

文章编号:1673-1689(2008)03-0068-05

## 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)基因鉴定 及畜血 Hb 降解技术

张滨<sup>1</sup>, 马美湖<sup>\*1,2</sup>, 万佳蓉<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学 食品科技学院, 湖南 长沙 410128; 2. 华中农业大学 食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 从多年被畜禽血液污染的土样中分离筛选出一株降解 Hb 能力强的自然菌株, 并对其进行连续 5 代定向诱变。利用 PCR 扩增法和 Neighbor-joining 方法测定和分析了诱变菌株 16S rDNA 序列, 对筛选出的自然菌株及诱变菌株进行了鉴定, 为短小芽孢杆菌(*B. pumilus*); 二阶导数红外光谱法探测到其分子结构具有短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)典型分子结构特征; SDS-PAGE 凝胶电泳中发现短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)产蛋白酶对 Hb 降解的断裂位点发生了变化。对 Hb 降解产物及产蛋白酶活力的测定结果表明, 经连续 5 代诱变的短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)对 Hb 降解能力比筛选出的自然菌株强, 其蛋白酶活力比自然菌株提高了近 3 倍, Hb 降解产物中的可溶性蛋白质质量分数、游离氨基酸质量浓度分别从 3.69%、14.4 mg/dL 提高到 4.12%、24.6 mg/dL。

**关键词:** 短小芽孢杆菌; 基因鉴定; 血红蛋白(Hb); 蛋白酶; 游离氨基酸

中图分类号: Q 789

文献标识码: A

### Identification of *Bacillus pumilus* and Study on the Degradation of Poultry Hemoglobin (Hb)

ZHANG Bin<sup>1</sup>, MA Mei-hu<sup>\*1,2</sup>, WAN Jia-rong<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. College of Food Science and Technology Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** In this manuscript, a kind of natural strain, which had more degraded ability of Hb, was isolated from poultry blood polluted soil. The original strain was continuous mutated for five generation. The strain was determined to be *Bacillus pumilus* by 16SrRNA sequencing and Neighbor-joining methods. The second derivative infrared spectrum result showed that the strain had a typical molecular structure characteristic of *B. pumilus*. SDS-PAGE result illustrated that the protease degradation location on Hb was changed. The final *B. pumilus* strain had a stronger ability in degradation of Hb than its parent strain. The protease activity was improved about three times than that of the parent strain. The content of soluble protein, free amino acids was improved from 3.69% and 14.4 mg/dL to 4.12% and 24.6 mg/dL, respectively.

**Key words:** *Bacillus pumilus*; gene identification; poultry hemoglobin; protease; free amino acid

收稿日期: 2007-06-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270976); 国家“十一五”重大科技项目。

作者简介: 张滨(1971-), 男, 湖南衡阳人, 副教授, 食品科学博士研究生。

\* 通讯作者: 马美湖(1957-), 男, 湖南常德人, 理学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物源性食品科学方面的研究, Email: mameihu@mail. hzau. edu. cn

根据国际粮农组织(FAO)统计,2004、2005、2006年我国肉类生产总量分别为 $72.5 \times 10^6$ 、 $76.4 \times 10^6$ 、 $80.1 \times 10^6$  t,按家畜血液占其肉重的6%计算,可获得的血液量分别为 $43.5 \times 10^6$ 、 $45.84 \times 10^6$ 、 $48.06 \times 10^6$  t;按蛋白质含量占血液的18%计算,从血液中可获得蛋白质分别达 $13.1 \times 10^6$ 、 $23.68 \times 10^6$ 、 $14.42 \times 10^6$  t<sup>[1-3]</sup>。由于原料血液极难保存、易被污染、血腥味浓、消化性和适口性及色泽感官极差等因素严重制约了畜禽血液的综合利用,致使大量宝贵的畜禽血资源浪费,并造成环境污染。随着现代生物技术和现代分离技术的迅猛发展,曾经制约着血液利用的不利因素被打破,海内外对血液利用的研究重新形成热点,血液食品已成为国际市场上的热门货。畜禽血液微生物降解,由于投入低、能耗省,蛋白质、肽和氨基酸含量高,被公认为是血液综合利用的一个方向<sup>[4-6]</sup>。

国内外有关畜禽血 Hb 微生物发酵降解、菌种选育的研究主要集中在霉菌(如米曲霉)等方面<sup>[7-15]</sup>,有关细菌(如短小芽孢杆菌)在畜禽 Hb 方面的系统研究尚不多见。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 短小芽孢杆菌(*B. pumilus*):经分离筛选、Hb 降解测定、定向诱变获得。

1.1.2 主要原料 新鲜猪血:湖南农业大学附近屠宰场购买;血红蛋白(Hb):新鲜猪血经离心分离获得。

#### 1.1.3 试剂

1) 种子培养基(组分 g/L) 葡萄糖 10.0,蛋白胨 5.0,酵母膏 5.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.0; pH 7.0。

2) Hb 发酵培养基(组分 g/L) 葡萄糖 10.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.4,  $\text{NaCl}$  0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6,  $\text{MgSO}_4$  0.1,  $\text{FeSO}_4$  0.02, Span20 1.0, 血红蛋白(Hb) 10.0; pH 6.5。

3) 16S rDNA 的 PCR 扩增:

正向引物:5'-GAGCGGATAACAATTTCA-CACAGG-3'

反向引物:5'-CGCCAGGGTTTTCCAGT-CACGAC-3'

1.1.4 主要仪器设备 LRH-250A 型生化培养箱;HD-925 型超净工作台;SpeedCycler 型 PCR 仪;EPS-300 型电泳仪;DSQ-600 型 DNA 测序仪;Nicolet Avatar-370 型傅里叶变换红外光谱仪;Fisher Biotech 型凝胶电泳仪;TaKaRa 细菌 16S rDNA PCR 扩增试剂盒(Code NO. 310);TaKaRa 切胶试剂盒(Code NO. DV805A)。

### 1.2 方法

1.2.1 红血蛋白(Hb)提取方法 生猪→检验→屠宰→收集血液→防凝→过滤去杂→冻结破壁→解冻→离心→弃上清液→水洗→低温烘干→红血蛋白(Hb)。

1.2.2 定向诱变方法 菌自然菌株→种子培养液(37℃,200 r/min 离心 48 h)→孢子悬浮液( $10^9$ /mL)→亚硝酸诱变(0.001%,2 min)→UV 诱变(紫外灯功率 15 W,25 cm 照射 60 s)→Hb 固体培养基避光培养(37℃培养 48 h)→挑菌划线分离培养→酪蛋白/明胶平板培养(37℃培养 48 h)→挑选出 5~10 个蛋白质水解圈比值大的菌落→Hb 降解性能测定→获得一株诱变的菌株。

1.2.3 蛋白酶活力测定方法 参照 Folin 法。

1.2.4 Hb 降解产物相对分子质量的测定 SDS-PAGE 凝胶电泳法。

1.2.5 Hb 降解产物游离氨基酸的测定方法 HPLC 测定法。

1.2.6 菌种 16S rDNA 的鉴定 PCR 扩增法。

1.2.7 16S rDNA 序列分析 Neighbor-joining 法。

1.2.8 细胞结构检测 红外光谱法。

## 2 结果与分析

### 2.1 16S rDNA 序列测定及其鉴定

采用 PCR 扩增法测定筛选菌种 16S rDNA 的序列,利用 Neighbor-joining 方法对其 16S rDNA 序列分析,并鉴定菌株的种。

16S rDNA 序列测定结果表明,扩增的 DNA 序列全长 1 462 bp。菌株全序列如下:

GCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTTCTTGAAC  
CGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG  
GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGT

GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACG  
GTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA  
TTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGAGGGTCA  
TTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT  
GGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC  
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTG  
CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGC  
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCC  
TAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATG  
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG  
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC  
TACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCAAGACCGAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGC  
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC  
GGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAG  
CCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGG

将所测序列与 GenBank 数据库中的相关种进行比较,构建以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树,见图 1。

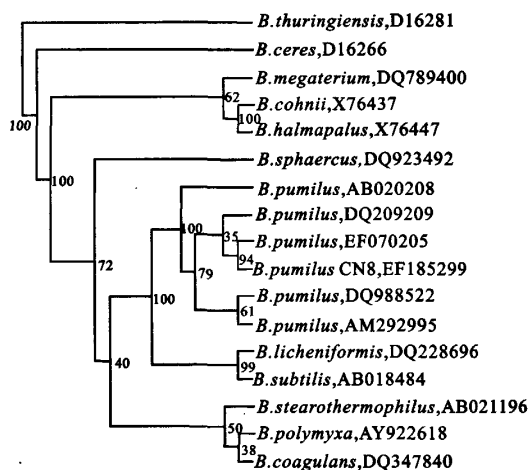


图1 菌株亲缘关系相近菌株 16S rDNA 序列的系统发育树

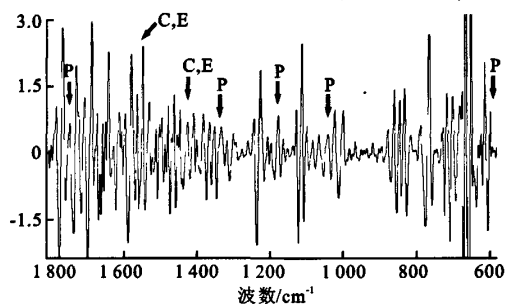
Fig. 1 Phylogenetic tree of the 16S rRNA sequence from the isolated strain and closely related strains

该菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的短小芽孢杆菌有很高的相似性(99.7%~99.9%)。因此,鉴定该菌株为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。

## 2.2 短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)细胞结构探测

在 500 mL 的三角瓶装入 200 mL 培养液,接种经活化 5 代的短小芽孢杆菌 3 环。在往复式摇床上培养,往复频率为 200 r/min,培养温度为(37±1)℃。将培养 1 d 的营养肉汤发酵液于 5 000 r/min 离心 5 min,获得菌体,然后用 0.9 g/dL 的 NaCl 溶液洗涤 3 次。再取少量菌体掺入溴化钾压片测定红外光谱。光谱测量范围为 4 000~400 cm<sup>-1</sup>,光谱分辨

率为 4 cm<sup>-1</sup>,信号扫描累加 64 次,得到菌体的红外光谱,经 OMNIC5.1 软件进行二阶导数转换处理,见图 2。



C: 荚膜; E: 芽孢; P: 多聚-β-羟基丁酸粒

图2 短小芽孢杆菌二阶导数红外光谱图

Fig. 2 Second derivative FTIR spectrum of *Bacillus pumilus*

由图 2 看出,短小芽孢杆菌同时表达多聚-β-羟基丁酸粒(PHB)、芽孢和荚膜的特征吸收峰。在 1 740 cm<sup>-1</sup>附近有一个明显的酯基吸收峰,这是贮藏结构多聚-β-羟基丁酸粒(PHB)的主要特征吸收峰;在 1 601 cm<sup>-1</sup>和 1 403 cm<sup>-1</sup>附近有两个较强吸收峰,表明荚膜和(或)芽孢的存在。其它特征吸收峰清晰地表明吡啶二羧酸(DPA)的存在,但较微弱,这说明多聚-β-羟基丁酸粒(PHB)和荚膜同时存在,多聚-β-羟基丁酸粒(PHB)的减少表明芽孢开始形成。

## 2.3 短小芽孢杆菌降解 Hb 测定

在 Hb 发酵培养液中添加体积分数 0.2% 的经 48 h 扩大培养后的自然菌株及其短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)种子培养液,在 37℃和转速为 200 r/min 摇床中发酵 72 h,测定蛋白酶活力、可溶性蛋白含量、游离氨基酸含量及 Hb 降解率,结果见表 1。

从表 1 可知,自然菌株和短小芽孢杆菌对 Hb

降解程度不同。短小芽孢杆菌降解 Hb 的能力比自然菌株强:蛋白酶活力比自然菌株提高了近 3 倍,从自然菌株的 483.81 U/mL 提高到 1 254.36 U/mL;Hb 降解产物即可溶性蛋白质、游离氨基酸含量也分别从 3.69%、14.4 mg/dL 增加到 4.12%、24.6 mg/dL。

表 1 短小芽孢杆菌降解 Hb 产物测定  
Tab. 1 Measurement of Hb degradation products by *B. pumilus*

| 菌株                                | 蛋白<br>酶活力/<br>(U/mL) | 可溶性<br>蛋白质<br>质量<br>分数/% | 游离氨基酸<br>质量浓度/<br>(mg/dL) | Hb<br>降解<br>率/% |
|-----------------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------|
| 自然菌株                              | 483.81               | 2.69                     | 14.4                      | 40.25           |
| 短小芽孢杆菌<br><i>Bacillus pumilus</i> | 1254.36              | 3.52                     | 24.6                      | 53.29           |

2.4 Hb 降解产物相对分子质量测定

将自然菌株(No 1)及短小芽孢杆菌(No 2)扩大培养液分别接种体积分数 0.2% 到血红蛋白(Hb)发酵液中,在 37 ℃、200 r/min 摇床发酵 72 h。然后分别取 10 mL 发酵液过滤,吸取 2 mL 滤液与 4 mL 的 Tirs HCl 混合,并加入小量的溴酚蓝指示剂,用微量注射器将样品加入到已灌制好的 SDS-PAGE 凝胶电泳槽的样品孔中,用血红蛋白(M)作标准样,进行电泳,结果见图 3。

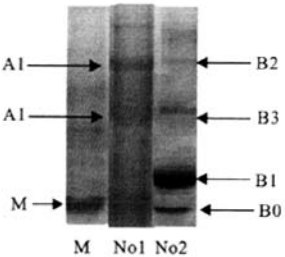


图 3 Hb 发酵产物的 SDS-PAGE 凝胶电泳图  
Fig. 3 The SDS-PAGE Gel Electrophoresis picture of Hb Fermentation Product

从图 3 可知,在 Hb 降解的产物中,自然菌株(No 1)处于标准样(M)水平线齐平的色带比短小芽孢杆菌(No 2)宽,这说明在发酵过程中,有较多的 Hb 没有被降解,这证实了诱变菌株即短小芽孢杆菌降解 Hb 能力强;在 No 2 的电泳图中,比前者(No 1)多一条明显的色带,由此可知,短小芽孢杆菌(No 2)与自然菌株(No 1)降解 Hb 的断裂位点不全相同,这进一步说明了短小芽孢杆菌的 DNA 分子结构局部发生了基因突变,从而提高了对 Hb 的降解能力。

2.5 氨基酸的种类及含量测定

将体积分数 0.2% 的自然菌株和短小芽孢杆菌扩大培养液分别接入到已灭菌的防凝新鲜猪血液中,在 37 ℃ 和 200 r/min 摇床中发酵 72 h,发酵液过滤,利用高效液相色谱仪(HPLC)测定游离氨基酸含量,结果见表 2。

表 2 游离氨基酸质量浓度测定结果  
Tab. 2 Determination of free amino acids content

| 氨基酸<br>种类  | 血液中游离氨基酸质量浓度/(mg/dL) |              |              |
|------------|----------------------|--------------|--------------|
|            | 新鲜<br>猪血液            | 自然菌株<br>发酵血液 | 诱变菌株<br>发酵血液 |
| 天门冬氨酸(Asp) | 2.21                 | 3.01         | 3.34         |
| 苏氨酸(Thr)   | 0.92                 | 0.46         | 0.20         |
| 丝氨酸(Ser)   | 1.19                 | 1.04         | 1.28         |
| 谷氨酸(Glu)   | 3.75                 | 2.91         | 3.71         |
| 脯氨酸(Pro)   | 1.32                 | 0.28         | 0.30         |
| 甘氨酸(Gly)   | 1.19                 | 2.40         | 2.41         |
| 丙氨酸(Ala)   | 1.58                 | 2.14         | 2.83         |
| 胱氨酸(Cys)   | 0.17                 | 0.69         | 0.68         |
| 缬氨酸(Val)   | 1.48                 | 3.76         | 4.69         |
| 蛋氨酸(Met)   | 0.25                 | 2.93         | 3.49         |
| 异亮氨酸(Ile)  | 0.40                 | 1.17         | 1.35         |
| 亮氨酸(Leu)   | 1.39                 | 5.67         | 7.08         |
| 酪氨酸(Tyr)   | 0.39                 | 7.38         | 7.09         |
| 苯丙氨酸(Phe)  | 0.34                 | 15.24        | 14.00        |
| 组氨酸(His)   | 3.18                 | 12.87        | 12.34        |
| 色氨酸(Trp)   | —                    | —            | —            |
| 赖氨酸(Lys)   | 1.42                 | 3.28         | 4.21         |
| 精氨酸(Arg)   | 1.23                 | 0.34         | 0.21         |
| Σ          | 22.41                | 65.23        | 69.21        |

注:以上数据由中科院亚热带农业生态研究所测试

由表 2 可知,在 Hb 发酵液中,短小芽孢杆菌所降解的游离氨基酸总量较未发酵血液提高 191.08%,比自然菌株提高 6.10%;从氨基酸种类分析得出,人体所必需的 8 种氨基酸中的异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、缬氨酸含量增加,其中蛋氨酸等含量增幅最大,提高率在 90% 以上。而苏氨酸、谷氨酸、脯氨酸、精氨酸与未发酵血液中同类氨基酸相比分别下降了 360%、1.08%、340% 和 485.71%。

3 结 语

1) 从被畜禽血液污染的土样中分离筛选获得的降解 Hb 能力最强的菌株,其菌株菌落特征为单菌落,白色,圆形,不透明,表面光滑,潮湿,有光泽,边缘整齐有规则,菌落向外凸出,生长在培养基表面;其菌株个体形态特征:单菌落革兰氏染色后镜检为 G<sup>+</sup>,短杆菌,芽孢呈椭圆形,不明显膨大,芽孢

中生或次中生,多为两端。诱变菌株菌落特征为单菌落,乳白色,圆形,不透明,表面光滑,潮湿,有光泽,边缘整齐有规则,菌落向外凸出,生长在培养基表面;诱变菌株菌体形态为单菌落,革兰氏染色后镜检为  $G^+$ ,短杆菌,芽孢呈椭圆,不明显膨大,芽孢中生或次中生,多为两端,菌体体积比自然菌株小。

2) 采用 PCR 扩增法测定诱变菌株 16S rDNA 的序列,利用 Neighbor-joining 方法对其 16S rDNA 序列分析,并鉴定诱变菌株为短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*),利用二阶导数红外光谱法探测到的分子结构具有短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 典型分子结构特征。

3) 通过测定 Hb 发酵降解产物及产蛋白酶活

力,证实了短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 对 Hb 降解能力较自然菌株强;其蛋白酶活力比自然菌株提高了近 3 倍;Hb 降解产物即可溶性蛋白质、游离氨基酸含量也分别从 3.69%、14.4 mg/dL 增加到 4.12%、24.6 mg/dL,人体所必需的 8 种氨基酸中的异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、缬氨酸含量增加,其中蛋氨酸等含量增幅最大,提高率在 90% 以上。

4) 短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 产蛋白酶对 Hb 降解的断裂位点发生了变化,表明经连续 5 代定向诱变后所获得的短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 分子结构发生了改变,即基因结构发生了突变。

## 参考文献 (References):

- [1] CHANG-KEE Hyun, SHIN H K. Utilization of bovine plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86: 34—37.
- [2] Dara O' Donnell, Wang Liping, Xu Jianfeng, et al. Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 8(3): 187—193
- [3] Peralta R M, Boer, Cinthia Gandolfi. Production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2000, 40(2): 75—81.
- [4] Yang J K, Shih I L, Tzeng Y M, et al. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(5—6): 406—413.
- [5] Faid M M, Jalil H El, Elyachoui M. Biotechnological process for the valorization of fish waste[J]. *Bioresour Technol*, 1997, 60(1): 237—241.
- [6] Deslandes B, Gariepy C, Houde A. et al. Review of microbiological and biochemical effects of skatole on animal production[J]. *Livestock Production Science*. 2001, 71(2): 193—200.
- [7] Lee S H, TRho Y. Improvement of tylosin fermentation by mutation and medium optimization[J]. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 28(2): 142—144.
- [8] Xu Jian-feng, Wang Li-ping, Darin Ridgway, et al. Increased heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth [J]. *Accepted for publication January*, 2000, 28(2): 222—227.
- [9] Arihara K, Itoh M, UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation[J]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 56(2): 227—230.
- [10] Lee S H, Rho Y T. Improvement of tylosin fermentation by mutation and medium optimization[J]. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 28(2): 142—144.
- [11] Fagan J M, Waxman L, Goldberg A L. Red blood cells contain a pathway for the degradation of oxidant-damaged hemoglobin that does not require ATP or ubiquitin[J]. *J Biol Chem*, 1986, 261: 5705—5713.
- [12] Sharma D C, Satyanarayana T. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsrl in submerged fermentation by using statistical methods[J]. *Bioresour Technol*, 2006, 97: 727—733.
- [13] Woo Patrick C Y, Ng Kenneth H L, Lau Ausanna K P, et al. Usefulness of the microSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41: 1996—2003.
- [14] Kapel Romain, Rahhou Elhassan, Lecouturier Didier, et al. Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 1961—1966.
- [15] Yu Yike, Hu Jianen, Miyaguchi Yuji, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin [J]. *Peptides*, 2006, 27: 2950—2956.

(责任编辑:李春丽)