

紫外线与氯化锂诱变 选育高产乳糖酶米曲霉

刘芳宁¹, 梁 琪¹, 乔海军², 杨 敏², 张 炎¹, 文鹏程¹, 张卫兵^{1,*}

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070;

2. 甘肃农业大学理学院, 甘肃兰州 730070)

摘 要:以产乳糖酶米曲霉(ATCC20423)为出发菌株,通过紫外线和紫外复合氯化锂诱变处理选育高产乳糖酶菌株。利用紫外线辐照诱变得到突变株 UV-15-20 的乳糖酶活力为 114.08U/mL,比出发菌株提高了 49.22%;以紫外线复合氯化锂选育得到突变株 UV-LiCl-38 乳糖酶活力为 121.42U/mL,比出发菌株提高了 58.82%。传代实验表明两个突变株均具有稳定的遗传性。

关键词:米曲霉,乳糖酶,诱变

Breeding of high β -galactosidase producing *Aspergillus Oryzae* by mutation with UV and LiCl

LIU Fang-ning¹, LIANG Qi¹, QIAO Hai-jun², YANG Min²,
ZHANG Yan¹, WEN Peng-cheng¹, ZHANG Wei-bing^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to breed high-yield β -Galactosidase producing strain, *Aspergillus Oryzae* (ATCC20423) was used as the original strain and mutagenized with Ultraviolet (UV) and UV + lithium chloride (LiCl), respectively. After mutagenized by UV, the β -Galactosidase activity of UV-15-20 reached 114.08U/mL, which revealed a 49.22% increase compared with the original strain. A mutant UV-LiCl-38 with high β -Galactosidase activity (121.42U/mL) was obtained by use of UV and LiCl, the β -galactosidase activity of this mutant was 58.82% higher than that by the wild-type. UV-15-20 and UV-LiCl-38 had good hereditary stability after several generations.

Key words: *Aspergillus Oryzae*; β -Galactosidase; mutation

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)01-0155-05

β -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)又称 β -D-半乳糖苷半乳糖水解酶,它能够催化 β -D-半乳糖苷化合物中的 β -D-半乳糖苷键发生水解,还具有转半乳糖苷活性。产乳糖酶微生物种类多样,包括多种细菌、酵母和霉菌^[1]。不同微生物来源的乳糖酶酶学性质差异很大。酵母所产乳糖酶最适 pH 接近中性,被广泛应用于牛乳和乳清中乳糖的水解,但由于是胞内酶,不易提取;细菌乳糖酶最适 pH 接近中性,具有易于发酵、酶的稳定性等优势,但由于安全性问题,在食品工业中的应用受到了限制;霉菌来源的乳糖酶是胞外酶,提取方便,在 pH 为 2.5~5.4 和温度为 50℃ 左右时,相对活力最高,主要用来处理生产干酪后的酸性乳清^[1-3]。目前,乳糖酶在乳品、医药、分析、环境

保护等方面都具有广阔的应用前景,然而较低的生产限制了乳糖酶的工业化生产及应用。通过遗传改良选育高产菌株,是实现乳糖酶高效生产的关键。紫外线和氯化锂是一种操作简便、效果较好的诱变方法,已经成功应用于多种产酶霉菌的菌种选育^[4-5]。本研究以米曲霉(ATCC20423)为出发菌株,采用紫外辐照和紫外复合氯化锂对其进行诱变选育,以期选育出高产乳糖酶的突变株,为乳糖酶的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

米曲霉菌株(*Aspergillus Oryzae*) 编号 ATCC20423;无水氯化锂 天津市凯信化学工业有限公司,分析纯;邻硝基苯 β -D-半乳糖苷(ONPG) 北京经科宏达生物技术有限公司,分析纯;乳糖 上海中泰化学试剂有限公司,分析纯;麸皮 兰州市安宁区桃海市场,市售。

PDA 培养基:马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 20g,蒸馏水 1000mL, pH 自然;诱变培养基:马铃薯

收稿日期:2012-06-15 * 通讯联系人

作者简介:刘芳宁(1987-),女,硕士研究生,研究方向:乳品微生物。

基金项目:甘肃省科技重大专项(1002FKDA046);甘肃省农业生物技术专项(GNSW-2010-17);兰州市政研产合作支撑计划项目(2011-1-105)。

200g,葡萄糖 20g,氯化锂 5~22.5g,琼脂 20g,蒸馏水 1000mL,pH 自然;初筛培养基:乳糖 1g,(NH₄)₂SO₄ 1g,KH₂PO₄ 1.5g,琼脂 2g,称取 2g 麸皮,加入 100mL 蒸馏水,煮沸 10min,用四层纱布过滤,滤液补水至 100mL,pH 调至 4.8,121℃ 下灭菌 20min 后冷却到 60℃,加入微滤除菌的 0.1% 的 ONPG 溶液。摇匀后用灭菌的滴管在超净台上将其加入灭菌的 1.0mL 的离心管中,置于冰箱冷藏备用;固态发酵培养基:乳糖 10g,(NH₄)₂SO₄ 10g,KH₂PO₄ 15g,蒸馏水 1000mL 配置成溶液,调整 pH4.8,然后将麸皮粉与上述溶液按 1:1.1 (w/v) 的比例混合,121℃ 下灭菌 20min;pH4.5 的醋酸缓冲液:把 50mL 的 2mol/L 冰醋酸与 11.3mL 的 4mol/L 的氢氧化钠溶液混合,定容至 1000mL,并用 2mol/L 的冰醋酸、4mol/L 的氢氧化钠调整溶液 pH 到 4.5 ± 0.5。

HH-SZ65 型数显恒温水浴锅 北京医疗设备厂;YZ-280 型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司;UV-5100 型紫外-可见分光光度计 上海分析仪器有限公司;HZQ-X100 型振荡培养箱 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;SW-CJ-ZFD 型双人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司;PHS-3C 型数显酸度计 上海精密科学仪器有限公司;DHP-9162 型电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公司;TGL-20M 型高速冷冻离心机 长江湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 出发菌株的活化 将米曲霉菌株接种于 PDA 斜面进行活化,30℃ 培养 4~5d,待长满黄绿色孢子后备用。

1.2.2 单孢子悬液的制备 取培养好的斜面,用无菌生理盐水洗脱孢子后转移至装有玻璃珠的无菌锥形瓶中,充分摇动使孢子散开,用带脱脂棉的无菌漏斗过滤除去菌丝得到孢子悬液,将孢子浓度调整到 10⁶ 个/mL。

1.2.3 紫外诱变处理 取 5mL 孢子悬液置于无菌的直径 6cm 的平皿中,在磁力搅拌作用下距 30W 紫外灯 30cm 处分别照射 7、9、11、13、15、17、19、21min,对每个处理进行梯度稀释,取 0.1mL 涂布于平板培养基上,立即用黑布将平板包好,30℃ 避光恒温培养 4d^[6],计数并测定菌株酶活,计算致死率和正突变率。

1.2.4 紫外与氯化锂复合诱变 将紫外诱变后的孢子悬液涂布于含 0.5%、0.75%、1.00%、1.25%、1.5%、1.75%、2.00%、2.25% 的氯化锂的诱变培养基平板上,30℃ 避光培养 4d^[7-8],计数并测定菌株酶活,计算致死率和正突变率。

致死率(%) = (未处理平板菌落数 - 处理平板菌落数) / 未处理平板菌落数 × 100

正突变率(%) = 乳糖酶活力提高的菌落数 / 诱变后长出的菌落总数 × 100

1.2.5 突变株的初筛 将诱变后长出的不同形态特征的菌落接种到初筛培养基中,30℃ 培养 3d。向初筛小管中喷洒 10% Na₂CO₃ 溶液,静置数分钟,挑取颜色较黄小管的菌株,依次转接保存斜面,30℃ 培养

至孢子成熟,于冰箱 4℃ 保藏^[9]。

1.2.6 突变株的复筛 将初筛得到的菌株活化后,接种至固态发酵培养基,30℃ 培养 6d,在室温下加入 5 倍体积 pH4.5 的醋酸缓冲液 180r/min 振荡 1h,然后用三层纱布过滤,收集滤液,在 4℃、10000r/min 条件下离心 15min,取上清液测定乳糖酶活力,筛选出高产菌株^[10]。

1.2.7 突变株遗传稳定性的测定 选取诱变后得到的乳糖酶产量较高的突变株连续传代 8 次,进行固态发酵培养后测定乳糖酶活力,判断其遗传稳定性。

1.2.8 出发菌株和突变株的产酶曲线 以出发菌株和突变株为待测菌株,挑取培养 4d 的斜面孢子 3 环接种于固态发酵培养基中,30℃ 恒温培养,每隔 0.5d 测定其酶活力,并绘制产酶曲线。

1.2.9 出发菌株和突变株的形态特征比较 将出发菌株 ATCC20423 和突变株点植于培养基进行培养,30℃ 培养后,观察菌落形态、菌丝体颜色等。

1.2.10 乳糖酶活力的测定 将在 45℃ 下水浴 10min 的粗酶液 0.5mL,加入已预热至 45℃ 的 1.5mL 的含 50mmol/L ONPG 醋酸缓冲液(pH4.5),在 45℃ 下水浴 10min,然后立即加入 3.0mL 0.5mol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应^[11]。于 420nm 处测定 OD 值,测定 3 次取平均值。以醋酸缓冲液作为空白。一个酶活力单位(U)定义为在上述条件下,每分钟水解 ONPG 生成 1μmol ONP 所需的酶量。

用已知浓度的 ONP 溶液做标准曲线,根据 ONP 的浓度 C 对应的 OD 值,利用最小二乘法建立回归方程:OD = 4.5907C + 0.021,相关系数 R = 0.9992。

酶活力计算公式:

$$\text{酶活力 } X = \frac{C \times 5 \times N}{0.5 \times 10}$$

式中,X 为乳糖酶活力(U/mL);C 为标准曲线中对应的 ONP 的浓度(μmol/mL);N 为粗酶液稀释倍数;10 为反应时间(min);5 为反应体系的总体积(mL);0.5 为反应体系加入粗酶液的体积(mL)。

2 结果与分析

2.1 紫外线诱变剂量的确定

出发菌株经紫外线照射不同时间的致死率和正突变率如图 1 所示。由图 1 可以看出,随着照射时间的延长,致死率逐渐增加。当处理时间为 13min 时,致死率为 73.49%,当处理时间为 21min 时,致死率为 94.9%。虽然总体菌株的减少减轻了筛选的负担,但得到的总数如果太少,选择的余地就会太小。而且正突变株也并不是随着致死率的增加,成严格的线性关系。采用紫外线进行诱变时,致死率达到 70%~80% 时,产生正突变的几率较高,有利于进一步筛选^[12],所以对致死率在 60%~90% 的诱变剂量的正突变率进行测定。当紫外线处理时间为 15min 时,致死率为 81.90%,正突变率为 5.41%,达到最大值。因此,本实验采用紫外诱变时间为 15min 的诱变剂量进行诱变处理。

2.2 紫外线复合氯化锂诱变剂量的确定

氯化锂单独起诱变作用不明显,但与紫外线复

表1 紫外照射诱变筛选结果
Table 1 The screening result of UV treatment

编号	酶活力 (U/mL)	初筛小管变色情况	编号	酶活力 (U/mL)	初筛小管变色情况
ATCC20423	76.45	+	UV-15-20	114.08	+++
UV-15-6	90.12	++	UV-15-21	96.07	++
UV-15-9	88.35	++	UV-15-22	83.5	++
UV-15-14	86.11	++	UV-15-24	88.12	++
UV-15-15	91.58	++	UV-15-32	85.29	++
UV-15-18	106.3	+++	UV-15-35	102.96	+++
UV-15-19	86.42	++	UV-15-37	103.91	+++

注: + 表示黄色较浅, ++ 表示黄色较深, +++ 表示黄色深, 表2 同。

表2 紫外照射复合氯化锂诱变筛选结果
Table 2 The screening result of UV + LiCl treatment

编号	酶活力 (U/mL)	初筛小管变色情况	编号	酶活力 (U/mL)	初筛小管变色情况	编号	酶活力 (U/mL)	初筛小管变色情况
ATCC20423	76.45	+	UV-LiCl-17	91.63	++	UV-LiCl-37	90.23	++
UV-LiCl-1	90.83	++	UV-LiCl-27	101.37	+++	UV-LiCl-38	121.42	+++
UV-LiCl-7	91.61	++	UV-LiCl-33	88.29	++	UV-LiCl-42	91.17	++
UV-LiCl-8	93.38	++	UV-LiCl-34	104.88	+++	UV-LiCl-44	93.34	++
UV-LiCl-10	90.21	++	UV-LiCl-35	94.78	++	UV-LiCl-50	94.73	++

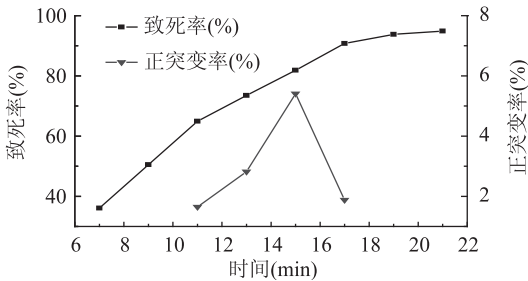


图1 紫外照射对菌株致死率及正突变率的影响
Fig.1 Effects of UV treatment on death rate and positive mutation rate

合诱变时可以明显提高诱变效果, 这表明氯化锂起着促诱变作用^[4]。出发菌株经紫外线照射 15min 复合氯化锂诱变的致死率和正突变率如图 2 所示, 致死率在 LiCl 质量浓度为 1.25% 范围内递增, 超过该浓度后则上升趋势缓慢, 当 LiCl 质量浓度为 2.25% 时, 致死率为 97.68%。正突变率在 LiCl 质量浓度较低的条件不断增大, 当 LiCl 质量浓度为 1.5% 时最大, 为 6.03%, 此时致死率为 83.68%, 因此选择 1.5% 的 LiCl 溶液作为紫外复合氯化锂的促诱变剂。

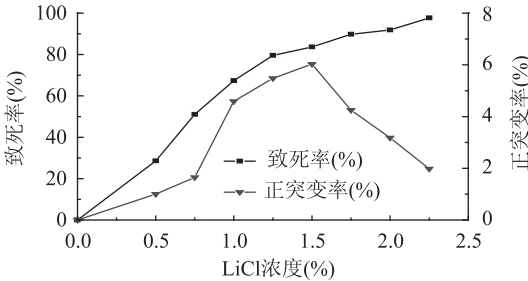


图2 紫外照射复合氯化锂对菌株致死率及正突变率的影响
Fig.2 The effect of UV + LiCl treatment on death rate and positive mutation rate

2.3 紫外照射诱变的筛选结果

通过对米曲霉 (ATCC20423) 的孢子进行多次紫

外照射诱变后, 经初筛后共获得 13 株突变株, 突变株在初筛小管中颜色变化情况和复筛测定结果见表 1。相对出发菌株, 这 13 株突变株的初筛小管颜色较深, 其中突变株 UV-15-18、UV-15-20、UV-15-35、UV-15-37 的初筛小管颜色加深最明显。从酶活力测定结果来看, 13 株突变株酶活力均比出发菌株增大。其中 UV-15-20 的增幅最大, 比出发菌株提高了 49.22%。

2.4 紫外照射复合氯化锂诱变的筛选结果

通过对米曲霉 (ATCC20423) 的孢子进行多次紫外照射复合氯化锂诱变后, 经初筛后共获得 14 株突变株, 突变株在初筛小管中颜色变化情况和复筛测定结果见表 2。相对出发菌株, 这 14 株突变株的初筛小管颜色较深, 其中突变株 UV-LiCl-27、UV-LiCl-34、UV-LiCl-38 的初筛小管颜色加深最明显。从酶活力测定结果来看, 14 株突变株酶活力均比出发菌株增大。其中 UV-LiCl-38 的增幅最大, 比出发菌株提高了 58.82%。

2.5 突变株的遗传稳定性

对产乳糖酶活力高的突变株 UV-15-20 和 UV-LiCl-38 连续传代 8 代, 进行遗传稳定性实验, 其结果见表 3 和表 5, 方差分析结果分别见表 4 和表 6。

表4 突变株 UV-15-20 传代实验方差分析

Table 4 Variance analysis of generation test of mutant UV-15-20					
变异来源	平方和	自由度	均方	F	显著性 (p)
组间	0.317	7	0.045	0.634	0.722
组内	1.145	16	0.072		
合计	1.462	23			

由表 3 和表 5 可以看出, 突变株 UV-15-20 不同代菌株酶活力变化范围为 113.74~114.53U/mL, 变化最大差值为 0.79U/mL。突变株 UV-LiCl-38 不同代菌株酶活力变化范围 120.97~121.99U/mL, 变化最大

表3 突变株 UV-15-20 不同代次的乳糖酶活力(U/mL)

Table 3 β -Galactosidase enzyme activity of mutant UV-15-20 of different generation(U/mL)

代数 UV-15-20	1	2	3	4	5	6	7	8
1	114.38	114.47	114.43	114.38	114.53	114.36	114.52	114.46
2	113.82	114.21	113.74	114.28	114.05	114.52	114.05	114.13
3	113.97	114.52	114.44	113.74	114.44	114.21	114.44	114.36

表5 突变株 UV-LiCl-38 不同代次的乳糖酶活力(U/mL)

Table 5 β -Galactosidase enzyme activity of mutant UV-LiCl-38 of different generation(U/mL)

代数 UV-LiCl-38	1	2	3	4	5	6	7	8
1	121.42	121.23	121.45	121.57	121.37	121.62	121.03	121.32
2	121.21	120.97	121.21	121.99	121.52	121.75	121.29	121.52
3	121.83	121.29	121.60	121.44	121.13	121.29	121.44	121.67

差值为 1.01U/mL。通过方差分析(表 4 和表 6)可知,突变株 UV-15-20、UV-LiCl-38 乳糖酶活力组间差异的 p 值都大于 0.05,说明传代次数对两个突变株乳糖酶活力变化影响不显著,表明突变株 UV-15-20、UV-LiCl-38 具有稳定的遗传性。

表6 突变株 UV-LiCl-38 传代实验方差分析

Table 6 Variance analysis of generation test of mutant UV-LiCl-38

变异来源	平方和	自由度	均方	F	显著性(p)
组间	0.570	7	0.081	1.556	0.219
组内	0.837	16	0.052		
合计	1.407	23			

2.6 出发菌株和突变株的产酶曲线

突变株与出发菌株的产酶曲线见图 3。由图 3 可以看出,突变株 UV-15-20 与出发菌株 ATCC20423 的发酵产酶曲线类似,发酵 1.5d 后酶活迅速增加,第 6d 达到产酶高峰,此时,ATCC20423、UV-15-20 的酶活力分别为 76.45、114.35U/mL,此后酶活力开始下降,在发酵过程中突变株 UV-15-20 的酶活力普遍高于出发菌株。在发酵过程中,突变株 UV-LiCl-38 从第 5d 开始,产酶速率增加较快,第 6d 酶活力为 120.72U/mL,达到产酶高峰。

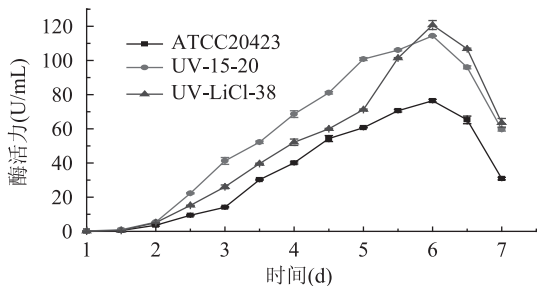


图3 ATCC20423、UV-15-20 和 UV-LiCl-38 的乳糖酶活力曲线

Fig.3 Fermentation curve of lactase from ATCC20423、UV-15-20 and UV-LiCl-38

2.7 出发菌株和突变株的形态特征比较

将出发菌株 ATCC20423 和突变株 UV-15-20、UV-LiCl-38 点植于 PDA 培养基进行培养,30℃ 培养后,观察菌落形态、菌丝体颜色等。菌落形态如图 4 所示。培养 2d 后,可以观察到出发菌株和两株突变

株菌落中央的菌丝顶部均长出少量绿色孢子。培养 4d 后,出发菌株的菌落直径为 3.8cm,UV-15-20 的菌落直径为 3.2cm,UV-LiCl-38 的菌落直径为 4.5cm;出发菌株和突变株 UV-15-20 已经开始大量产生孢子,UV-LiCl-38 产生的孢子量较少。培养 6d 后,整个菌落被绿色的孢子覆盖,菌落边缘均为白色菌丝,菌丝体呈白色,菌落质地绒毛状,菌落高度丘状隆起。

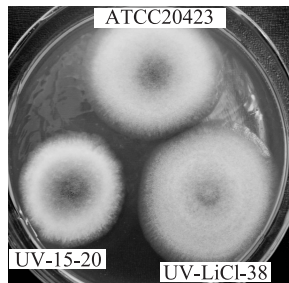


图4 ATCC20423、UV-15-20、UV-LiCl-38 的菌落形态

Fig.4 The characteristics of colony of ATCC20423、UV-15-20、UV-LiCl-38

3 讨论

ONPG 离心小管法有效地指导了本实验的复筛工作。目前,文献报道的有关乳糖酶产生菌的筛选方法主要有:X-gal 平板法^[13]、ONPG 孔板分离法^[14]、ONPG 离心小管法^[15]。X-gal 灵敏度高,会导致初筛工作量大且准确率低^[16];霉菌菌落较大,X-gal 价格昂贵,采用平板分离法会加大平板的用量,同时也导致 X-gal 用量增加。孔板分离法和离心小管法以 ONPG 为产酶指示剂,与 X-gal 指示剂法相比,可以避免灵敏度和价格高的问题,孔板分离法易受小孔之间颜色互相干扰、菌株容易污染的影响,离心小管法采用离心小管作为培养小室可以解决污染,颜色干扰的问题^[17]。

本实验将紫外线和氯化锂结合使用,诱变效果较好,其乳糖酶活力比出发菌株提高了 58.82%,比使用紫外照射诱变获得的产乳糖酶能力增加幅度最大的突变株 UV-15-20 提高了 9.6%。乳糖酶产量提高与多种因素有关,除了菌种自身的遗传改造外,发酵条件的优化对产酶也有重要的影响^[18]。通过发酵培养基和发酵条件的优化来提高产酶量有待进一步研究。

4 结论

4.1 通过紫外照射对米曲霉进行诱变实验,确定了最佳紫外照射时间为 15min;经紫外诱变后,筛选得到一株产乳糖酶能力增加幅度最大的突变株 UV-15-20,乳糖酶活力为 114.08U/mL,比出发菌株提高了 49.22%。

4.2 通过紫外线复合氯化锂对米曲霉进行诱变实验,确定了最佳紫外照射时间为 15min,1.5% 的 LiCl 溶液作为紫外复合氯化锂的促诱变剂,经紫外复合氯化锂诱变后,经筛选得到一株产乳糖酶能力增加幅度最大的突变株 UV-LiCl-38,乳糖酶活力为 121.42U/mL,比出发菌株提高了 58.82%。

4.3 对突变株 UV-15-20 和 UV-LiCl-38 进行遗传稳定性实验,结果表明菌株 UV-15-20、UV-LiCl-38 具有稳定的遗传性。

参考文献

- [1] Oliveira C, Pedro M R G, Domingues L, et al. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 600-609.
- [2] Parmjit S P, Reeba P, Ram S S, et al. Microbial production, Immobilization and applications of β -D-galactosidase [J]. *Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, 81(4): 530-543.
- [3] Qayyum H. β -Galactosidases and their potential applications: a review [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010, 30(1): 41-62.
- [4] 朱国胜,刘作易,雷邦星,等.被孢霉 γ -亚麻酸高产菌株选育[J]. *菌物学报*, 2005, 24(1): 85-92.
- [5] 余明洁,田丰伟,范大明,等.高产 ε -聚赖氨酸白色链霉菌的复合诱变选育研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(7):

99-104.

- [6] 张春玲.紫外线与亚硝基胍复合诱变选育高产海藻糖菌株的研究[J]. *食品科学*, 2010, 30(21): 188-191.
- [7] 卢燕云,林建国,李明.复合诱变选育酸性蛋白酶高产菌株[J]. *中国酿造*, 2009(1): 49-51.
- [8] 周波,王菊芳,吴振强,等.高产红曲黄色素菌株的选育[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(12): 1909-1914.
- [9] 李宁,贾英民,祝彦忠.黑曲霉乳糖酶高产菌株的诱变选育[J]. *中国食品学报*, 2006, 5(6): 54-58.
- [10] Nizamuddin S A, Sridevi G, Narasimha. Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2008, 7(8): 1096-1100.
- [11] Michael J B, Matti Linko V T T. Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation [J]. *Journal of Biotechnology*, 1990, 16(1-2): 57-66.
- [12] 何国庆,贾英明.食品微生物学[M].北京:中国农业出版社, 2002: 188-193.
- [13] Liu Y, Shi Y W, Wang X Q. Isolation and identification of a strain producing cold-adapted β -galactosidase, and purification and characterisation of the enzyme [J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2008, 26(4): 284-290.
- [14] 李玉强.丝状真菌 β -半乳糖苷酶的研究[D].天津:天津轻工业学院, 2000.
- [15] 杜海英,于宏伟,韩军,等.原生质体诱变选育乳糖酶高产菌株[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(6): 48-51.
- [16] 李兴峰.糖酶高产菌株分离筛选、发酵产酶及酶学性质的研究[D].保定:河北农业大学, 2004.
- [17] 李兴峰,贾英民,檀建新,等.乳糖酶高产菌株筛选及酶活测定方法的研究[J]. *中国食品学报*, 2003(增刊): 47-52.
- [18] Rowlands R T. Industrial strain improvement: Mutagenesis and random screening procedures [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1984, 6(1): 3-10.

(上接第 154 页)

- chromatography with electron impact - mass spectrometric detection [J]. *lipids*, 2001(36): 851-856.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
 - [14] D Spellman, E McEvoy, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis [J]. *International Dairy Journal*, 2003, 13(6): 447-453.
 - [15] 钱方,邓岩,王凤翼,等.蛋白酶及其大豆蛋白水解物苦味的研究[J]. *大连轻工业学院学报*, 2009, 19(3): 182-186.
 - [16] 吴建中,赵谋明,宁正祥,等.双酶法生产低苦味大豆多

肽研究[J]. *食品工业科技*, 2003, 24(4): 24-27.

- [17] 李和平,蔡凤英,刘来亭,等.中性蛋白酶水解大豆分离蛋白的工艺优化[J]. *粮油食品科技*, 2009, 17(5): 15-18.
- [18] 任为聪,程建军,张智宇,等.酶活性对高温变性豆粕溶解性的影响[J]. *食品科学*, 2010, 21(31): 139-144.
- [19] 刘静,张光华.蛋白酶联合水解大豆蛋白制备小分子肽的研究[J]. *食品工业*, 2010(4): 26-29.
- [20] 黄建超,张洪,黄整.枯草杆菌蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J]. *食品工业*, 2002(3): 13-15.
- [21] 刘艳秋.大豆多肽生产工艺的优化及其生物活性研究[D].长春:吉林农业大学, 2004: 24-32.
- [22] Marque Mcz, Vazquez M A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis [J]. *Process Biochem*, 1999, 35: 111-117.