

微孢根霉产凝乳酶的发酵条件优化

孙倩¹ 王喜平² 闫巧娟² 江正强^{1*}

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083;

2. 中国农业大学 工学院,北京 100083)

摘要 筛选得到一株高产凝乳酶的菌株 F518,鉴定为微孢根霉。通过单因素试验优化了微孢根霉 F518 液体发酵产凝乳酶的发酵条件。结果表明:发酵产酶的最适碳源为酒糟,最适氮源为酵母浸粉,培养基最适初始 pH 为 5.0。在优化后的发酵条件下 30 ℃培养 72 h,微孢根霉 F518 产凝乳酶活性最高,达到 1 001 SU/mL。微孢根霉 F518 在凝乳酶生产方面有很大的应用前景。

关键词 微孢根霉;凝乳酶;液体发酵;优化

中图分类号 Q 814.4

文章编号 1007-4333(2014)04-0137-07

文献标志码 A

Optimization of fermentation conditions for milk clotting enzyme production by *Rhizopus microsporus*

SUN Qian¹, WANG Xi-ping², YAN Qiao-juan², JIANG Zheng-qiang^{1*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract The strain F518, identified as *Rhizopus microsporus*, was newly isolated from fermented bean curd for its high level of milk clotting enzyme production. The single-factor tests were employed to evaluate the optimal fermentation conditions for milk clotting enzyme production of *Rhizopus microsporus* F518 by liquid fermentation. The results showed that the optimal conditions for milk clotting enzyme production were as follows: vinasse as carbon source, yeast extract as nitrogen source, the initial pH was 5.0 and incubation temperature was 30 ℃. Under optimized conditions, the highest enzyme activity of 1 001 SU/mL was obtained after 72 h of incubation. *Rhizopus microsporus* F518 possesses a potential application from the industrial point of view for the milk clotting enzyme production.

Key words *Rhizopus microsporus*; milk clotting enzyme; liquid fermentation; optimization

凝乳酶是一种天冬氨酸蛋白酶,特异性地水解κ-酪蛋白 Phe₁₀₅-Met₁₀₆之间的肽键,导致牛奶凝结,因此广泛用于奶酪与干酪素生产中。传统的凝乳酶来源于小牛皱胃,但利用其生产干酪受到很大的限制。微生物生产凝乳酶成本较低、酶提取方便、经济效益高,不仅解决了小牛皱胃酶供不应求的问题,而且带动了凝乳酶制剂行业的发展。微生物凝乳酶的来源有细菌、放线菌和真菌,其中细菌中的解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌都有产凝乳酶的报道^[1],也有学者筛选到放线菌中链霉菌属、小单孢菌属和马

杜拉放线菌属都有一定的产凝乳酶活性^[2],其蛋白水解活性也很高,但酶的热稳定性较高,不适合单独用于奶酪生产。一些真菌产凝乳酶性质适合于奶酪生产,毛霉属和根毛霉属是研究最为广泛的产凝乳酶的种属,近年来有关根霉属菌株产凝乳酶的报道也比较多。真菌来源的凝乳酶从19世纪60年代即开始用于商业化干酪的生产。迄今,国外已实现微生物发酵凝乳酶的规模化生产。目前微生物凝乳酶应用最多的是真菌中的微小毛霉(*Mucor pusillus*)、米黑毛霉(*Mucor miehei*)和栗疫菌(*Endothia*

收稿日期:2013-12-06

基金项目:国家杰出青年科学基金项目(31325021)

第一作者:孙倩,博士研究生,E-mail:sunqian126@163.com

通讯作者:江正强,教授,博士,主要从事酶工程专业研究,E-mail:zhqjiang@cau.edu.cn

parasitica)产生的凝乳酶^[3]。国内学者自20世纪80年代开展凝乳酶的研究,但国内大部分凝乳酶主要还是依赖进口的重组凝乳酶制剂,随着奶酪市场需求的不断扩大,凝乳酶的研究开发仍然具有重要的意义。

相较于牛胃凝乳酶,一些微生物凝乳酶仍存在凝乳活性较低、水解酪蛋白的活性较高和热稳定性高的问题,限制其在干酪生产中的应用。但微生物源凝乳酶是新型凝乳酶开发的一个有效途径,凝乳酶高产菌株的筛选仍是关键,同时对酶的发酵工艺进行优化以提高酶的产量,对今后酶性质的研究及其工业化生产都极为重要。微生物凝乳酶生产的发酵方式有固体发酵和液体发酵。很多真菌凝乳酶用固体发酵,但固体发酵是间歇式发酵,培养基pH和溶氧等条件不易控制,且有些微生物固体发酵的产酶活性并没有液体发酵高。

根霉可作为凝乳酶的潜在产生菌,具有在奶酪生产中应用的潜力,研究根霉凝乳酶以替代小牛皱胃酶生产干酪具有重要的意义。本实验室筛选得到一株高产凝乳酶的微孢根霉须状变种(*Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*)。国内外学者的研究表明微孢根霉可产生纤维素酶^[4]和脂肪酶^[5]等,但未见其产生凝乳酶的报道。本研究通过对此菌株产凝乳酶液体发酵条件进行优化,旨在为其应用于奶酪等相关产业提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* F518,由中国农业大学食品科学与营养工程学院食品酶与发酵工程实验室筛选保存。酪蛋白(casein),购于Sigma公司;低分子量标准蛋白样品,购于TaKaRa公司;酵母提取物、胰蛋白胨,购于英国Oxoid公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定

培养菌株1~5 d,观察菌落形态。用扫描电子显微镜观察孢子表面结构。提取微孢根霉F518的基因组DNA,测定18S rDNA序列并在GenBank中进行Blast比对,使用MEGA4.0软件构件系统发育树。

1.2.2 液体发酵产凝乳酶

初始发酵培养基(质量浓度,g/L):燕麦粉30,

蛋白胨10,磷酸二氢钾5,无水氯化钙0.3,硫酸镁0.3,pH为5.0。

发酵培养:在30℃培养120 h,发酵液离心取上清,测定粗酶液凝乳酶活性和蛋白水解活性。

1.2.3 发酵产酶条件的优化

利用单因素法优化微孢根霉F518液体发酵产凝乳酶的条件。分别以质量浓度为30 g/L的麸皮、燕麦、酒糟、脱脂棉粉和蔗渣为单一碳源,酒糟与葡萄糖、蔗糖和脱脂棉等按照1:1的比例进行复配做复合碳源,考察碳源对产酶的影响。选取最适的碳源,研究碳源浓度对产酶的影响。选定碳源后,以每种氮源含氮素72.5 mg(50 mL 1%的蛋白胨所含的氮素)为基准,研究氯化铵、硫酸铵、硝酸钾、蛋白胨、酵母浸粉、酪蛋白、脱脂粉、大豆蛋白胨和大豆粉等氮源对微孢根霉F518产凝乳酶的影响。选定氮源种类后,研究氮源浓度对产酶的影响。选取最适碳源和氮源,对二者浓度设计2因素3水平正交试验,确定最佳碳氮比。

确定最佳碳源和氮源后,试验同样采用单因素优化的方法对微孢根霉F518液体发酵产凝乳酶的培养条件包括初始pH、发酵温度和发酵时间进行优化研究。分别在不同初始pH(4.0~7.0)和不同温度(25~45℃)下发酵产凝乳酶以考察初始pH和温度对产酶的影响;最后在优化后的最适培养条件下培养菌株,考察产酶历程,确定最适发酵时间。

试验数据采用Excel软件进行分析,试验中各发酵条件的优化均做3次平行,结果取3次结果的平均值。

1.2.4 酶活性及蛋白含量的测定

总蛋白含量测定:Lowry法^[6],以牛血清蛋白为标准蛋白。

凝乳酶活性测定^[7]:用50 mmol/L,pH 5.6的醋酸钠缓冲液配制质量浓度为84 g/L的脱脂乳液,氯化钙浓度为0.01 mol/L。取5.0 mL脱脂乳液于37℃保温5 min,加入0.5 mL酶液,立即混匀,开始计时,当管壁上出现絮状沉淀时即为终点。把40 min凝固1 mL质量浓度为84 g/L脱脂乳液所需的酶量定义为一个索氏单位(Soxh Unit,SU)。按下式计算凝乳酶活性为 $MC = 2\ 400 \times V_1 \times n / (t \times V_2)$ 。式中:MC为凝乳酶活性/(SU/mL); V_1 为脱脂牛奶溶液体积/mL; V_2 为加酶体积/mL; t 为凝乳时间/s; n 为稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

真菌 F518 的 18S rDNA 的序列全长为 1 735

bp, 序列比对结果表明该菌株与根霉属菌株的同源性很高。利用软件 MEGA4.0 构建系统发育树, 如图 1 所示, F518 与根霉属的微孢根霉 (*R. microsporus*) 之间亲缘关系最为接近。

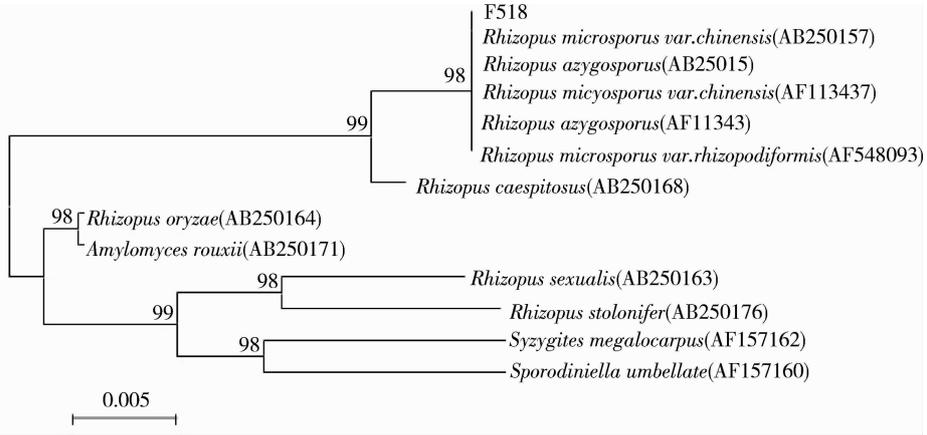


图 1 F518 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of F518

真菌 F518 在 37 °C 培养 3 d 的菌落形态见图 2(a), 白色匍匐菌丝不发达, 先有少量顶盖生长, 后塌陷。在扫描电镜下观察其产孢结构, 见图 2(b), 孢子囊轴大多呈梨形, 少数呈半球形一球形, 属于根霉属中的微孢根霉 (*R. microsporus*)。

子囊孢子呈球形, 表面有细刺状突起。参照 Liou 等^[8]对该属菌株分类检索表的修正及对微孢根霉变种分类学特征的描述, 鉴定该菌株为微孢根霉须状变种 (*Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*)。



(a) F518在37 °C培养3 d的菌落形态
(a) Colonemorphologies of F518 at 37 °C

(b) 孢子囊与囊轴(电镜200×)
(b) Sporangium and columella (Electron microscope 200×)

图 2 F518 的菌落形态和电镜下孢子形态

Fig. 2 Colonemorphologies(a)and Spore morphologies of F518 on electron microscope(b)

2.2 碳源对菌株液体发酵产凝乳酶的影响

碳源对微孢根霉 F518 发酵产凝乳酶的影响见表 1。当以酒糟和脱脂棉粉作为唯一碳源时, 微孢根霉 F518 发酵产凝乳酶能力较高, 其中又以利用

酒糟的能力最强, 凝乳酶活性达到 593 SU/mL。这可能是由于酒糟本身含氮素丰富, 而凝乳酶是一种诱导酶, 酒糟既作为碳源又作为诱导剂, 有利于微孢根霉 F518 凝乳酶的分泌。试验进一步研究了酒糟

表1 碳源种类对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响

Table 1 Effect of carbon sources on MCE production from *R. microsporus* F518

碳源种类 Carbon sources	凝乳酶活性/(SU/mL) Milk clotting activity
麸皮 Wheat bran	97±4
燕麦 Oats	119±2
酒糟 Vinasse	593±10
脱脂棉粉 Degreasing cotton	319±27
蔗渣 Bagasse	80±4

与葡萄糖、蔗糖、脱脂棉、燕麦和淀粉的复配对产酶的影响(表2),结果表明酒糟与蔗糖复配时,凝乳酶活性最高,为361 SU/mL,反而低于酒糟作为单一碳源时的酶活性。因此选择酒糟作为碳源。

表2 碳源复配对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响

Table 2 Effect of compound carbon sources on MCE production from *R. microsporus* F518

碳源种类 Carbon sources	凝乳酶活性/(SU/mL) Milk clotting activity
酒糟+葡萄糖 Vinasse and Glucose	100±6
酒糟+蔗糖 Vinasse and Sucrose	361±12
酒糟+脱脂棉 Vinasse and Degreasing cotton	345±11
酒糟+燕麦 Vinasse and Oats	147±4
酒糟+淀粉 Vinasse and Strach	69±2

进而研究了酒糟的质量浓度对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响,结果如图3。试验表明,随着酒糟

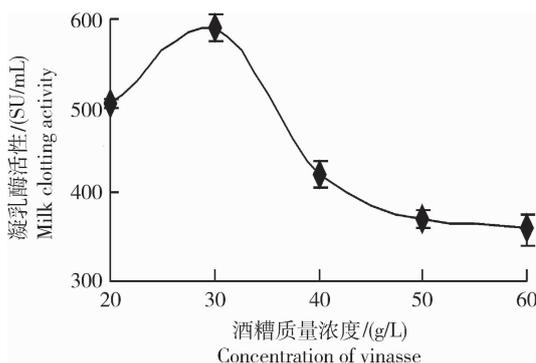


图3 酒糟质量浓度对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响

Fig. 3 Effect of vinasse content on MCE production from *R. microsporus* F518

质量浓度的增加,凝乳酶活性增加;当酒糟质量浓度为30 g/L时,凝乳酶活性最高,为590 SU/mL;而后随着酒糟浓度的增加,凝乳酶活性开始下降。因此选质量浓度为30 g/L的酒糟作为碳源。

2.3 氮源对菌株液体发酵产凝乳酶的影响

氮源对微孢根霉 F518 发酵产凝乳酶的影响见表3。不同氮源对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响不同,其中以酵母浸粉为氮源产凝乳酶最高,活性为787 SU/mL。同时考察了酵母浸粉浓度对产酶的影响,结果如图4。试验表明当酵母浸粉质量浓度为10 g/L时酶活性最高,为791 SU/mL;之后,随着酵母浸粉质量浓度增大,酶活性逐渐下降。氮源的类型和性质影响酶的合成和分泌,酵母浸粉营养成分丰富,可为微生物发酵提供全面均衡的营养。

表3 氮源种类对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响

Table 3 Effect of nitrogen sources on MCE production from *R. microsporus* F518

氮源种类 Nitrogen sources	凝乳酶活性/(SU/mL) Milk clotting activity
氯化铵 Ammonium chloride	565±13
硫酸铵 Ammonium sulfate	558±26
硝酸钾 Potassium nitrate	449±25
蛋白胨 Peptone	608±15
酵母浸粉 Yeast extract	787±26
酪蛋白 Casein	462±36
脱脂粉 Defatted powder	98±5
大豆蛋白胨 Soybean peptone	99±2
大豆粉 Soybean meal	73±4

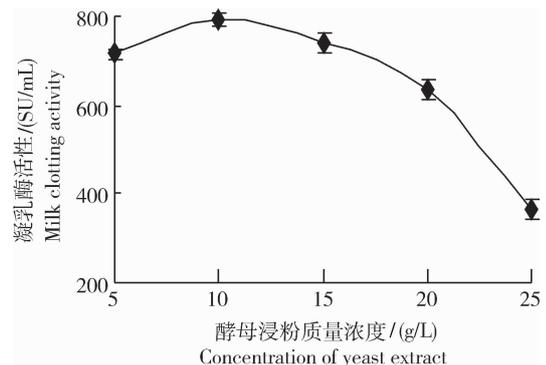


图4 酵母浸粉浓度对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响

Fig. 4 Effect of yeast extract content on MCE production from *R. microsporus* F518

2.4 最佳碳氮比的确定

以酒糟为碳源,酵母浸粉为氮源,设计 2 因素 3 水平正交试验,确定最佳碳氮比。正交试验因素和水平及试验方案和结果分析见表 4。

由表 4 正交试验结果分析表明,碳源浓度对产酶影响较氮源大,随着碳源浓度增大,产酶量先升高

后下降,而氮源浓度对产酶量影响较小。由极差分析得,最优组合为 A₂B₂,经验证,此条件下得凝乳酶活性为 760 SU/mL,高于其他试验组,因此使用 A₂B₂ 作为最佳碳源和氮源,即当酒糟浓度为 30 g/L,酵母浸粉浓度为 10 g/L 时,产酶量最高,此时碳氮比为 3 : 1。

表 4 碳源和氮源配比正交试验设计及结果分析

Table 4 Results and analysis of orthogonal test for carbon and nitrogen sources

试验号 Experiment number	A 酒糟质量 浓度/(g/L) Concentration of vinasse	B 酵母浸粉质量 浓度/(g/L) Concentration of yeast extract	C (空列) Empty	D (空列) Empty	凝乳酶活性/ (SU/mL) Milk clotting activity
1	1(20)	1(5)	1	1	583±11
2	1	2(10)	2	2	670±24
3	1	3(15)	3	3	618±16
4	2(30)	1	2	3	661±23
5	2	2	3	1	758±14
6	2	3	1	2	710±22
7	3(40)	1	3	2	556±14
8	3	2	1	3	640±17
9	3	3	2	1	616±21
均值 1 Mean value 1	624	600	644	660	
均值 2 Mean value 2	710	689	649	645	
均值 3 Mean value 3	604	648	644	640	
极差 Range	106	89	5	21	
主次顺序 Order		A>B			
优水平 Optimum level	A ₂	B ₂			
优组合 Optimum group		A ₂ B ₂			

2.5 培养基初始 pH 对菌株液体发酵产凝乳酶的影响

随着初始 pH 的升高,发酵液凝乳酶活性增大(表 5)。在初始 pH 为 4.0 时,培养基 pH 维持在较高酸度,不利于微孢根霉 F518 产酶;当初始 pH 大于 5.0 时,酶活性不再增加,最高酶活为 823 SU/mL。初始 pH 过高或过低都会使微生物的生命活动减弱,代谢产物累积增加。

2.6 发酵温度对菌株液体发酵产凝乳酶的影响

在不同温度下发酵微孢根霉 F518,从表 6 可以看出,30 ℃以下时,随着温度升高,凝乳酶活性也明显升高,温度继续上升,酶活性下降,45 ℃时酶活性下降至 40 SU/mL。30 ℃时达到最大值,凝乳酶酶活性为 967 SU/mL。温度是保证微生物生长和产酶的重要条件之一,温度过高或过低,菌体生长缓

慢,影响凝乳酶活性,因此本试验选择 30 ℃作为培养温度。

表 5 培养基初始 pH 对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响

Table 5 Effect of initial pH on MCE production from *R. microsporus* F518

初始 pH Initial pH	凝乳酶活性/(SU/mL) Milk clotting activity
4.0	40±20
4.5	686±20
5.0	823±21
5.5	819±33
6.0	739±29
6.5	641±38
7.0	504±16

表6 发酵温度对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响

Table 6 Effect of incubation temperature on MCE production from *R. microsporus* F518

发酵温度/℃ Fermentation temperature	凝乳酶活性/(SU/mL) Milk clotting activity
25	824±30
30	967±30
35	775±25
40	402±23
45	40±0

2.7 培养时间对菌株液体发酵产凝乳酶的影响

确定各发酵条件的最优参数后,在最佳条件的基础上考察发酵时间对微孢根霉 F518 液体发酵产酶的影响。培养时间对微孢根霉 F518 发酵产凝乳酶的影响见图 5。菌株在优化后的发酵条件下,24 h 即已开始产酶,发酵 72 h 时酶活性可达 1 001 SU/mL,蛋白含量为 0.431 mg/mL。之后,随着培养时间的增加,酶活性增长缓慢,发酵 120 h 时酶活

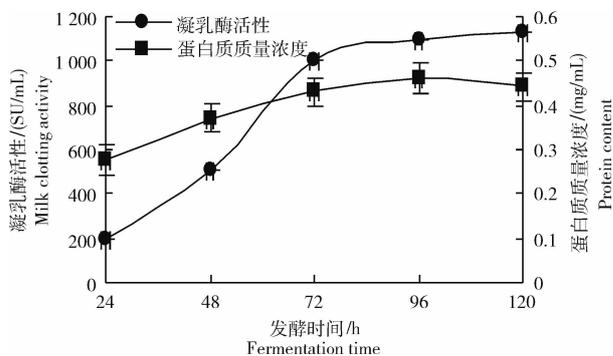


图5 发酵时间对微孢根霉 F518 产凝乳酶的影响

Fig. 5 Effect of fermentation time on MCE production from *R. microsporus* F518

性达 1126 SU/mL,而蛋白产量反而下降,可能是发酵液中的蛋白酶水解了发酵所产生的其他蛋白。

3 讨论

微孢根霉须状变种 (*Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiiformis*) F518 液体发酵产酶条件的研究表明该菌株能够发酵产凝乳酶。本研究采用单因素优化法对微孢根霉 F518 液体发酵产凝乳酶的条件进行了优化。发酵培养基中营养物质影响菌株生长快慢及代谢方式,会诱导或阻遏不同代谢产物的合成,从而产生不同的代谢产物种类,影响产物的产量。对碳源、氮源和培养基初始 pH、发酵温度等的研究表明,该菌株利用酒糟作为碳源,酵母浸粉作为氮源,在 pH 5.0, 30 ℃ 条件下产酶最高。不同菌株对营养物质的利用情况不同,国内外学者对产凝乳酶的菌株发酵条件进行优化的研究中,利用葡萄糖、酪蛋白等简单底物和麸皮、燕麦粉、大豆粉等复杂底物时,产酶量有所不同,复合底物常可诱导酶的大量分泌。Preetha 等^[9]对米黑根毛霉产凝乳酶研究中,利用麸皮作为底物,发酵 5 d 后酶活性最高。丁明亮等^[10]采用液体发酵枯草芽孢杆菌产凝乳酶,以葡萄糖为主要碳源时酶活性最高。

国内外有许多类似的真菌发酵产凝乳酶的研究(表 7),但目前,天然菌株筛选的凝乳酶活性都不高,有报道显示根霉产凝乳酶的凝乳活性约为 72~92 SU/mL^[11-13],活性较低。本研究中微孢根霉 F518 经优化后的培养基发酵培养,得到凝乳酶活性达 1 001 SU/mL,具有较高的产酶活性,远高于国内外有关天然真菌液体发酵产凝乳酶的报道,具有应用于凝乳酶生产的潜力。今后可对该菌株产凝乳酶的纯化和性质做深入研究,为今后该酶的应用奠定基础。

表7 部分真菌发酵产凝乳酶情况

Table 7 Milk clotting enzyme production of partial fungi

菌株 Strain	发酵方式 Fermentation pattern	凝乳酶活性 Milk clotting activity	参考文献 References
微孢根霉 F518 <i>Rhizopus microsporus</i> F518	液体发酵 Liquid fermentation	1 001 SU/mL	本研究 This study
米黑根毛霉 <i>Rhizomucor miehei</i>	固体发酵 Solid fermentation	1 210 SU/g	[9]

表7(续)

菌株 Strain	发酵方式 Fermentation pattern	凝乳酶活性 <i>Milk clotting activity</i>	参考文献 References
高大毛霉 <i>Mucor mucedo</i>	液体发酵 Liquid fermentation	130 SU/mL	[14]
毛霉 <i>Mucor</i>	液体发酵 Liquid fermentation	600~800 SU/mL	[15]
根霉 F34 <i>Rhizopus F34</i>	液体发酵 Liquid fermentation	161.14 SU/mL	[16]
根霉 M5 <i>Rhizopus M5</i>	液体发酵 Liquid fermentation	150.6 SU/mL	[17]

4 结 论

新筛选得到一株微孢根霉 F518 可高产凝乳酶。通过单因素优化试验得到其发酵产凝乳酶的最佳条件为：酒糟质量浓度 30 g/L，酵母浸粉质量浓度 10 g/L，磷酸二氢钾质量浓度 7.5 g/L，培养基初始 pH 为 5.0。在优化后的发酵条件下 30 ℃ 培养 72 h，微孢根霉 F518 发酵产凝乳酶活性达到 1 001 SU/mL，具有很好的应用前景和科研价值。

参 考 文 献

- [1] 张卫兵,甘伯中,梁琪,等.一株产凝乳酶解淀粉芽孢杆菌的筛选、鉴定及酶学性质[J].食品工业科技,2012,33(7):136-172
- [2] 郭光远,姜成林,马俊.微生物凝乳酶的研究 I:菌株的筛选、发酵、制备及毒性[J].微生物学通报,1988,15(5):207-210
- [3] Jacob M, Jaros D, Rohm H. Recent advances in milk clotting enzymes [J]. Int J Dairy Technol, 2011, 64(1):14-33
- [4] 贺建超,杨云云,贺榆霞,等.1株产纤维素酶高温根霉的分离和鉴定[J].陕西农业科学,2012,58(1):72-74
- [5] Alberton D, Mitchell D A, Cordova J, et al. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater [J]. Food Technol Biotechnol, 2010, 48(1):28-35
- [6] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193(1):265-275
- [7] Preetha S, Boopathy R. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13(5):573-578
- [8] Liou G Y, Chen S R, Wei Y H, et al. Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group [J]. Mycol Res, 2007, 111(Part 2):196-203
- [9] Preetha S, Boopathy R. Influence of culture condition on the production of milk-clotting enzyme from *Rhizomucor* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 1994, 10:527-530
- [10] 丁明亮,欧阳安然,王望斐,等.枯草芽孢杆菌产凝乳酶发酵条件的优化[J].食品科学,2011,32(3):156-160
- [11] 韩玲玲,潘道东.根霉产凝乳酶的固态发酵条件优化[J].食品科学,2010,31(9):156-160
- [12] 叶为标,吴进菊,陈卫平,等.根霉产凝乳酶发酵条件的研究[J].食品研究与开发,2007,28(8):53-56
- [13] 刘振民,刘辉,骆承库.酒药中凝乳酶菌株筛选及产酶条件研究[J].食品与发酵工业,2001,27(5):8-11
- [14] Yegin S, Fernandez-Lahore M, Jose G S A, et al. Aspartic proteinases from *Mucor* spp in cheese manufacturing [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89(4):949-960
- [15] 张娜,郭庆启,赵新淮.表面毛霉成熟干酪制备工艺优化[J].食品工业科技,2010(1):210-212
- [16] 吴进菊,徐尔尼,张凤英,等.中国曲中凝乳酶高产菌株的筛选及产酶条件的研究[J].中国食品学报,2009,9(1):124-129
- [17] 范素琴,王成忠,杨爱华,等.红曲米中凝乳酶产生菌的筛选及液态发酵条件的优化[J].中国酿造,2009(9):24-27

责任编辑：王燕华