



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150217

碱性蛋白酶的异源表达及其在制备 CPP 中的应用

凌敏¹, 董自星², 李玉¹, 叶松¹, 王正祥², 路福平¹
(1. 天津科技大学生物工程学院; 2. 天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457)

摘要: 碱性蛋白酶是现代工业酶制剂中最重要的酶类之一, 在人类日常生活中扮演着非常重要的角色. 本研究以嗜碱芽胞杆菌(*B. alcalophilus*) TCCC11006 基因组为模板, 从中扩增出碱性蛋白酶基因 *apr*, 并构建重组表达质粒 pHY-*apr*, 将重组质粒电转入蛋白酶基因缺失的地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*) H115 中, 实现了碱性蛋白酶的分泌表达. 重组菌在 LB 培养基中最高酶活力达到 3 199 U/mL, 是出发菌株酶活力的 1.82 倍, 发酵周期缩短了 8 h. 然后通过单因素和正交实验对重组碱性蛋白酶水解酪蛋白的工艺参数进行优化, 确定了最佳水解温度、pH 和酶添加量分别为 50 °C、9.5 和 4 000 U/g. 在最佳水解条件下, 通过钨-乙醇沉淀的方法制备生物活性肽——酪蛋白磷酸肽(CPP), 其得率和氮磷物质的量比分别为 14.8% 和 8.47. 这为碱性蛋白酶在功能性食品制造方面的应用奠定了良好的基础.

关键词: 碱性蛋白酶; 异源表达; 水解; 酪蛋白磷酸肽

中图分类号: TQ920.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2016)05-0008-06

Heterologous Expression and Application of Gene Encoded Alkaline Protease in Preparation of CPP

LING Min¹, DONG Zixing², LI Yu¹, YE Song¹, WANG Zhengxiang², LU Fuping¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Alkaline protease is one of the most important enzymes in industrial enzymes. It plays a very important role in human daily life. Alkaline protease encoded gene (*apr*) was amplified from *B. alcalophilus* TCCC11006 genome. Then the recombinant expression vector pHY-*apr* was successfully constructed and transformed into protease-deficient strain *B. licheniformis* H115. The alkaline protease gene was expressed in the recombinant *B. licheniformis* H115. The highest alkaline protease activity was 3 199 U/mL in LB medium, which was 1.82 times of that of the starting strain. The fermentation cycle was decreased by 8 h. Then the hydrolyzing casein parameters of recombinant alkaline protease were optimized with single factor and orthogonal experiments. The optimum hydrolyzing time, temperature, pH and the amount of the enzyme were found to be 2 h, 50 °C, 9.5 and 4 000 U/g substrate. Under the optimal hydrolysis conditions, the yield and N/P mole ratio of the casein peptide phosphate (CPPs) prepared were 14.8% and 8.47, respectively. Knowledge gained in the research can be a solid foundation for the application of alkaline protease in the manufacturing of functional food.

Key words: alkaline protease; cloning expression; hydrolysis; CPP

碱性蛋白酶是指在 pH 偏碱性范围内水解蛋白质肽键的一大类酶类, 是目前工业中用量较多的酶之一^[1], 其每年销售额占全世界酶类销售额的 60%^[2]. 随着人们对碱性蛋白酶应用研究的不断深

入, 发现其在洗涤剂、食品加工、医药、环境保护、皮革制造、丝绸制造等行业都有十分重要的作用^[3-9]. 其中, 地衣芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌是我国碱性蛋白酶的主要生产菌, 但地衣芽胞杆菌具有比枯草芽胞杆

收稿日期: 2015-11-25; 修回日期: 2016-02-05

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2013AA102106-07)

作者简介: 凌敏(1990—), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生; 通信作者: 路福平, 教授, lfp@tust.edu.cn.

数字出版日期: 2016-05-19; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20160519.1033.008.html>

菌更强的分泌表达系统,大约是枯草芽胞杆菌分泌能力的2倍,且地衣芽胞杆菌生长较慢,有利于刚分泌的蛋白充分折叠和运输^[10]。另外,利用微生物源碱性蛋白酶制备酪蛋白磷酸肽(CPP)已成为当前的研究热点。被誉为“矿物质载体”的酪蛋白磷酸肽具有促进钙、铁、锌、硒离子的吸收和利用的功能,也是目前促进钙吸收较好的生物活性剂,被广泛应用于食品、医药等领域^[11]。现阶段,CPP的生产通常采用价格较高的胰蛋白酶^[12],这在很大程度上限制了CPP的应用。因此,国内外许多专家学者都在寻找一种价格较为低廉的微生物源蛋白酶代替胰蛋白酶来制备CPP。而筛选高表达蛋白酶的新菌种、菌种诱变和构建高表达的重组菌是解决这个问题的主要方法。

目前,利用芽胞杆菌表达系统获得重组蛋白酶来制备CPP的研究较少。本研究通过重组DNA的手段实现嗜碱芽胞杆菌来源的碱性蛋白酶在地衣芽胞杆菌中的分泌表达,提高其表达量并缩短了发酵周期。利用正交实验优化重组碱性蛋白酶水解酪蛋白的工艺参数,提高产品中CPP的纯度。旨在为碱性蛋白酶的大规模工业化生产及其替代胰蛋白酶制备CPP等方面奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

嗜碱芽胞杆菌(*B. alcalophilus*) TCCC11006、地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*) H115(蛋白酶基因缺失菌株)宿主菌和表达载体pHY等均由本研究室保藏。

1.1.2 培养基

嗜碱芽胞杆菌生长培养基(g/L):牛肉膏 8,酵母浸粉 2,多聚蛋白胍 5,NaCl 2,琼脂 17,酪蛋白 4, K₂HPO₄ 18, pH 自然。

嗜碱芽胞杆菌发酵培养基(g/L):酵母浸粉 17,棉籽饼粉 30,麦芽糊精 100,柠檬酸钠 3,氯化钙 2.6, K₂HPO₄ 18, pH 自然。

地衣芽胞杆菌 H115 生长和发酵培养基均为 LB 培养基(g/L):蛋白胍 10,酵母提取物 5,NaCl 10。

干酪素筛选培养基(g/L):干酪素 8,酵母抽提物 2, K₂HPO₄ 14, KH₂PO₄ 6, (NH₄)₂SO₄ 2,琼脂粉 20, pH 7.2~7.4。

1.1.3 主要试剂

Pyrobest DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA

连接酶、DNA Marker 和琼脂糖凝胶回收试剂盒等均购自 TaKaRa 公司;卡那霉素、PCR 产物纯化试剂盒、小量 DNA 产物纯化试剂盒、福林酚和酪蛋白等均购自上海生工生物工程有限公司;其他分析纯试剂均由北京国药集团有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 碱性蛋白酶基因的扩增

参照 GenBank 报道的嗜碱芽胞杆菌 TCCC11006 菌株碱性蛋白酶 *apr* 基因序列(GenBank 登录号:FJ940727.1)设计引物。上游引物为 5'-CGC GGATCCGCTGAAGAAGCAAAGAAAAATAT-3';下游引物为 5'-TCCCCCGGGTTAGCGTGTGCGCCTTCT-3'。其中在上游引物和下游引物中分别加入 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切位点。PCR 反应体系为 *Pyrobest*TM DNA 聚合酶 0.25 μL、10×*Pyrobest* buffer II (Mg²⁺ Plus) 5 μL、dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL、模板 1 μL、上游引物和下游引物各 1 μL、超纯水 37.75 μL;PCR 反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 72 °C 10 min, 15 °C 60 min。嗜碱芽胞杆菌基因组 DNA 的提取、质粒 DNA 的制备等方法参考文献[13]。

1.2.2 重组质粒 pHY-*apr* 的构建、转化与验证

将扩增出来的碱性蛋白酶基因片段与质粒 pHY 分别进行酶切、纯化,再进行连接。采用电转化法将连接产物转入地衣芽胞杆菌 H115 中,并在含有 20 μg/mL 卡那霉素的酪素筛选培养基上对转化子进行筛选、验证。

1.2.3 重组菌的验证

在含有 20 μg/mL 卡那霉素的酪素筛选培养基上对阳性转化子进行点接。观察有无透明圈形成。

1.2.4 重组菌碱性蛋白酶的表达

将验证正确的重组菌接种到含有 20 μg/mL 卡那霉素的 30 mL LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 培养过夜后,按照 2% 的接种量转接到 50 mL LB 发酵培养基中进行发酵实验,每隔 8 h 取样,取样后将发酵液 12 000 r/min 离心 10 min,测定上清液酶活力。

1.2.5 碱性蛋白酶活力的测定

按照 GB/T 23527—2009^[14]测定酶活力,1 个酶活力单位(U)是 1 mL 酶液在 40 °C、pH 10.5 条件下反应 1 min 产生 1 μg 酪氨酸所需要的酶量。

1.2.6 重组碱性蛋白酶水解酪蛋白工艺参数的确定

酪蛋白水解度的测定采用茚三酮比色法^[15]。酪蛋白溶液总氮含量的测定采用微量凯氏定氮法^[16]。水解度(DH)按照式(1)进行计算。

$$DH = \frac{c}{6.25 \times \rho \times H_{tot}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: c 为样品中氨基的含量, $\mu\text{mol/mL}$; ρ 为底物溶液中总氮含量, mg/mL , $6.25 \times \rho$ 为水解物中蛋白的含量, mg/mL ; H_{tot} 为 1 g 原料蛋白质的肽键总数, 酪蛋白的 H_{tot} 为 8.2 mmol/g.

(1) 时间的变化对水解度的影响: 用 pH 为 10.5 的硼砂-氢氧化钠缓冲液配制 100 mL 2% 的酪蛋白溶液, 按照 2 000 U/g 添加重组碱性蛋白酶, 在 40 °C 恒温水浴锅中进行水解反应, 每隔 30 min 取样, 研究时间对酪蛋白水解度的影响.

(2) 温度的变化对水解度的影响: pH 10.5 的条件下水解 2% 酪蛋白溶液, 重组碱性蛋白酶的添加量为 2 000 U/g, 水解 2 h, 测定不同温度下的水解度.

(3) pH 的变化对水解度的影响: 在水解温度为 50 °C 条件下水解 2% 酪蛋白溶液, 重组碱性蛋白酶的添加量为 2 000 U/g, 水解 2 h, 测定不同 pH 下酪蛋白溶液水解度.

(4) 酶添加量的变化对水解度的影响: 在 pH 10.5、水解温度 50 °C 的条件下水解 2% 酪蛋白溶液, 水解 2 h, 测定不同酶添加量下酪蛋白溶液水解度.

(5) 正交实验优化: 在上述单因素实验的基础上, 选择水解温度、pH 和酶添加量 3 个因素, 分别取 3 个水平, 并以 $L_9(3^3)$ 正交表进行正交实验, 通过方差分析筛选出关键因素, 从而确定最优水解条件组合. 其中, 正交实验的设计和分析采用软件正交实验助手 II 3.1.1 进行.

1.2.7 酪蛋白磷酸肽的制备与理化性质检测

在最佳水解条件下, 采用钼-乙醇沉淀法^[17]制备 CPP. 总磷含量的测定参照 GB/T 5009.87—2003^[18]的钼蓝比色法. 测定钼-乙醇沉淀得到的粗品质量 (m_1) 和初始酪蛋白质量 (m_2), 按照式 (2) 计算酪蛋白磷酸肽得率. 分别测定氮、磷的质量分数 (w_N 和 w_P), 按照式 (3) 计算氮磷物质的量比.

$$\text{酪蛋白磷酸肽得率} = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

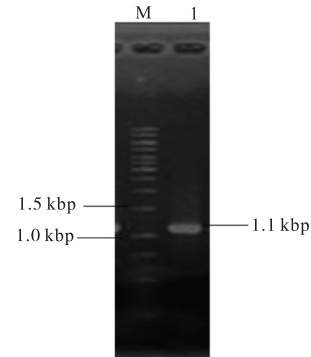
$$\text{氮磷物质的量比} = \frac{w_N \times 31}{w_P \times 14} \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 碱性蛋白酶基因 *apr* 的扩增

提取嗜碱芽胞杆菌 TCCC11006 染色体 DNA, 以

此为模板, *apr*-F 和 *apr*-R 为引物 PCR 扩增碱性蛋白酶基因 *apr*. 所扩增片段的大小为 1 100 bp 左右, 与理论值 (1 060 bp) 相符 (图 1).



M. 1 kbp DNA ladder; 1. 碱性蛋白酶 *apr* 基因的 PCR 产物

图 1 嗜碱芽胞杆菌 TCCC11006 *apr* 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 Amplification of *apr* gene encoded alkaline protease from *B. alcalophilus* TCCC11006

2.2 重组质粒 pHY-*apr* 的构建

将 PCR 获得的片段经过 *Bam*H I 酶切后, 与经过 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切的表达载体 pHY 连接, 采用电击转化方法转入感受态细胞中, 在含有卡那霉素的干酪素平板上筛选转化子. 其中, 重组载体 pHY-*apr* 的构建方案如图 2 所示.

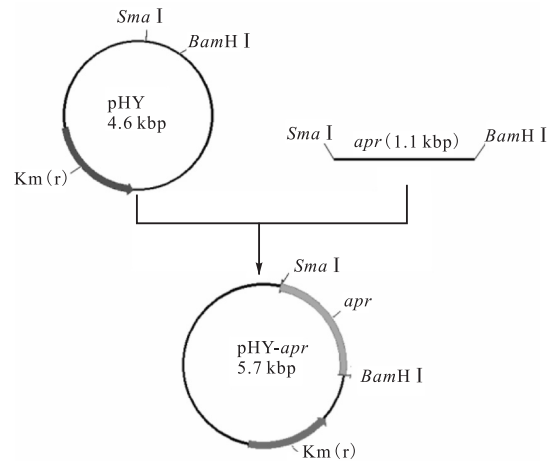
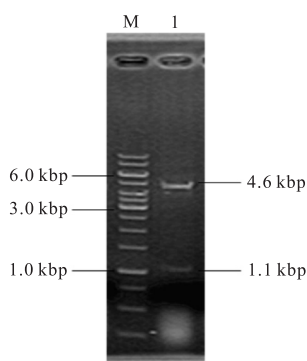


图 2 重组表达质粒的构建示意图

Fig. 2 Diagram of the construction of the recombinant plasmid

2.3 重组菌的筛选和鉴定

重组质粒经 *Bam*H I 和 *Sma* I 双酶切后得到两条大小分别为 4.6 kbp 和 1.1 kbp 的条带 (图 3), 表明目的基因已经插入到 pHY 载体上, 将该重组子命名为 pHY-*apr*.



M. Gene ruler 1 kbp DNA ladder; 1. 重组载体经 *Bam*H I/*Sma* I 酶切

图3 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombined plasmid through double digestion with *Bam*H I and *Sma* I

2.4 重组菌验证

将含有目的基因的载体与不含目的基因片段的空载转入地衣芽胞杆菌后,得到的转化子分别在酪素筛选培养基中进行点接,培养 32 h,结果如图 4 所示.



1. *B. licheniformis* H115/pHY-*apr* 菌株;

2. *B. licheniformis* H115/pHY 菌株

图4 重组菌鉴定

Fig. 4 Identification of the recombined bacteria

2.5 重组菌与出发菌株的产酶水平比较

在发酵过程中,每隔 8 h 进行取样,测定上清液酶活力.重组菌 H115/pHY-*apr* 在 LB 发酵培养基中发酵 56 h 时,酶活力达到最大,为 3 199 U/mL;而出发菌株 TCCC11006 在发酵 64 h 时酶活力仅为 1 758 U/mL(图 5).

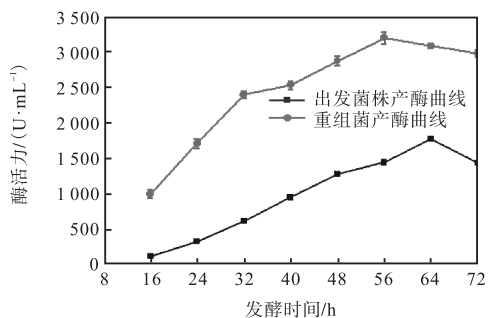


图5 重组菌与出发菌株发酵酶活的比较

Fig. 5 Comparison of the activities of alkaline proteases from the recombined strain and the starting strain

2.6 重组碱性蛋白酶水解酪蛋白工艺条件的确定

2.6.1 时间的变化对水解度的影响

重组碱性蛋白酶水解 2% 酪蛋白溶液时,其水解度(DH)随着时间的变化趋势如图 6 所示.由图 6 可知,水解时间为 0.5~2 h,水解度随着时间的增加而变大.当水解时间为 2 h 时,水解度达到 15.6%.继续增加水解时间,水解度保持不变.

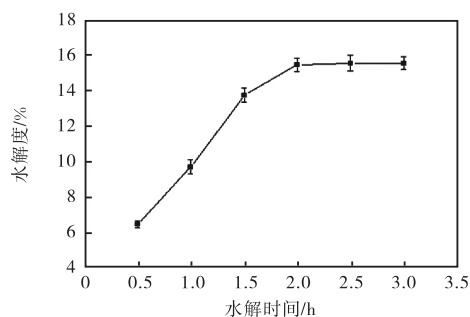


图6 不同时间段酪蛋白水解度比较

Fig. 6 Effects of time on the hydrolysis of casein

2.6.2 温度对水解度的影响

不同温度下,酪蛋白水解度的变化如图 7 所示.在 35~50 °C 的温度范围内,酪蛋白的水解度随着温度的增高而变大.当温度达到 50 °C 时,蛋白酶的水解度达到 17.9%.继续增加温度,水解度反而降低.

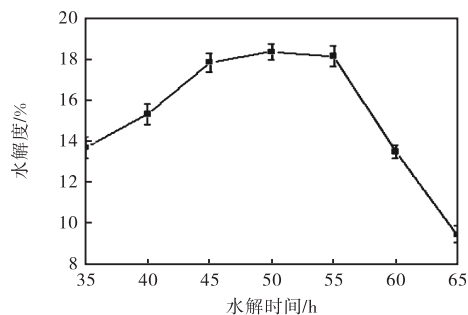


图7 温度对水解度的影响

Fig. 7 Effects of temperature on the degree of hydrolysis

2.6.3 pH 对水解度的影响

不同 pH 对水解度的影响如图 8 所示.当反应 pH 达到 9.5 时,其水解度最大,为 17.6%.但是,随着反应 pH 增大或减小,其水解度均逐渐变小.

2.6.4 酶添加量对水解度的影响

不同酶添加量对水解度的影响结果如图 9 所示.在一定量的酶添加量的范围内,酪蛋白的水解度随着酶量的增加而变大.添加量在 1 000~4 000 U/g 范围内,水解度变化较明显,但是继续增加酶的添加量时,其水解度基本保持不变.

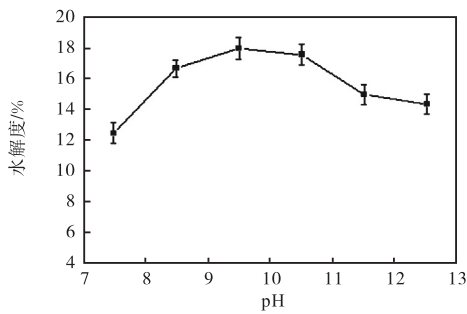


图8 pH对水解度的影响

Fig. 8 Effects of pH on the degree of hydrolysis

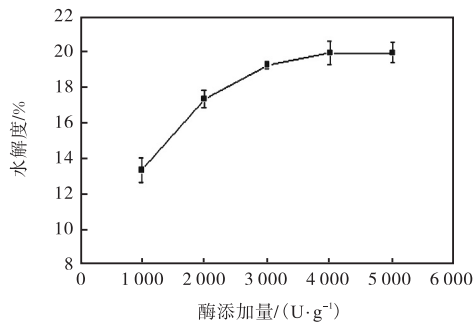


图9 酶添加量对水解度的影响

Fig. 9 Effects of the amount of enzyme on the degree of hydrolysis

2.6.5 正交实验

根据单因素实验结果,选取温度(A)、pH(B)、酶添加量(C)进行正交实验设计,进一步考察各因素对酪蛋白水解度的影响.正交实验结果见表1.

表1 水解度正交实验的因素水平和结果

Tab. 1 Factors, levels and results of orthogonal experiment of the degree of hydrolysis

编号	A/℃	B	C/(U·g ⁻¹)	水解度/%
1	45	8.5	2 000	16.9
2	45	9.5	3 000	17.3
3	45	10.5	4 000	17.5
4	50	8.5	3 000	19.2
5	50	9.5	4 000	20.4
6	50	10.5	2 000	18.3
7	55	8.5	4 000	19.4
8	55	9.5	2 000	18.6
9	55	10.5	3 000	19.2
k ₁	17.233	18.500	17.933	
k ₂	19.300	18.767	18.567	
k ₃	19.067	18.333	19.100	
R	2.067	0.434	1.167	

由表1可知,影响酪蛋白水解度的显著性大小的顺序为A>C>B.通过正交实验确定了最佳水解条件为:水解温度50℃,pH 9.5,酶添加量4 000 U/g.

2.7 酪蛋白磷酸肽的制备

2.7.1 酪蛋白磷酸肽得率

参照钡-乙醇沉淀法制备酪蛋白磷酸肽,用2g固体酪蛋白经过重组碱性蛋白酶在其最佳水解条件下进行水解,经过烘干后,得到酪蛋白磷酸肽粗品的质量为0.296g,得率为14.8%.

2.7.2 酪蛋白磷酸肽氮磷物质的量比

按照酪蛋白磷酸肽含氮量和含磷量测定方法进行测定,酪蛋白磷酸肽中氮含量为11.9%,磷含量为3.11%,氮磷物质的量比为8.47.

3 讨论

本研究将碱性蛋白酶基因apr成功导入地衣芽胞杆菌H115中,并实现了分泌表达,在LB液体培养基(50 mL/250 mL)中进行摇瓶发酵,其最大酶活力为3 199 U/mL,是出发菌株酶活的1.82倍,同时发酵周期较出发菌株缩短了8h,为碱性蛋白酶的大规模生产奠定了一定的基础.

酪蛋白磷酸肽作为功能性食品的添加剂,日益受到人们的关注.目前, CPP的生产主要依赖于动物源的胰蛋白酶,但是价格昂贵、提取较复杂、得率较低等一系列因素^[19],使得胰蛋白酶在CPP的大规模生产和应用方面受到限制.本研究中,利用微生物源的蛋白酶制备CPP,其中,用重组碱性蛋白酶水解2%酪蛋白溶液时,随着水解时间的逐渐增加,其水解度也不断增加,当水解时间达到2h后,其水解度基本维持在15.8%左右;由于蛋白酶对温度和pH比较敏感,研究发现,重组碱性蛋白酶在50℃、pH为9.5时,其水解度较大,可能原因是重组碱性蛋白酶在温度和pH不适宜的环境下,其稳定性差有所降低,使重组酶受到不同程度的影响,导致水解度的降低^[20];另外,由于酶与底物的结合是有一定限制的,所以对其酶添加量进行研究发现,酶添加量在4 000 U/g时,其水解度达到最大,所以本研究最终获得的最佳水解条件是水解时间2h,水解温度50℃,水解pH为9.5,酶添加量为4 000 U/g.

利用重组碱性蛋白酶在其最优水解条件下水解酪蛋白制备CPP, CPP的得率为14.8%,氮磷物质的量比为8.47,虽然得率与胰蛋白酶的17%相比稍有差距^[19].但是,本研究利用微生物源蛋白酶制备的CPP,具有更低的氮磷物质的量比,纯度更高,磷酸丝氨酸基团更容易得到富集,使得其结合钙离子的能力

越强,阻止钙离子沉淀的效果越好.这为其替代胰蛋白酶制备CPP以及在其他功能性食品的制作方面打下了坚实的基础.

参考文献:

- [1] Rao M, Tanksale A M, Ghatge M S, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 597-635.
- [2] Reng G, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(1): 15-32.
- [3] Deng A, Wu J, Zhang Y. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(18): 7111-7117.
- [4] Liu Y H, Zhang T, Zhang Z M. Improvement of cold adaptation of *Bacillus alcalophilus* alkaline protease by directed evolution[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, 106: 117-123.
- [5] Bhaskar N, Sudeepa E S, Rashmi H N, et al. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(14): 2758-2764.
- [6] Sareen R, Mishra P. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(3): 399-405.
- [7] Rathod M, Pathak A P, Rathod M G, et al. Wealth from waste: Optimized alkaline protease production from agro-industrial residues by *Bacillus alcalophilus* LW8 and its biotechnological applications[J]. *Journal of Taibah University for Science*, 2014, 8(4): 307-314.
- [8] Grebeskova R. Using alkaline protease to intensify the processing of leather raw material[J]. *Biotechnology*, 2007, 6(4): 788-791.
- [9] Phadatare S U, Deshpande V V, Srinivasan M C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*: enzyme production and compatibility with commercial detergents[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15(1): 72-76.
- [10] 黄文晶. 高产碱性蛋白酶重组菌及其发酵性能[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [11] Ketnawa S, Martínez-Alvarez O, Benjakul S, et al. Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion[J]. *Food Chemistry*, 2015, 192: 34-42.
- [12] Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(9): 945-960.
- [13] Dikshit K, Dikshit R P, Webster D A. Study of *Vitreoscilla* globin(vgb) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(14): 4149-4155.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23527—2009 蛋白酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [15] 杨文博, 张英华. 蛋白质水解度的测定方法研究[J]. *中国调味品*, 2014(3): 88-90.
- [16] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [17] 陈雪香, 罗珍, 刘飞, 等. 酪蛋白磷酸肽的质量评价方法研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(8): 75-77.
- [18] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009. 87—2003 食品中磷的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [19] 冯颖杰, 宗红, 诸葛斌, 等. 一种米曲霉蛋白酶的酶学性质及其在酪蛋白磷酸肽制备中的应用[J]. *微生物学通报*, 2015, 11(3): 35-42.
- [20] Liu W, Wang M, Shao W, et al. A novel model to determine the dipeptides responsible for optimum temperature in F/10 xylanase[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(3/4): 1389-1394.

责任编辑: 郎婧