

# 高产蛋白酶细菌的分离筛选及其种类鉴定

马桂珍, 暴增海, 王淑芳, 吴少杰, 付泓润, 葛平华

(淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005)

**摘要:** 从广东、河北、辽宁、湖南、江苏等省份采集土壤样品 9 个, 采用稀释涂布的方法共分离到细菌菌株 44 株, 利用平板透明圈法对 44 株细菌菌株产蛋白酶能力进行初步筛选, 16 株菌株出现了明显的透明圈, 菌株 G1-b、GD-2-2、HX-B-1 的蛋白酶活性最强, 透明圈/菌落直径比(HC)在 3.5 以上; 比色法测定产酶活性强的 3 株菌株的蛋白酶活力, GD-2-2 菌株的产酶能力最强, 酶活力达到 447.6U/mL。通过对细菌 GD-2-2 菌株形态学观察、生理生化实验, 结合相关文献, 初步鉴定菌株 GD-2-2 属于芽孢杆菌属。对菌株 GD-2-2 的 16S rDNA 序列分析表明, 该菌株序列与细菌 *Bacillus licheniformis* strain YB915 (GQ996726.1) 的 16S rDNA 序列同源性达 100%, 综合形态学观察和生理生化实验结果, 鉴定 GD-2-2 菌株为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

**关键词:** 细菌; 蛋白酶; 鉴定

## Screening and Identification of High Protease-producing Bacteria

MA Gui-zhen, BAO Zeng-hai, WANG Shu-fang, WU Shao-jie, FU Hong-run, GE Ping-hua

(School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

**Abstract:** Totally 44 bacterial strains were isolated from 9 soil samples collected from Guangdong, Hebei, Liaoning, Hunan and Jiangsu by diluted plate method. The protease-producing ability of the bacteria isolated was screened by transparent cycle plate assay. The results indicated that of these bacterial isolates, 16 exhibited clear transparent cycles. Meanwhile, strains G1-b, GD-2-2 and HX-B-1 revealed the strongest protease activity. The ratio of transparent circle diameter to colony diameter was higher than 3.5. Strain GD-2-2 had stronger protease activity than the other two, reaching 447.6 U/mL. Based on morphological observations and physiological and biochemical tests, strain GD-2-2 belonged to *Bacillus*. The 16S rDNA sequence analysis showed that the isolate was 100% similar with *Bacillus licheniformis* strain YB915 (GQ996726.1). Therefore, strain GD-2-2 belonged to *Bacillus licheniformis*.

**Key words:** bacteria; protease; identification

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0183-05

蛋白酶是催化蛋白质水解的一类酶。主要存在于动物内脏、植物茎叶、果实和微生物中, 是最重要的三大工业用酶之一。蛋白酶种类的多样性和水解活性的专一性, 使其在食品、皮革、洗涤剂等行业生产领域成为具有重要商业价值的工业酶<sup>[1]</sup>。与传统的动植物资源相比, 微生物来源的蛋白酶具有生产周期短、生产成本低、易于管理控制、不受土地和季节限制等优点, 且微生物产生的蛋白酶多为胞外酶, 纯化制备相对容易, 规模化生产的成本会大大降低, 微生物日益成为工业酶制剂的主要来源<sup>[2]</sup>。优良高产菌株的获得是蛋白酶生产的关键, 近年来高产蛋白酶菌株筛选研究工作非常活跃, 国内外许多学者从土壤、海洋等不同环境中分离得到了大量具有不同优势的菌株, Mukherjee 等<sup>[3]</sup>从阿萨姆地区土壤中分离到 *Bacillus* sp. AS-S20-I 菌株, 发

酵条件优化后蛋白酶活力为  $(2408.0 \pm 70.0)$  U/mg, Sundararajan 等<sup>[4]</sup>从富含蛋白的土壤中分离到 *Bacillus cereus* VITSN04 菌株, 蛋白活力在优化条件下可达  $(200.1 \pm 0.68)$  U/mL, Vishwanatha 等<sup>[5]</sup>从酱油曲中分离到具有较高蛋白酶活性的菌株 *Aspergillus oryzae* MTCC 5341, Shivanand 等<sup>[6]</sup>从印度卡纳塔克邦的沿海地区土壤样中分离到产蛋白酶菌株 *Bacillus aquimaris* VITP4, 在最佳条件下蛋白酶活力达 796U/mL, Reddy 等<sup>[7]</sup>从土样中分离菌株 *Bacillus* sp. RKY3 在优化的条件下蛋白酶活力达到 416U/mL 左右。

我国的 Xu Jiaxing 等<sup>[8]</sup>从江苏土壤中分离到了具有强产蛋白酶能力的 *Bacillus cereus* WQ9-2 菌株, 并纯化了蛋白酶, Deng Aihua 等<sup>[9]</sup>从堆肥中分离到了 *Bacillus* sp. B001 菌株, 在优化条件下具有较高的蛋白酶活性,

收稿日期: 2011-06-04

作者简介: 马桂珍(1963—), 女, 教授, 博士, 研究方向为有益微生物及其利用。E-mail: guizhenma@sohu.com

表现了良好的应用前景。已有的研究表明,我国在产蛋白酶优良菌株的筛选、发酵、诱变、工程菌构建与表达、酶的纯化与制备等研究技术发展迅速,许多蛋白酶品种已大量生产和应用,但与国外相比,我国的蛋白酶研究还存高产微生物资源开发不足、蛋白酶种类较少、作用范围较窄,酶制剂品种单一,价格昂贵等问题<sup>[10]</sup>,因此,寻找和开发高产蛋白酶微生物资源具有重要的科研、应用及商业价值。本实验从广东、湖南、江苏、河北、辽宁等地采集土壤样品,分离筛选高产蛋白酶优良细菌菌株,并对优良菌株进行种类鉴定,旨在为蛋白酶的生产应用提供高产优良微生物菌株。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 土壤样品的采集与培养基

自广东、湖南、江苏、河北、辽宁等不同省区的水稻田采集土壤样品,较大的地块用5点取样法,较小地块用蛇形法随机取5~20cm深度土层土壤样品,每个点取样500g,装入无菌塑料袋,4℃冰箱保存。

细菌分离培养基:牛肉膏蛋白胨培养基。蛋白酶初步筛选培养基:脱脂奶粉3.0g、琼脂3.0g、水200mL。种子液培养基(g/L):牛肉膏3g、蛋白胨10g、NaCl 5g、水1000mL, pH7.0~7.2。产酶液体培养基:脱脂奶粉3.0g、水100mL、70℃灭菌1h。淀粉培养基(g/L):蛋白胨10、NaCl 5、可溶性淀粉2、牛肉膏5、琼脂20,水1000mL。耐盐性实验培养基:液体牛肉膏蛋白胨培养基中分别加入0、1、2、3、4、5、6、7、8、9g/100mL氯化钠。

### 1.2 细菌的分离纯化

采用梯度稀释和三区划线的方法分离单菌落<sup>[10]</sup>。

### 1.3 产蛋白酶菌株的初步筛选

采用平板透明圈法<sup>[11-12]</sup>。将分离纯化得到的细菌菌株分别点种到脱脂牛奶培养基平板上,每个平板点种3株菌株,37℃恒温培养,20h后测量不同菌株的透明圈和菌落直径。根据透明圈与菌落直径比(HC)值的大小,筛选产蛋白酶能力相对较强的菌株。

### 1.4 蛋白酶产生菌的复筛

将初步筛选得到的产生透明圈明显的菌株在产酶液体培养基中发酵,采用比色法测定发酵液的蛋白酶活力。

#### 1.4.1 粗酶液的制备

将初筛得到的透明圈较大的菌株在37℃培养24h,加入3mL种子液培养基,用接种环轻轻刮取菌苔,制成均匀的菌悬液,接入装有50mL种子液培养基的250mL三角瓶中,37℃、180r/min摇床培养20h,作为种子液,调节细胞浓度为 $10^9$ 个/mL。

制备好的种子液按8%的接种量接种到产酶发酵培养基中,250mL三角瓶中装培养基50mL,37℃、180r/min

恒温振荡培养48h,发酵液于4℃、3500r/min离心30min,上清液即为粗酶液<sup>[13]</sup>,每个菌株发酵3瓶,为3次重复。

#### 1.4.2 蛋白酶活力的测定

采用Folin-酚试剂显色法<sup>[14]</sup>。以每毫升发酵液在40℃条件下,每分钟水解酪蛋白产生1μg酪氨酸作为1个酶活力单位(U)。

### 1.5 高产蛋白酶细菌菌株的鉴定

#### 1.5.1 形态观察

对筛选出的高产蛋白酶菌株进行形态观察,测定细胞大小,进行革兰氏染色,芽孢染色,鞭毛染色。

#### 1.5.2 生理生化实验

参照《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[15]</sup>、《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[16]</sup>和《芽孢杆菌属》<sup>[17]</sup>及文献[18-19],应用生化反应管进行各种生理生化反应,依据形态及生理生化特征对分离的纯培养的细菌菌株进行初步分类鉴定。

#### 1.5.3 高产蛋白酶细菌菌株的16S rDNA序列扩增与分析

##### 1.5.3.1 细菌菌株的DNA提取

采用CTAB法<sup>[20]</sup>。取1mL新鲜细菌培养液装于EP管中,4℃、12000r/min离心10min,弃上清液,沉淀物中加入6μL CTAB裂解液(1.4mol/L NaCl、100mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、2% CTAB、20mmol/L EDTA, pH9.0)、30μL 10%的SDS缓冲溶液(Tris 100mmol/L、200mmol/L NaCl、3% SDS, pH9.0),65℃水浴裂解1h,4℃、5000r/min离心5min,取上清液加入等体积酚氯仿,4℃、12000r/min离心25min,将离心后的水相转移新EP管中,加入0.6倍体积的异丙醇室温沉淀1h,4℃、13000r/min离心25min,弃上清液,沉淀用75%乙醇洗涤2次,4℃、12000r/min离心5min,弃上清液,沉淀即为基因组DNA,加入20μL去离子水,1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取结果。

##### 1.5.3.2 细菌菌株的16S rDNA序列扩增

所用引物为细菌16S rDNA的通用引物:16SF:5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3';16SR:5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR反应体系(25μL)为dNTP(10mmol/L each)0.5μL,10×PCR buffer 2.5μL, Mg<sup>2+</sup>(20mmol/L)2μL,引物(20μmol/L)各0.5μL,模板DNA(约50ng/μL)1μL, Taq酶(5U/μL)0.2μL,补水至25μL。

PCR扩增程序为:95℃预变性5min;94℃变性30s,52℃退火45s,72℃延伸60s,35个循环;最后72℃延伸8min。扩增产物用0.75%的琼脂糖凝胶电泳回收,纯化后的产物送上海生工生物工程技术有限公司双向测

序, 测序后获得的 16S rDNA 序列登录 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网站, 用 Blast 程序进行序列比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌的分离纯化结果

从不同省份共采集土壤样品 9 个, 其中广东湛江 1 个、湖南长沙 1 个、江苏连云港 2 个、河北秦皇岛 2 个、辽宁沈阳 3 个, 分离纯化得到了 44 株细菌。

### 2.2 产蛋白酶细菌菌株的初步筛选

利用脱脂牛奶培养基对 44 株细菌进行初筛, 得到 16 株透明圈明显的菌株, 结果见表 1。

表 1 产蛋白酶细菌透明圈 / 菌落直径比

Table 1 Transparent circle diameter-to-colony diameter ratios of 44 bacterial isolates

菌株编号	透明圈直径/mm	菌落直径/mm	直径比(HC)
G1-b	12.3	3.3	3.72
G1-3	20.2	6.8	2.97
GD-2-1	23.4	13.5	1.73
GD-2-2	24.5	6.5	3.76
GD-3-1	8.7	5.9	1.47
GD-3-2	18.1	6.7	2.70
GD-3-3	26.9	19.3	1.39
GD-3-4	34.7	18.9	1.83
HD-2-3	17.6	7.3	2.41
HD-2-4	17.0	6.1	2.79
HX-B-1	20.7	5.8	3.57
HC-D-1	16.2	6.3	2.57
HC-D-2	16.8	8.1	2.07
N-8-1	19.4	7.3	2.66
N-8-2	16.5	8.9	1.85
N-8-9	17.7	8.3	2.13

从表 1 可知, 16 个菌株能够产生明显的透明圈。比较不同菌株的 HC 发现, 菌株 GD-2-1、GD-3-1、GD-3-3、GD-3-4、N-8-2 的 HC 在 2.00 以下; 菌株 G1-3、GD-3-2、HD-2-3、HD-2-4、HC-D-1、HC-D-2、N-8-1、N-8-9 的 HC 在 2.00~3.00 之间; 菌株 G1-b、GD-2-2、HX-B-1 的 HC 在 3.5 以上。说明菌株 G1-b、GD-2-2、HX-B-1 的具有较强的产蛋白酶能力, 见图 1。

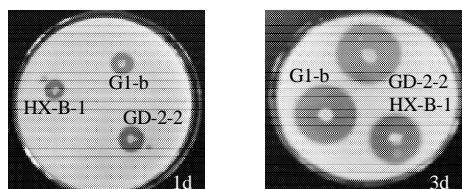


图 1 不同菌株在脱脂牛奶培养基上培养 1d 和 3d 所产生的透明圈

Fig.1 Transparent cycles formed on skim milk medium by different strains after 1 and 3 days of cultivation

### 2.3 高产蛋白酶细菌的复筛

对初筛分离纯化后的 3 株菌株 GD-2-2、G1-b 和 HX-B-1

在产酶发酵培养基中进行摇瓶发酵培养 48h, 制备粗酶液, 测定蛋白酶活力, 结果见表 2。

表 2 菌株 GD-2-2、HX-B-1、G1-b 蛋白酶活力测定结果

Table 2 Protease activity of strains GD-2-2, HX-B-1 and G1-b

菌株编号	OD <sub>680nm</sub>	酶活力/(U/mL)
G1-b	0.684	359.8
HX-B-1	0.583	306.7
GD-2-2	0.851	447.6

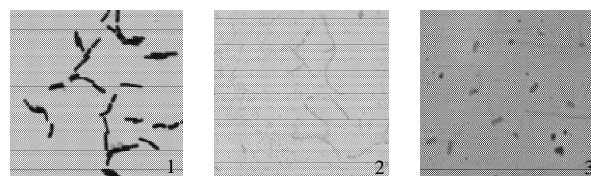
表 2 表明, 菌株 GD-2-2 发酵液的酶活力最高, 其酶活力为 447.6U/mL, 明显高于另外 2 株菌株。

### 2.4 GD-2-2 菌株的鉴定

#### 2.4.1 形态特征

菌株 GD-2-2 在牛肉膏蛋白胨固体培养基上培养 20h 后, 菌落为乳白色, 半透明, 表面较光滑, 后期菌落边缘不整齐, 较为粗糙, 淡黄色, 不透明, 无光泽, 表面皱褶。

革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色结果表明, 菌体形态为杆状, 链状排列, 两端钝圆, 菌体大小为  $(1.0\sim1.8)\times(2.0\sim4.1)\mu\text{m}$ , 革兰氏染色为阳性, 有芽孢, 芽孢椭圆或卵圆, 每个细胞产一个芽孢, 芽孢位于菌体中央, 有鞭毛, 可运动。对细菌 GD-2-2 进行革兰氏染色, 芽孢染色和鞭毛染色, 见图 2。



1. 革兰氏染色; 2. 芽孢染色; 3. 鞭毛染色。

图 2 细菌 GD-2-2 的菌体形态( $\times 1000$ )

Fig.2 Colonial morphology of strain GD-2-2( $\times 1000$ )

#### 2.4.2 细菌 GD-2-2 菌株的生理生化实验结果

表 3 细菌 GD-2-2 的生理生化实验结果

Table 3 Physiological and biochemical properties of strain GD-2-2

生理生化反应	结果	生理生化反应	结果
甲基红实验	阴性	葡萄糖	阳性
V-P 实验	阳性	乳糖	阴性
硫化氢实验	阴性	棉子糖	阴性
过氧化氢酶实验	阳性	阿拉伯糖	阴性
苯丙氨酸脱氨酶实验	阴性	纤维二糖	阴性
半固体琼脂穿刺实验	阳性	蔗糖	阳性
西蒙氏枸橼酸盐实验	阴性	果糖	阴性
淀粉水解实验	阳性	木糖醇	阴性
尿素酶实验	阳性	山梨醇	阴性
明胶液化实验	阳性	甘露醇	阳性
		蜜二糖	阴性

由表 3 可见, 淀粉水解实验中滴加碘液后菌落周围

有透明圈, 呈阳性, 说明细菌 GD-2-2 能分泌淀粉酶将菌落周围培养基中的淀粉水解; 明胶液化实验中明胶有液化现象, 说明该菌株可产明胶酶, 能将明胶先水解为多肽, 再进一步水解为氨基酸, 失去凝胶性质而液化, 呈阳性; V-P 实验中培养液呈现红色, 为阳性; 甲基红实验的培养液呈黄色, 说明菌株 GD-2-2 不能由葡萄糖产生有机酸, 呈阴性; 糖醇发酵实验结果表明: 细菌 GD-2-2 能分解葡萄糖(不产气)、甘露醇、蔗糖, 产生酸而使指示剂溴甲酚紫显现出黄色, 呈阳性, 不能分解乳糖、棉子糖、阿拉伯糖、纤维二糖、果糖、木糖醇、山梨醇、蜜二糖产生酸, 因而指示剂不变色, 呈阴性; 硫化氢实验结果表明菌株 GD-2-2 未产生硫化氢, 说明不能分解醋酸铅培养基中的硫代硫酸钠而呈阴性; 接触酶实验中有气泡产生, 说明该细菌含有过氧化氢酶, 呈阳性; 苯丙氨酸脱氨酶实验中注入 10%  $\text{FeCl}_3$  后不变色, 说明该菌株不具有苯丙氨酸脱氨酶, 不能将培养基中的苯丙氨酸脱氨生成苯丙酮酸, 遇三氯化铁指示剂不能变为绿色呈阴性; 尿素酶实验中培养基变为碱性, 使酚红呈现红色, 说明该菌能产生尿素酶, 将尿素分解产生氨为阳性; 半固体琼脂穿刺实验呈阳性, 说明菌株 GD-2-2 具有运动性。

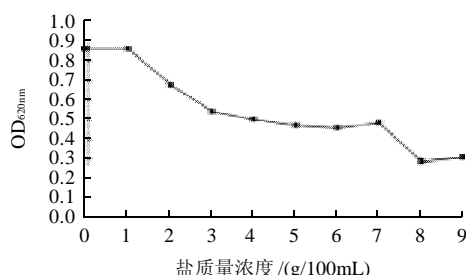


图3 细菌 GD-2-2 耐盐性实验结果  
Fig.3 Salt tolerance of strain GD-2-2

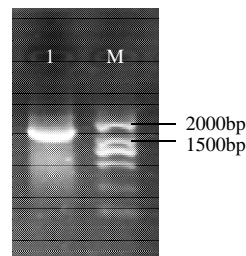
由图3可见, 盐质量浓度为 0g/100mL 和 1g/100mL 时, 菌体密度无明显变化, 表明细菌 GD-2-2 菌株生长几乎不需要盐, 能够耐受 1g/100mL 的盐质量浓度。质量浓度高于 1g/100mL 时, 菌体密度逐渐降低, 盐质量浓度在 3~7g/100mL 菌体密度趋于稳定, 盐质量浓度为 8~9g/100mL 时, 菌体生长速度急剧下降, 说明该菌株能适应较低的盐质量浓度, 不适合在盐质量浓度高的环境下生长。

根据以上形态鉴定和生理生化实验结果, 参考《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[15]</sup>、《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[16]</sup>和《芽孢杆菌属》<sup>[17]</sup>, 细菌 GD-2-2 的特性符合芽孢杆菌属特征, 初步鉴定该菌株属于芽孢杆菌属。

#### 2.4.3 细菌 GD-2-2 菌株 16S rDNA 的扩增产物序列测定结果

CTAB 法提取获得的 GD-2-2 菌株基因组 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测发现, DNA 带型整齐、无降

解, 片段大小符合基因组 DNA 大小, 说明 GD-2-2 菌株的基因组 DNA 提取成功。利用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 结果见图 4。



1. PCR 扩增产物; M. Marker。

图4 细菌 GD-2-2 的 16S rDNA 的 PCR 扩增产物

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products of 16S rDNA from strain GD-2-2

将 PCR 扩增产物回收测序, 测序片段长度为 1461bp, 将所得序列输入 GenBank, 用 Blast 程序进行比较分析, 该菌株与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) YB915 (GQ996726.1) 的 16S rDNA 序列同源性达到 100%。

选取与细菌 GD-2-2 的 16S rDNA 序列同源性高达 99% 以上的 25 株菌株, 应用 Clustalx 和 Mega4 分析软件构建系统进化树, 结果见图 5。细菌 GD-2-2 与 *Bacillus licheniformis* strain YB915 (GQ996726.1) 处于同一分支, 表明它们之间的亲缘性最近, 该结果与序列同源性比较结果一致。

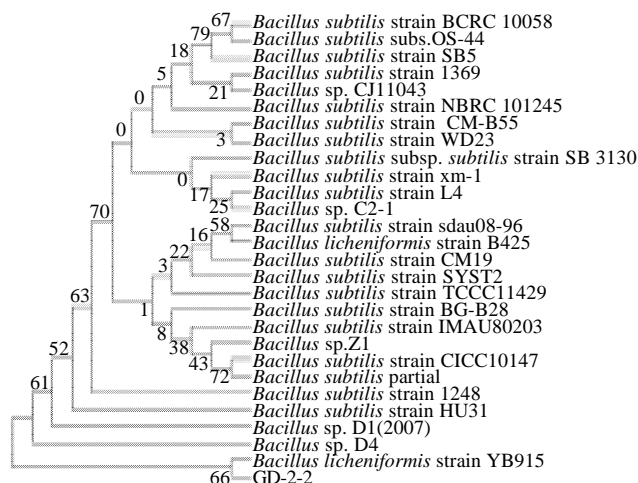


图5 根据细菌 GD-2-2 16S rDNA 序列同源性构建的系统进化树  
Fig.5 Phylogenetic tree based on the similarity of 16S rDNA sequence of strain GD-2-2

综合形态学特征和生理生化特征, 结合 16S rDNA 分子鉴定结果, 将细菌 GD-2-2 鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

### 3 结论与讨论

从广东、河北、辽宁、湖南、江苏等省份采集土壤样品9个,采用稀释涂布法共分离到细菌菌株44株,利用平板透明圈法对44株细菌产蛋白酶能力进行初步筛选,16株菌株出现了明显的透明圈,菌株G1-b、GD-2-2、HX-B-1产蛋白酶活性最强,HC在3.5以上;比色法测定产酶活性强的3株菌株的蛋白酶活力,GD-2-2菌株的产酶能力最强,在未经优化的条件下酶活力达到447.6U/mL,徐建国等<sup>[21]</sup>从山西临汾汾河滩涂的表层土壤中分离到高产蛋白酶菌株,在优化后的发酵条件下产蛋白酶活力为129.2U/mL,该菌株酶活力高于Sundararajan等<sup>[4]</sup>筛选的VITSN04菌株( $200.1 \pm 0.68$ )U/mL、Reddy等<sup>[7]</sup>筛选的*Bacillus* sp. RKY3菌株(416U/mL),具有较强的产酶能力,发酵条件优化后表现了潜在的开发应用前景。

通过对细菌GD-2-2菌株形态学观察和生理生化实验,该菌株符合芽孢杆菌属特征,初步鉴定该菌株属于芽孢杆菌属,16S rDNA序列分析结果表明,该菌株序列与细菌*Bacillus licheniformis* YB915(GQ996726.1)的16S rDNA序列同源性达100%,综合形态学观察和生理生化实验结果,鉴定GD-2-2菌株为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*),广泛分布于土壤和其他自然环境中,具有耐热、酶系丰富、产酶量更高和安全等诸多优良特性,有文献报道地衣芽孢杆菌分泌蛋白至培养基中的能力大约是枯草芽孢杆菌的2倍<sup>[22]</sup>,地衣芽孢杆菌长期作为食品加工用酶制剂的生产,已被大规模应用于淀粉酶的发酵生产,1981年,《食品化学品索引》将地衣芽孢杆菌列为食品加工用淀粉酶和蛋白酶的来源。由地衣芽孢杆菌生产的淀粉水解酶和蛋白酶被美国FDA鉴定为“公认安全使用物质(GRAS)”,在其补充说明中强调:“地衣芽孢杆菌是一种被普遍认知的多种食品中存在的常见微生物,没有任何有关食品存在此种微生物与任何毒性或致病性相关的报道”<sup>[23]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 刘海军,乐超银,邵伟,等.一株高产蛋白酶芽孢杆菌的鉴定[J].中国酿造,2009(9): 18-20.
- [2] 陈涛.毛霉蛋白酶的制备及水解豆粕的研究[D].广州:华南理工大学,2004.
- [3] MUKHERJEE A K, RAI S K. A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus* sp. strain AS-S20-I[J]. New Biotechnology, 2011, 28(2): 182-189.
- [4] SUNDARARAJAN S, KANNAN C N, CHITTIBABU S. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: potential application as a dehairing agent[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(2): 128-133.
- [5] VISHWANATHA K S, APPU RAO A G, SRIDEVI A S. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 402-407.
- [6] SHIVANAND P, JAYARAMAN G. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(10): 1088-1094.
- [7] REDDY L V A, WEE Y J, YUN J S, et al. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(7): 2242-2249.
- [8] XU Jiaxing, JIANG Min, SUN Honglin, et al. An organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Bacillus cereus* WQ9-2: purification, biochemical properties, and potential application in peptide synthesis [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(20): 7991-7994.
- [9] DENG Aihua, WU Jie, ZHANG Yun, et al. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001 [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7100-7106.
- [10] 代玉梅.蛋白酶高产菌株的筛选鉴定及酶学性质研究[D].青岛:青岛大学,2008.
- [11] 陈秀兰,张玉忠,高培基,等.渤海湾浅表海水中低温蛋白酶适冷菌的筛选[J].海洋科学,2000,24(9): 42-45.
- [12] 黄志强,林白雪,谢联辉.产碱性蛋白酶海洋细菌的筛选与鉴定[J].福建农林大学学报:自然科学版,2006,35(4): 416-420.
- [13] LEE P G, CHE N A R. Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 13(1): 73-77.
- [14] 阵曾燮,刘兢,罗丹.生物化学实验[M].合肥:中国科技大学出版社,1994.
- [15] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 8版. 北京: 科学出版社,1984.
- [16] 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.
- [17] 戈登 R E, 海恩斯 W C, 帕格 C H N. 芽孢杆菌属[M]. 蔡妙英,译. 北京: 中国农业出版社,1983.
- [18] 李超敏,石晓,窦会娟,等.一株蛋白酶产生菌的分离鉴定[J]. 食品工程,2008,22(3): 48-50.
- [19] 王雪梅,胡江春,王书锦.深海芽孢杆菌B1394的鉴定及其产蛋白酶酶学性质[J].吉林农业大学学报,2009,31(2): 143-147.
- [20] 边才苗,李钧敏,施时迪,等.土壤细菌DNA的抽提及分析[J].浙江师范大学学报,2002,25(1): 56-61.
- [21] 徐建国,田呈瑞,胡青,等.高产蛋白酶菌株的筛选及产酶条件优化[J].中国粮油学报,2010,25(10): 112-115.
- [22] VEITH B, HERZBERG C, STECKEL S, et al. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2004, 7(4): 204-211.
- [23] 牛丹丹,石贵阳,王正祥.分泌高效蛋白的地衣芽孢杆菌及其工业应用[J].生物技术通报,2009,26(6): 45-50.