

耿 静,韩秋霞,高文静,等. 一株产蛋白酶的中度嗜盐菌 *Salinivibrio* sp. MK070915 的选育及产酶条件优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(5):287-294.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.056

一株产蛋白酶的中度嗜盐菌 *Salinivibrio* sp. MK070915 的选育及产酶条件优化

耿 静,韩秋霞,高文静,肖丽娇

(山东科技大学化学与环境工程学院,山东青岛 266590)

摘要:以 1 株筛选自盐浓度为 21% 海盐水的中度嗜盐菌 *Salinivibrio* sp. MK070915 为研究对象,该菌株可产胞外蛋白酶。以 Gibbons 培养基为基底,采用单因素试验和最陡爬坡试验相结合的方法对影响嗜盐菌产蛋白酶能力的重要培养基成分和工艺条件进行筛选,确定主要影响因素及其取值范围;并在此基础上,通过 Design-Expert 软件对主要影响因素进行四因素三水平响应面试验设计,以蛋白酶活性为响应值优化菌株产酶的培养条件,并验证响应面模型预测值与实测值的一致性。结果表明,最优培养条件如下:以 Gibbons 培养基为基底,NaCl 浓度为 5%,pH 值为 8,培养温度为 20 ℃,碳源为麦芽糖,含量为 1.85%,蛋白胨的含量为 1.17%,KCl 的含量为 1.0%,柠檬酸钠的含量为 5%,经响应面分析得到的蛋白酶活性为 44.09 U,与预期值 44.22 U 相比,差异为 0.299%。结果丰富了嗜盐蛋白酶的研究和开发依据,为高盐环境下食品工业催化和农业制剂催化提供了理论基础。

关键词:嗜盐蛋白酶;单因素试验;响应面法;最陡爬坡试验;影响因素

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)05-0287-08

嗜盐菌通常是指在高盐环境中可以进行正常生长和生理代谢的微生物^[1-2]。在高盐环境中生长的嗜盐微生物能够利用多种营养物质进行代谢活动,并能分泌淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶、木聚糖酶和纤维素酶等胞外水解酶,这些酶被称为嗜盐水解酶,能够在高盐环境下催化完成许多水解反应^[1-3]。除此之外,许多嗜盐水解酶热稳定性非常好,且能适应广泛的 pH 值环境。由于具有这些独特的性质,嗜盐水解酶在不利的条件下对生物技术应用具有吸引力^[4-7]。

优化发酵培养基和工艺条件是提高蛋白酶产量的重要途径之一,也是开发低成本发酵工艺的重要步骤之一^[8-10]。响应面分析法(RSM)是酶工业生产中培养基优化和工艺优化的有效工具。在优化之前筛选重要参数非常重要,其目的是忽略次要参数,减少试验次数,以方便试验的进行,其中单因素试验和最陡爬坡试验相结合的方法是最为常用的研究手段^[10-13]。本研究以 1 株筛选自 21% 海盐

水的可产蛋白酶的中度嗜盐菌为研究对象,采用单因素试验和最陡爬坡试验相结合的方法分析菌株产蛋白酶的主要影响因素,确定各因素最佳浓度,并在此基础上进行四因素三水平响应面试验设计,进行验证试验,进而得到菌株产蛋白酶的最优培养基成分和工艺条件。

1 材料与方法

1.1 菌株样品来源

采集山东省昌邑市某盐场浓度为 21% 海盐水水平面下 15 cm 处的水样,4 ℃ 暂存。带回后稀释水样并涂布,分离纯化后,得到中度嗜盐菌 MK070915,斜面保藏于冰箱中。

1.2 试剂和培养基

1.2.1 主要试剂 干酪素,购自北京 Solatrio 有限公司;福林酚试剂,购自国药集团化学试剂有限公司;三氯乙酸,购自天津市广成化学试剂有限公司;碳酸钠购自天津市巴斯夫化工贸易有限公司;L-酪氨酸,购自天津迪博化工有限公司。

1.2.2 培养基 液体 Gibbons 培养基(GM):酪素水解物 5 g,酵母浸出物 10 g,蛋白胨 5 g,柠檬酸钠 3 g,MgSO₄·7H₂O 20 g,KCl 2 g,NaCl 100 g,蒸馏水 1 000 mL。固体 GM:在液体 GM 的基础上添加 2%

收稿日期:2018-12-24

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2014EMM005)。

作者简介:耿 静(1993—),女,山东淄博人,硕士研究生,研究方向为嗜盐微生物产酶。E-mail:15764230941@163.com。

的琼脂。灭菌条件:121 ℃,20 min。

筛选培养基:在固体 GM 的基础上添加 1% 脱脂奶粉。灭菌条件:115 ℃,10 min。

1.3 产蛋白酶菌株的筛选

1.3.1 菌株的初筛 将纯化后的菌株点种于筛选培养基上,37 ℃ 下倒置培养 3~5 d,观察菌落周围是否出现透明水解圈。

1.3.2 菌株的复筛

1.3.2.1 粗酶液的制备 将纯化后的菌株按 2% (质量/体积)的比例接种至液体 GM 中,在 37 ℃、200 r/min 条件下培养 72 h 后,将菌液在 4 ℃、8 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,即粗酶液,备用。

1.3.2.2 菌株的复筛 制作牛奶-盐-琼脂固体平板并放置牛津小杯,作标记;以空白 GM 作对照,未离心的菌液作为试验组 1,粗酶液作为试验组 2,分别加入到牛津小杯中,于 37 ℃ 培养箱中放置 12 h,观察透明圈生成情况。

牛奶-盐-琼脂固体培养基:脱脂牛奶 25 g,NaCl 25 g,蒸馏水 1 000 mL,琼脂添加量 2%。

1.4 福林酚法测定蛋白酶活性

参照 SB/T 10317—1999《蛋白酶活力测定法》,采用福林酚法测定蛋白酶活性。

酶活性定义:将在温度为 40 ℃、pH 值为 7.0 的条件下,1 mL 粗酶液 1 min 水解酪素产生 1 μg 酪氨酸作为 1 个酶活性单位,用 U 来表示。

1.5 系统发育分析

委托生工生物工程(上海)股份有限公司对活化后的菌株进行 16S rDNA 测序,并采用 MEGA 7.0 软件中的邻接法对所测得的序列进行系统发育树构建^[2]。

1.6 菌株生长条件和营养物质利用

1.6.1 菌株生长条件 将液体 GM 的 NaCl 浓度分别设置为 0、5%、10%、15%、20%、25%,pH 值分别设置为 5、6、7、8、9、10;将培养温度分别设置为 10、15、20、25、30、35、40 ℃;向液体 GM 中分别添加金属离子 Fe³⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺,使各金属离子终浓度为 5 mmol/L。将活化后的菌株按 2% (质量/体积)的比例接种至上述培养基中,于 37 ℃、200 r/min 下振荡培养 72 h;每隔 4 h 取样 1 次,制备粗酶液,测定蛋白酶活性。

1.6.2 营养物质的利用 以酵母浸出物(对照)葡萄糖、淀粉、蔗糖、乳糖、糊精、麦芽糖和甘露醇为唯

一碳源添加到液体 GM 中;以蛋白胨(对照)、脱脂牛奶、明胶、牛肉浸粉、胰蛋白胨、酪蛋白、酵母浸粉、酪素水解物、氯化铵、亚硝酸钠和硝酸铵为唯一氮源添加到液体 GM 中,将活化后的菌株按 2% (质量/体积)的比例分别接种至上述培养基中,于 37 ℃、200 r/min 下振荡培养 72 h,制备粗酶液,测定蛋白酶活性。

1.7 单因素试验和最陡爬坡试验

对培养基的各组成部分进行产酶单因素试验,根据单因素试验结果,分别设置 4 个因素的最陡爬坡试验,按照不同因素、不同水平配制培养基,将活化后的菌株按 2% (质量/体积)的比例接种于上述培养基中,于 37 ℃、200 r/min 下振荡培养 72 h,制备粗酶液,测定蛋白酶活性。单因素试验设置如下:碳源浓度梯度为 0%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%、0.35%;氮源浓度梯度为 0%、0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25%、1.50%、1.75%、2.00%;KCl 添加终浓度分别为 0.5‰、1.0‰、1.5‰、2.0‰、2.5‰、3.0‰;柠檬酸钠添加终浓度分别为 1‰、2‰、3‰、4‰、5‰、6‰。

1.8 响应面法优化菌株产酶条件

根据单因素试验结果以及 Box-Behnken 设计原则,4 个因素分别以 A(麦芽糖)、B(蛋白胨)、C(KCl)和 D(柠檬酸钠)表示,以单因素试验结果的最佳条件作为中水平,即 0 水平,响应面试验设计的因素和水平见表 1。

表 1 菌株培养条件优化响应面试验因素与水平

因素水平	A:麦芽糖 (%)	B:蛋白胨 (%)	C:KCl (‰)	D:柠檬酸钠 (‰)
-1	1.0	0.75	1	3
0	1.5	1.00	2	4
1	2.0	1.25	3	5

1.9 数据处理

生长特性和产酶特性试验分别设置 3 组平行样品,按照时间间隔分别取样测定蛋白酶活性,取平均值,并绘制生长特性和产酶特性曲线。营养物质利用试验、单因素试验以及最陡爬坡试验均测定 3 次,用 SPSS 18.0 软件为测得的数据进行显著性分析,并根据响应面结果对优化数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选

如图1所示,菌株MK070915在初筛平板上产

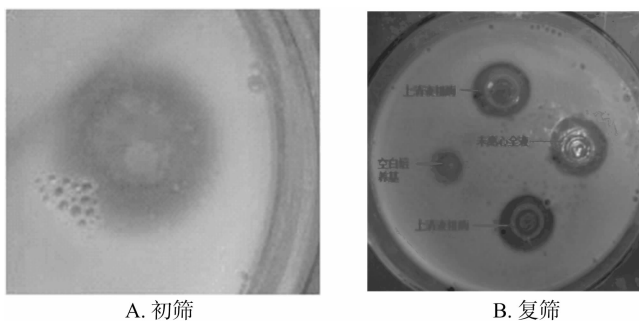


图1 菌株 MK070915 初筛和复筛结果

生透明水解圈,说明其具有产蛋白酶的能力。

2.2 系统发育分析

将通过生工生物工程(上海)股份有限公司测序得到的 16S rDNA 序列提交到 GenBank 中进行同源性比较,并利用 MEGA 7.0 软件中的邻接法进行

系统发育树的构建,结果如图 2 所示。MK070915 菌株与 *Salinicibrio* 属内 *Salinicibrio costicola* 18 AG 的同源性为 91%,说明它们为同种微生物,结合形态学和生理生化特征,确定该菌株为 *Salinicibrio* 属成员,因此将其命名为 *Salinicibrio* sp. MK070915。

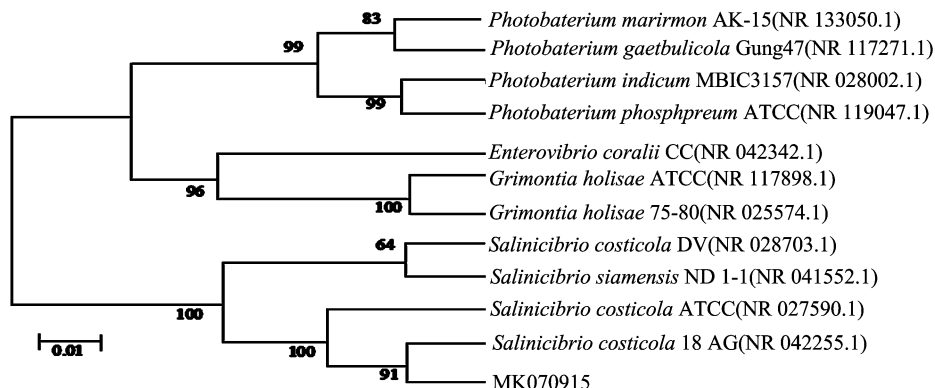


图2 菌株 *Salinicibrio* sp. MK070915 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析

2.3 福林酚法测定蛋白酶活性标准曲线

采用福林酚法测定蛋白酶活性,以标准品 *L*-酪氨酸浓度(x)为横坐标、对应浓度的吸光度(y)为纵坐标绘制蛋白酶活性标准曲线(图 3)。曲线方程为 $y = 0.0110x + 0.0333$, $r^2 = 0.9995$,可信度较高,可用。而蛋白酶活性的计算公式为

$$x = D \times K \times n \times 4 / 10.$$

式中: x 为样品的蛋白酶活性, U/g 或 U/mL; D 为平行试验中样品的平均吸光度; K 为吸光常数; n 为稀释倍数。带入方程可得, $K = 84.374$ 。

2.4 菌株生长条件和营养物质利用

经 3 次试验发现, MK070915 菌株均不能生长于 NaCl 浓度为 0%、20%、25% 以及 pH 值为 5 和 10 的条件下,因此本研究不再对这些处理进行分析。如图 4-A 所示,菌株可以在 NaCl 浓度为 5%~15% 的培养基中生长并产生蛋白酶,当 NaCl 浓度为 5% 时,该菌株的生长和产酶能力最大,因此,判断该

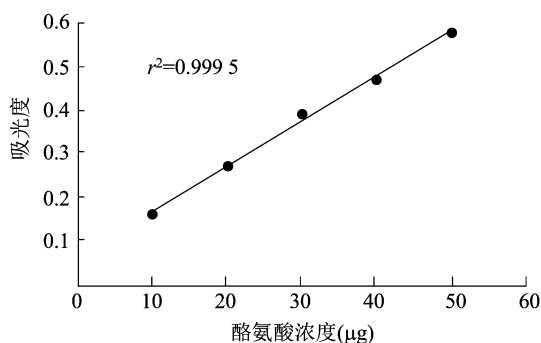
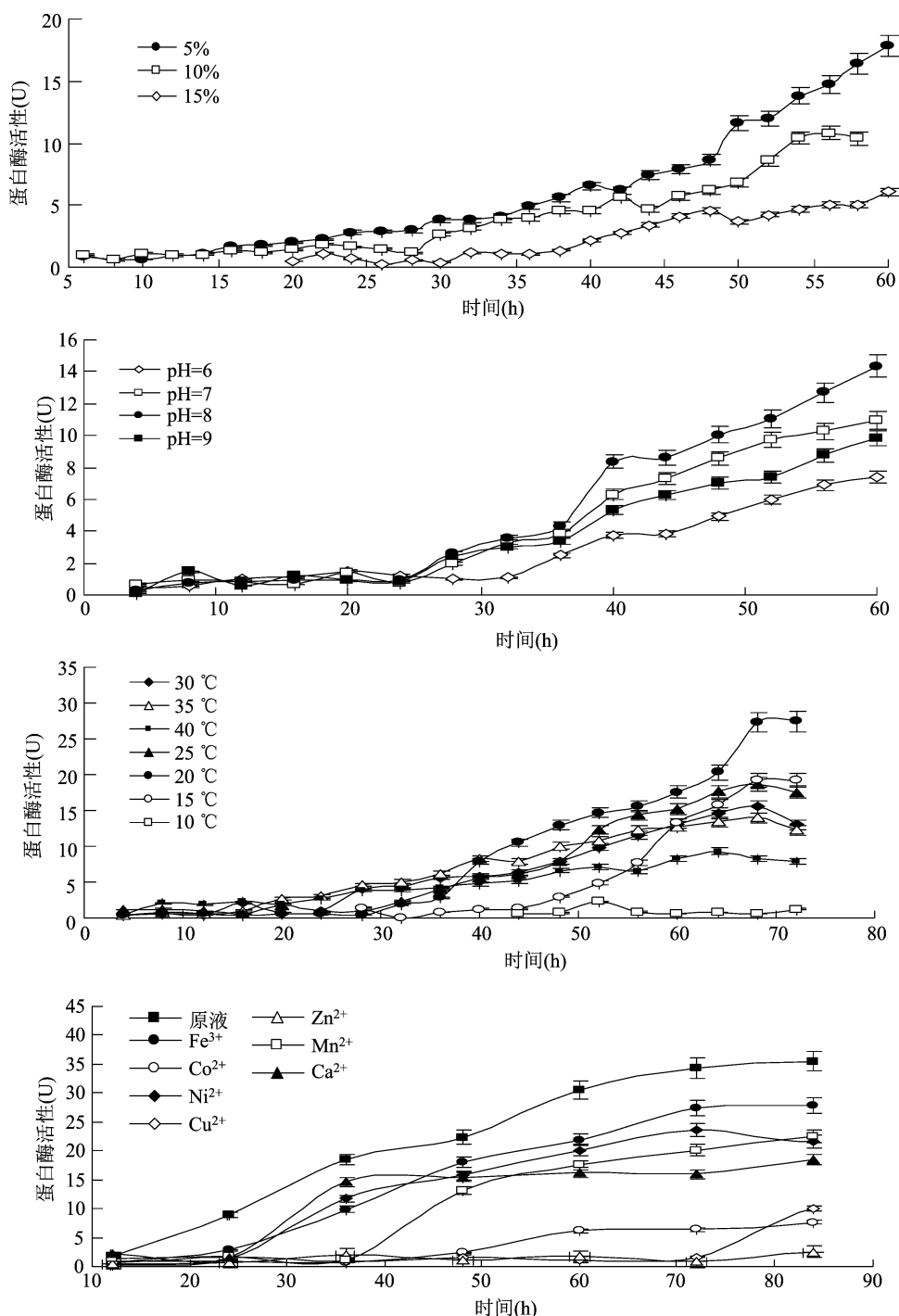


图3 福林酚法测定蛋白酶活性标准曲线

菌株为中度嗜盐菌,并选择 5% 的 NaCl 浓度进行下一步生长条件探索。如图 4-B 所示,培养基 pH 值在 6~9 之间时,菌株均可以生长并产生蛋白酶;当 pH 值为 5 和 10 时,菌株无法生长;当 pH 值为 8 时,菌株产酶能力高于其他 pH 值条件,因此选择 8 为该菌株产酶的最适 pH 值。如图 4-C 所示,菌株在 10~40 °C 条件下可以进行生长和产生蛋白酶,温度

图4 菌株 *Salinivibrio* sp. MK070915 的生长特性和产酶特性

适应范围较广;当培养温度为 20 °C 时,该菌株的产酶能力最强;当培养温度在 15 ~ 25 °C 之间时,温度对该菌株产酶能力的促进作用比较明显。如图 4 - D 所示, Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 的添加对菌株后期的产酶能力具有促进作用,但是对应培养条件下的菌株产酶开始的时间为 36 h 左右,说明上述金属离子的存在对于菌株前期的产酶活性具有一定的抑制作用, Zn^{2+} 的存在使得菌株无法正常生长,其他

金属离子的存在不影响菌株生长和产酶,但是对应培养条件下的菌株产酶能力相较于未添加金属离子的原液差。

菌株 *Salinivibrio* sp. MK070915 可以利用多种营养物质作为碳源和氮源,这与已报道的嗜盐菌产蛋白酶的特点^[15]相吻合。如图 5 - A 所示,碳源为麦芽糖时,菌株的产酶活性比原培养基中以酵母浸出物为碳源时增加了 1.74 倍;如图 5 - B 所示,氮源

为蛋白胨时,菌株所产蛋白酶表现出来的活性最高,而其他氮源的添加并没有明显地提高菌株产蛋白酶的能力,当将酪素水解物和亚硝酸钠作为唯一

氮源添加到培养基中时,甚至抑制了菌株产蛋白酶的能力。因此选用麦芽糖作为碳源替代 GM 中的酵母浸出物,氮源物质仍为原培养基中的蛋白胨。

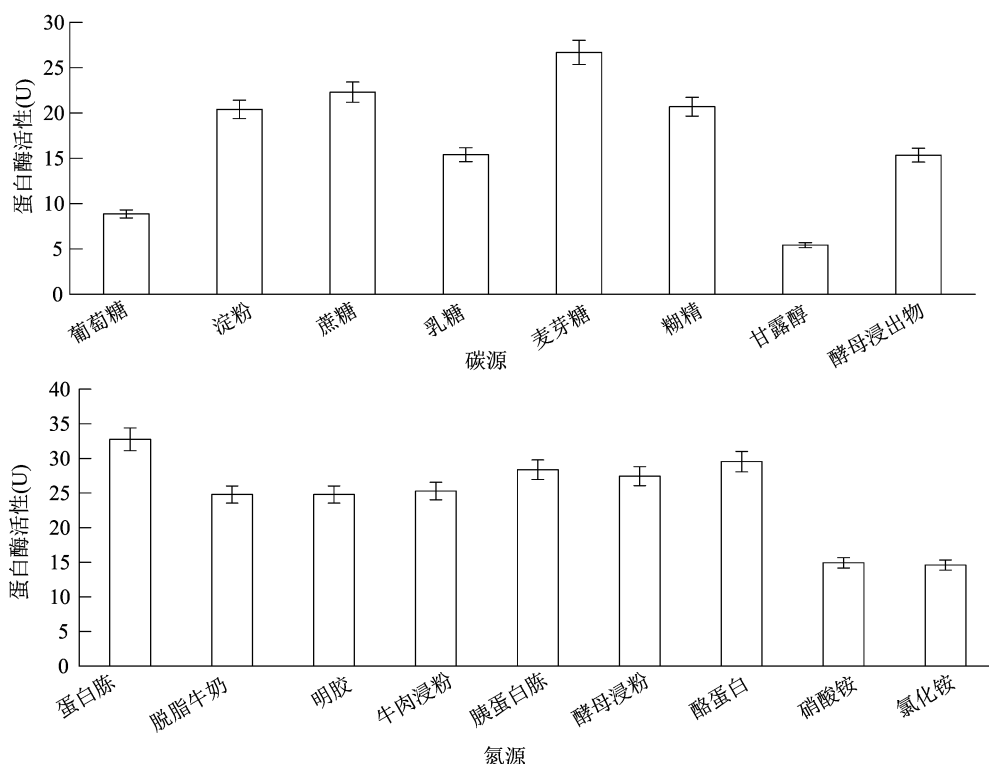


图5 菌株 *Salinivibrio* sp. MK070915 对碳源和氮源的利用

2.5 单因素试验和最陡爬坡试验

针对单因素试验设计中对菌株产蛋白酶影响最大的 4 个因素进行最陡爬坡试验,分别于各个因素各水平条件下接种活化后的菌株,在 37℃、200 r/min 条件下振荡培养 72 h 后测定粗酶液蛋白酶活性。如图 6 所示,麦芽糖添加量为 1.5% 时,蛋白酶活性达到最大值,添加量超过 2.5% 时,蛋白酶活性急剧下降;蛋白胨作为最优氮源,最佳添加量为 1.0%;KCl 的最佳添加量为 2.0‰,而柠檬酸钠的最佳添加量为 4‰。然而最优发酵条件并不一定是各个单因素所得最佳条件的简单组合,需要在单因素基础上进行响应面试验来确定最优的发酵培养条件。响应面试验各因素水平的选择如下:麦芽糖添加量为 1.25% ~ 1.75%,蛋白胨添加量为 0.75% ~ 1.25%,KCl 添加量为 1.0‰ ~ 3.0‰,柠檬酸钠添加量为 3‰ ~ 5‰;将蛋白酶活性作为响应值。

2.6 响应面优化产酶条件

以麦芽糖(A)、蛋白胨(B)、KCl(C)和柠檬酸钠(D)为试验因素,蛋白酶活性为评价指标,按照二

次项回归方程进行试验。试验设计及结果见表 2。

根据表 2 的试验结果,通过响应面软件处理后确定回归方程为蛋白酶活性 = $37.22 - 2.91A + 2.52B - 3.93C + 0.40D + 2.72AB - 5.97AC - 2.27AD + 2.24BC + 0.75BD - 3.44CD - 1.86A^2 - 2.20B^2 - 2.08C^2 + 0.70D^2$ 。

根据响应面试验结果,构建的回归模型的方差分析结果见表 3。

由表 3 可知,本试验所得模型 P 值为 0.000 4,说明模型极显著($P < 0.01$);模型失拟项的 P 值为 0.382 7,说明模型失拟项不显著。一次项 A、B、C 对菌株产蛋白酶能力的影响极显著($P < 0.01$);二次项 B^2 、 C^2 对菌株产蛋白酶能力的影响显著($P < 0.05$)。两因子试验,麦芽糖和 KCl、KCl 与柠檬酸钠之间交互作用对菌株产蛋白酶能力的影响极显著($P < 0.01$);麦芽糖与蛋白胨之间的交互作用对菌株产蛋白酶能力的影响显著($P < 0.05$)。

以蛋白酶的活性为响应值,采用软件作响应曲面图。如图 7-A 所示,曲面图形的顶点落在中心位置左右,区域俯视图趋近于椭圆形,说明麦芽糖

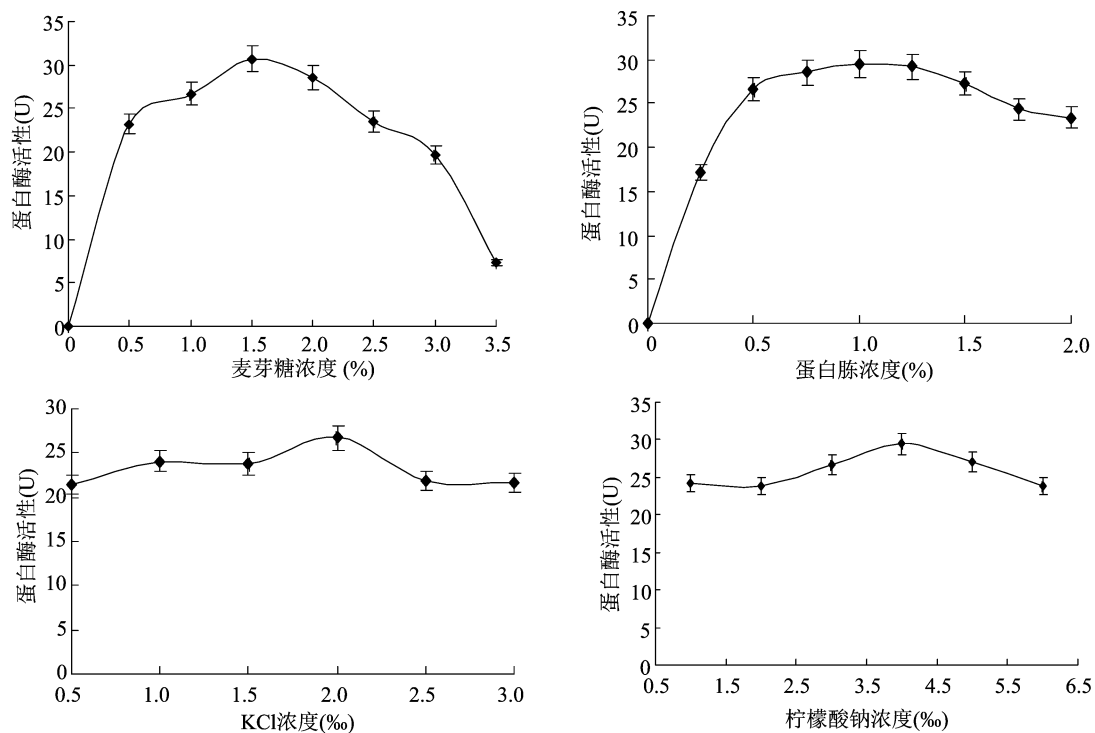


图6 产酶条件单因素试验结果

表 2 Box – Behnken 试验方案与结果

试验号	因素水平				蛋白酶活性(U)	
	A	B	C	D	实际值	预测值
1	-1	1	0	0	38.81	35.88
2	0	-1	0	1	35.20	32.85
3	0	0	0	0	37.22	37.22
4	-1	0	0	-1	37.64	36.29
5	-1	-1	0	0	36.00	36.27
6	1	1	0	0	35.38	35.49
7	0	0	-1	1	43.01	43.61
8	1	0	0	1	30.54	31.28
9	0	0	0	0	37.22	37.22
10	0	-1	-1	0	37.21	36.59
11	0	1	1	0	33.78	33.78
12	0	0	0	0	37.22	37.22
13	0	1	0	1	40.39	39.40
14	0	0	1	-1	35.16	34.94
15	-1	0	-1	0	33.92	34.15
16	1	-1	0	0	21.70	25.01
17	0	-1	1	0	26.09	24.25
18	0	0	0	0	37.22	37.22
19	0	0	1	1	28.74	28.88
20	-1	0	0	1	39.77	41.64
21	1	0	0	-1	36.32	38.23
22	0	1	0	-1	34.50	37.09
23	0	0	-1	-1	35.68	35.92
24	-1	0	1	0	37.50	35.01
25	0	1	-1	0	35.93	37.15
26	0	0	0	0	37.22	37.22
27	0	-1	0	-1	32.32	33.55
28	1	0	-1	0	41.94	40.26

和蛋白胨的交互作用对菌株产蛋白酶能力的影响显著;麦芽糖和 KCl 交互作用的响应曲面如图 7 – B 所示,柠檬酸钠和 KCl 交互作用的相应曲面如图 7 – F 所示,2 个曲面图形的顶点落在中心位置,说明它们之间的交互作用对菌株产蛋白酶能力的影响较为显著;麦芽糖和柠檬酸钠交互作用的响应曲面如图 7 – C 所示,蛋白胨和柠檬酸钠交互作用的响应曲面如图 7 – E 所示,2 个曲面图形的曲线比较平稳,区域俯视图趋近于椭圆形,说明它们之间的交互作用对菌株产蛋白酶能力的影响不显著;蛋白胨和 KCl 交互作用的响应曲面如图 7 – D 所示,曲面图形的曲线较陡,区域俯视图形也趋近于椭圆形,然而,椭圆形区域并无实线,说明它们之间的交互作用并没有体现在此模型中。

通过 Design – Expert 8.0.5b 软件进行培养条件的优化,最优培养条件如下:以 Gibbons 培养基为基底,添加 5% NaCl,调整 pH 值为 8,设置培养温度为 20 ℃,碳源为麦芽糖,含量为 1.85%,氮源为蛋白胨,含量为 1.17%,添加 1.0‰ KCl、5‰柠檬酸钠。根据响应面试验结果得出的最优方案对培养基进行改进,以此检验响应面法所得结果的可行性,经过 3 次重复性试验,最终得到的蛋白酶活性可达 44.09 U,与预期值 44.22 U 相比,差异为 0.294%,表明该模型合理可靠,所优化的最佳培养条件能够

表 3 回归模型方差分析和显著性检测

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	485.83	14	34.70	7.69	0.000 4	***
A	84.68	1	84.68	18.77	0.000 8	***
B	76.36	1	76.36	16.92	0.001 2	***
C	154.19	1	154.19	34.18	<0.000 1	***
D	1.96	1	1.96	0.43	0.521 3	
AB	29.54	1	29.54	6.55	0.023 8	**
AC	88.95	1	88.95	19.72	0.000 7	***
AD	20.66	1	20.66	4.58	0.051 9	
BC	20.12	1	20.12	4.46	0.054 7	
BD	2.27	1	2.27	0.50	0.491 1	
CD	47.27	1	47.27	10.48	0.006 5	***
A ²	20.26	1	20.26	4.49	0.053 9	
B ²	30.48	1	30.48	6.76	0.022 0	**
C ²	25.27	1	25.27	5.60	0.034 1	**
D ²	3.06	1	3.06	0.68	0.425 2	
残值	58.65	13	4.51			
失拟项	58.65	9	6.52	1.21	0.382 7	
纯误差	0.000	4	0.000			
总和	544.48	27				

注：*** 表示极显著($P<0.01$)；** 表示显著($P<0.05$)。

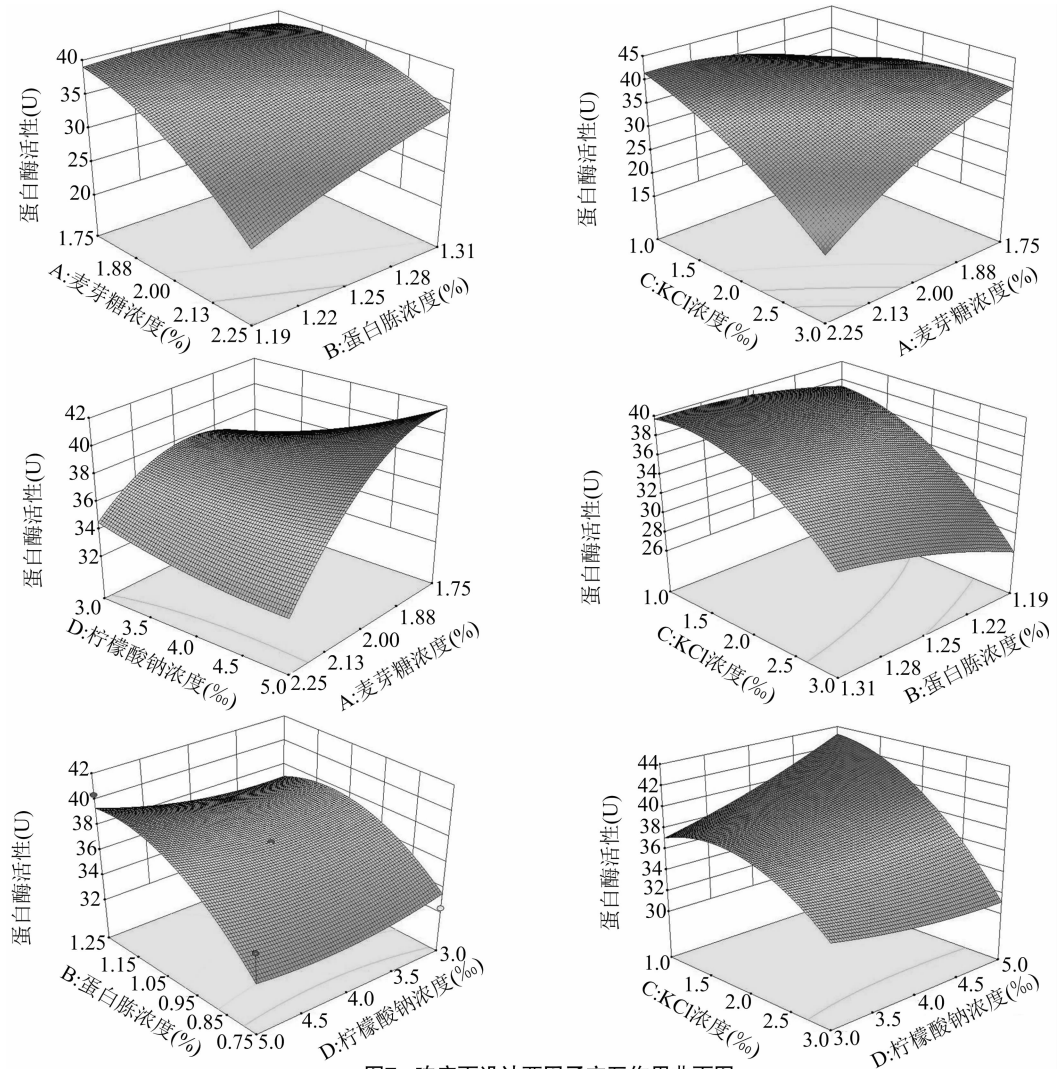


图7 响应面设计两因子交互作用曲面图

被用于蛋白酶的高效产酶培养。

3 讨论与结论

从盐浓度为 21% 的晒盐场海盐水中分离得到 1 株 *Salinivibrio* 属的中度嗜盐菌 MK070915, 该菌株在适宜培养条件下可产胞外蛋白酶。

采用固体 Gibbons 培养基, 对该菌株进行分离纯化, 并进行菌株产蛋白酶的筛选, 结果发现, 该菌株在筛选培养基上产生较大的透明水解圈, 说明它具有较强的产蛋白酶能力; 通过进一步对菌株的生长特性和营养物质利用进行探究发现, 该菌株可以在 NaCl 浓度为 5% ~ 10%、pH 值为 6 ~ 9、温度为 10 ~ 40 ℃ 的条件下生长并产蛋白酶, 且可以利用葡萄糖、淀粉、蔗糖、乳糖、糊精、麦芽糖和甘露醇为碳源, 利用蛋白胨、脱脂牛奶、明胶、牛肉浸粉、胰蛋白胨、酵母浸粉、酪蛋白、氯化铵和硝酸铵为氮源。利用单因素试验、最陡爬坡试验结合响应面法优化了该菌株产胞外蛋白酶的最适培养条件: 以 Gibbons 培养基为基底, 添加 5% NaCl, 调整 pH 值为 8, 设置培养温度为 20 ℃, 碳源为麦芽糖, 含量为 1.85%; 氮源为蛋白胨, 含量为 1.17%, KCl 含量为 1.0‰, 柠檬酸钠含量为 5‰。经响应面分析得到的蛋白酶活性为 44.09 U, 而预期值为 44.22 U, 二者之间的差异为 0.294%。

本研究中的可产蛋白酶的中度嗜盐菌菌株 *Salinivibrio* sp. MK070915 经过优化之后, 其蛋白酶活性明显提高, 与 2007 年报道的菌株 *Salinivibrio* sp. AF-2004 所产蛋白酶^[15]相比, 酶活性提高尤为明显; 其中温度对蛋白酶活性的影响较大, 20 ℃ 作为发酵温度, 可以有效的节能减排。

参考文献:

[1] 侯 靖, 徐佳琪, 崔恒林. 嗜盐古菌 *Halorussu* sp. XZYJ18 产胞外

蛋白酶特点及其酶学性质[J]. 中国调味品, 2018, 43(9): 11 - 16.

- [2] 董 伟, 郭立忠, 李翠翠, 等. 一株高产酯酶中度嗜盐菌的分离、鉴定及酯酶部分酶学性质的研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 479 - 483.
- [3] 倪志华, 张玉明, 周艳芬. 一株中性嗜盐菌 *Halobacillus dabanensis* N522 的分离鉴定及其抗菌活性研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(5): 158 - 164.
- [4] Siti S D, Ihsanawati, Hertadi R. Isolationg and characterization of organic - solvent stable protease isolated by *Pseudomonas stutzeri* BK AB - 12[J]. Procedia Chemistry, 2015, 16: 341 - 348.
- [5] Chuprom J, Bovonreungroj P, Ahmad M, et al. Approach toward enhancement of halophilic protease production by *Halobacterium* sp. strain LBU50301 using statistical design response surface methodology[J]. Biotechnology Reports, 2016, 10: 17 - 28.
- [6] DasSarma S, DasSarma P. Halophilicities and their enzymes: negativity put to good use[J]. Current Opinion in Microbiology, 2015, 25: 120 - 126.
- [7] 夏 珺. 山东省三处盐场环境中嗜盐菌多样性调查及六株嗜盐新菌的分类学研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 蛋白酶活力测定法: SB/T 10317—1999[S]. 北京: 国家标准出版社, 1999.
- [9] 侯 靖, 徐佳琪, 李 杨, 等. 一平浪盐矿产蛋白酶嗜盐古菌的鉴定及其酶学性质[J]. 食品工业科技, 2017, 38(23): 124 - 128.
- [10] 苏同伟, 包 斌, 严 婷, 等. 响应面法优化海洋微生物发酵产生纤溶化合物的培养条件[J]. 生物工程学报, 2013, 29(6): 857 - 861.
- [11] 陈蔚青, 李一飞, 申屠超. 响应面法优化一株中度嗜盐菌的培养条件[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 140 - 144.
- [12] 赵梦琴. 一株嗜盐古生菌胞外蛋白酶的酶学特性的研究及产酶条件的优化[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
- [13] 曹 礼, 张学虹, 赵惠蓉, 等. 响应面法优化盐碱土中所得一株细菌的培养条件[J]. 中国酿造, 2018, 37(2): 91 - 94.
- [14] 庞丰平, 霍乃蕊. 响应面法优化瑞士乳杆菌产蛋白酶培养条件[J]. 中国调味品, 2017, 42(4): 4 - 8.
- [15] Ali Amoozegar M, Zahra Fatemi A, Reza Karbalaei - Heidari H, et al. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF - 2004[J]. Microbiological Research, 2007, 162(4): 369 - 377.