

产低温弹性蛋白酶菌株的筛选及酶学特性分析

高兆建, 陈尚龙, 巫有华, 张莉

(徐州工程学院 食品(生物)工程学院, 江苏 徐州 221008)

摘要: 筛选获得一株产生低温型弹性蛋白酶菌株并研究酶学性质, 为该酶在肉类嫩化中应用奠定理论基础。在不溶性的弹性蛋白琼脂平板上, 以弹性蛋白作为唯一氮源, 根据水解圈直径和菌落直径的比值筛选到一株分泌低温型弹性蛋白酶的菌株, 命名为 XZE116, 通过形态学、生理生化试验以及 16s rDNA 序列分析, 该菌株鉴定为短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)。菌株所产弹性蛋白酶最适作用 pH 值 8.0, 在较广的 pH 值范围(7.0~12.0)内酶稳定性较好。酶最适作用温度 25 ℃, 在 40 ℃以下保温 2 h, 酶稳定性好。浓度为 5 mmol/L 的 Mg^{2+} 离子对酶有激活作用, 但 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 强烈抑制酶活性。丝氨酸蛋白酶特异性抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)强烈抑制酶活性, 但 E-64 对酶活性没有影响, 表明菌株 XZE116 弹性蛋白酶是丝氨酸蛋白酶。0.1% 的阴离子表面活性剂 SDS、阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)以及非离子型表面活性剂 Triton X-100 对酶活性有轻微的抑制作用。这些酶的良好生化特性赋予了该酶在肉品工业中具有潜在的应用价值。

关键词: 低温弹性蛋白酶; 短芽孢杆菌; 鉴定; 酶学性质

中图分类号: Q 939.97

文献标志码: A

文章编号: 1673—1689(2012)10—1105—07

Screening of Cold-Active Elastase Producing Strain and Characterization of Enzyme Activity

GAO Zhao-Jian, CHEN Shang-Long, WU You-hua, ZHANG Li

(College of Food (Biological) Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: The aim was to screen a cold-active elastase producing strain and study the enzymatic properties in order to establish the theoretical basis for its application of meat tenderization. One strain, named XZE116, which produced cold-active elastase was screened using elastin as sole nitrogen source on elastin agar plate according to the ratio of the diameter of the hydrolytic circle to the diameter of the colony. The strain was identified as *Bacillus brevis* by morphological, physiological, biochemical tests and 16S rDNA gene sequence analysis. The enzyme was highly active over a wide range of pH from 7.0 to 12.0, with an optimum at pH 8.0. It exhibited maximal activity at 25 ℃ and was stable within two hours below 40 ℃. The enzyme activity was activated by

收稿日期: 2011-11-21

基金项目: 徐州工程学院青年培育项目(XKY2009123)。

* 通信作者: 高兆建(1976—), 男, 山东沂南人, 工学博士, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

E-mail: gaozhaojian@126.com

Mg^{2+} , but was strongly inhibited by Hg^{2+} and Pb^{2+} . Its activity was completely inhibited by phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), but not by E-64, suggesting that the enzyme is a serine-protease. The elastase activity was slightly reduced by anionic (0.1% SDS), cationic (0.1% cetyltriethylammonium bromide, CTAB), non-ionic surfactants (1% Tween-80 and 1% Triton X-100). Considering its promising properties, the elastase from *Bacillus brevis* XZE116 may find potential application in meat industry.

Keywords: cold-active elastase, *Bacillus brevis*, identification, characteristics

弹性蛋白酶是蛋白水解酶的一种,同普通蛋白酶相比,它能高效地水解不溶性的弹性蛋白。弹性蛋白酶主要通过从动物胰脏提取以及微生物发酵获得^[1],其应用非常广泛,在治疗高血脂症、动脉粥样硬化等医疗领域^[2]、化妆品领域^[3]以及在肉类嫩化的食品工业^[4]中都有重要应用^[5]。

目前弹性蛋白酶研究最多的主要是源于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的弹性蛋白酶^[6-9],在酶理化特性、酶基因克隆、表达、结构等方面有研究^[8,10]。但因铜绿假单胞菌是致病微生物,严重限制其在食品工业中的应用。除了铜绿假单胞菌外,还有从地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)^[11]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[12]、微球菌(*Micrococcus luteus*)^[13]、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)^[14]等微生物中分离到弹性蛋白酶的报道。但所报道的弹性蛋白酶最适水解温度均在 30~40 °C 之间,而这个温度范围正是大量腐败菌生长的最适温度。而且酶活力较低,水解反应慢。若应用于肉类嫩化中,肉品在这个温度范围内容易受到大量腐败菌的污染而发生变质,这极大限制了这类弹性蛋白酶的应用。低温型弹性蛋白酶与普通酶相比有很多优势,它能在 25 °C 左右水解不溶性的弹性蛋白,在较低的温度下可有效抑制杂菌生长。故筛选产生低温弹性蛋白酶菌株在肉类嫩化的食品工业中有着潜在的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 从徐州食品厂、屠宰场、徐州肉联厂、农贸市场以及徐州工程学院学生食堂等附近的土壤、污水、淤泥等样品中分离筛选菌株。

1.1.2 培养基

1)富集培养基(g/L):弹性蛋白 3,酵母膏 1,葡萄糖 1, K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1; pH 7.0, 121 °C 蒸汽灭菌 20 min。

2)初筛平板分离培养基(g/L):弹性蛋白 5, 酵母膏 1, 葡萄糖 1, K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 琼脂粉 15; pH 7.0, 121 °C 蒸汽灭菌 20 min。

3)种子培养基(g/L):蛋白胨 5, 葡萄糖 10, 酵母膏 5, KH_2PO_4 2, $MgSO_4$ 0.1; pH 7.0, 121 °C 蒸汽灭菌 20 min。

4)摇瓶发酵培养基(g/L):蛋白胨 10, 酵母膏 5, 葡萄糖 5, K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 0.5, $MgSO_4$ 0.1; pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 试剂与仪器 弹性蛋白、刚果红-弹性蛋白:购自 Sigma 公司;DNA 分子标准及试剂盒、Taq™DNA 聚合酶:购自 TaKaRa 公司;琼脂糖:购自 Promega 公司;其余均为国产分析纯。PCR 仪:英国 TECHNE 公司;Bio-Rad 凝胶成像系统:美国伯乐公司;UV-1700 紫外分光光度计:日本岛津公司;Allegra 25R 高速冷冻离心机:美国贝克曼公司;DYY-8C 电泳仪:北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 低温弹性蛋白酶菌株的筛选

1)菌种初筛:取采集的土样 1.0 g 加入装有 9.0 mL 无菌水的试管中摇匀,然后取 1.0 mL 于 50 mL 富集培养基中,于 15 °C、180 r/min 恒温振荡培养 72 h,培养液再进行 10 倍梯度稀释至 10^{-6} ,分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个梯度的稀释液 0.2 mL 涂布在牛肉膏蛋白胨平板上,15 °C 倒置培养 48 h。将平板上长出的单菌落再点接于弹性蛋白初筛分离培养基上,15 °C 培养 48~72 d,观察菌落大小和菌落周围水解圈的大小,以菌株水解弹性蛋白所形成的透明圈直径与菌落径之比为筛选依据,选取二者比值较大的菌株进一步复筛。

2)菌种复筛:初筛得到的菌株经斜面活化后接种于装有种子培养基的摇瓶中,摇瓶容量 250 mL 装量 50 mL,培养温度 15 °C,摇床转速 200 r/min,培

养18 h后将培养好的菌液按体积分数8%的接种量接种于装有发酵培养基的摇瓶中,摇瓶容量500 mL,装量100 mL,培养温度15℃,摇床转速200 r/min,培养时间72 h。发酵结束后,按照标准方法测定酶活性,选取酶活最高的菌株进一步深入研究。

1.2.2 弹性蛋白酶活性测定 采用 Sachar^[15]法并参照我国现行药用弹性蛋白酶测定方法加以改进,该法以与染料偶联的不溶性底物经酶作用而溶解至水相,反应上清液的光密度反应底物被酶消化的程度,称取20 mg 刚果红-弹性蛋白溶于1 mL水中,加1 mL pH 8.0、0.2 mol/L的磷酸缓冲液,取1 mL适当稀释的酶液于25℃下振荡反应20 min,加入pH 6.0、0.7 mol/L的磷酸钠缓冲液2 mL终止反应,离心后取上清液测495 nm处的光密度,以不加酶液和底物的反应系统为空白,在此反应条件下溶解1 mg 刚果红-弹性蛋白底物所需的酶量定义为一个弹性蛋白酶活性单位(U)。参照 Sachar 方法进行制作标准曲线。

1.2.3 菌株鉴定

1)形态学、生理生化特征测定:按照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)方法进行碳源利用、接触酶、硫化氢、吲哚、硝酸盐还原等试验。

2)16S rDNA 基因序列测序和分析:斜面保存的菌株平板划线得出菌株单菌落,细菌基因组DNA的提取参照《分子克隆实验指南》(第3版)的方法,依据细菌16S rDNA中最保守的序列设计引物,引物F:5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3',引物R:5'-AAG GAG GTG WTCCAR CC-3',PCR反应体系20 μ L。热循环参数94℃预变性5 min,94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸2 min,循环30次,72℃延伸10 min。取2 μ L反应液进行1 g/dL琼脂糖电泳检测,PCR扩增产物送到生工生物工程有限公司测序。测序结果进行双向拼接后,将该序列与从NCBI中比对获得的相近细菌的16S rDNA序列采用Clustal X1.83进行多序列比对,然后采用MEGA4.0生物学软件构建系统进化树,利用邻位相连算法(N-J法)对各菌株的16S rDNA序列进行遗传距离计算,重复Boot-traps1000次进行统计学检验。

1.2.4 弹性蛋白酶酶学性质分析

1)酶最适反应温度和热稳定性:发酵液8 000 r/min离心20 min,将沉淀的菌体去除,取上清液作

为粗酶液,用于酶学性质初步研究。酶最适反应温度的测定是在标准反应体系中,在不同温度(15~55℃)下进行酶促反应。耐热性测定选取了30、40、50、60、70℃,酶液在该温度范围内的不同温度下分别孵育1 h,再按照标准方法测定酶活性。用未经处理的酶液做空白对照(为100%)。

2)酶最适作用pH值及酸碱稳定性:粗酶液在不同pH值(5.0~12.0)下进行酶促反应以测定其最适pH值。所用缓冲液为:pH 4.0~5.5的醋酸钠缓冲液,pH 6.0~7.5的磷酸钠缓冲液,pH 8.0~9.0的Tris-HCl缓冲液,pH 9.0~10.5的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液,pH 12.0的氯化钾-氢氧化钠缓冲溶液。以在最适pH值下所测酶活设为100%,其它pH值下所测为对其相对酶活。粗酶液酸碱稳定性的测定是将酶液在以上不同pH值的缓冲液中30℃下孵育1 h,以标准方法测定酶活。

3)金属离子及抑制剂对酶活性的影响:在粗酶液中加入一定浓度的金属离子及各种抑制剂,30℃保温1 h后,标准方法测定残余酶活,以不加任何试剂的酶液做空白对照。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

根据菌株分泌的弹性蛋白酶将菌落周围弹性蛋白水解产生可见的水解圈的特点,初筛出产生弹性蛋白酶的菌株,将各次初筛得到的菌株划线分离纯化后,再次将活性较高的菌株接到同一个初筛平板上进行进一步的筛选。大部分菌株在培养24 h后,在菌落周围都会产生肉眼可见的清晰透明水解圈,其中8株菌产生的水解圈直径同菌落直径之比较大,结果见图1。挑取这8株菌进行液体培养复筛。经过摇瓶发酵培养后,菌株XZE116的酶活较高,并且该菌株在弹性蛋白初筛平板上水解圈直径同菌落直径比值最大。因此选择该菌株做进一步的研究。

2.2 菌株形态学及生理生化鉴定

菌株XZE116在牛肉膏蛋白胨培养基上生长,菌落扁平,圆形,呈现乳白色,表面有微褶皱凸起,菌落特征见图2。营养体呈现短杆状,两端钝圆。营养体培养到后期,菌体中间开始膨大,呈纺锤状。芽孢在膨大部位形成,由小变大,形成孢子囊。菌株XZE116具体的形态学及生理生化特征见表1。根据

菌落、染色特征和生理生化特征，初步确定菌株 XZE116 为短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)。



图 1 弹性蛋白酶的初筛平板
Fig.1 Isolated elastase strains

表 1 菌株 XZE116 形态学及生理生化特性
Tab.1 Morphological,biological and physiological characteristics of strain XZE116

特性	结果	特性	结果
革兰氏染色	+	产硫化氢	-
运动性	+	接触酶活性	+
孢囊	+	V.P 反应	-
芽孢	+	吲哚试验	-
生长温度 10 ℃	+	甲基红试验	+
生长温度 42 ℃	+	硝酸盐还原	-
生长温度 50 ℃	+	D-葡萄糖	+
生长温度 55 ℃	-	麦芽糖	-
厌氧生长	-	D-木糖	-
明胶液化	+	海藻糖	-
淀粉水解	-	山梨醇	-
酪素	+	棉子糖	-
L-阿拉伯糖	-	D-甘露醇	-

注:+,阳性;- ,阴性。

2.3 16S rDNA 克隆及其序列分析

PCR 产物电泳检测结果见图 3 所示。回收产物后测序,测序结果显示为 1 413 bp,将其与 NCBI 上已有序列进行 Blast 同源检索，发现其 16S rDNA 和多数短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*) 的同源性达

99%以上。综合 XZE116 菌株的形态学特征、生理生化特征及 16S rDNA 核苷酸序列同源性分析结果，将菌株 XZE116 鉴定为短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)。



图 2 菌株 XZE116 菌落形态
Fig.2 Morphology of strain XZE116

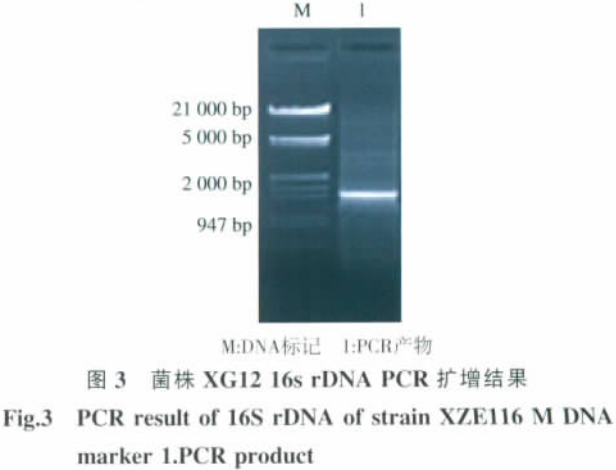


图 3 菌株 XG12 16s rDNA PCR 扩增结果
Fig.3 PCR result of 16S rDNA of strain XZE116 M DNA marker 1.PCR product

2.4 温度对粗酶活性的影响

酶催化最适温度测定结果见图 4 所示,酶最适反应温度为 25 ℃,在更低的温度如 15 ℃和 20 ℃仍有 45%、78%的酶活性。在温度 20~35 ℃之间,酶活性均在 75%以上,但当温度高于 45 ℃时,弹性蛋白酶活力下降至 54%以下,故该酶在较低的温度下催化活性较高。比来源于微球菌(*Micrococcus luteus*)^[13]、假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[8-9]、芽孢杆菌(*Bacillus sp.* EL3)^[16]、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)^[13]、嗜碱芽孢杆菌(*Alkalophilic bacillus*)^[17]的弹性蛋白酶最适作用温度要低。菌株 XZE116 弹

性蛋白酶最佳作用温度是国内外所报道的弹性蛋白酶中温度较低的一种,这在肉类嫩化中具有一定的优势,可以在较低的温度下对肉进行嫩化处理,可有效避免在较高的温度下处理肉制品时肉品腐败。故低温弹性蛋白酶在肉的嫩化处理中有一定的应用优势。

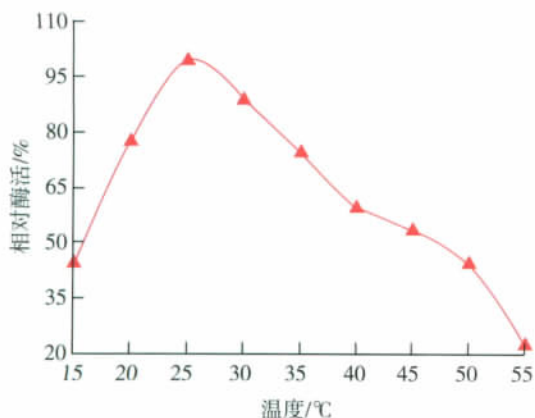


图4 温度对弹性蛋白酶活性影响

Fig.4 Effect of temperature on *Bacillus brevis* XZE116 elastase activity

酶的热稳定性见图5,酶在40℃保温2h,测得酶活还在80%以上,当温度提高到50℃以上,随着保温时间延长,酶活性迅速下降,温度为60℃时,保温3h即不能测得酶活性,表明短芽孢杆菌XZE116弹性蛋白酶耐热性较差,但在偏低温的条件下,长时间能保持高的活性。

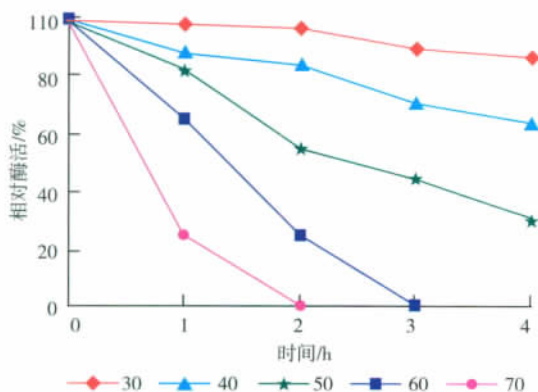


图5 弹性蛋白酶的热稳定性

Fig.5 Effect of temperatures on the stability of the elastase

2.5 pH 值对粗酶活性的影响

粗酶液在不同pH值的缓冲体系中,25℃下测定酶活性,结果见图6。在pH7.0~10.0之间酶相对

活性在80%以上,当pH值在7.0以下时,酶活性急剧下降,pH5.0时,酶相对活性仅有21%,表明酶在中性偏碱条件下活性较高。其最适作用pH8.0,低于所报道的嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus* Ya-B)^[17-18]、微球菌(*Micrococcus luteus*)^[13]的弹性蛋白酶。

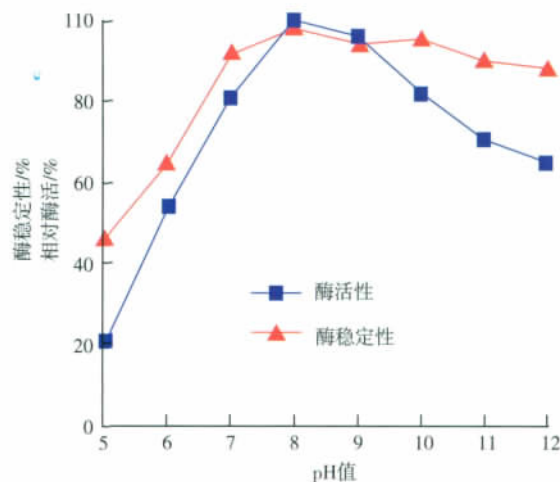


图6 pH值对弹性蛋白酶活性及稳定性的影响

Fig.6 Effect of pH on *Bacillus brevis* XZE116 elastase activity and stability

酶的酸碱稳定性的测定是将酶液在不同pH的缓冲液中于30℃处理1h,再在最适pH值下测定酶活性。结果表明,在pH7.0~12.0之间酶相对活性都保持在85%以上,而在pH7.0以下,酶活性急速下降,表明弹性蛋白酶在中性及碱性环境下非常稳定。

2.6 金属离子、表面活性剂及抑制剂对粗酶活性的影响

在粗酶液中分别加入不同的金属离子、表面活性剂及蛋白酶特异性抑制剂,使其达到一定的浓度,孵育1h后标准方法测定酶活,结果见表2。 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 对酶有强烈抑制作用,在5mmol/L的浓度下 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 对酶活性无明显影响,而 Mg^{2+} 对酶活有显著激活作用。表面活性剂对酶均有不同程度的抑制作用,其中Triton X-100抑制作用较强,经过处理后相对酶活降至75%。金属螯合剂对酶有轻度的抑制作用。丝氨酸蛋白酶特异性抑制剂PSFM几乎完全抑制酶活性,表面菌株XZE116弹性蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶。E-64对酶活性几乎没有影响,故该酶不属于半胱氨酸型蛋白酶。

表 2 各种抑制剂及金属离子对弹性蛋白酶活性的影响

Tab.2 Effect of various inhibitors and metal ions on the elastase activity from *Bacillus brevis* XZE116

试剂	浓度/(mmol/L)	相对酶活/%
None	—	100±3.1
Na ⁺	5	102±1.5
K ⁺	5	100±2.6
Mg ²⁺	5	121±4.4
Ca ²⁺	5	97±2.2
Mn ²⁺	5	85±3.5
Fe ²⁺	5	90±3.8
Cu ²⁺	5	81±2.1
Zn ²⁺	5	94±3.4
Hg ²⁺	5	46.2±1.2
Pb ²⁺	5	37±3.4
SDS	0.1%	81.2±3.1
CTAB	0.1%	87.9±4.1
Tween-80	1%	91±3.1
Triton X-100	1 %	75±2.4
EDTA	5	79.4±2.1
PSFM	4	11.2±1.2
E-64	0.2	97±5.1

3 结 语

微生物产弹性蛋白酶的研究虽然有一定报道,但与实际生产还有很大差距,用于肉类嫩化的弹性蛋白酶的商业化生产还是空白。主要原因在于,所筛选的菌株产酶量低和酶的理化性质存在缺陷,这是其推广应用的瓶颈所在。筛选产酶量高、更为适合肉类嫩化工艺的菌株,是亟待开展的工作。本研究采用不溶性的弹性蛋白作为惟一氮源制作琼脂平板,通过低温富集、初筛等方法筛选低温弹性蛋白酶高产菌株,本方法操作简单方便,目的菌株清晰可见,筛选步骤少,方法可靠。从采集的土壤样品中初筛得到 8 株产生弹性蛋白酶能力较强的菌株,经过反复复筛,得到高产低温弹性蛋白酶的菌株 XZE116。经形态、生理生化特性和分子生物学鉴定,其为短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)。

对该菌株产生的弹性蛋白酶粗酶性质进行了初步研究。结果表明:该菌株所产弹性蛋白酶在较宽的低温区间内活性高,最适作用温度为 25 ℃,当温度降至 20 ℃,相对酶活仍接近 80%。在 40 ℃以下,保温 2 h,酶活还保持在 80%以上。故该酶在较低的温度范围内催化活性较高,同时低温下稳定性较好,所以在肉类嫩化加工过程中,可以在低温环境下对肉进行嫩化处理。有望将其应用到畜产品工业中,提高肉制品的口感和营养价值,为低温弹性蛋白酶的开发、生产及运用奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] Erlendsson L E U S, Filippusson H E U. Purification and characterization of ovine pancreatic elastase [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 1998, 120(3): 549-557.
- [2] Robert L, Robert A M, Jacotot B. Elastin-elastase-atherosclerosis revisited [J]. **Atherosclerosis**, 1998, 140(2): 281-295.
- [3] XU Y, HE G Q, LI J J. Effective extraction of elastase from *Bacillus* sp. fermentation broth using aqueous two-phase system [J]. **Journal of Zhejiang University Science B**, 2005, 6(11): 1087-1094.
- [4] Considine T, Healy A, Kelly A L, et al. Proteolytic specificity of elastase on bovine [beta]-casein [J]. **Food Chemistry**, 1999, 66(4): 463-470.
- [5] 段钢, 赵振锋, 钱莹. 酶制剂在蛋白质加工行业的应用 [J]. **食品与生物技术学报**, 2005, 24(4): 104-110.
DUAN Gang, ZHAO Zhenfeng, QIAN Ying. Enzymes application in the protein processing industries [J]. **Journal of food science and Biotechnology**, 2005, 24(4): 104-110. (in Chinese)
- [6] Ogino H, Yokoo J, Watanabe F, et al. Cloning and sequencing of a gene of organic solvent-stable protease secreted from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 and its expression in *Escherichia coli* [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2000, 5(3): 191-200.
- [7] Besson C, Faver-Bonvin G, O'Fagain C, et al. Chemical derivatives of *Pseudomonas aeruginosa* elastase showing increased stability [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1995, 17(10): 877-881.

- [8] LIN X, XU W, HUANG K, et al. Cloning, expression and characterization of recombinant elastase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2009, 63(2): 69–74.
- [9] 贺稚非, 陈宗道, 李洪军, 等. 胞外弹性蛋白酶的理化特性及其影响因素[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(4): 10–13.
HE Zhi-fei, CHEN Zong-dao, LI Hong-jun, et al. Studies on properties of extracellular elastase from *Pseudomonas sp*[J]. **Food and Fermentation Industrie**, 2005, 31(4): 10–13. (in Chinese)
- [10] ROBERT A. BEVER B H I. Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene[J]. **Journal of Bacteriology**, 1988, 170(9): 4309–4314.
- [11] CHEN Q, GUOQING H, JINLING W. Acid shock of elastase-producing *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 and its elastase characterization evaluation[J]. **Journal of Food Engineering**, 2007, 80(2): 490–496.
- [12] 张娟, 刘书亮, 吴琦, 等. 产弹性蛋白酶芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 四川农业大学学报, 2007, 25(3): 253–256.
ZHANG Juan, LIU Shu-liang, WU Qi, et al. Screening and identification of elastase-producing *Bacillus* strains[J]. **Journal of Sichuan Agricultural University**, 25(3): 253–256. (in Chinese)
- [13] Clark D J, Hawrylik S J, Kavanagh E, et al. Purification and characterization of a unique alkaline elastase from *Micrococcus luteus*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2000, 18(1): 46–55.
- [14] 刘双发, 安德荣, 苟丽霞, 等. 新的产弹性蛋白酶菌株的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(9): 1345–1349.
LIU Shuang-fa, AN De-rong, GOU Li-xia, et al. Screening and identification of a new elastase-producing strain [J]. **Microbiology**, 2009, 36(9): 1345–1349. (in Chinese)
- [15] LA S. Photometric method for estimation of elastase activity[Z]. **K K W**, 1955: 90, 323–326.
- [16] 陈启和, 何国庆, 邬应龙. 弹性蛋白酶产生菌的筛选及其发酵条件的初步研究[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2003, 29(1): 59–64.
CHEN Qi-he, HE Guo-qing, WU Ying-long. Screening of elastase-producing strains and primary studies on fermentation conditions[J]. **Journal of Zhejiang University: Agric Life Sci**, 2003, 29(1): 59–64. (in Chinese)
- [17] TSAI Y C, LIN S F, LI Y F, et al. Characterization of an alkaline elastase from *Alkalophilic bacillus* Ya-B[J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)–General Subjects**, 1986, 883(3): 439–447.
- [18] TSAI Y C, JUANG R Y, LIN S F, et al. Production and further characterization of an alkaline elastase produced by *Alkalophilic bacillus strain* Ya-B[J]. **Applied and Environmental Microbiology Microbiology**, 1988, 54(12): 3156–3161.