E 所示, 未处理鳕鱼肽呈现不规则且大片状结构, 经过 AoAPase 处理后的鳕鱼肽变为无序和碎片状结构。这可能是 AoAPase 切除肽段 N 端疏水性氨基酸残基, 使其整体疏水性下降, 进而缓解因疏水而聚集的现象, 与葵花子蛋白酶解研究结果类似^[21]。

2.4 氨肽酶对鳕鱼肽抗氧化活性的影响

如表 2 所示, 鳕鱼肽经 AoAPase 处理后对 DPPH 自由基清除率为 33.76%, 较处理前略有提高。鳕鱼肽对·OH 自由基清除率由处理前的 63.42% 提升至处理后的 70.89%, 增幅约 7.47%。AoAPase 处理前后, 鳕鱼肽对 ABTS·自由基清除率保持在同等水平, 约 92%。因此, AoAPase 处理对鳕鱼肽抗氧化活性无明显降低。

3 讨论与结论

肽段的 N 端含有疏水性氨基酸残基是其产生苦味的主要原因, 这类肽段与味蕾接触时会有明显的苦味。氨肽酶能够特异性切除肽段 N 端疏水性残基, 有助于降低蛋白苦味。本研究通过毕赤酵母表达体系成功表达了 *Aspergillus oryzae* RIB40 来源氨肽酶 AoAPase, 该酶来自 M28 肽酶家族, AoAPase 与来自同家族的嗜肺军团菌来源氨肽酶 Lap 活性位点的结构基本相同, 二价锌离子和高度保守的催化残基几乎重

叠, 另外 AoAPase 疏水特异性结合袋里的 6 个残基(M262、D338、Y312、C314、I342 和 F331) 也存在于同一家族的其他酶中, 包括酱油曲霉 AS-Lap1 和溶解蛋白单胞菌 AAP, 表明这类氨肽酶具有保守的活性位点结构, 这使得 M28 肽酶家族有高度保守的反应机制^[19]。

本研究率先开展 AoAPase 的酶学性质及在蛋白脱苦中的应用研究。AoAPase 最适温度为 70 °C, 但在 50 °C 下具有良好的热稳定性。异源表达过程中, 糖基化等轻微修饰能够影响酶的性质, 例如来自米曲霉 JN-412 的脯氨酰氨肽酶 pap 经过糖基化后表现出较高的热稳定性^[22]; AoAPase 具有广泛的 pH 适应性, 其最适 pH 为 8.0, 偏向于弱碱性环境, 这与多数碱性氨肽酶 pH 特性一致^[23–25]。Zn²⁺对 AoAPase 酶活有抑制作用, 原因可能是 2 个 Zn²⁺对氨肽酶作用的底物结合能力不同, 其中一个 Zn²⁺结合能力较强, 不易被其他金属离子替换; 另一个 Zn²⁺结合能力较弱, 当加入 Ca²⁺时, Ca²⁺可能会取代不稳定的 Zn²⁺使氨肽酶的酶活提高。

AoAPase 能够促进鳕鱼肽中疏水性氨基酸残基的释放, 表明 AoAPase 通过去除肽段 N 端疏水氨基酸来减少鳕鱼肽的苦味, 其中游离氨基酸中 Leu 含量提高明显, 符合 AoaPase 为亮氨酸氨肽酶的特征。AoAPase 处理后鳕鱼肽呈现出碎片化, 表明 AoAPase 能够有效作用于肽结构, 解离疏水性氨基酸, 使肽亲水性提高, 增加肽与水分子之间的接触, 从而使鳕鱼肽更加分散。

此外, 鳕鱼肽对 DPPH 自由基清除能力明显低于·OH 自由基和 ABTS·自由基清除能力, 这可能是由于水溶性自由基 ABTS·比脂溶性自由基 DPPH 更容易在水溶液中与多肽反应, 因此和多肽反应更有效^[26]。AoAPase 处理后, 鳕鱼肽对·OH 自由基清除能力有所提高。据报道,

表 2 鳕鱼肽脱苦过程中抗氧化活性的变化

Table 2 Changes in antioxidant activity of cod peptides before and after debittering

Number	Free radical scavenging rate (±SD%)		
	DPPH	·OH	ABTS·
Control	31.52±0.60	63.42±0.97	92.61±0.05
Sample	33.76±1.05	70.89±2.15	92.69±0.13

Sample: cod peptides treated with AoAPase.

影响·OH 自由基清除活性最重要因素之一是疏水性氨基酸的含量, 主要是 Gly、Pro 和 Ala^[27]。鳕鱼肽具有较高 ABTS·自由基清除能力, 可能是在肽序列中含有一些特定的氨基酸, 例如 Tyr 和 Phe 可以向缺失电子的自由基提供质子, 同时通过共振结构保持稳定性, 可以作为有效的自由基清除剂, Trp 和 His 分别含有吲哚环和咪唑基团, 可以作为氢供体, 这些氨基酸对清除自由基有重要作用^[28]。综上所述, 氨肽酶 AoAPase 可有效降低鳕鱼肽的苦味, 并且脱苦后的鳕鱼肽可以作为潜在的抗氧化剂添加到食品中, 对健康有益。

参考文献

- [1] Fan W, Tan X, Xu X, Li G, Wang Z, Du M. Relationship between enzyme, peptides, amino acids, ion composition, and bitterness of the hydrolysates of Alaska pollock frame. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(4): e12801.
- [2] Hou H, Zhao X, Li BF, Zhang CH, Zhuang YL. Inhibition of melanogenic activity by gelatin and polypeptides from pacific cod skin in B16 melanoma cells. *Journal of Food Biochemistry*, 2011, 35(4): 1099–1116.
- [3] Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(4): 1984–1989.
- [4] Hou H, Fan Y, Li B, Xue C, Yu G, Zhang Z, Zhao X. Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of Alaska pollock frame. *Food Chemistry*, 2012, 134(2): 821–828.
- [5] Je JY, Park PJ, Kwon JY, Kim SK. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(26): 7842–7845.
- [6] Idowu AT, Benjakul S. Bitterness of fish protein hydrolysate and its debittering prospects. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(9): e12978.
- [7] Nandan A, Nampoothiri KM. Therapeutic and biotechnological applications of substrate specific microbial aminopeptidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(12): 5243–5257.
- [8] Wu B, Shi PJ, Li J, Wang YR, Meng K, Bai YG, Luo HY, Yang PL, Zhou ZG, Yao B. A new aminopeptidase from the keratin-degrading strain *Streptomyces fradiae* var. k11. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(3): 730–739.
- [9] Wu YT, Zhou ND, Zhou ZM, Gao XX, Tian YP. A thermo-stable lysine aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*: isolation, purification, characterization, and sequence analysis. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(10): 1110–1119.
- [10] Huang WQ, Zhong LF, Meng ZZ, You ZJ, Li JZ, Luo XC. The structure and enzyme characteristics of a recombinant leucine aminopeptidase rLap1 from *Aspergillus sojae* and its application in debittering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177(1): 190–206.
- [11] Lei FF, Zhao QZ, Sun-Waterhouse DX, Zhao MM. Characterization of a salt-tolerant aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 that improves hydrolysis and debittering efficiency for soy protein isolate. *Food Chemistry*, 2017, 214: 347–353.
- [12] Tchobanov B, Marinova M, Grozeva L. Debittering of protein hydrolysates by *Lactobacillus* LBL-4 aminopeptidase. *Enzyme Research*, 2011, 2011: 538676.
- [13] Qin Q, Tang C, Wu J, Chen S, Yan Z. A dual-functional aminopeptidase from *Streptomyces canus* T20 and its application in the preparation of small rice peptides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 167: 214–222.
- [14] 李鹏, 张艳芳, 王军, 韩玉婷, 王选年. 紫外诱变选育米曲霉氨肽酶高产菌株. *中国调味品*, 2017, 42(1): 61–64.
Li P, Zhang YF, Wang J, Han YT, Wang XN. Breeding of *Aspergillus oryzae* aminopeptidase-producing strains by ultraviolet induced mutation. *China Condiment*, 2017, 42(1): 61–64. (in Chinese)
- [15] Xi HX, Tian YP, Zhou ND, Zhou ZM, Shen W. Characterization of an N-glycosylated *Bacillus subtilis* leucine aminopeptidase expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(2): 236–246.
- [16] Xie NN, Wang BB, Jiang LP, Liu CC, Li B. Hydrophobicity exerts different effects on bioavailability and stability of antioxidant peptide fractions from casein during simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell absorption. *Food Research International*, 2015, 76(pt 3): 518–526.

- [17] Wang ZX, Liu XY, Xie HK, Liu ZQ, Rakariyatham K, Yu C, Shahidi F, Zhou D. Antioxidant activity and functional properties of alcalase-hydrolyzed scallop protein hydrolysate and its role in the inhibition of cytotoxicity *in vitro*. *Food Chemistry*, 2021, 344: 128566.
- [18] Matsushita-Morita M, Tada S, Suzuki S, Hattori R, Marui J, Furukawa I, Yamagata Y, Amano H, Ishida H, Takeuchi M, Kashiwagi Y, Kusumoto KI. Overexpression and characterization of an extracellular leucine aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Current Microbiology*, 2011, 62(2): 557–564.
- [19] Baltulionis G, Blight M, Robin A, Charalampopoulos D, Watson KA. The role of propeptide-mediated autoinhibition and intermolecular chaperone in the maturation of cognate catalytic domain in leucine aminopeptidase. *Journal of Structural Biology*, 2021, 213(3): 107741.
- [20] Lei FF, Zhao QZ, Lin LZ, Sun BG, Zhao MM. Evaluation of the hydrolysis specificity of an aminopeptidase from *Bacillus licheniformis* SWJS33 using synthetic peptides and soybean protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(1): 167–173.
- [21] Qin N, Bao XL, Li HJ. Structure and functional properties of sunflower seed protein as affected by enzymatic hydrolysis combined with macroporous resin adsorption decolorization. *International Journal of Food Properties*, 2021, 24(1): 1574–1587.
- [22] Yang HY, Zhu Q, Zhou ND, Tian YP. Optimized expression of prolyl aminopeptidase in *Pichia pastoris* and its characteristics after glycosylation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(11): 1–11.
- [23] Wang KD, Wang KH, Zhou ND, Tian YP. Secretory expression, purification, characterization, and application of an *Aspergillus oryzae* prolyl aminopeptidase in *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 181(4): 1611–1623.
- [24] Basten DEJW, Moers APHA, Van Ooyen AJJ, Schaap PJ. Characterisation of *Aspergillus niger* prolyl aminopeptidase. *Molecular Genetics and Genomics*, 2005, 272(6): 673–679.
- [25] Kitazono A, Kitano A, Tsuru D, Yoshimoto T. Isolation and characterization of the prolyl aminopeptidase gene (*pap*) from *Aeromonas sobria*: comparison with the *Bacillus coagulans* enzyme. *Journal of Biochemistry*, 1994, 116(4): 818–825.
- [26] Zheng L, Lin LZ, Su GW, Zhao QZ, Zhao MM. Pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides. *Food Research International*, 2015, 76(Pt 3): 359–365.
- [27] Mirzapour-Kouhdasht A, Moosavi-Nasab M, Kim YM, Eun JB. Antioxidant mechanism, antibacterial activity, and functional characterization of peptide fractions obtained from barred mackerel gelatin with a focus on application in carbonated beverages. *Food Chemistry*, 2021, 342: 128339.
- [28] Lapsongphon N, Yongsawatdigul J. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. *International Journal of Cardiology Heart & Vasculature*, 2013, 141(2): 992–999.