

产氨肽酶芽孢菌的筛选及酶学性质研究

李冬琪^{1,2}, 程江华^{1,2}, 万娅琼^{1,2}, 徐雅莹^{1,2*}

(¹安徽省农业科学院农产品加工研究所 合肥 230031

²安徽省食品微生物发酵与功能应用工程实验室 合肥 230031)

摘要 氨肽酶作为一种蛋白质水解酶被广泛应用于食品发酵加工领域。筛选高产氨肽酶菌株,并对菌株中风味酶的酶学性质进行研究,对开发高质量豆制品发酵剂具有重要意义。本文利用以 L-亮氨酸-对硝基苯胺(L-Leu-PNA)为底物的分离培养基筛选出 1 株产氨肽酶的芽孢菌 XYY1,通过形态特征观察、生理生化试验和 16S rDNA 技术对其进行鉴定,采用单因素实验和响应面方法优化产酶培养条件,并对菌株 XYY1 所产氨肽酶 Lap-Y 的酶学性质进行研究。结果表明,菌株 XYY1 经鉴定为地衣芽孢杆菌,起始 pH 值为 6.5,置 36 °C 条件下恒温培养 35.5 h 时,氨肽酶含量高达(4 132.75±11.94)U。酶学性质研究表明反应温度为 55 °C 时 Lap-Y 的相对活性最高,且热稳定性良好;最适 pH 值为 9.0,在中性偏碱环境下稳定性较好,属于偏碱性酶;金属离子 Mg²⁺、Fe²⁺、Co²⁺和 Ca²⁺可激活 Lap-Y 活性,其中 Mg²⁺为 1.0 mmol/L 时对氨肽酶 Lap-Y 的激活作用最显著,乙二胺四乙酸(EDTA)、二巯苏糖醇(DTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)对 Lap-Y 都有较强的抑制作用。地衣芽孢杆菌 XYY1 所产的氨肽酶 Lap-Y 适合工业化生产,对食品、医疗等行业具有极高的应用价值。

关键词 地衣芽孢杆菌;氨肽酶;筛选鉴定;酶学性质

文章编号 1009-7848(2024)11-0071-15 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.11.008

氨肽酶作为一种蛋白酶被应用于食品加工,可以减少食品的苦味并增加游离氨基酸含量,提高食品营养价值及风味^[1]。欧洲药典适应性证书(CEP)研究了由转基因丝状真菌(*A. oryzae*)菌株 NZYM-BU 产生亮酰氨肽酶的口服毒性,并匹配了过敏源,证明该酶在预期的使用条件下不会引起安全问题^[2]。氨肽酶广泛存在于动、植物、微生物及原生动物等多种生物体内^[3]。其中动、植物体内氨肽酶含量较低^[4],且提取难度大^[5],而通过微生物发酵生产氨肽酶效率高且成本低。产氨肽酶的微生物的种类很多,而大多数菌种因产酶能力低或者产生潜在风险因子等问题而不适合大规模生产氨肽酶^[6]。有文献报道用于氨肽酶工业生产的野生菌种主要有曲霉菌、芽孢杆菌和乳酸菌^[7]。芽孢杆菌属(*Bacillus*)是一类革兰氏阳性菌,好氧或兼性厌氧,产生的芽孢对高温、紫外线、电离辐射等具有较强抗性,且营养需求简单,生长速度快,适应范围广,广泛存在于土壤、水、空气以及动物肠道等

处^[8],其中地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)含有丰富的酶类,包括脯氨酰亚氨基氨肽酶(Pep I)、广谱性氨肽酶(Pep N、Pep C)、X-脯氨酰-二肽酰基-氨肽酶(Pep X)等氨肽酶^[9-10]。

不同菌株产氨肽酶的种类不同,其酶学性质也不尽相同。随着氨肽酶在工业生产中的应用需求日益增加,寻求新的或更好性能的氨肽酶成为当今的研究热点^[11]。为了适应工业需求,在极端生存条件中筛选菌种,以获得性能好的氨肽酶也成为重要的筛选方式^[12]。豆酱作为我国传统的发酵调味品之一,其盐度普遍在 20%左右。豆酱发酵过程中通过增加盐度制造高渗环境,以抑制杂菌生长^[13]。邓扬龙^[14]研究发现豆酱发酵后期,芽孢杆菌属为优势菌,占总分离菌株的 55%,其中海洋芽孢杆菌含量达到总分离菌株的 16%。本文从传统发酵豆酱中筛选出高产氨肽酶的芽孢菌株,对其进行鉴定,采用单因素实验和响应面试验优化该菌株产酶培养条件,并探究该氨肽酶的部分酶学性质,为进一步扩大氨肽酶生产及其应用提供理论依据。

收稿日期: 2023-11-19

基金项目: 科技部重点专项(SQ2020YFF0404523);安徽省重大科技专项(202003b06020027)

第一作者: 李冬琪,女,硕士生

通信作者: 徐雅莹 E-mail: AAASXYY1004@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

发酵豆酱采自安徽民间作坊,放置于无菌取样盒中4℃保存。

KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、L-亮氨酸-对硝基苯胺(L-Leu-PNA)、L-精氨酸-对硝基苯胺(L-Arg-PNA)、L-缬氨酸-对硝基苯胺(L-Val-PNA)、L-脯氨酸-对硝基苯胺(L-Pro-PNA)、 CoCl_2 、 CuCl_2 、 CaCl_2 、 MgSO_4 、 FeCl_2 、 ZnCl_2 、苯甲磺酰氟(PMSF)、乙二胺四乙酸(EDTA)、胃蛋白酶抑制剂(Pepstatin)、二硫苏糖醇(DTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)、Tris、浓盐酸、无水乙醇等试剂,均为分析纯级,上海吉至生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

BKM-SRG-006型电热恒温水浴锅,特科锶(广州)科技服务有限公司;UV-2102C型紫外-可见分光光度计,北京东南仪诚实验室设备有限公司;YP10002B型电子分析天平,特科锶(广州)科技服务有限公司;生化培养箱,高教研(北京)科技有限公司;BK-LTG210A型台式高速离心机,广州科大恒新技术有限公司;LC-101-3B型高温烘箱,北京金优科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 氨肽酶产生菌的筛选

1.3.1.1 菌株初筛 称取1g样品于装有100mL无菌水的锥形瓶中振荡均匀,80℃水浴20min^[15],取1.0mL混于无菌水中的样品接入富集培养基(牛肉膏蛋白胨培养基)中37℃培养24h,取富集培养菌液稀释涂布到分离培养基[蔗糖30g/L,牛肉膏5g/L,L-Leu-PNA 0.5g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, KH_2PO_4 1.0g/L,琼脂粉20g/L,pH 7.0;培养基中无色的对硝基苯胺(LNA)可以被分解生成黄色对硝基苯胺]中,根据生成的水解圈直径大小筛选出目的菌株^[16],用于后续试验。

1.3.1.2 菌株复筛 将初筛菌株接种于产酶培养基(MRS培养基)37℃培养24h,取菌液测定氨肽酶活力,根据酶活高低筛选出目的菌株。

1.3.2 氨肽酶活力的测定 采用LNA法^[17]测定氨肽酶活力,具体步骤如下:取样品酶液0.5mL,加入6mL pH 9.0 Tris-HCl缓冲液,58℃下预热5min后加入0.5mL 26mmol/L LNA-乙醇溶液,

空白对照加入0.5mL的无水乙醇,水浴反应10min。反应结束后立即放入冰浴终止反应。测定反应液在波长405nm处的吸光值,根据下列公式计算酶活。

$$\text{酶活力(U)} = A \times 138.12 \times N \times 10 \times 30 / 1000$$

式中:A为由样品测得的吸光度根据标准曲线计算得到的对硝基苯胺含量, μg ;N为稀释倍数。

酶活性单位的概念:在40℃时,每分钟溶解L-Leu-PNA生成1 μg 的对硝基苯胺所需酶量,即为一个酶活单位U。

1.3.3 氨肽酶产生菌的鉴定

1.3.3.1 形态学观察 观察菌株单菌落的颜色、形状、质地等形态特征;油镜下观察革兰氏染色后的菌体;并通过扫描电镜观察菌体形态^[18]。

1.3.3.2 生理生化检测 用细菌微量生化鉴定管对分离出的菌落进行生理生化鉴定^[19-21]。

1.3.3.3 分子鉴定 由上海生工生物有限公司测定,并在GenBank数据库中对比同源关系序列,MEGA 6.0系统构建进化树。

1.3.4 氨肽酶产生菌耐盐能力的测定 按3%的接种量将菌液于添加不同质量分数(10%,20%,30%,40%)NaCl的MRS液体培养基中,37℃下培养24h后观察菌株的生长情况,测定菌株在波长600nm处的吸光值^[22]。

1.3.5 单因素实验优化产酶培养条件

1.3.5.1 培养温度的选择 以培养温度为自变量,保持培养时间48h、起始pH 7.0等其它培养条件不变,根据1.3.5节中氨肽酶活力的测定方法,分析不同培养温度(35,36,37,38,39℃)对菌株XYY1产氨肽酶活力的影响,试验重复3次,计算平均值。

1.3.5.2 培养时间的选择 以培养时间为自变量,保持培养温度为36℃、起始pH 7.0等其它培养条件不变,根据1.3.5节中氨肽酶活力的测定方法,分析不同培养时间(12,24,36,48,60h)对菌株XYY1产氨肽酶活力的影响,试验重复3次,计算平均值。

1.3.5.3 起始pH值的选择 以起始pH值为自变量,保持培养温度为36℃、培养时间48h等其它培养条件不变,根据1.3.5节中氨肽酶活力的测定

方法,分析不同起始 pH 值(4.5,5.5,6.5,7.5,8.5,9.5,10.5)对菌株 XYY1 产氨肽酶活力的影响,试验重复 3 次,计算平均值。

1.3.6 响应面试验 根据菌株的基础培养条件,在单因素实验的基础上,按照 Box-Behnken 中心的综合工程设计基本原理,系统设计了三因素三水平的响应面解析试验,一共 17 个测试点,当中 12 个为析因点,另外 5 个零点重复,以计算测试偏差,即对每毫升酶液的氨肽酶活性的最大响应值(Y)。培养时间的 3 个水平分别是 36,48,60 h;培养温度的 3 个水平分别是 35,36,37 °C;起始 pH 值的 3 个水平,依次是 5.5,6.5,7.5^[23-25]。

表 1 Box-Behnken 设计因素及水平表

因素水平	培养时间(A) /h	培养温度(B) /°C	起始 pH 值 (C)
-1	35	36	5.5
0	36	48	6.5
1	37	60	7.5

1.3.7 部分酶学性质的研究

1.3.7.1 粗酶液的制备及其性质研究 1.3.6 节中优化的培养条件下培养菌株获得发酵液,在 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min,弃去沉淀,上清液为粗酶液^[26],且将本试验筛选出的地衣芽孢杆菌所产的氨肽酶命名为 Lap-Y。

1.3.7.2 最适反应温度测定试验 将酶液分别在 30,35,40,45,50,55,60,65,70 °C 恒温水浴中保温 10 min,按照 1.3.2 节的方法测定氨肽酶活,以 50 °C 条件下的测得的酶活为 100%,计算其它温度下的相对酶活(对照组酶活平均值减去试验组酶活平均值的绝对值与对照组酶活平均值的比值),取 3 次试验的平均值作为试验结果,比较不同温度对酶活性的影响。

1.3.7.3 热稳定性测定试验 将等量的酶液置于不同温度(50,60,70,80,90 °C)的培养箱中保温 1 h 后,分别于 0,5,10,15,30,60 min 取样,按照 1.3.2 节的方法测定氨肽酶活,于最适反应温度下测定酶活,以保温前酶液的酶活为 100%,计算出其它相应温度下的相对酶活(同 1.3.7.2 节中相对酶活定义),取 3 次试验的平均值作为试验结果,

得温度稳定性曲线。

1.3.7.4 最适反应 pH 值测定试验 配制不同 pH 值梯度(6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,11.0)的反应缓冲液,按照氨肽酶活的测定方法,于最适反应温度下测定酶活,以 pH 9.0 条件下的酶活为 100%,计算其它梯度下的相对酶活(同 1.3.7.2 节中相对酶活定义),取 3 次试验的平均值作为试验结果,比较不同 pH 值对酶活性的影响。

1.3.7.5 pH 值稳定性测定试验 用不同 pH 值的缓冲液,将原始酶液进行相同倍数的稀释,使得酶液达到相应的 pH 值(6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,11.0),室温条件下保存 1 h 后,按照氨肽酶活的测定方法,于最适反应温度与最适 pH 值条件下测定酶活,以标准条件下 pH 9.0 的酶液测得的酶活为 100%,计算其它梯度下的相对酶活(同 1.3.7.2 节中相对酶活定义),取 3 次试验的平均值作为试验结果,得出 pH 值稳定性曲线。

1.3.7.6 金属离子对酶活的影响 在酶液中分别加入 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子,且设定 0.1,1,10 mmol/L 的浓度梯度^[27],按照氨肽酶活的测定方法,于最适反应温度与最适 pH 值条件下测定酶活,以不添加金属离子的样品为对照,计算其它样品的相对酶活(同 1.3.7.2 节中相对酶活定义),比较不同浓度的金属离子对酶活性的影响。

1.3.7.7 抑制剂对酶活的影响 将酶液溶于缓冲液中,分别加入各种蛋白酶抑制剂(PMSF、EDTA、Pepstatin、DTT、SDS)至终质量浓度为 1 mg/mL^[28-29],在室温下放置 1 h 后,按照氨肽酶活的测定方法,于最适反应温度与最适 pH 值条件下测定酶活,以不加抑制剂的样品为对照,计算其它样品的相对酶活(对照组酶活平均值减去试验组酶活平均值的绝对值与对照组酶活平均值的比值),比较各种抑制剂对氨肽酶活性的影响。

1.3.7.8 底物对酶活的影响试验 将酶液溶于缓冲液中,不改变酶活测定的其它条件,只更换底物(L-Leu-PNA、L-Arg-PNA、L-Val-PNA、L-Pro-PNA)^[30],按照氨肽酶活的测定方法,于最适反应温度与最适 pH 值条件下测定酶活,以 L-亮氨酸-对硝基苯胺作为对照,计算其它浓度下的相对酶活(对照组酶活平均值减去试验组酶活平均值的绝

对值与对照组酶活平均值的比值),比较不同底物对亮氨酸氨肽酶的影响。

2 结果与分析

2.1 氨肽酶产生菌的筛选

豆酱以高渗环境抑制发酵过程中杂菌的污染,芽孢杆菌作为豆酱发酵过程中的优势菌株,在豆酱中具有较高的丰度。因此本试验对传统发酵豆酱中分离出的芽孢菌株对进行初筛,得到6株具有黄色水解圈的芽孢菌株,并通过比较氨肽酶活复筛得一株氨肽酶活力较高的芽孢菌株,现将其命名为 XYY1,继续后续试验。

2.2 氨肽酶产生菌的鉴定

XYY1 菌落呈白色、扁平状,表面粗糙且边缘褶皱不整齐的形态(如图2a);革兰氏染色呈阳性,其菌体形态为杆状,单生,产生近中生的椭圆状芽孢,包囊稍膨大,无荚膜,无鞭毛,能运动(如图2b),扫描电镜下菌体呈长杆状(如图2c)。生化分析显示该菌可发酵阿拉伯糖、麦芽糖、甘露醇、木糖、葡萄糖,且VP试验为阳性,能分解葡萄糖产生丙酮酸;不能发酵柠檬酸盐与丙酸盐,酶触试验与脲酶试验均为阳性,可降解淀粉,可将硝酸盐还原为亚硝酸盐(表3)。对 XYY1 进行 16S rDNA 测序,所得序列在 GenBank 中上传获得序列登录号为 MW301117.1。通过 NCBI 数据库 BLAST 序列比对和系统发育树分析,证实菌株 XYY1 与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) strain CI-IRC、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) strain MRPDSCV17203 等菌株聚类在同一分枝上(图3),结合形态学观察和生理生化检测结果,确定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)^[31],命名为地衣芽孢杆菌 XYY1(*Bacillus licheniformis*)

表2 初筛产生水解圈的菌株

Table 2 A strain that produces hydrolytic rings at first screening

菌株编号	水解圈直径(D)/cm
YB-01	0.8
YB-02	1.1
YB-05	0.5
YB-06	0.2
XYY1	1.5
YB-09	1.0

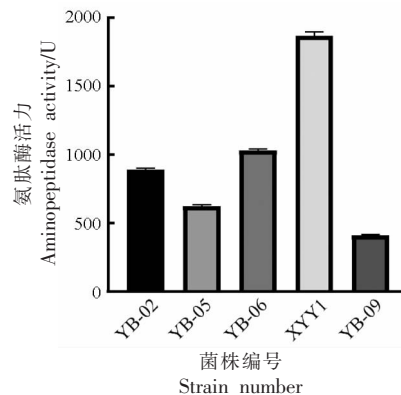


图1 产生水解圈菌株发酵液中的酶活力

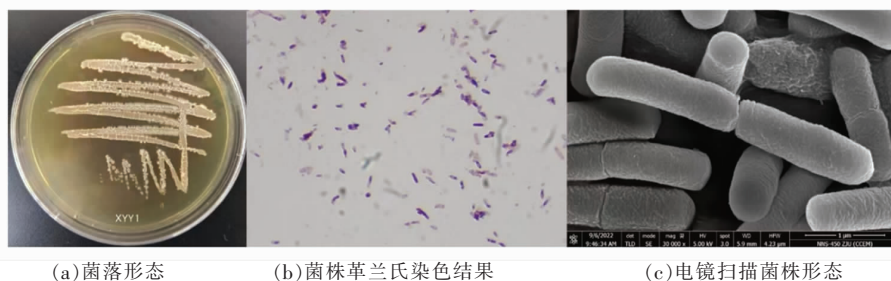
Fig.1 Enzyme activity in the fermentation broth of strains producing hydrolysis zones

表3 菌株 XYY1 的生理生化鉴定结果

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain XYY1

生理生化鉴定项目	结果	生理生化鉴定项目	结果
淀粉水解试验	+	阿拉伯糖	+
触酶试验	+	麦芽糖	+
VP 试验	+	葡萄糖	+
脲酶试验	+	甘露醇	+
柠檬酸盐	-	木糖	+
丙酸盐	-	硝酸盐还原	+

注:“+”表示结果为阳性,“-”表示结果为阴性。



(a) 菌落形态

(b) 菌株革兰氏染色结果

(c) 电镜扫描菌株形态

图2 菌株 XYY1 的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of strain XYY1

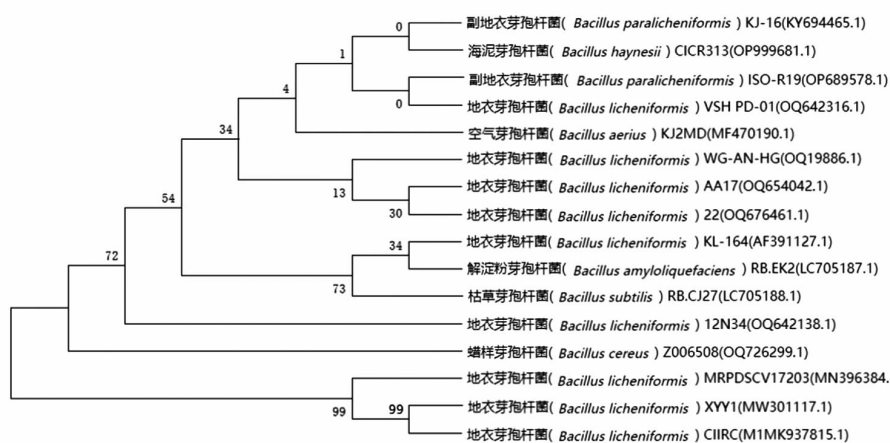


图 3 菌株 XYY1 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain XYY1

XYY1), 于中国典型微生物保藏中心专利保藏, 菌株专利保存编号为 M2022734。

2.3 氨基酸酶产生菌的耐盐能力

芽孢杆菌可应用于如豆酱、泡菜等食品的发酵过程中^[32], 而其作为发酵剂, 必须具备一定的耐盐能力^[33]。本试验通过菌株在含有不同质量分数 NaCl 的液体培养基中的生长情况, 分析菌株的耐盐性。因为本研究中筛选菌株的样品为传统发酵豆酱, 其盐的质量分数大约在 20%, XYY1 菌株筛选于高盐浓度的发酵豆酱, 在 NaCl 质量分数为 10%、20% 时菌株生长良好, 当 NaCl 质量分数为 30% 时菌株虽出现生长缓慢的情况, 但仍有半数菌株可以正常生长。当 NaCl 质量分数为 40% 时, 菌株出现明显的生长受限, 说明 XYY1 菌株具有非常强的耐盐能力。

2.4 培养温度对 XYY1 产氨基酸酶活力的影响

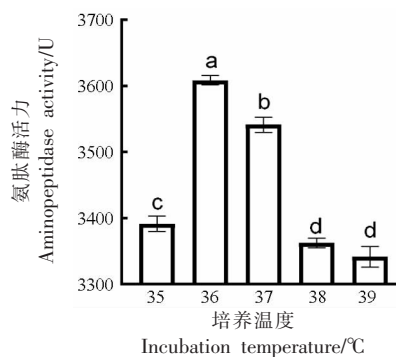
温度是影响微生物生长和发酵的重要参数之一, 通过温度的控制可以调控微生物代谢能力。由图 4 可得, 当培养温度为 35~36 °C 时, XYY1 产氨基酸酶活力逐渐上升, 随后 XYY1 产氨基酸酶活力随温度升高开始降低。推测可能的形成原因是: 培养温度过低会导致菌株生长繁殖减慢, 减少了产氨基酸酶的产量; 培养温度过高, 菌株的生长繁殖加快, 提早进入生长衰亡期, 菌株代谢能力减弱, 导致产氨基酸酶的活力下降^[34]。当温度为 36 °C 时 XYY1 产氨基酸酶活力升至最大为 $(3\ 608.65 \pm 7.02)U$, 与 35 °C 和 37 °C 相比氨基酸酶活力分别提高了 68.25%,

表 4 菌株在不同质量分数 NaCl 下的生长情况

Table 4 Growth of strains at different NaCl mass fraction

菌株	耐盐情况			
	10%	20%	30%	40%
XYY1	+++	+++	++	+

注: “+”代表生长情况受限, “++”代表生长情况缓慢, “+++”代表生长情况良好。



注: a、b、c、d 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 培养温度对 XYY1 产氨基酸酶活力的影响

Fig.4 Effects of culture temperature on aminopeptidase production activity of XYY1

17.37% ($P < 0.05$)。一般而言, 微生物生长和代谢产酶的最佳温度因种类不同而有所差异, 如郭宇星等^[35]研究发现瑞士乳杆菌产氨基酸酶的温度优选为 33~37 °C, 陈国恒等^[36]研究发现嗜热链球菌 KM-022 的最适产氨基酸酶温度为 40 °C, 张皎皎等^[37]研究发现甲基营养型芽孢杆菌 WM-1 的最适产氨

肽酶温度为 30 ℃。

2.5 培养时间对 XYY1 产氨肽酶活力的影响

由图 5 可得, 培养时间在 12~36 h 时, XYY1 产氨肽酶活力逐渐上升, 在 36 h 时菌株产氨肽酶活力达到最高点, 为 $(3\ 918.66 \pm 10.11)U$, 与 24 h 和 48 h 相比氨肽酶活力分别提高了 12.52% 和 23.00% ($P < 0.05$), 随后开始缓慢降低。推测是由于菌株在 36 h 正处于稳定期, 次级代谢产物氨肽酶大量产生, 随着培养时间继续延长, 进入衰亡期后活菌数下降导致氨肽酶的合成量减少^[38]。陈雅惠等^[39]研究发现, 随着培养时间的增加, 地衣芽孢杆菌 E7 培养体系中失活的酶量逐渐增加, 导致氨肽酶活力逐渐降低, 与本研究的试验结果相一致。不同种类的微生物最佳产酶时间虽具有差异, 但通常细菌最佳产酶时间略短于霉菌, 如蜡样芽孢杆菌 M2 的最佳产酶时间为 24 h^[40], 溶藻弧菌 S10 最佳产酶时间为 36 h^[41], 而团青霉 M4 的最佳产酶时间为 48 h^[42]。

2.6 起始 pH 值对 XYY1 产氨肽酶活力的影响

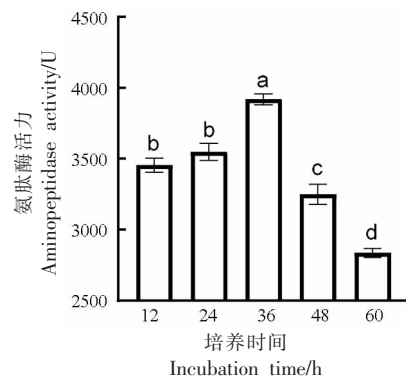
pH 值是调控微生物生长代谢重要的参数之一, 其通过影响微生物细胞结构, 即细胞膜的通透性、微生物合成酶种类和组成以及营养物质的状态来影响微生物代谢活动^[43]。起始 pH 值对 XYY1 产氨肽酶活性的影响如图 6 所显示, 在起始 pH 值在 4.5~6.5 范围时, XYY1 产氨肽酶活性持续提高, 随着起始 pH 值的变大, XYY1 产氨肽酶活性也呈现降低态势。起始 pH 为 6.5 时, XYY1 产氨肽酶活性最高为 $(3\ 668.66 \pm 6.45)U$, 与起始 pH 5.5 和起始 pH 7.5 相比氨肽酶活力分别提高了 71.66% 和 16.57% ($P < 0.05$)。检测分离本文芽孢菌的豆酱样品 pH 值为 6.43, 表明该菌生长环境 pH 值与其适宜产酶培养条件相吻合。

2.7 响应面试验

菌株 XYY1 产氨肽酶含量响应面试验结果见表 5, 方差分析见表 6。应用 Design Expert 10 软件对表 4 中的数据进行分析, 回归模型如下:

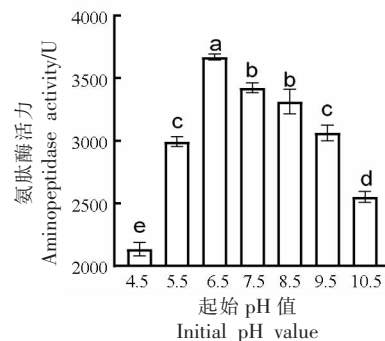
$$Y = 3932.86 - 182.71A - 155.50B - 8.32C - 112.66AB - 60.04AC - 96.26BC - 659.68A^2 - 373.94B^2 - 636.46C^2$$

提高对模型中的回归系数进行显著性试验, 结果见下表 6。一次项中的 A、B、C; 交互项中的 B



注: a、b、c、d 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 培养时间对 XYY1 产氨肽酶活力的影响
Fig.5 Effects of culture time on aminopeptidase production activity of XYY1



注: a、b、c、d 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 起始 pH 值对 XYY1 产氨肽酶活力的影响
Fig.6 Effects of initial pH value on aminopeptidase production activity of XYY1

和 C 之间的交互作用; 二次项中的 A 对 XYY1 产氨肽酶活力都有显著影响 ($P < 0.05$)。通过对比回归方程中各系数绝对值的大小, 可以确定 3 种因素对 XYY1 产氨肽酶活性的影响顺序为 $A > B > C$ (培养时间 > 培养温度 > 起始 pH 值)。由此可知, 各个因素对氨肽酶活力的影响并不是简单的线性关系。去掉差异不显著项, 可以得到优化后的回归模型为 $Y = 3932.86 - 182.71A - 155.50B - 659.68A^2 - 373.94B^2 - 636.46C^2$ 。

模型有意义 ($P < 0.01$), 决定系数 $R^2 = 0.9735$, 说明此模型可以解释 97.35% 的数据; 变异系数 $CV = 4.49\%$, CV 值较小, 说明试验误差较小^[44]。数据显示, 本研究获取模型的响应值和自变量的线性关系显著, 为地衣芽孢杆菌高产氨肽酶提供理论预测。利用响应面分析试验结果中的 P 值可以

看出,所选的 3 个因素都能影响地衣芽孢杆菌生长繁殖代谢产物氨肽酶活性,其中对 XYY1 产氨肽酶影响较为重要的原因是培养时间。这可能是

由于特定环境温度可以增加菌株产氨肽酶的活力与稳定性^[45]。

表 5 响应面分析试验设计方案及结果

Table 5 Response surface analysis test design scheme and results

试验号	培养时间 (A)/h	培养温度 (B)/°C	起始 pH 值(C)	Y/(U/mL)	试验号	培养时间 (A)/h	培养温度 (B)/°C	起始 pH 值(C)	Y/(U/mL)
1	36	36	6.5	3 867.50	10	36	35	5.5	2 986.09
2	36	36	6.5	3 867.77	11	36	35	7.5	3 051.35
3	36	36	6.5	3 951.55	12	24	48	6.5	3 077.97
4	48	35	6.5	3 115.88	13	36	48	5.5	3 020.17
5	36	36	6.5	4 039.70	14	24	36	5.5	2 784.36
6	24	37	6.5	2 907.91	15	24	36	7.5	3 032.49
7	36	36	6.5	3 937.77	16	48	36	7.5	2 369.00
8	48	37	6.5	2 495.17	17	36	37	7.5	2 632.22
9	48	35	5.5	2 361.02					

表 6 方差分析表

Table 6 Analysis of variance table

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5 140 000.00	9	571 100.00	28.600	<0.0001	**
A	267 100.00	1	267 100.00	13.370	0.0081	**
B	193 400.00	1	193 400.00	9.690	0.0170	*
C	554.11	1	554.11	0.028	0.8724	
AB	50 771.36	1	50 771.36	2.540	0.1548	
AC	14 418.01	1	14 418.01	0.720	0.4236	
BC	37 065.88	1	37 065.88	1.860	0.2153	
A ²	1 832 000.00	1	1 832 000.00	91.760	<0.0001	**
B ²	588 800.00	1	588 800.00	29.480	0.0010	**
C ²	1 706 000.00	1	1 706 000.00	85.410	<0.0001	**
残差	139 800.00	7	19 969.20			
失拟项	119 500.00	3	39 829.17	7.850	0.0376	*
误差项	20 296.85	4	5 074.21			
总和	2 280 000.00	16				
R ² =0.9735	R ² _{adj} =0.9395		CV=4.49%			

注:“*”表示差异显著($P<0.05$);“**”表示差异极显著($P<0.01$)。

各变量间的相互作用对菌株产氨肽酶含量影响见图 7 所示。

通过响应面可很明显的看出最优值点及各参数之间的交互作用^[46],由图 7 可知,随各因素水平的增加,所有响应面开口均朝下,拟合曲线均为凸形,存在极大值,氨肽酶活力随着培养时间、培养温度及起始 pH 值的变化呈先增大后减小的趋

势。通过图 7 可知,培养时间的坡度大于培养温度的坡度,表明在 AB 交互作用中培养时间的影响比较大。培养温度和起始 pH 值的椭圆程度大,表明 AC 的交互作用影响也很显著,与方差分析结果一致。培养时间与起始 pH 值的坡度陡峭且颜色变化快,表明 BC 二者交互作用对菌株产氨肽酶活力影响较显著。

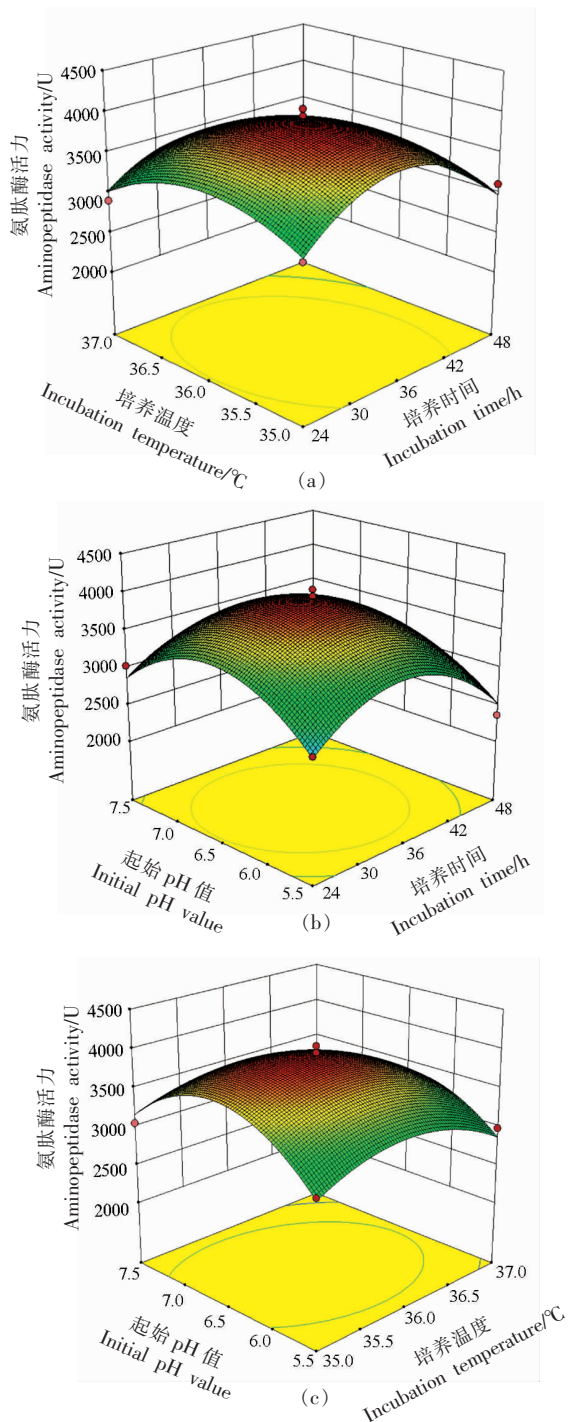


图7 培养时间、培养温度与起始pH值交互作用对YYY1产氨肽酶活力影响的响应面图

Fig.7 The contour plot and surface response of culture time, culture temperature and initial pH value content on YYY1

结合回归模型和响应面图分析得出最佳培养条件为:培养时间为34.528 h,培养温度为35.819

℃,起始pH值为6.513,此最优条件下预测YYY1产氨肽酶活力为4 039.70 U。结合实际情况,设定培养时间为35.5 h,培养温度为36℃,起始pH值为6.5,在此条件下培养菌株并检测氨肽酶活力进行验证,试验结果为 $(4\ 132.75 \pm 11.94)U$,与模型预测值基本吻合,表明模型可靠。

2.8 粗酶性质的研究

2.8.1 氨肽酶的最适反应温度 从图8可见,反应温度为55℃时氨肽酶Lap-Y的相对活性最高,达到121%。反应温度在50~60℃范围,相对酶活较高。温度高于55℃时,相对酶活开始降低,可能是因为高于最适反应温度,氨肽酶与水解底物结合受到影响,酶活下降。然而,在60℃和65℃时,Lap-Y活性分别达到109%和89%,即在高温条件下,该酶仍有较高的活性。氨肽酶Lap-Y最适反应温度为55℃,与常见氨肽酶相比结果相近,例如地衣芽孢杆菌的BLAP最适反应温度为60℃^[47]、嗜热脂肪芽孢杆菌的LapII最适反应温度为55℃^[48]。汪晓东等^[49]发现枯草芽孢杆菌Zj016来源的氨肽酶最适反应温度为55℃。

2.8.2 氨肽酶的热稳定性 从图9可见,分别在50℃和60℃保温箱里保温60 min后氨肽酶Lap-Y仍保持80%左右的酶活;处理温度为70℃时,氨肽酶Lap-Y热稳定性明显降低,保温60 min后剩余酶活为初始酶活的50%;80℃保温60 min后剩余酶活为初始酶活30%左右;在90℃保温60 min后剩余酶活为初始酶活10%左右。说明该菌产氨肽酶具有良好的热稳定性。对比来自酱油曲霉的亮氨酸氨肽酶Lap1 75℃下保温60 min只能保持10%的相对酶活力^[50],进一步证明本研究中的氨肽酶Lap-Y具有良好的热稳定性,在食品加工产业应用上更具有优势。

2.8.3 氨肽酶的最适反应pH值 从图10可见,氨肽酶Lap-Y最适pH值为9.0,相对酶活有92%。细菌来源的氨肽酶绝大部分属于碱性氨肽酶,且最适反应pH值一般为6.0~9.0,只有少数氨肽酶不在该范围内^[51]。杨丽娜等^[52]从渤海海域海泥、海水样品中分离出一株高产氨肽酶LapX的蜡样芽孢杆菌,并进行酶学特性研究,结果表明氨肽酶LapX的最适作用pH值为8.5,当pH值小于7.0或大于10.0时,其相对酶活均不足60%,这与

本试验的研究结果相符合,提示该菌所产的氨基酸酶 Lap-Y 是一种弱碱性氨基酸酶。

2.8.4 氨基酸酶的 pH 值稳定性 图 11 可以看出, pH 值在 8.0~9.0 时酶的稳定性在缓慢上升,而当 pH 值小于 8.0 时酶稳定性较低,大于 9.0 时酶的稳定性急剧下降,Lap-Y 在 pH 8.0~10.0 范围相对稳定,在 pH 8.0 和 pH 10.0 缓冲液中酶活达到

112%和 96%,且 pH 9.0 时酶活最稳定,推测可能是因为过高或过低的 pH 值都会使酶蛋白变性而失活,所以在进行工业化生产时可通过控制 pH 值在 8.0~10.0 之间以保持其稳定性^[53]。综上,比起偏酸、中性或过碱性环境,弱碱性环境下的 Lap-Y 活性较好,稳定性最高,说明 Lap-Y 有一定的耐弱碱性。

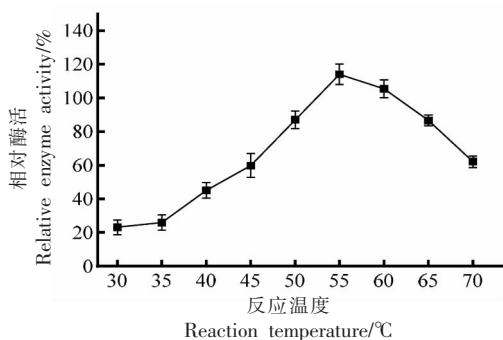


图 8 温度对 Lap-Y 酶活的影响

Fig.8 Effects of temperature on Lap-Y enzyme activity

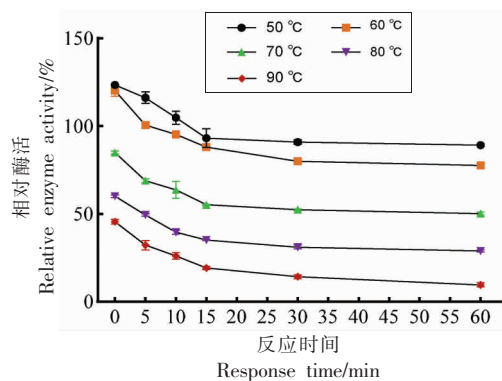


图 9 Lap-Y 的热稳定性

Fig.9 Thermal stability of Lap-Y

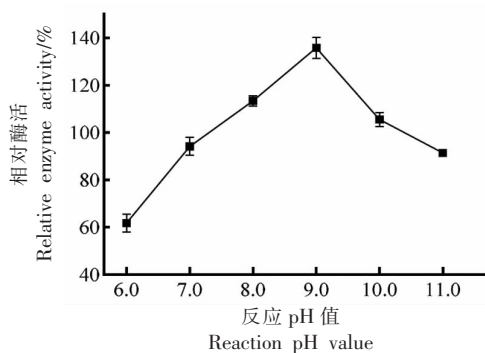


图 10 氨基酸酶 Lap-Y 的最适反应 pH 值

Fig.10 The optimal pH value for the reaction of aminopeptidase Lap-Y

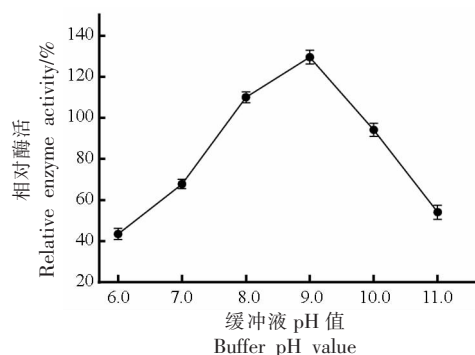


图 11 Lap-Y 的 pH 值稳定性

Fig.11 pH value stability of Lap-Y

2.8.5 金属离子对氨基酸酶酶活的影响 70%左右的氨基酸酶都是金属氨基酸酶,常见的金属离子有 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 等^[54],金属氨基酸酶的活性中心含有 1~2 个金属离子,在催化过程或者稳定蛋白质结构方面起着重要的作用^[55]。不同浓度的同一种金属离子和同一浓度的不同金属离子对氨基酸酶活性作用效果均不同^[56]。由表 7 所示, Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ca^{2+} 离子能激活菌株产氨基酸酶的活性, Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 浓度在 1.0 mmol/L 时激活作用比较强,

Ca^{2+} 在 0.1 mmol/L 时激活作用比较强,高浓度则抑制酶活性,其中 Mg^{2+} 对氨基酸酶 Lap-Y 的激活作用是所有试验组中最强的。 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 能够抑制氨基酸酶 Lap-Y 的酶活,陈晓飞等^[57]研究发现 Fe^{2+} 能够维持酶的高活力稳定性和复杂空间结构,其对芽孢杆菌菌株产酶有积极作用,这和本试验结论比较相符。孟昭旭等^[58]研究表明,氯化钙在低浓度时刺激了一些菌株的氨基酸酶活性,在高浓度时有抑制作用,与本试验的研究结果相符合。

表7 金属离子对Lap-Y酶活性的影响

Table 7 Effects of metal ions on Lap-Y enzyme activity

金属离子	金属离子浓度/ (mmol/L)	相对酶活/%
对照组	-	100.00
Co ²⁺	0.1	100.07
	1.0	115.99
	10.0	99.87
Fe ²⁺	0.1	103.18
	1.0	118.33
	10.0	99.07
Mg ²⁺	0.1	105.46
	1.0	120.40
	10.0	95.43
Ca ²⁺	0.1	103.97
	1.0	77.32
	10.0	23.48
Cu ²⁺	0.1	20.31
	1.0	23.79
	10.0	20.46
Zn ²⁺	0.1	24.32
	1.0	49.77
	10.0	32.37

注：“-”表示对照组不添加金属离子。

2.8.6 抑制剂对氨肽酶酶活的影响 从图12可见,丝氨酸蛋白酶抑制剂PMSF和胃蛋白酶抑制剂Pepstatin作用下的相对酶活分别为95%和97%,表明二者对氨肽酶Lap-Y活性无抑制作用。在金属螯合剂EDTA、蛋白质变性剂SDS和还原剂DTT作用下相对酶活明显降低,表明三者对氨肽酶Lap-Y活性有明显抑制作用,可能因为上述成分与酶进行作用后导致酶分子构象发生变化,使得酶失活^[59]。二价金属螯合剂EDTA能强烈地抑制氨肽酶的活性^[60],说明该氨肽酶一种金属酶,与2.8.5节中Mg²⁺、Zn²⁺和Co²⁺离子促进酶活的结果相一致。宋婷婷等^[61]通过研究米曲霉重组AAP的酶学性质,发现10 mmol/L的碘乙酰胺(I-AM)、PMSF和Pepstatin对AAP只有轻微的抑制作用,EDTA对AAP的抑制作用十分显著,该试验结果与本文试验结果相符合。

2.8.7 不同底物对氨肽酶酶活的影响 由表8可知,氨肽酶Lap-Y对L-Leu-PNA有较强的底物特异性,其作为底物时氨肽酶相对活力较高,符合

氨肽酶M17家族的水解特性,即具有严格的底物特异性的氨肽酶,它们只能特异性的水解某一种或一类氨基酸^[62-63]。在氨肽酶Lap-Y作用下,亮氨酸被释放游离出来,说明该酶优先水解N末端氨基酸残基为亮氨酸的多肽。酶解大分子蛋白质使得肽链中呈苦味的疏水氨基酸暴露出来,故大多数蛋白质的水解液呈苦味。亮氨酸作为产生苦味的疏水氨基酸被氨肽酶Lap-Y切除,从而去除蛋白质水解液的苦味。氨肽酶Lap-Y这一特性可应用于大豆多肽的苦味的去除^[64]。

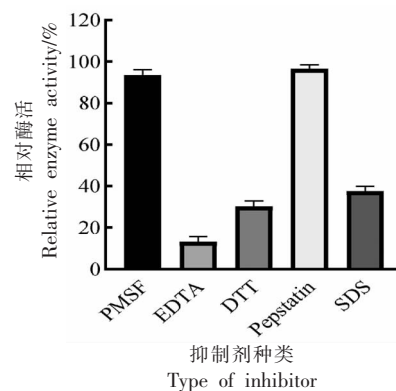


图12 抑制剂对Lap-Y酶活性的影响

Fig.12 Effects of enzyme inhibitors on Lap-Y enzyme activity

表8 不同底物对Lap-Y酶活性的影响

Table 8 Effects of different substrates on Lap-Y enzyme activity

底物	氨肽酶相对活力
L-Leu-PNA	+
L-Arg-PNA	-
L-Val-PNA	-
L-Pro-PNA	-

注：“+”代表能测到酶活，“-”代表不能测到酶活。

3 结论

本文筛选出一株产氨肽酶的芽孢菌XYY1,经鉴定该菌株为地衣芽孢杆菌,通过响应曲面法优化XYY1菌株的适宜培养条件:培养温度36℃、培养时间35.5 h、起始pH值为6.5,在此条件下,XYY1菌株产氨肽酶活力为(4132.75±11.94)U,显著提高了79.52%。探究了该氨肽酶的酶学性质,该氨肽酶的最适反应温度55℃,在50℃条件下保存60 min仍保持89%的酶活;最适反应pH

9.0, 且在 pH 8.0~10.0 之间都保持 90% 以上的酶活; Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ca^{2+} 金属离子促进酶活, 且 1.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 对氨肽酶起最强激活作用; EDTA、SDS、DTT 对酶都具有较强的抑制作用; XYY1 菌株所产的氨肽酶为单一酶, 具有较强的底物特异性。本试验结果表明, 产氨肽酶的地衣芽孢杆菌对食品、医疗等产业具有极高的应用价值, 为发掘具有潜在产业化价值的氨肽酶奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 黄甜, 孟勇, 张秀红, 等. 氨肽酶在食品中的研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(19): 20–22.
HUANG T, MENG Y, ZHANG X H, et al. Research progress of aminopeptidase in food[J]. Modern Food, 2022, 28(19): 20–22.
- [2] LAMBRE C, BARAT B J M, BOLOGNESI C, et al. Safety evaluation of the food enzyme leucyl aminopeptidase from the genetically modified *Aspergillus oryzae* strain NZYM - BU[J]. EFSA Journal, 2024, 22(4): e8717.
- [3] JIN K T, JAE K M, JI K Y, et al. Characterization of an aminopeptidase A from *Tetragenococcus halophilus* CY54 isolated from Myeolchi - Jeotgal[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 33(3): 371–377.
- [4] PASCUAL A I, RIVERA M L, ALMEIDA G F, et al. Bufadienolides preferentially inhibit aminopeptidase N among mammalian metallo-aminopeptidases; relationship with effects on human melanoma MeWo cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 229: 825–837.
- [5] 周慧娉, 李静, 邓毛程, 等. 亮氨酸氨肽酶产生菌筛选与特性的研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 98–101.
ZHOU H P, LI J, DENG M C, et al. Screening and characteristics of leucine aminopeptidase-producing strain[J]. China Brewing, 2017, 36(2): 98–101.
- [6] WANG Y W, ZHAO P Y, ZHOU Y, et al. From bitter to delicious: Properties and uses of microbial aminopeptidases[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2023, 39(3): 72.
- [7] WANG B R, HUANG Y M, LI N, et al. Initial soil formation by biocrusts: Nitrogen demand and clay protection control microbial necromass accrual and recycling[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2022, 167(4): 1354–1355.
- [8] 何杉杉, 王晓蕊, 彭禹熙, 等. 雪莲菌中乳酸菌的益生特性[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 210–216.
HE S S, WANG X R, PENG Y X, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Keflr grain[J]. Food Science, 2022, 43(2): 210–216.
- [9] 张伟, 金庭飞, 黎旭, 等. 新疆传统乳制品中产蛋白酶乳酸菌的筛选及产酶条件优化[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 101–106.
ZHANG W, JIN T F, LI X, et al. Screening of protease-producing lactic acid bacteria from Xinjiang traditional dairy products and optimization of enzymatic production conditions[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 101–106.
- [10] 韩巍巍, 侯俊财, 曹秋阁, 等. 不同生长阶段保加利亚乳杆菌关键蛋白酶基因表达变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 13–19.
HAN W W, HOU J C, CAO Q G, et al. Changes of key protease gene expression in *Lactobacillus bulgaricus* at different growth stages[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(3): 13–19.
- [11] ATSUSHI O, MASAFUMI T. Characterization of the enzymatic properties of human RNPEPL1/aminopeptidase Z[J]. Journal of Biochemistry, 2022, 173(4): 316–326.
- [12] 任楠楠, 王晓辉, 迟乃玉, 等. 海洋低温甾醇酯酶菌株的筛选鉴定及其酶学特性研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(1): 37–41.
REN N N, WANG X H, CHI N Y, et al. Screening and identification of a low temperature sterol esterase-producing strain from marine and its enzymatic properties[J]. China Brewing, 2019, 38(1): 37–41.
- [13] 范智义, 邓维琴, 李恒, 等. 传统发酵调味品低盐化的研究进展[J]. 中国调味品, 2020, 45(7): 194–200.
FAN Z Y, DENG W Q, LI H, et al. Research progress on the desalination of traditional fermented condiment[J]. China Condiment, 2020, 45(7): 194–200.
- [14] 邓扬龙. 郫县豆瓣中产气微生物的分离、鉴定及其生物特性研究[D]. 成都: 西华大学, 2020.
DENG Y L. Isolation, identification and biological

- characteristics of the aerogenic microorganism in Pixian broad bean paste[D]. Chengdu: Xihua University, 2020.
- [15] 王庆, 王超彦, 徐海林, 等. 高温大曲中高产四甲基吡嗪芽孢杆菌的分离鉴定及发酵条件优化 [J]. 中国酿造, 2022, 41(10): 125–129.
- WANG Q, WANG C Y, XU H L, et al. Isolation and identification of high-yield tetramethylpyrazine *Bacillus* from high-temperature Daqu and optimization of fermentation conditions [J]. China Brewing, 2022, 41(10): 125–129.
- [16] JOANY P R, ALEJANDRO T J, LOURDES V T, et al. Intracellular aminopeptidase activity determination from the fungus *Sporisorium reilianum*: Purification and biochemical characterization of psrAPEi enzyme[J]. Current Microbiology, 2022, 79(3): 90.
- [17] LI Y L, LI Y, WEN L F, et al. Reliability analysis of tensile crack resistance in high asphalt core based on mixed-level uniform design and response surface method [J]. International Journal of Geomechanics, 2023, 23(2): 10.
- [18] GORDANA G C, DRAGICA J, LJILJANA Z, et al. Synthesis of octenyl succinic anhydride-modified levan and investigation of its microstructural, physicochemical, and emulsifying properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242(10): 8480–8489.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 91–100.
- DONG X Z, CAI M Y. Handbook for the identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 91–100.
- [20] 张庆芳, 迟乃玉. 微生物实验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2001: 119–141.
- ZHANG Q F, CHI N Y. Microbial experimental technique[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2001: 119–141.
- [21] 刘琨毅, 王利妍, 安江珊, 等. 接种地衣芽孢杆菌发酵的普洱茶品质与微生物群落分析[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(2): 108–118.
- LIU K Y, WANG L Y, AN J S, et al. Analysis on the quality and microbial community of Pu'er tea inoculated with *Bacillus licheniformis* [J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(2): 108–118.
- [22] BODZEN A, JOSSIER A, DUPONT S, et al. Increased survival of *Lactococcus lactis* strains subjected to freeze-drying after cultivation in an acid medium: Involvement of membrane fluidity cultivation in acid medium to improve bacterial survival of freeze-drying[J]. Food Technology and Biotechnology, 2021, 59(4): 443–453.
- [23] 陈阳, 孙代华, 江丹, 等. 响应面分析法优化艾叶药渣中白坚木皮醇乙醇提取工艺[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(9): 90–96.
- CHEN Y, XUN D H, JIANG D, et al. Optimization of quebrachitol ethanol extraction from folium *Artemisiae argyi* extraction dregs by response surface methodology (RSM)[J]. China Food Additives, 2021, 32(9): 90–96.
- [24] 步营, 吕月月, 朱文慧, 等. 基于模糊数学与响应面分析法开发味噌风味鲮鱼罐头[J]. 中国调味品, 2021, 46(9): 90–94.
- BU Y, LÜ Y Y, ZHU W H, et al. Development of canned miso-flavor spanish mackerel based on fuzzy mathematics and response surface analysis [J]. China Condiment, 2021, 46(9): 90–94.
- [25] 艾仄宜, 李荣林, 叶禹彤, 等. 草莓粗酶液促进发酵改善秋季红茶的理化品质[J]. 现代食品科技, 2021, 37(8): 184–219.
- AI Z Y, LI R L, YE Y T, et al. Crude enzymatic solution of strawberry promotes fermentation and improves the physicochemical quality of autumn black tea[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 184–219.
- [26] 李明华, 孟秀梅, 王成龙. 纤维素酶高产菌筛选鉴定及酶学性质初步研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(8): 134–138.
- LI M H, MENG X M, WANG C L. Screening and identification of high-producing cellulose strain and enzymatic property[J]. China Brewing, 2021, 40(8): 134–138.
- [27] CHEN J X, WEDEKIND K, ESCOBAR J, et al. Trypsin inhibitor and urease activity of soybean meal products from different countries and impact of trypsin inhibitor on ileal amino acid digestibility in pig[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2020, 97(10): 1002.
- [28] 孙艺轩, 郑国栋, 林剑. 芽孢杆菌 NCB-01 胞外蛋白酶酶学特性的初步研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 128–133.
- SUN Y X, ZHENG G D, LIN J. Preliminary study

- of enzymatic characterization of extracellular protease from *Bacillus* NCB-01[J]. *China Brewing*, 2020, 39(8): 128-133.
- [29] MALCOLM T R, SWIDERSKA K W, HAYES B K, et al. Mapping the substrate specificity of the plasmodium M1 and M17 aminopeptidases [J]. *The Biochemical Journal*, 2021, 478(13): 2697-2713.
- [30] VERONICA B, MASSIMO P, MICHELA B, et al. An integrated analytical approach for the characterization of probiotic strains in food supplements [J]. *Nutrients*, 2022, 14(23): 5085.
- [31] HE H H, YU Q Q, DING Z Y, et al. Biotechnological and food synthetic biology potential of platform strain: *Bacillus licheniformis* [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(2): 1008-1016.
- [32] LEE M A, CHOI Y J, LEE H, et al. Influence of salinity on the microbial community composition and metabolite profile in kimchi [J]. *Fermentation*, 2021, 7(4): 308.
- [33] 李祥弟, 徐婷, 刘占, 等. 高产四乙基愈创木酚耐盐乳酸菌的筛选及其发酵特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(22): 33-40.
- LI X D, XU T, LIU Z, et al. Screening and fermentation characteristics of salt-tolerant lactic acid bacteria for high yield of 4-ethylguaiacol [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(22): 33-40.
- [34] AKCAN N. Cultural conditions optimization for production of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 under solid-state fermentation [J]. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2018, 43(3): 240-247.
- [35] 郭宇星, 潘道东, 田俊英. 瑞士乳杆菌产氨肽酶和X-脯氨酰-二肽酰基-氨基肽酶发酵条件的优化[J]. *食品科学*, 2009, 30(7): 148-153.
- GUO Y X, PAN D D, TIAN J Y. Optimization of fermentation conditions for aminopeptidase and X-prolyl-depeptidyl aminopeptidase (XPDAP) production by *Lactobacillus helveticus* [J]. *Food Science*, 2009, 30(7): 148-153.
- [36] 陈国恒, 李静, 邓毛程, 等. 氨肽酶产生菌筛选及其对乳肽发酵脱苦的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(19): 215-219.
- CHEN G H, LI J, DENG M C, et al. Screening of aminopeptidase producing bacteria for debittering milk peptide by fermentation [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(19): 215-219.
- [37] 张皎皎, 马富平, 李艳红, 等. 嗜水气单胞菌拮抗菌甲基营养型芽孢杆菌 WM-1 发酵条件优化[J]. *水产学报*, 2018, 42(7): 1124-1131.
- ZHANG J J, MA F P, LI Y H, et al. Fermentation optimization of a strain *Bacillus methylotrophilus* WM-1 against *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(7): 1124-1131.
- [38] 张艳芳, 孟广超, 王选年. ARTP 技术选育米曲霉氨肽酶高产菌株[J]. *中国调味品*, 2021, 46(12): 31-41.
- ZHANG Y F, MENG G C, WANG X N. Breeding of *Aspergillus oryzae* strains with high aminopeptidase productivity by ARTP technology [J]. *China Brewing*, 2021, 46(12): 31-41.
- [39] 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.
- [40] 王清龙, 陈园园, 刘延波, 等. 高产阿魏酸酯酶菌株的筛选鉴定及产酶条件优化[J]. *中国酿造*, 2022, 41(10): 83-88.
- WANG Q L, CHEN Y Y, LIU Y B, et al. Screening and identification of high-yield ferulic acid esterase strains and enzyme production condition optimization [J]. *China Brewing*, 2022, 41(10): 83-88.
- [41] 王艺欣, 张健, 刘芳, 等. 褐藻胶降解菌株 S10 鉴定及产酶条件优化[J]. *微生物学杂志*, 2023, 43(1): 66-76.
- WANG Y X, ZHANG J, LIU F, et al. Identification of alginate degradable strain S10 and the optimization of enzyme production conditions [J]. *Journal of Microbiology*, 2023, 43(1): 66-76.
- [42] 于华, 黄丹, 陈卓, 等. 四川腊肉中产脂肪酶霉菌筛选及产酶条件研究[J]. *中国食品添加剂*, 2016(12): 78-83.
- YU H, HUANG D, CHEN Z, et al. Study on screening of lipase mould and its enzyme-producing conditions in Sichuan bacon [J]. *China Food Additives*, 2016(12): 78-83.
- [43] 刘璐, 陈洲, 陈瑶瑶, 等. 黄曲霉产胞外 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶的发酵条件优化[J]. *食品科学技术学报*, 2019, 37(1): 28-35.

- LIU L, CHEN Z, CHEN Y Y, et al. Optimization of fermentation conditions for β -1, 3-1, 4-gluco-*canase* production by *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(1): 38-35.
- [44] 段志霞, 宋洁, 赵娜. 基于响应面分析的沙蟹汁制备工艺优化及其风味研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(12): 116-119.
- DUAN Z X, SONG J, ZHAO N. Optimization of preparation technology and *Ocypode* juice based on response surface analysis[J]. China Condiment, 2022, 47(12): 116-119.
- [45] 周巧, 张梦梅, 李建龙, 等. 丝状真菌降解拟除虫菊酯类农药和 3-苯氧基苯甲酸研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(19): 207-219.
- ZHOU Q, ZHANG M M, LI J L, et al. Research progress on the degradation of pyrethroids and 3-phenoxybenzoic acid by filamentous fungi[J]. Food Science, 2023, 44(19): 207-219.
- [46] PILER C D S W, MARIA W N R, SANTOS O F, et al. Evaluation of the effects of canning variables on the mineral composition of canned cowpeas (*Vigna unguiculata* l. Walp) using multi-response analysis[J]. Food Science and Technology International, 2023, 30(3): 10820132221146593.
- [47] LEI F, ZHAO Q, SUN-WATERHOUSE D, et al. Characterization of a salt-tolerant aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 that improves hydrolysis and debittering efficiency for soy protein isolate[J]. Food Chemistry, 2017, 214: 347-353.
- [48] WANG F, NING Z, LAN D, et al. Biochemical properties of recombinant leucine aminopeptidase II from *Bacillus stearothermophilus* and potential applications in the hydrolysis of Chinese anchovy (*Engraulis japonicus*) [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2012, 60(1): 165.
- [49] 汪晓东, 田亚平. 枯草芽孢杆菌 ZH-Zj016 产亮氨酸氨肽酶的发酵控制研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(8): 192-195, 200.
- WANG X D, TIAN Y P. Study on fermentation control study for leucine aminopeptidase production by *Bacillus subtilis* ZH-Zj016[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(8): 192-195, 200.
- [50] HUANG W Q, ZHONG L F, MENG Z Z, et al. The structure and enzyme characteristics of a recombinant leucine aminopeptidase rLap1 from *Aspergillus sojae* and its application in debittering[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 177(1): 190-206.
- [51] 黄甜, 孟勇, 张秀红, 等. 氨肽酶在食品中的研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(19): 20-22.
- HUANG T, MENG Y, ZHANG X H, et al. Research progress of aminopeptidase in food[J]. Modern Food, 2022, 28(19): 20-22.
- [52] 杨丽娜, 迟乃玉, 石群, 等. 海洋氨肽酶菌株的筛选鉴定及其酶学特性研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(3): 66-70.
- YANG L N, CHI N Y, SHI Q, et al. Isolation and identification of a aminopeptidase-producing strain from marine and its enzymatic properties[J]. China Brewing, 2017, 36(3): 66-70.
- [53] 吕艳芳, 张思涵, 蔡路昀, 等. 南美白对虾酚氧化酶催化不同底物的生化特性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(23): 139-144.
- LÜ Y F, ZHANG S H, CAI L Y, et al. Biochemical characteristics of phenol oxidase in *Penaeus vannamei* on different substrates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(23): 139-144.
- [54] PETER C P S, NATALIE V B, CHAILLE W T, et al. Structure-based development of potent *Plasmodium falciparum* M1 and M17 aminopeptidase selective and dual inhibitors via S1'-region optimisation[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2023, 248: 115-152.
- [55] YUAN Y L, WANG F F, LI H, et al. Potential application of the immobilization of carbonic anhydrase based on metal organic framework supports[J]. Process Biochemistry, 2022, 122(2): 214-223.
- [56] 张洁, 张梁, 黄武宁, 等. 3 种氨肽酶基因在大肠杆菌中的重组表达与比较研究[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 200-205.
- ZHANG J, ZHANG L, HUANG W N, et al. A comparative study of recombinant expression of three aminopeptidases in *Escherichia coli*[J]. Food science, 2013, 34(23): 200-205.
- [57] 陈晓飞, 李珊珊, 刁文涛, 等. 高产 β -甘露聚糖酶菌株的分离鉴定及酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(9): 92-97.
- CHEN X F, LI S S, DIAO W T, et al. Isolation and identification of β -mannanase-producing strain and its enzymatic property[J]. China Brewing, 2021, 40(9): 92-97.

- [58] 孟昭旭, 易华西, 张兰威. 基于氨基酸酶活性和自溶性的非发酵剂乳酸菌的筛选[J]. 食品科技, 2019, 44(5): 1-7.
MENG Z X, YI H X, ZHANG L W. Screening non-starter lactic acid bacteria based on aminopeptidase activity and autolysis [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(5): 1-7.
- [59] MAN Z Y, FENG Y, XIAO J B, et al. Structural changes and molecular mechanism study on the inhibitory activity of epigallocatechin against α -glucosidase and α -amylase[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 948-959.
- [60] VERMILYEA D M, CROCKER A W, GIFFORD A H, et al. Calprotectin-mediated zinc chelation inhibits *Pseudomonas aeruginosa* protease activity in cystic fibrosis sputum [J]. Journal of Bacteriology, 2021, 203: 432-477.
- [61] 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. Allogeneic expression and enzymatic properties of APP gene from *Aspergillus oryzae* [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(5): 38-44.
- [62] YARINI A, LAURA R, ALEJANDRO P, et al. Bacitracin is a non-competitive inhibitor of porcine M1 family neutral and glutamyl aminopeptidases [J]. Natural Product Research, 2019, 35 (17): 2958-2962.
- [63] 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): 181-188.
- [64] 王金玲, 王雨浙, 王梓同, 等. 大豆多肽的制备及功能性研究进展[J]. 中国酿造, 2022, 41(1): 25-31.
WANG J L, WANG Y X, WANG Z T, et al. Progress on preparation and functionality of soybean polypeptides [J]. China Brewing, 2022, 40(1): 25-31.

Screening of a Marine Aminopeptidase Producing Bacterium and Its Enzymatic Properties

Li Dongqi^{1,2}, Cheng Jianghua^{1,2}, Wan Yaqiong^{1,2}, Xu Yayuan^{1,2*}

¹Institute of Agricultural Products Processing, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031

²Anhui Engineering Laboratory of Microbial Fermentation and Functional Application of Food, Hefei 230031)

Abstract Aminopeptidase as a protein hydrolase is widely used in food fermentation and processing. Screening high aminopeptidase-producing strains and studying the enzymatic properties of the flavor enzymes in the strains are important for the development of high-quality soybean product ferments. In this paper, an aminopeptidase-producing strain of *Bacillus* sp. XYY1 was screened using L-Leu-PNA as substrate in the isolation medium, and identified by morphological observation, physiological and biochemical tests, and 16S rDNA technology, and optimized the enzyme-producing culture conditions by using a one-factor experiment and response surface methodology, and studied the enzymatic properties of the aminopeptidase Lap-Y produced by strain XYY1. The enzyme properties of the aminopeptidase Lap-Y produced by strain XYY1 were investigated. The results showed that strain XYY1 was identified as *Bacillus licheniformis*, with a starting pH of 6.5, and the content of aminopeptidase was as high as (4,132.75±11.94) U when it was cultured at a constant temperature of 36 °C for 35.5 h. The study of the enzymatic properties showed that the relative activity of Lap-Y was highest at the reaction temperature of 55 °C with good thermal stability, and that the optimal pH was 9.0, which was good for enzyme stability in the neutral alkaline environment, which was alkaline. The optimum pH value was 9.0, and the enzyme was alkaline in a neutral alkaline environment. Metal ions Mg²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ and Ca²⁺ could activate the activity of Lap-Y, among which the activation effect of Mg²⁺ was the most significant for the aminopeptidase Lap-Y when Mg²⁺ was 1.0 mmol/L, and the activation effect of EDTA, dithiothreitol (DTT) and sodium dodecyl sulphate (SDS) had a stronger inhibitory effect on the activity of Lap-Y. inhibitory effect. The aminopeptidase Lap-Y produced by *Bacillus licheniformis* XYY1 is suitable for industrialized production and has high application value for food and medical industries.

Keywords *Bacillus licheniformis*; aminopeptidase; screening identification; enzymatic properties