

一株产低温蛋白酶菌株的筛选、鉴定及生长特性的研究

张晓燕,古丽娜孜,库米拉,陈卫林,王小标,杨静,王雪薇,韩艳鹏,武运*
(新疆农业大学食品科学与药学学院,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:以新疆阿勒泰地区的冻土为原材料,采用平板分离法初筛,测蛋白酶活性法复筛,筛选出9株低温蛋白酶产生菌株,其中菌株 A₂₉-2 蛋白酶活性最高,为 31.88U/mL,且该菌在初始 pH 7.0,NaCl 质量分数为 1.00%,22℃ 条件下繁殖量最大。通过形态学观察、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列鉴定,鉴定为:该菌属于沙雷氏菌(*Serratia* sp.),该菌株所产的蛋白酶在 4℃ 条件下保存 48h,酶活力基本保持不变,表明该低温耐冷菌所产的蛋白酶为低温酶。

关键词:低温蛋白酶,筛选鉴定,生长特性

Screening, identification and growth characteristics of a low-temperature proteinase producing strain

ZHANG Xiao-yan, GU Li-nazi, KU Mi-la, CHEN Wei-lin, WANG Xiao-biao,
YANG Jing, WANG Xue-wei, HAN Yan-peng, WU Yun*

(College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: Through the plate separation and the proteinase activity determination, nine low-temperature proteinase producing strains were obtained from the permafrost in the region of Altai, Xinjiang, in which the strain A₂₉-2 had the highest proteinase activity, reaching to 31.88U/mL. The growth of A₂₉-2 reached the maximum level under the condition of initial pH 7.0, mass fraction of NaCl 1.00%, temperature 22℃. Based on the morphological observation, physiological and biochemical identification and 16S rDNA sequence analysis, the strain A₂₉-2 was identified as *Serratia* sp.. The activity of proteinase produced by A₂₉-2 remained mostly unchanged after 48h of stored at 4℃. The results indicated that proteinase produced by cold-adapted strains was low-temperature enzyme.

Key words: low-temperature proteinase; isolation and identification; growth characteristics

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)05-0145-05

生活在低温环境下的微生物称为低温微生物,主要分为嗜冷菌(*psychrophiles*)和耐冷菌(*psychrotrophs*)两类,前者是指在 0℃ 可生长繁殖,最适温度不超过 15℃,最高温度不超过 20℃ 的细菌、真菌和藻类等微生物^[1];后者是指在 0~5℃ 可生长繁殖,最适生长温度可达 20℃ 以上的微生物。低温微生物能够在低温条件下产生一些具有较高催化效率的低温酶,来维持细胞新陈代谢的正常运行^[2]。

目前,对低温蛋白酶的研究主要集中在从极地、冰川、雪山、深海等长年极冷环境选育产酶的冷适微生物、通过化学诱变和物理诱变筛选高产低温蛋白酶菌株^[3]、冷适蛋白酶提纯及酶学特性研究^[4]、从分子水平解析冷适机制并进行化学修饰保护酶的热稳定性^[5]。低温蛋白酶具有低温易反应,高效活力,热损失少等优点,因此,在食品、环境修复、化妆品、医药等领域有着中温蛋白酶无法比拟的优越性^[6-7]。

对于陆地常冷环境冻土、高海拔地区产冷适蛋白酶菌株鲜有报道。本文基于新疆冻土资源充裕,以新疆阿勒泰进山口植物根际冻土为材料,旨在应用微生物发酵法筛选产低温蛋白酶菌株,筛选出一株产冷适蛋白酶的菌株,16S rDNA 鉴定为沙雷氏菌(*Serratia* sp.),这为冷适蛋白酶的进一步提取纯化、研究酶学特性奠定基础,为开发新疆特色果蔬加工低温酶制剂提供理论与技术支持,为新疆丰富的果蔬加工工业提供方便、高效、快捷的非热加工方式,来保持果蔬及果蔬制品特有的风味,色泽,营养。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

土样采自新疆阿勒泰进山口,采集时间是 2012 年 3 月,采集时环境温度为 0~10℃。将土样置于无菌铝盒中,做好标记,放置保温箱中当天运回,-20℃ 保存备用;ZP301 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DL2000 Plus DNA Marker、ZT201 2 × Taq PCR MasterMix(含染料)、10mg/mL EB 染色液 北京庄盟国际生物基因科技有限公司;primer1:(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') primer2:(5'-AAG

收稿日期:2013-08-30 * 通讯联系人

作者简介:张晓燕(1988-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

基金项目:自治区科技支疆项目(201191238)。

GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') 华大基因;革兰氏染色液^[8]、1mol/L pH8.0 Tris-HCl、20mg/L 蛋白酶 K 上海百祥生物科技有限公司;10mg/mL 溶菌酶 北京百泰克生物技术有限公司;50 × TAE (Tris-乙酸)、1% 溴酚蓝指示剂 北京索莱宝科技有限公司;0.5 μg/mL EB 染色液^[9];液体富集培养基 葡萄糖 1.00%, 蛋白胨 0.50%, 酵母浸粉 0.50%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, K₂HPO₄ 0.10%, NaCl 1.00%, Na₂CO₃ 1.00%, pH 7.2; LB 培养基 蛋白胨 1.0%, 酵母浸粉 0.5%, NaCl 1.0%, (固体加 2% 的琼脂), pH 7.2; 选择培养基 酵母浸粉 0.1%, NaCl 1.0%, 酪蛋白 2.0%, 琼脂 2.0%, pH 7.2。培养基均在 121℃ 灭菌 20min 后, 待用。

LD2X-30KA 立式电热压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; HR40-II A2 生物安全柜 青岛海尔特种电器有限公司; DHP-9162 电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公司; DZKW-D-2 电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器厂; XSP-2CA 生物显微镜 Motic 实业集团有限公司; FA2104N 分析天平 上海民桥精密科学仪器有限公司; THZ-98A 恒温振荡箱 上海一恒科学仪器有限公司; 050-810Tgradient48 PCR 扩增仪 德国 Biometra 公司; DYY-7B 电泳仪 北京六一仪器厂; JY04S 凝胶成像仪 北京君意东方电泳设备有限公司; MiniSpin 离心机 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株驯化 在容积 100mL 的三角瓶内装 50mL 生理盐水, 放几颗玻璃珠, 121℃ 灭菌 20min, 冷却后在无菌操作台上, 将土样加到无菌生理盐水中, 制成 1% 土壤悬浮液, 摇匀, 待用。(注意: 每隔 20min 震荡一次, 震荡数次充分混匀后, 在无菌操作台上, 静置 30min)

在 500mL 三角烧瓶内装 50mL 液体富集培养基, 在 121℃ 灭菌 20min 后冷却, 在超净工作台上准确移取 5mL 上述 1% 的土壤悬浮液, 加入到三角烧瓶中, 在 20℃ 200r/min 培养 1 天, 待用。

1.2.2 产低温蛋白酶菌株的初筛 在无菌操作台上, 分别取驯化好的菌悬液 0.5mL, 加入到 4.5mL 无菌生理盐水中, 用梯度稀释法得到不同稀释度的稀释液, 即 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷。每个稀释度做两个平皿, 分别移取 0.1mL 的菌液, 移入凝固干燥后的固体初筛培养基平皿中, 用涂布棒涂匀, 在 20℃ 的培养箱中恒温培养 24~48h, 观察有无透明圈出现, 将初筛得到的产酶菌株, 挑单个菌落, 在选择培养基上点样, 20℃ 培养 24~48h 后, 加入 10% 的 TCA 终止反应, 测量菌落直径以及透明圈直径。每个菌株做三个平皿, 平行测量三次, 取平均值。在菌落边缘可看到透明圈的菌株即为要筛选的菌株。

1.2.3 产低温蛋白酶菌株的复筛 蛋白酶活力的测定: 按照国标 GB/T23527-2009 规定的福林酚显色法 (Folin) 测酶活进行菌株的复筛, 蛋白酶活性定义: 在 pH7.0 和 40℃ 温度条件下, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸, 定义为一个蛋白酶活力单位。同一个样

品测三次, 取平均值。

1.2.4 产低温蛋白酶菌株鉴定 用肉眼观察平板上单个菌落的颜色、大小、形状等特征, 记录; 再用革兰氏染色法观察菌株的显微镜形态, 按照文献^[10]对菌株进行初步鉴定。按照文献^[11-12]进行菌株生理生化鉴定, 通过李远^[13]等的方法扩增菌株的 16S rDNA, 扩增成功的 PCR 产物, 送至北京六合华大公司测序, 获得的测序结果递交 GenBank 数据库中 Blast, 进行相似同源性分析, Maximum likelihood 法绘制系统发育树, BOOTSTRAP 分析法, 选取重复 1000 评估树的准确性。

1.2.5 菌株生长曲线及产酶曲线的绘制 将菌株接入液体培养基中, 在 22℃ 的摇床中 150r/min 进行培养, 通过连续测定 (每隔 2h) 液体培养基中细菌的 OD_{600nm} 吸光值及酶活力, 确定菌株生长状况及产酶情况, 绘制生长曲线和产酶曲线。

1.2.6 菌株 A₂₉-2 生长特性的初步研究 将活化好的种子液以 1% 的接种量接入液体培养基中, 通过连续测定液体 OD_{600nm} 吸光值, 研究菌株在 4、18、20、22、25、28、30、37℃ 下的生长情况。测定菌株在初始 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 及质量分数 0.00%、0.25%、0.50%、1.00%、2.00%、4.00%、8.00% 的 NaCl 中 22℃ 培养 24h 后的生长量。

2 结果与分析

2.1 产低温蛋白酶菌株的筛选

通过平板分离初筛及复筛方法, 在 20℃ 培养条件下恒温孵育 48h 后加入 10% 的 TCA 溶液终止反应, 从植物根际土壤中筛选出 9 株产低温蛋白酶菌株, 表 1 是水解透明圈 d₁ 与菌落直径 d₂ 测量结果。

从图中可以看出, 菌株 A₂₉-2 和 A₂₉-3 透明圈与菌落直径之比 d₁/d₂ 的值均大于 3.00^[14], 后续工作中测得菌株 A₂₉-2 和 A₂₉-3 的酶活力依次是 31.88U/mL 和 7.04U/mL, 说明透明圈的大小与酶活力的大小成正相关, 故此方法可用于筛选产低温蛋白酶菌株^[15]。菌株 A₂₉-2 的酶活力较大, 作为后续工作的研究对象。

表 1 菌株筛选的结果

Table 1 Results of strains screening

菌株	透明圈直径 d ₁ (mm)	菌落直径 d ₂ (mm)	透明圈与菌落直径之比 d ₁ /d ₂	蛋白酶酶活 (U/mL)
A ₂₉ -1	16.43	6.06	2.71	5.26
A ₂₉ -2	22.03	4.71	4.68	31.88
A ₂₉ -3	22.83	6.10	3.74	7.04
A ₂₉ -4	18.25	7.26	2.51	4.75
A ₂₉ -5	23.11	9.61	2.40	4.55
A ₂₉ -6	15.23	5.32	1.05	2.14
A ₂₉ -7	22.31	9.11	2.45	4.63
A ₂₉ -8	16.90	7.88	2.14	3.89
A ₂₉ -9	21.76	7.91	2.75	5.83

2.2 菌株鉴定

2.2.1 菌株形态学鉴定 菌株 A₂₉-2 在酪蛋白分离培养基上形态特征如图 1 所示: 单个菌落表面圆滑

湿润,凸起,规则圆形,呈乳白色,边缘整齐,不透明。显微镜下的形态如图2所示为单细胞呈短杆状,不规则排列,革兰氏阴性,无芽孢,有荚膜。

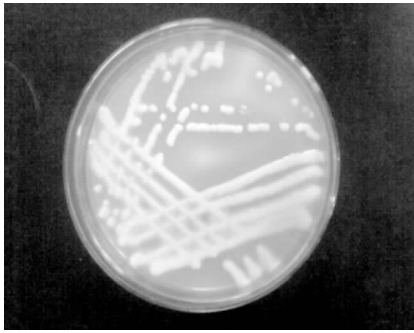


图1 菌株 A₂₉-2 的平板特征

Fig.1 Plate characteristics of strain A₂₉-2

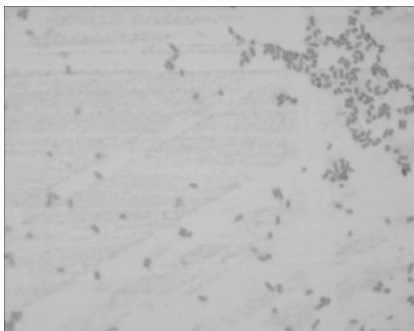


图2 菌株 A₂₉-2 的镜检特征

Fig.2 Microscopic characteristics of strain A₂₉-2

2.2.2 生理生化鉴定 研究结果见表2:菌株 A₂₉-2 可分解葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-棉籽糖、D-木糖、甘露醇、甘露糖、密二糖、海藻糖产酸产气,不能分解乳糖、水杨苷产酸。M-R 实验、H₂S 实验、吲哚实验为阴性;接触酶实验、V-P 实验、硝酸盐还原实验、明胶液化实验、柠檬酸盐实验为阳性;石蕊牛乳实验结果为牛奶结块凝固,不变色或蓝色,即酶凝。说明菌株 A₂₉-2 具有产低温蛋白酶的能力。

2.2.3 菌株 A₂₉-2 的 16S rDNA 鉴定 由图3可知,菌株 A₂₉-2 PCR 扩增出的条带在 1500bp 左右,说明成功的扩增出菌株 A₂₉-2 的 16S rDNA 片段;将菌株 A₂₉-2 的测序结果,通过 NCBI 进行 16S rDNA 数据库 BLAST,选取序列相似度达 99% 的部分菌种,采用软件 DNAMAN 和 Mega5.05, Maximum likelihood 法制作

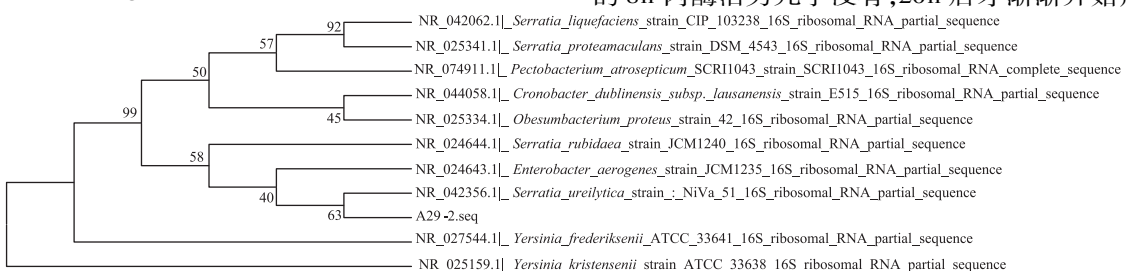


图4 菌株 A₂₉-2 的系统发育树

Fig.4 The phylogenetic tree of strain A₂₉-2

系统发育树,结果见图4,菌株 A₂₉-2 与标准菌株 NR_042356.1 在同一支系,相似率达到 99%,故菌株 A₂₉-2 鉴定为沙雷氏菌 (*Serratia ureilytica* strain NiVa 51)。

表2 菌株 A₂₉-2 生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical identification results of strain A₂₉-2

鉴定项目	结果	鉴定项目	结果
L-阿拉伯糖	O ⁺	甘露糖	O ⁺⁺
纤维二糖	w	密二糖	O ⁺
七叶苷	d	D-棉籽糖	O ⁺
果糖	O ⁺⁺	L-鼠李糖	d
D-半乳糖	O ⁺	水杨苷	-
葡萄糖	O ⁺⁺	D-山梨醇	O ⁺
乳糖	-	蔗糖	O ⁺⁺
麦芽糖	O ⁺	海藻糖	O ⁺⁺
甘露醇	O ⁺	D-木糖	O ⁺
革兰氏染色	G ⁻	硝酸盐还原实验	+
接触酶实验	+	H ₂ S 实验	-
V-P 实验	+	明胶液化实验	+
M-R 实验	-	石蕊牛乳实验	酶凝
吲哚实验	-	柠檬酸盐实验	+

注:d:11%~89% 为阳性反应;+:阳性反应;-:阴性反应;w:反应很弱;O⁺:产酸产气;O⁺⁺:产气强烈。

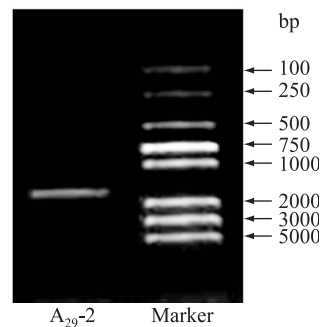


图3 菌株 A₂₉-2 PCR 电泳胶图

Fig.3 PCR electrophoresis gel figure of strain A₂₉-2

2.3 菌株生长特性的初步研究

2.3.1 菌株 A₂₉-2 的生长和产酶曲线 通过连续测定液体培养基中菌株 A₂₉-2 的 OD_{600nm} 吸光值,由图5可知,菌株 A₂₉-2 在 22℃ 环境中能较快生长,4~18h 为对数生长期,培养 18h 后基本达到稳定期;在最初的 8h 内酶活力几乎没有;20h 后才渐渐开始产酶,此

时菌株处于稳定期;随着菌株逐渐衰亡,产酶能力也越来越强,说明酶的产生发生在菌株生长的中后期。

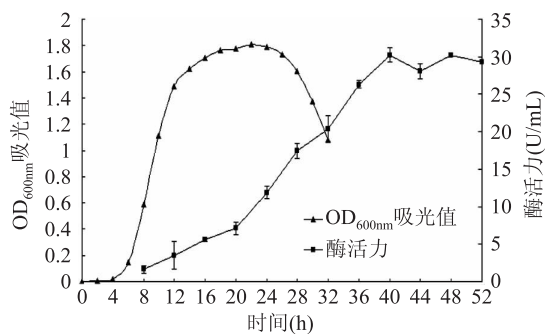


图5 菌株 A₂₉-2 的生长和产酶曲线

Fig.5 The growth curve and enzyme production curve of strain A₂₉-2

2.3.2 温度对菌株 A₂₉-2 生长的影响 温度对菌株 A₂₉-2 生长的影响如图 6 所示,菌株 A₂₉-2 在 4~30℃ 均能生长,且最适生长温度为 22℃,37℃ 不生长,表明该菌是低温菌。在不同温度下,培养 18h 后均陆续进入稳定期,且 18h 的生长量最大;随着温度的升高,菌株到达生长高峰的时间提前,加速了菌株的死亡。

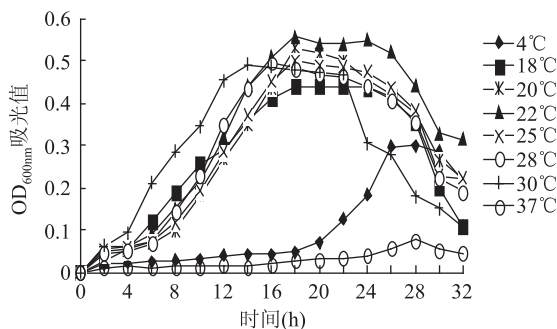


图6 温度对菌株 A₂₉-2 生长的影响

Fig.6 The effect of temperature on the growth of strain A₂₉-2

2.3.3 初始 pH 对菌株 A₂₉-2 生长的影响 初始 pH 对菌株 A₂₉-2 生长的影响如图 7 所示,菌株 A₂₉-2 在初始 pH 为 6.0~8.0 生长较快,最适初始 pH 为 7.0。

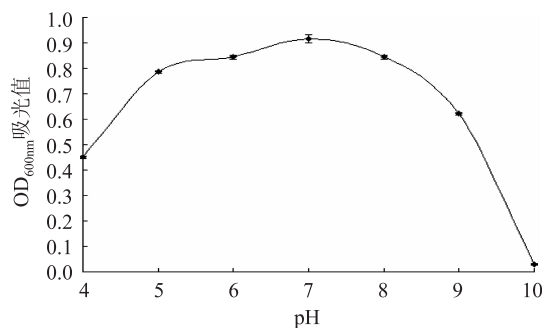


图7 初始 pH 对菌株 A₂₉-2 生长的影响

Fig.7 The effect of initial pH on the growth of strain A₂₉-2

2.3.4 NaCl 质量分数对菌株 A₂₉-2 生长的影响 NaCl 质量分数对菌株 A₂₉-2 生长的影响如图 8 所

示,NaCl 质量分数为 0.00%~1.00% 时,菌株 A₂₉-2 生长最快,且最适 NaCl 质量分数为 1.00%。

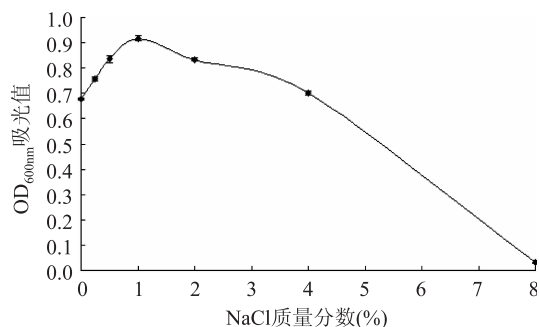


图8 NaCl 质量分数对菌株 A₂₉-2 生长的影响

Fig.8 The effect of mass fraction of NaCl on the growth of strain A₂₉-2

3 结论

本研究通过微生物发酵法分离筛选出 9 株产低温蛋白酶菌株,其中菌株 A₂₉-2 所产低温蛋白酶活性最高,为 31.88U/mL。通过微生物学鉴定方法对菌株 A₂₉-2 进行形态学、生理生化及 16S rDNA 鉴定,经序列同源性分析,鉴定该菌属于沙雷氏菌 (*Serratia* sp.),该研究与迟乃玉等^[15]、刘静等^[16]、全桂静等^[17] 学者分离筛选所得的菌种有所不同,本研究得到一株新菌种,并对新菌种的生长特性进行初步探讨,菌株 A₂₉-2 生长最适温度为 22℃,且在 4℃ 可以生长,37℃ 不生长。根据耐冷菌能够在 0~5℃ 左右生长,最适生长温度约 20℃ 左右的特性,可以确定该菌为耐冷菌。且最适初始 pH 为 7.0,在 pH10.0 时生长最缓慢,pH4.0 时生长较缓慢,因此,该菌耐碱性差,但具有一定的耐酸性。该菌最适 NaCl 质量分数为 1.00%,超过 1.00% 时,菌株生长加速死亡,所以,该菌具有一定的耐盐性。本研究筛选的菌株 A₂₉-2 为进一步提取纯化低温蛋白酶和研究酶学特性奠定了基础。

参考文献

- [1] Morita R.Y. Psychrophilic bacteria [J]. Bacterial Rev, 1975, 39:144-167.
- [2] Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology [J]. Trends in Biotechnol, 2000, 18(3):103-107.
- [3] 王长远, 罗梦晓. 高产蛋白酶地衣芽孢杆菌株的紫外诱变 [J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(5):620-622.
- [4] 祁丹丹, 杨瑞金, 华霄, 等. 天山冻土中产低温蛋白酶菌株的筛选、鉴定及酶学性质 [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7):32-37.
- [5] Vazquez SC, Coria SH, Cormack WPM. Extracellular proteases from eight psychrotolerant antarctic strains [J]. Microbiol Res, 2004, 159(2):157-166.
- [6] 陈秀兰, 张玉忠, 高培基. 低温蛋白酶的研究进展与应用前景 [J]. 工业微生物, 2001, 31(1):52-57.
- [7] Margesin R, Dieplinger H, Hofmann J, et al. A cold-active extracellular metalloprotease from *Pedobacter cryoconitis*:

(下转第 152 页)

经 DPS 软件二次多项式逐步回归, 得出最高指标时各个因素组合为: $X_1 = 37.08$, $X_2 = 0.03$, $X_3 = 24.18$, $X_4 = 0.075$, 即发酵温度为 37.08°C , 接种量为 3% (v/v), 发酵时间为 24.18h , 面粉添加量为 7.5% (w/v), 此时产酸量得率最高为 $0.8537\text{g}/100\text{mL}$ 。为便于生产应用, 调整黄浆水自然发酵条件为发酵温度 37°C , 接种量 3% (v/v), 发酵时间 24h , 面粉添加量 7.5% (w/v)。按照上述条件进行三次验证实验, 得产酸量为 $0.8301\text{g}/100\text{mL}$, 达到回归预测理论值 ($0.8537\text{g}/100\text{mL}$) 的 97.24% , 表明最佳发酵条件可靠。

3 讨论与结论

3.1 由于制作豆腐时加工条件不同、使用凝固剂不同等原因, 导致产生的黄浆水 pH 不尽相同。酸浆中主要是乳酸菌产酸, 适宜乳酸菌生长的 MRS 培养基初始 pH 为 6.2 ± 0.2 , 故将黄浆水初始 pH 统一调整为 6.2 。

3.2 通过比较 4 种天然促生因子对黄浆水自然发酵产酸的研究, 面粉为最佳天然促生因子。面粉添加量为 4% 时, 其产酸量为 $0.6251\text{g}/100\text{mL}$, 是葡萄糖 $0.5742\text{g}/100\text{mL}$ 的 1.09 倍, 空白 $0.3042\text{g}/100\text{mL}$ 的 2.05 倍, 表明添加面粉能较好的促进黄浆水发酵产酸。

3.3 将生物培养基中的常规碳源葡萄糖与天然促生因子碳源进行经济性比较, 表明面粉是一种来源广泛, 价廉物美, 经济性良好, 能有效促使黄浆水自然发酵的天然促生因子。

3.4 均匀实验优化黄浆水自然发酵产酸的最佳发酵条件为: 发酵温度 37°C , 接种量 3% (v/v), 发酵时间 24h , 面粉添加量 7.5% (w/v), 培养基初始 pH 6.2 , 产酸量达 $0.8301\text{g}/100\text{mL}$; 比单一黄浆水自然发酵产酸量 $0.3042\text{g}/100\text{mL}$ 提高 2.73 倍, 明显提高了黄浆水自然发酵的产酸量。

参考文献

[1] 刘平, 李晓峰, 谭新敏. 利用大豆黄浆水发酵生产维生素 B_{12} 的工艺探索[J]. 陕西科技大学学报, 2003(4): 83-85.
 [2] 胡欣欣, 蒋立文, 刘嘉, 等. 黄浆水酸化过程中有机酸的变化研究[J]. 农产品加工, 2011(3): 74-75.
 [3] 宋永生. 影响大豆异黄酮含量与种类的因素[J]. 粮油食品科技, 2003(3): 4-5.
 [4] 史宣明, 岳琳, 武丽荣. 大豆异黄酮的提取及精制[J]. 中国油脂, 2001(2): 3-5.
 [5] 赵冬梅, 刘凌, 张京健. 黄浆水中功能性成分和主要污染物在组合膜分离中的再分布[J]. 食品与发酵工业, 2006(5): 134-137.
 [6] 王国良. 酸浆野生菌发酵黄浆水生产天然凝固剂的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2005.
 [7] 贾爱霞, 王晓曦, 王绍文, 等. 小麦的营养组分及加工过程中的变化[J]. 粮食与食品工业, 2010(2): 4-6.
 [8] Olsen K M, Purugganan M D. Molecular evidence on the origin and evolution of glutinous rice [J]. Genetics, 2002, 162 (2): 941-950.
 [9] MacLean W C, Klein G L, Lopez de Romana G, et al. Protein quality of conventional and high protein rice and digestibility of glutinous and non-glutinous rice by preschool children [J]. Journal of Nutrition, 1978, 108.
 [10] 李进, 郭峰. 特用玉米营养价值及综合加工利用[J]. 新疆农业科学, 1999(4): 162-165.
 [11] 张国民, 张玉华, 宋立泉, 等. 浅谈大米中的蛋白质对营养价值及食味品质的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2001(3): 38-39.
 [11] 李素丽, 李志刚, 马光庭, 等. 大豆黄浆水醋酸菌种选育及其发酵实验初探[J]. 大众科技, 2009(7): 109-110.
 [12] 佟献俊, 孙洋, 钱方. 大豆黄浆水中乳清蛋白和低聚糖制备研究进展[J]. 中国酿造, 2009(12): 3-5.
 [13] 孙玉梅, 崔迎进, 曹芳, 等. 豆腐黄浆水中补加乙醇和葡萄糖发酵虾青素的研究[J]. 中国酿造, 2007(1): 24-27.
 [14] 唐鑫, 陈卓然, 黄薪安, 等. 豆制品生产中黄浆水的综合应用[J]. 农产品加工, 2010(6): 67-68.
 [15] 郝继伟. 均匀设计法优化超声波辅助提取枸杞多糖的工艺[J]. 光谱实验室, 2011(5): 2493-2497.
 [16] 罗巛辉, 王昭晶. 均匀设计法优化微波辅助提取牛蒡菊糖工艺[J]. 福建农业大学学报, 2006(3): 329-332.
 [17] 吴兰芳, 景永帅, 张振东, 等. 土党多糖不同提取方法的比较研究[J]. 食品科学, 2012(18): 45-48.
 [18] 天津轻工业学院等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1980.

(上接第 148 页)
 production and properties[J]. Research in Microbiology, 2005, 156 (4): 499-505.
 [8] 黄秀梨, 辛明秀. 微生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 19-23.
 [9] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 25-26.
 [10] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 49-51, 220-225.
 [11] 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: 66-95.
 [12] Buchanan R E, Gibbens N E. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 450-454.
 [13] 李远, 巴吐尔, 张小燕, 等. 新疆哈萨克族传统发酵乳中乳酸菌的分离鉴定[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(1): 54-58.
 [14] 马桂珍, 暴增海, 王淑芳, 等. 高产蛋白酶细菌的分离筛选及其种类鉴定[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 183-187.
 [15] 迟乃玉, 张庆芳, 王晓辉, 等. 海洋低温蛋白酶菌株选育及发酵培养基的研究(I)[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 114-117.
 [16] 刘静, 闰航, 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, 2006, 32(3): 251-256.
 [17] 全桂静, 尹黎献. 低温碱性蛋白酶高产菌株的选育与发酵条件研究[J]. 沈阳化工大学学报, 2011, 25(2): 117-120.