

# 1株耐高温产蛋白酶细菌的筛选鉴定及其液体发酵条件的优化

敖 静,桓明辉,李 杨,刘晓辉,高晓梅,徐 冲  
(辽宁省微生物科学研究院,辽宁 朝阳 122000)

**摘要:**为高效发酵鸡粪,在鸡粪发酵高温时期( $\geq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ )筛选到11株菌株,确定其中1株高温细菌GX7具有较高的蛋白酶活力。经16S rDNA测序并进行同源性比较可知,GX7与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的16S rDNA序列相似性达到100%;通过构建系统发育进化树,结合生理生化试验,鉴定GX7为枯草芽孢杆菌。通过绘制细菌生长曲线、测定细菌蛋白酶活力可知,细菌GX7的蛋白酶活力与菌数呈强正相关。从发酵培养基的组成及菌株的培养条件等方面优化枯草芽孢杆菌GX7产蛋白酶的条件,结果显示,最优培养基配方为:酵母浸膏1.5%、玉米粉1.5%、 $\text{MgSO}_4$  0.5%;最优培养条件为:pH值8.1、培养温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、接菌量2%、装液量50 mL(250 mL)、摇床转速140 r/min。在此条件下,活菌数提高1个数量级,达到 $2.56\times 10^9\text{ cfu/mL}$ ,蛋白酶活力提高约3倍,为26 U/mL。

**关键词:**耐高温;蛋白酶;细菌;鉴定;发酵条件优化  
**中图分类号:** S811.7      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2016)11-0116-07

## Screening and Identification of A High Temperature Resistance Protease-producing Bacteria and Optimization of Its Liquid Fermentation Condition

AO Jing, HUAN Minghui, LI Yang, LIU Xiaohui, GAO Xiaomei, XU Chong  
(Microbial Research Institute of Liaoning Province, Chaoyang 122000, China)

**Abstract:** To improve chicken manure fermentation, 11 strains were screened in chicken manure fermentation during the period of high temperature ( $\geq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), of which thermophilic bacteria GX7 with high protease activity by 16S rDNA sequencing and homology comparison, the sequence homology of GX7 with *Bacillus subtilis* of 100%. GX7 was identified as *Bacillus subtilis* by phylogenetic tree and combined with physiological and biochemical tests. By drawing the bacterial growth curve and determining the bacterial protease activity, it could be known that the protease activity of GX7 was strongly positively correlated with the number of bacteria. By optimization of culture medium composition and strain culture conditions, the optimal medium was yeast extract of 1.5%, corn powder of 1.5%,  $\text{MgSO}_4$  of 0.5%; The optimum culture condition was pH value of 8.1, culture temperature of  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , inoculation amount of 2%, liquid volume of 50 mL (250 mL), shaker speed of 140 r/min. Under these conditions, the number of viable bacteria increased 10 times to  $2.56\times 10^9\text{ cfu/mL}$ , and the protease activity increased three times to 26 U/mL.

**Key words:** high temperature; protease; bacteria; identification; fermentation condition optimization

随着畜禽养殖业的不断发展,畜禽粪便的产量也急剧增加。据统计,我国畜禽粪便的年总量高达20亿t,是工业废弃物的3.2倍<sup>[1]</sup>。利用微生物菌剂进行堆肥发酵是将畜禽粪便无害化处理的最有效

手段之一。堆肥发酵是微生物通过代谢繁殖将有机质分解转化为无机态养分的过程,通过添加外源微生物能大幅度提高堆肥腐熟的速度和效果<sup>[2]</sup>。近年来,我国学者在利用微生物发酵堆肥方面进行了

大量研究,其中,石春芝等<sup>[3]</sup>用鸡粪、猪粪和稻壳混合堆肥,通过添加 0.5% 的快速发酵菌剂,显著缩短了发酵时间,堆制 14 ~ 21 d 即达到有机肥料标准;高华等<sup>[4]</sup>利用自行分离筛选的菌株复合作为除臭菌剂,对鸡粪进行对比发酵,试验结果发现,0 ~ 10 d 时,氨气释放量减少了 21%,同时硫化氢的产生也有所减少,通过添加除臭菌剂提早 20 d 消除了臭味,除臭效果明显;席北斗等<sup>[5]</sup>发现,添加高效复合微生物菌剂的成品肥料含有大量有益菌群,是一种良好的生物活性肥料。生物有机肥中含有许多功能菌,如产纤维素酶菌株、产淀粉酶菌株等,分离筛选具有特定功效的功能菌并将其用于发酵堆肥具有重要意义。目前,关于从发酵鸡粪中筛选具有较高蛋白酶活力菌株的研究鲜见报道,为此,本研究在鸡粪发酵高温时期筛选产蛋白酶菌株,并对其生长条件进行优化,旨在为鸡粪发酵奠定基础。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

1.1.1 鸡粪 由辽宁省微生物科学研究院微生物实验室采集保存。

1.1.2 培养基配置 NA 培养基:牛肉膏 0.3%、蛋白胨 1%、NaCl 0.5%,pH 值 7.0 ~ 7.2,121 ℃ 高温灭菌 30 min。

酪蛋白培养基:干酪素 1%、牛肉膏 0.3%、蛋白胨 1%、NaCl 0.5%、琼脂 1.5% ~ 2%、酵母浸膏 0.1%,pH 值 7.0 ~ 7.5,121 ℃ 高温蒸汽灭菌 30 min。

基础发酵液培养基:蔗糖 1%、蛋白胨 1%、NaCl 0.5%,pH 值 7.0 ~ 7.2,121 ℃ 高温灭菌 30 min<sup>[6]</sup>。

液体摇瓶培养条件:pH 值 7.0、37 ℃、转速 180 r/min、装液量 50 mL(250 mL)、接菌量 2%<sup>[7]</sup>。

1.1.3 仪器 主要有可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司,T6 新悦)、立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂,LDZX - 75KB)、恒温摇床(上海世平实验设备有限公司,SPF - 2008)。

## 1.2 菌种初筛

取样方法:鸡粪自然堆肥发酵,高温阶段( $\geq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ )从粪堆的不同深度部位取样 3 份,将 3 份样品充分混合后,称取 1.0 g 置于 99 mL 无菌水中,振荡约 30 min。梯度稀释至  $10^{-5}$  倍,分别利用划线法于 NA 培养基上( $50 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 24 h<sup>[8]</sup>。从中挑选形态不同的单菌落,利用平板划线法将其纯化。

## 1.3 蛋白酶活力测定

定性分析:将分离出的所有菌株点接在酪蛋白

培养基平板上,于( $50 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$  培养,每 4 h 观察 1 次,至 48 h 结束。挑选透明圈明显的菌株,测量其菌落直径与透明圈直径<sup>[9]</sup>。

定量分析:采用福林酚法<sup>[10]</sup>测定蛋白酶活力。

## 1.4 鉴定方法

1.4.1 生理生化鉴定 将菌株按划线法接到 NA 培养基平板上,进行革兰氏染色,观察菌落形态及生长状态<sup>[11-12]</sup>,并对分离得到的菌株进行生理生化试验。

1.4.2 16S rDNA 序列比对及系统发育分析 16S rDNA 测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。将 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的核苷酸序列进行同源性分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),利用 Mega 软件进行比对并构建系统发育进化树。

## 1.5 培养时间对菌数及产酶活力影响的测定

取 14 个装有 50 mL NA 培养基的 250 mL 三角瓶,用记号笔分别标明培养时间,即 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、24、28、32 h。吸取 1 mL 菌种(37 ℃、180 r/min 培养 24 h)分别加入 14 个三角瓶中,液体摇瓶培养条件培养,并按标注的培养时间取相应的三角瓶,立即放入冰箱中冷藏,每个时间点做 3 个平行处理<sup>[13]</sup>。以未接菌的 NA 培养基为空白对照,测 OD<sub>600</sub> 值,并计算每个时间点蛋白酶活力。

## 1.6 液体培养基优化单因素试验及正交试验

采用液体摇瓶培养条件培养,培养时间 12 h,用稀释平板计数法计活菌数。每个处理设 3 个平行。

1.6.1 碳源 分别用 1% 的葡萄糖、乳糖、可溶性淀粉、玉米粉替代基础发酵液培养基中 1% 的蔗糖。

1.6.2 氮源 分别用 1% 的硝酸钠、氯化铵、酵母浸膏、黄豆饼粉替代基础发酵液培养基中 1% 的蛋白胨。

1.6.3 无机盐 分别用 0.5% 的 ZnSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1:1) 替代基础发酵液培养基中 0.5% 的 NaCl<sup>[14]</sup>。

1.6.4 正交试验设计 根据筛选出的最优碳源、氮源和无机盐 3 个重要因素,选用三因素三水平 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交表进行正交试验,以进一步优化,每个处理设 3 个平行<sup>[15]</sup>,正交试验设计见表 1。

表 1 GX7 液体培养基优化的正交试验设计 %			
水平	玉米粉(A)	酵母浸膏(B)	MgSO <sub>4</sub> (C)
1	0.5	0.5	0.25
2	1.0	1.0	0.50
3	1.5	1.5	0.75

1.7 液体培养条件的优化

以优化后的最优培养液配方培养,培养时间 12 h,用稀释平板计数法计活菌数。每个处理设 3 个平行。

1.7.1 初始 pH 值 将初始 pH 值用 20% NaOH 和 0.5 mol/L HCl 分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0(未调前培养基 pH 值为 4.6)。接种量为 1 mL,装液量为 50 mL(250 mL),于恒温摇床中 37 ℃、180 r/min 振荡培养。选出菌数较高 pH 值为 6.0~8.0,在此范围内将 pH 值调至 6.6、6.9、7.2、7.5、7.8、8.1、8.4,研究细化 pH 值对菌数的影响。

1.7.2 培养温度 培养温度分别设定为 25、30、35、40、45、50、55 ℃,其他培养条件同上。

1.7.3 接种量 将接种量分别设为 1%、2%、3%、

4%、5%,其他培养条件同上。

1.7.4 装液量 250 mL 三角瓶中装液量分别设为 10、25、50、75、100 mL,其他培养条件同上。

1.7.5 摇床转速 转速分别设为 60、100、140、180、220 r/min,其他培养条件同上。

2 结果与分析

2.1 试验用菌株的初步筛选及产酶活力大小定性比较

试验共分离纯化出 11 株菌株,分别编号 GX1—GX11(表 2)。

D/d 值较高说明菌株分解酪蛋白能力较强。由表 2 可以看出,细菌 GX7 D/d 为 3.00,分解酪蛋白能力比其他菌株强。

表 2 菌株 GX1—GX11 分解酪蛋白能力测定结果

菌株	透明圈平均直径 (D)/mm	菌落平均直径 (d)/mm	D/d	菌株	透明圈平均直径 (D)/mm	菌落平均直径 (d)/mm	D/d
GX1	12.88	10.35	1.24	GX7	16.88	5.63	3.00
GX2	3.78	3.78	1.00	GX8	25.26	18.53	1.36
GX3	13.66	10.70	1.28	GX9	10.32	10.32	1.00
GX4	8.36	8.36	1.00	GX10	10.39	6.79	1.53
GX5	12.30	12.30	1.00	GX11	7.56	7.56	1.00
GX6	19.97	10.45	1.91				

2.2 试验用菌株蛋白酶活力大小定量比较

根据图 1 或用回归方程计算得出,当吸光度为 1 时,酪氨酸的量为 97.9 μg,即吸光常数 K 值为 97.9。从图 2 可以看出,高温细菌中 GX7 的蛋白酶活力最高,约为 9 U/mL,而其他菌株的蛋白酶活力均在 4 U/mL 以下。

2.3 细菌 GX7 形态学特征比较及生理生化试验

细菌 GX7 形态学特征为菌落小、白色、形状不规则、表面起褶皱、边缘锯齿状、不产色素;有芽孢、椭圆形、中生;杆状,革兰氏染色呈阳性。根据《伯杰细菌鉴定手册》,初步鉴定细菌 GX7 为芽孢杆菌属。

从表 3 可以看出,细菌 GX7 生化试验结果为:葡萄糖产气、不产酸,麦芽糖、硝酸盐还原、明胶液化、VP 等试验结果阳性,乳糖、西蒙氏柠檬酸盐、吡哌等试验结果阴性,符合芽孢杆菌属的生化特征。

表 3 细菌 GX7 的生化特征

项目	结果	项目	结果
葡萄糖产酸	-	西蒙氏柠檬酸盐	-
葡萄糖产气	+	硫化氢	-
乳糖	-	脲酶	-
麦芽糖	+	运动性	+
甘露糖	-	硝酸盐还原	+
蔗糖	-	淀粉水解	+
果糖	-	吡哌	-
木糖	-	明胶液化	+
阿拉伯糖	-	VP	+

注: + 表示阳性, - 表示阴性。

2.4 细菌 GX7 的 16S rDNA 序列比对

使用 BLAST 将 GX7 的 16S rDNA 序列提交到 NCBI 核酸数据库中,与数据库中其他菌的 16S rDNA 序列进行比对。结果表明,GX7 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 16S rDNA 序列相似性达到

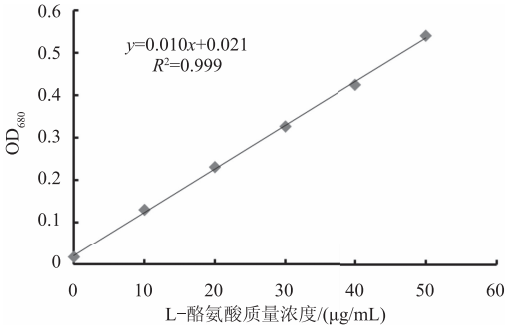


图 1 L-酪氨酸标准曲线

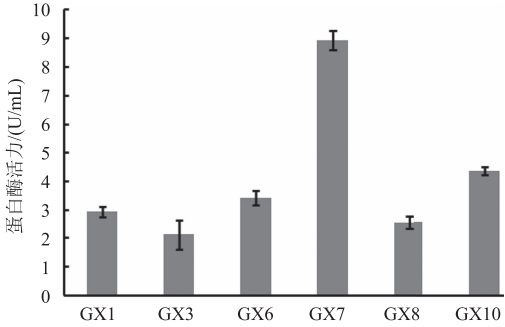


图 2 细菌蛋白酶活力比较

100%,可以初步确认细菌 GX7 为枯草芽孢杆菌。

从 GenBank 中选择 8 个菌株与 GX7 构建系统发育进化树。如图 3 所示,菌株 GX7 与 *Bacillus subtilis* strain TAT1-8 亲缘关系最近,进一步证明 GX7 为枯草芽孢杆菌。

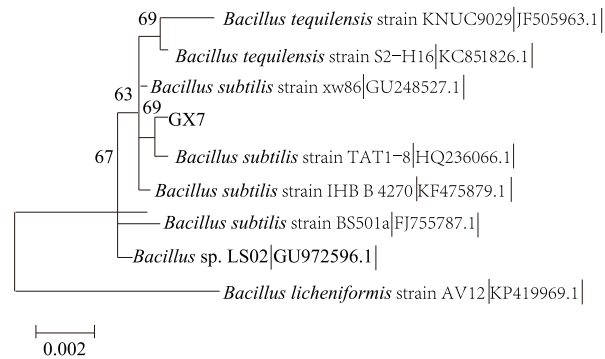


图 3 细菌 GX7 的 16S rDNA 系统发育进化树

2.5 细菌 GX7 的生长曲线及酶活力变化曲线

生长曲线是反映菌体生长状态的曲线,分为 4 个阶段:迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期,通过生长曲线可以判断菌株的最佳培养时间。从图 4 可以看出,细菌 GX7 培养 12 h 内菌数逐渐升高,蛋白酶活力也随之增高;超过 12 h 后,菌数开始降低,酶活力也随之降低;培养至 12 h 时,OD<sub>600</sub> 值最高,即菌数最多,所以最佳培养时间为 12 h。

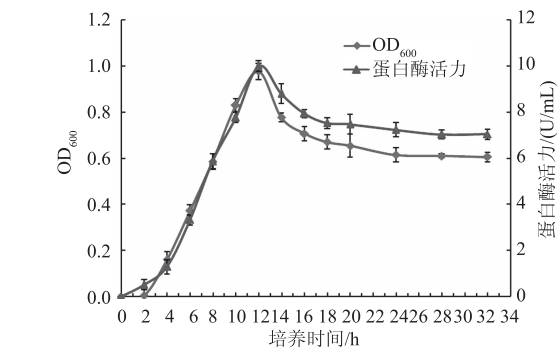


图 4 培养时间对 GX7 的菌数及产酶活力的影响

从图 5 可以看出,酶活力与菌数关系密切。GX7

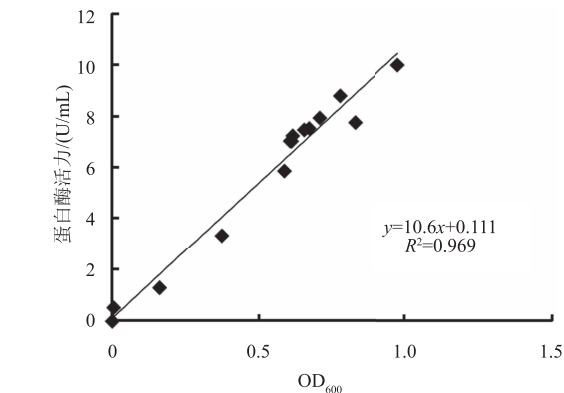


图 5 GX7 蛋白酶活力与菌数的相关性

的蛋白酶活力与菌数的相关系数  $r=0.984$ ,表明细菌 GX7 的蛋白酶活力与菌数呈强正相关( $r>0$ ,为正相关,且  $r>0.8$ ,为强正相关)。因此,培养基优化可将菌数高低作为衡量标准。

2.6 细菌 GX7 液体培养基的优化

2.6.1 单因素试验结果

2.6.1.1 碳源对活菌数的影响 从图 6 可以看出,玉米粉和可溶性淀粉为碳源时,GX7 的生长明显优于葡萄糖、乳糖和蔗糖;利用玉米粉和可溶性淀粉作为碳源发酵后,GX7 活菌数超过  $2.87 \times 10^8$  cfu/mL。而利用其他 3 种碳源时,其活菌数在  $0.85 \times 10^8$  cfu/mL 以下,说明 GX7 利用淀粉的能力优于单糖和二糖,利用玉米粉的能力优于可溶性淀粉。可见,GX7 生长的最佳碳源是玉米粉,其次是可溶性淀粉。

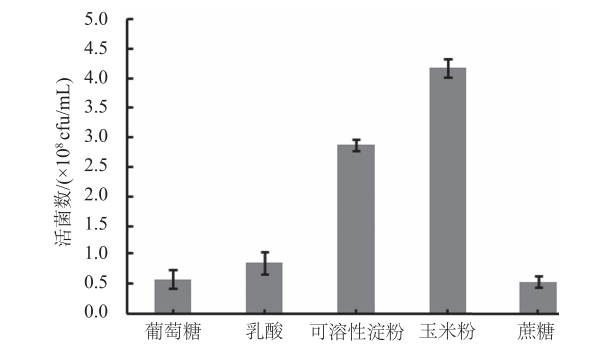


图 6 不同碳源对活菌数的影响

2.6.1.2 氮源对活菌数的影响 从图 7 可以看出,酵母浸膏、黄豆饼粉和蛋白胨为氮源时,GX7 的生长明显优于硝酸钠和氯化铵,其活菌数可达到  $6.22 \times 10^8$  cfu/mL 以上,说明 GX7 利用有机氮源的能力优于无机氮源。利用有机氮源的能力依次为酵母浸膏 > 黄豆饼粉 > 蛋白胨,这与酵母浸膏中富含氨基酸、维生素及未知生长因子有关<sup>[16]</sup>。可见,GX7 生长的最佳氮源是酵母浸膏。

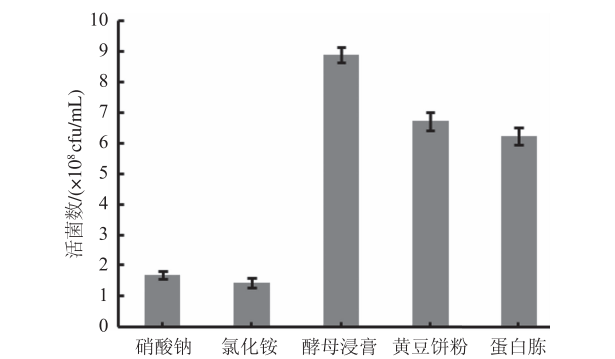


图 7 不同氮源对活菌数的影响

2.6.1.3 无机盐对活菌数的影响 从图 8 可以看出,Zn<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>2+</sup> 对 GX7 的生长略有抑制作用,菌数均低于 NaCl; MgSO<sub>4</sub> 对 GX7 的生长有明显的促进

作用,其活菌数可达到  $4.26 \times 10^9$  cfu/mL;  $K_2HPO_4$  与  $KH_2PO_4$  (1:1) 混合时, GX7 的活菌数达到  $1.58 \times 10^9$  cfu/mL,说明  $K^+$  对 GX7 的生长有一定的促进作用,也可能是由于  $K_2HPO_4$  和  $KH_2PO_4$  形成了缓冲溶液,对溶液的 pH 值产生了一定的缓冲作用,导致菌数增多。可见, GX7 生长的最佳无机盐为  $MgSO_4$ 。

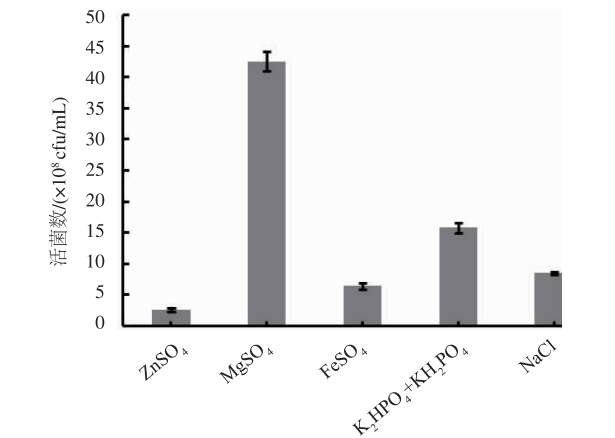


图 8 不同无机盐对菌数的影响

2.6.2 正交试验结果 确定最佳碳源是玉米粉,最佳氮源是酵母浸膏,最佳无机盐是  $MgSO_4$ , 选用三因素三水平  $L_9(3^3)$  正交表进行试验,结果见表 4。

表 4 GX7 液体培养基优化的  $L_9(3^3)$  正交试验结果

试验编号	玉米粉 (A)	酵母浸膏 (B)	MgSO <sub>4</sub> (C)	平均活菌数/( $\times 10^8$ cfu/mL)
1	1	1	1	4.18
2	1	2	2	5.35
3	1	3	3	9.00
4	2	1	2	3.40
5	2	2	3	8.60
6	2	3	1	10.50
7	3	1	3	6.60
8	3	2	1	11.90
9	3	3	2	21.10
$K_1$	18.53	14.18	26.58	
$K_2$	22.50	25.85	29.85	
$K_3$	39.60	40.60	24.20	
$k_1$	6.80	4.73	8.86	
$k_2$	7.50	8.62	9.95	
$k_3$	13.20	13.53	8.07	
R	6.40	8.80	1.88	

通过正交试验可知,  $R_B > R_A > R_C$ , 3 个因素对试验结果的影响顺序为  $B > A > C$ , 利用数据统计软件 SPSS 计算得  $F_A = 3.330$ ,  $F_B = 4.657$ ,  $F_C = 0.214$ , 即酵母浸膏 (B) 在这 3 个因素中影响最大, 玉米粉 (A) 次之,  $MgSO_4$  (C) 最小。由表 5 可以得出, 最优配方为  $A_3B_3C_2$ , 即酵母浸膏 1.5%、玉米粉 1.5%、 $MgSO_4$  0.5%。

2.7 细菌 GX7 液体发酵条件的优化

2.7.1 培养基初始 pH 值对活菌数的影响 从图 9 可以看出,随着 pH 值的升高,细菌 GX7 活菌数随之增加,当 pH 值为 8.1 时,活菌数最高;当 pH 值大于 8.1 时,细菌 GX7 活菌数有所下降。因此,确定 GX7 的最适 pH 值为 8.1。

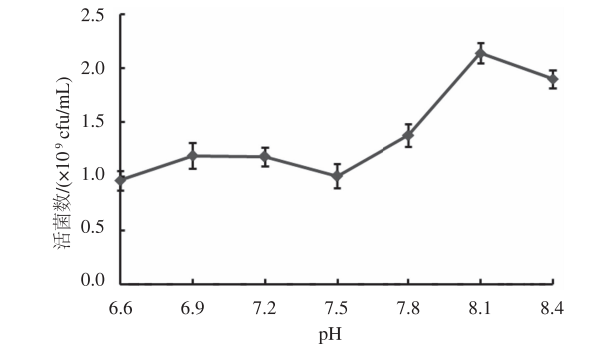


图 9 不同初始 pH 值对活菌数的影响

2.7.2 培养温度对活菌数的影响 从图 10 可以看出,  $25 \sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 细菌 GX7 的活菌数随温度升高而增加;当温度超过  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,细菌 GX7 的活菌数随温度升高而减少,但由于 GX7 在高温条件下筛选出,所以,温度升高到  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,仍有活菌。可见,细菌 GX7 的最适生长温度是  $35 \sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 根据试验具体情况,选用细菌常用培养温度  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

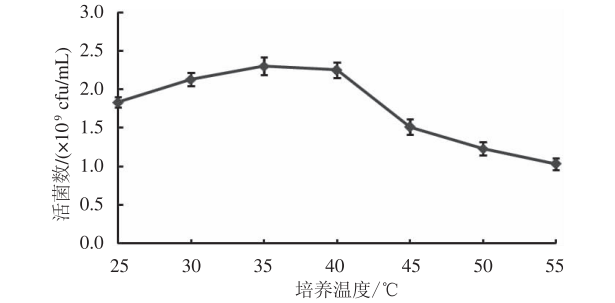


图 10 不同培养温度对活菌数的影响

2.7.3 接菌量对活菌数的影响 从图 11 可以看出,接菌量小于 3% 时,细菌 GX7 的活菌数随接菌量

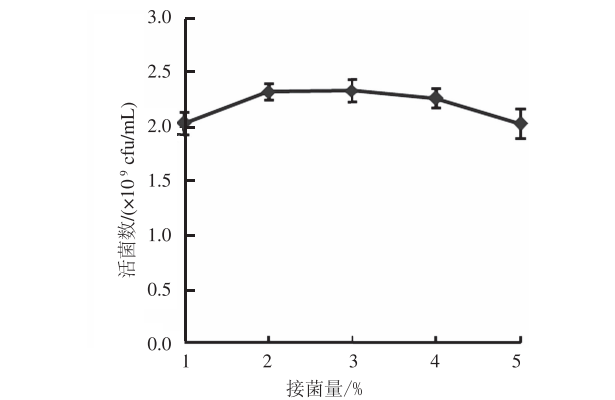


图 11 不同接菌量对活菌数的影响



的增加略有增加;当接菌量大于 3% 时,活菌数有所下降,说明接种量过大或者过小都会影响到活菌数,过小会造成细菌长势较慢,过大又会引起溶氧或营养物质不足而导致菌数减少。因此,最佳接菌量为 2%~3%。接菌量为 2% 和 3% 时,菌数相差较小,因此,确定 GX7 液体培养最佳接菌量为 2%。

2.7.4 装液量对活菌数的影响 从图 12 可以看出,250 mL 三角瓶中装液量小于 50 mL 时,菌数随装液量的增加而增加;而装液量超过 50 mL 以后,菌数开始减少。由此可知,装液量的多少对菌株的生长有一定影响,装液量过少营养物质不足,不利于菌株生长;装液量过大则通氧量减少,导致菌数下降<sup>[17]</sup>。因此,细菌 GX7 的液体培养最佳装液量为 50 mL(250 mL)。

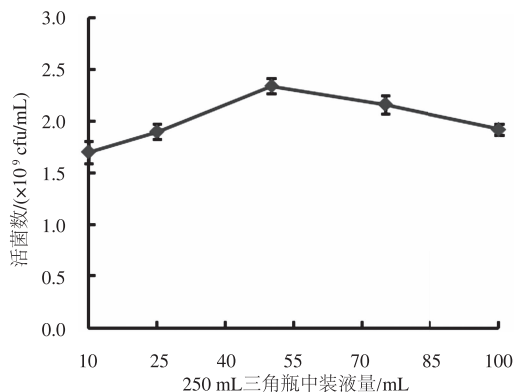


图 12 不同装液量对活菌数的影响

2.7.5 转速对活菌数的影响 从图 13 可以看出,振荡培养箱转速小于 140 r/min 时,菌数随转速的加快而增加;当转速大于 140 r/min 时,菌数基本保持不变。由此可知,当转速过小时,培养基通氧量不足,不利于菌株生长;当通氧量达到菌株生长所需的极限时,转速虽然增加,但菌数基本保持不变。因此,确定 GX7 液体培养最佳摇床转速为 140 r/min。

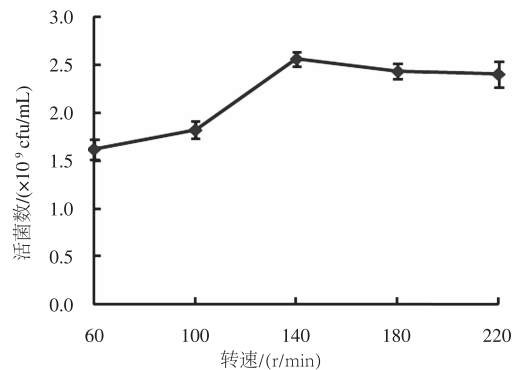


图 13 不同转速对活菌数的影响

配方优化前,GX7 的菌数为  $0.85 \times 10^8$  cfu/mL;

蛋白酶活力为 9 U/mL。通过以上试验,在最佳培养条件下,GX7 的菌数提高至  $2.56 \times 10^9$  cfu/mL;蛋白酶活力为 26 U/mL,比优化前提高了约 3 倍。

### 3 结论与讨论

蛋白质是鸡粪的主要物质之一,其中粗蛋白含量为 25%~35%<sup>[14]</sup>,本研究以筛选具有降解蛋白质功能的细菌为目的,在鸡粪发酵高温期时( $\geq 50^\circ\text{C}$ )筛选到 11 株高温菌株,确定了 1 株高温细菌(GX7)具有较高蛋白酶活力,经过 16S rDNA 测序并进行同源性比较可知,GX7 与枯草芽孢杆菌的 16S rDNA 序列相似性达到 100%,通过构建系统发育进化树,并结合生理生化试验,鉴定 GX7 为枯草芽孢杆菌。

本研究确定了酶活力与菌数的关系,优化培养基提高菌数的同时也提高蛋白酶活力。利用优化的培养基配方,在优化后的培养条件下培养,活菌数由  $0.85 \times 10^8$  cfu/mL 提高至  $2.56 \times 10^9$  cfu/mL,蛋白酶活力由 9 U/mL 提高至 26 U/mL,提高了约 3 倍。有效菌数多可以抑制其他细菌的生长,在鸡粪发酵时解决了其他有害杂菌过多的问题,而且能提高发酵效率,缩短鸡粪发酵时间;同时,蛋白酶活力的提高更有利于鸡粪中蛋白质的分解,能够提高发酵后的有效肥效,增加肥力。本研究为进一步研究高温蛋白质降解菌的应用奠定了理论基础。

#### 参考文献:

- [1] 温海燕. 枯草芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 兽医科技, 2012(2): 118-120.
- [2] 李先,刘强,荣湘民,等. 有机肥对水稻产量及产量构成因素的影响[J]. 湖南农业科学, 2010(5): 64-66.
- [3] 石春芝,蒲一涛,郑宗坤,等. 垃圾堆肥接种固氮菌对堆肥含氮量的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(4): 419-421.
- [4] 高华,秦清军,谷洁,等. 除臭菌剂在家禽粪便无害化处理中的效果研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(11): 59-64.
- [5] 席北斗,刘鸿亮,孟伟,等. 高效复合微生物菌群在垃圾堆肥中的应用[J]. 环境科学, 2001, 22(5): 122-125.
- [6] 王妹,陈有光,段平,等. 枯草芽孢杆菌培养基配方优化的研究[J]. 渔业现代化, 2008, 35(6): 44-47.
- [7] 张丹,许景钢,路伟明,等. 低温降解纤维素的细菌的筛选及鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(1): 55-57.
- [8] 李慧. 猪粪中产淀粉酶、蛋白酶菌株的筛选、鉴定及发酵条件的优化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.

(下转第 125 页)

- [3] 刘巧婷,何若钢,刘谨,等. 谷氨酰胺对保育猪生长性能、免疫器官及其小肠形态学发育程度影响的研究[J]. 饲料工业,2014(15):35-40.
- [4] 陈静,刘显军,边连全,等. 谷氨酰胺对早期段仔猪生长性能和免疫性能的影响[J]. 西北农业学报,2006,15(4):58-62.
- [5] 张海平,程小爱. 水胁迫下欧李丙二醛和氧自由基的变化[J]. 天津农业科学,2015,21(12):15-20.
- [6] Janero D R. Nitric oxide (NO) related pharmaceuticals: Contemporary approaches to therapeutical NO modulation [J]. Free Radical Bio Med,2002,28(10):1495-1506.
- [7] 张秀英. 断奶应激对仔猪血清抗氧化功能指标的影响[J]. 畜禽业,2010(11):42-43.
- [8] 赵骏,杨超,王传鹏,等. 芹菜素对雄性小鼠肝脏组织总抗氧化能力、还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽值、丙二醛含量影响研究[J]. 中国医药导报,2013(18):7-9.
- [9] 杨家军. 早期断奶仔猪肠上皮细胞氧化与损伤及二氢杨梅素对其调控作用[D]. 北京:中国农业科学院,2012:60-62.
- [10] 连慧香,程丰,朱凤霞,等. 饲喂鲜胡萝卜对豫南黑猪产后母猪健康状况及血清免疫和抗氧化指标的影响[J]. 河南农业科学,2015,44(7):128-131.
- [11] 席鹏彬,林映才,蒋宗勇,等. 谷氨酰胺二肽对断奶仔猪生长、免疫、抗氧化力和小肠粘膜形态的影响[J]. 动物营养学报,2007,19(2):135-141.
- [12] 王现盟. 谷氨酰胺对断奶仔猪肠黏膜形态和细胞能量合成的影响[D]. 杭州:浙江大学,2010:43-44.
- [13] Noha G B, Ezzat A E E. Immunoelectron microscope localization of androgen receptors and proliferating cell nuclear antigen in the epithelial cells of albino rat ventral prostate [J]. Journal of Microscopy and Ultrastructure, 2015,3(2):75-81.
- [14] 章平,张自富. FSH 激活的 ERK1/2 信号通路在 GC 细胞增殖分化过程中的作用[J]. 河南农业科学,2014,43(8):120-125.
- [15] Kan C C, Chung T Y, Hsieh M H. Gene expression profiling of rice seedlings in response to glutamine treatment [J]. Genomics Data,2015,6:123-124.
- [16] 张军民. 谷氨酰胺对早期断奶仔猪肠道的保护作用及其机理研究[D]. 北京:中国农业科学研究所,2000:71-77.
- [17] Milan M, Štefan T, Zuzana J, et al. Impact of alanyl-glutamine dipeptide on proliferative and inflammatory changes in jejunal mucosa after acute mesenteric ischemia [J]. Journal of Pediatric Surgery, 2014, 49(9):1385-1389.

(上接第 121 页)

- [9] 肖蓓,王晓丹,班世栋,等. 酱香大曲中产中性蛋白酶嗜热细菌的筛选及鉴定[J]. 酿酒科技,2015(2):50-53.
- [10] 全国食品工业标准化技术委员会. 蛋白酶制剂:GB/T 23527—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [11] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [12] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京:科学出版社,1984.
- [13] 沈萍,范秀荣,李广武. 微生物学试验[M]. 北京:人民教育出版社,1980.
- [14] 刘新风,牛春华. 枯草芽孢杆菌 BSG1 产蛋白酶发酵条件优化[J]. 食品工业,2013,34(7):1-4.
- [15] 秦艳,李卫芬,黄琴. 枯草芽孢杆菌发酵条件的优化[J]. 饲料研究,2007(12):70-74.
- [16] 张志焱,徐海燕,杨军方. 枯草芽孢杆菌固体发酵培养基的优化[J]. 饲料博览,2005(9):34-36.
- [17] 李庆岗. 鸡粪的开发与利用[J]. 山东家禽,2002(6):42-45.