

比较传统老面中戊糖片球菌的代谢活性与亲缘关系

龚云霞, 齐小保

(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

摘要: 本研究主要目的探究传统老面中戊糖片球菌的分子特性。8 株戊糖片球菌分离自中国中北部不同老面, 比较它们发酵葡萄糖产酸的能力, 利用脱脂乳分离培养基探究戊糖片球菌产蛋白酶的能力, 使用沉淀蛋白法提取胞外分泌蛋白并进行蛋白凝胶电泳分析胞外分泌蛋白, 使用 Folin-酚法比较不同戊糖片球菌蛋白酶活力。结果表明 8 株戊糖片球菌均有代谢葡萄糖产酸的能力, 其中 P.P005 能力最佳, 经过发酵 pH 值降低 0.41; 8 株戊糖片球菌均可产生明显水解圈, 均具有产蛋白酶的能力; 胞外蛋白结果显示 P.P002 菌株和 P.P008 菌株分泌蛋白浓度最大, 最高酶活力在 1057.27~1242.56 U/mL 之间, 在各自最适条件下, 产蛋白酶活力从大到小依次是 P.P002、P.P001、P.P005、P.P006、P.P003、P.P008、P.P007、P.P004; ERIC-PCR 分析亲缘关系分析显示所有的菌株的相似度都在 86% 以上。本研究为探究传统老面中戊糖片球菌发挥的作用奠定了分子研究的基础。

关键词: 戊糖片球菌; 产酸能力; 胞外蛋白; 蛋白酶活性; ERIC-PCR

文章编号: 1673-9078(2020)07-70-74

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.1056

Comparison of Metabolic Activity and Relationship of *Pediococcus pentosaceus* in Traditional Chinese Sourdough

GONG Yun-xia, QI Xiao-bao

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The molecular properties of *P. pentosaceus* separated from traditional sourdoughs were investigated in this work. The 8 strains of *P. pentosaceus* were isolated from different Laomians in central and northern China. Acid producing abilities generated by fermenting glucose were compared. The skimmed milk separation medium was used to investigate the ability of protease production of *P. pentosaceus*. Extracellular proteins were extracted by precipitation protein method and protein gel electrophoresis was used to analyze extracellular proteins. Furthermore, the Folin-phenol method was used to compare the protease activity produced by different *P. pentosaceus*. The results showed that these *P. pentosaceus* had the ability to metabolize glucose and acid production, of which P.P005 had the best ability, and the pH value was reduced by 0.41 at the end of fermentation. All *P. pentosaceus* can produce obvious hydrolytic circles when cultured on skim milk plates, therefore they had the ability to produce protease. The strain P.P002 and strain P.P008 had the highest concentration of secreted protein, and the highest enzyme activity was between 1057.27 to 1242.56 U/mL by exploring the protease activity of different strains. Under their optimal conditions, the protease production activity were followed by P.P002, P.P001, P.P005, P.P006, P.P003, P.P008, P.P007, and P.P004. Finally, their relationship was analyzed by ERIC-PCR, and the results showed that the similarity of all strains was within 86%. This study provides the foundation for molecular research to explore the role played by *P. pentosaceus* in traditional Laomian.

Key words: *Pediococcus pentosaceus*; acid production capacity; extracellular protein; protease activity; ERIC-PCR

引文格式:

龚云霞, 齐小保. 比较传统老面中戊糖片球菌的代谢活性与亲缘关系[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 70-74

GONG Yun-xia, QI Xiao-bao. Comparison of metabolic activity and relationship of *Pediococcus pentosaceus* in traditional Chinese sourdough [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 70-74

中国传统老面馒头有着悠久的历史, 深受人们喜爱^[1], 老面特有的微生物菌系造成了老面馒头特有的

收稿日期: 2019-03-11

基金项目: 中央高校基本科研业务费基金资助 (2662016PY102)

作者简介: 龚云霞 (1995-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 齐小保 (1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物

风味^[2]。不同于国外酸面团中的优势乳酸菌^[3], 本实验室所收集的来自湖北, 河南和山东等地 8 份老面中(连续面粉传代半年以上), 通过 VITEK 2 微生物鉴定系统进行鉴定^[4], 发现 8 份老面样品中均检测到戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)^[5], 因此我们认为戊糖片球菌为中国中北部地区老面中的优势菌株。

戊糖片球菌与现代人的生活密切联系,对人体健康具有非常重要的生理功能,其益生功能体现在增强机体免疫能力、缓解高血脂、减少心血管病发病率、提高抗氧化能力、抑制病原菌等^[6]方面。目前国内外对于戊糖片球菌的研究主要集中在蔬菜发酵制品和肉制品的应用领域^[7]。老面中的戊糖片球菌与其它微生物相互协助,发挥着重要的作用,促进面团的发酵,赋予面团良好的风味,延长货架期和形成特殊的结构等^[8]。因此,良好性能的菌株对于食品发酵非常重要。

发酵食品中戊糖片球菌的主要性能有一是产生细菌素抑制其它有害微生物生长;二是产酸,适宜浓度的酸能赋予产品令人愉悦的风味;三是产蛋白酶,降解蛋白产生更多的氨基酸,形成独特的风味。本研究比较来自不同老面中8株戊糖片球菌利用葡萄糖产酸的能力,利用脱脂乳平板鉴定戊糖片球菌产蛋白酶的能力,使用Folin-酚法比较不同戊糖片球菌蛋白酶活力^[9],提取胞外蛋白进行蛋白凝胶电泳分析,最后采用ERIC图谱分析不同的老面中戊糖片球菌的亲缘相似性^[10],本研究对生产生活中戊糖片球菌的应用与选择具有指导性意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

葡萄糖发酵培养基:葡萄糖10 g/L,蛋白胨20 g/L, pH 7.4;牛肉膏蛋白胨液体培养基(蛋白胨10 g/L、氯化钠5 g/L、牛肉膏3 g/L);检测酶活液体发酵培养基^[11]、脱脂乳培养基^[12,13]、MRS肉汤琼脂培养基,青岛海博生物;福林试剂(索莱宝PC0030 Lowry法蛋白浓度测定试剂盒)、PCR仪,美国伯乐BIO-RAD公司;凝胶成像系统,美国伯乐BIO-RAD公司;BioNumerics分析软件,上海一贝科技有限公司;Bradford快速蛋白浓度测定,美国伯乐BIO-RAD公司;其它化学试剂均购自国药集团。

1.2 菌株活化

本实验室收集湖北、河南和山东等省8份老面样本,分离、鉴定并保藏,8株戊糖片球菌分别是P.P001(HNNY)、P.P002(HNNY)、P.P003(ZMD)、P.P004(ZMD)、P.P005(HBWH)、P.P006(WBWH)、P.P007(HBWH)和P.P008(HBJZ),通过MRS液体培养基培养至对数生长期,并通过分光光度法调整至0.40(OD_{600nm})备用。

1.3 发酵糖产酸的能力

取1 mL的菌悬液接种于200 mL的葡萄糖发酵培养基中,37 °C震荡培养。分别在发酵0、2、4、6、8 h时测发酵液pH,每组实验独立重复3次。以pH变化量衡量8株戊糖片球菌发酵葡萄糖产酸的能力。

1.4 筛选产蛋白酶菌株

具有产蛋白酶能力的细菌会将酪蛋白水解成酪氨酸,其菌落周围会出现透明的水解圈,将戊糖片球菌点种于脱脂乳平板上,37 °C培养48 h,测定平板上蛋白水解圈直径的比值大小。本研究以水解圈与菌落比值 ≥ 6 时判定为活性比较高的蛋白酶产酶菌株^[14]。

1.5 蛋白酶活测定

探究不同温度(25 °C、28 °C、37 °C)和不同pH值(pH 5、pH 6、pH 7、pH 8、pH 9)产蛋白酶活力。将8株戊糖片球菌分别接种至5 mL的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,震荡培养16 h,然后接种500 μ L于10 mL的检测酶活液体发酵培养基中,振荡培养48 h,离心(10000 r/min、10 min),取上清液为粗酶液^[15],用Folin-酚法测蛋白酶活力^[11]。

1.6 产胞外蛋白酶分析

将产蛋白酶菌株接种于400 mL MRS肉汤培养基,37 °C过夜培养,离心(3500 r/min, 10 min)并收集上清液,加入40 mL 2% (w/w) 脱氧胆酸钠水溶液,4 °C静置30 min,边搅拌边加入三氯乙酸溶液,使得最终浓度为6% TCA,并于4 °C沉淀蛋白4 h,离心(4 °C, 13000 r/min, 15 min),收集沉淀,用4倍体积的冰丙酮(-20 °C保存)超声洗涤沉淀3次,于室温下自然风干。

所有蛋白样品调整至相同浓度后使用12%分离胶和5%堆积胶在垂直凝胶电泳仪(Bio-Rad, USA)中进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,最后经考马斯蓝染色而记录结果。

1.7 ERIC-PCR 亲缘分析

使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取戊糖片球菌DNA,ERIC-PCR引物序列为ERIC F: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'; ERIC R: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'。20 μ L PCR反应体系: 2 \times Utaq PCR Mix 10 μ L, ERIC F 1 μ L, ERIC R 1 μ L, 无核酸水 6 μ L, DNA模板 2 μ L。

PCR扩增程序: 94 °C预变性3 min, 94 °C变性30 s, 45 °C退火30 s, 72 °C延伸3 min, 循环45次, 72 °C

终延伸 5 min。扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 用 BioNumerics 分析软件, 得到亲缘关系图谱。

1.8 统计学分析

使用完全随机化的设计来计划研究, 并且使用 SPSS 22.0 对实验数据进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 发酵糖产酸的能力

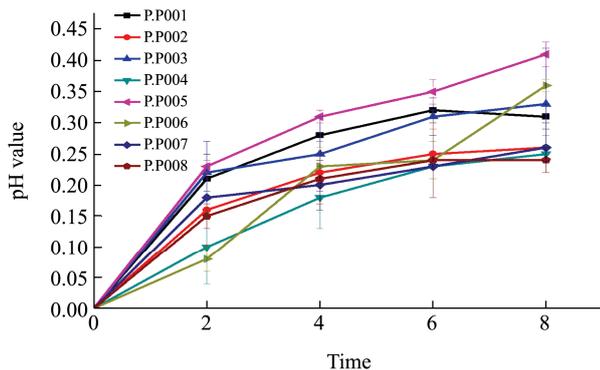


图 1 8 株戊糖片球菌发酵葡萄糖产酸能力比较

Fig.1 Comparison of acidogenic capacity of glucose fermentation by 8 strains of *P. pentosaceus*

酸是重要的风味物质, 也是酯类风味物质形成的前体, 产酸能力大小通过发酵葡萄糖来检测。图 1 显示了 8 株戊糖片球菌在发酵葡萄糖培养基培养过程中 pH 的变化值, 结果表明所有菌株都有利用葡萄糖产酸的能力, pH 值都有所下降, 发酵 8 小时后, 所有菌株的 pH 值下降范围 0.24~0.41, 其中利用葡萄糖产酸能力最为明显的是 P.P005 菌株, pH 下降了 0.41, 其次为 P.P006 菌株, pH 下降了 0.35。在老面发酵中, 酿酒酵母水解大分子的淀粉产生葡萄糖, 戊糖片球菌发酵时利用葡萄糖产生很多种有机酸, 例如: 丙酸、乳酸、醋酸等, 有机酸的产生不仅可以与酵母菌发酵产生的一些醛、酮、醇类物质相互作用, 从而产生更多的香味物质和呈味物质, 大幅度提高面团的风味物质种类和含量, 并调节面团酸碱度, 赋予面团柔软的质地, 抑制有害菌的生长^[17], 并且通过降解面团中的一部分戊聚糖降低面团的粘度, 使面团环境更适合其他有益发酵微生物的生长和繁殖^[18]。

2.2 筛选产蛋白酶菌株

产蛋白酶是戊糖片球菌的重要特征。通过脱脂乳培养基筛选具有产蛋白酶能力的戊糖片球菌, 结果显示通过脱脂乳琼脂水解试验定性确定了 8 株戊糖片球菌产生和分泌胞外蛋白水解酶的能力, 如图 2 所示,

所有 8 种戊糖片球菌都能够在脱脂乳琼脂上产生清晰的水解区。推断出 8 株戊糖片球菌均能够产生和分泌胞外蛋白水解酶, 将发白的不透明色酪蛋白分子水解为无色的肽片段, 从而在培养物周围产生透明区域。同时, 经过测量发现水解圈最大直径比在 5.26~6.31 之间, 8 株戊糖片球菌的蛋白酶活力较强。戊糖片球菌作为唯一存在于奶酪中的片球菌, 是促进 Manura 奶酪中风味形成和加快发酵的优势菌群^[19], 其产生的蛋白酶发挥了至关重要的作用。我们的研究也显示, 戊糖片球菌在老面中也显示出独特的优势与作用, 本实验的 8 株戊糖片球菌均可以分解酪蛋白产蛋白酶, 生成透明圈, 而蛋白酶可以增加面团的可溶性蛋白质比例, 例如: 小分子蛋白、肽、氨基酸等, 这些可溶性蛋白可以与酵母菌形成一种良性的相互关系, 可以促进面团醒发。同时, 根据点样时菌落的大小与产生的透明圈大小一致, 可以推断出这 8 株戊糖片球菌没有运动性。

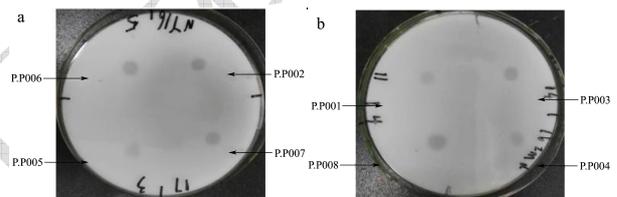


图 2 8 株戊糖片球菌在脱脂乳平板上生长情况

Fig.2 Growth of 8 strains of *P. pentosus* on skim milk plate

2.3 蛋白酶活测定

微生物发酵生产蛋白酶时, 蛋白酶的产量和蛋白酶的酶活必然会受诸多因素的影响^[16]。通过在不同温度和不同 pH 值条件培养戊糖片球菌, 测定胞外蛋白酶活力, 揭示了温度与 pH 对胞外蛋白酶酶活的影响规律。在 37 °C 发酵时, 戊糖片球菌 P.P006 产蛋白酶活力值为所有实验组最小, 102.39 U/mL, 戊糖片球菌 P.P001 产蛋白酶活力值为所有实验组最大, 399.18 U/mL; 在 28 °C 发酵时, 戊糖片球菌产蛋白酶活力最小值由 P.P002 产生, 350.71 U/mL, 最大值在接种有 P.P001 酶活检测培养基检测到, 490.7 U/mL; 在 25 °C 发酵时, 8 株戊糖片球菌产蛋白酶活力最小值为 302.71 U/mL (P.P002), 最大值为 310.36 U/mL (P.P007)。温度对蛋白酶酶活的影响是一把双刃剑。一方面, 在一定的范围内, 温度与蛋白酶酶活呈现出正的相关性, 温度升高酶促反应加速; 另一方面, 超过一定的温度范围, 温度与蛋白酶酶活呈现出负的相关性, 温度如果过高会引起蛋白酶的变性凝固, 酶活不升反而降低。

在 28 °C 和 25 °C 发酵, 8 株戊糖片球菌均在 pH 5 时, 产蛋白酶酶活力最低, 在 pH 8 时, 产蛋白酶酶活

力最高。在 37 °C 发酵, 戊糖片球菌 P.P001、P.P002、P.P003 和 P.P004 在 pH 6 时, 产蛋白酶活力最低, 戊糖片球菌 P.P005、P.P006、P.P007 和 P.P008 在 pH 5 时, 产蛋白酶活力最低; 相反, 在 pH 7 时, P.P001、P.P002、P.P005、P.P007 和 P.P008 产蛋白酶活力最高, 其余三株戊糖片球菌在 pH 8 时, 产蛋白酶活力最高。pH 值的高低也会影响蛋白酶活性催化基团的解离状态, 使底物不能酶解。在本实验条件设置下 (25 °C、28 °C 和 37 °C, pH 5~9), 8 株戊糖片球菌最高酶活力在 1057.27~1242.56 U/mL, 在不同菌株的最适条件下, 产蛋白酶活力从大到小依次为 P.P002、P.P001、P.P005、P.P006、P.P003、P.P008、P.P007、P.P004, 整体对比发现 pH 偏碱性时, 戊糖片球菌产蛋白酶活力效果较佳。通常, 蛋白水解酶可根据其活性 pH 范围分为三类, 即酸性, 中性和碱性蛋白酶, 碱性蛋白酶来源于细菌, 酵母菌, 真菌等微生物, 具有较高的酶活力和广泛的 pH 稳定性, 在 pH=5.0~10.0 时较稳定, 在 EDTA 乙二胺四乙酸、多磷酸盐之类的钙除去剂的存在下, 也能保证活性的充分发挥^[20,21]。

2.4 产胞外蛋白酶分析

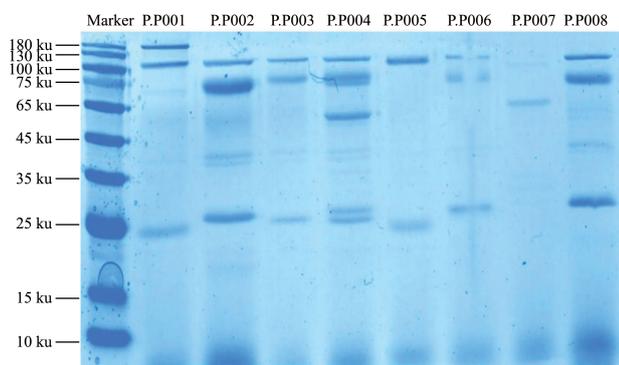


图 3 8 株戊糖片球菌胞外蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis of 8 strains *P. pentosaceus* extracellular proteins

蛋白酶是胞外蛋白质, 为了研究 8 株无糖片球菌的胞外蛋白差异, 利用 TCA-DOC 沉淀法提取了 8 株戊糖片球菌的胞外蛋白, 并进行了 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳分析胞外蛋白组分, 图 3 显示电泳结果。8 株戊糖片球菌胞外蛋白均大于 20 ku, 大多数菌株 100 ku 有一条共有带, 25 ku 也有一条共有带, P.P007 菌株仅分离得到一类浓度极低且分子量为 65 ku 的胞外蛋白, 其次 P.P006 菌株的胞外分泌蛋白条带也较微弱, 说明 2 株戊糖片球菌的胞外蛋白含量很低; 相对而言, P.P002 菌株和 P.P008 菌株所分离出的胞外蛋白条带最强烈, 其中分子量为 75 ku 的这类蛋白浓度均是最大的, 根据不同 pH 条件下酶活测定结果, 我们推测这

是一类碱性蛋白酶; 分子量约为 180 ku 的蛋白为 P.P001 菌株胞外蛋白所特有的, 联系酶活测定结果, 我们推测这是一类对温度敏感的蛋白酶, 且其最适温度约为 37 摄氏度。每条带具体的功能有待进一步研究。

2.5 ERIC-PCR 亲缘分析

通过 ERIC-PCR 扩增, 得到各个戊糖片球菌的基因组指纹图谱, 运用 BioNumerics 软件比对菌株之间的重复序列的显示度, 来判断它们的亲缘关系^[10]。P.P005 号和 P.P006 号的相似性约为 98%, 它们均来自于同一地区, 同样来自于湖北省武汉市的老面面团中分离出的 P.P005 菌株、P.P006 菌株、P.P007 菌株的相似性为 96.5%, 显示相似性与地缘关联度高, 这也解释了 P.P005 菌株和 P.P006 菌株具有相似发酵葡萄糖能力的原因。而且 P.P004 菌株和 P.P008 菌株的相似性也约为 96.5%。P.P004 菌株和 P.P008 菌株的相似性约为 99%, 相似性极高, 与之相反, P.P004 菌株和 P.P003 菌株虽然分离来自于同一地域的老面面团, 但是其相似性只有 94.6%左右, 同样的来自于河南省南阳市的 P.P001 菌株和 P.P002 菌株的相似性约为 93.5%。由于老面的微生物系统与存放环境、面粉种类、地理位置等多种因素息息相关, 因此我们认为将菌株由老面中分离后, 在传代培养的过程中发生了菌株的驯化, 基因组 DNA 发生了略微的突变。但是, 整体而言, 戊糖片球菌 ERIC-PCR 亲缘性关系图谱显示, 所有的菌株的相似性都在 86%以内, 这也就解释了本实验的 8 株菌株都具有发酵葡萄糖和产蛋白酶的能力。

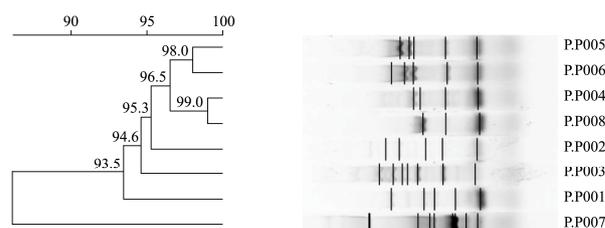


图 4 8 株戊糖片球菌 ERIC-PCR 亲缘性关系图谱

Fig.4 Genetic relationship map of 8 strains *P. pentosaceus* by ERIC-PCR

3 结论

从老面面团中分离并鉴定了 8 株戊糖片球菌, 其中 P.P004 和 P.P002 菌株发酵葡萄糖产酸能力最高, 通过脱脂乳平板培养定性实验发现 8 株戊糖片球菌均可以产生蛋白酶, Folin-酚法测产蛋白酶活力结果表明 P.P002 菌株在 28 °C、pH 8 培养条件下产蛋白酶活力最大, 1242.56 U/mL, SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳结果

表明 P.P002 菌株和 P.P008 菌株胞外蛋白组分最佳,在戊糖片球菌的 ERIC-PCR 分析中,所有的菌株的相似度都在 86%以内,其中 P.P005 菌株和 P.P006 菌株的相似度约为 98%; P.P004 菌株和 P.P008 菌株的相似度约为 99%,相似度极高。本研究系统的研究了分离自传统老面的戊糖片球菌在发酵中的作用,对研究戊糖片球菌在发酵过程中的风味贡献与物性影响奠定了研究基础。

参考文献

- [1] 丁长河,戚光册,侯丽芬,等.传统老酵头馒头的品质特性[J].中国粮油学报,2007,22(3):17-20
DING Chang-he, QI Guang-ce, HOU Li-fen, et al. Quality evaluation of steamed bread by traditional fermentation [J]. China Cereals and Oils Journal, 2007, 22(3): 17-20
- [2] 韩春然,马永强,王金凤,等.传统发酵面团的菌相分析[J].食品工业科技,2010,5:184-187
HAN Chun-ran, MA Yong-qiang, WANG Jin-feng, et al. Microflora analysis of traditional fermented dough [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 5: 184-187
- [3] De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, et al. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? [J]. Food Microbiology, 2014, 37: 11-29
- [4] Kim H Y, Huh H J, Choi R, et al. Three cases of candidiasis misidentified as *Candida famata* by the vitek 2 system [J]. Annals of Laboratory Medicine, 2015, 35(1): 175-177
- [5] Angmo K, Kumari A, Monika, et al. Antagonistic activities of lactic acid bacteria from fermented foods and beverage of Ladakh against *Yersinia enterocolitica* in refrigerated meat [J]. Food Bioscience, 2016, 13: 26-31
- [6] Ladha G, Jeevaratnam K. Probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* LJR1, a bacteriocinogenic strain isolated from rumen liquor of goat (*Capra aegagrus hircus*) [J]. Food Biotechnology, 2018, 32(1): 60-77
- [7] Xu Y S, Dai M J, Zang J H, et al. Purification and characterization of an extracellular acidic protease of *Pediococcus pentosaceus* isolated from fermented fish [J]. Food Science and Technology Research, 2015, 21(5): 739-744
- [8] Aguilar L T, Fragoso L R, Reyes-Esparza J. Effect of *Pediococcus pentosaceus* at different doses on *in vivo* model of acute ulcerative colitis: effect of *Pediococcus pentosaceus* at different doses on *in vivo* model of acute ulcerative colitis [J]. Faseb Journal, 2016, 30
- [9] 颜小捷,谷陟欣,卢凤来,等.Folin-酚比色法测定裸花紫珠中总酚含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(18):74-78
YAN Xiao-jie, GU Zhi-xin, LU Feng-lai, et al. Determination of total polyphenol from *callicarpa nudiflora* by folin-phenol colorimetry [J]. China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(18): 74-78
- [10] Hulton C S, Higgins C F, Sharp P M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria [J]. Molecular Microbiology, 2010, 5(4): 825-834
- [11] 柯野,伍嘉慧,曾松荣,等.一株产蛋白酶菌株的筛选鉴定及酶学性质分析[J].广东农业科学,2015,42(2):137-141
KE Ye, WU Jia-hui, ZENG Song-rong, et al. Screening and identification of a strain producing proteases and analysis on its enzymatic properties [J]. Guangdong Agricultural Science, 2015, 42(2): 137-141
- [12] 方芳,冀林立,张彦斌,等.产耐热蛋白酶乳酸菌的筛选、产酶条件及其酶学性质的研究[J].食品科学,2008,29(10):375-379
FANG Fang, JI Lin-li, ZHANG Yan-bin, et al. Screening of thermotolerant proteinase-producing lactic acid bacteria, conditions of enzyme production and properties of produced thermotolerant proteinase [J]. Food Science, 2008, 29(10): 375-379
- [13] 张咚咚,安家彦,姜铁民,等.传统发酵乳中高产蛋白酶乳酸菌的筛选及鉴定[J].食品科技,2013,8:5-8
ZHANG Dong-dong, AN Jia-yan, JIANG Tie-min, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional fermented milk [J]. Food Science and Technology, 2013, 8: 5-8
- [14] Chen M, Li H, Chen W, et al. Isolation, identification and characterization of 68 protease-producing bacterial strains from the arctic [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(7): 702
- [15] Chen X L, Zhang Y Z, Gao P J, et al. Two different proteases produced by a deep-sea psychrotrophic bacterial strain, *Pseudoalteromonas* sp. SM 9913 [J]. Marine Biology, 2003, 143(5): 989-993
- [16] Cao C C, Feng M Q, Sun J, et al. Screening of lactic acid bacteria with high protease activity from fermented sausages and antioxidant activity assessment of its fermented sausages [J]. Cyta-Journal of Food, 2019, 17(1): 347-354

(下转第 119 页)