



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160336

微生物碱性蛋白酶的研究与开发

刘逸寒, 王洪彬, 刘夫锋, 张会图, 秦慧民, 路福平

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 工业酶国家工程实验室,
天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 微生物碱性蛋白酶被广泛应用于洗涤、食品、皮革及纺织等制造工业中. 本文围绕碱性蛋白酶的研究与开发, 对微生物碱性蛋白酶的来源、表达调控、分子改造、构效关系及应用进行了阐述, 指出了今后的研究方向.

关键词: 碱性蛋白酶; 微生物来源; 表达调控; 构效关系; 应用

中图分类号: Q814.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2017)02-0001-06

The Research and Development of Microbial Alkaline Protease

LIU Yihan, WANG Hongbin, LIU Fufeng, ZHANG Huitu, QIN Huimin, LU Fuping

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Microbial alkaline proteases are widely used in the industrial process of laundry additives, food, leather and silk. This article introduces the latest development in the research of alkaline protease, including the source, expression regulation, structure-function relationship and the application of microbial alkaline protease. It also points out the direction for future research.

Key words: alkaline protease; microbial source; expression regulation; structure-function relationship; application

工业酶是重要的工业蛋白质, 其作为生物催化和生物转化的关键, 已被广泛应用到食品、医药、饲料、纺织、造纸、化工、环境、能源等重大工业领域^[1]. 在众多的工业用酶中, 微生物碱性蛋白酶是可在碱性条件下水解蛋白质肽键的酶类, 其最适 pH 一般为 9~11, 在洗涤剂、食品加工、皮革制造、纺织制造等工业中被广泛应用和研究^[1-2]. 因此, 本文针对微生物碱性蛋白酶的研究与开发进行综述.

1 产碱性蛋白酶的微生物

1945年, Jaag等首次发现了微生物碱性蛋白酶^[3]. 与动植物来源的碱性蛋白酶相比, 微生物碱性蛋白酶可分泌到细胞外, 更适合于工业化生产, 因此, 筛选产碱性蛋白酶的菌株逐渐成为了研究热点.

迄今为止, 产碱性蛋白酶的微生物主要从盐碱湖、深海、沙地等碱性环境中分离得到. 目前, 芽胞杆菌(*Bacillus*)、放线菌(*Actinomyces*)以及真菌均有报道可以产碱性蛋白酶. 芽胞杆菌有地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)、短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、嗜碱性芽胞杆菌(*Bacillus alcalophilus*)和克劳氏芽胞杆菌(*Bacillus clausii*)等; 放线菌有灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)、费氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)等; 真菌有米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)、蜂蜜曲霉(*Aspergillus melleus*)、酱油曲霉(*Aspergillus sojae*)等^[1-2]. 虽然已报道可产碱性蛋白酶的菌株有很多, 但目前碱性蛋白酶在工业生产中主要以芽胞杆菌属细菌为主, 在我国用于工业生产碱

收稿日期: 2016-10-18; 修回日期: 2016-12-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2013AA102106-07); 天津市科技支撑计划资助项目(16YFZCSY01040, 14ZCZDSY00012)

作者简介: 刘逸寒(1982—), 男, 天津人, 副教授; 通信作者: 路福平, 教授, lfp@tust.edu.cn

性蛋白酶的菌株主要为地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

2 碱性蛋白酶的表达调控

随着碱性蛋白酶市场需求的不断扩展, 研究工作者开始将注意力集中在碱性蛋白酶高产工程菌株的构建方面. 大肠杆菌 (*E. coli*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 作为首选宿主菌株被用于碱性蛋白酶的高效表达. 早在 1994 年, Vaughan 等^[4]将来源于节瘤拟杆菌 (*Dichelobacter nodosus*) 的碱性蛋白酶基因克隆至大肠杆菌并成功进行了功能表达, 但产量较低, 稳定性较差. 2010 年, Salamin 等^[5]在毕赤酵母中实现了碱性蛋白酶 Subtilisin 的功能表达, 蛋白酶产量仅为 10 mg/L, 仍难以满足工业生产的需要.

芽胞杆菌作为一种重要的原核表达宿主, 具有较强的蛋白分泌表达系统和蛋白酶耐受性以及相对完善的载体/宿主系统, 因此在碱性蛋白酶异源表达方面具有独特的优势. 研究发现^[6], 通过优化其表达调控元件可使碱性蛋白酶的表达量获得较大提高. 其中, 启动子是实现碱性蛋白酶基因高效表达的关键, 通过启动子系统的筛选和优化可使碱性蛋白酶基因的表达量得到大幅度提高. 组成型启动子无需任何诱导物, 可以持续性表达碱性蛋白酶编码基因. 芽胞杆菌中常用的组成型启动子为枯草芽胞杆菌来源的 *P43* 启动子, 该启动子为强启动子, 启动强度明显优于诱导型启动子 *PsacB* 和 *PamyE*, 被广泛用于表达载体的调控元件. Yang 等^[7]通过启动子诱捕技术, 从地衣芽胞杆菌基因组中筛选获得一个强启动子 *Pshuttle-09*, 其强度是 *P43* 的 8 倍. 与组成型启动子相比, 诱导型启动子可根据需要在特定的诱导条件, 快速诱导基因转录的“开”与“关”. 枯草芽胞杆菌中最常见的为受 IPTG 诱导的启动子, 此外还有以木糖为诱导物的启动子 *Pxyl*, 以及以蔗糖为诱导物的 *sacB* 启动子. 除此之外, 还有受淀粉诱导可持续性表达外源基因的启动子 *Pamy*, 以及受磷酸、柠檬酸盐、四环素、枯草菌素、细胞壁抗生素和甘氨酸等诱导的启动子^[8]. 可见, 芽胞杆菌启动子种类繁多, 而启动强弱也各有区别, 主要与启动子本身的结构和宿主细胞有关, 因此特定的碱性蛋白酶编码基因需要选用特定的启动子及适当的宿主细胞才能实现碱性蛋白酶的高效表达. 另外, 信号肽是另一个实现碱性蛋白酶高效表达的重要因素, Degering 等^[9]系统研究了 173 种来源于枯草芽胞杆菌的信号肽和 220 种来源于地

衣芽胞杆菌的信号肽对碱性蛋白酶 Subtilisin 产量的影响, 与原信号肽相比, 来源于地衣芽胞杆菌几丁质酶 (Chitinase) 的信号肽 dBli00338 可以使碱性蛋白酶 Subtilisin 在地衣芽胞杆菌 H402 中的分泌表达量提高 7~8 倍, 在枯草芽胞杆菌 TEB1020 中提高 6~7 倍; 而来源于枯草芽胞杆菌的信号肽 sYbdN 也可大幅度提高 Subtilisin 的分泌表达量.

3 碱性蛋白酶的构效关系

不同来源及特性的碱性蛋白酶, 呈现出不同的三维结构特征.

3.1 碱性蛋白酶的结构

3.1.1 嗜冷碱性蛋白酶

嗜冷碱性蛋白酶 (psychrophilic alkaline protease) 由 $\alpha\beta$ 折叠和反平行 β -三明治结构域组成 (图 1), 其催化结构域为 $\alpha\beta$ 折叠, 锌离子为催化反应的激活剂; 活性中心含有 HEXXHXXGXXH 结合模体, His173、His179、Tyr209 形成了催化活性中心^[10]; 底物结合位点位于催化活性中心, 位于 $\alpha\beta$ 折叠结构域的上方.

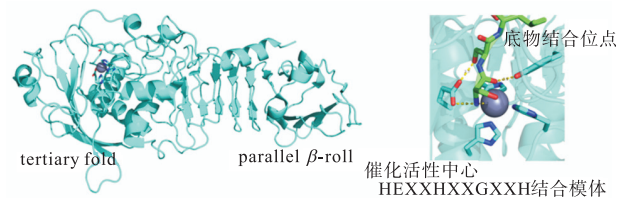


图 1 嗜冷碱性蛋白酶的结构解析

Fig. 1 Structural analysis of psychrophilic alkaline protease

3.1.2 嗜盐碱性蛋白酶

嗜盐碱性蛋白酶 (halophilic alkaline protease) 呈现出不同的结构^[11], 是由两个 β -桶结构域组成; 催化活性中心由 His41、Asp91、Ser169 组成 (图 2).

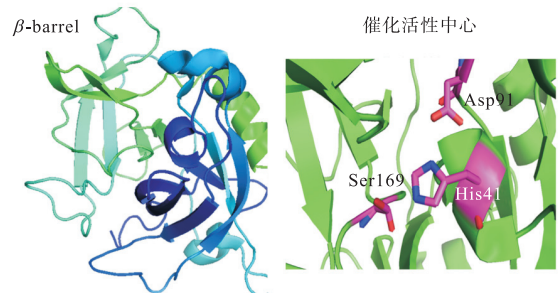


图 2 嗜盐碱性蛋白酶的结构解析

Fig. 2 Structural analysis of halophilic alkaline protease

3.1.3 芽胞杆菌属碱性蛋白酶

芽胞杆菌属碱性蛋白酶 KP-43 (alkaline protease KP-43 from *Bacillus* sp.) 具有 α/β 折叠和反平行 β -桶结构域组成(图 3), Asp30、His68、Ser255 形成催化活性中心,底物结合位点位于催化活性区上方,被 α 螺旋区域和 Loop 区所包围^[12-13]。碱性蛋白酶 KP-43 具有独特的反平行 β -桶结构域,以及 3 个钙离子结合位点,分别为 Ca I、Ca II 和 Ca III。其热稳定性与 3 个钙离子结合位点密切相关(图 3),结构分析发现 Ca I 位于 α/β 结构域;Ca II、Ca III 分别位于 β -桶结构域;3 个钙离子通过氢键网分别与酶分子的氨基酸相结合。碱性蛋白酶 KP-43 另外一个特点是具有抗氧化性^[14],通过结构分析发现,其活性位点周围存在的两个甲硫氨酸 M251、M256 对酶的抗氧化活性起到关键作用。

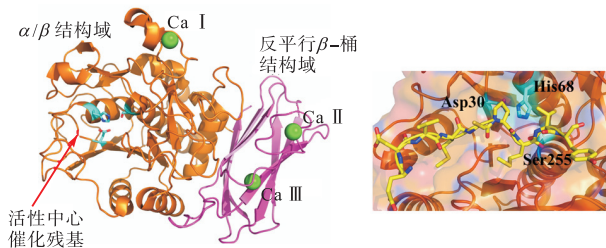


图 3 芽胞杆菌属碱性蛋白酶 KP-43 的结构解析

Fig. 3 Structural analysis of alkaline protease KP-43 from *Bacillus* sp.

3.1.4 克劳氏芽胞杆菌碱性蛋白酶

克劳氏芽胞杆菌碱性蛋白酶 (alkaline protease from *B. clausii*) 具有 α/β 折叠的单结构域(图 4), Asp32、His65、Ser221 为其催化活性中心的 3 个氨基酸残基, Arg19、Arg275、Glu271 形成了其特有的盐桥结构^[15]。

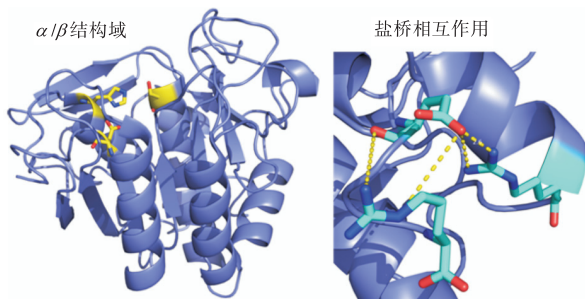
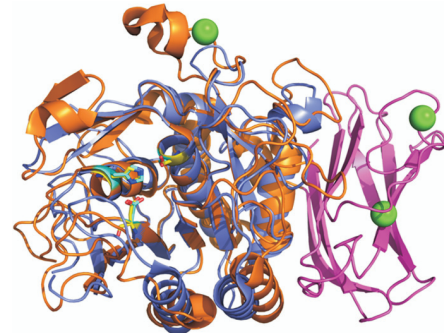


图 4 克劳氏芽胞杆菌碱性蛋白酶的结构解析

Fig. 4 Structural analysis of alkaline protease from *B. clausii*

通过比较克劳氏芽胞杆菌碱性蛋白酶与芽胞杆菌属碱性蛋白酶 KP-43 发现,两种碱性蛋白酶催化

残基完全保守, β -折叠区域与分子内部核心区的 α 螺旋空间位置一致,但外围 α 螺旋区及 Loop 区域空间位置具有很大差异(图 5)。

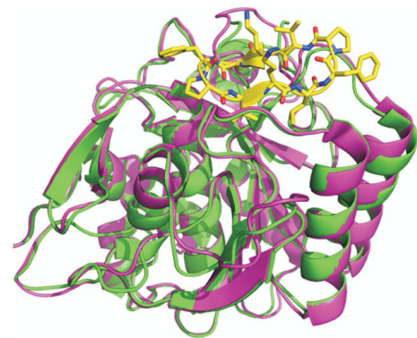


蓝色:碱性蛋白酶(克劳氏芽胞杆菌)
橙色:碱性蛋白酶KP-43(芽胞杆菌属)

图 5 克劳氏芽胞杆菌碱性蛋白酶与芽胞杆菌属碱性蛋白酶 KP-43 的结构比较

Fig. 5 Structural comparison between alkaline protease from *B. clausii* and *Bacillus* sp.

通过比较克劳氏芽胞杆菌碱性蛋白酶与地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 碱性蛋白酶发现,两种碱性蛋白酶在氨基酸序列上具有 50% 相似度,但其立体结构高度保守,均由 α/β 折叠单结构域组成,底物结合区域也相同(图 6)。



紫色:碱性蛋白酶(克劳氏芽胞杆菌)
绿色:碱性蛋白酶(地衣芽胞杆菌)

图 6 克劳氏芽胞杆菌碱性蛋白酶与地衣芽胞杆菌碱性蛋白酶的结构比较

Fig. 6 Structural comparison between alkaline protease from *B. clausii* and *B. licheniformis*

3.2 碱性蛋白酶的改造

基于碱性蛋白酶的结构特征,研究工作者通过改变碱性蛋白酶不同位置的氨基酸残基,研究其对抗氧化性、热稳定性和催化活性的影响。

3.2.1 抗氧化性

由于洗涤用碱性蛋白酶在使用过程中会遇到强氧化剂,所以亟需提高碱性蛋白酶的抗氧化能力。Stauffer 等^[16]将碱性蛋白酶 Subtilisin Carlsberg

经双氧水处理,发现仅有 222 位蛋氨酸被氧化成蛋氨酸亚砷,而另外 4 个蛋氨酸没有被氧化;氧化后碱性蛋白酶活性降低 57% ~ 92%,降低程度随所用酶浓度不同而变化;为了提高碱性蛋白酶的抗氧化能力,对活性位点附近的 222 位蛋氨酸进行改造,当将 Met222 突变为 Ala 或 Cys 时虽然会大大降低酶活力,分别为野生型的 20% 和 30%,但由于突变酶具有更高的抗氧化能力,其洗涤能力分别比野生型高出 54% 和 51%。Vojcic 等^[17]改造来源于枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) DB104 的 Subtilisin Carlsberg,获得两种突变体 M4(T58/W216M/M221) 和 M6(T58A/W216L/M221C),可分别将其抗氧化性能提高 2.6 倍和 1.5 倍。

3.2.2 热稳定性

引入分子间二硫键来提高蛋白质稳定性是最常用的方法之一。Takagi 等^[18]利用定点突变技术在枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) Subtilisin E 碱性蛋白酶的 61 和 98 位引入两个半胱氨酸,使其形成二硫键,结果表明突变体的半衰期提高了 2 ~ 3 倍, T_m 值比野生型高 4.5 °C。Huang 等^[19]发现短小芽胞杆菌 (*Bacillus pumilus*) 碱性蛋白酶 V149 突变成 I 会破坏底物结合区域的柔性,通过增强酶和底物之间的亲和性来提高酶的热稳定性,突变体的半衰期是野生型的 2 倍;与之相反, R249E 突变会破坏蛋白酶 C-末端的相互作用,从而导致酶的热稳定性降低,其半衰期仅为野生型的 26.4%。

3.2.3 催化活性

目前提高碱性蛋白酶催化活性的常用方法主要有以下 3 种。

(1) 增加碱性蛋白酶活性位点(尤其是 Loop 区)附近结构的柔性。通过在 Subtilisin PB92 活性位点附近的柔性 Loop 区域增加一个或数个氨基酸残基,进一步提高该 Loop 区域的柔性,可增强碱性蛋白酶和底物之间的结合能力,从而起到提高其催化活性的目的^[20]。

(2) 改变蛋白酶表面的带电性质或等电点。将嗜碱芽胞杆菌 (*Bacillus alcalophilus*) 碱性蛋白酶(SBA) 表面 110 位的 Glu 突变为 Ala,突变体在 10 °C 催化活性提高了 50%^[21];将吉氏芽胞杆菌 (*Bacillus gibsonii*) 碱性蛋白酶(BgAP) 表面的 Asn 和 Gln 分别突变为 Asp 和 Glu,可提高其催化活性,但降低了其最适 pH^[22];碱性蛋白酶 Subtilisin 309(即 Savinase) 中 42、114 和 115 位的 Asn 突变为 Arg 的突变体,在 pH 10 ~ 11、温度 46 ~ 58 °C 之间具有较高的催化活性,

同时还具有较长的存储时间^[23]。

(3) 活性位点附近优化,提高底物和活性位点之间的亲和性。Wells 等^[24]将 Subtilisin Carlsberg 活性位点(即 Asp32、His64 和 Ser221)附近的 Glu156 和 Asp166 均突变为 Lys,可使其催化活性提高 1 900 倍以上,而 K27R、N87S、T274A 则对活性影响较小或基本没有影响。

4 碱性蛋白酶的应用

碱性蛋白酶因其相对较强的水解能力和耐碱能力,可广泛应用于食品、洗涤、皮革和饲料等工业领域。

4.1 碱性蛋白酶在食品行业中的应用

碱性蛋白酶具有相对较强的水解能力,并且因为多数动植物蛋白的碱溶性比较好,所以碱性蛋白酶对大部分动植物蛋白的水解效率相对要高,可有效应用于动植物蛋白的加工,以改善蛋白食品的品质和风味,增强食品的营养和功能,制备生物活性肽等。目前,国内外已开发了玉米肽、大豆肽、乳肽、降血压肽和抗氧化肽等多种多样的生物活性肽产品。通过蛋白酶水解动植物蛋白,尤其是蛋白类废料或副产品,转化成附加值比较高的生物活性多肽,将会大大促进动植物蛋白资源的综合利用。

尽管碱性蛋白酶在碱性条件下水解能力较强,但其很少单独应用于蛋白水解,而是主要与其他种类蛋白酶制剂配成复合酶制剂,然后应用于蛋白水解,以期获得更好的风味或更高的水解度。路福平等^[25]以中成药血必净药渣为材料,利用蛋白酶水解制备生物活性肽,通过考察比较酸性、中性和碱性蛋白酶水解药渣的效果,确定了复合蛋白酶配方及水解工艺;梁秋丽等^[26]以水解度为指标,比较了不同蛋白酶对大豆分离蛋白的水解能力,结果显示碱性蛋白酶的水解寡肽收率最高,在此基础上进一步采用多酶复合水解,通过复合比例的优化获得了比单独采用碱性蛋白酶更高的寡肽收率;李绮丽等^[27]运用碱性蛋白酶和中性蛋白酶双酶水解米渣蛋白质,经两次酶解所得米渣蛋白酶解液,水解度达到了 15%,高于单独使用碱性蛋白酶或者中性蛋白酶的水解度;Bah 等^[28]采用两种碱性蛋白酶和两种真菌来源的蛋白酶分别水解牛血清蛋白,发现不同酶制剂水解的产物在生理活性上差异很大;Ko 等^[29]采用碱性蛋白酶、胰蛋白酶等酶制剂水解比目鱼,从中分离鉴定到了两种抗氧化性能优异的多肽。由此可见,不同种类的蛋白酶协同水解

底物蛋白之所以能够获得更高的水解效率,原因在于不同种类蛋白酶在水解位点上存在差异和互补性。

4.2 碱性蛋白酶在洗涤行业中的应用

碱性蛋白酶是最早应用于洗涤剂产品的酶制剂种类,而目前洗涤剂用酶已由单一型转变为复合型,即不仅添加蛋白酶,还添加淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶等酶类,以满足消费者对多种污渍类型去除的需求。但是,蛋白酶作为一种蛋白质降解酶,在加酶洗涤剂的存储过程中不仅水解自身,也会分解产品中的其他酶。因此,有效抑制蛋白酶的活性就成了维持复合酶稳定性的关键技术。传统的酶稳定剂为硼酸和丙二醇体系,该体系可以在产品贮存过程时起到抑制蛋白酶的作用,而在洗涤过程中随着其浓度的稀释,蛋白酶的活力又可以释放出来。研究工作者很早了解到苯基硼酸及其同分异构体对蛋白酶活性有可逆的抑制作用,诺维信公司开发了高效的蛋白酶抑制剂4-FPBA用于稳定洗涤剂碱性蛋白酶产品,随后又致力于开发以肽醛为基础的抑制剂,理论上其安全性更高,对环境更为友好^[30]。

酶制剂在洗涤剂配方中的稳定性一直是加酶洗涤剂发展的关键技术难题,而复合酶制剂在洗涤剂配方中的稳定性则是一个更大的技术挑战。对于固体洗衣粉而言,通过包裹造粒等技术已经很好地解决了酶制剂的稳定性。但对液体洗涤剂而言,因是溶液体系,酶分子会与水、表面活性剂以及其他洗涤助剂充分接触,所以很容易变性失活。1999年,诺维信公司开发出了微胶囊型的液体碱性蛋白酶产品 Savinase LCC^[31],用于液体洗涤剂中酶的复配使用,表现出了较好的稳定性。随着洗涤剂种类和用途的变化,复合型加酶洗涤剂产品将不断地进入市场,洗涤剂中增加复合酶制剂的用量、尽量降低化学物质总量将成为洗涤剂行业发展的一个必然趋势,因此洗涤用酶制剂的市场前景较好。

4.3 碱性蛋白酶在制革行业中的应用

自20世纪初Rohm公司尝试用酶软化和脱毛以来,皮革用酶已有一百多年的历史,但至今仍未成为制革工艺的主流技术。碱性蛋白酶可以应用于制革工艺的浸水、浸灰、脱毛、软化和废水处理等多个环节^[32-33]。浸水工序的目的是使生皮吸收水分恢复到鲜皮状态。传统方法主要是采用表面活性剂来加速浸水。而采用蛋白酶浸水,能切断生皮干燥过程中形成的交联键,溶解和除去纤维间质,进而促进生皮的回湿。浸水酶制剂主要是碱性蛋白酶,它对非胶原蛋白去除效果明显,目前产品主要有诺维信公司生产的

NovocorS、德瑞公司(TFL)的 ErhazymC、希伦赛勒赫公司的 AgIntanPR等。浸灰环节的作用是松散胶原纤维,碱性蛋白酶应用于浸灰,可以促进皮纤维的松散,减少其他助剂的使用量,增加革的柔软性和强度等。诺维信公司的 NUE0.6MPX 是目前的市场主力产品,浸灰要求蛋白酶具有很强的耐碱性。碱性蛋白酶也可以用于脱毛环节^[34],但目前尚存在一些问题,水解程度难以控制,在脱毛的同时对胶原纤维的破坏比较大,而且毛通常难以完全去除。

虽然目前碱性蛋白酶在制革工业中还面临以上问题,但随着我国政府和国民对环境保护重视程度的提高,通过酶技术等绿色生产技术,革新传统高污染的皮革工业,已成为研究与应用的热点和趋势。

5 展望

随着各工业领域的进一步发展,碱性蛋白酶的市场仍在逐步扩大,这对碱性蛋白酶的催化特性、活性、生产以及应用均提出了更高的要求。因此,应继续对碱性蛋白酶进行如下方面的研究:挖掘与改造碱性蛋白酶分子,以适应不同加工种类和过程的需求,如耐热、嗜冷、抗氧化等;构建与优化碱性蛋白酶高效表达系统,创建其高产菌株;调整与控制碱性蛋白酶发酵工艺,实现其规模化高水平的制备;开发与拓展碱性蛋白酶应用技术,提升其应用效能和应用领域。对碱性蛋白酶相关理论和技术问题不断的探索和突破,可为我国酶制剂工业的理论和技术创新提供重要支撑,对于推动我国酶制剂行业的纵深发展和产业链升级具有重要意义。

参考文献:

- [1] Kumar C G, Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint[J]. *Biotechnology Advances*, 1999, 17(7): 561-594.
- [2] 邓菊云. 微生物碱性蛋白酶研究进展[J]. *现代食品科技*, 2008, 24(3): 293-296.
- [3] Rose A H. *Economic Microbiology*[M]. London: Academic Press, 1980: 51-72.
- [4] Vaughan P R, Wang L F, Stewart D J, et al. Expression in *Escherichia coli* of the extracellular basic protease from *Dichelobacter nodosus*[J]. *Microbiology*, 1994, 140(8): 2093-2100.
- [5] Salamin K, Sriranganadane D, Léchenne B, et al. Secretion of an endogenous subtilisin by *Pichia pastoris*

- strains GS115 and KM71[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(13): 4269–4276.
- [6] Ye R, Kim J H, Kim B G, et al. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 62(1): 87–96.
- [7] Yang M, Zhang W, Ji S, et al. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56321.
- [8] 余小霞, 田健, 刘晓青, 等. 枯草芽胞杆菌表达系统及其启动子研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(2): 35–44.
- [9] Degering C, Eggert T, Puls M, et al. Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6370–6376.
- [10] Hege T, Feltzer R E, Gray R D, et al. Crystal structure of a complex between *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and its cognate inhibitor[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(37): 35087–35092.
- [11] Villeret V, Chessa J P, Gerday C, et al. Preliminary crystal structure determination of the alkaline protease from the Antarctic psychrophile *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Protein Science, 1997, 6(11): 2462–2464.
- [12] Baumann U, Wu S, Flaherty K M, et al. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: A two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif[J]. The EMBO Journal, 1993, 12(9): 3357–3364.
- [13] Yang N, Nan J, Brostromer E, et al. Crystal structure of an alkaline serine protease from *Nesterenkonia* sp. defines a novel family of secreted bacterial proteases[J]. Proteins, 2008, 73(4): 1072–1075.
- [14] Sellami-Kamoun A, Haddar A, Ali E H, et al. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations[J]. Microbiological Research, 2008, 163(3): 299–306.
- [15] Yamane T, Kani T, Hatanaka T, et al. Structure of a new alkaline serine protease(M-protease) from *Bacillus* sp. KSM-K16[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 1995, 51(2): 199–206.
- [16] Stauffer C E, Etson D. The effect on subtilisin activity of oxidizing a methionine residue[J]. Journal of Biological Chemistry, 1969, 244(19): 5333–5338.
- [17] Vojcica L, Despotovica D, Maurerb K H, et al. Reengineering of subtilisin Carlsberg for oxidative resistance[J]. Biological Chemistry, 2012, 394(1): 79–87.
- [18] Takagi H, Takahashi T, Momose H, et al. Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(12): 6874–6878.
- [19] Huang R, Yang Q J, Feng H. Single amino acid mutation alters thermostability of the alkaline protease from *Bacillus pumilus*: Thermodynamics and temperature dependence[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015, 47(2): 98–105.
- [20] Mulder F A, Schipper D, Bott R, et al. Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline *Bacillus* subtilisins[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 292(1): 111–123.
- [21] Liu Y H, Zhang T, Zhang Z M, et al. Improvement of cold adaptation of *Bacillus alcalophilus* alkaline protease by directed evolution[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 106: 117–123.
- [22] Martinez R, Jakob F, Tu R, et al. Increasing activity and thermal resistance of *Bacillus gibsonii* alkaline protease(BgAP) by directed evolution[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(3): 711–720.
- [23] Amory A, Clippe A, Konieczny-Janda G, et al. High-alkaline protease and its use arginine-substituted subtilisin composition and use: United States, 6190904[P]. 2001–02–20.
- [24] Wells J A, Powers D B, Bott R R, et al. Designing substrate specificity by protein engineering of electrostatic interactions[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(5): 1219–1223.
- [25] 路福平, 杨霁菡, 王永帅, 等. 蛋白酶水解中药渣制备生物活性肽工艺探讨[J]. 轻工学报, 2016, 31(1): 12–16.
- [26] 梁秋丽, 方佳茂, 罗石柱, 等. 高水解度大豆寡肽专用复合酶的配方优化[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 254–258.
- [27] 李绮丽, 吴卫国, 张喻, 等. 双酶法水解米渣蛋白工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2011(1): 19–22.