产蛋白酶酵母菌的选育及酶学特性

徐亚男[1]，史学伟[1]，童军茂[1]，谈思维[1]，安洋洋[2]，肖婧[3]
（1 石河子大学食品学院，新疆石河子 832000）（2 包头职业技术学院经管系，内蒙古包头 010043）
（3. 石河子大学信息科学与技术学院，新疆石河子 832000）

摘要：在葡萄酒自然发酵过程中，在发酵初期非酿酒酵母菌占主导地位，蛋白酶可将葡萄汁中的蛋白质水解成可溶性肽和氨基酸，利于葡萄酒的澄清和稳定，同时对陈酿期间的酵母自溶也有着重要的作用。本研究通过对新疆赤霞珠葡萄酒发酵过程中非酿酒酵母菌的筛选，得到 1 株产蛋白酶能力较强的菌株；紫外-微波复合诱变后，酶活力增加 1.47 倍；经 26S rRNA 基因序列分析鉴定为葡萄汁有孢汉生酵母 XYN162（*H.uvarum* XYN162）；酶学性质研究表明：所产蛋白酶最适 pH 为 8.0，在 pH 为 7.0-8.0 时酶活性保持在 90%以上；酶的最适作用温度为 37 ℃，在 35 ℃酶活力保持较好；Fe^{2+}、Ca^{2+}对酶有不同程度的激活作用，Mg^{2+}、Cu^{2+}对酶有明显的抑制作用，说明此菌株所产的蛋白酶对金属离子具有依赖性。以上数据确认该菌为产蛋白酶葡萄汁有孢汉生酵母。

关键词：蛋白酶；非酿酒酵母菌；葡萄汁有孢汉生酵母；酶学特性

文章篇号：1673-9078(2015)10-146-150 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.025

Screening of Protease Production in Non-*Saccharomyces* Yeasts and Study of Its Enzymology Characteristics

XU Ya-nan[1], SHI Xue-wei[1], TONG Jun-mao[1], TAN Si-wei[1], AN Yang-yang[2], XIAO-jing[3]
(1.Food college, Shihezi University, Xinjiang 832000, China)
(2.Economy and Trade Department, Baotou Vocational and Technical College, Baotou 010043, China)
(3.College of Information Science and Technology, Shihezi University, Xinjiang 832000, China)

Abstract: Non-*Saccharomyces* dominated in the early stages of fermentation on the natural fermentation process. Proteins are present in varying quantities in the grape and, along with polysaccharides, are responsible for increasing must and wine turbidity. Although these proteins can be eliminated with bentonite, this nonspecific process also leads to loss of aromas and compounds that influence flavor. Protease treatment, on the other hand, specifically hydrolyzes proteins and improves the clarity and stability of the wine. The smaller, more soluble peptides and amino acids generated by this enzymatic hydrolysis are also nitrogen-containing compounds. The aim of the present work was to determine the ability of non-*Saccharomyces* from Cabernet Sauvignonn variety to produce proteases. A strain with good capacity of producing proteases was isolated from must. After ultraviolet-microwave compound mutation, the enzyme activity increased 1.47 times. It was identified by morphology and ITS sequence analysis. The strain was indentified as *Hanseniaspora uvarum* and named *H.uvarum* XYN162. Thereafter, the proteases produced went through enzymatic evaluation, the results showed that the optimum pH was 8.0 and the proteases activity remained more than 90% in pH 7.0-8.0; the optimum temperature was 37 ℃ and stable at 35 ℃ by the analysis of thermal stability. Moreover, metal ions has a great influence on the activity, the proteases can be activated by Fe^{2+} and Ca^{2+} and inhibited by Mg^{2+} and Cu^{2+}. These results showed the strain with the potential of producing proteases possesses tremendous development value.

Key words : extracellular proteases; non-*Saccharomyces*; *Hanseniaspora uvarum*; enzymology characteristics

蛋白酶是催化蛋白质水解的一类酶，是酶学研究中较早也是最深入的一种酶，蛋白酶的用途非常广泛，主要用于洗涤剂，其次用于饲料、食品工业、酿酒酿造、制革工业以及医药；蛋白酶的广泛使用，不仅简化了行业的生产工艺、节约成本、提高产品得率与质量，同时对改善环境，减少二氧化碳排放也做出了积极贡献；近年来随着人们环保意识的增强，创建资源节约型、环境友好型社会的观念日益深入人心，为进一步推广蛋白酶的生产与应用创造了有利条件。

收稿日期：2015-01-06
基金项目：新疆兵团科技攻关项目（P20136500002-1146）；新疆兵团青年科技创新资金项目（DEC_PGUEIK_893341）
作者简介：徐亚男（1990-），女，硕士，研究方向：农产品加工及贮藏工程专业
通讯作者：史学伟（1980-），男，博士，讲师，研究方向为微生物菌种资源开发

葡萄酒中产生的沉淀主要是葡萄表皮存在的细菌及酵母裂解和自溶产生的蛋白质[1]，当酒中的 pH 接近酒中所含蛋白质的等电点，易发生沉淀；此外蛋白质还可以和酒中的金属离子、盐类等物质聚集而产生沉淀，从而使葡萄酒出现浑浊现象[2]。蛋白质水解酶可将葡萄汁中的蛋白质水解成可溶性肽和氨基酸，利于葡萄酒的澄清和稳定，也可阻止由于葡萄汁中氮源缺乏而引起的发酵不完全，同时对陈酿期间的酵母自溶也有着重要的作用[3]。因此通过添加一定量的蛋白酶可以改善葡萄酒的稳定性，增加葡萄酒的风味物质，提高葡萄酒的感官特性及营养价值。

非酿酒酵母菌是一类自然存在于葡萄表皮、酿酒环境中，能分泌多种胞外酶，通过代谢和自溶提高发酵食品的感官特性，参与复杂新鲜的风味物质形成的酵母菌[4]。本研究在新疆赤霞珠葡萄酒发酵过程中，经鉴别培养基采集非酿酒酵母菌，得到一株能分泌蛋白酶的野生菌株，通过分子生物学鉴定为葡萄汁有孢汉生酵母，并对其酶学特性进行初步研究，本菌株所产蛋白酶为碱性蛋白酶，对金属离子具有一定的依赖性，在食品工业行业有着良好的应用前景，进一步应用于新疆特色酿造发酵行业中，以期改善产品质量、提高设备利用率，同时为后期的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料

赤霞珠葡萄，采自新疆石河子 121 团场葡萄园。

1.1.2 培养基

酵母膏葡萄糖培养基(质量分数，%)：葡萄糖 2.0，酵母提取物 2.0，蛋白胨 2.0，pH 7.0，121 ℃灭菌 20min；赖氨酸培养基[5](质量分数，%)：赖氨酸 0.56，葡萄糖 1.0，KH_2PO_4 0.1，$MgSO_4$ 0.05，琼脂 2.0，121 ℃灭菌 20 min；酪蛋白分离筛选培养基(质量分数，%)：干酪素 0.5，牛肉膏 0.3，蛋白胨 1.0，NaCl 1.0，琼脂 1.5，pH 7.0，121 ℃灭菌 20min；发酵培养基(质量分数，%)：干酪素 0.5，蛋白胨 1.0，NaCl 1.0，牛肉膏 0.3，pH 7.0，121 ℃灭菌 20 min。

1.1.3 仪器

Seven Excellence S400 pH 计：梅特勒托利仪器（上海）有限公司；SYQ-DSX-280B 手提式不锈钢电热蒸汽灭菌器：上海申安医疗器械厂；Mini-14K 高速离心机：上海昨非实验室设备有限公司；数显气浴恒温振荡器：金坛市精达仪器制造厂；7200 型可见分光光度计：尤尼柯（上海）仪器有限公司；Power Cycler Gradient SL PCR 仪：德国耶拿分析仪器股份公司；IEF-SYS 琼脂糖凝胶电泳仪：英国柏楷（Biochrom）有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离纯化

葡萄样品经破碎后带皮进行自然发酵，发酵启动后在整个发酵过程中定期取样，以不同浓度梯度涂布于赖氨酸培养基，28 ℃培养 48 h，划线分离；重复多次直至得到单菌落后，接种于酵母浸出粉胨葡萄糖培养基，28 ℃培养 48 h 后，甘油保存于-80 ℃冰箱。

1.2.2 产酶菌株的筛选

取试验菌株的菌悬液 0.1 mL 进行 10 倍系列稀释至 10^{-1}~10^{-6}，分别取各个稀释梯度 1 mL 涂布于酪蛋白分离筛选培养基，培养 48 h 后，取用柠檬酸调 pH 值至 6.0 的 NaOH 溶液，喷于平板上，选择其中显示透明圈直径较大的菌株，备用；初筛菌株接种于发酵培养基中，在 37 ℃下于 200 r/min 的摇床上培养 48 h 后，分别取 1 mL 菌液于离心管中，离心后，收集上清液进行酶活测定，将酶活力大的菌株筛选出来，备用。

1.2.3 产酶菌株诱变选育[6]

将筛选出的菌株发酵液在离心机中 5000 r/min 离心 8 min，弃去上清液，用无菌水重新悬浮；吸取 2 mL 放置于 4 ℃冰箱中作为对照；剩余的菌液，吸取 5 mL 加入无菌平板中，平板置于紫外灯已照射 30 min 的磁力搅拌器上，等距离放置距灯 30 cm 处，照射 20 min，得诱变菌株 1；诱变菌种 1 放入微波源为 2450 MHz、850 W 的微波炉中，每照射 10 s，而后室温静置 10 s 后再照射 10 s，温度降至室温后，在 37 ℃培养 60 h，得到最终诱变菌株。诱变菌株接种于发酵培养基，进行扩大培养，备用。

1.2.4 粗酶液的提取和蛋白酶活性测定

分别取诱变菌株与对照菌株发酵液于 4 ℃ 12000 r/min 离心 5 min，取上清液即为粗酶液；取粗酶液 1.0 mL 于 37 ℃水浴锅中预热 2 min，加入预热后的酪蛋白 1.0 mL 摇匀，在 37 ℃下保温 10 min，加三氯乙酸终止反应，静置 10 min 后用滤纸过滤，取滤液，加 Na_2CO_3，福林试剂反应 20 min 后，于 680 nm 下测定吸光值，同时做空白样品；

酶活力单位（U）定义[7]：在 37 ℃，每分钟生成 1 μmol/L 酪氨酸所用酶量为 1 个酶活单位。酶活力计算方法：

X=A Ƙ Ѵ n/t

式中：X 为酶活力（U/mL）；A 为吸光值；K 为吸光常数；

V 为反应总体积；n 为稀释倍数；t 为反应时间。

1.2.5 菌株的分子生物学鉴定

采用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取试验菌株 DNA，以所得 DNA 基因组为模板，利用 ITS1 和 ITS4 为引物扩增 ITS 区的基因，PCR 反应体系参照文献[8]，将扩增产物送到北京三博远志生物技术有限责任公司进行测序；将 ITS 序列输入 NCBI(美国国家生物信息中心)的 GenBank 数据库中进行比对，分析序列同源性，确定该菌株的分类地位。

1.2.6 粗酶性质研究

（1）pH 对酶活的影响

分别配制 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的缓冲溶液，配制 2%酪蛋白溶液作为酶活测定的反应底物，以最高点酶活为 100%，其他与之相比得相对酶活，绘制酶最适 pH 值曲线；

（2）pH 稳定性研究

粗酶液分别与等量不同 pH 缓冲液混匀，置于 37 ℃下水浴保温 1 h 后，测定剩余酶活，以以最高点酶活为 100%，其他 pH 条件下与之相比为相对酶活，绘制酶的 pH 值稳定性曲线，计算相对酶活；

（3）温度对酶活的影响

在温度分别为 25 ℃、30 ℃、37 ℃、42 ℃、45 ℃下测酶活，以最高点酶活为 100%，其他与之相比得相对酶活，以确定最适反应温度，绘制酶催化温度曲线，计算相对酶活；

（4）热稳定性研究

粗酶液置于 35 ℃、45 ℃、55 ℃不同温度下保温一定时间，取出后迅速冷却，以 pH 为 7.0 的 2%酪蛋白溶液为底物溶液，在 37 ℃下测定剩余酶活，以未经处理的酶溶液酶活为 100%，其他温度条件下与之相比为相对酶活，绘制酶热稳定性曲线，计算相对酶活；

（5）金属离子对酶活的影响[9]

反应体系中加 1 mL、终浓度为 1 mmol/L 各种金属离子：Ca^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}、Cu^{2+}，充分混匀后，在 37 ℃下放置 24 h，测酶活，以 1 mL 双蒸水代替金属离子的酶溶液酶活力为 100%，其他金属离子下与之相比为相对酶活，绘制酶活影响曲线，计算相对酶活。

1.2.7 数据分析

独立重复进行 3 次试验，结果表示 3 次测定的平均值±标准偏差，所有曲线以 Origin 8.0 作图。

2 结果与分析

2.1 产酶菌株的筛选

以采集于发酵过程中的新鲜葡萄汁为分离源分离得到具有水解蛋白酶活性的菌株 3 株，通过蛋白酶透明圈试验选取得到水解圈最大的 1 号菌株，结果如表 1 所示：

表 1 产酶菌株筛选结果

Table 1 Results of the screening strain

	1 号	2 号	3 号
水解圈直径/cm	2.25±0.02	1.84±0.01	2.14±0.02
蛋白酶活力/(U/mL)	143.6±1.20	115.4±2.01	132.7±1.50

由表 1 可知，分离得到的 3 株菌株均具有水解蛋白质的能力，通过水解圈直径测量可知 1 号菌株水解能力最强，3 号菌株次之；酶活测定结果表明，1 号菌株产蛋白酶能力高于其他 2 株，3 号菌株酶活力与 1 号较接近，表明该菌株具有可能的开发前景，故选择 1 号和 3 号菌株为本次试验初次筛选的菌株。

2.2 产酶菌株诱变选育

表 2 菌株诱变选育对酶活的影响

Table 2 Effect of mutation on protease activity

	1 号	3 号
诱变前酶活力(U/mL)	143.6±1.20	132.7±1.50
诱变后酶活力(U/mL)	212.59±3.40	178.32±3.60

将产蛋白酶能力较好的菌株进行诱变选育，结果如下：由表 2 可知，各菌株经紫外-微波复合诱变后，酶活力均不同程度增大，1 号菌株酶活力增加 68.99±2.20，3 号菌株酶活力增加 45.62±2.10，经诱变后，1 号菌株所产蛋白酶活力明显高于 3 号菌株，故本次试验所得菌株为 1 号诱变菌株。

2.3 26s rRNA 基因序列分析

对 1 号菌株进行 DNA 的提取和 PCR 扩增，通过分子生物学手段鉴定该菌株的 ITS 核苷酸序列如下：

AATcATTGTTGCTCGAGTTCTTGTTTAGATCT
TTTACAATAATGTGTATCTTTATTGAAGATGTGCG
CTTAATTGCGCTGCTTCTTTAGAGTGTCGCAGTG
AAAGTAGTCTTGCTTGAATCTCAGTCAACGCTAC
ACACATTGGAGTTTTTTACTTTAATTTAATTCTTT
CTGCTTTGAATCGAAAGGTTCAAGGCAAAAAAC
AAACACAAACAATTTTATTTTATTATAATTTTTTA
AACTAAACCAAAATTCCTAACGGAAATTTTAAAA
TAATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATTGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTG
AATTTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGAGCATTC
TCAGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCTTC

TCAAAAGATAATTTATTATTTTTTGGTTGTGGGCG
ATACTCAGGGTTAGCTTGAAATTGGAGACTGTTT
CAGTCTTTTTTAATTCAACACTTAGCTTCTTTGG
AGACGCTGTTCTCGCTGTGATGTATTTATGGATTT
ATTCGTTTTACTTTACAAGGGAAATGGTAACGTA
CCTTAGGCAAAGGGTTGCTTTTAATATTCATCAA
GTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGA
ACTTAAGCATATCA

由表 3 可知，1 号菌株的 26s r RNA 基因序列和 BLAST 比对结果显示它与 *Hanseniaspora uvarum* strain Tcy19 菌的 26s r RNA(HM601459.1)有 100%的相似度。构建的系统发育树(图 1)表明 1 号菌株在 *Hanseniaspora* 属进化树一个分支上，因此，该菌株为葡萄汁有孢汉生酵母菌株，命名为：XYN162（*H.uvarum* XYN162）。

表 3 1 号菌株的 26s rRNA 基因测序 BLAST 结果

Table 3 The BLAST results of 26s r RNA gene sequencing of strain 1

Description	Max Score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Hanseniaspora uvarum strain Tcy19 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1284	1284	99%	0.0	100%	HM601459.1

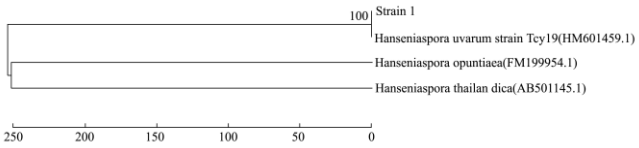


图 1 1 号菌株基于 26s r RNA 基因发育树

Fig.1 The development tree diagram based on 26s r RNA genes of strain 1

2.4 酶的最适 pH 及其酸碱稳定性

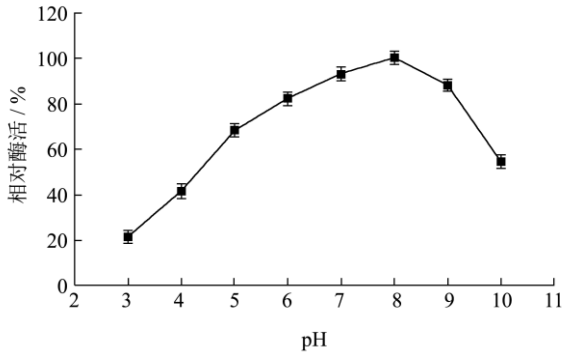


图 2 pH 对蛋白酶活性的影响

Fig.2 Effect of pH on protease activity

测定不同 pH 对蛋白酶活性的影响，如图 2 所示，pH 在 3~8 范围内，该菌株所产蛋白酶的酶活力逐渐升高，在酸度较大时酶活力很低，pH 为 8.0 时，酶活力达到最高，继续增加 pH 时，酶活力有所下降，故确定该菌株的产酶最适 pH 为 8.0。

如图 3 所示，该蛋白酶在 pH 为 7.0~8.0 时，稳定性较好，达到 90%以上；在酸性条件下，酶活力损失较严重，说明该菌株所产蛋白酶不耐酸性，在碱性条件下具有明显的优势。

2.5 酶的最适温度及其热稳定性

在不同温度下，测定蛋白酶的活性，由图 4 可知，随着温度的增加，蛋白酶活力增大，在 37 ℃时，该菌株表现了最佳酶活力，在 30~37 ℃的范围内各菌株均具有较高活性，当温度低于 30 ℃或高于 42 ℃时，酶活力显著降低。

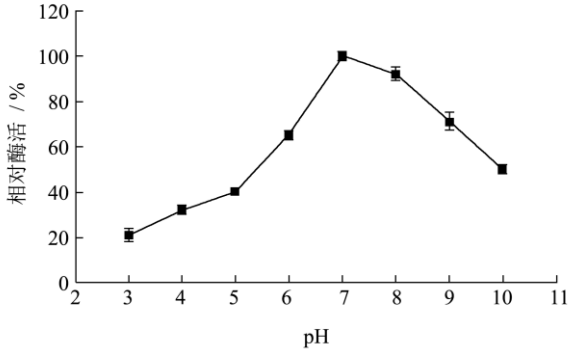


图 3 pH 稳定性

Fig.3 pH stability

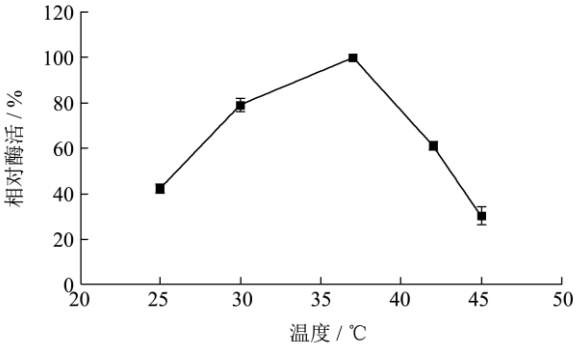


图 4 温度对蛋白酶活性的影响

Fig.4 Effect of temperature on protease activity

如图 5 所示，随着温度的升高，经一段时间后，酶的活性逐渐降低；在 35 ℃下，在不同时间内，测定的酶的活性相对稳定，保温 60 min 后，仍保留 85%的活性；55 ℃下保温 15 min 后，酶活力损失 60%，

保温 60 min 后，剩余酶活力仅为 10%。由此可知，该蛋白酶在 35 ℃拥有良好的稳定性。

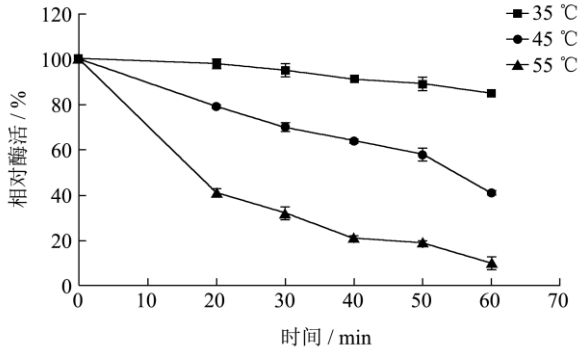


图 5 热稳定性

Fig.5 Thermal stability

2.6 金属离子对蛋白酶活性的影响

表 4 金属离子对酶活力的影响

Table 4 Effect of metal ions on protease activity

金属离子	浓度/(mmol/L)	相对酶活力/%
双蒸水	1	100±0.0
Ca^{2+}	1	121.12±1.32
Fe^{2+}	1	146.24±0.72
Mg^{2+}	1	85.15±1.53
Cu^{2+}	1	68.23±0.27

如表 4 所示，Fe^{2+}和 Ca^{2+}对该菌株所产蛋白酶的酶活力均有较高的激活作用，Fe^{2+}的激活作用最大，为 146.24±0.72%；Mg^{2+}和 Cu^{2+}有明显的抑制作用，Cu^{2+}的抑制作用最显著，为 68.23±0.27%。

3 结论

3.1 酿酒葡萄中存在的蛋白质和多糖使酒体浑浊，虽然皂土可以一定程度的消除蛋白质，但是这一非特异性的过程使得使风味化合物减少，进而影响葡萄酒的感官特性[10]。Charoenchai et al. (1997)研究非酿酒酵母菌中蛋白酶的活性表明，在酿酒过程中，胞外酶对氮源的生成具有重要影响[11]。然而，在葡萄酒的自然发酵过程中，蛋白酶的活性较低，因此，筛选出具有高活性的非酿酒酵母菌蛋白酶并应用于酿酒过程中是目前研究的重点。Lagace & Bisson (1990)研究表明在 Chenin Blanc 和 Chardonnay 葡萄酒中添加柠檬形克勒克酵母（*K.apiculata*）可有效消除酒体中的蛋白质[12]，并证明，在葡萄酒酿造过程中添加木樨榄假丝酵母（*Candida olea*），解脂假丝酵母（*Candida lipolytica*），铁红假丝酵母（*Candida pulcherrima*）和柠檬形克勒克假丝酵母（*K.apiculata*）可有效降低酒体浑浊。Dizy & Bisson (2000)证明克勒克假丝酵母属（*Kloeckera*）和有孢汉生酵母属（*Hanseniaspora*）在葡萄汁中具有较高蛋白酶活力并能影响酒体成熟[13]。

3.2 在新疆赤霞珠葡萄酒发酵过程中通过对非酿酒酵母菌的采集与筛选，得到 1 株产蛋白酶能力较强的菌株；紫外-微波复合诱变后，酶活力增加 1.47 倍；经 26S rRNA 基因序列分析鉴定为葡萄汁有孢汉生酵母，并命名为 XYN162（*H.uvarum* XYN162）；酶学性质研究表明：该菌株所产蛋白酶最适 pH 为 8.0，在 pH 为 7.0~8.0 时酶活力保持在 90%以上；酶的最适作用温度为 37 ℃，在 35 ℃酶活力保持较好；金属离子依赖性发现，Fe^{2+}、Ca^{2+}对酶有不同程度的激活作用，Mg^{2+}、Cu^{2+}对酶有明显的抑制作用，说明此菌株所产的蛋白酶对金属离子具有依赖性。以上数据确认该菌株为产碱性蛋白酶葡萄汁有孢汉生酵母。

参考文献

[1] Mirko Gobbi; Luciana De Vero. Fermentative aptitude of non-Saccharomyces wine yeast for reduction in the ethanol content in wine [J]. European Food Research and Technology, 2014, 51: 1453-1459

[2] Domizio P, Liu Y. Use of non-Saccharomyces wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine [J]. Food Microbiol., 2014, 25: 287-293

[3] Ubeda J, Maldonado Gil M. Biodiversity of non-Saccharomyces yeasts in distilleries of the La Mancha region (Spain) [J]. FEMS Yeast Research, 2014, 122: 312-320

[4] Neil P Jolly, Cristian Varela, Isak S Pretorius. Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered [J]. FEMS Yeast Research, 2014, 36(2): 267-272

[5] Quirós M, Rojas V. Selection of non-Saccharomyces yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration [J]. Int. J. Food Microbiol., 2014, 45: 249-257

[6] 赵丰丽,黄翠,陈睿.复合诱变对酵母产脂的影响及检测方法的研究[J]. 中国油脂,2007,7:34-37
ZHAO Feng- li, HUANG Cui, CHEN Rui. Effect of compound mutation on the oil production by yeast and its detection [J]. Chinese Oil, 2007, 7: 34-37

[7] Maturano Y P, Rodríguez Assaf L A. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts during wine fermentation [J]. Int. J. Food Microbiol., 2012, 39(1): 283-287

[8] 陈杰,赵雨薇,倪永清,等.新疆石河子地区酵母菌的生物多样性及系统发育研究[J]. 中国酿造,2012,11:102-105
CHEN Jie, ZHAO Yu-wei, NI Yong-qing, et al. Selective isolation and diversity of natural yeasts from shihezi area of

Xinjiang [J]. China Brewing, 2012, 11: 102-105

[9] Nally M C, Pesce V M. Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by Saccharomyces and other yeast species [J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 139: 325-334

[10] G C Rollán, et al. Protease production by *Leuconostoc oenos* strains isolated from wine [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1993, 3(5): 2-8

[11] C CHAROENCHAI, G H FLEET. Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 1997, 60(1): 178-184

[12] Linda S Lagace, Linda F Bisson. Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction [J]. American Journal of Enology and Viticulture. 1990, 107(2): 239-245

[13] MARTA DIZY, LINDA F BISSON. Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2000, 15(2): 105-115

现代食品科技