

海水养殖凡纳滨对虾肠道产蛋白酶菌株的筛选、鉴定

杨亚东, 杨锡洪, 解万翠, 吴帅, 吉宏武, 刘书成, 毛伟杰, 李承勇

(广东海洋大学食品科技学院, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要: 为开发海洋来源的微生物蛋白酶, 本文以海水养殖凡纳滨对虾肠道为原料, 利用蛋白酶水解圈法初筛得到 27 株产蛋白酶菌株, 测定菌株的透明圈直径与菌落直径比值 (即 D/d) 初步估计其产酶能力, 通过发酵液酶活测定复筛得到一株高产蛋白酶菌株, 编号为 xc10, 通过形态学观察、生理生化鉴定、16S rDNA 基因序列分析及系统发育树分析进行菌种鉴定, 并对其发酵液粗蛋白酶的酶学性质进行了初步探讨。结果表明: 菌株 xc10 为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), 蛋白酶的最适温度为 50 ℃; 最适 pH 为 7.5; Fe³⁺、Cu²⁺、EDTA 对该酶有抑制作用, 但 Zn²⁺ 对该酶有激活作用。因此, 从海水养殖的凡纳滨对虾肠道中分离得到的产蛋白酶的菌株 xc10 为一株中性、中温蛋白酶菌, 为开发利用海洋微生物蛋白酶在水产品加工的应用提供了理论基础。

关键词: 凡纳滨对虾; 肠道微生物; 蛋白酶; 筛选; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2015)1-131-136

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.024

Screening and Identification of Protease-producing Bacteria from the Intestines of Maricultured *Litopenaeus vannamei*

YANG Ya-dong, YANG Xi-hong, XIE Wan-cui, WU Shuai, JI Hong-wu, LIU Shu-cheng, MAO Wei-jie, LI Cheng-yong

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In this study, to obtain marine-derived microbial protease, 27 protease-producing bacterial strains were isolated from the intestines of maricultured *Litopenaeus vannamei* using protease hydrolysis circle method. Enzyme production by different strains was preliminarily estimated by determining the ratio of transparent circle diameter to colony diameter (D/d). A high-yield protease-producing strain, named as xc10, was isolated during secondary screening by measuring protease activity of fermentation broth. It was identified as *Bacillus cereus* by cell morphology, physiological, and biochemical characteristics, 16S rDNA gene sequence analysis, and phylogenetic tree analysis. Enzyme properties of crude protease in the fermentation broth were investigated. The optimal temperature and the pH for protease were 50 ℃ and 7.5, respectively. Additionally, the enzyme activity was inhibited by Fe³⁺, Cu²⁺, and EDTA, while Zn²⁺ slightly increased the enzyme activity. Therefore, strain xc10 isolated from the intestine of maricultured *Litopenaeus vannamei* was confirmed as a bacterial strain producing mesophilic neutral protease. This study provides a theoretical basis for the development and application of marine-derived microbial proteases in the processing of aquatic products.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; intestinal microorganism; protease; screening; enzyme properties

蛋白酶作为一种重要的工业酶制剂, 通过催化蛋白质和多肽的水解, 广泛应用于乳制品、酿酒、肉类加工、烘焙食品、饮料、调味品以及水产品加工等行业。

收稿日期: 2014-06-10

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (GARS-47)

作者简介: 杨亚东(1989-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为水产品加工及贮藏工程

通讯作者: 解万翠(1969-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 食品风味和食品质量与安全

业。在水产品加工中主要应用于水解蛋白、制备海鲜调味基料、功能性物质的提取、鱼类脱鳞去皮、以及加工鱼骨制品等。

蛋白酶广泛存在于动、植物和微生物中, 与动植物来源蛋白酶相比而言, 微生物蛋白酶具有生产成本低、生产速度快、易扩大产量、生产条件易于控制、下游处理简单等优点^[1]。不同的蛋白酶有不同的酶切方式, 对氨基酸残基形成的肽键有其酶解专一性, 因此当不同的蛋白酶作用于同一底物时, 会产生不同的

氨基酸和小肽水解物,使蛋白水解物具有不同的口味和功能特性。海洋微生物蛋白酶具有作用温度范围广、作用 pH 范围宽、催化效率高、耐盐性强等特点,相比陆生微生物蛋白酶应用于水产品加工中可能还具有近源性等优点,对水产品底物有更好的水解效果,使蛋白水解物具有不同的口味和功能特性。近年来,海洋微生物低温酶的研究正逐渐成为开发新型酶制剂的重要途径^[2]。

产蛋白酶海洋微生物的筛选来源主要集中在深海海水^[3]、深海泥沙^[4]、沿海^[5]、海洋动物肠道^[6-7]等。其中,海洋动物肠道中存在大量的微生物菌群,能够分泌各种酶类,具有一定的研究价值,目前的研究主要集中于水产动物肠道菌群的构成及消化道生理特性,以确保在养殖过程中营养物的充分利用和水产动物的健康生长,而肠道微生物蛋白酶作为消化酶,应用于水产品加工中的研究不多。本论文拟从凡纳滨对虾肠道中分离产蛋白酶菌株,并对其所产蛋白酶得酶学性质初步研究,为该菌株及其所产蛋白酶在水产品加工中的应用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

海水养殖凡纳滨对虾肠道,采自湛江国联水产开发有限公司

1.1.2 主要试剂

琼脂、蛋白胨、酵母膏,北京奥博星生物技术有限公司;酪蛋白,国药集团化学试剂有限公司;福林酚试剂,上海荔达生物科技有限公司;三氯乙酸,成都市科龙化工试剂厂。

1.1.3 主要仪器

LG20-W 高速冷冻离心机,博动行仪器有限公司;UV-3200PC 紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;SPX-250B-Z 型恒温培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;HZQ-F160 恒温摇床,金坛市万华实验仪器厂。

1.1.4 培养基

2216E 培养基(g/L)^[8]:蛋白胨 5,磷酸铁 0.1,酵母膏 1,琼脂 15, pH7.5;

筛选培养基(g/L):蛋白胨 5,磷酸铁 0.1,酵母膏 1,酪蛋白 5,琼脂 15, pH7.5;

斜面培养基(g/L):蛋白胨 5,磷酸铁 0.1,酵母膏 1,琼脂 15, pH7.5;

种子及基础发酵培养基:蛋白胨 5,酵母膏 1,

pH7.5;

以上培养基均用陈海水配制。

1.2 实验方法

1.2.1 产蛋白酶菌株的初筛

将采集的凡纳滨对虾肠道用无菌海水制备 10^1 菌悬液,以十倍稀释法稀释至 10^{-6} ,将 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度梯度分别涂布于筛选培养基中,于恒温培养箱 28 ± 2 °C 培养 2 d。观察菌落形态,挑取产蛋白水解圈的菌株于 2216E 培养基进行划线分离, 28 ± 2 °C 培养 2 d,得到单菌落,通过菌落形态观察及革兰氏染色,统计筛选得到的产蛋白酶菌株。

用无菌牙签挑取少许菌体点种于筛选培养基平板中,于恒温培养箱 28 ± 2 °C 培养,分别培养 1、2、3 d 后测量蛋白水解圈直径(D)和菌落直径(d),计算 D/d 值。

1.2.2 产蛋白酶菌株的复筛

初筛后菌株于斜面培养基中活化培养 1 d,加入 5 mL 无菌海水制备菌悬液,以 2.0% 的接种量接种于 50 mL 发酵培养基中,于恒温摇床中 150 r/min, 28 ± 2 °C 培养 2 d,将发酵液于 4 °C、10000 r/min 离心 15 min,得到粗酶液,测定其蛋白酶活力,并将沉淀烘干称重测定菌体生长量^[9]。

1.2.3 蛋白酶活力的测定

蛋白酶活力的测定采用福林酚法。蛋白酶活力定义:40 °C、pH 7.5 条件下,每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸所需酶量,定义为 1 个蛋白酶活力单位,以 U/mL 表示。

1.2.4 菌株 xc10 的鉴定

1.2.4.1 菌株的形态学观察

将菌种划线于 2216E 平板上, 28 ± 2 °C 培养 2 d,观察菌落形态特征,取典型菌落进行革兰氏染色,观察菌体形态特征。

1.2.4.2 菌株的生理生化鉴定

按照《伯杰氏系统细菌学手册》(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)进行生理生化鉴定。

1.2.4.3 16S rDNA 序列分析及系统发育分析

将菌种送检至华大基因公司进行 16S rDNA 序列测定。测序结果用 NCBI-BLAST 软件在 GenBank 中进行同源性检索,采用 Blast 程序进行多序列比对,应用 MEGA 5.2 软件构建菌株系统发育树。

1.2.5 酶学性质初步研究

1.2.5.1 最适作用温度及热稳定性

将粗酶液与底物在 pH 7.5 和不同温度(20~60 °C)条件下进行酶活力的测定,以确定最适作用温度。为

测定其热稳定性, 将酶液分别于不同温度下保温 20、40、60、120、180、240 min, 测保留蛋白酶活力, 以未处理的酶液活力为 100%, 计算相对酶活力, 研究酶的热稳定性。

1.2.5.2 最适作用 pH 及 pH 稳定性

分别用不同 pH 的缓冲液 (Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液 pH 5.5~7.0; Tris-HCl 缓冲液 pH 7.5~9.0; 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 pH 9.5~12.0) 配制底物、稀释酶液, 进行酶活力测定, 确定酶的最适作用 pH。为测定其 pH 稳定性, 用不同的缓冲液分别调酶液 pH 4.0~12.0, 于 30 °C 恒温水浴中保温 30、60 min, 然后分别在最适 pH 下测保留蛋白酶活力, 以未处理的酶液活力为 100%, 计算相对酶活力, 研究酶的 pH 稳定性。

1.2.5.3 金属离子及 EDTA 对酶活的影响

将各种金属离子 (Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Al³⁺、Ba²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Pb²⁺)、EDTA 与酶液混合, 使其最终浓度达到 2.0、5.0 mmol/L, 进行酶活力测定, 以未处理的酶液酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 研究金属离子及 EDTA 对酶活的影响。

1.2.6 数据分析

所有试验重复 3 次, 结果用平均值±标准偏差表示, 采用 Excel 2003 和 Origin 8.0 进行数据处理和作图分析。

2 结果与讨论

2.1 产蛋白酶菌株的初筛

根据菌落的形态特征及部分菌株的革兰氏染色结果, 共分离得到 27 株菌。27 株菌的 3 d D/d 值的平均值测定结果如图 1, 其中, 菌株 xc4、7、13 第一天无蛋白水解圈。

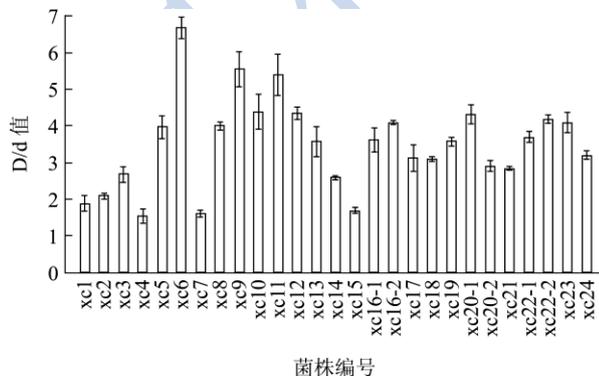


图 1 不同菌株 D/d 平均值测定结果

Fig.1 Average D/d for different strains

依据筛选培养基上 D/d 值初步估计其产酶能力, D/d 值较大其产酶能力可能较强。张晓燕^[10]从新疆阿勒泰地区的冻土筛选产低温蛋白酶菌株的筛选的研究

表明 D/d 值与酶活力的大小成一定的相关性, 任佩^[6]从章鱼肠道筛选产蛋白酶菌株时对初筛得到的 6 株菌进行发酵产酶实验, 结果显示 D/d 值较大的菌株其产酶能力较强, 故依据 D/d 值可进行菌株的初筛。由图 1 可知, 3 d D/d 值平均值大于 3 的菌株有 xc5、6、8、9、10、11、12、13、16-1、16-2、17、18、19、20-1、22-1、22-2、23、24, 其中菌株 xc13 第 1 d 无蛋白水解圈产生且菌体生长缓慢, 鉴于前期的实验基础证实其发酵液酶活较低, 不对其进行发酵产酶实验。

2.2 产蛋白酶菌株的复筛

选取初筛得到的 17 株菌株分别进行摇瓶发酵培养, 测定各菌株发酵液蛋白酶活力及菌体生长量, 结果如图 2 所示。

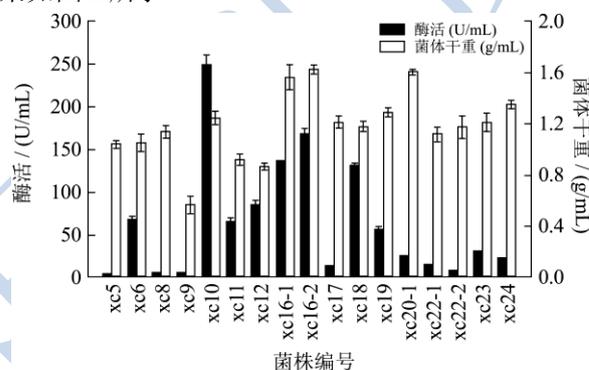


图 2 不同菌株蛋白酶酶活及菌体生长量测定结果

Fig.2 Protease enzyme activity and bacterial growth of different strains

由图 2 可知, 菌株 xc10 的发酵液粗蛋白酶酶活最高, 达到 249.50 U/mL, 其次为菌株 xc16-2, 粗蛋白酶活力达到 168.18 U/mL。不同菌株接种于等量发酵培养基进行发酵培养, 酶活较高则菌株产酶量较多, 而菌体生长量较高则菌体生长繁殖较快、易于培养。由图 1、2 可知, D/d 值较大的菌株其产酶能力不一定强, 可能是由于不同菌株在摇床发酵过程中的培养条件如摇床转速、装液量、培养基起始 pH、培养时间等因素影响其代谢产物的产生, 顾瑾麟^[11]在从开菲尔粒中筛选高产蛋白酶菌株研究中对初筛得到 D/d 值较高的 3 株菌进行复筛, 结果表明 D/d 值最高的菌株 Kx-3 发酵液酶活力明显低于 Kx-7。综合考虑 D/d 值、发酵液酶活及菌体生长量 3 个因素, 选取菌株 xc10 作为目标菌株, 进行后续研究。

2.3 菌株 xc10 的鉴定

2.3.1 生理生化鉴定

菌株 xc10 培养 2d 形成直径 2~3 mm 菌落, 其形态特征如图 3a 所示, 圆形、表面光滑、中间凸起、边

缘整齐、浅褐色、半透明、较光泽，革兰氏染色显微照片如图 3b 所示为杆状、革兰氏阳性。菌株 xc10 部分生理生化鉴定结果如表 1，其生长温度范围较宽、较适宜低温生长，好氧，具有较好的氯化钠耐受性，能水解酪素、明胶、淀粉。



图 3 菌落形态及革兰氏染色图片

Fig.3 Colony morphology and Gram stain

表 1 菌株 xc10 的生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of bacterial strain xc10

bacterial strain xc10			
试验因素	结果	试验因素	结果
葡萄糖	+	5%NaCl	+
木糖	-	10%NaCl	-
乳糖	+	甲基红	-
甘露醇	+	V-P	+
酪素	+	吲哚	-
明胶	+	接触酶	+
淀粉	+	氧化酶	+
生长温度/℃	10~35	淀粉酶	+
好氧性	+	苯丙氨酸脱氢酶	-

注：“+”结果表示阳性，“-”结果表示阴性。

2.3.2 分子鉴定

以菌株 xc10 DNA 作为模板，利用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增，得到了一条约 1500 bp 大小的条带，如图 4 所示。

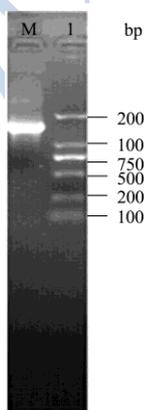


图 4 菌株 xc10 16S rDNA 的 PCR 产物

Fig.4 PCR products of 16S rDNA of strain xc10

注：M:DS-2000 DNA Marker, 1: 16S rDNA 的 PCR 产物经测序得知 16S rDNA 的目的片段为 1467 bp。将其序列提交到 GenBank，利用 Blast 程序与数据库基因序列进行比对，结果显示与蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的同源性达到 100%。选取与菌株 xc10 同源性较高的 8 株菌，利用 ClustalX 2.1 和 Mega 5.2 软件构建系统发育树，如图 5。

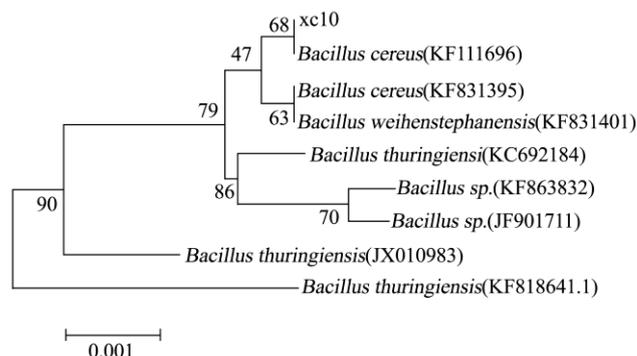


图 5 以菌株 xc10 及其相关菌株的 16S rDNA 序列为基础构建的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of bacterial strain xc10 and related strains based on 16S rDNA sequence

注：节点处数值代表取样 1000 次 bootstrap 检验后的置信度值(%), 标尺代表每个核苷酸位置发生变化的数目。

2.4 酶学性质

2.4.1 最适作用温度及热稳定性

由图 6a 可知，该酶最适作用温度为 50℃，在 50~60℃ 温度范围时有较高的催化活力，为中温蛋白酶，微生物蛋白酶的最适作用温度一般是 30~75℃，不同属的细菌所产蛋白酶最适作用温度不同，芽孢杆菌属所产的蛋白酶最适作用温度相对较高，如短芽孢杆菌产的蛋白酶的最适温度为 55℃^[12]，龙舌兰芽孢杆菌所产蛋白酶最适作用温度为 50℃^[13]。由图 6b 该酶在 40℃ 条件下保温 240 min 后酶活仍能保持 85% 以上，50℃ 时，保温 60 min 后酶活可保留约 70%，240 min 后酶活为 41.3%，60℃ 保温 120 min 后酶活性基本丧失，对热较为敏感。

由于该蛋白酶的最适作用温度的测定是在酶促反应时间 10 min 下进行的，此期间酶的失活对测定结果影响较小。Anjali Bose^[13]等从印度杰考港沿岸分离得到菌株 *Bacillus tequilensis* P15，所产蛋白酶最适温度为 50℃，该温度下保温 240 min 保留约 40% 的酶活力，与本文结果相似。因此，该酶不适宜在较高温度下进行长时间酶解反应，后续在实际应用中须考虑酶促反应温度、时间对酶失活的影响。

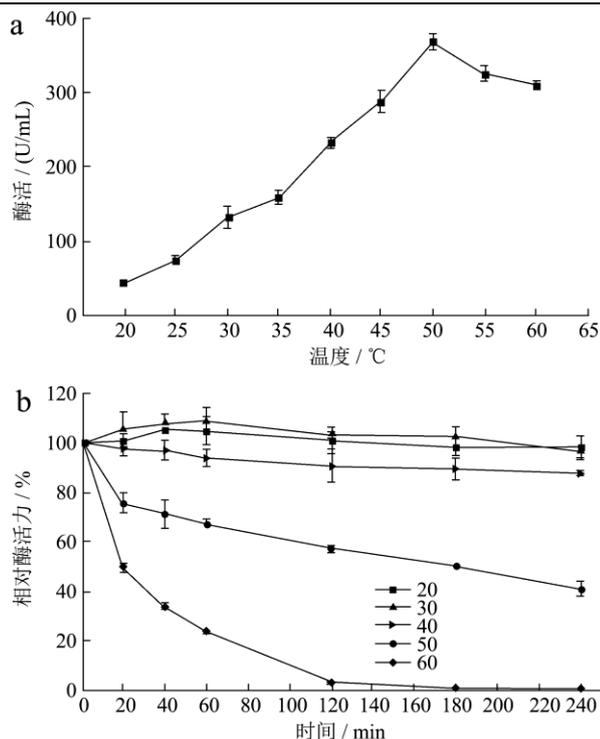


图6 温度对蛋白酶活力(a)及其热稳定性(b)的影响

Fig.6 Effect of temperature on protease activity and thermal stability

2.4.2 最适作用 pH 及 pH 稳定性

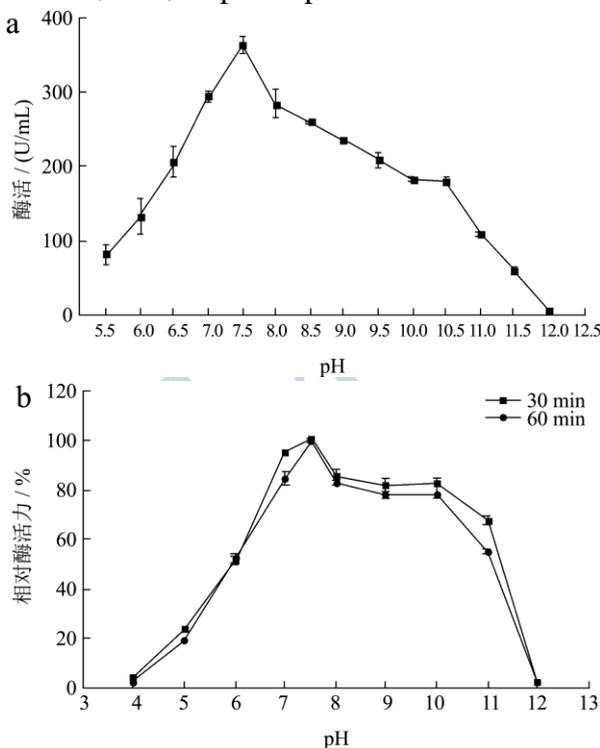


图7 pH对蛋白酶活力(a)及其稳定性(b)的影响

Fig.7 Effect of pH on protease activity and stability

由图7a可知,蛋白酶的最适pH为7.5左右,在pH 7.0~9.0范围内活性较高,表明该菌所产蛋白酶为中性蛋白酶,当pH高于11时酶活性迅速下降。由图

7b可知,该酶在pH 6.5~10.0范围内酶活性较为稳定,保温60 min后酶活均能保持75%以上;当pH低于5.0或高于10.5时酶活性稳定性很差,可能是在过酸或过碱对酶的活性结构造成了一定程度的破坏,且随着保温时间的延长,酶失活的越严重。

2.4.3 金属离子及EDTA对酶活的影响

表2 金属离子和EDTA对酶活力的影响

Table 2 Effect of metal ions and EDTA on protease activity

因素	相对酶活力/%	
	2 mmol/L	5 mmol/L
对照	100±1.08	100±1.08
Na ⁺	97.93±1.38	91.63±0.79
Ca ²⁺	90.05±0.39	86.70±2.56
Mg ²⁺	96.75±0.39	94.29±0.49
K ⁺	99.61±0.49	93.20±0.59
Zn ²⁺	103.45±0.59	106.80±0.59
Cu ²⁺	33.99±1.08	25.81±1.58
Al ³⁺	100.79±2.46	92.02±0.20
Ba ²⁺	94.88±0.49	83.05±0.89
Fe ²⁺	98.13±2.56	86.40±0.10
Fe ³⁺	63.84±0.00	56.95±2.17
Pb ²⁺	91.82±0.00	85.71±1.97
EDTA	56.06±0.10	48.18±1.28

由表2可知,金属离子及EDTA浓度不同对酶活的影响也有一定的差异, Chittoor Jabeena Thaz^[14]等从古姆达沿岸筛选得到一株产蛋白酶海洋细菌,其蛋白酶的酶学性质研究表明金属离子及抑制剂的浓度对酶活的影响差异较显著,且作用效果不与浓度呈现一定的相关性。其中Zn²⁺对粗蛋白酶有一定的激活作用;Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Fe²⁺对酶活力作用不明显;Cu²⁺、Fe³⁺、EDTA对该蛋白酶活力有较强的抑制作用,其中Cu²⁺的抑制作用尤其强烈;其他金属离子对酶活力均有轻微的抑制作用。

3 结论

3.1 凡纳滨对虾肠道存在具有产胞外蛋白酶能力的海洋细菌。经过初筛得到27株具有产蛋白酶能力的菌株,复筛得到一株产酶能力较强的菌株xc10,经形态学观察、生理生化鉴定及分子鉴定,得知菌株xc10为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

3.2 对菌株xc10所产蛋白酶酶学性质进行了初步研究,结果显示,蛋白酶的最适作用温度为该酶最适作用温度为50℃,在50~60℃温度范围时有较高的催化活力,对热较为敏感,在60℃保温120 min后酶活性基本全部丧失;最适作用pH值为7.5,在pH 7.0~9.0

范围内有较高的活性,且在 pH6.5~10.5 范围内该蛋白酶较为稳定; Zn^{2+} 对粗蛋白酶有一定的激活作用, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、EDTA 对该蛋白酶活力有较强的抑制作用。

参考文献

- [1] 邓菊云.微生物碱性蛋白酶研究进展[J].现代食品科技, 2008,24(3):293-296
DENG Jun-yun. Research progress in microbial alkaline protease [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(3): 293-296
- [2] Huston, Adrienne L. Remarkably low temperature optima for extracellular enzyme activity from *Arctic bacteria* and sea ice [J]. Environmental Microbiology, 2000, 2(4): 383-389
- [3] CHEN Xiu-lan, ZHANG Yu-zhong, GAO Pei-ji, et al. Two different proteases produced by a deep-sea psychrotrophic bacterial strain, *Pseudoalteromonas sp.* SM9913 [J]. Marine Biology, 2003, 143: 989-993
- [4] Nelda L Olivera, Cynthia Sequeiros, Marina L Nievas. Diversity and enzyme properties of protease producing bacteria isolated from sub-Antarctic sediments of Isla de Los Estados, Argentina [J]. Extremophiles, 2007, 11: 517-526
- [5] Megha K Purohit, Satya P Singh. Comparative analysis of enzymatic stability and amino acid sequences of thermostable alkaline proteases from two haloalkaliphilic bacteria isolated from Coastal region of Gujarat, India [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49: 103-112
- [6] 任佩,金玉兰,朴美子.章鱼肠道产蛋白酶菌的筛选、产酶条件及酶学性质[J].食品科学,2013,34(1):189-193
REN Pei, JIN Yu-lan, PIAO Mei-zi. Screening of protease-producing bacterium from octopus *vulgaris* intestine, fermentation conditions and enzymatic properties [J]. Food Science, 2013, 34(1): 189-193
- [7] F Sahnouni, A Matallah-Boutiba, D Chemlal, et al. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish in the Oran Algeria coast [J]. Agricultural Journal, 2012, 7(2): 81-87
- [8] Ramamoorthy Sathish Kumar, Gnanakkan Ananthan, Antonyraj Selva Prabhu. Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Marinobacter sp.* GACAS9 using response surface methodology-A statistical approach [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, 12: 1-7
- [9] WENG-Ta Su, LIU Huan-liang. Response surface optimization of microbial prodigiosin production from *Sarmatia marcescens* [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2011, 42: 217-222
- [10] 张晓燕,古丽娜孜,库米拉,等.一株产低温蛋白酶菌株的筛选、鉴定及生长特性的研究[J].食品工业科技,2014,35(5): 145-149
ZHANG Xiao-yan, GU Li-nazi, KU Mi-la, et al. Screening, identification and growth characteristic of a low-temperature proteinase producing strain [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 145-149
- [11] 顾瑾麟,夏永军,张红发,等.开菲尔粒中高产蛋白酶菌株的筛选及培养基优化[J].现代食品科技,2013,29(3):558-562
GU Jin-lin, XIA Yong-jun, ZHANG Hong-fang, et al. Screening of high protease-producing bacteria of kefir grains and optimization of fermentation media [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(3): 558-562
- [12] 廉立慧,高丽君,王德才,等.高温蛋白酶产生菌的筛选及其产酶条件和酶学性质分析[J].生物技术通报,2011,3: 175-179
LIAN Li-hui, GAO Li-jun, WANG De-cai, et al. Screening of thermostable protease-producing bacterium and analysis of fermentation conditions and protease properties [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 3: 175-179
- [13] Anjali Bose, Vishal Chawdhary, Haresh Keharia. Production and characterization of a solvent-tolerant protease from a novel marine isolate *Bacillus tequilensis* P15 [J]. Ann Microbiol, 2014, 64: 343-354
- [14] Chittoor Jabeena Thaz, Gurunathan Jayaraman. Stability and detergent compatibility of a predominantly β -sheet serine protease from *Halotolerant B. aquimaris* VITP4 strain [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172: 687-700