

白酒窖泥中蛋白酶产生菌的筛选及复配

马 特, 宋连宝, 赵 辉*

(黑龙江大学生命科学学院, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘 要: 从优质白酒窖泥中分离筛选出8株高产蛋白酶的兼性厌氧细菌, 通过测定内肽酶、氨肽酶、羧肽酶活力, 最终筛选出3株蛋白酶活力相对较高的菌株HDS4、HDS6、HDS8, 并对其进行形态观察、生理生化和16S rDNA鉴定, 确定3株菌分别为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。以接种量为基础, 对3株目的菌株进行复配, 得到的复配菌系3种蛋白酶活力均比单一菌株高, 3种酶活力分别提高了8.907%、6.181%、8.781%。

关键词: 蛋白酶; 窖泥; 鉴定; 筛选; 白酒

Screening of Protease-Producing Strains in Liquor Pit Mud and Mixed-Culture Fermentation for Enhanced Protease Production

MA Te, SONG Lianbao, ZHAO Hui*

(Agricultural Microbiology Engineering Research Center, Ministry of Education, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: Eight strains of facultative anaerobic bacteria with higher capacity to produce protease were isolated and screened from high-quality liquor pit mud. Out of the 8 strains, 3 strains producing higher endopeptidase, aminopeptidase and carboxypeptidase activities including HDS4, HDS6 and HDS8 were selected and identified by morphological, physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis as *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Bacillus thuringiensis*. Mixed-culture fermentation with the 3 strains yielded an increase of 8.907%, 6.181% and 8.781% in endopeptidase, aminopeptidase and carboxypeptidase activities compared with single-culture fermentation, respectively.

Key words: protease; pit mud; identification; screening; liquor

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201607027

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2016)07-0146-06

引文格式:

马特, 宋连宝, 赵辉. 白酒窖泥中蛋白酶产生菌的筛选及复配[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 146-151. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201607027. <http://www.spkx.net.cn>

MA Te, SONG Lianbao, ZHAO Hui. Screening of protease-producing strains in liquor pit mud and mixed-culture fermentation for enhanced protease production[J]. Food Science, 2016, 37(7): 146-151. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201607027. <http://www.spkx.net.cn>

白酒为中国特有的一种以高粱等谷物为原料, 采用大曲、小曲或麸曲为糖化发酵剂, 经过发酵、蒸馏、贮存勾兑而成的蒸馏酒^[1]。窖泥是浓香型白酒酿造的基础, 是产生白酒中香味物质的功能菌生长繁殖的载体^[2]。窖泥中微生物的种类、数量、种群间的相互作用以及代谢的多样性对白酒品质具有重要影响^[3]。窖泥中的微生物可催化原料进行一系列复杂的生化反应, 能分解淀粉、脂肪形成糖和氨基酸引发美拉德反应, 生成香型白酒独特的风味前驱物^[4]。在白酒酿造过程中添加蛋白酶产生菌产生蛋白酶, 通过对原料中蛋白质的水解, 不仅可以促进微

生物生长, 而且还可形成白酒中醇类等风味物质, 从而使酒体更加丰满醇厚^[5]。

1964年, Koaze等^[6]首次发现大孢子黑曲霉突变体(*Aspergillus niger* v. Tiegh)能产生两种不同的酸性蛋白酶, 即酸性蛋白酶A和酸性蛋白酶B, 可用于白酒固态发酵。陈飞等^[7]从茅台镇酱香型白酒生产样品中分离得到1株白地霉(*Geotrichum candidum*), 该菌株可应用于白酒风味的提升。Kumae等^[8]从酒曲中分离得到一株产蛋白酶的芽孢杆菌, 经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。Kumar等^[9]从大曲中分离得到一株芽孢杆菌,

收稿日期: 2015-04-18

基金项目: 黑龙江省博士后科研启动基金项目(LBH-Q13139)

作者简介: 马特(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。E-mail: 835147262@qq.com

*通信作者: 赵辉(1971—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为发酵工程。E-mail: zhaohui9463@sohu.com

通过紫外诱变后,可产生较高的蛋白酶活力,发酵性能优良。Sumantha等^[10]从固态发酵米糠中得到一株产中性蛋白酶的小孢根霉(*Rhizopus microsporus* NRRL 3671),对其酶学性质进行研究,发现该菌株在60℃、pH 7.0时得到最大酶活力。Su等^[11]从盐碱地的土样中,分离出一株新的曲霉(*Aspergillus* sp. FC-10),可产耐盐蛋白酶。近几年许多研究者分别从富含蛋白的土壤样品、海洋泥中的土样中,筛选出产蛋白酶的菌株,并对其进行了鉴定^[12-20]。

蛋白酶是催化水解蛋白质肽键的一类酶的总称^[21]。按其水解多肽的方式,可以将其分为内肽酶和外肽酶两类^[22]。内肽酶将蛋白质分子内部切断,形成分子量较小的肽^[23]。外肽酶从蛋白质分子的游离氨基或羧基的末端逐个将肽键水解,而游离出氨基酸,前者为氨肽酶^[24],后者为羧肽酶^[25]。在白酒发酵过程中,3种酶的协同作用,可以使原料中的蛋白质水解更加充分,游离的氨基酸数量增加,从而提高原料的利用率,并生成白酒中醇类等香味物质。

本实验选取黑龙江省富裕老窖酒业有限公司的窖泥,利用5点取样法,从窖泥中分离、筛选高产蛋白酶(内肽酶、氨肽酶、羧肽酶)的细菌,以期筛选3种产蛋白酶活性均较高的菌株,并对筛选出的菌株进行鉴定。将筛选出的高产3种蛋白酶的细菌进行菌株复配,以期提高3种蛋白酶活力,从而更好地发挥协同作用,达到提高白酒发酵的原料利用率,促进菌体生长和提高白酒香气的作用。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与培养基

从黑龙江省富裕老窖酒业有限公司的优质老窖池中取样的窖泥。

DL2000DNA Marker、细菌基因组DNA试剂盒生工生物工程(上海)有限公司;脱脂奶粉 完达山乳业有限公司;酪蛋白 北京奥博星生物技术有限公司。

分离和保藏培养基:脱脂奶粉10 g、可溶性淀粉10 g、 KH_2PO_4 0.3 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、NaCl 1 g、琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL,121℃高压灭菌20 min^[26]。

发酵培养基:可溶性淀粉5 g、牛肉膏5 g、蛋白胨5 g、酵母膏2.5 g、 KH_2PO_4 0.3 g、NaCl 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,蒸馏水1 000 mL,121℃高压灭菌15 min^[26]。

1.2 仪器与设备

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪德国Biometra公司;琼脂糖凝胶电泳仪 美国Bio-Rad公司;UV755B紫外分光光度计、FA1004电子天平 上

海精密科学仪器有限公司;高速冷冻离心机 美国日立公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集

依据生态学原理,采用5点法对酒厂的优质窖池中的窖泥进行采集。取样自上而下,按4层分别采集,同一层面按中心部和周边部5点取样,并混合均匀作为1个样品,在室温下进行采样,记好标记,无菌密封,4℃冰箱保存。

1.3.2 产蛋白酶菌株的初筛

称取1 g窖泥加入到装有99 mL灭菌分离培养基的三角烧瓶中,静置培养24 h,吸取富集菌液0.5 mL,进行不同浓度梯度稀释,分别取0.1 mL涂布于分离培养基上,每个梯度做3个平行样,37℃倒置恒温培养24 h,产透明圈的为目的菌株。根据其菌落形态不同进行简单归类,并进行纯化保藏。

1.3.3 产蛋白酶菌株的复筛

测定初筛菌株的蛋白酶活力进行复筛。用发酵培养基对目的菌株进行培养,离心后取上清液分别测定内肽酶、氨肽酶、羧肽酶的活力。

内肽酶活力单位是指指在38℃、pH 5.5条件下,1 min内水解酪蛋白产生酪氨酸的酶量;氨肽酶活力单位是指指在50℃、pH 5.5条件下,1 min内水解酪蛋白产生酪氨酸的酶量;羧肽酶活力单位是指指在30℃、pH 6.6条件下,1 min内水解乙酰酪氨酸乙酯产生酪氨酸的酶量。3种酶活力均采用紫外分光光度法测定^[25,27-28]。

1.3.4 菌株形态学及生理生化鉴定

参照《伯杰细菌鉴定手册》,对筛选出高产蛋白酶活力的菌株进行形态学描述和生理生化鉴定。生理生化鉴定包括:甲基红(M.R.)实验、吲哚实验、脲酶实验、乙酰甲醇(V.P.)实验、明胶液化、柠檬酸盐利用实验、淀粉水解实验、过氧化氢实验、硝酸盐还原实验、葡萄糖氧化发酵产酸产气实验、糖/醇(D-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露醇)发酵产酸实验等,每个实验重复3次^[29-30]。

1.3.5 菌株16S rDNA鉴定

1.3.5.1 提取细菌基因组DNA

细菌基因组DNA提取使用生工生物工程(上海)股份有限公司细菌基因组DNA试剂盒。

16S rDNA通用引物设计如下:正向引物P1:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物P2:5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。

1.3.5.2 PCR反应体系和程序

PCR扩增反应体系为:10×PCR Buffer (Mg^{2+}) 2.5 μL, dNTP Mixture 2 μL, P1 1 μL, P2 1 μL, DNA模板 1 μL, 去离子水17.3 μL, Taq DNA聚合酶0.2 μL, 共25 μL。

PCR扩增反应程序：94℃预变性10 min；94℃变性0.5 min，56℃退火1 min，72℃延伸1.5 min，循环32次；72℃终延伸8 min，4℃保存。

1.3.5.3 目的片段与载体连接

用TaKaRa连接试剂盒将回收产物连接至pMD19-T载体上，4℃反应过夜，利用Tiangen公司质粒提取试剂盒将载体与DNA片段进行连接，连接目的产物转化至DH5α感受态细胞，保存重组阳性克隆，并进行扩大培养，提取质粒，再次进行PCR扩增。

1.3.5.4 16S rDNA片段的测序与系统发育分析

将PCR产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行序列测定。再将测序所得到的16S rDNA序列与GenBank数据库进行BLAST比对分析，通过MEGA软件构建系统发育树。

1.3.6 菌株复配的研究

1.3.6.1 菌株的生长曲线

将筛选出的高产3种蛋白酶的菌株HDS4、HDS6、HDS8接种到发酵培养基中振荡培养，每隔2 h在660 nm波长处测定菌液的光密度（OD_{660 nm}）值，绘制菌体24 h生长曲线，确定3种菌株的最佳培养时间。

1.3.6.2 菌株复配

将筛选出的高产3种蛋白酶的菌株HDS4、HDS6、HDS8进行最适接种量试验，并以最适接种量为基础，利用发酵培养基，在37℃、pH 7.0、摇床转速为140 r/min培养16 h，选择HDS4的接种量为1%、2%、3%，HDS6的接种量为3%、4%、5%，HDS8的接种量为2%、3%、4%，以复配后的菌体浓度为试验结果，做三因素三水平的正交试验。

1.3.6.3 复配后3种蛋白酶活力的比较

进行复配菌体的生长与产酶实验：在发酵培养基中接种复配菌体，在37℃、pH 7.0、摇床转速为140 r/min条件下振荡培养，每隔2 h取发酵液测定菌液的OD_{600 nm}值，同时离心后测定3种蛋白酶活力，绘制菌体的生长和产酶曲线，以考察菌体生长与酶活力之间的关系。同时在培养16 h后对复配后菌系的3种酶活力进行测定，并进行单一菌株在最佳接种量条件下培养16 h后的酶活力实验，对复配体系及单菌株发酵的酶活力进行对比。

1.4 菌体浓度的分析方法

将菌悬液梯度稀释，利用平板菌落计数法测得菌落数，并运用比色法测定菌液的OD_{600 nm}值，根据单位体积菌落数与OD_{600 nm}值的相关性，从而回归推算出菌液浓度。

2 结果与分析

2.1 高产蛋白酶细菌的分离筛选

初筛菌共46株，根据3种酶活力高低比较，选出

8株，酶活力见表1。菌株HDS6的内肽酶活力、HDS4的氨肽酶活力和HDS8的羧肽酶活力相对较高，分别为104.516、84.269、72.538 U/mL。

表1 8株菌的3种蛋白酶活力比较
Table 1 Comparison of three enzyme activities in 8 strains

菌种名称	U/mL		
	内肽酶	氨肽酶	羧肽酶
HDS1	85.312±2.102	78.251±2.083	70.599±3.162
HDS2	90.715±2.162	57.254±2.301	63.173±6.943
HDS3	98.599±6.943	77.582±2.601	55.425±2.022
HDS4	95.969±1.817	84.269±1.552	70.793±1.801
HDS5	92.874±2.641	72.821±1.832	62.295±3.961
HDS6	104.516±2.772	80.574±1.084	70.387±1.704
HDS7	92.304±1.183	45.621±1.803	54.431±2.884
HDS8	88.301±1.800	78.837±3.103	72.538±2.256

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株的形态学观察及生理生化鉴定

对菌株HDS4、HDS6、HDS8进行形态学观察和生理生化鉴定，结果见表2和表3，3株菌可以初步鉴定为芽孢杆菌属。

表2 3株菌的形态特征
Table 2 Morphological characteristics of three selected strains

菌种名称	形状	颜色	光滑	湿度	边缘	革兰氏染色	菌形	芽孢着生位置
HDS4	圆	白	褶皱	湿润	整齐	+	杆状	中间
HDS6	不规则	淡黄	褶皱	湿润	不整齐	+	杆状	中间
HDS8	圆	白	褶皱	湿润	不整齐	+	杆状	端生

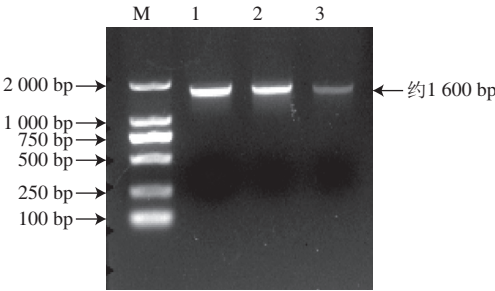
注：+，阳性。下同。

表3 3株菌的生理生化实验结果
Table 3 Physiological and biochemical properties of three selected strains

菌种名称	M.R.	V.P.	呼吸	硫化氢	硝酸盐	柠檬酸	明胶	过氧化氢酶	氧化酶	氨基酸脱羧酶	葡萄糖	半乳糖	乳糖	果糖	蔗糖	麦芽糖	海藻糖	七叶苷
HDS4	+	+	-	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HDS6	+	+	-	-	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HDS8	+	+	-	-	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：-，阴性；o，产酸不产气；f，兼性；u，既不产酸也不产气；g，产酸不产气。

2.2.2 菌株的16S rDNA鉴定及系统发育进化树



M. DL2000 DNA Marker；泳道1~3分别为菌株HDS4、HDS6、HDS8。

图1 16S rDNA PCR扩增产物电泳分析

Fig.1 Electrophoresis analysis of 16S rDNA PCR amplified products

以菌株HDS4、HDS6、HDS8的基因组为模板,经PCR扩增,电泳检测,在1 000~2 000 bp处有明亮的特征条带,见图1,序列的长度与测序的结果相符。

菌株HDS4、HDS6、HDS8的16S rDNA经测序,其序列长分别为1 570、1 513、1 550 bp,与GenBank数据库进行BLAST比对分析,利用DNAMAN软件绘制菌株的系统发育树,结果见图2。结合形态学观察和生理生化分析,可以确定菌株HDS4为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、HDS6为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、HDS8为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。

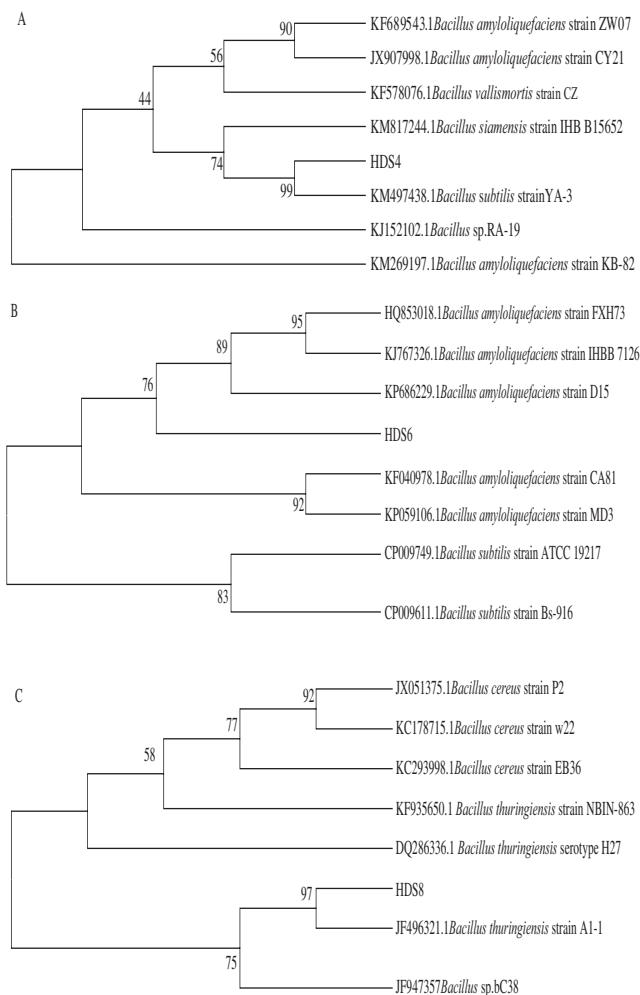


图2 菌株HDS4 (A)、HDS6 (B)、HDS8 (C) 系统发育树的构建
Fig.2 Phylogenetic trees of strains HDS4 (A), HDS6 (B) and HDS8 (C)

2.3 菌株的复配

2.3.1 3株菌的生长曲线

将筛选出的高产3种蛋白酶的菌株HDS4、HDS6、HDS8接种到发酵培养基中振荡培养,由图3可知,菌株HDS4的迟缓期为2~4 h,对数期为4~12 h,稳定期12~16 h,衰亡期16~24 h;菌株HDS6的迟缓期为

2~4 h,对数期为4~14 h,稳定期14~18 h,衰亡期18~24 h;菌株HDS8的迟缓期为2~4 h,对数期为4~12 h,稳定期12~16 h,衰亡期16~24 h,综合3株菌的生长曲线,确定复配菌系的培养时间为14~16 h。

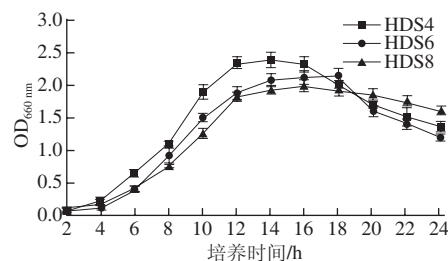


图3 3株菌的生长曲线

Fig.3 Growth curves of HDS4, HDS6 and HDS8

2.3.2 目的菌株的最适接种量

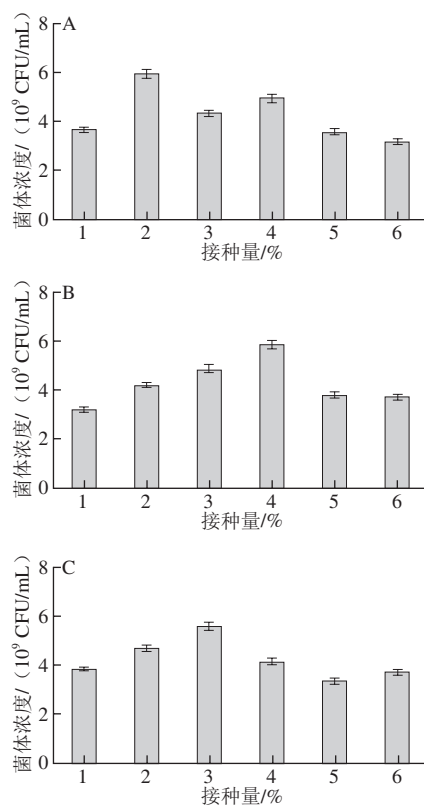


图4 接种量对目的菌株HDS4 (A)、HDS6 (B)、HDS8 (C) 生长的影响

Fig.4 Effect of inoculum amount on the growth of HDS4 (A), HDS6 (B) and HDS8 (C)

如图4所示,HDS4的最适接种量为2%,HDS6的最适接种量为4%,HDS8的最适接种量为3%,其各自的菌体浓度均达到最高。

2.3.3 目的菌株的复配

由表4可知,确定目的菌株的复配最优组合为A₂B₂C₃,即以接种量分别为2%的HDS4,4%的HDS6,

4%的HDS8菌株进行菌株的混合复配。表5方差分析表明,对试验结果的影响顺序依次为:HDS4>HDS6>HDS8,HDS4的 $F=8.7$ 与 $F_{0.1(2,2)}=9$ 接近,对试验结果影响较为显著,HDS6、HDS8两个因素对试验结果影响不显著。

表4 目的菌株复配正交试验设计与结果
Table 4 Orthogonal array design with experimental results for the optimization of mixed starter cultures

试验号	A HDS4 接种量/%	B HDS6 接种量/%	C HDS8 接种量/%	空列	菌体浓度/ (10 ⁹ CFU/mL)
1	1 (1)	1 (3)	1 (2)	1	3.425±0.104
2	1	2 (4)	2 (3)	2	5.273±0.213
3	1	3 (5)	3 (4)	3	3.921±0.075
4	2 (2)	1	2	3	4.216±0.211
5	2	2	3	1	6.814±0.092
6	2	3	1	2	5.016±0.201
7	3 (3)	1	3	2	3.262±0.112
8	3	2	1	3	3.081±0.105
9	3	3	2	1	3.015±0.045
k_1	4.206	3.634	3.841		
k_2	5.349	5.056	4.168		
k_3	3.119	3.984	4.666		
极差R	1.087	1.422	0.825		
优化方案	$A_2B_2C_3$				

表5 目的菌株复配正交试验结果方差分析
Table 5 Analysis of variance of orthogonal tests

因素	平方和	自由度	均方	F	显著性
A	7.456	2	3.728	8.700	较显著
B	3.292	2	1.646	3.828	
C	1.035	2	0.518	1.204	
误差	0.860	2	0.430		

注: $F_{0.1(2,2)}=9$ 。

2.4 复配后3种蛋白酶活力的比较

2.4.1 复配菌体生长和产酶曲线的绘制

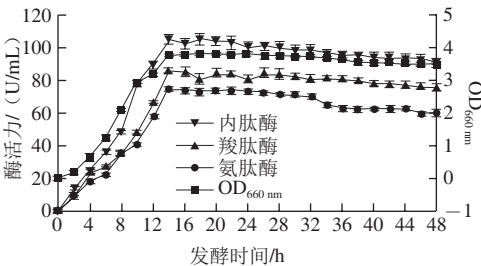


图5 复合菌株生长和产酶曲线

Fig.5 Growth and enzyme production curves of optimal mixed start culture

由图5可知,复配菌株快速进入对数期,自第16小时以后,菌体生长逐渐进入稳定期。此时该菌株产内肽酶、氨肽酶、羧肽酶的酶活力最大值,说明产蛋白酶活力与菌体的生长成正相关,进入对数期即开始产酶,而且酶活力不断增加。当进入稳定期以后,由于芽孢的生成,酶活力有所下降。

2.4.2 蛋白酶活力的对比

以接种量分别为2% HDS4、4% HDS6、4% HDS8菌株复配得到的复配菌株振荡培养16 h,由表6可知,复配后的菌系内肽酶、氨肽酶、羧肽酶酶活力分别为112.736、91.987、82.269 U/mL。同时进行3株单菌在最佳接种量(HDS4 2%、HDS6 4%、HDS8 3%)下的发酵产酶实验,实验结果如表6所示,复配菌株的3种酶活力均高于单一菌株,较单一菌株的3种酶活力最大值,内肽酶、氨肽酶、羧肽酶分别提高了8.907%、6.181%、8.781%,说明复配结果有意义。同时与已报道^[25,27,31-34]的菌株产内肽酶酶活力62.538、147.322 U/mL,产氨肽酶酶活力102.347、23.825 U/mL,产羧肽酶酶活力86.535、117.523 U/mL相比,该复配体系3种酶活力总体水平平均较高。

表6 菌株复配前后蛋白酶活力的比较
Table 6 Comparison of protease activities of HDS4, HDS6, HDS8 and their combination

菌株	接种量/%	酶活力/(U/mL)		
		内肽酶	氨肽酶	羧肽酶
HDS4	2	92.964±1.817	86.632±1.023	71.639±1.072
HDS6	4	103.516±2.772	81.382±1.062	70.527±1.074
HDS8	3	90.382±1.204	80.833±3.293	75.628±2.526
复配菌株	$A_2B_2C_3$	112.736±1.729	91.987±2.058	82.269±1.036

3 结论

本实验从东北寒区优质白酒窖泥中筛选出内肽酶、氨肽酶、羧肽酶活力均较高的菌株HDS4、HDS6、HDS8,并经形态学、生理生化及16S rDNA鉴定,确定菌株分别为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。以接种量为基础,以达到最大菌体浓度为目的,对目的菌株进行复配,得到的复配菌系3种酶活力较于单一菌株的3种酶活力均得以提高,其分别提高了8.907%、6.181%、8.781%。

实验菌株均来源于白酒窖泥,能适应白酒发酵环境,若应用于白酒发酵,在3种蛋白酶的协同作用下,可以大幅度提高原料的利用率,为白酒发酵体系中多种微生物提供氮态氮,而且还可形成白酒中醇类等风味物质,从而使酒体丰满醇厚,这对于白酒企业很有实际应用价值。

参考文献:

[1] 徐岩, 范文来, 王海燕, 等. 风味分析定向中国白酒技术研究的进展[J]. 酿酒科技, 2010(11): 73-78.
[2] 张丽莺. 窖池微生物资源库的建立、管理及菌种保藏[D]. 成都: 四川大学, 2006.
[3] 赵爽, 杨春霞, 徐曼, 等. 浓香型白酒生产中酿酒微生物研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(1): 24-29. DOI:10.3969/j.issn.1674-506X.2012.01.006.

- [4] 吴衍庸. 酒曲微生物分析与白酒香型初探[J]. 酿酒科技, 2004(5): 38-39. DOI:10.3969/j.issn.1001-9286.2004.05.012.
- [5] 沈怡方. 我国白酒生产技术进步的回眸[J]. 酿酒科技, 2008(6): 24-28. DOI:10.3969/j.issn.1001-9286.2002.06.004.
- [6] KOAZE Y, GOI H, EZEAWA K, et al. Fungal proeolytic enzymes[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1964, 28: 216-223.
- [7] 陈飞, 吴生文, 张志刚. 蛋白酶在酒类生产中的应用现状[J]. 酿酒科技, 2011(1): 82-84. DOI:10.3969/j.issn.1002-8110.2010.06.006.
- [8] KUMAE R D, BHALLA T C. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(6): 726-736.
- [9] KUMAR S, SHARMA N S, SAHARAN M R, et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization[J]. Process Biochemistry, 2011, 40(5): 1701-1705.
- [10] SUMANTHA A, DEEPA P, SANDHYA C, et al. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2014, 49(5): 843-851.
- [11] SU N W, LEE M H. Purification and characterization of a novel salt tolerant protease from *Aspergillus* sp. FC-10, soy sauce koji mold[J]. Journal of Industrial of Microbiology and Biotechnology, 2013, 26(4): 253-258. DOI:10.1038/sj.jim.7000129.
- [12] RAO M B, TANKASLE A M, MOHINI S G. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005, 68(1): 726-736.
- [13] 费笛波, 钱玉英, 叶玲玲, 等. 黑曲霉菌株6042饲用酸性蛋白酶的性质及其应用研究[J]. 浙江农业学报, 1997(6): 300-304.
- [14] 翁醒华, 徐晨明, 李永泉, 等. 宇佐美曲霉L336酸性蛋白酶的动力学性质[J]. 菌物系统, 1999(1): 61-66.
- [15] KANEKO R, KOYAMA N, TSAI Y C, et al. Molecular cloning of the structural gene for alkaline elastase YaB, a new subtilisin produced by an alkalophilic *Bacillus* strain[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(9): 5232-5236.
- [16] TOBE S, TAKAMI T, HIROSE Y, et al. Purification and some properties of Alkaline proteinase from *Bacillus* sp.[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1975, 39(9): 1749-1755.
- [17] 邱秀宝, 袁影, 戴宏, 等. 嗜碱性芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究: 诱变株选育及产酶条件[J]. 微生物学报, 2010, 30(2): 129-136.
- [18] WANG H Y, LIU D M, CHENG C F, et al. Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 44: 1-6.
- [19] TANG X M, SHEN W, LAKAY F M, et al. Cloning and over-expression of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 975-979.
- [20] JORGENSEN P L, TANGNEY M, PEDERSEN P E, et al. Cloning and sequencing of an alkaline protease gene from *Bacillus lentus* and amplification of the gene on the *B. lentus* chromosome by an improved technique[J]. Applied Environmental Microbiology, 2013, 66: 825-827.
- [21] 李艳丽, 许少春, 许尧兴. 中性蛋白酶高产菌株的筛选及产酶酶系分析[J]. 生物技术, 2010, 17(1): 20-23. DOI:10.3969/j.issn.1004-311X.2007.01.007.
- [22] 赵建, 郭本恒, 陈卫, 等. 肽酶高产菌株的筛选及其生物学特性研究[J]. 乳业科学与技术, 2011, 34(2): 69-72. DOI:10.3969/j.issn.1671-5187.2007.02.005.
- [23] 付静, 杨晓泉, 李理. 食品发酵用霉菌产内肽酶的研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 219-224. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2009.09.054.
- [24] TAYLOR A. Aminopeptidases: structure and function[J]. The FASEB Journal, 1993, 7(2): 290-298.
- [25] 冯红霞. 羧肽酶菌株的筛选及其酶的分离纯化、酶学性质的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2002.
- [26] 王俊英, 侯小歌, 张杰, 等. 酒曲中高蛋白酶产生菌筛选及酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(4): 33-36.
- [27] 叶伟. 地衣芽孢杆菌谷氨酸特异性内肽酶的功能特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [28] 胡东华. 猪后腿肉中氨肽酶的分离纯化与酶学特性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- [29] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 729-795.
- [30] 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: 253-298.
- [31] ZHU Y S, PHANINDRA K, RICHARD J. Quantitative analysis of bovine β -casein hydrolysates obtained using glutamyl endopeptidase[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63: 1334-1338.
- [32] 梁二宾. 氨肽酶产生菌的鉴定、酶的分离纯化及性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [33] SANDRINE C, CECILE D, JULIEN P, et al. The M1 family of vertebrate aminopeptidases: role of evolutionarily conserved tyrosines in the enzymatic mechanism of aminopeptidase B[J]. Biochimie, 2015, 109: 67-77.
- [34] 付静, 杨媚, 李理, 等. 雅致放射毛霉3.2778羧肽酶性质及其活性中心结构的研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(3): 30-33. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2010.03.009.