

温度和氮源对耐冷蜡状芽孢杆菌 产冷适蛋白酶的影响

史劲松¹, 陶文沂^{1, 2}, 许正宏^{1, 2}, 吴奇凡¹, 奚文芳¹

(1. 江南大学生物工程学院 214036 江苏 无锡)

(2. 江南大学教育部工业生物技术重点实验室 214036 江苏 无锡)

[摘要] 对影响耐冷蜡状芽孢杆菌 SYP-A2-3 合成冷适蛋白酶的主要因素进行了研究, 主要包括培养温度对产酶水平和产酶周期的影响、不同相对分子质量分布的酪蛋白水解物对菌体细胞诱导产酶的差异以及菌体芽孢形成过程与产酶过程的关系等。结果表明通过采取前高后低的变温培养策略可以使菌体在发酵初期快速增殖, 从而提高冷适蛋白酶的产量。粗料氮源预水解可增加相对分子质量较低的氮源水平, 能提高前期的菌体产量。研究认为, 在产酶期间应保持低分子量氮源的低速释放, 使诱导作用得到持续加强并减缓代谢阻遏作用, 避免芽孢的快速形成, 实现产酶期的延长。

[关键词] 蜡状芽孢杆菌, 适冷菌, 诱导和阻遏, 蛋白酶

[中图分类号] Q936, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)04-0077-06

Effect of Temperature and Nitrogen Source on Psychrotrophic *Bacillus Cereus* SYP-A2-3 Production Cold-Adapted Protease

Shi Jinsong¹, Tao Wenyi^{1, 2}, Xu Zhenghong^{1, 2}, Wu Qifan¹, Dou Wenfang¹

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, 214036, Wuxi, China)

(2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, 214036, Wuxi, China)

Abstract The key factors on synthesizing cold-adapted protease with psychrophilic *Bacillus Cereus* SYP-A2-3 were investigated. They mainly included the effect of different culture temperatures on the production course and protease level, the ability to induce protease by the different molecular weight distribution of casein peptide, and the relationship between spores formation and production protease. The optimization control strategy for fermentation was adopted so that protophase culture should be in higher temperature (20℃) in order to increase biomass and that production enzyme should be in lower temperature (15℃) in order to raise protease yield. When coarse nitrogen source was applied in the medium, it should be prehydrolysed to increase concentration of LMWN (lower molecular weight nitrogen). During the course of production protease, the LMWN should be kept slowly releasing to medium in order to strengthen induction and decrease metabolic repression, and that it was important to prolong the course of production protease and to avoid sproutation at a short time.

Key words *Bacillus Cereus*, psychrotrophs, induction and repression, protease

0 引言

冷适微生物(Cold-Adapted Microorganisms)广泛存在于极地、雪山、冰海或海洋深部区域等低温生态系统中, 因其能够产生在低温下具有高效催化活力的冷适酶(Cold-Adapted Enzyme)而成为近年来极端微生物

收稿日期: 2005-03-20.

基金项目: 国家“ 863 ”计划资助项目(2001AA214101).

作者简介: 史劲松, 1971—, 博士研究生, 南京野生植物综合利用研究院高级工程师, 主要从事微生物发酵工程的学习与研究.

E-mail: shijs@163.com

通讯联系人: 陶文沂, 1946—, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物发酵工程的教学与研究. E-mail: wytiao@sytu.edu.cn

万方数据

物(Extremophiles)研究领域中继嗜热菌之后的又一个热点内容,目前在分子进化、能量与物质代谢机制、细胞膜结构以及冷适酶构效关系等方面已开展了深入的研究^[1-6]。冷适蛋白酶在食品加工和洗涤剂中有很高的利用价值,低温下进行肉类嫩化具有对食品风味影响小、加工成本经济的特点,低温洗涤也有对织物影响小、节能等优点,冷适酶在医药、化学化工等领域也有潜在的应用优势^[7,8]。蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* SYP-A2-3)是从中国冰川 1 号雪山分离出来的产冷适蛋白酶的耐冷菌,研究已发现其胞外蛋白酶的合成受培养温度、培养基氮源等因素影响较大,与中温菌的产酶行为存在很多差异^[9],因而在开展发酵优化和控制时,必须结合低温菌的生理特征以及胞外蛋白酶合成和积累的特点进行。由于蛋白酶家族庞大,菌株来源也具有多样性,在酶合成的调控机制方面表现得十分复杂。本文通过研究温度对 *B. cereus* SYP-A2-3 胞外蛋白酶合成的调控、不同分子量分布的氮源对蛋白酶诱导的效果,并探讨了芽孢形成与蛋白酶合成积累的关联性,为进一步开展培养基优化和发酵控制提供条件。

1 材料与方法

1.1 菌株

蜡状芽孢杆菌(*B. cereus* SYP-A2-3),分离自新疆的“中国 1 号冰川”。

1.2 培养基

种子培养基(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 5.0,酵母粉 5.0, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 5.0, pH 7.0。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 10,酵母粉 4.0~酪蛋白 10, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, K_2HPO_4 1.0, pH 7.0。

诱导培养基(g/L):葡萄糖 1.0, $CaCl_2$ 0.2, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 5, pH 7.0, 氮源加入量 1.0 g/L,具体品种根据实验要求使用。

上述培养基配置后于 0.1 MPa 灭菌 20 min。实验生化试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 发酵产酶和菌体诱导产酶

斜面种子活化后接入种子培养基,培养 20 h,按 2% 接种量接入发酵培养基进行产酶培养。摇瓶培养采用旋转式摇床(上海欣蕊, HYG-II 型) 250 mL 三角瓶装 30 mL 培养基,转速为 200 r/min。发酵罐培养采用瑞士比欧公司 Bioengineering 5 L 自控罐,装液量为 3.8 L,转速 400 r/min,通气量为 4 L/min。无特殊说明,培养温度均采用 15℃。

变温培养采用摇瓶方式进行,接种后先在较高的温度下(20℃或 25℃)进行菌体培养,然后分别于培养 4 h、8 h、12 h、16 h、20 h 后转入 15℃摇床培养,继续培养至 48 h。

诱导产酶是先在种子培养基中进行菌体培养,离心获得菌体并经生理盐水洗涤 2 次,取一定量菌体加入诱导培养基,使菌体 OD_{562} 在 15~20,振荡培养 2 h 测定胞外蛋白酶活力。操作温度及所加入的培养基温度均为 15℃。

1.4 测定方法

酶活测定采用改进的紫外法^[9],使用 pH 7.5 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,反应终止液(TCA)配方为 0.11 mol/L 三氯乙酸,0.22 mol/L 醋酸钠,0.33 mol/L 乙酸。稀释酶液 1 mL 与 2 mL 1.2% 酪蛋白液在 35℃反应 30 min 后,使用 2 mL TCA 进行终止(对照样在反应前先加 TCA),10 min 后经滤纸过滤,于 275 nm 测定滤液吸光值(A_{275})。酶活定义为上述条件下,以酪蛋白为底物,以 1 μ g/min 的速率催化产生酪氨酸的酶量为一个蛋白酶活力单位(U)。

菌体浓度以 562 nm 的光密度值(OD_{562})表示,取培养液 1 mL,以生理盐水适当稀释后于 752 分光光度计上 562 nm 测定吸光值 A_{562} 。菌体浓度(OD)表示为: $OD_{562} = N \times A_{562}$,实验通过干燥法测得菌体质量浓度,计算方程为 $y = 0.3261 \times OD_{562} - 0.0069$,方程回归系数 $R^2 = 0.9995$,式中 y 为菌体质量浓度(mg/mL), N 为稀释倍数。

蛋白含量测定采用考马斯亮蓝染色法^[10], α -氨基氮测定采用甲醛滴定法。

1.5 不同聚合度酪蛋白肽的制备^[11-13]

配置 10% 浓度酪蛋白溶液 300 mL, pH 7.5,水解温度 35℃,加入 *B. cereus* SYP-A2-3 蛋白酶,加酶量为 2 000 U/g 酪蛋白,搅拌水解,使用 pH 计监控反应的 pH 变化,滴加 1.0 mol/L NaOH 溶液,使反应体系 pH

维持在 7.5 ,至水解度(*DH*)为 5 时 ,沸水煮 10 min 灭酶. 酪蛋白水解度(*DH*)按照下式进行计算 :

$$DH = \frac{B}{\alpha \cdot h} \times 100\%$$
 式中 *B* 为碱液消耗的摩尔数 ,mol ; α 为 α 氨基酸的平均解离度 ,在具体的 pH 值和温度下 α 值为定值 ,取近似值 1. *h* 为被水解蛋白质肽键的摩尔数 ,mol ,由 $h = \text{酪蛋白质量} \times 8.2 \text{ mmol/g}$ 计算.

酪蛋白水解物经盐酸和三氯乙酸(TCA)选择性沉淀获得的 *S_a*、*S_b*、*S_c* 组分 ,采用截留相对分子质量分别为 3 500、7 000、12 000 的透析膜对 *S_c* 透析 ,取得 *C₁*、*C₂*、*C₃* 组分 ,使用 Superdex G75 凝胶柱在中压层析系统(Pharmacia)上进一步对 *C₂* 组分进行拆分 ,获得 *G₁*、*G₂*、*G₃* 组分.

相对分子质量分布使用高压液相凝胶色谱(TSK-gel)测定 ,流动相为 pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 ,流速 0.8 mL/min ,紫外 280 nm 检测.

2 实验结果

2.1 产酶温度和产酶期

B. cereus SYPA3-2 能在 0 ~ 38℃ 范围内生长 ,最适生长温度 25℃ ,但最适产酶温度为 15℃ ,不同培养温度下产酶期和产酶能力相差较大(表 1). 15℃ 培养达到稳定期需要 40 h 左右 ,相应的 20℃ 和 25℃ 分别为 30 h 和 20 h. 但对于 30℃ 培养 ,培养液中无蛋白酶活检出 ,在对数生长中后期 ,菌体浓度不增加 ,其培养基中有未被利用的酪蛋白 ,呈絮凝性结块 ,表明大分子氮源没有得到有效的降解 ,当小分子氮源利用完后 ,氮源不足导致生长停滞.

表 1 不同温度下产酶水平及产酶期

温度/℃	10	15	20	25	30
产酶期/h	40 ~ 160	20 ~ 60	12 ~ 50	8 ~ 28	/
酶活/(U/mL)	1 050	2 583	2 060	1 430	/
菌浓(<i>OD</i> ₅₆₂)	9.4	21.7	26.8	22.7	16.2

2.2 变温培养

蛋白酶的积累与细胞生物量有关 ,在近于最适温度下进行细胞培养可缩短培养时间 ,获得较高的菌体浓度. 鉴于产酶温度与最适温度相差较大 ,可以采用变温培养方式将细胞培养阶段和产酶阶段分开控制 ,在 20℃ 或者 25℃ 分别预培养一段时间 ,再于 15℃ 下培养至 48 h. 实验表明这种变温措施是有效的 ,20℃ 预培养 16 h ,或 25℃ 预培养 8 h ,产酶水平相应达到 3 230 U/mL、2 980 U/mL ,比 15℃ 恒温培养分别提高了 28.2%、18.7%(表 2). 变温培养的关键是控制前期的培养时间 ,在菌体进入产酶期之前(对数生长前期)必须降低温度 ,延长高温培养时间将引起产酶水平的显著下降.

表 2 变温培养方式对产酶的影响

20℃ 预培养时间/h	4	8	12	16	20
最高产酶/(U/mL)	2 630	2 790	2 820	3 230	2 640
25℃ 预培养时间/h	4	8	12	16	20
最高产酶/(U/mL)	2 870	2 980	2 430	1 900	1 470

* 恒温培养产酶(U/mL) :15℃ 对照 2 520 20℃ 对照 2 150 25℃ 对照 1 520.

2.3 相对分子质量分布不同的酪蛋白肽对胞外蛋白酶的诱导

B. cereus SYP-A2-3 在种子培养基中不产酶 ,但是将菌体细胞置入诱导培养基中 ,可在 30 min 后检测到蛋白酶活力 ,表明蛋白酶的合成受细胞所处的外部环境的影响 ,具有可诱导性. 实验利用培养至 30 h 的菌体细胞 ,重点考察了不同相对分子质量分布的酪蛋白肽对细胞诱导产酶的效果(表 3). 以未经水解的酪蛋白为对照 ,从相对酶活可以看出酪蛋白限制性水解后的 *S_c* 组分诱导效果较好 ,*S_c* 组分的拆分产物 *C₂* 进一步提高了诱导效果 ,而 *C₂* 的凝胶过滤拆分组分 *G₂*、*C₃* 的诱导产酶能力分别比对照酪蛋白提高了 104.1%、124.7% . 根据氨基酸平均相对分子质量 123 计算 ,则最佳诱导的肽类链长为 35 ~ 55 个氨基酸.

单一氨基酸(Glu、Ala、Arg、Leu)为氮源没有诱导作用 ,诱导培养基中的葡萄糖浓度超过 0.3% 时 ,也将起不到诱导作用 ,氨基酸和葡萄糖均表现出阻遏蛋白酶合成作用 ,菌体合成蛋白酶的水平同时受到代谢阻遏和诱导作用的调控.

表 3 相对分子质量分布不同的酪蛋白肽对 SYP-A_{2.3} 诱导产酶比较

I. 沉淀组分	HCl 沉淀组分(S _a)	TCA 沉淀组分(S _b)	未沉淀组分(S _c)
相对分子质量分布	> 25 000	15 000 ~ 25 000	< 15 000
相对酶活/ %	82. 4	144. 2	173. 2
II. 透析组分	C1	C2	C3
相对分子质量分布	< 3 500	3 500 ~ 7 000	7 000 ~ 12 000
相对酶活/ %	116. 7	185. 7	168. 0
III. 凝胶过滤组分	G1	G2	G3
相对分子质量分布	3 500 ~ 4 500	4 500 ~ 5 500	5 500 ~ 7 000
相对酶活/ %	146. 1	204. 1	224. 7

2.4 补加氮源对摇瓶发酵产酶的影响

在摇瓶发酵 40 h 和 48 h ,添加了诱导实验中使用的 C₂ 组分的酪蛋白肽 ,来考察对产酶水平的影响 ,表 4 产酶水平为发酵 52 h 测定的酶活 ,结果表明在 40 h 和 48 h 补加 C₂ 组分的酪蛋白肽均具有一定的产酶促进作用 ,在 40 h 补加 0. 25 g/L 酪蛋白肽后 ,产酶水平提高了 22. 4% ;对于 48 h ,添加了 0. 5 g/L 酪蛋白肽 ,能够提高产酶 13. 3% . 增加添加量并不会进一步提高产酶水平 ,其原因可能是小分子肽或氨基酸的量也同时得到增加 ,形成了对产酶的阻遏. 由于 C₂ 组分酪蛋白肽制备步骤较为复杂 ,因而在批量发酵上直接使用酪蛋白 ,其降解产物中含有小分子肽类物质.

表 4 补加 C₂ 组分对产酶水平的影响

补加浓度/(g/L)	对照	0. 125	0. 25	0. 5	1. 0	2. 0
40 h 补加/(U/mL)	2 850	3 449	3 488	3 465	3 446	3 383
48 h 补加/(U/mL)	2 850	2 968	3 216	3 230	3 229	3 184

2.5 小罐发酵的变温培养和氮源补加

在 5 L 发酵罐中 ,综合运用变温培养和氮源补加策略进行优化发酵 ,主要包括 : (1) 20℃ 预培养 8 h 后以 - 1. 25℃/h 降温至 15℃ (2) 在 36 ~ 48 h 流加 10% 的酪蛋白液 ,流加速度 12. 5 mL/h. 实验结果见图 1 ,产酶高峰在 45 h ,最高酶活达到 4 840 U/mL. 与对照相比 ,产酶高峰提前了 8 h ,酶活提高了 1 100 U/mL.

2.6 发酵过程中氮源水平变化

实验在 5 L 发酵罐中考察了氮源在发酵过程中的变化(图 2) ,在培养 24 h 后 ,发酵液中蛋白质含量已由初始的 12 g/L 降到 3 g/L ,此时细胞处于对数增长前期. α-氨基氮水平可以衡量发酵液中低分子氮源指标 ,产酶期的 α-氨基氮水平在 130 ~ 180 mg/L ,在菌体大量增殖的对数期间略高 ,原因是蛋白酶的大量分泌使培养基中的蛋白质的水解速率和水解程度得到加强 ,α-氨基氮的增加也是菌体大量增值的动力. 在发酵后期 ,α-氨基氮和蛋白质含量均处于较低的水平 ,营养耗竭使菌体大量形成芽孢进入休眠期 ,此时发酵液中的酶量也处于下降阶段 ,细胞合成蛋白酶受到限制.

2.7 产酶期与芽孢形成的关联性

蛋白酶的合成与芽孢形成在时间上几乎是同时启动于对数生长前期 ,蛋白酶开始表达的同时 ,镜检可发现少量细胞开始孕育芽孢 ,当菌体大量形成芽孢时 ,培养液中酶活也达到高峰 ,当芽孢成熟脱落时 ,酶活也开始下降(图 2). 营养菌体形成芽孢的原因源于环境条件的恶化 ,在发酵过程中 ,营养耗竭将导致芽孢的迅速形成 ,此外 ,温度、pH 等因素也对芽孢形成有较大的影响 ,较高培养温度下芽孢形成周期短 ,相应的产酶周期也缩短.

2.8 粗料氮源预水解处理与发酵产酶

对豆粕、大豆粉、米蛋白、玉米浆粉进行预处理均能提高产酶水平 ,其中玉米浆粉提高了 153. 6% ,大

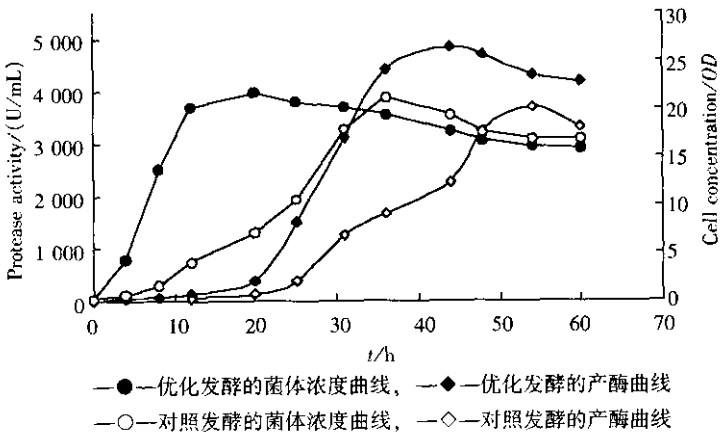


图 1 发酵罐上变温培养和氮源补加生长和产酶情况

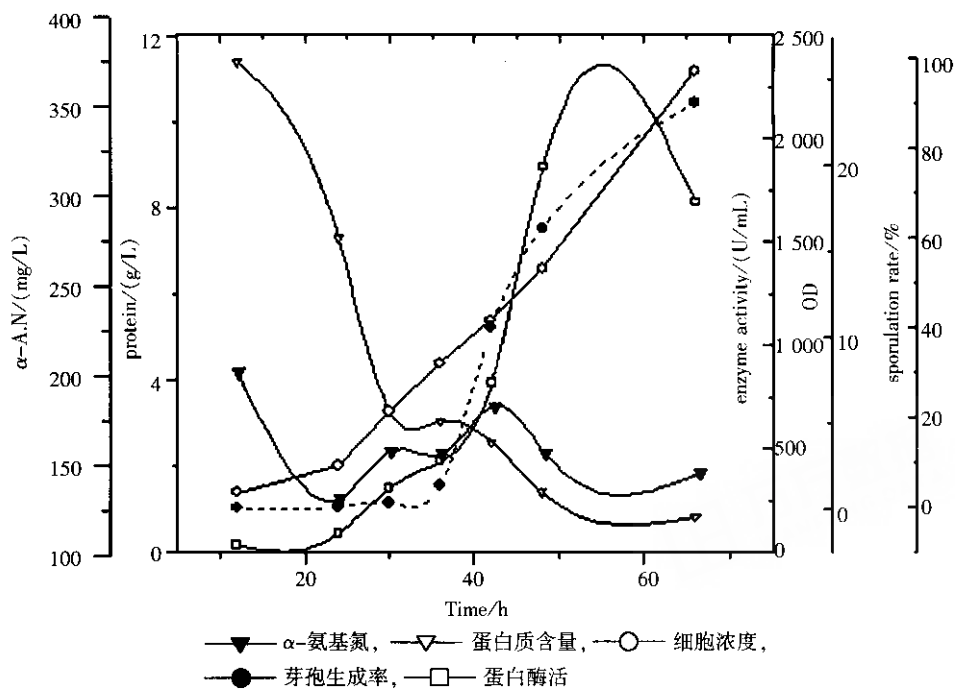


图2 发酵过程中菌体浓度、芽孢形成率、蛋白酶活、胞外氮源的变化

豆粉提高了85.9% ,米蛋白提高了59.6% ,豆粕提高了77.9%(表5) 。在实验条件下 ,处理后的玉米浆粉、大豆粉、豆粕均达到超过了酪蛋白对照组。粗料氮源作为产酶培养基能够降低发酵成本 ,但未经预处理产酶能力较低 ,其原因是粗料中蛋白质与淀粉、纤维素等包裹在一起 ,结构较为严实 ,在发酵过程中 ,很难被水解利用 ,培养过程中 α -氨基氮水平一直很低(35 ~ 60 mg/L) ,粗料氮源预水解后 ,产生了部分可快速利用的小分子氮(α -氨基氮水平在120 ~ 180 mg/L) ,从而有利于菌体的初期生长 ,当菌体蛋白酶开始合成后 ,能进一步对培养基中氮源进行水解 ,提供产酶期间的氮的需求 ,而且由于粗料氮源水解速率比较慢 ,能够使培养体系中低分子氮维持在低水平释放状态 ,避免快速释引起来的阻遏作用 ,并起到持续诱导的效果。预水解处理还使发酵周期大为缩短 ,豆粕、米蛋白和大豆粉均呈现产酶高峰提前现象。

表5 粗料预水解发酵产酶情况

氮源	24 h 产酶情况/(U/mL)		48 h 产酶情况/(U/mL)		60 h 产酶情况/(U/mL)	
	未处理	预水解	未处理	预水解	未处理	预水解
豆粕	120	514	540	2 263	1 140	1 225
米蛋白	239	638	1 047	1 746	1 094	460
大豆粉	263	479	1596	2967	573	681
玉米浆粉	82	101	1 056	2 023	1 394	3 535

3 讨论

长期的低温环境压迫使冷适应菌 SYP-A2-3 生理机制发生了变化 ,尽管在较高的培养温度下仍能够快速生长 ,但蛋白酶分泌能力弱化或丧失了 ,这种行为也出现在 *B. cereus* KCTC3676^[14]、*P. fluorescens* LS107d2^[15]等冷适应菌身上。低温有利于酶的合成 ,但适度提高培养温度能实现生物量的快速积累 ,因而变温培养是对菌体培养和产酶行为的一种优化控制 ,不仅能够获得产酶水平的提升 ,而且能够使产酶期提前。

SYP-A2-3 的胞外蛋白酶属诱导型酶 ,其产生和积累受底物诱导和代谢阻遏双向调节 ,当胞外存在合适的诱导物时 ,细胞合成蛋白酶并向胞外分泌 ,使胞外大分子氮源得到降解和利用 ,但氮源代谢的终末端产物如氨基酸、小分子肽类可阻遏蛋白酶的合成^[16]。大分子蛋白质由于空间位阻原因 ,作为诱导信号物质存在明显的缺陷 ,但其不完全降解产物可能是直接的诱导底物。实验利用不同相对分子质量的肽类物质作为诱导物 ,尽可能地排除了发酵产酶过程中氮源对菌体生长的干扰 ,初步明确了不同聚合度的肽类所提供的诱导信号存在强弱之分。相对而言 ,聚合度较小的肽诱导的酶量较大 ,但当聚合度进一步减少 ,由于受到

万方数据

阻遏机制的调控,细胞分泌的酶量也受到限制.

在蜡状芽孢杆菌中,目前研究认为蛋白酶在芽孢形成后期的细胞蛋白更新中发挥特定作用,并受芽孢形成过程调节^[17,18],对本实验的适冷蜡状芽孢杆菌,从芽孢形成和产酶的时间上看,这两个细胞事件几乎是同步的,芽孢从孕育到脱落的时间受培养温度及营养状况影响,低分子氮水平既调节芽孢形成的速率,也通过诱导和阻遏效应调节酶的合成和积累.因而通过控制低分子氮的释放速度,使培养体系维持在一种亚适量状态,或者在发酵产酶后期,补加少量的营养物质来延长芽孢形成过程,都可望获得蛋白酶的较多积累,需要在发酵优化实践中开展相关的研究.

总之,以对数生长前期为分界点,将发酵过程分为菌体培养期和诱导产酶期,优化控制要根据两个阶段的特点采取措施,前期必须快速获得大量的菌体,可适当采取提高培养温度、增加速效氮源等方法实现,后期需要创造一个良好的产酶环境,在营养供应方面,应保持相对分子质量较低的氮的低速释放,使底物诱导和代谢阻遏的关系得到较好的协调,同时还应控制好pH、温度等环境因素,使菌体处于良好的生理状态,延长芽孢形成过程,使蛋白酶得到较多的积累.

[参考文献]

- [1] Duilio A, Madonna S, Tutino M L, *et al.* Promoters from a cold-adapted bacterium: definition of a consensus motif and molecular characterization of UP regulative elements[J]. *Extremophiles*, 2004, 8(2): 125—132.
- [2] Marshall C J. Cold-adapted enzymes[J]. *Trends Biotechnol*, 1997, 15(9): 359—364.
- [3] Aghajari N, Van Petegem F, Villeret V, *et al.* Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases[J]. *Proteins*, 2003, 50(4): 636—647.
- [4] Nicholas J R. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles[J]. *Extremophiles*, 2000, 4(4): 83—90.
- [5] Hanna-Kirsti S L, Nils P W, Arne O S. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(4): 1039—1049.
- [6] Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, *et al.* Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology[J]. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(3): 103—107.
- [7] 朱非,王珊,周培瑾. 低温酶冷适应的分子机制及其在生物技术中的应用[J]. *微生物学报*, 2002, 42(5): 640—644.
- [8] 杨胜远,陆兆新. 微生物低温碱性蛋白酶的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(4): 93—98.
- [9] 史劲松,吴奇凡,许正宏,等. 中国冰川1号产适冷蛋白酶耐冷菌的分离鉴定及产酶条件[J]. *微生物学报*, 2005, 45(2): 258—263.
- [10] 张龙翔,张庭芳,李令媛,等. 生化实验方法和技术[M]. 2版. 北京:科学出版社,1997.
- [11] 王世润. 酪蛋白的主要组成及其分离技术[J]. *中国乳品工业*, 1991(6): 265—269.
- [12] Pieter W, Robert J. *Dairy Chemistry and Physics*[M]. New York: Wiley Interscience Publication, 1984.
- [13] Bruic G, Roger L, Fauquant J, *et al.* Phosphopeptides from casein-based material[P]. US Pat, 4358465. 1982.
- [14] Sam S K, Young J K, Rhee I K. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674[J]. *Arch Microbiol*, 2001, 175(6): 458—461.
- [15] Burger M, Woods R G, McCarthy C, *et al.* Temperature regulation of protease in *Pseudomonas fluorescens* LS107d2 by an ECF sigma factor and a transmembrane activator[J]. *Microbiology*, 2000, 146(12): 3149—3155.
- [16] Calik P, Bayram A, Ozdamar T H. Regulatory effects of alanine-group amino acids on serine alkaline protease production by recombinant *Bacillus licheniformis*[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2003, 37(2): 165—171.
- [17] Vries Y P, Hornstra L M, Vos W M, *et al.* Growth and sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under defined conditions: temporal expression of genes for key sigma factors[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(4): 2514—2519.
- [18] Kroos, Zhang B, Ichikawa H, *et al.* Control of sigma factor activity during *Bacillus subtilis* sporulation[J]. *Mol Microbiol*, 1999, 31(5): 1285—1294.

[责任编辑:孙德泉]