

产碱性蛋白酶芽孢杆菌的鉴定

黄继翔

(徐州生物工程职业技术学院生物工程系 江苏 徐州 221006)

摘要: 通过测量比较在碱性蛋白平板上产生的蛋白水解圈直径, 从土壤中筛选到一株高产蛋白酶菌株 *Bacillus* sp. HFBL0079, 根据生理生化特性、16S rDNA 序列, 鉴定为 *B. amyloliquefaciens*。其最适培养温度为 35 °C–37 °C, 最适生长 pH 8.0, 在特定培养条件下 16 h 达到稳定期, 菌体生长和蛋白酶合成同步进行。以大豆分离蛋白为氮源时发酵液具有最高酶活。发酵液在 pH 10 时具有最高酶活, 表明为碱性蛋白酶。该菌株产生的碱性蛋白酶可水解多种天然蛋白质, 对胶原蛋白水解度高于其他蛋白质, 对羽毛角蛋白也有一定水解能力, 提示该酶具有一定新颖性。

关键词: 芽孢杆菌, 碱性蛋白酶, 胶原蛋白, 角蛋白

Identification of a *Bacillus* strain producing alkaline protease

HUANG Ji-Xiang

(Department of Bioengineering, Xuzhou Bioengineering Polytechnic College, Xuzhou, Jiangsu 221006, China)

Abstract: A protease producing spore-forming strain named HFBL0079 was isolated from soil by measuring clearing zone in alkaline casein plate. *Bacillus* sp. HFBL0079 was identified as *B. amyloliquefaciens* by phenotypic properties and 16S rDNA sequence. Its optimal growth temperature was 35 °C–37 °C and initial pH was 8.0. Protease activity increased quickly in log phase in accord with biomass and was steady in stationary phase, the maximal value was found in 16 hours. The highest protease activity was found when nitrogen source was soy protein isolate. The protease was alkaline protease because the highest activity was shown in pH 10. The alkaline protease was shown activity to multi substrate, the highest hydrolysis degree was found in collagen (42.3%) more than casein, ovalbumin, BSA, and the hydrolysis degree of keratin was 15.3%, these results indicated the alkaline protease had some novel properties.

Keywords: *Bacillus*, Alkaline protease, Collagen, Keratin

碱性蛋白酶(Alkaline protease)是指在 pH 为中性至碱性条件下水解蛋白质肽键的酶类, 最适 pH 一般为 9–11。碱性蛋白酶应用广泛, 在洗涤剂、制

革、丝绸、饲料、医药、食品、环保等领域广泛应用, 在世界范围内占酶制剂总产量的 40%左右, 具有重要的工业和经济价值^[1]。作为一种工业化生产

的成熟产品,目前对碱性蛋白酶的研究主要集中在以下 3 个方面:分子结构研究和定向、定点突变以提高酶的性能;通过诱变、培养条件优化、异源表达等提高酶产量;筛选新型蛋白酶和产酶菌株。在筛选新型蛋白酶和产酶菌株方面,近年来已报道了具有较高 pH 适应性的碱性蛋白酶^[2],碱性弹性蛋白酶^[3],水解多种底物的碱性蛋白酶^[4],具有耐热、耐表面活性剂、耐氧化剂等特性的碱性蛋白酶等^[5-7],所报道的产酶菌株大多数为芽孢杆菌属(*Bacillus*)内菌株。

新型碱性蛋白酶的研究对新产品开发和拓宽应用领域,深化对多样性、序列和分子进化、空间结构、催化机制等领域的认识均有重要意义。为此,本文进行了产新型碱性蛋白酶芽孢杆菌的筛选鉴定工作,并对其生物学特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与培养基

1.1.1 试剂:除特殊说明外均为市售分析纯。Folin 酚试剂购自上海荔达生物科技有限公司,大豆分离蛋白、牛乳酪蛋白、胶原蛋白由徐州豪蓓特食品化学有限公司馈赠,羽毛蛋白粉为自制:鸡羽毛用 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡 2 h 后自来水冲洗干净,60 °C 烘干 4 h,高速粉碎机粉碎后过 80 目筛。

1.1.2 培养基:筛选培养基(*W/V*):脱脂乳粉 4%、酵母膏 0.5%、NaCl 1%、琼脂 1%, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min,灭菌后稍冷却,用过滤除菌的浓 NaOH 溶液调 pH 至 10.0,倒平板。发酵培养基(*W/V*):蛋白胨 0.5%、酵母膏 0.5%、葡萄糖 0.5%,NaOH 调 pH 10.0, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.2 菌株分离材料

土壤样品 130 份,采集自江苏徐州地区的屠宰场、垃圾填埋场、农村堆肥。

1.3 芽孢杆菌菌株分离纯化和筛选

1.3.1 芽孢杆菌的分离和纯化:土壤样品在烘箱内 70 °C 处理 6 h 烘干,称取 1 g 土壤样品至装有 9 mL 无菌水试管中,80 °C 水浴保温 10 min,梯度稀释,取 10^{-2} – 10^{-5} 稀释度各 0.5 mL 涂布至筛选培养基平板,37 °C 培养 24 h,选取菌落周围有明显蛋白水解

圈的菌株在 LB 平板上划线纯化至单菌落。挑取单菌落经结晶紫简单染色后镜检观察,选取产芽孢的菌株进行后续筛选。

1.3.2 产酶菌株的初筛:将菌株用接种针点种于筛选培养基平板,37 °C 培养 24 h,测量菌落直径和蛋白水解圈直径,挑选蛋白水解圈直径与菌落直径比值较大的菌株,保存至 LB 斜面并进行复筛。

1.3.3 产酶菌株的复筛:100 mL 三角瓶内装入发酵培养基 15 mL,挑取单菌落接种,37 °C 恒温 120 r/min 振荡培养 16 h,培养液 6 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液至无菌容器,每 1 mL 上清液加入 0.5% 氯霉素乙醇溶液 5 μ L。在筛选培养基平板上放置牛津杯,加入上清液 150 μ L,每个菌株做 5 个处理,分别放置与 10 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 环境下 12 h,测量蛋白水解圈直径并选取不同温度下水解圈直径均较大的菌株。

1.4 菌株鉴定

通过革兰氏染色和芽孢染色观察菌体形态,生理生化试验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[8],16S rDNA 序列测定由北京华大基因技术有限公司完成。测序结果使用 BALSTn 比对初步确定种,利用有关种的公认标准序列数据,使用 MEGA 3.0 对齐、计算序列间距离并做系统发育分析,参数为 NJ 法、Kimura2、Pairwise deletion。

1.5 发酵液酶活的测量

以酪蛋白作为底物,采用 Folin-酚法测定酶活。酪蛋白以 2% (*W/V*) 浓度溶于 pH 10.0、硼酸根浓度 0.05 mol/L 的硼砂-NaOH 缓冲液。培养液经 6 000 r/min 离心后取上清,1 mL 上清液与 1 mL 底物溶液混合后在 40 °C 水浴保温 10 min,加入 0.4 mol/L 的三氯乙酸溶液 2 mL 中止反应,6 000 r/min 离心 5 min 后取上清液 1 mL,加入 0.4 mol/L Na_2CO_3 溶液 5 mL, Folin-酚试剂 1 mL,振荡均匀,60 °C 保温显色 20 min,测 680 nm 吸光度。酶活力单位定义为在 pH 10.0、40 °C 下,每分钟水解酪蛋白生成 1 μ g 酪氨酸的酶量。酶活表示单位为 U/mL。

1.6 菌株培养和产酶的影响因素

1.6.1 温度对菌株生长和产酶的影响:100 mL 三角

瓶装入发酵培养基 15 mL, 灭菌冷却后从平板单菌落接种, 37 °C 恒温、120 r/min 振荡培养 24 h 为种子液。以 3% (V/V) 比例接种至发酵培养基, 100 mL 三角瓶装液量 15 mL, 分别在 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、37 °C、40 °C、45 °C、50 °C 下 120 r/min 振荡培养 12 h, 测量培养液 600 nm 吸光度和酶活。

1.6.2 最适生长 pH 测定: 种子液制备同 1.6.1。用 HCl 或 NaOH 调发酵培养基 pH 为 6.0–12.0 范围, 以 3% (V/V) 比例接种种子液。100 mL 三角瓶装入发酵培养基 15 mL, 37 °C、120 r/min 振荡培养 12 h, 测量培养液 600 nm 吸光度。

1.6.3 发酵液中蛋白酶最适作用 pH 测定: 种子液制备同 1.6.1。用 NaOH 调发酵培养基 pH 为 8.0, 300 mL 三角瓶装液量 50 mL, 以 3% (V/V) 比例接种种子液, 37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h, 发酵液 6 000 r/min 离心取上清冷藏备用。酪蛋白以 3% (W/V) 浓度溶于 0.03 mol/L 的 Na₂HPO₄ 溶液, 100 mL 溶液用 6 mol/L HCl 溶液或 4 mol/L NaOH 溶液调 pH 为 6.0–12.0 并定容至 150 mL, 为底物溶液。其他操作同 1.5。

1.6.4 生长曲线和产酶曲线测定: 种子液制备同 1.6.1。用 NaOH 调发酵培养基 pH 为 8.0, 300 mL 三角瓶装液量 50 mL, 以 3% (V/V) 比例接种种子液, 37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h, 每隔 2 h 取样, 测量培养液 600 nm 吸光度和发酵液酶活。

1.6.5 不同氮源对产酶的影响: 选取大豆分离蛋白、牛乳酪蛋白、明胶、蛋白胨、氯化铵、硝酸铵为氮源。培养基组成 (W/V) 为氮源 1.0%、酵母膏 0.3%、葡萄糖 0.5%, pH 8.0, 1×10⁵ Pa 灭菌 15 min, 100 mL 三角瓶装液量 15 mL, 种子液(同 1.6.1)接种量 3% (V/V), 37 °C、120 r/min 振荡培养 16 h。测量发酵液酶活。

1.7 不同蛋白质水解度测定

以羽毛角蛋白、大豆分离蛋白、卵清蛋白、牛血清白蛋白(BSA)、胶原蛋白、牛乳酪蛋白为底物, 以浓度 2% (W/V) 溶于或悬浮于 pH 10.0、硼酸根 0.05 mol/L 的硼砂-NaOH 缓冲液中, 每 4 mL 蛋白溶液或蛋白悬液加入 1 mL 发酵液上清, 在 40 °C 分别作用 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 后 100 °C 加热

3 min 使酶失活以终止反应。6 000 r/min 离心 10 min 除去不溶物, 取上清液采用茚三酮法测定游离氨基酸浓度^[9]。以灭活发酵液上清为空白, 计算出酶水解每克蛋白质产生的氨基酸浓度 (mmol/g)。

底物蛋白完全水解液制备: 称取 50 °C 烘干 4 h 的各类底物蛋白各 0.5 g, 放入反应瓶中, 加入 6 mol/L HCl 20 mL, 密封后放入 130 °C 烘箱水解 24 h, 冷却后用 4 mol/L 的 NaOH 溶液中和至中性, 定容至 50 mL, 采用茚三酮法测定溶液中游离氨基酸浓度。根据称取的底物蛋白质质量和游离氨基酸浓度计算出完全水解后每克蛋白质产生的氨基酸浓度 (mmol/g)。

蛋白水解度为酶水解产生的氨基酸浓度和完全水解产生的氨基酸浓度比值的百分数。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌菌株分离纯化和筛选

从 130 份土壤样品中共分离纯化到 1 000 余株在 pH 10.0 的筛选培养基平板上能形成蛋白水解圈的产芽孢细菌菌株。在初筛中通过比较蛋白水解圈直径与菌落直径的比值, 筛选到 20 株比值大于 3.5 的菌株。在复筛中, 通过杯碟法测量特定体积发酵上清液在不同温度下形成蛋白水解圈的直径, 可简单快速的比较不同菌株发酵液的酶活。由于离心处理不能将上清液中的菌体和芽孢完全除去, 在复筛过程中残留的菌体和芽孢可能生长并产酶, 因此在上清液中加入少量氯霉素, 抑制菌体生长和蛋白质合成。复筛结果表明, 菌株 *Bacillus* sp. HFBL0079 发酵液在 10 °C–50 °C 范围内形成的蛋白水解圈直径平均值分别为 20.5 mm、25.3 mm、29.4 mm、31.2 mm、33.0 mm, 高于其他菌株的蛋白水解圈直径。认为该菌株产生的胞外碱性蛋白酶在温度适应性上具有一定优势, 因此选择 *Bacillus* sp. HFBL0079 作为研究对象。

2.2 菌株鉴定

Bacillus sp. HFBL0079 在 LB 平板上生长时菌落呈白色, 圆形, 表面光滑, 边缘较整齐, 中间略凸起; 染色观察为革兰氏阳性、菌体长杆状, 芽孢椭圆、中生或偏端生、不膨大。菌体形态见图 1。



图1 *Bacillus* sp. HFBL0079 菌株显微形态
Fig. 1 Cell morphology of *Bacillus* sp. HFBL0079

生理生化特性试验表明, *Bacillus* sp. HFBL0079 为严格好氧菌, 可发酵葡萄糖、甘露醇、松二糖、纤维二糖, 不发酵麦芽糖、棉籽糖、乳糖、半乳糖、山梨醇、海藻糖、甘油, 可水解淀粉、果胶、卵磷

脂、酪蛋白、明胶, 不能分解 Tween-80、尿素, 可利用柠檬酸钠、丁二酸钠、乙酸钠、苯甲酸钠为唯一碳源生长, 在 7% NaCl 下生长良好、10% NaCl 下生长微弱, V.P. 反应阳性。

Bacillus sp. HFBL0079 的 16S rDNA 序列 (HQ153104) 表明, 该菌株与枯草芽孢杆菌群 (*Bacillus subtilis* group) 内菌株同源性最高, 均在 99% 以上, 系统发育树见图 2。枯草芽孢杆菌群包括 *B. subtilis*、*B. atropheus*、*B. vallismortis*、*B. mojavensis*、*B. amyloliquefaciens*, 当使用 16S rDNA 序列作为区分鉴定的方法时, 群内 16S rDNA 序列相似度多在 99% 以上, 无法准确区分。目前认为该群内菌株的准确鉴定可使用 *gyrB* 基因序列, *gyrB* 的进化速率高于 16S rDNA, 具有更好的分辨率且与 DNA 杂交数据具有一定线性关系, 在种或亚种水平的分类研究中更加适用^[10]。

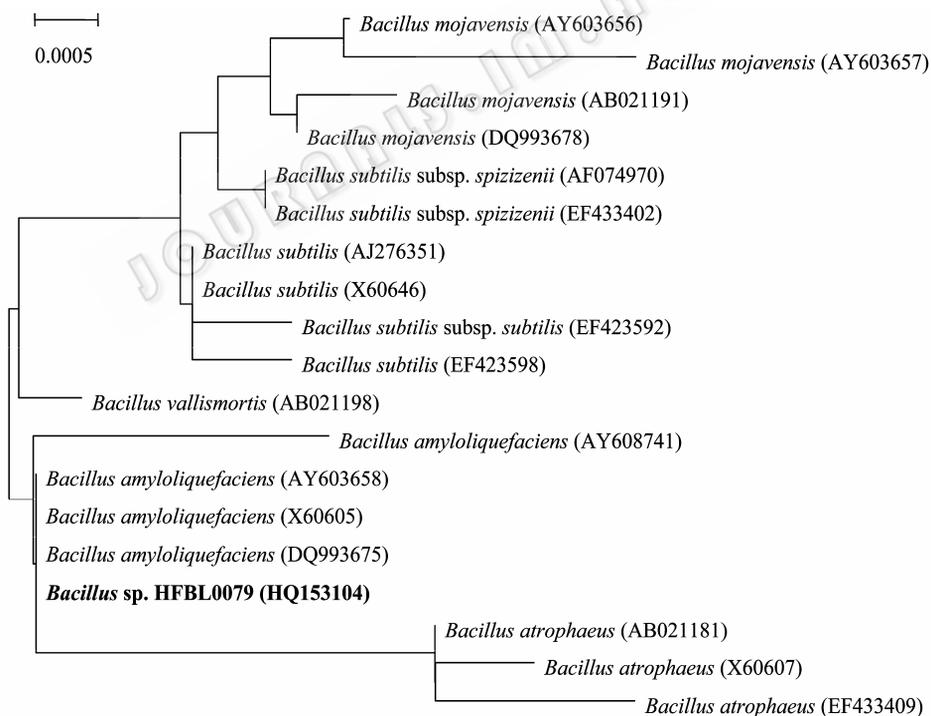


图2 基于 16S rDNA 序列构建的 *Bacillus* sp. HFBL0079 与相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of *Bacillus* sp. HFBL0079 and related species

注: 序列的 GenBank 登录号列于括号中, 标尺所示长度为 0.05% 核苷酸置换率。

Note: GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bar, 0.0005 substitutions per nucleotide position.

综合生理生化特性和 16S rDNA 序列, 初步鉴定 *Bacillus* sp. HFBL0079 为淀粉液化芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。

2.3 菌株培养和产酶条件

2.3.1 温度对菌株生长和产酶的影响: *B. amyloliquefaciens* HFBL0079 在不同温度下培养 12 h 后发酵液 600 nm 吸光值和酶活见图 3。该菌株最适培养温度在 35 °C–37 °C, 温度高于 40 °C 后生物量和产酶量快速下降, 45 °C 时基本无生长。在 12 h 培养过程中产酶量同菌体生长量变化趋势一致, 表明蛋白酶随菌体繁殖而同步合成。

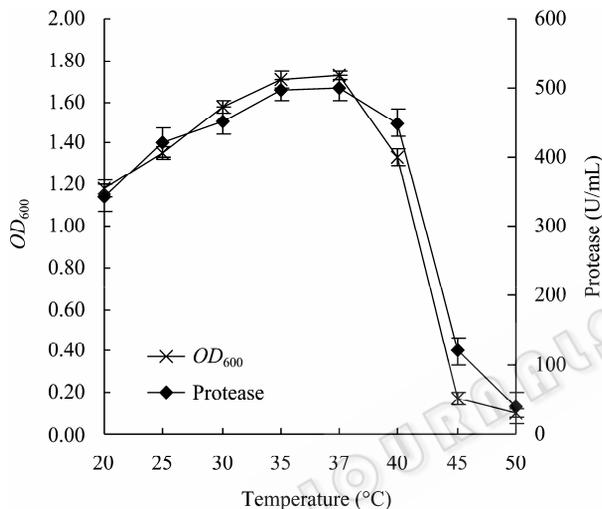


图 3 不同温度下菌体生长和产酶情况

Fig. 3 Effect of temperature on growth and protease production

2.3.2 最适生长 pH: *B. amyloliquefaciens* HFBL0079 在不同起始 pH 下生长情况见图 4, 最适生长 pH 在 7.00–8.00 范围内, 随 pH 增高生物量逐渐下降, 表明该菌株为耐碱菌而非嗜碱菌。

2.3.3 发酵液中蛋白酶最适作用 pH 测定: *B. amyloliquefaciens* HFBL0079 发酵液在 pH 为 6.0–12.0 条件下的蛋白酶活力变化见图 5。pH 6.0–10.0 范围内随 pH 升高发酵液酶活逐渐增大, pH 10.0 时高达 645 U/mL, pH 10.0–12.0 范围内酶活逐渐下降, 表明该菌株发酵液中蛋白酶的最适 pH 值约为 10.0, 至少含有一种碱性蛋白酶。

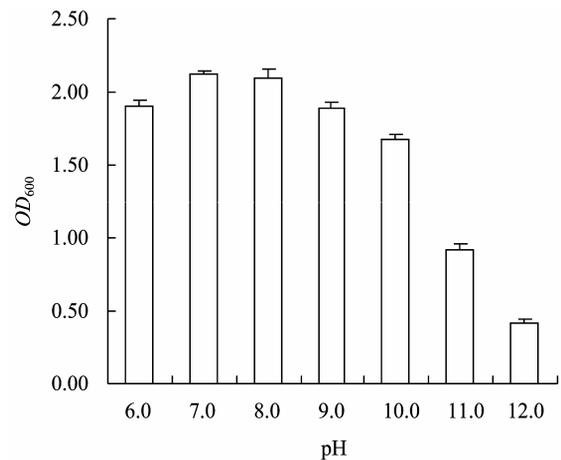


图 4 不同初始 pH 下菌体生长情况

Fig. 4 Effect of initial pH on growth

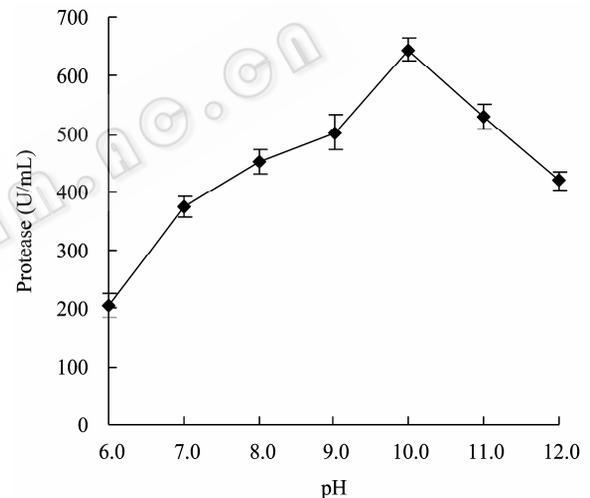


图 5 不同 pH 条件下发酵液中蛋白酶活性变化

Fig. 5 Effect of pH on protease activity in fermentation liquid

2.3.4 生长曲线和产酶曲线测定: 在发酵培养基初始 pH 8.0 条件下测量 *B. amyloliquefaciens* HFBL0079 生长曲线和产酶曲线, 结果见图 6。培养 4 h 后进入对数生长期, 酶活和菌体数量在对数期内均快速增长, 表明胞外碱性蛋白酶的合成与菌体生长具有相关性, 可根据菌体生长情况间接判断产酶情况, 薛林贵等^[1]在诱变选育碱性蛋白酶高产菌时也观察到该现象。培养 16 h 到达稳定期, 培养液 600 nm 吸光度和酶活保持稳定。

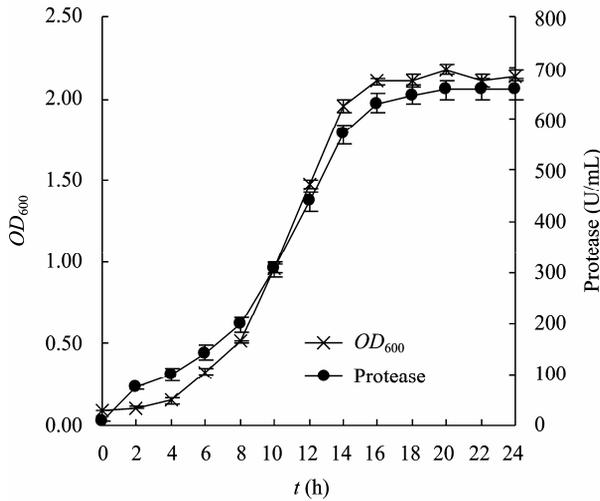


图6 菌株生长曲线和产酶曲线
Fig. 6 Growth curve and protease production curve

2.3.5 不同氮源对产酶的影响: 测量 *B. amyloliquifaciens* HFBL0079 在不同氮源下发酵液酶活, 以大豆分离蛋白为氮源时酶活达 852 U/mL, 以明胶、酪蛋白、蛋白胨为氮源时酶活分别为 728、581、573 U/mL, 以氯化铵、硝酸铵为氮源时发酵液酶活 <10 U/mL。以大豆分离蛋白为氮源时酶活最高, 大豆蛋白在价格和来源上均具有优势, 是培养基优化时的首选氮源。以氯化铵、硝酸铵为氮源时发酵液酶活极低, 表明 NH_3 阻遏蛋白酶的产生。

2.3.6 碱性蛋白酶对不同蛋白质水解度: *B. amyloliquifaciens* HFBL0079 所产碱性蛋白酶作用于不同底物的蛋白水解度见图 7。羽毛角蛋白水解度最低, 为 15.3%。角蛋白为富含 β -折叠结构的线状蛋白, 富含 Cys, 二硫键数量较多, 形成稳定的三维结构, 溶解性差, 一般蛋白酶均难以降解, 对角蛋白的降解表明该酶在水解能力上可能具有一定独特性。酶解 3 h 后胶原蛋白水解度最高, 为 42.3%。认为胶原蛋白为线状分子, 有更多的酶解位点暴露出来, 更易水解。大豆分离蛋白、卵清蛋白、牛血清白蛋白、牛乳酪蛋白为球蛋白或接近球蛋白, 多肽链卷曲程度高, 暴露出的酶解位点相对较少, 水解度低于线状的胶原蛋白。水解度结果表明胶原蛋白中 40% 以上氨基酸被水解为游离状态, 值得特别注意。一般认为碱性蛋白酶要求水解位点羧基侧为芳香族或强

疏水性氨基酸, 而胶原蛋白中则以 Gly、Pro、Hyp 等为主要氨基酸, 芳香族和强疏水性氨基酸含量一般低于 25%^[12]。推测该菌株产生的碱性蛋白酶可能在酶切位点特异性上不同于常见的碱性蛋白酶。

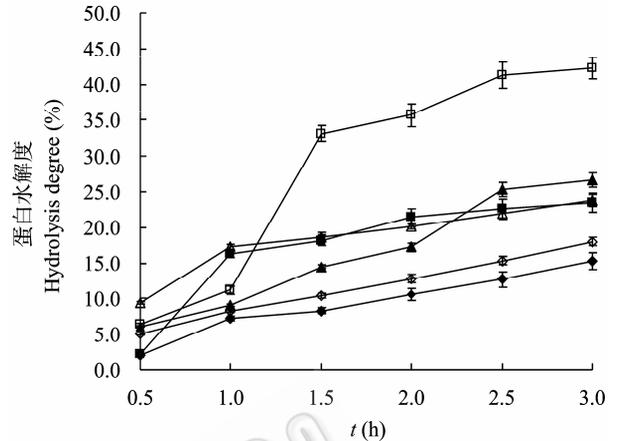


图7 不同蛋白质为底物的水解度变化曲线
Fig. 7 The hydrolysis degree of different proteins on different times

注: ◆: 羽毛角蛋白; ■: 大豆分离蛋白; ▲: 卵清蛋白; ◇: 牛血清白蛋白; □: 胶原蛋白; △: 牛乳酪蛋白。
Note: ◆: Feather keratin; ■: Soy protein isolate; ▲: Ovalbumin; ◇: BSA; □: Collagen; △: Milk casein.

3 讨论

本研究筛选到的 *B. amyloliquifaciens* HFBL079 菌株可产生胞外蛋白酶, 最适 pH 约为 10, 表明其产生的胞外蛋白酶至少含有一种碱性蛋白酶。枯草芽孢杆菌群内菌种产生的碱性蛋白酶多属于 Subtilisin 类型蛋白酶, 该类酶为碱性丝氨酸蛋白酶, 水解肽链时要求肽键羧基侧残基为芳香族或疏水氨基酸, 例如 Tyr、Phe、Leu 等; 最适 pH 多为 10 左右; 对 PMSF、DFP 等敏感, Ca^{2+} 往往能提高酶稳定性和活性; 分子量较小, 已报道的多个酶均在 30 kD 及以下^[1,4,13-14]。在 pH 10 条件下, *B. amyloliquifaciens* HFBL079 产生的蛋白酶对胶原蛋白的降解程度高于酪蛋白、BSA、大豆分离蛋白等常见蛋白, 可将 40% 以上氨基酸水解为游离状态。胶原蛋白中富含亲水性氨基酸, 仅 Gly、Pro、Hyr 3 种氨基酸含量即超过 40%, 芳香族和强疏水性氨基酸含量一般低于 25%^[12]。*B. amyloliquifaciens* HFBL079 产生的蛋白

酶对胶原蛋白的高水解程度不符合 Subtilisin 类型蛋白酶要求肽键羧基侧为芳香族或疏水性氨基酸的特性, 提示其酶切位点特异性可能与已知的 Subtilisin 类型蛋白酶有所差异。

B. amyloliquifaciens HFBL079 产生的胞外蛋白酶对羽毛角蛋白有一定水解能力。角蛋白是动物羽毛、指甲等结构的主要成分, 富含 Cys 并依靠分子内二硫键形成坚固结构, 一般蛋白酶均不能分解角蛋白。Kumar 等^[4]报道一株嗜碱芽孢杆菌可产生 2 种分子量为 28 kD 和 29 kD, 最适 pH 分别为 11 和 12 的碱性丝氨酸蛋白酶, 在 pH 6.0–12.0 范围内保持稳定, 两种酶均可水解酪蛋白、弹性蛋白、角蛋白等多种底物, 在底物广泛性上与 *B. amyloliquifaciens* HFBL079 产生的胞外蛋白酶较为类似。对芽孢杆菌产生的角蛋白酶的深入研究表明, 其氨基酸序列与 Subtilisin 类蛋白酶高度相似, 并不具有打开二硫键的能力, 纯化后的角蛋白酶单独作用时水解能力严重下降, 其水解角蛋白的能力依赖于菌体细胞产生的其他成分对角蛋白二硫键的破坏^[15]。

B. amyloliquifaciens HFBL079 对角蛋白的水解能力还需进一步研究。

本研究表明 *B. amyloliquifaciens* HFBL079 所产胞外碱性蛋白酶在底物特异性、酶切位点特异性上与常见 Subtilisin 类型蛋白酶有所差异, 该酶的纯化、酶学性质、序列分析将是后续研究重点。

参 考 文 献

- [1] Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(1): 15–32.
- [2] 郝建国, 薛燕芬, 马延和. 一株产蛋白酶嗜碱菌株的分离、鉴定及酶学特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(1): 54–59.
- [3] 肖昌松, 吕健, 田新玉, 等. 嗜碱芽孢杆菌 XE22-4-1 碱性弹性蛋白酶发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 2001,

41(5): 611–616.

- [4] Kumar CG, Tiwari MP, Jany KD. Novel alkaline serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* spp.: purification and some properties[J]. Process Biochemistry, 1999, 34(5): 441–449.
- [5] Johnvesly B, Naik GR. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium[J]. Process Biochemistry, 2001, 37(2): 139–144.
- [6] Banerjee UC, Sani RK, Azmi W, et al. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive[J]. Process Biochemistry, 1999, 35(1/2): 213–219.
- [7] Joo HS, Kumar CG, Park GC, et al. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(2): 267–272.
- [8] 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: 349–398.
- [9] 邵金良, 黎其万, 董宝生, 等. 茚三酮比色法测定茶叶中游离氨基酸总量[J]. 中国食品添加剂, 2008(2): 162–165.
- [10] Wang LT, Lee FL, Tai CJ, et al. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(8): 1846–1850.
- [11] 薛林贵, 景春娥, 赵旭, 等. 重离子诱变技术选育碱性蛋白酶高产菌株[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 845–851.
- [12] 李燕, 王川, 蓝蔚青. 胶原蛋白的分离纯化及氨基酸组成分析[J]. 食品科技, 2007, 32(10): 137–140.
- [13] Gessesse A, Hatti-Kaul R, Gashe BA, et al. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(5): 519–524.
- [14] Beg QK, Gupta R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(2): 294–304.
- [15] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview[J]. Applied Microbiol Biotechnology, 2006, 70(1): 21–33.