

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201904030



产碱性冷适蛋白酶菌株 *Chryseobacterium* sp. vv8 的鉴定及粗酶性质

何小玉¹, 刘承忠¹, 陈明霞¹, 李和阳²

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 自然资源部第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 为鉴定金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)菌株 vv8 及分析其胞外蛋白酶的酶学特性,首先,通过分子及生理生化特性对菌株 vv8 进行鉴定;然后,采用明胶平板筛选法和 Lowry 法对菌株 vv8 进行产酶筛选和蛋白酶活性测定;最后,研究 pH 值、温度、金属离子和抑制剂对该蛋白酶活性的影响. 研究表明:菌株 vv8 的 16S rDNA 与比目鱼黄杆菌(*C. scopthalmum*) 具有 98.24% 的序列相似性,属于 *Chryseobacterium* 属;菌株 vv8 的最适生长条件是温度为 22 ℃, NaCl 质量浓度为 0 mg · mL⁻¹, pH 值为 6.0;菌株 vv8 的胞外蛋白酶在 pH 值为 5.0~10.0, 温度为 0~90 ℃ 范围内均具有酶活性,其最适酶活温度和 pH 值分别为 40 ℃, 8.5;在最适条件下,蛋白酶具有较高的稳定性,在冻干过程中,添加葡萄糖具有明显的酶活保护作用;Fe³⁺, Fe²⁺, Cu²⁺ 等金属离子及乙二胺四乙酸(EDTA)对酶活性有明显的抑制作用,该酶对洗衣液和尿素具有较好的耐受性.

关键词: 冷适碱性蛋白酶; 金黄杆菌属; 生长特性; 酶特性

中图分类号: Q 93.9

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2019)05-0646-07

Identification and Preliminary Enzymatic Properties of Cold-Adapted Alkaline Protease Producing Strain *Chryseobacterium* sp. vv8

HE Xiaoyu¹, LIU Chengzhong¹, CHEN Mingxia¹, LI Heyang²

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China)

Abstract: To identify *Chryseobacterium* sp. vv8 and analyze the enzymatic properties of its extracellular protease, the strain vv8 was firstly identified by molecular, physiological and biochemical characteristics. Secondly, the enzyme screening and protease activity of strain vv8 were determined by gelatin plate screening method and Lowry method. Last, the effects of pH value, temperature, metal ions and inhibitors on the protease activity were studied. The results showed that the 16S rDNA of strain vv8 had 98.24% sequence similarity with *C. scopthalmum* and was phylogenetically assigned as genus *Chryseobacterium*. The optimum culture conditions of strain were 22 ℃, the mass concentration of NaCl 0 mg · mL⁻¹ and pH value 6.0. The extracellular protease of strain vv8 presented enzyme activity at the range of pH 5.0-10.0 and 0-90 ℃, with the highest a-

收稿日期: 2019-04-17

通信作者: 陈明霞(1980-),女,讲师,博士,主要从事海洋微生物的研究. E-mail:chenmx1257@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41506179); 国家海洋局全球变化与海气相互作用专项资助项目(GASI-03-01-03-01); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(海三科 2014003); 福建省自然科学基金资助项目(2015J01613); 华侨大学研究生科研创新能力培育计划资助项目(17013087002)

ctivity at pH 8.5 and 40 ℃. Under the optimal conditions, the protease exhibited good stability, and glucose had obvious enzyme activity protection during lyophilization. Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) showed obvious inhibitory effects on enzyme activity, but the protease exhibited good tolerance to laundry detergent and urea.

Keywords: cold-adapted alkaline protease; *Chryseobacterium*; growth characteristics; enzymatic characteristics

蛋白酶不仅是一类能水解蛋白质肽链的催化酶,还是目前世界上产销量最大的商业酶,在不同工业市场上的应用占有所有酶类的 40%。微生物是蛋白酶的一个重要来源,其产生的蛋白酶比植物、动物产生的蛋白酶更容易被分离和纯化^[1-3]。目前,微生物蛋白酶在工业上的应用主要是中温蛋白酶,因其最适酶活性在 50 ℃ 左右^[4],有一定的局限性,故急需开发新型蛋白酶。而由低温菌和耐低温菌产生的低温蛋白酶,因其最适酶活性一般在 40 ℃ 以下^[5-6],在食品工业、化妆品行业、环境治理等行业中具有较大的应用前景。目前,发现可以生产低温蛋白酶的菌种大多属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[7-8]、海杆菌属(*Marinobacter*)^[9]、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)^[10]、黄杆菌属(*Flavobacterium*)^[11-12]等。金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)隶属于拟杆菌门(*Bacteroidetes*)黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)^[13]。*Chryseobacterium* 在土壤、淡水、海洋、极地等环境均能生存^[14-15],*Chryseobacterium* 的菌株能产生较稳定的蛋白酶,在工业生产中具有较大的优势。本文主要对来源于北极海水的产碱性冷适蛋白酶菌株 vv8 进行鉴定,并对其部分酶学性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

菌株 vv8 分离自北极海水,其采样坐标为 53.33° N,169.96° E。明胶培养基的制作参考文献[16],2216E 培养基和发酵培养基的制作参考文献[15]。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂:*Taq* DNA Polymerase(上海生工生物工程股份有限公司);DNA Marker(上海生工生物工程股份有限公司);细菌微量生化反应管(浙江省杭州天和微生物试剂有限公司);DNA 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司);Lowry 法蛋白质量浓度测定试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司);酪蛋白(美国 Sigma 公司);其他化学试剂均为国产分析纯。

主要仪器:SPECTRA MAX 190 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);Centrifuge 5417R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);FDU-2100 型冷冻干燥仪(上海森超生物科技有限公司);聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 BIO-RAD 公司);JY-SPDT 型电泳槽(大连竞迈生物科技有限公司);Gel Doc™XR 型凝胶成像仪(美国 BIO-RAD 公司);SP-250A 型生化培养箱(南京实验仪器厂)。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 菌株蛋白酶活性验证 将菌株 vv8 接种到明胶平板上,在温度为 20 ℃ 的环境下,培养 3~20 d。利用氯化汞试剂处理平板,并观察是否有水解圈产生^[17]。

1.3.2 菌株分子鉴定 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 vv8 基因组 DNA。以 Eubac27F 和 Eubac1492R^[18] 为引物,扩增 16S rDNA^[19]。PCR 的产物琼脂糖凝胶经电泳检测后,由南京金斯瑞生物科技有限公司进行序列测定,所得 16S rDNA 序列通过 GenBank 数据库进行 Blast 分析,并利用 MEGA 7 软件采用最大似然法构建系统进化树,自举数据集为 1 000 次。

1.3.3 菌株生理生化鉴定 菌株的生理生化鉴定方法参考文献[20]和杭州天和微生物试剂有限公司提供的细菌微量生化反应管使用方法。

1.4 NaCl 质量浓度、pH 值和温度对菌株 vv8 生长的影响

在温度为 18 ℃,pH 值为 7.0 的条件下,测定不同 NaCl 质量浓度(0,20,30,40,50 mg · mL⁻¹)对菌株 vv8 生长的影响;在温度为 18 ℃,NaCl 质量浓度为 20 mg · mL⁻¹的条件下,测定不同 pH 值(5.0,6.0,7.0,8.0,9.0)对菌株 vv8 生长的影响;在 NaCl 质量浓度为 20 mg · mL⁻¹,pH 值为 7.0 的条件下,

测定不同温度(10,15,20,25,30 ℃)对菌株 vv8 生长的影响. 上述 3 种情况下的测定方法均是将菌株 vv8 置于转速为 250 r · min⁻¹的摇床中培养,每间隔 5~8 h 取一次样,以测定发酵液 D_{600} 值(波长为 600 nm 处的菌体的吸光度),并根据测得的数据,绘制菌株在不同培养条件下的生长曲线.

1.5 蛋白酶学特性分析

1.5.1 蛋白酶活性测定 为获取菌株 vv8 所产的蛋白酶,将菌株 vv8 接种到 2216E 培养基中,在温度为 18 ℃,转速为 200 r · min⁻¹的摇床中,培养 4~5 d. 在温度为 4 ℃,摇床转速为 8 000 r · min⁻¹的条件下,将发酵液离心 10 min 后,收集上清液,并经真空冷冻干燥、过夜透析处理后,得到粗酶液. 采用 Lowry 法测定菌株 vv8 所产蛋白酶的活性^[21-22].

1.5.2 温度、pH 值对蛋白酶活性及稳定性的影响 温度设定范围为 0~90 ℃,其间隔设定为 5 ℃,粗酶和底物酪蛋白(质量浓度为 1 mg · mL⁻¹,pH=8.0)反应 10 min 后,测定其蛋白酶活性. pH 值设定范围为 5.0~10.0,其间隔设定为 1.0,粗酶和底物酪蛋白(质量浓度为 1 mg · mL⁻¹) 在温度为 40 ℃的条件下,反应 10 min 后,测定其酶活性.

在最佳反应温度下,将蛋白酶分别放置 40,90 min,以验证最佳反应温度对蛋白酶稳定性的影响. 在温度为 4 ℃条件下,将蛋白酶在最适 pH 值缓冲液中放置 5 d 后,测定其残余蛋白酶活性,以分析最佳 pH 值对蛋白酶稳定性的影响.

1.5.3 蛋白酶 K_m, v_{max} 测定 在温度为 40 ℃,pH 值为 8.5 的条件下,粗酶液与不同质量浓度的酪蛋白(2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0 mg · mL⁻¹) 反应 10 min 后,测定反应体系的 D_{680} 值(波长为 680 nm 处的蛋白的吸光度),根据米氏方程计算酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率 v_{max} .

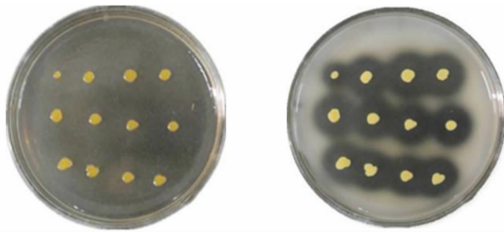
1.5.4 金属离子及抑制剂对蛋白酶活性的影响 向酶活性测定反应体系中分别加入金属离子、尿素、洗衣液、乙二胺四乙酸(EDTA)等试剂,直至浓度为 1 mmol · L⁻¹或其他设定浓度,以未加试剂的反应体系作为阴性对照,在温度为 40 ℃条件下,反应 10 min 后,测定菌株 vv8 所产蛋白酶的酶活性.

1.5.5 保护剂在冷冻干燥过程中对蛋白酶活性的影响 向粗酶溶液中分别加入葡萄糖、蔗糖、甘氨酸等保护剂,使其最终质量浓度为 100 mg · mL⁻¹,并在温度为-20 ℃条件下,冷冻凝固后,放入冻干机冷冻干燥. 各冻干粉用蒸馏水调整至冻干前体积,测定其酶活性,以未经冷冻干燥过程的酶活性为原始酶活性对照. 在测定酶活性时,设定空白对照,以扣除各种保护剂在 Lowry 法测定中的本底影响.

2 实验结果与分析

2.1 明胶水解特性分析

Chryseobacterium sp. vv8 菌落及明胶水解形态,如图 1 所示. 由图 1(a)可知:菌株 vv8 培养 15 d 后的菌落形态呈浅黄色,不透明,且表面光滑. 由图 1(b)可知:用氯化汞试剂处理平板后,可观察到明显的水解透明圈,说明该菌株具有较强的明胶水解能力,产胞外蛋白酶.



2.2 *Chryseobacterium* sp. vv8 的 16S rDNA 序列及系统发育分析

菌株 vv8 的 16S rDNA 有效序列为 1 478 bp, GenBank 的登录号为 MG725656. 1. 菌株 vv8 及相关菌株的 16S rDNA 系统发育分析,如图 2 所示. 图 2 中:括号内为菌株的 16S rDNA 序列在 GenBank 中的登录号;分支上的数字为 bootstrap 值;标尺的数值为进化距离. 由图 2 可知:通过 16S rDNA 序列对比,菌株 vv8 与比目鱼黄杆菌(*C. scophthalmum*)具有 98. 24% 的序列相似性,属于同一种属范围^[23-25];通过系统发育分析,菌株 vv8 与 *C. scophthalmum* 亲缘关系最近,处于同一个进化分支上.

(a) 培养 15 d 后的菌落形态 (b) 明胶水解圈形态
图 1 *Chryseobacterium* sp. vv8 菌落及明胶水解形态
Fig. 1 Colony morphology and gelatin hydrolysis of *Chryseobacterium* sp. vv8

2.3 *Chryseobacterium* sp. vv8 的生理生化特征分析

菌株 vv8 具体的生理生化特征,如表 1 所示. 表 1 中:“+”代表具有水解特性/阳性;“-”代表不具

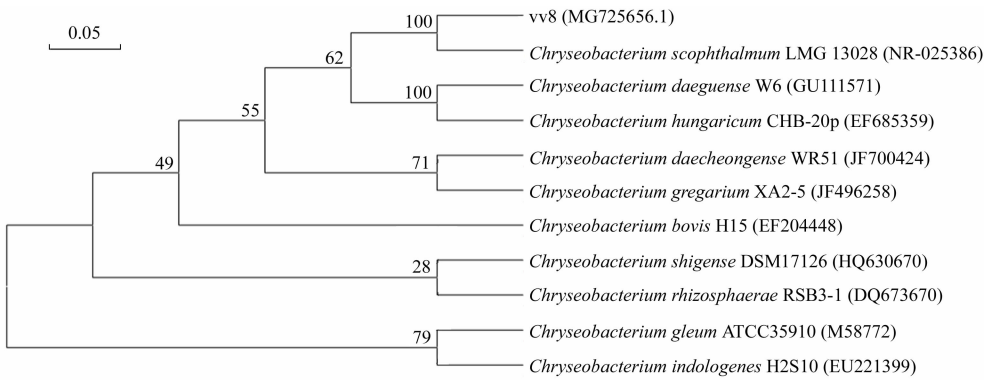


图 2 菌株 vv8 及相关菌株的 16S rDNA 系统发育分析

Fig. 2 16S rDNA phylogenetic analysis of strain vv8 and related strains

有水解特性/阴性. 由表 1 可知: 菌株 vv8 可以利用葡萄糖、果糖、半乳糖、麦芽糖、甘露糖作为唯一碳源进行生长, 但不具有水解乳糖、蔗糖、木糖的能力. 此外, 菌株 vv8 不具备硝酸盐还原能力, 其氧化酶、明胶酶、尿酶呈阳性, DNA 酶呈阴性, 这与 *C. scophthalmum* 具有相似的生理生化特性^[26].

表 1 *Chryseobacterium* sp. vv8 的生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of *Chryseobacterium* sp. vv8

特征	阳/阴性	特征	阳/阴性	特征	阳/阴性	特征	阳/阴性	特征	阳/阴性
乳糖	—	还原硝酸盐	—	甘露醇	—	半乳糖	+	七叶苷	+
蔗糖	—	亚硝酸盐产气	—	乙酰胺	—	果糖	+	尿酶	+
海藻糖	—	硝酸盐产气	—	H ₂ S 产生	—	葡萄糖	+	DNase	—
鼠李糖	—	侧金盏花醇	—	氧化酶	+	明胶酶	+	麦芽糖	+
								木糖	—
								甘露糖	+

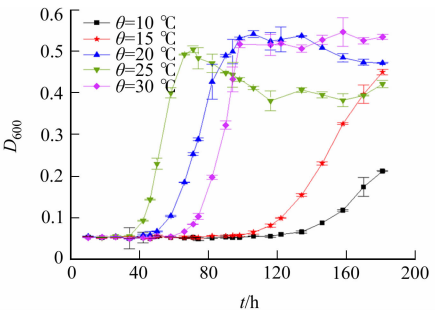
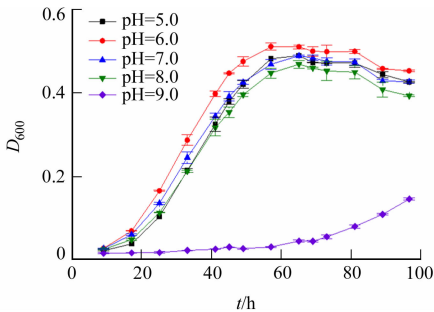
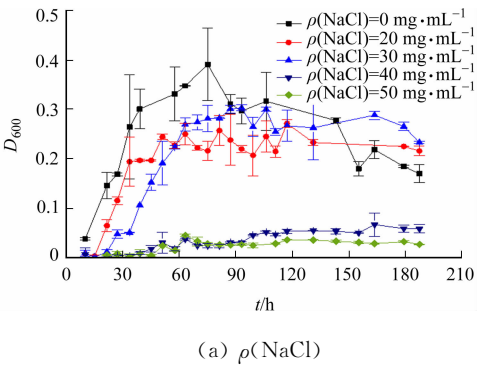
2.4 *Chryseobacterium* sp. vv8 的生长特性分析

不同因素对 *Chryseobacterium* sp. vv8 生长的影响, 如图 3 所示. 图 3 中: $\rho(\text{NaCl})$ 为 NaCl 的质量浓度; θ 为温度; t 为时间.

由图 3(a)可知: 在 $\rho(\text{NaCl})$ 为 $0\sim30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内, 菌株 vv8 可以良好地生长; 当 $\rho(\text{NaCl})$ 为 $0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 菌株 vv8 生长最快, 且该条件下的稳定期 (t 为 $40\sim50\text{ h}$) 的菌体数量较多, 但稳定期相对较短; 当 $\rho(\text{NaCl})\geq 40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 菌株 vv8 生长非常缓慢, 说明菌株 vv8 更适合在低盐质浓度下生长.

由图 3(b)可知: 在 pH 值为 $5.0\sim8.0$ 范围内, 菌株 vv8 生长良好; 当 pH 值为 6.0 左右时, 菌株 vv8 生长状态最佳; 当 pH 值为 9.0 时, 菌株 vv8 生长较为缓慢, 出现生长延滞现象, 说明菌株 vv8 更适合在偏酸性条件下生长.

由图 3(c)可知: 在温度为 $20\sim30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内, 菌株 vv8 生



(a) $\rho(\text{NaCl})$ (b) pH 值 (c) 温度

图 3 不同因素对 *Chryseobacterium* sp. vv8 生长的影响

Fig. 3 Effects of different factors on growth of *Chryseobacterium* sp. vv8

长良好;而在温度为 10~15 ℃ 范围内,菌株 vv8 生长较差,但生长周期长,说明该菌属于冷适菌。

2.5 蛋白酶的最适反应温度及温度稳定性分析

温度对菌株 vv8 所产蛋白酶活性的影响,如图 4 所示。图 4 中: ρ (酪氨酸)为酪氨酸的质量浓度。由图 4 可知:菌株 vv8 所产蛋白酶的酶活性温度范围广,在温度为 0~87 ℃ 均具有一定活性,而在温度为 40 ℃ 时,酶活性最高;在温度为 40 ℃ 时,将粗酶溶液与酪蛋白溶液(pH 值为 8.0)反应 10 min 后, ρ (酪氨酸)可达 140 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。

为验证菌株 vv8 所产蛋白酶的温度稳定性,在温度为 40 ℃ 条件下,将粗酶溶液放置 40 min 后,有 86.09% 的残余酶活性,而放置 1.5 h 后,粗酶溶液仍有 74.21% 的残余酶活性,这与文献[27-30]报道的蛋白酶相比,菌株 vv8 所产蛋白酶在最适酶活性温度下,具有较高的稳定性。通常把最适酶活性温度在 35 ℃ 以下,且在低温下仍具一定催化效能的酶称为低温酶^[27]。菌株 vv8 所产蛋白酶的冷适性较好,属于冷适酶。

2.6 蛋白酶的最适 pH 值及 pH 值稳定性分析

pH 值对菌株 vv8 所产蛋白酶活性的影响,如图 5 所示。由图 5 可知:蛋白酶酶活性的 pH 值范围广,在 pH 值为 6.5,10.0 时,蛋白酶仍具有一定酶活性;蛋白酶酶活性最适 pH 值为 8.5 左右,属于碱性蛋白酶;在 pH 值为 8.5 条件下,将粗酶溶液与酪蛋白溶液(温度为 40 ℃)反应 10 min 后, ρ (酪氨酸)可达 108 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。

为了验证菌株 vv8 所产蛋白酶 pH 值稳定性,在温度为 4 ℃,pH 值为 8.5 的条件下,将粗酶溶液放置 5 d,所测得的酶活性无损失,这表明菌株 vv8 所产蛋白酶具有较高的稳定性。

2.7 蛋白酶动力学常数分析

在波长为 680 nm 处,蛋白吸光度标准曲线回归方程为 $y=0.067\ 23+0.001\ 03x$, $R^2=0.995\ 0$ 。根据米氏方程计算,可得 $K_m=3.622\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $v_{\max}=3.452\ \text{mg} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$ 。

2.8 金属离子及抑制剂对酶活性的影响分析

各种金属离子及抑制剂对蛋白酶活性的影响,如表 2 所示。表 2 中: ϕ 为相对酶活性;除市售洗衣液的浓度稀释 1 000 倍外,其余试剂的最终浓度均为 1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 。由表 2 可知: Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} 最终浓度为 1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 时,其对蛋白酶活性无明显影响; Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , EDTA 最终浓度为 1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 时,其对蛋白酶活性有较强的抑制作用;尿素最终浓度为 1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 时,对蛋白酶活性几乎没有影响;在稀释 1 000 倍后的市售洗衣液中,蛋白酶仍然具有较高的酶活性。

表 2 金属离子及抑制剂对蛋白酶活性的影响

Tab. 2 Effect of metal ions and inhibitors on protease activity

试剂	$\phi/\%$	试剂	$\phi/\%$	试剂	$\phi/\%$
ZnSO ₄	95.20±1.00	MgSO ₄	105.08±1.20	Fe ₂ (SO ₄) ₃	12.15±0.80
FeCl ₃	10.45±0.00	MnCl ₂	107.34±1.20	FeSO ₄	27.12±0.20
CuSO ₄	54.05±1.80	NiCl ₂	101.69±0.80	CoCl ₂	105.37±0.41
SrCl ₂	101.69±0.40	尿素	102.26±0.40	EDTA	29.29±0.80
市售洗衣液	78.59±3.54				

2.9 保护剂对蛋白酶活性的影响分析

不同保护剂对蛋白酶活性的影响,如表 3 所示。表 3 中: R 为残余酶活性。加入保护剂的各粗酶溶液的质量浓度均为 100 mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。由表 3 可知:将粗酶液不加任何保护剂直接冻干处理后,酶活性剩余 73.16% 左右,酶活性损失较大;将甘露醇、甘油、甘氨酸加入粗酶液进行冻干处理后,酶活性损失约为

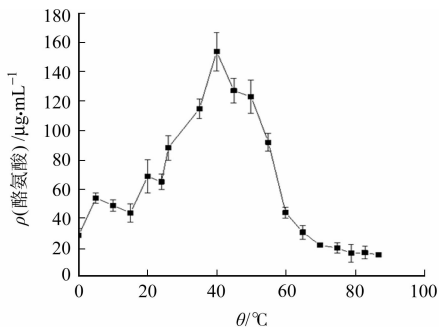


图 4 温度对蛋白酶活性的影响
Fig. 4 Effect of temperature on protease activity

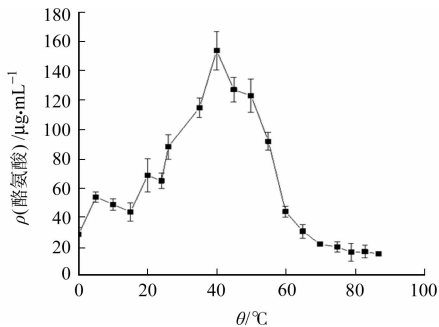


图 5 pH 值对蛋白酶活性的影响
Fig. 5 Effect of pH value on protease activity

50.00%;加入二甲基亚砷(DMSO)后,酶活性剩余 5.00%左右,几乎完全丧失酶活性;蔗糖对蛋白酶的活性影响不大,冻干后,酶活性保持 76.32%左右;在添加葡萄糖的粗酶溶液中,酶活性没有损失,这说明葡萄糖在冻干过程中对蛋白酶有明显的保护作用。

表 3 各种保护剂对蛋白酶活性的影响

Tab. 3 Effect of various protective agents on protease activity

保护剂	R/%	保护剂	R/%	保护剂	R/%	保护剂	R/%
空白处理	73.16±3.72	甘露醇	48.42±4.09	蔗糖	76.32±1.86	葡萄糖	108.95±0.74
甘油	45.26±2.98	甘氨酸	49.32±5.58	DMSO	5.00±1.12		

3 结论

通过对产蛋白酶菌株 vv8 进行分子及生理生化鉴定,并对其胞外蛋白酶部分酶学性质进行研究,得出以下 4 点结论。

- 1) 菌株 vv8 属于 *Chryseobacterium* 属,其与 *C. scopthalmum* 具有 98.24%的序列相似性. 该菌株最适生长条件为温度为 22 ℃,ρ(NaCl)为 0 mg·mL⁻¹,pH 值为 6.0.
- 2) 菌株 vv8 所产蛋白酶的最佳反应温度和最适酶活性 pH 值分别为 40 ℃,8.5,且在低温条件下,蛋白酶活性较高,属于冷适碱性蛋白酶.
- 3) 菌株 vv8 所产蛋白酶在最适酶活性条件下,具有较好的稳定性. 在温度 40 ℃条件下,将粗酶溶液分别放置 40 min,1.5 h 后,其溶液中分别仍有 86.09%,74.21%的残余酶活性.
- 4) 菌株 vv8 所产冷适碱性蛋白酶在稀释 1 000 倍的洗衣液中,仍然具有 78.59%左右的酶活性,且稳定性较好,其作为去污剂酶类具有很大的潜能.

参考文献:

[1] 刘金龙. 鱼蛋白多肽的制备及其在农业生产中的应用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.

[2] 谢薇,顾龙龙,单妍. 一株产耐盐碱性蛋白酶菌株的分离鉴定及最佳生产条件研究[J]. 包头医学院学报, 2018, 34(7): 95-98. DOI:10.16833/j.cnki.jbmc.2018.07.041.

[3] 徐晓梅. 生活污水净化耐冷菌株的分离及降解活性测定[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2017.

[4] 姜春宇,张媛,孙燕飞,等. 产低温蛋白酶酵母菌株的筛选及发酵培养基优化[J]. 中国酿造, 2018, 37(11): 51-56. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2018.11.010.

[5] 王继莲,李明源,任羽. 布伦口湖群湿地产蛋白酶耐低温菌株的筛选及初步鉴定[J]. 西南农业学报, 2017, 30(6): 1330-1334. DOI:10.16213/j.cnki.scjas.2017.6.016.

[6] FURHAN J,AWASTHI P,SHARMA S. Biochemical characterization and homology modelling of cold-active alkophilic protease from northwestern Himalayas and its application in detergent industry[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 17: 726-735. DOI:org/10.1016/j.bcab.2019.01.028.

[7] SINGH S K, SINGH S K, TRIPATHI V R, et al. A novel psychrotrophic, solvent tolerant *Pseudomonasputida* SKG-1 and solvent stability of its psychro-thermoalkalstable protease[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(7): 1430-1435. DOI:10.1016/j.procbio.2011.03.012.

[8] 李桂英,廖祥儒,蔡宇杰. 微生物转化浮萍资源生产蛋白酶的条件[J]. 生物资源, 2018, 40(1): 64-69. DOI:10.14188/j.ajsh.2018.01.012.

[9] 林念炜,张锐,赵晶,等. 南极产低温蛋白酶菌株 *Marinobacter* sp. R2 的发酵条件及酶学性质研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(6): 865-869. DOI:10.1161/01.ATV.0000116865.98067.31.

[10] MARGESIN R,SCHINNER F. Characterization of a metalloprotease from psychrophilic *Xanthomonasmaltophilia* [J]. Fems Microbiology Letters, 1991, 79(23): 257-262. DOI:10.1111/j.1574-6968.1991.tb04538.x.

[11] KIM E H,CHO K H,LEE Y M, et al. Diversity of cold-active protease-producing bacteria from arctic terrestrial and marine environments revealed by enrichment culture[J]. Journal of Microbiology, 2010, 48(4): 426-432. DOI:10.1007/s12275-010-0015-z.

[12] 叶思帆,赵媛. 微生物源碱性蛋白酶的生产及其应用[J]. 青海科技, 2018, 25(2): 75-78.

[13] VANDAMME P,BERNARDET J F,SEGERS P, et al. Notes: New perspectives in the classification of the *Fla-*

vobacteria; Description of *Chryseobacterium* gen. nov. *Bergeyella* gen. nov. and *Empedobacter* nom. rev. [J]. International Journal of Systematic Bacteriology,1994,44(4):827-831. DOI:10.1099/00207713-44-4-827.

[14] 刘静,闵航,章骥,等.一株产低温蛋白酶菌株的筛选鉴定及纯酶研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2006,32(3):251-256. DOI:10.3321/j.issn:1008-9209.2006.03.004.

[15] 陈明霞,李和阳,陈维维,等.68株北极产蛋白酶菌株的筛选、鉴定以及部分酶学性质[J].微生物学报,2013,53(7):702-709. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2013.07.006.

[16] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995.

[17] 晏爱芬,余丽.1株蛋白酶产生菌的分离及生理特征研究[J].安徽农业科学,2011,39(7):3793-3795. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2011.07.039.

[18] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1992,89(12):5685-5689. DOI:10.1111/j.1753-4887.1981.tb06752.x.

[19] 陈亮,陈明霞,李和阳.一株产脂肪酶芽胞杆菌菌株 SJXYZ 的鉴定[J].安徽农业科学,2018,46(8):108-109. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2018.08.031.

[20] 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.

[21] 梅源,唐佳颖,何惠容,等.霉豆瓣中优势微生物蛋白酶活性测定[J].食品与发酵工业,2017(9):134-140. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.014512.

[22] 王耿,方柏山,张婷婷,等.一株碱性脱毛蛋白酶产生菌的筛选及系统发育分析[J].华侨大学学报(自然科学版),2009,30(3):297-301. DOI:10.11830/ISSN.1000-5013.2009.03.0297.

[23] WEISBURG W G,BARNS S M,PELLETIER D A,*et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology,1991,173(2):697-703. DOI:10.1128/jb.173.2.697-703.1991.

[24] DRANCOURT M,BERGER P,RAOULT D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of a typical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans [J]. Journal of Clinical Microbiology,2004,42(5):2197-2202. DOI:10.1128/JCM.42.5.2197-2202.2004.

[25] 李晓亮,蔡明明,李阳,等.第六次北极科学考察海洋沉积物可培养细菌的多样性分析[J].微生物学通报,2016,43(5):974-983. DOI:10.13344/j.microbiol.china.150875.

[26] MUDARRIS M, AUSTIN B, SEGERS P, *et al.* *Flavobacterium scopthalmum* sp nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus* L)[J]. International Journal of Systematic Bacteriology,1994,44(3):447-453.

[27] 徐晓梅,薛双红,袁俊超,等.2株产低温蛋白酶耐冷菌株的筛选及酶学性质[J].江苏农业科学,2017,45(10):209-213. DOI:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.058.

[28] 刘静,闵航,章骥,等.一株产低温蛋白酶菌株的筛选鉴定及纯酶研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2006,32(3):251-256. DOI:10.3321/j.issn.1008-9209.2006.03.004.

[29] 徐国英,林学政,王能飞,等.产低温蛋白酶极地菌株的筛选及 *Pseudoalteromonas* sp. QI-1 产蛋白酶粗酶性质[J].生物加工过程,2010,8(2):55-60. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2010.02.011.

[30] 莫清珊,张会图,田耀,等.低温蛋白酶产生菌的筛选及其酶学性质的初步研究[J].天津科技大学学报,2015(3):19-23. DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20140077.

(责任编辑:钱筠 英文审校:刘源岗)