

枯草芽孢杆菌QM11漆酶基因克隆表达及序列分析

由庆,徐伟*

(哈尔滨商业大学食品工程学院,黑龙江哈尔滨 150076)

摘要:为获得高效表达的产漆酶工程菌,将枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的漆酶(*cotA*)基因在大肠杆菌中表达。用PCR的方法从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)QM11基因组中扩增*cotA*基因,连接载体pET22b构建表达载体pET22b-*cotA*,转化至*E.coli* BL21(DE3)进行诱导表达,最终通过SDS-PAGE检测蛋白表达情况。克隆得到的*cotA*基因含有1542个核苷酸,由513个氨基酸组成,预测相对分子量为58 ku,理论等电点为5.91,无信号肽,二级结构以 β -折叠和无规卷曲为主,其中 β -折叠占26.71%,无规卷曲占52.05%,与NCBI已公布的*Bacillus subtilis*漆酶*cotA*基因(GenBank: GQ184294.1)碱基序列有12个碱基的差异,其编码的氨基酸序列有4个发生了改变。通过SDS-PAGE检测,目标蛋白相对分子质量约为54 ku,与预测相对分子质量基本相符。

关键词:枯草芽孢杆菌,漆酶,基因克隆,序列分析,表达载体构建,诱导表达

Cloning, expression and characterization of laccase from *Bacillus subtilis*

YOU Qing, XU Wei*

(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: To express laccase *cotA* gene from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* expression system, *cotA* gene was cloned from *Bacillus subtilis* QM11 genome DNA by PCR. Plasmid pET22b containing *cotA* gene was constructed and transferred into competent *Escherichia coli* BL21(DE3) and the expression of recombinant protein was proved by SDS-PAGE. The gene *cotA* contained 1542 nucleotides, comprising one open reading frame encoding a polypeptide of 513 amino acids with 58 ku of relative molecular weight and predicted pI value of 5.91 and there was no signal peptide in *cotA*. The secondary structure of *cotA* was mainly β -sheet and random coil, β -sheet was 26.71% and random coil was 52.05%. There were twelve-site mutations between the nucleotide sequence from *Bacillus subtilis* QM11 and *cotA* (NCBI GenBank: GQ184294.1) from *Bacillus subtilis*, which could result in four amino acid substitution. The molecular weight of *cotA* gene protein was estimated to be 54 ku by SDS-PAGE.

Key words: *Bacillus subtilis*; laccase; gene cloning; sequence analysis; construction of expression vector; induced expression

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)06-0225-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.06.038

漆酶(EC 1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶,能够催化多种酚类化合物氧化,同时将分子氧还原为水^[1],广泛应用于造纸及食品工业等。秸秆是我国主要的农业废弃物^[2],主要由木质素、纤维素和半纤维素组成,秸秆降解的关键就是处理包裹在纤维素和半纤维素外面的木质素^[3]。木质素是由带有苯环结构的单体交联组成的三维高聚物,漆酶可以有效的降解木质素。

在自然界中能够降解木质素并产生相应酶类的生物只占少数,主要是真菌和细菌^[4-6]。由于与真菌漆酶结构不同,细菌漆酶无需糖基化、热稳定性高、可耐受更高的pH及Cu²⁺抗性^[7]等特点比真菌漆酶更有优势。Suzuki等^[8]发现一种来源于细菌的漆酶可在70℃条件下保温20 min依然保持较高的酶活。Ruijssenaars等^[9]也发现了一种最适pH在7.5~8的细菌漆酶。

本研究以从森林土壤中分离得到的高产漆酶细

收稿日期: 2015-08-19

作者简介: 由庆(1990-),男,在读硕士研究生,研究方向:微生物学与发酵工程, E-mail: youq_will@126.com。

* 通讯作者: 徐伟(1963-),女,博士,教授,研究方向:微生物学与发酵工程, E-mail: xuwei@hrbcu.edu.cn。

基金项目: 哈尔滨商业大学研究生创新科研项目(JYSCX2014-333HSD)。

菌枯草芽孢杆菌QM11为研究对象,通过设计特异性引物扩增出cotA基因,进行序列分析,通过构建pET22b-cotA重组表达载体,将其转入*E.coli* BL21 (DE3)菌株中,以期实现重组漆酶cotA的高效表达,提高漆酶cotA的比活力,进一步增加细菌漆酶的产量,提高秸秆的降解效率,为实现农业废弃物资源化奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌*E.coli* BL21 (DE3)感受态细胞 购自北京全式金生物技术有限公司;克隆载体pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公司;表达载体pET22b 购自于美国Novagen公司;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)QM11 本实验室保藏;限制性内切酶 购自美国NEB公司;Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶 购自北京全式金生物技术有限公司;Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒 购自上海生工生物工程股份有限公司;质粒小提试剂盒、普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒 购自北京天根生化科技有限公司;其他试剂 均为国产分析纯。

PCR仪 美国BIO-RAD公司;凝胶成像系统 美国SIM公司;电泳仪和电泳槽 北京六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 QM11基因组DNA的提取 QM11基因组DNA提取按照Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒说明书操作。采用1.0%琼脂糖凝胶电泳,121 V电压,20 min,检验完整性并采用凝胶成像系统观察并拍照,总DNA保存于-80 °C备用。

1.2.2 引物设计 根据NCBI中已公布的枯草芽孢杆菌cotA基因序列(GenBank登录号GQ184294),用Primer 5.0软件设计引物QM-F 5'-CGGGATCCATGACACTTGAAAAATTTGTGGATGC-3';QM-R 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTTATGGGGATCAGTTATATCCATCG-3',并在其上下游分别引入酶切位点BamH I和Not I(下划线部分所示),上下游引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.3 QM11 cotA基因扩增 PCR反应采用50 μL体系,模版DNA 1 μL、10 μmol/L QM-F及QM-R各1 μL、10×PCR Buffer 5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 3 μL、dNTP mixture 3 μL、Taq DNA聚合酶(5 U/μL) 1 μL、ddH₂O补足至50 μL。PCR反应参数:95 °C 5 min;95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 2 min,30个循环;72 °C 10 min。扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶纯化目的条带,PCR产物纯化后与pMD18-T载体连接,转化JM109感受态细胞,蓝白斑筛选出阳性克隆,挑取阳性克隆进行测序,基因序列由上海生工生物工程公司进行测定。

1.2.4 QM11 cotA基因的生物信息学分析 测序结果采用Vector NTI 10.0进行序列比对分析。相对分子量与理论等电点预测采用ExPASy在线服务器的Compute pI/Mw工具(http://web.expasy.org/compute_pi/)。采用在线软件SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽序列的预测。采用http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=

npsa_sopm.html预测蛋白质的二级结构,采用SWISS MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行蛋白质结构三维建模。

1.2.5 重组表达载体的构建及重组子的筛选 将pMD18-cotA重组质粒与表达质粒pET22b分别用BamH I和Not I双酶切,经1%琼脂糖凝胶电泳,121 V,20 min,回收目的片段,将目的基因的酶切片段与酶切处理后的表达质粒pET22b进行连接。将连接产物转入*E.coli* BL21 (DE3),在含有氨苄青霉素(50 μg/mL)的LB抗性平板上37 °C培养过夜,挑取单克隆至LB液体培养基中,37 °C 150 r/min摇菌过夜,并进行菌落PCR验证。

1.2.6 重组载体在大肠杆菌中的诱导表达 挑取正确的转化子过夜活化后,以1%的接种量转接至氨苄青霉素(50 mg/mL)的LB液体培养基中,37 °C、150 r/min摇床培养,当培养至OD₆₀₀达到0.6时,加入IPTG至终浓度1 mmol/L开始诱导,于诱导的1、2、3、4 h取样,同时未诱导的作为对照。

1.2.7 重组蛋白的SDS-PAGE 收集诱导表达后的菌液,12000 r/min离心10 min,沉淀加入5 mL PBS溶液,进行超声破碎。破碎后的溶液12000 r/min离心10 min,取上清进行SDS-PAGE电泳,浓缩胶浓度为5%,分离胶浓度为12%。

2 结果与分析

2.1 QM11总DNA提取及目的基因的扩增



图1 QM11基因组DNA提取结果

Fig.1 Electrophoresis of total DNA extracted from QM11 cotA

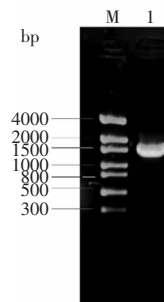


图2 基因组DNA扩增结果

Fig.2 Electrophoretic profile of PCR products of cotA

注:M:DNA Marker;1:QM11的PCR产物。

如图1所示,QM11基因组DNA经1%琼脂糖凝胶电泳可知,条带单一,清晰可见,说明DNA完整性较好。以提取的基因组DNA为模版,利用QM-F及QM-R

进行PCR扩增,得到1500 bp左右的一条带,如图2所示,大小与预期结果相符。

2.2 cotA基因序列的测定及分析

将扩增获得的cotA基因进行TA克隆,获得重组的pMD18-T-cotA,转化JM109后,蓝白斑筛选后,将重组子送于上海生工生物工程有限公司进行测序。

将测得的序列进行生物信息学分析结果表明,cotA基因含1542个核苷酸,其中GC含量为48.02%,编码513个氨基酸组成(图3),相对分子量为58436.07,理论等电点为5.91。在线软件SignalP 4.1 Server分析结果表明cotA基因无信号肽。将推导的氨基酸序列提交http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi进行同源比对,结果显示该序列与Bacillus sp.WN01和Bacillus sp.LS02等cotA基因同源性较高,均达到99%。漆酶cotA碱基序列与已公布的Bacillus subtilis漆酶基因(NCBI GenBank: GQ184294.1)碱基序列有12个碱基的差异,其编码的氨基酸序列有4个发生了改变。

```

M T L E K F V D A L P I P D T L K P V Q
1  ATG ACA CTT GAA AAA TTT GTG GAT GCT CTC CCA ATC CCA GAT ACA CTA AAG CCA GTA CAG
   Q S K E K T Y Y E V T M E E C T H Q L H
61  CAA TCA AAA GAA AAA ACA TAC TAC GAA CTC ACC ATG GAA GAA TGC ACT CAT CAG CTC CAT
   R D L P P T R L W G Y A N G L F P G P T I
121 CGC CAT CTC CCA ACC GCG CTC TCG GGA TAC AAC GCG TTA TTT CCG GCG GCG ACC ATT
   E V K R N E N V Y V K W M N N L P S T H
181 GAG GTT AAA AGA AAT GAA AAC GTA TAT GTA AAA TCG ATG AAT AAC CTT CTT TCC ACA CAT
   F L P I D H T I H H S D S Q H E E P E V
241 TTC CTT CCG ATT GAT CAC ACC ATT CAT CAC AGT GAC AGC CAG CAT GAA GAG CCG GAG GTA
   K T V V H L H G G V T P D D S D G Y P E
301 AAG ACT GTT CTT TTA CAC GCG GCG CTC AGC CCA GAT GAC AGT GAC GCG TAT CCG GAG
   A W F S K D F E Q T G P Y F K R E V Y H
361 GCT TGG TTT TCC AAA GAC TTT GAA GAA CCA GGA CCT TAT TTC AAA AGA GAT GTT TAT CAT
   Y P N Q Q R G A I L W Y H D H A M A L T
421 TAT CCA AAC CAG CAG CCG GCG GCT ATA TTG TGG TAT CAC GAT CAC GCG ATG GCG CTC ACC
   R L N V Y A G L V G A Y I I H D P K E K
481 AGG CTA AAT GTC TAT GCG GGA CTT CTC GGT GCT TAT ATC ATT CAT GAC CCA AAG GAA AAA
   R L K L P S D E Y D V P L L I T D R T I
541 CGC TTA AAA CTG CCT TCA GAC GAA TAC GAT GTG CCG CTT CTT ATC ACA GAC CCG ACC ATC
   N E D G S L F Y P S A P E N P S P S L P
601 AAT GAG GAC GGT TCT TTG TTT TAT CCA AGC GGA CCG GAA AAC CCT TCT CCG TCA CTG CTT
   N P S I V P A F C G E T I L V N G K V W
661 AAT CTT TCA ATC GTT CCG GCT TTT TGC GGA GAA ACC ATA CTC GTC AAC GGG AAG GTA TGG
   P Y L E V E P R K Y R F R V I N A S N T
721 CCA TAC TTG GAA GTC GAG CCA AGG AAA TAC CCA TTC GGT GTC ATC AAC GCG TCC AAT ACA
   R T Y N L S L D N C G E F I Q I G S D G
781 AGA ACC TAT AAC CTG TCA CTC GAT AAT GCG GGA GAG TTT ATT CAG ATT GGT TCA GAT GGA
   G L L P R S V K L N S F S L A P A E R Y
841 GGC CTC CTG CCG CGA TCT GTT AAA CTG AAT TCT TTC AGC CTT GCG CCT GCT GAA CGT TAT
   D I I I D F T A Y E G E S I I L A N S A
901 GAT ATC ATC ATT GAT CTA CCA GAA TAT GAA GGA GAA TGC ATC ATT TTG CCA ACC AGC GCG
   G C C G D V N P E T D A N I M Q F R V T
961 GCG TGC GCG GGT CAC CTC AAT CCT GAA ACA GAT CCG AAT ATC ACA TTC ACA CTC ACA
   K P L A Q K D E A S R K P K Y L A S Y P S
1021 AAA CCA TTG GCA CAA AAA GAC GAA AGC AGA AAG CCG AAG TAC CTC CCG TCA TAG CTT TCG
   V Q H E R I Q N I R T L K L A G T Q D E
1081 GTA CAG CAT GAA AGA ATA CAA AAC ATC AGA CCG TGC GAT CCG ACA GCG ACC CAG CAG GAA
   Y G R P V L L L N N K R W H D P V T E A
1141 TAC GCG ACA CCG CTC CTT CTT AAT AAC AAA CCG TGC GAT CCG GTC ACA GAA GCA
   P K V G T T E I W S I I N P T R G T H P
1201 CCA AAA GTC GCG ACA ACT GAA ATA TGG TCC ATT ATC AAC CCG ACA CCG GGA ACA CAT CCG
   I H L H L V S F R V L D R R P F D I A R
1261 ATC CAC CTG CAT CTA GTC TCC TTC CCT GTA TTA GAC CCG CCG CCG TTT GAT ATC CCG CCG
   Y Q E S G E L S Y T G P A V P P P P S E
1321 TAT CAA GAA AGC GCG GAA TTG TCC TAT ACC GGT CCG GCT CTC CCG CCG CCG ACA AGT GAA
   K G W K D T I O A H A G E V L R I A A T
1381 AAG GCG TGC AAA GAC ACC ATT CAA GCG CAT CCA GGT GAA GTC CTG ACA GTC CCG CCG ACA
   F G P Y S G R Y V W H C H I L E H E D Y
1441 TTC GGT CCG TAC AGC GGA CCA TAC GTA TGC CAT TGC CAT ATT CTA GAG CAT GAA GAC TAT
   D M M R P M D I T D P H K *
1501 GAC ATG ATG AGA CCG ATG GAT ATA ACT GAT CCG CAT AAA TAA

```

图3 cotA基因序列及对应的氨基酸序列

Fig.3 DNA sequence of cotA gene and deduced amino acid sequence of cotA protein

2.3 cotA蛋白二级结构分析

采用SOPM二级结构预测程序(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopm.pl)进行cotA蛋白二级结构预测。由图4可知,α-螺旋占14.04%(72个),β-折叠为26.71%(137个),β-转角为7.21%(37个),无规则卷曲为52.05%(267个)。

2.4 cotA三维结构建模

进入Swiss-Model三维结构预测服务器,提交cotA基因编码的氨基酸序列,所得结果见图5。cotA蛋

```

10 20 30 40 50 60 70
MTLEKFDALPIPDILKPVQSQKEKTYEYVIMEECTHQLHRDLPPTRLWYNGLFFPGPIIEVKRNNVYV
hhhhhhhtcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
KWMNLPSTHFLPIDHTIHHSDSQHEEPEVKTVVHLHGGVTPDDSDGYEAWFSKDFEQGYPFKREVTH
hhhtcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
YPNQQRGAAILWYHDHAMLTRLNVAAGLVGAYIIHDPKPKRLKLPDSEYDVPLLITDRIINEDGSLFYPS
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
APENPSPSLPNPSPVAFCEGTEILVNGKVPWVPLEVPRKRYFRVINAENRTRVYMLSLDNGGEGFIQIGSDG
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
GLLPRSGKLNPSLAPAERYDIIIDFTAYEGESIILANSAGCGDVMPETDANIMQFRVTKPLAQKDES
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
KPKYLAAYSPVQHEIRIQNIRTLKLAGTQDEYGRPVLLLNKRWHDPVTEAPKVGITTEIWSIINPTRGTHP
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
IHLHLVSPVLDRRPFDIARYQESGELSYTGPAVPPPPSEKGVKDIQAHAAGEVLRIAATFGPYSGRYVW
eeeeeeeeehcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
HCHILEHEDYDMMRPMIDTPHK
ehhhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc

```

图4 cotA蛋白二级结构预测

Fig.4 Deduced secondary structure of cotA protein
注:h:α-螺旋;t:β-转角;c:无规则卷曲;e:β-折叠。

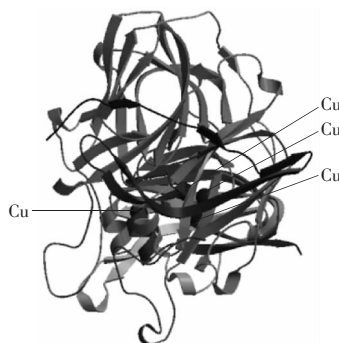


图5 cotA蛋白的三级结构

Fig.5 Deduced 3-D structure of cotA protein

白三级结构模型的建立是以4akq.1.A为模板,一致性达到99.22%,QMEAN4值为0.45。观察cotA蛋白三级结构,图5中的4个黑色球为蛋白中含有的4个铜原子,具有由3个杯状结构域紧密组成的漆酶的球状构象。

2.5 原核表达载体的构建及重组子的筛选

将pMD18T-cotA和载体pET22b分别用BamH I、Not I进行双酶切,回收目的基因片段和载体片段,用T4 DNA连接酶进行连接,将pET22b-cotA表达载体转入感受态的E. coli BL21宿主菌,涂布于含氨苄青霉素的LB平板,挑取8个阳性克隆,进行菌落PCR鉴定,经菌落PCR均扩增出一段1500 bp左右的片段(图6),证明为正确的转化子。

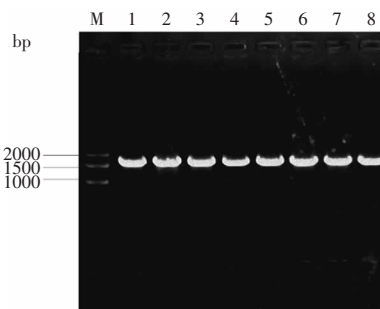


图6 重组子鉴定结果

Fig.6 Identification of constructed plasmid
注:M: DNA Marker; 1~8: 8个阳性克隆菌落PCR结果。

2.6 cotA融合蛋白的原核表达

分别将未诱导和诱导过夜的E.coli BL21的总蛋

白进行SDS-PAGE蛋白电泳,重组子经IPTG诱导后,与对照比较,1、2、3、4 h后在54 ku处均有明显条带(图7)。该条带所示的蛋白分子量与理论值相符,表明成功表达了cotA蛋白。

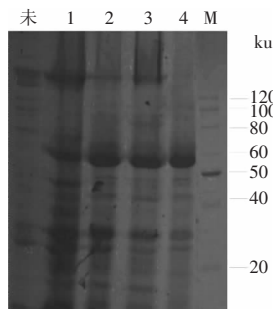


图7 表达产物 SDS-PAGE分析

Fig.7 SDS-PAGE profile of expressed products

注:未:未加入IPTG诱导;1:诱导1 h后取样;2:诱导2 h后取样;3:诱导3 h后取样;4:诱导4 h后取样;M:Protein Marker。

3 结论

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,能够催化多种酚类物质的氧化,过去认为漆酶主要存在于植物以及真菌中,且研究主要集中在真菌漆酶上,而关于细菌漆酶的研究在近几年才逐渐开展。

本研究从*Bacillus subtilis* QM11中克隆得到了漆酶基因cotA,以基因组为模板,PCR扩增出的核酸序列全长为1542个核苷酸,编码513个氨基酸组成,预测相对分子量为58436.07,理论等电点为5.91,无信号肽,cotA蛋白二级结构预测:其中 α -螺旋占14.04%(72个), β -折叠为26.71%(137个), β -转角为7.21%(37个),无规卷曲为52.05%(267个)。经过BLAST比对,该序列与*Bacillus* sp.WN01和*Bacillus* sp.LS02等cotA基因同源性较高,均达到99%。漆酶cotA碱基序列与已公布的*Bacillus subtilis*漆酶基因(NCBI

GenBank:GQ184294.1)碱基序列有12个碱基的差异,其编码的氨基酸序列有4个发生了改变。将*Bacillus subtilis*的漆酶基因克隆到表达载体pET22b,转化*E.coli* BL21 (DE3),通过含有Amp的LB平板筛选单克隆,使用IPTG进行诱导表达,最终通过SDS-PAGE进行检测,表达产物分子量约为54 ku,与预测分子量基本一致。为获得高效表达的产漆酶工程菌以及提高漆酶产量及酶活力奠定了基础。

参考文献

- [1] K Nakamura. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62:2050-2066.
- [2] 王勇,孟晓林. 秸秆废弃物的生物学特性及其开发利用[J]. 山西农业科学, 2009, 37(2):42-44.
- [3] Gai YP, Zhang WT, Mu ZM, et al. Involvement of ligninolytic enzymes in degradation of wheat straw by *Trametes trogii*[J]. J Appl Microbiol, 2014, 117(1):85-95.
- [4] 丛立新. 白腐真菌生物降解秸秆及饲料化的研究进展[J]. 饲料研究, 2014, 7:11-13.
- [5] 郑苗苗,邵淑丽,张东向,等. 红平菇漆酶基因异源表达及对染料脱色的研究[J]. 纺织学报, 2014, 35(12):84-89.
- [6] 李红亚,李术娜,王树香,等. 产芽孢木质素降解菌MN-8的筛选及其对木质素的降解[J]. 中国农业科学, 2014, 47(2):324-333.
- [7] Hullo MF, Moszer I, Danchin A, et al. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase[J]. J Bacteriol, 2001, 183(18):5426-5430.
- [8] Suzuki T, Endo K, Ito M, et al. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(10):2167-2175.
- [9] Ruijsenaars HJ, Hartmans S. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 65(2):177-182.
- [10] 汪少芸,黄景洁. 新型复合酶制备鳃鱼蛋白水解物的研究[J]. 中国食品学报, 2008, 18(4):123-127.
- [11] Quaglia. Influence of Enzymic Hydrolysis on Structure and Emulsifying Properties of Sardine 8 Protein Hydrolysates[J]. J Food Sci, 1990, 55(6):1571.
- [12] Soottawat Benjakul. Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid wastes[J]. J Agric Food Chem, 1997(46):3423.
- [13] 郭本恒,孔保华. 保健与功能食品[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2001.
- [14] 陶兴无. 鲢鱼肉蛋白的酶解工艺研究[J]. 中国调味品, 2007, 7:48-51.
- [15] 许庆陵,杜扬,王雅卿,等. 鲢肉脱脂及其酶解技术研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2):124-127.
- [16] 周燕芳,詹丽虹. 鳃鱼蛋白酶解条件的研究[J]. 江苏农业科学, 2010(2):312-314.
- [17] 丁伟璐,赵小慧,丁佳,等. 酶解金枪鱼加工下脚料制备蛋白粉加工工艺研究[J]. 科学养鱼, 2014(10):75-78.
- [18] 张音,夏延斌. 酶解制备鸭肉香精前体物的工艺优化[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2012, 2(4):217-220.
- [19] 许晓琴,徐丽. 利用有限酶解技术提高鳃鱼食用肉粉溶解度的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16):9838-9839, 9981.
- [20] 郭浩楠,杨荣华. 鲢鱼蛋白的酶解及其酶解物功能性质的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 149(2):106-111.
- [21] 陈钧辉. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社, 2003.
- [22] 华婧. 水解大豆蛋白制备肉味香精的研究[D]. 无锡:江南大学, 2007.
- [23] 蔡凤英. 酶解鸡肉蛋白制备调味基料研究[D]. 郑州:河南工业大学, 2007.
- [24] 王璋,许时婴,汤坚. 食品化学[M]. 北京:中国轻工出版社, 2006.
- [25] 郑集,陈钧辉. 普通生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 2007.
- [26] 李伶俐. 美拉德反应体系中影响烤肉风味形成的因素研究[D]. 无锡:江南大学, 2011.

(上接第224页)

1987(38):271-276.

[6] Quaglia. Influence of Enzymic Hydrolysis on Structure and Emulsifying Properties of Sardine 8 Protein Hydrolysates[J]. J Food Sci, 1990, 55(6):1571.

[7] Soottawat Benjakul. Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid wastes[J]. J Agric Food Chem, 1997(46):3423.

[8] 郭本恒,孔保华. 保健与功能食品[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2001.

[9] 陶兴无. 鲢鱼肉蛋白的酶解工艺研究[J]. 中国调味品, 2007, 7:48-51.

[10] 许庆陵,杜扬,王雅卿,等. 鲢肉脱脂及其酶解技术研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2):124-127.

[11] 周燕芳,詹丽虹. 鳃鱼蛋白酶解条件的研究[J]. 江苏农业科学, 2010(2):312-314.

[12] 丁伟璐,赵小慧,丁佳,等. 酶解金枪鱼加工下脚料制备蛋白粉加工工艺研究[J]. 科学养鱼, 2014(10):75-78.

[13] 汪少芸,黄景洁. 新型复合酶制备鳃鱼蛋白水解物的研究