

# 高产中/碱性蛋白酶的枯草芽孢杆菌 W1 菌株的筛选及条件优化

刘晓艳, 封健, 韩傲, 高宁, 连莲, 国立东

(黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:** 为了筛选高产蛋白酶活性细菌, 以大豆及其发酵制品为目标样品, 采用酪蛋白平板筛选到一株既可产中性蛋白酶又可产碱性蛋白酶的细菌菌株 W1, 经形态学及 16S rDNA 基因序列分析鉴定为枯草芽孢杆菌枯草亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis*), 其产中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力分别为 28.99 U/mL 和 33.19 U/mL。通过单因素试验对其产蛋白酶的培养条件进行初步优化, 并在此基础上以总蛋白酶活力为指标对其产蛋白酶条件进一步进行正交试验优化, 最佳条件为培养基初始 pH 9.0, 接种量 4%, 培养温度 35 °C, 培养时间 48 h, 此条件下中性蛋白酶活力为 40.39 U/mL, 碱性蛋白酶活力为 52.02 U/mL, 总蛋白酶活力为 92.41 U/mL, 优化后相应酶活力分别提高了 39.3%、56.7% 和 48.6%, 这将为枯草芽孢杆菌 W1 菌株蛋白酶的酶学性质研究提供帮助, 同时也是对蛋白酶活性枯草芽孢杆菌资源库的丰富。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 中性蛋白酶; 碱性蛋白酶; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2020)04-157-163

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.021

## Isolation and Optimization of *Bacillus subtilis* W1 Strain with High Neutral/Alkaline Protease Activity

LIU Xiao-yan, FENG Jian, HAN Ao, GAO Ning, LIAN Lian, GUO Li-dong

(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**Abstract:** To obtain the bacteria strain with high protease activity, high-protease-producing strain W1 was isolated from soybean products by casein plate method, and identified as *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* by phenotypical characteristics and 16S rDNA sequences. The strain W1 exhibited both neutral protease activity and alkaline protease activity, which were 28.99 U/mL and 33.19 U/mL, respectively. The single factor experiment was selected for preliminary optimization. The orthogonal experimental design was used to optimize the culture condition of *Bacillus subtilis* W1 strain based on the single factor results and the total protease activity was selected as an indicator. The optimal conditions were as follow: the initial pH 9.0 in the medium, 4% inoculation, culture temperature 37 °C, and culture time 60 h. In the above conditions, the activity of neutral protease, alkaline protease and total protease were 40.39 U/mL, 52.02 U/mL and 92.41 U/mL, respectively. Thought optimization, the corresponding protease activities increased by 39.3%, 56.7% and 48.6%, respectively. These results will be helpful to further study the protease characteristics of the *Bacillus subtilis* W1 strain, and also enrich the resource library of *Bacillus subtilis* with protease activity.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; neutral protease; alkaline protease; identification

引文格式:

刘晓艳,封健,韩傲,等.高产中/碱性蛋白酶的枯草芽孢杆菌 W1 菌株筛选及条件优化[J].现代食品科技,2020,36(4):157-163

LIU Xiao-yan, FENG Jian, HAN Ao, et al. Isolation and optimization of *Bacillus subtilis* W1 strain with high neutral/ alkaline protease activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 157-163

蛋白酶因其具有水解蛋白质的作用而在工业上具有重要地位, 广泛应用于洗涤、皮革、食品以及医药

收稿日期: 2019-11-06

基金项目: 黑龙江省教育厅面上项目(12541761)

作者简介: 刘晓艳(1962-), 女, 教授, 研究方向: 农产品深加工

通讯作者: 国立东(1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 保健食品研究与开发

等领域, 全球几乎 20%酶市场均来自于蛋白酶<sup>[1]</sup>, 其在植物、动物以及人体内广泛存在, 但工业蛋白酶主要源于微生物发酵生产<sup>[2]</sup>。枯草芽孢杆菌作为重要的工业微生物之一, 不仅具有高蛋白酶活性, 还可产生纤溶酶<sup>[3]</sup>、木聚糖酶<sup>[4]</sup>、淀粉酶<sup>[5]</sup>, 甚至可降解黄曲霉毒素 B1<sup>[6]</sup>, 但均具有菌株特异性。枯草芽孢杆菌在自然界分布广泛, 如土壤, 地表水及其沉积物, 昆虫、

鱼类及人体消化道, 发酵食品等<sup>[7-11]</sup>。关于枯草芽孢杆菌的蛋白酶活性国内外研究人员已进行了大量研究, 其所产的蛋白酶主要以中性蛋白酶和碱性蛋白酶最为常见<sup>[12,13]</sup>, 酶活力高低与培养基质和培养条件有关。研究人员以木薯纸浆、豆粕和麦麸为培养基质, 研究了枯草芽孢杆菌 DES-59 在不同基质浓度及不同培养条件对其所产中性蛋白酶活性的影响, 发现木薯纸浆、豆粕和接种量对其酶活力影响最明显, 并通过响应面法确定了其最佳条件为 37.38 g/L 木薯纸浆、15 g/L 豆粕和 6.5% 接种量<sup>[14]</sup>。Chatterjee 等<sup>[1]</sup>利用固态发酵法以廉价的麦麸为基质, 优化了产碱性蛋白酶的枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 培养参数, 并发现其所产碱性蛋白酶为热稳定蛋白酶, 最适温度为 50 °C, 并且在 pH 7.0~pH 10.0 范围内稳定, 对乙二胺四乙酸不敏感, 在 SDS、Tween-20 及 Triton X-100 存在时仍具有活性, 故可在去污剂配方中添加使用, 具有潜在的工业应用价值。鉴于枯草芽孢杆菌因蛋白酶活性而在工业上广泛应用, 从自然界中筛选高产蛋白酶活性枯草芽孢杆菌具有重要意义。文中以大豆及其发酵制品为研究对象, 从中分离筛选高产蛋白酶活性枯草芽孢杆菌, 并对其产蛋白酶条件进行初步优化, 旨在为其酶学性质的深入研究及工业化应用提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

样品来源于市售纳豆、豆豉及大豆, 共计 5 个样品。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基(100 mL): 1.0 g 胰蛋白胨, 1.0 g NaCl, 0.5 g 酵母粉, 加水至 100 mL, 固体培养基则需加 2.0 g 琼脂, 121 °C 湿热灭菌 15 min。

酪蛋白培养基: 1.0 g 酪蛋白, 0.2 g 葡萄糖, 0.2 g 酵母膏, 0.2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02 g MgSO<sub>4</sub>, 加水溶解至 200 mL, 再加 4.0 g 琼脂, 121 °C 湿热灭菌 15 min。

#### 1.1.3 主要试剂

福林酚试剂, 北京博奥拓达科技有限公司; 碳酸钠, 天津市光复精细化工研究所; 三氯乙酸(TCA), 天津市致远化学试剂有限公司; 硼酸钠, 天津市巴斯夫化工有限公司; 酪蛋白, 北京奥博星生物技术有限责任公司; L-酪氨酸, 上海康达氨基酸厂; 离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 引物, 华大基因(北京); 其他试剂均为分

析纯。

#### 1.1.4 主要设备

双人单面净化工作台 SW-CJ-2D, 苏州净化设备有限公司; 低速离心机 SC-3610, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 紫外可见分光光度计 SP-752 (PC), 上海光谱仪器有限公司; 电子天平 ME203E, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 酸度计 PB-10, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器 DY04-13-43-00 (LS-30), 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 振荡培养箱 BSD-100, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 数显式电热恒温水浴锅 XMTD-204, 上海跃进医疗器械有限公司; 生物显微镜 DM500, LEICA 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 蛋白酶活性菌株的筛选

取适量样品按照 10% 的比例接种至 LB 液体培养基中, 37 °C 富集培养 24 h, 随后进行梯度稀释, 并将稀释液涂布于 LB 固体培养基, 挑取单菌落并划线于 LB 固体培养基并进行纯化培养, 并将纯化菌株分别接种至酪蛋白固体培养基中, 以筛选蛋白酶活性菌株。若菌株在酪蛋白固体培养基上生长的菌落周围形成透明圈, 则说明该菌株可水解酪蛋白, 具有蛋白酶活性。

### 1.2.2 筛选菌株蛋白酶活性的测定

选取可在酪蛋白固体培养基上形成透明圈的菌株, 接种至 LB 液体培养基中 37 °C 培养 24 h, 培养液经 3000 r/min 离心 10 min 后得上清液即为粗酶液。粗酶液采用 GB/T 23527-2009 中福林-酚法测定蛋白酶活力。蛋白酶活力定义: 1.0 mL 酶液在一定 pH 值条件下, 1 min 于 40 °C 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸定义为一个酶活力单位, 用 U/mL 表示。其中, 磷酸缓冲液(pH 7.5)用于中性蛋白酶活力测定的缓冲液, 而硼酸缓冲液(pH 10.5)用于碱性蛋白酶活力测定的缓冲液。

### 1.2.3 高产蛋白酶活性菌株的鉴定

#### 1.2.3.1 形态学特征

菌株接种至 LB 固体培养基, 37 °C 培养 24 h, 观察形成菌落的形态, 并挑取单菌落进行革兰氏染色观察, 记录菌体细胞特征。

#### 1.2.3.2 16S rDNA 基因序列分析

根据细菌基因组提取试剂盒说明书提取 W1 菌株的基因组 DNA, 并以 27F 和 1541R 分别作为正向和反向引物进行 16S rDNA 基因序列的扩增, 引物序列及 PCR 反应条件参照文献<sup>[15]</sup>。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳确定目标条带, 随后送至华大基因(北京)

测序。获得的基因序列经过校准确定后进行 BLAST 分析,并从 GenBank 中获取同源性最高菌属内模式菌株的 16S rDNA 基因序列,利用 MEGA 5.1 软件与 W1 菌株的 16S rDNA 基因序列进行校准排齐后,构建系统发生树<sup>[16]</sup>。

### 1.2.4 不同培养条件对蛋白酶活性的影响

分别考察不同培养时间、培养温度、接种量及初始 pH 值对菌株所产蛋白酶活性的影响,从而确定单因素试验的最佳培养条件。

### 1.2.5 正交试验优化菌株的蛋白酶活性

选取培养温度、接种量、培养基初始 pH 值及培养时间 4 个因素,根据单因素试验结果,每个因素设定 3 个不同水平,采用  $L_9(3^4)$  正交试验对菌株产蛋白酶活性进行条件优化。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

| 水平 | 因素    |       |         |      |
|----|-------|-------|---------|------|
|    | 温度/°C | 接种量/% | 初始 pH 值 | 时间/h |
| 1  | 35    | 2     | 5       | 24   |
| 2  | 37    | 4     | 7       | 36   |
| 3  | 39    | 6     | 9       | 48   |

### 1.2.6 数据分析

采用 SPSS19.0 软件进行数据统计与分析,结果用均值±标准差表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋白酶活性菌株的初筛

#### 2.1.1 蛋白酶活性菌株的筛选



图 1 分离菌株在酪蛋白琼脂培养基上的生长情况

Fig.1 Growth of the different isolates on the casein agar medium

酪蛋白琼脂培养基通常作为筛选蛋白酶活性的选择培养基<sup>[17]</sup>,文中从 5 个样品中共分离到 11 株菌,并接种至酪蛋白琼脂培养基,37 °C 培养 24 h,发现 W1、W2、R、Fs、F3 共 5 个菌株的菌落周围形成透明圈,展现出了一定的蛋白酶活性,结果如图 1 所示。

### 2.1.2 筛选菌株的蛋白酶活力

酪蛋白琼脂培养基初筛获得的 5 株蛋白酶活性细菌,其具体蛋白酶活力水平仍有待于进一步确定,因菌株分离自非酸性样品,故仅对初筛菌株的中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力进行测定,结果如表 2 所示。

表 2 分离菌株的蛋白酶活力

Table 2 The protease activity of the isolates

| 菌株 | 酶活力/(U/mL)              |                         |
|----|-------------------------|-------------------------|
|    | 中性蛋白酶                   | 碱性蛋白酶                   |
| W1 | 28.99±0.78 <sup>a</sup> | 33.19±1.47 <sup>a</sup> |
| W2 | 10.83±1.64 <sup>b</sup> | 9.55±1.15 <sup>b</sup>  |
| R  | 7.59±2.60 <sup>b</sup>  | 2.22±2.97 <sup>d</sup>  |
| Fs | 1.31±0.63 <sup>c</sup>  | 6.90±0.98 <sup>bc</sup> |
| F3 | 1.14±0.52 <sup>c</sup>  | 4.39±1.07 <sup>cd</sup> |

注:同列数据中 a、b、c、d 字母不同表示差异显著( $p < 0.05$ )。

由表 2 结果可知,W1 和 W2 菌株均表现出了较强的蛋白酶活性,且既能产生中性蛋白酶又能产生碱性蛋白酶,类似报道并不多见。其中 W1 菌株的蛋白酶活力最高,且碱性蛋白酶活力高于中性蛋白酶活力,而杨刚等<sup>[18]</sup>报道的枯草芽孢杆菌中性蛋白酶活力明显高于碱性蛋白酶。W1 菌株的中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力分别为 28.99 U/mL 和 33.19 U/mL,是 W2 菌株相应蛋白酶活力的 2.68 倍和 3.48 倍;W2 菌株中性蛋白酶与碱性蛋白酶活力相差不大,分别为 10.83 U/mL 和 9.55 U/mL;其它 3 株菌的中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力均低于 8.00 U/mL,且以其中一种蛋白酶活性为主,这与大部分研究报道结果相似<sup>[18-20]</sup>。

### 2.2 W1 菌株的鉴定

#### 2.2.1 形态学特征

W1 菌株在 LB 固体培养基中培养 24 h 后形成的菌落形态如图 2a 所示,形成的单菌落为圆形,边缘不整齐,表面粗糙,无光泽,呈草帽状,质地干燥,乳白色,不透明。挑取单菌落涂片进行革兰氏染色观察菌体细胞形态如图 2b 所示,W1 菌株细胞呈短杆状,两端钝圆,单在、成对排列,可形成明显的芽孢。

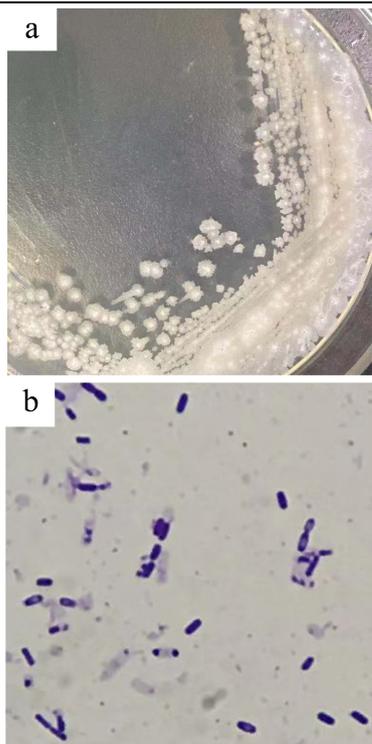


图2 W1菌株的菌落(a)及菌体细胞(b)形态  
Fig.2 The form of colony and cell of the strain W1

### 2.2.2 16S rDNA 基因序列分析

提取 W1 菌株的基因组 DNA, 并以此为模板进行 PCR 扩增其 16S rDNA 基因, PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示。PCR 产物应为 1500 bp 左右, 电泳条带显示其恰好在 1000 bp~2500 bp 之间, 符合要求, 随后送至华大基因进行基因测序, 其碱基序列为 1438 bp, 并按照 1.2.3.2 的方法构建菌株系统发生树, 结果如图 4 所示。

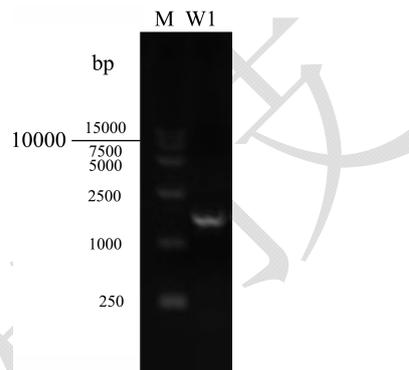


图3 W1菌株16S rDNA基因PCR产物电泳图

Fig.3 Electropherogram of PCR products of 16S rDNA in the strain W1

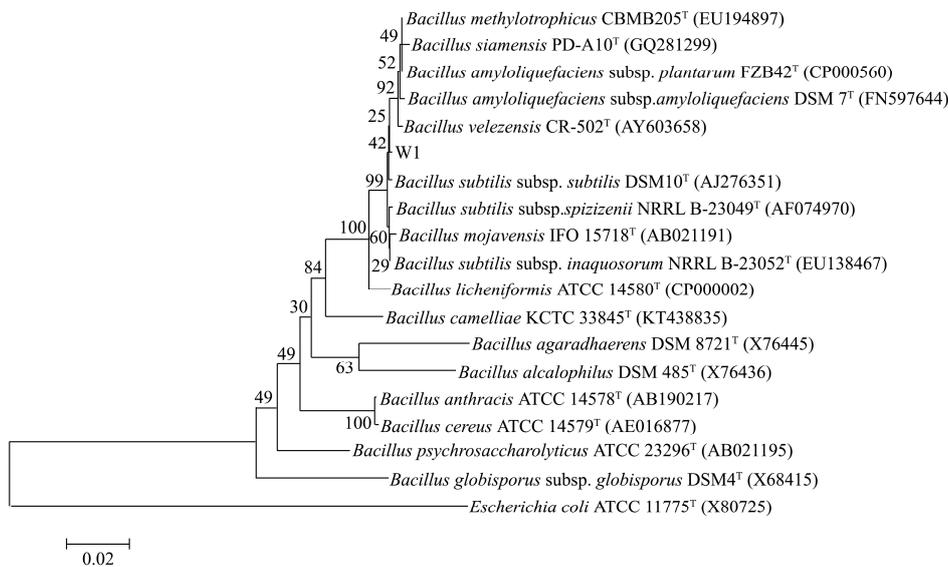


图4 基于16S rDNA基因序列的芽孢杆菌属的系统发生树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Bacillus* genus based on 16S rDNA sequences

由图 4 可知, W1 菌株与 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (枯草芽孢杆菌枯草亚种) 的亲缘关系最近, 其 16S rDNA 基因序列与枯草芽孢杆菌 DSM 10 模式菌株同源性大于 99%。除特殊情况<sup>[21]</sup>外, 一般认为 16S rDNA 基因序列同源性大于 97% 的两个细菌菌株被认为是同一个种, 故将 W1 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌枯草亚种。

### 2.3 不同条件对枯草芽孢杆菌 W1 菌株产蛋白

#### 酶能力的影响

##### 2.3.1 培养时间对酶活力的影响

活化的枯草芽孢杆菌 W1 按 4% 接种至 LB 液体培养基中, 37 °C 连续培养 72 h, 每隔 12 h 分别检测其中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力, 以确定培养时间对其产蛋白酶能力的影响, 结果如图 5 所示。W1 菌株所产中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力最高值均出现在培养时间为 36 h, 酶活力分别为 33.64 U/mL 和 41.25 U/mL,

最佳培养时间与姚刚等<sup>[22]</sup>研究报道相一致。

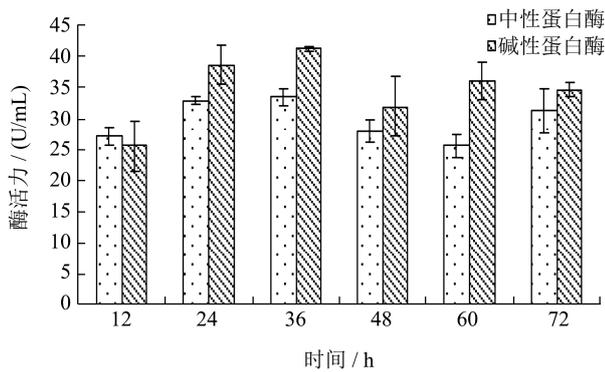


图5 不同培养时间对蛋白酶活力的影响

Fig.5 Effect of different cultural time on the protease activity

### 2.3.2 培养温度对酶活力的影响

分别考察不同培养温度 (33 °C、35 °C、37 °C、39 °C、41 °C) 下 W1 菌株培养 36 h 所产蛋白酶的活力, 结果如图 6 所示, 发现其他培养温度下菌株 W1 所产中性蛋白酶和碱性蛋白酶均不如 37 °C 条件下活性高 ( $p < 0.05$ ), 酶活力大小同 2.3.1 结果, 在已报道的研究中同样发现 37 °C 为枯草芽孢杆菌产蛋白酶的最佳培养温度<sup>[8,23]</sup>。其中, 41 °C 培养下中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力均为最低, 分别为 25.40 U/mL 和 30.33 U/mL。

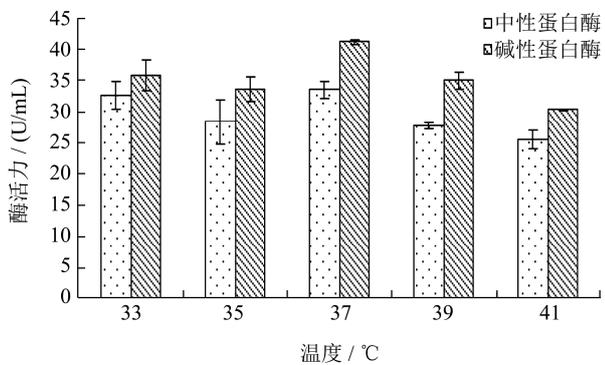


图6 不同培养温度对蛋白酶活力的影响

Fig.6 Effect of different cultural temperature on the protease activity

### 2.3.3 接种量对酶活力的影响

接种量通常会影响到枯草芽孢杆菌所产中性蛋白酶或碱性蛋白酶活力<sup>[22,23]</sup>, 故将已活化的 W1 菌株按不同接种量 (2%、4%、6%、8%、10%) 接种至 LB 液体培养基, 37 °C 培养 36 h, 分别检测其酶活力, 以考察接种量对其蛋白酶活力的影响, 结果如图 7 所示, 发现不同接种量对 W1 菌株所产中性蛋白酶活力影响差异不显著 ( $p > 0.05$ ), 而对其所产碱性蛋白酶活力影响差异显著 ( $p < 0.05$ ), 总体来看中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力最高值均出现在 4% 接种量条件, 即酶活力分别为 33.64 U/mL 和 41.25 U/mL。

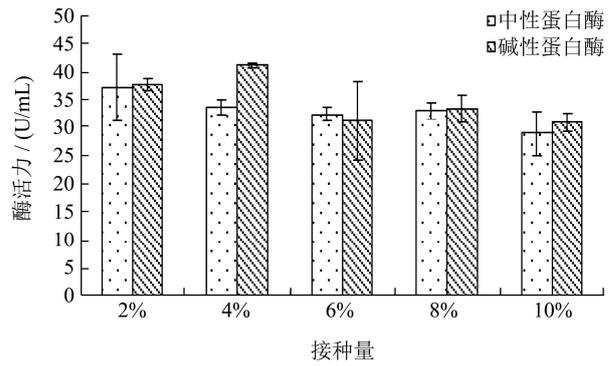


图7 不同接种量对蛋白酶活力的影响

Fig.7 Effect of different inoculum size on the protease activity

### 2.3.4 初始 pH 值对酶活力的影响

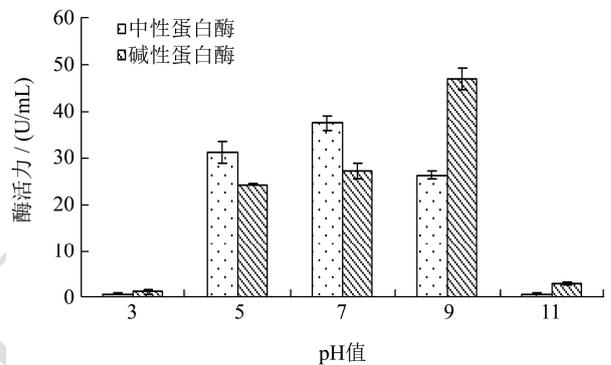


图8 不同初始 pH 值对蛋白酶活力的影响

Fig.8 Effect of different initial pH value on the protease activity

分别考察培养基不同初始 pH 值 (pH 3.0、pH 5.0、pH 7.0、pH 9.0、pH 11.0) 对 W1 菌株蛋白酶活力的影响, 结果如图 8 所示, 发现 W1 菌株在 pH 3.0 和 pH 11.0 条件下长势非常弱, 37 °C 培养 36 h 后培养液较澄清, 故几乎无蛋白酶活性, 而初始 pH 值为 pH 5.0 和 pH 7.0 条件下 W1 菌株所产中性蛋白酶活力高于碱性蛋白酶, 初始 pH 9.0 条件下碱性蛋白酶活力则高于中性蛋白酶活力, 这说明中性蛋白酶与碱性蛋白酶活力的高低与初始 pH 值关系很大。通常情况下, 中性蛋白酶活力高值出现在初始 pH 值为中性<sup>[23]</sup>, 而碱性蛋白酶活力高值则出现在初始 pH 值为碱性条件<sup>[22]</sup>, W1 菌株所产中性蛋白酶与碱性蛋白酶的情况与此类似, 其中性蛋白酶活力最高点出现在初始 pH 7.0 条件, 中性蛋白酶活力为 37.21 U/mL; 而碱性蛋白酶活力最高点出现在初始 pH 9.0 条件, 碱性蛋白酶活力为 46.82 U/mL。

### 2.4 枯草芽孢杆菌 W1 产蛋白酶条件优化

根据单因素的试验结果, 按照 1.2.4 选取的因素与水平进行正交试验, 结果如表 3 所示。

由表 3 结果可知, 不同条件对枯草芽孢杆菌 W1 菌株产蛋白酶活力的影响程度依次为初始 pH 值 > 接

种量>培养时间>培养温度, 这与其他研究报道不同<sup>[24]</sup>, 由此说明培养条件对枯草芽孢杆菌产蛋白酶活力的影响具有菌株特异性。最终确定其产蛋白酶的最佳条件为 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, 即培养温度 35 ℃、接种量 4%、初始 pH 9.0、培养时间 48 h。将枯草芽孢杆菌 W1 按照

优化的最佳条件培养 48 h, 其所产中性蛋白酶活力为 40.39 U/mL, 碱性蛋白酶活力为 52.02 U/mL, 总蛋白酶活力为 92.41 U/mL, 相比优化前相应酶活力分别提高了 39.32%、56.73%和 48.62%。

表 3 正交试验条件优化结果

Table 3 Optimization of orthogonal test conditions

| 试验号            | A (温度/℃) | B(接种量/%) | C (pH 值) | D (时间/h) | 蛋白酶活力/(U/mL) |       |       |
|----------------|----------|----------|----------|----------|--------------|-------|-------|
|                |          |          |          |          | 中性           | 碱性    | 总酶活   |
| 1              | 1        | 1        | 1        | 1        | 2.28         | 0.78  | 3.06  |
| 2              | 1        | 2        | 2        | 2        | 17.26        | 23.03 | 40.29 |
| 3              | 1        | 3        | 3        | 3        | 24.28        | 33.76 | 58.04 |
| 4              | 2        | 1        | 2        | 3        | 19.32        | 15.46 | 34.78 |
| 5              | 2        | 2        | 3        | 1        | 33.50        | 29.72 | 63.22 |
| 6              | 2        | 3        | 1        | 2        | 1.53         | 1.63  | 3.16  |
| 7              | 3        | 1        | 3        | 2        | 13.02        | 20.32 | 33.33 |
| 8              | 3        | 2        | 1        | 3        | 11.24        | 15.44 | 26.68 |
| 9              | 3        | 3        | 2        | 1        | 10.79        | 12.51 | 23.30 |
| k <sub>1</sub> | 33.80    | 23.73    | 10.97    | 29.86    |              |       |       |
| k <sub>2</sub> | 33.72    | 43.40    | 32.79    | 25.60    |              |       |       |
| k <sub>3</sub> | 27.77    | 28.17    | 51.53    | 39.83    |              |       |       |
| R              | 6.02     | 19.67    | 40.56    | 14.24    |              |       |       |

### 3 结论

从纳豆中分离筛选到一株高产蛋白酶的枯草芽孢杆菌 W1, 即可产生中性蛋白酶又可产生碱性蛋白酶, 通过正交试验确定了其最佳培养条件, 即培养温度 35 ℃, 接种量 4%, 初始 pH 9.0, 培养时间 48 h, 优化后中性蛋白酶活力达 40.39 U/mL, 碱性蛋白酶活力达 52.02 U/mL。W1 菌株所产中性蛋白酶与碱性蛋白酶的酶学性质, 及其在发酵纳豆过程中能否利用其蛋白酶活性产生生物活性肽仍有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Chatterjee J, Giri S, Maity S, et al. Production and characterization of thermostable alkaline protease of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) from optimized solid-state fermentation [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015, 62(5): 709-718
- [2] Gurumalles P, Alagu K, Ramakrishnan B, et al. A systematic reconsideration on proteases [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 128: 254-267
- [3] 满丽莉, 向殿军. 来源于豆豉的枯草芽孢杆菌 MX-6 所产纳豆激酶的稳定性研究[J]. *中国调味品*, 2019, 44(7): 25-28, 33

MAN Li-li, XIANG Dian-jun. Study on stability of nattokinase produced by *Bacillus subtilis* MX-6 from fermented soya beans [J]. *China Condiment*, 2019, 44(7): 25-28, 33

- [4] Moteshafii H, Hashemi M, Mousavi SM, et al. Characterization of produced xylanase by *Bacillus subtilis* D3d newly isolated from apricot phyllosphere and its potential in pre-digestion of BSG [J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2016, 37: 251-260
- [5] Sánchez Blanco A, Palacios Durive O, Batista Pérez S, et al. Simultaneous production of amylases and proteases by *Bacillus subtilis* in brewery wastes [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(3): 665-674
- [6] Farzaneh M, Shi ZQ, Ghassempour A, et al. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran [J]. *Food Control*, 2012, 23(1): 100-106
- [7] 巴翠玉, 张林波, 张培军, 等. 2 株枯草芽孢杆菌的分离鉴定及特性研究[J]. *华南农业大学学报*, 2017, 38(3): 46-51
- BA Cui-yu, ZHANG Lin-bo, ZHANG Pei-jun, et al. Isolation, identification and characterization of two strains of *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2017, 38(3): 46-51

- [8] Patel AR, Mokashe NU, Chaudhari DS, et al. Production optimisation and characterisation of extracellular protease secreted by newly isolated *Bacillus subtilis* AU-2 strain obtained from *Tribolium castaneum* gut [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 19: 101122
- [9] Di J, Chu Z, Zhang S, et al. Evaluation of the potential probiotic *Bacillus subtilis* isolated from two ancient sturgeons on growth performance, serum immunity and disease resistance of *Acipenser dabryanus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 711-719
- [10] Hong HA, Khaneja R, Tam NM, et al. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract [J]. Research in Microbiology, 2009, 160(2): 134-143
- [11] Sharmila GR, Venkateswaran G. *Bacillus subtilis* CFR5 isolated from fermented soybean attenuates the chronic pancreatitis [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 197-206
- [12] 张晓燕,国立东,刘晓艳. 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的研究进展[J]. 中国酿造, 2018, 37(4): 12-15  
ZHANG Xiao-yan, GUO Li-dong, LIU Xiao-yan. Research advances in the neutral protease of *Bacillus subtilis* [J]. China Brewing, 2018, 37(4): 12-15
- [13] Nounou MI, Zaghoul TI, Ahmed NA, et al. Skin permeability enhancement by *Bacillus subtilis* alkaline protease: Application to transdermal drug delivery [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 529(1-2): 423-432
- [14] Zhu MJ, Cheng JR, Chen HT, et al. Optimization of neutral protease production from *Bacillus subtilis*: Using agroindustrial residues as substrates and response surface methodology [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2013, 60(3): 336-342
- [15] 刘倩,刘爱芳,江柳青,等. 开菲尔粒中一株高加索酸牛奶杆菌的分离及鉴定[J]. 黑龙江医药, 2013, 26(5): 810-813  
LIU Qian, LIU Ai-fang, JIANG Liu-qing, et al. Identification of a strain of *Lactobacillus kefir* isolated from Kefir grains [J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2013, 26(5): 810-813
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [17] 赵谋明,舒会,崔春,等. 产耐盐蛋白酶深海细菌的分离鉴定[J]. 现代食品科技, 2015, 31(3): 50-54  
ZHAO Mo-ming, SHU Hui, CUI Chun, et al. Screening of protease production in non-saccharomyces yeasts and study of its enzymology characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(3): 50-54
- [18] 杨刚,杨国浩,管军军,等. 米曲霉和枯草芽孢杆菌对羽毛粉降解效果研究[J]. 饲料工业, 2018, 39(4): 50-52  
YANG Gang, YANG Guo-hao, GUAN Jun-jun, et al. The degradation effect of *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* on feather meal [J]. Feed Industry, 2018, 39(4): 50-52
- [19] 刘晓艳,张晓燕,杨国力,等. 枯草芽孢杆菌 L1 发酵产中性蛋白酶活性的研究[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(3): 55-59  
LIU Xiao-yan, ZHANG Xiao-yan, YANG Guo-li, et al. Research on the enzyme activity of neutral protease from *Bacillus subtilis* L1 strain fermenting the soybean meal [J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2018, 54(3): 55-59
- [20] 王雨婷,缪礼鸿,周凤鸣,等. 一株高效降解玉米蛋白粉枯草芽孢杆菌的筛选及其发酵特性研究[J]. 饲料工业, 2017, 38(21): 49-56  
WANG Yu-ting, MIAO Li-hong, ZHOU Feng-ming, et al. An efficient degradation of corn gluten meal *Bacillus subtilis* screening and fermentation characteristics research [J]. Feed Industry, 2017, 38(21): 49-56
- [21] 国立东,刘倩,江柳青,等. 开菲尔粒中一株乳酸乳球菌的分离及性能研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 121-125  
GUO Li-dong, LIU Qian, JIANG Liu-qing, et al. Isolation and characteristics of a *Lactococcus lactis* strain from Kefir grains [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9): 121-125
- [22] 姚刚,程建军,孙鹏,等. 枯草芽孢杆菌发酵产碱性蛋白酶的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 347-351  
YAO Gang, CHENG Jian-jun, SUN Peng, et al. Preparation of alkaline protease by fermentation of *Bacillus subtilis* [J]. Food Science, 2009, 30(23): 347-351
- [23] 黄达明,宋庆春,管国强,等. 枯草芽孢杆菌 ZC1 发酵产中性蛋白酶的条件优化[J]. 中国调味品, 2015, 40(9): 35-40  
HUANG Da-ming, SONG Qing-chun, GUAN Guo-qiang, et al. Optimization of fermentation conditions for neutral protease produced by *Bacillus subtilis* ZC1 [J]. China Condiment, 2015, 40(9): 35-40
- [24] 吴海波,江连洲,赵英,等. 发酵低温豆粕生产碱性蛋白酶的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(3): 195-200  
WU Hai-bo, JIANG Lian-zhou, ZHAO Ying, et al. Alkaline protease produced by *Bacillus Subtilis* with defatted soy flour [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(3): 195-200