

# 枯草芽孢杆菌ZH-Zj016产亮氨酸氨肽酶的发酵控制研究

汪晓东, 田亚平\*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

**摘要:**一种通过原生质体转化技术所获得的可产亮氨酸氨肽酶的枯草芽孢杆菌工程菌ZH-Zj016, 在对其发酵条件单因素初步优化的基础上, 通过控制最低溶氧、两阶段变温培养、细胞通透性调节等, 获得15L自控式发酵罐最适发酵条件: 初始pH8.0, 装液量8.0L, 发酵温度(15h前39℃, 15h后37℃), 培养时间28h, 接种量7%(V/V), 搅拌转速为250~500r/min, 罐压控制在0.06~0.08MPa, 通气量1.2vvm, 溶氧和搅拌转速相偶联, 最低溶氧维持在40%, 在此条件下, 酶活可达138U/mL, 与该菌摇瓶优化条件下相当, 是原野生菌15L发酵罐平均水平(6.5U/mL)的21倍。

**关键词:**枯草芽孢杆菌, 亮氨酸氨肽酶, 变温策略, 表面活性剂, 溶氧

## Study on fermentation control study for leucine aminopeptidase production by *Bacillus subtilis* ZH-Zj016

WANG Xiao-dong, TIAN Ya-ping\*

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

**Abstract:** A leucine aminopeptidase producing strain *Bacillus subtilis* ZH-Zj016 was obtained by protoplast transformation technology. Fermentation conditions of the strain were firstly optimized through single factor experiments. Then a series of fermentation control strategies, such as the minimum dissolved oxygen control, temperature-shift culture and cell permeability regulation, were performed and the optimal fermentation conditions for 15L fermenter was confirmed as follows: medium volume of 8L, initial pH8.0, 7% of inoculum volume, agitation rate of 250~500r/min pressure at 0.06~0.08MPa, 40% dissolved oxygen (DO) upholding (The DO and agitation rate were coupled), ventilation volume of 1.2vvm, culture temperature at 39℃ within 15h and shift to 37℃ thereafter. After fermentation for 28h, leucine aminopeptidase activity produced by the strain reached 138U/mL, which was 21 times of the original strain.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; leucine aminopeptidase; temperature-shift strategy; surfactant; dissolved oxygen

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)08-0192-05

氨肽酶是一类从多肽链的N端顺序水解氨基酸、使氨基酸逐个游离出来的酶, 能水解多肽和完整的蛋白质分子。氨肽酶不仅存在于高等动物的胰脏、肠液中, 而且广泛分布于多种真菌、细菌和原生动物体内, 一些真菌和细菌的种类还能向胞外分泌这种酶。氨肽酶的种类很多, 根据最适反应底物的不同可分为亮氨酸氨肽酶<sup>[1]</sup>、甲硫氨酰氨肽酶<sup>[2]</sup>、脯氨酰胺氨肽酶<sup>[3]</sup>等。同一种氨肽酶对不同的N端氨基酸残基的水解能力也不同<sup>[4]</sup>。其广泛应用于食品工业<sup>[5]</sup>、医学<sup>[6-7]</sup>及生物技术<sup>[8]</sup>等领域。亮氨酸氨肽酶作为肽酶M1或M17家族的成员之一, 是一种水解蛋白质分子或者多肽链N端亮氨酸残基的外肽酶, 其种类及功能得到了广泛的研究<sup>[9-10]</sup>。亮氨酸氨肽酶具有较大的商业潜力<sup>[11]</sup>,

如在生物活性肽的制备<sup>[12-13]</sup>、改善食品风味<sup>[14]</sup>、脱除蛋白水解液的苦味<sup>[15]</sup>及蛋白质的深度水解<sup>[16-18]</sup>等。此外, 其在医学上也有广阔的应用前景, 如对金黄色葡萄球菌致病性的影响<sup>[19]</sup>、防止*Fasciola hepatica*对羊类的感染<sup>[20]</sup>及对日本血吸虫感染中的抗体应答机制的影响<sup>[21]</sup>。因此, 氨肽酶的工业化生产对其广泛应用具有重要意义。本文通过优化培养温度、初始pH、装液量、接种量、摇床转速、溶氧等发酵条件及两阶段变温培养、表面活性剂和渗透压对氨肽酶分泌的影响的发酵控制策略来提高枯草芽孢杆菌ZH-Zj016产氨肽酶能力, 为其规模化生产创造良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

枯草芽孢杆菌ZH-Zj016 保藏编号: CGMCC No.6559, 是通过原生质体转化技术将质粒PMA-BSAP转化到枯草芽孢杆菌Zj016中, 获得的一株遗传稳定高产的亮氨酸氨肽酶菌株; L-亮氨酸-4-硝基苯胺(AR) 美国Alfa公司; 其他试剂 均为分析纯, 购

收稿日期: 2012-11-07 \* 通讯联系人

作者简介: 汪晓东(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物发酵生物活性物质研究。

基金项目: “十二五”国家863课题资助计划项目(2011AA100905)。

于国药集团化学试剂有限公司(上海);种子培养基 10.0g/L蛋白胨, 5.0g/L氯化钠, 5.0g/L牛肉膏, pH7.2; 发酵培养基 可溶性淀粉0.6%, 豆粕1.8%, 酵母膏2.4%, 甘油0.2%,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.6%,  $CoCl_2$  0.6mmol/L, 卡那霉素50.0 $\mu$ g/mL, pH8.0; 以上培养基均为121 $^{\circ}C$ 灭菌20min。

722型分光光度计 上海第三分析仪器厂; 电热恒温水浴锅 上海医疗器械五厂; Delta320型酸度计 梅特勒托力多公司; AL204型电子天平 Mettler; 立式压力蒸汽灭菌器 上海花线医用核子仪器有限公司; TG-328A型电光分析天平 梅特勒公司; Himac CR22G型高速冷冻离心机 日本日立(HITACHI)公司; 搅拌式发酵罐 B.Braun Biotech international; 真空冷冻干燥机 Verities。

### 1.2 实验方法

1.2.1 培养条件 摇瓶培养: 接种量7% (V/V), 装液量50mL/250mL, 回转式摇床转速220r/min, 37 $^{\circ}C$ 培养30h。

发酵罐培养: 全自动式15L发酵罐(B.Braun Biotech international), 装液量8.0L, 发酵温度(15h前39 $^{\circ}C$ , 15h后37 $^{\circ}C$ ), 接种量7% (V/V), 搅拌转速为250~500r/min, 罐压控制在0.06~0.08MPa, 通气量1.2vvm, 溶氧和搅拌转速相偶联, 最低溶氧设定为40%。

1.2.2 发酵条件的单因素实验 在装液量为50mL/250mL, 摇床转速220r/min, 发酵30h条件下, 分别对发酵培养基初始pH、发酵温度、接种量、溶氧等条件进行逐一优化。

1.2.3 不同表面活性剂及渗透压对细胞通透性及产氨肽酶酶活的影响 细胞通透性: 发酵液8000 $\times$ g离心10min后, 收集菌体, 用去离子水充分清洗, 分别溶于各种不同浓度的表面活性剂溶液中, 37 $^{\circ}C$ 培养10h, 检测体系中氨肽酶酶活的变化。对照加入等体积的去离子水, 细胞通透性的调节以每克湿菌体中氨肽酶的释放程度表征。

产氨肽酶酶活: 将粗酶液与不同浓度的表面活性剂或NaCl溶液混合, 37 $^{\circ}C$ 培养10h, 考察体系中氨肽酶酶活的变化。对照加入等体积的去离子水。

1.2.4 不同表面活性剂及渗透压对 *B. subtilis* ZH-Zj016 产氨肽酶分泌过程中的影响 *B. subtilis* ZH-Zj016 接种于发酵培养基中, 于37 $^{\circ}C$  220r/min振荡培养15h后分别添加不同浓度的Tween 80、SDS和NaCl溶液, 继续培养, 定时取样并检测发酵液中氨肽酶酶活的变化。

1.2.5 氨肽酶酶活测定方法 采用LNA法, 测定时, 首先加入2mL Tris-HCl缓冲液和1mL底物(L-亮氨酸-4-硝基苯胺L-leu-pNA), 然后再加入1mL稀释一定倍数的粗酶液, 整个体系体积为4mL, 在50 $^{\circ}C$ 水浴反应10min后, 405nm比色测定酶活。

酶活力定义: 在50 $^{\circ}C$ 水浴下, 每分钟分解L-亮氨酸-4-硝基苯胺产生1.0 $\mu$ mol的硝基苯胺所需酶量, 定义为一个酶活单位。

1.2.6 还原糖的测定 采用3,5-二硝基水杨酸法<sup>[22]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵条件的单因素实验

2.1.1 培养温度、初始pH、接种量对 *B. subtilis* ZH-Zj016 产氨肽酶的影响 培养温度不仅影响微生物的生长, 而且对代谢过程中的关键酶酶活性也有重要影响, 从而调节代谢产物的分泌合成。因此在初始pH8.0时, 考察了不同培养温度条件对 *B. subtilis* ZH-Zj016 产氨肽酶的影响。结果见图1。

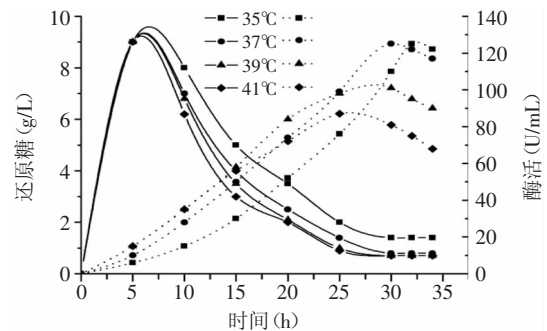


图1 不同培养温度下 *B. subtilis* ZH-Zj016 发酵过程曲线 (残糖和氨肽酶酶活)

Fig.1 The fermentation curve of *B. subtilis* ZH-Zj016 under different temperature (residual sugar and aminopeptidase activity)

注: 图中实线为还原糖, 虚线为酶活。

从图1可以看出, 10h后, 在较高的培养温度下(39、41 $^{\circ}C$ ), 还原糖消耗较快, 可能由于在较高的温度下, 一些参与底物消耗分解及与生长相关的酶的活力更高, 促使微生物的生长代谢、底物消耗速率加快。

在初始培养阶段, 提高培养温度更利于氨肽酶的分泌, 但培养25h以后, 当培养温度高于37 $^{\circ}C$ 时, 氨肽酶酶活都有一定程度下降。可能因为提高培养温度, 蛋白酶的活性提高, 促使氨肽酶的降解加快, 且温度越高, 酶的温定性越差; 而较低的培养温度(35 $^{\circ}C$ )不能为细胞生长及氨肽酶合成提供足够的活化能, 从而使菌体生长及产酶延滞期较长。

在其他条件固定下考察单因素初始pH及接种量的影响, 发现 *B. subtilis* ZH-Zj016 的最适初始pH为8.0(见图2); 在1%~1%范围内时, 接种量对发酵产酶影响差异很小, 但在7%接种量时, 酶活达到最大值, 因此确定最适接种量为7%(见图3)。

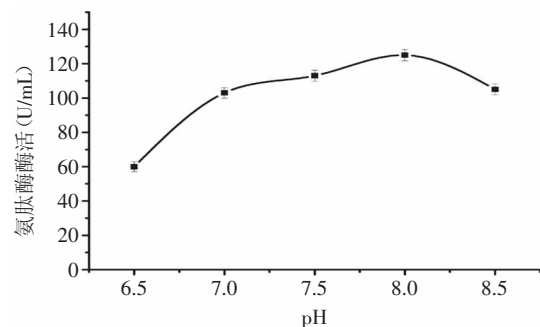


图2 初始pH对产酶的影响

Fig.2 Effect of initiation pH on AP production

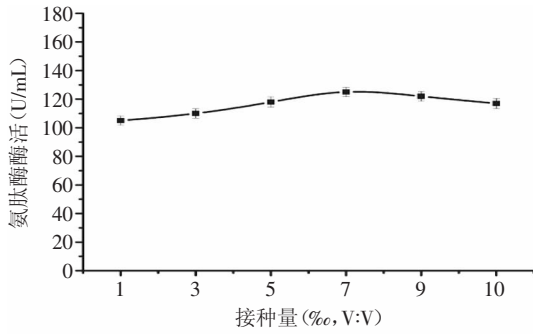


图3 接种量对产酶的影响

Fig.3 Effect of inoculum size on AP formation

2.1.2 溶氧对发酵产酶的影响 氧气是好氧微生物所必需的生长因素,溶氧的高低对菌体的生长和代谢有着重要的影响。实验用转速及通气量调节发酵过程中溶氧的水平,分别采取20% (低水平溶氧)、40% (中水平溶氧)、70% (高水平溶氧) 三种不同的最低溶氧进行发酵,结果见图4。

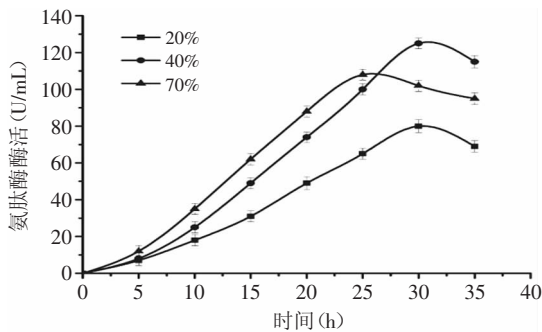


图4 最低溶氧对产酶的影响

Fig.4 Effect of the minimum dissolved oxygen on AP formation

氨基酶发酵属于中等程度的好氧发酵,溶氧过高或过低都不利于氨基酶的生产——溶氧过低抑制了菌体的生长进而影响代谢产酶;溶氧过高,菌体生长过快,菌体之间的环境竞争作用变大,因此大量的营养物质被用来构建菌体的骨架和新陈代谢,可被用来合成产物的变少。由图4可知,溶氧40%时,酶活高且菌体量适当,因此选择40%为最低溶氧水平。

## 2.2 不同表面活性剂及渗透压对细胞通透性及氨基酶酶活的影响

适宜的调节细胞通透性的方法不仅要求可以克服由于细胞壁、细胞膜存在而形成的渗透屏障,促进胞内产物的释放,同时对目的产物本身不应具有抑制作用。如表1所示,在所选用的四类试剂中,非离子、阴离子、阳离子表面活性剂及NaCl各个浓度对 *B. subtilis* ZH-Zj016氨基酶酶活均无明显抑制作用,因此均具有潜在的调节 *B. subtilis* ZH-Zj016细胞通透性、促进氨基酶分泌的能力。但由于阳离子表面活性剂CTAB对细胞的通透性的调节作用相对较差,同时阳离子表面活性剂会影响培养环境中表面张力、抑制细胞的生长代谢,因此舍弃阳离子表面活性剂CTAB,进一步考察非离子表面及阴离子表面活性剂、渗透压变化在发酵培养过程中对 *B. subtilis* ZH-

Zj016细胞通透性的调节作用,以提高氨基酶的分泌。

表1 不同表面活性剂及渗透压对细胞通透性的调节及氨基酶酶活的影响

Table 1 Effect of surfactants and osmotic pressure on cell permeability and AP activity

类型	浓度 (g/L)	酶活		
		通透性 (U/g湿菌体)	相对酶活 (%)	
非离子表面活性剂	Tween 80	0.75	1.05	106.56
		1.5	2.32	113.11
		2.25	2.18	100.82
阴离子表面活性剂	SDS	0.1	1.25	100.68
		0.2	1.82	98.35
		0.3	1.90	97.43
阳离子表面活性剂	CTAB	0.03	0.18	100.02
		0.06	0.12	98.68
		0.09	0.08	97.21
		5	0.92	98.92
		10	2.58	99.31
渗透压	NaCl	15	2.48	99.53
对照	-	0.06	100	

## 2.3 不同表面活性剂及渗透压对 *B. subtilis* ZH-Zj016 产氨基酶分泌过程的影响

初步考察中发现, *B. subtilis* ZH-Zj016细胞生长速率在发酵培养前13h较快。因此为了降低表面活性剂及NaCl对细胞生长及代谢的毒害作用,在获得较高的菌体量且氨基酶有一定的积累后(16h),分别加入不同浓度的Tween 80、SDS及NaCl溶液,考察各种溶剂对氨基酶分泌的影响,结果见表2。

表2 不同表面活性剂及渗透压对菌体产氨基酶分泌的影响

Table 2 Effect of surfactants and osmotic pressure on the secretion of AP

活性剂	添加浓度 (g/L)	氨基酶酶活 (U/mL)
Tween 80	0.75	132
	1.5	138
	2.25	124
SDS	0.1	22
	0.2	17
	0.3	11
NaCl	5	119
	10	117
	15	120
对照	0	125

从表2可以看出,在所考察的三种试剂中,SDS所对应的氨基酶酶活较低,而添加NaCl后,氨基酶酶活有一定程度降低。当发酵培养过程中添加不同浓度的Tween 80后,氨基酶酶活均得到改善,其中当添加浓度为1.5g/L时,氨基酶酶活达到最大值为138U/mL,所以选择Tween 80作为调节细胞通透性物质且其添加浓度为1.5g/L。

### 2.4 两阶段变温培养策略在*B. subtilis* ZH-Zj016产氨肽酶中的应用

从恒温培养条件下的摇瓶发酵过程曲线图1~图4可以看出,在*B. subtilis* ZH-Zj016产氨肽酶的发酵过程中,温度对细胞生长、底物利用有着重要影响。因此,提出两阶段温度控制策略,即在发酵培养的前15h,控制培养温度保持在39℃,较高的培养温度不仅增强了细胞的生长代谢,且在一定范围内温度越高,膜脂的流动性越好,细胞通透性增加,更易于胞内外物质的交换;培养15h后,降低培养温度至37℃并保持到发酵结束,结果见图5。

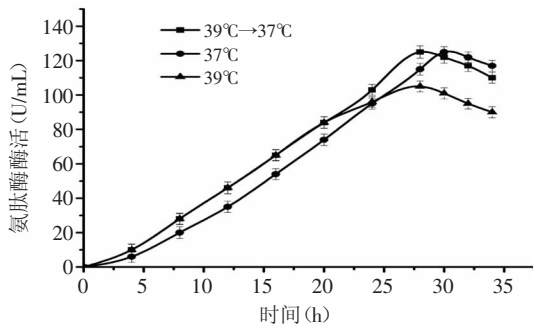


图5 *B. subtilis* ZH-Zj016在37、39℃及两阶段变温培养条件下发酵产酶曲线

Fig.5 Batch fermentation of AP production by *B. subtilis* ZH-Zj016 cultivated at 37, 39℃ and temperature-shift conditions

在*B. subtilis* ZH-Zj016培养15h后,将培养温度由39℃调整至37℃,此时微生物已进入次级代谢阶段,细胞生长基本达到稳定,因此采用两阶段变温培养对细胞的生长影响较小。与37℃单一培养27h相比,菌体整个发酵周期(30h)缩短了3h,从而提高了生产强度,同时该策略易于操作实施、费用低,在实际生产操作中具有良好的应用潜力。

### 2.5 *B. subtilis* ZH-Zj016在15L发酵罐中发酵过程曲线

在*B. subtilis* ZH-Zj016产氨肽酶发酵条件优化的基础上,应用两阶段变温培养、添加适量的Tween 80来调节细胞通透性,进一步在15L的小型发酵罐上实验,为大规模化的应用和生产创造条件,结果见图6。

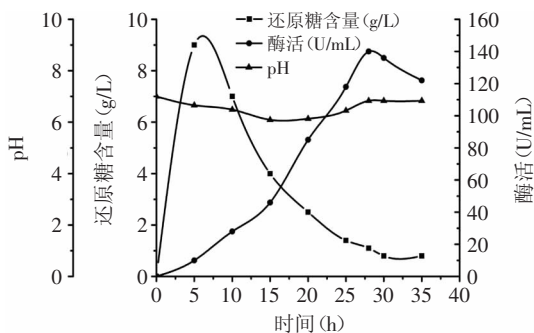


图6 *B. subtilis* ZH-Zj016的发酵曲线

Fig.6 The fermentation curve of *B. subtilis* ZH-Zj016

从图6的pH曲线可看出,在15h之前,随着菌的生长,pH不断下降,说明菌体生长旺盛时消耗了大量的糖以产生酸性物质。由于培养基中含有丰富的蛋白质类原料、菌体自身的生长呼吸作用及发酵过程中通风搅拌等因素的影响,此时发酵罐中产生了大量的泡沫,可添加适量消泡剂以消除泡沫。培养15h后,此时菌体进入稳定期,pH逐渐上升,此时泡沫逐渐减少。发酵27h结束时,*B. subtilis* ZH-Zj016产亮氨酸氨肽酶酶活为138U/mL,是出发菌株的21倍。

### 3 结论

通过原生质体转化技术将质粒PMA-BSAP转化到枯草芽孢杆菌Zj016中,获得一株遗传稳定高产的氨肽酶菌株ZH-Zj016,对其摇瓶发酵条件与15L发酵罐发酵控制进行研究。在酶活水平相当的情况下,两阶段变温培养与恒温培养相比,发酵周期缩短了10%,具有降低成本、提高生产强度、减少发酵过程染菌机会等优点;通过在培养16h后添加适量Tween 80来调节细胞通透性,促进了胞内氨肽酶的释放、提高了培养环境中氨肽酶的酶活;通过最佳溶氧水平的研究,在不影响酶活的情况下,采用中等的溶氧水平(40%),有利于降低能耗从而节约成本。通过这一系列的发酵条件优化及控制策略,发酵结束酶活最高达138U/mL,为大罐及大规模工业化发酵培养创造了良好的基础。

### 参考文献

- [1] Jia H, Nishikawa Y, Luo Y, et al. Characterization of a leucine aminopeptidase from *Toxoplasma gondii*[J]. Mol Biochem Parasit, 2010, 170(1): 1-6.
- [2] Narayanan SS, Ramanujan A, Krishna S, et al. Purification and biochemical characterization of methionine aminopeptidase (MetAP) from *Mycobacterium smegmatis* mc2155[J]. Appl Biochem Biotech, 2008, 151(2/3): 512-521.
- [3] Matsushita-Morita M, Furukawa I, Suzuki S, et al. Characterization of recombinant prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*[J]. J Appl Microbiol, 2010, 109(1): 156-165.
- [4] 赵国华, 陈宗道. 蛋白质水解物苦味研究[J]. 粮食与油脂, 2000(1): 28-30.
- [5] Shen Y, Wang F, Lan D, et al. Biochemical properties and potential applications of recombinant leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(11): 7609-7625.
- [6] Wickstrom M, Larsson R, Nygren P, et al. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy[J]. Cancer Sci, 2011, 102(3): 501-508.
- [7] Zhang SC, Martin E, Shimada M, et al. Aminopeptidase substrate preference affects HIV epitope presentation and predicts immune escape patterns in HIV-infected individuals[J]. J Immunol, 2012, 188(12): 5924-5934.
- [8] Waditee-Sirisattha R, Hattori A, Shibato J, et al. Role of the Arabidopsis leucine aminopeptidase 2[J]. Plant Signal Behav, 2011, 6(10): 1581-1583.

(下转第200页)

得分分别比酶解法提高了73%、67%和46%。

同时,由于发酵法省去了大量商品酶的使用,可以降低部分生产成本:以1000kg原料生产牛肉呈味料,酶解法所使用商品蛋白酶及液体香精的成本为3500~4000元,而发酵法所需种曲的成本仅为几十元。综上,协同发酵法制备牛肉呈味料在产品品质、生产成本上比酶解法更具优势。

### 参考文献

- [1] 中国投资咨询顾问网. 2012-2016年中国方便食品行业投资分析及前景预测报告[Z]. 2012.
- [2] 孙宝国. 中国咸味香精的现状与发展趋势[J]. 食品工业科技, 2012(3):43-46.
- [3] 孙宝国. 中国第三代肉味香精生产技术[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5):1-4.
- [4] 李宏梁, 马雅鸽. 酶法制备肉味香精及其风味调配的研究[J]. 中国调味品, 2006(10):45-48.
- [5] 朱建才, 肖作兵, 孙宗宇. 国内外咸味香精的制备技术概况[J]. 香料香精化妆品, 2009(6):37-40.
- [6] 吴肖. 牛肉风味热反应体系的建立及稳定性研究[D]. 广州:华南理工大学, 2007.
- [7] 陈亚光, 高朝辉, 陈勇, 等. 沪酿3.042米曲霉紫外诱变及高活力蛋白酶菌株选育[J]. 中国调味品, 2005(3):15-18.
- [8] 杨俊豪, 陈宝英, 吴培群, 等. 酱油曲霉蛋白酶活力的提高[J]. 工业微生物杂志, 1994(1):1-6.
- [9] 林祖申. 酱油生产技术问答[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2000:27-30.

- [10] 上海市酿造科学研究所. SB/T 10317-1999蛋白酶活力测定法[S]. 北京:中国标准出版社, 1999.
- [11] 武彦文, 张燕, 阎晶辰. 酶法水解植物蛋白制备肉味香精的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(3):53-55.
- [12] Kurozawa L E, Park K J, Hubinger M D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(5):405-412.
- [13] 全国粮油标准化技术委员会. GB/T 22492-2008大豆肽粉[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
- [14] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 第二版. 北京:科学出版社, 2005:92-121.
- [15] Su Guowan, Ren Jiaoyan, Yang Bao, et al. Comparison of hydrolysis characteristics on defatted peanut meal proteins between a protease extract from *Aspergillus oryzae* and commercial proteases[J]. Food Chemistry, 2011, 126:1306-1311.
- [16] 曾晓房. 鸡骨架酶解及其产物制备鸡肉香精研究[D]. 广州:华南理工大学, 2007.
- [17] 高献礼. 高盐稀态酱油在发酵和巴氏杀菌过程中风味物质形成和变化的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2010.
- [18] 廖兰, 赵谋明, 崔春. 肽与氨基酸对食品滋味贡献的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(12):107-113.
- [19] 李松耀, 郝学财, 邢海鹏, 等. 利用微生物发酵生产牛肉香精[J]. 中国调味品, 2008(12):84-87.
- [20] 吴建中. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2003.
- [21] 邓靖. 脱苦蛋白酶霉菌菌种选育及酶学性质研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2005.

(上接第195页)

- [9] 高应东, 王书奎. 亮氨酸氨肽酶的种类及临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 12:1408-1410.
- [10] Matsui M, Fowler JH, Walling LL. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function[J]. Biol Chem, 2006, 387(12):1535-1544.
- [11] Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(3):597-635.
- [12] Terenius L, Sandin J, Sakurada T. Nociceptin/orphanin FQ metabolism and bioactive metabolites[J]. Peptides, 2000(21), 7:919-922.
- [13] Goldberg AL, Cascio P, Saric T, et al. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides[J]. Mol Immunol, 2002, 39(3/4):147-164.
- [14] Toldra F, Aristoy AC, Flores M. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham[J]. Food Res Int, 2000, 33(3/4):181-185.
- [15] 须瑛敏. 氨肽酶脱苦效果的研究[J]. 食品与药品, 2007, 11:36-39.
- [16] 魏亚娟, 田亚平, 须瑛敏. 枯草芽孢杆菌脱苦氨肽酶在水解大豆分离蛋白中的应用研究[J]. 食品工业科技, 2008, 4:

- 149-151.
- [17] 吕广林, 田亚平. 氨肽酶与中性蛋白酶协同水解大豆分离蛋白的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011(1):101-105.
- [18] 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*) proteins[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(1):165-172.
- [19] Carroll RK, Robison TM, Rivera FE, et al. Identification of an intracellular M17 family leucine aminopeptidase that is required for virulence in *Staphylococcus aureus*[J]. Microbes Infect, 2012(14), 11:989-999.
- [20] Maggioli G, Acosta D, Silveira F, et al. The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep[J]. Vaccine, 2011, 29:9057-9063.
- [21] 张霞, 高雅楠, 侯敏, 等. 亮氨酸氨肽酶在日本血吸虫感染中的抗体应答特征[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011(2):163-167.
- [22] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2001.