研究论文

原料乳中产耐热蛋白酶细菌的鉴定及其酶学特性研究

张 熙[1]， 母智深*[2]

（1. 华南理工大学 生物科学与工程学院，广东 广州 510006；2. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院，内蒙古 呼和浩特 010018）

摘要：为了研究UHT乳在货架期内发生水解、凝块、变苦等品质劣变现象的原因，从原料乳中分离得到一株产耐热蛋白酶细菌，通过细菌形态观察、生理生化试验、脂肪酸分析、16S rDNA基因序列测定及16-23S rRNA间区序列分析，对该菌株进行鉴定，并对其所产蛋白酶进行初步研究。结果表明：该菌株属于荧光假单孢杆菌。该菌株所产的耐热蛋白酶的最适温度为40 ℃，最适pH为6.8。该蛋白酶可以耐受140 ℃，4 s热处理。

关键词：荧光假单胞菌；细菌鉴定；耐高温蛋白酶；原料乳

中图分类号：Q 939.112　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)03—0272—07

Identification of a Bacterium Isolated from Raw Milk and Study on Its Heat-Stable Protease

ZHANG Xi[1]， *MU Zhi-shen*[*2]

(1. College of Bioscience and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: UHT milk can be clotted or hydrolyzed by the heat-stable protease from Psychrotrophs bacteria in raw milk, resulting in bitter taste and other quality deterioration in shelf life. One of bacterium from raw milk was identified based on morphology, physiology, biochemistry analysis, 16S rDNA and 16-23S rRNA sequence analysis. The bacterium (named Rm12) was identified as *Pseudomonads fluorescens*. The optimal catalytic temperature and pH of the protease from Rm12 were 40 ℃ and 6.8 respectively. After heat treatment (140 ℃, 4 s), the rest of activity of protease was only 6.66% that of the original preparation.

Key words: *Pseudomonads fluorescens*, identification, heat-stable protease, raw milk

荧光假单胞菌是低温冷藏原料乳中常见的一类细菌[1]，其种类繁多，广泛存在于低温环境中。已经了解的嗜冷菌中，细菌就有30多个属，其中属于革兰氏阴性的*Pseudomoas*属和革兰氏阳性*Bacillus*

收稿日期：2012-06-13

基金项目：内蒙古自然科学基金(100239)。

* **通信作者**：母智深(1968—)，男，山西大同人，工学博士，副教授，主要从事乳品科学方面研究。E-mail：feixiong1010@yahoo.com.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

属的较多[2]。而原料乳中以兼性嗜冷菌为主,从原料乳中分离到的嗜冷菌以假单胞菌属(*Pseudomonas*),特别是荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)居多。产生热稳定性蛋白酶和脂肪酶的主要是假单胞菌属[3],这类菌增长速度快,在2℃条件下仍能生长良好[4]。该类细菌其本身不耐热,一般巴氏杀菌条件可以将其杀死,但它们分泌的胞外耐热性蛋白酶可以耐受UHT杀菌条件(140 ℃,4 s)。该类蛋白酶经常引起UHT乳及其它乳制品在货架期内发生水解、凝块、变苦等品质劣变现象[5]。

研究中从原料乳中分离得到一株产耐热蛋白酶的嗜冷细菌,采用多项鉴定方法对其进行了鉴定。在此基础上研究耐热蛋白酶的部分酶学特性和耐热性。为在乳品工业中如何控制以及耐高温蛋白酶将来利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 产耐高温蛋白酶菌株分离与筛选

1.1.1 嗜冷菌分离 原料乳取自内蒙古呼和浩特市周边奶站。原料乳用划线法直接涂布于固体培养基[6-7](胰蛋白胨5 g/L,酵母浸膏2.5 g/L,葡萄糖1 g/L,琼脂20 g/L,pH 7.2),6.5 ℃条件下恒温培养7 d。挑取单个菌落,观察菌落大小、形状、色泽、色素产生、表面光滑程度、边缘整齐度。选取形态差异的菌落,结合革兰氏染色进行嗜冷菌筛选。平板上划线纯化2~3次后得到纯培养物。

1.1.2 嗜冷菌筛选 将分离纯化的嗜冷菌菌株分别接种于1.0 g/dL的酪蛋白琼脂培养基上置于20 ℃培养5 d。选择水解圈大而明显的菌株,进一步纯化并保存。将产生水解圈的菌株,接入50 mL上述液体培养基中,20 ℃,培养48 h,然后取5 mL接种到100 mL相同液体培养基中,于20 ℃条件下,摇床(120 r/min)培养5 d。将发酵液在15 000 *g*条件下低温(4 ℃)离心20 min,上清液即为胞外蛋白酶粗酶液。分别测定上清液酶活和经过95 ℃,5 min加热后酶的剩余活力。根据上述两项指标选择一株目标菌株。

1.2 形态学和生理生化鉴定

将入选菌株划线于上述固体培养基,在20 ℃下培养2 d,观察其菌落形态;并在电子显微镜下观察菌株的细胞形态。形态观察、生理生化试验参照《伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)》[8]和《工业微生物实验技术手册》[9]。

全细胞脂肪酸分析采用GC-MS[10]。2 000 mL的锥形瓶盛1 000 mL灭菌NB培养液。按体积分数5%接种,20 ℃摇床(120 r/min)培养36 h。培养菌液于5 000 *g*离心15 min。弃去上清液。沉淀菌体用超纯水洗涤3次。取出菌体约400 mg(湿重)细胞移入有Teflon盖的试管中。向样品管中加入体积分数15% NaOH-甲醇10 mL,100 ℃水浴30 min,然后加入体积分数25% HCL-甲醇20 mL,水浴80 ℃,10 min,冷却后分别加入10 mL的水和乙醚提取细胞脂肪酸甲酯(FAMEs),将乙醚提取物用氮气流吹干,加入100 μL正己烷溶解。取2 μL正己烷作GC-MS分析。

1.3 16S及16S-23S rDNA间区的PCR扩增及分析

细菌基因组DNA的提取见参考文献[11]。引物采用革兰氏阴性细菌通用引物,由大连宝生物公司提供,引物序列见表1、表2。

表1 16S rDNA PCR扩增引物

Table 1 16S rDNA sequencing primers used in PCR

引物名称	引物序列
Seq forward	5′-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3′
Seq reverse	5′-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3′
Seq internal	5′-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3′

表2 16-23S rRNA扩增引物

Table 2 16S-23S rRNA sequencing primers used in PCR

引物名称	引物序列
Seq forward	5'-TTACC ACGGT GTGAT TCATG A-3
Seq reverse	5'-CCTTT CCCTC ACGGT ACTG -3'

PCR反应见文献[12-14]。将测序结果在NCBI中进行Blast后交送GeneBank数据库,与数据库中已有序列对比,进行系统发育分析。

1.4 蛋白酶催化温度和pH确定及耐热性研究

1.4.1 蛋白酶最适作用温度 将蛋白酶与底物溶液(偶氮酪蛋白)混合,分别置于20,25,35,40,45 ℃和50 ℃下反应2 h,测定蛋白酶活力。

1.4.2 蛋白酶最适作用pH确定 配置pH值范围在4.6到10.6的多种缓冲溶液,pH值间隔为0.5。其中乙酸-乙酸钠缓冲液pH 4.6~5.8,磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液pH 6.0~7.0,Tris-HCl缓冲液pH

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

7.2~8.8,甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 pH 9.0~10.6。用上述缓冲液分别代替 Tris-HCl (pH 7.5)缓冲溶液,测定蛋白酶活力。

1.4.3 酶热稳定性测定 取 60 μL 酶液,置于 4 mm×40 mm 密封玻璃管中,用油浴加热。热电偶置于另一玻璃管中,测定酶液加热到指定温度所需的时间。加热温度分别为 80,90,100,110,120,130 和 140 ℃,酶受热时间 4 s。酶液加热结束后,将玻璃管置于 20 ℃水中快速冷却。取热处理后酶液 40 μL,测定蛋白酶剩余活力。

1.5 酶活力测定方法

以偶氮酪蛋白(azocasein)为底物,测定蛋白酶水解活性[15]。先将酶溶液,底物,缓冲液在 40 ℃水浴中预热,然后将 1 250 μL 酶溶液(pH 7.5,20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释)添加到 1 750 μL 偶氮酪蛋白溶液中(1.5 g/dL),40 ℃水浴 2 h 后,加入 3 000 μL 10 g/dL 三氯醋酸中止反应。混合物立即在 4 ℃下离心(10 000 *g*,10 min),取 2 400 μL 上清液,用 600 μL 1.8 mol/L NaOH 溶液中和,在 420 nm 处测定其吸光度值。1 个酶活力单位(unit)定义为:在上述实验条件下,2 h 内,每毫升酶液,每增加 0.01 个 $OD_{420\ nm}$ 定义为 1 个酶活力单位。酶活力计算公式为:酶活(U/mL)=$OD_{420\ nm}$×100×*K*/*V*。其中 U 为酶活力单位,$OD_{420\ nm}$ 为 420 nm 下酶的吸光度值,*K* 为酶的稀释倍数,*V* 为酶液量。

1.6 数据统计

采用软件 SSPS12.5 进行数据分析,所有数据来自最少 3 个独立实验,并各重复 3 次。

2 结果

2.1 形态学鉴定

在培养基上,被选菌株菌落呈现淡白色圆形,表面光滑,边缘整齐。从透射电镜的照片(图 1,图 2)可以看出,该菌株为杆菌,大小为 0.6 μm× 2.0 μm,无菌柄也无鞘,不产芽孢,有鞭毛,且鞭毛数大于 1。依菌株的菌落形态和细胞形态,可以初步判定该菌归属于荧光假单胞菌,并编号 Rm12。

2.2 生理生化鉴定

生理生化特征鉴定见表 3。该菌为革兰氏阴性细菌,产荧光色素,不产非荧光色素,产果聚糖,反硝化实验阴性,卵磷脂酶,脂酶阳性,能在 4 ℃下生长,41 ℃不生长。其大部分生理生化特性与荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)最为接近。

菌株 Rm12 的细胞脂肪酸(CFAs)分析结果见表 4。其中具有鉴别意义的脂肪酸分别是 3-羟基癸酸($C_{10:0}$)、2-羟基月桂酸($C_{12:0}$)、3-羟基月桂酸($C_{12:0}$)、肉豆寇酸($C_{14:0}$)、棕榈油酸($C_{16:1}$)、反式棕榈油酸($C_{16:1}$)、棕榈酸($C_{16:0}$)、油酸($C_{18:1}$)、反油酸($C_{18:1}$)和硬脂酸($C_{18:0}$)。Rm12 不仅含有假单胞菌所共有的饱和脂肪酸 $C_{16:0}$,及不饱和脂肪酸 $C_{16:1}$ 及 $C_{18:1}$,同时也含有被认定假单胞杆菌的特征脂肪酸的 $C_{10:0\ 3OH}$ 和 $C_{12:0\ 3OH}$。



图 1 菌株 Rm12 的电镜扫描图片

Fig. 1 TEM micrograph of Rm12 cell

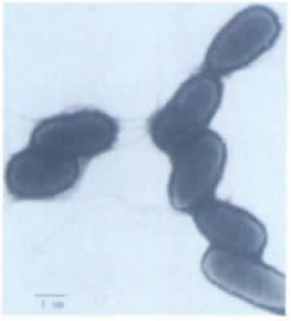


图 2 菌株 Rm12 多个菌体电镜扫描图片

Fig. 2 TEM micrograph of Rm12 cells

2.3 分子鉴定

2.3.1 16S 鉴定结果

用革兰氏阴性细菌通用引物扩增菌株 Rm12 的 16S rDNA 基因,获得 1 455 bp 的片段,并测序。采用 NCBI 网站中的 Blast 工具,将菌株 Rm12 的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 中查得的相关序列进行比较,得到与其序列同源性较高的相关菌株的 16S rDNA 序列,采用 CLUSTALX 1.8 软件对所测定的核苷酸序列进行排列,用系统发育推断软件包 PHYLIP 3.5 c 中的距离依靠法构建系统发育树。结果表明,Rm12 菌株与假单胞菌属(*Pseudomonas*)一些种的序列同源性高。与 AM410618,DQ279328,DQ279327 的最大相似度高达 100%。与 AY747594,AM411619,DQ219372,DQ200857,DQ314540,DQ31

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4541,DQ200851,DQ314546 的相似度高达 99%,除 AY747594 被鉴定为 *P. reactans*,其它菌株均被鉴定为假单胞杆菌的变种。因此,从分子分类学的角度来看 Rm12 菌株属于假单胞菌属的菌种。

表 3 Rm12 菌株的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical character of Rm12

特征	Rm12	Pf802	特征	Rm12	Pf802
鞭毛数量	>1	>1	柠檬酸盐,丙三醇	+	+
扩散性非荧光色素	–	–	β–羟基丁酸盐	+	+
不扩散性非荧光色素	–	–	戊五糖	+	+
荧光色素	+	+	纤维二糖,乙二醇	–	–
水解明胶	+	+	岩藻糖	–	–
脱氨作用	–	–	乳糖,麦芽糖	–	–
果聚糖	+	+	水杨苷,淀粉	–	–
卵磷脂酶	+	+	乙醇,丙醇	–	–
酯酶	+	+	D–果糖	+	+
4 ℃生长	+	+	D–半乳糖	+	+
41 ℃生长	–	–	D–葡萄糖	+	+
G+C 摩尔百分含量	58	60	马尿酸盐	–	–
山梨糖醇	+	+	肌醇	d	d
蔗糖	+	+	甘露醇	+	+
海藻糖	+	+	D–甘露糖	+	+
D–木糖	+	+	L–鼠李糖	–	–
L–丝氨酸,赖氨酸	+	+	D–核糖	+	+

注:pf802 为 *P. fluorescens*,保存于中国科学院微生物研究所国家菌种保藏中心,编号为:1.1802

表 4 Rm12 菌体的脂肪酸组分

Table 4 Cellular fatty acid profile of Rm12

编号	细胞脂肪酸	百分含量(质量分数%)
1	癸酸($C_{10:0}$)	0.10
2	3–羟基癸酸($C_{10:0}$)	2.07
3	十一酸($C_{11:0}$)	0.01
4	2–羟基月桂酸($C_{12:0}$)	3.28
5	3–羟基月桂酸($C_{12:0}$)	1.09
6	月桂酸或十二碳酸($C_{12:0}$)	0.85
7	12–甲基十三碳酸($C_{13:0}$)	0.19
8	十三碳酸($C_{13:0}$)	0.05
9	肉豆寇酸或十四碳酸($C_{14:0}$)	4.42
10	14–甲基十五碳酸($C_{15:0}$)	0.18
11	十五碳酸($C_{15:0}$)	0.43
12	棕榈油酸或十六碳–9–烯酸($C_{16:1}$)	12.74
13	反式棕榈油酸或十六碳–9–烯酸($C_{16:1}$)	8.71
14	棕榈酸或十六碳酸($C_{16:0}$)	20.80
15	15–甲基十六碳酸($C_{16:0}$)	0.39
16	亚油酸($C_{18:2}$)	0.45
17	油酸($C_{18:1}$)	5.31
18	反油酸或反式十八碳–9–烯酸($C_{18:1}$)	12.89
19	硬脂酸或十八碳酸($C_{18:0}$)	4.88

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

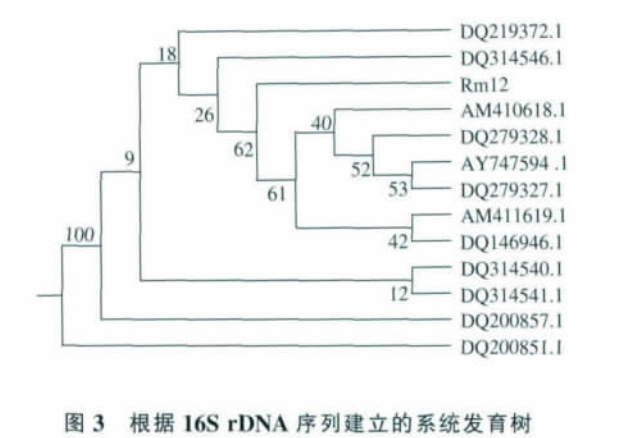


图 3 根据 16S rDNA 序列建立的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of Rm12 based on 16s rDNA

2.3.2 16-23S rRNA 间区鉴定结果 通过对 Rm12 菌株的 16S-23S rRNA 间区序列测定，获得 1056 bp 基因片段。将菌株 Rm12 的16S-23S rRNA 间区序列与 GenBank 中查得的相关序列进行比较。结果是，Rm12 菌株与假单胞菌属(*Pseudomonas*)中的荧光假单胞杆菌(*P. fluorescens*)的一些菌株的序列同源性较高。该菌株与 AF127587.1,AF127586.1,AF127585.1 的最大相似度高达 100%，与 AY582369.1,AY582380.1,AY582371.1 的相似度也高达 99%，与其它菌株的最大相似度均达到了 95% 以上。因此，从分子分类学的角度进一步确定 Rm12 菌株属于荧光假单胞杆菌。

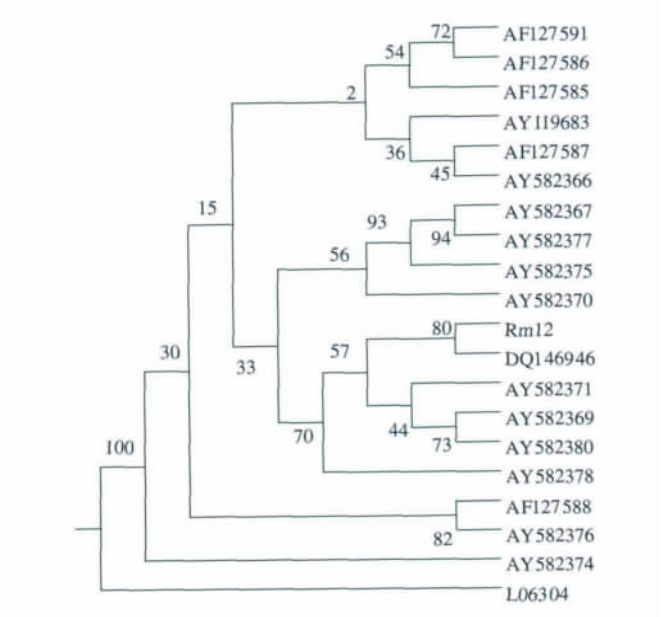


图 4 根据 16-23S rRNA 序列建立的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of Rm12 based on 16-23S rRNA

2.4 蛋白酶的最适温度和最适 pH

在不同温度下测定蛋白酶活力。结果(图 5)表明，该酶的最适反应稳定为 40 ℃，活力达到 5 403 U/mL，酶的温度影响曲线并不对称，低于最适温度时，酶活力上升较为平缓，高于最适温度时，酶活力下降相对较快。

不同 pH 下蛋白酶活力测定结果(图 6)表明，该酶的最适 pH 为 7.5。在 pH 值低于 7.5 或高于 7.5 时，酶活力下降的速度较快。

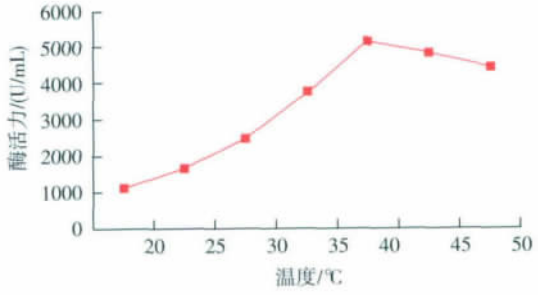


图 5 不同温度对蛋白酶的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the protease

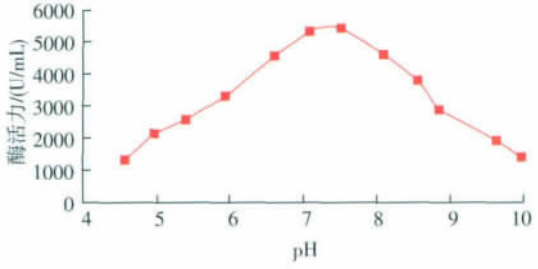


图 6 不同 pH 对蛋白酶活力的影响

Fig. 6 Effect of pH value on protease

2.5 酶的热稳定性

原酶液在 80,90,100,110,120,130 和 140 ℃条件下加热 4 s，测定剩余活力。见图 7，从 80 ℃到 140 ℃，随着温度升高，酶的活力呈明显下降趋势。原酶液在 140 ℃下加热 4 s，剩余活力为 321.55 U/mL。剩余活力为原酶液活力的 6.66 %。

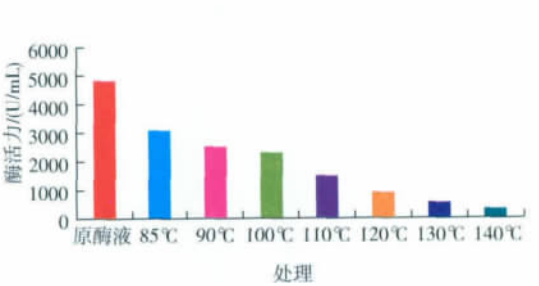


图 7 酶的热稳定性测定

Fig. 7 Effect of high temperature on the protease

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨 论

根据形态鉴定,生理生化特性,菌体脂肪酸含量和种类测定,16S rDNA 及 16-23S rRNA 区间基因序列分析,从原料乳中分离得到的菌株 Rm12 属于荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)。

脂肪酸是微生物细胞组分中一种较为稳定的重要成分,它和细菌的遗传变异、毒力、耐药性等有极为密切的关系,它的种类和含量是细胞化分类法的重要依据之一。Gundlapalli[16]等人分离的嗜冷假单胞杆菌 CMS35T,CMS38T 和 CMS64T 中,$C_{16:0}$,$C_{16:1}$,和 $C_{18:1}$ 均为它们的主要脂肪酸。1987 年 Ikemoto 等人研究了 50 株不同假单胞杆菌,所有菌株中都存在直链的饱和脂肪酸 $C_{16:0}$,及不饱和脂肪酸 $C_{16:1}$ 及 $C_{18:1}$。Vancaneyt 的实验进一步支持了这一观点。$C_{10:0\ 3OH}$ 和 $C_{12:0\ 3OH}$ 被作为假单胞杆菌的特征脂肪酸[17]。

从实验结果可以看出,Rm12 不仅含有假单胞菌所共有的饱和脂肪酸 $C_{16:0}$,及不饱和脂肪酸 $C_{16:1}$ 及 $C_{18:1}$,同时也含有被认定假单胞杆菌的特征物质的 $C_{10:0\ 3OH}$ 和 $C_{12:0\ 3OH}$。

大多数耐热蛋白酶作用最佳温度多数在 60~80 ℃之间,少数例外也在 80 ℃以上[18-19]。而作者所分离得到的蛋白酶最适温度在 40 ℃,与常规耐热蛋白酶的情况不一致,这可能与该蛋白酶的分子结构有一定的关系。pH 值对酶反应的影响是多方面的,通过影响酶的构象和底物的荷电性质,从而影响酶的活性中心与底物的接近和结合程度。酶是一种两性化合物,在不同的 pH 下会以不同的解离状态存在,往往只有一种解离状态最适合酶促反应的进行,这就是最适 pH 值。此外,pH 值还会影响酶的稳定性,极端 pH 值下能够导致酶的不可逆变性。

4 结 语

通过以上分析,从原料乳中分离的菌株 Rm12 属于荧光假单胞杆菌(*P. fluorescens*),是一种产耐热蛋白酶的嗜冷菌。该菌所产的耐热蛋白酶可以耐受一般 UHT 灭菌条件(140 ℃,4 s)。

参考文献:

[1] Haryani S,Datta N,Anthony J,et al. Production of proteases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature[J]. **Aust J Dairy Technol**,2003,58(1):15- 50.

[2] 李广武. 低温生物学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1998.

[3] Cusion M A. Presence and activity of psychrotrophic microoganismis in milk and dairy products:a review [J]. **Food Prot**,1982,45:172-207.

[4] Griffiths M W,Phillips J D,West I G,et al. The effect of extended low temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk[J]. **Food Microbiol**,1988(5):75-87.

[5] Fairbairn D J,Law B A. The elect of nitrogen and carbon sources on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens*[J]. **Journal of Applied Bacteriology**,1987,62:105-113.

[6] 惠艺. 原料乳中嗜冷菌的测定 [J]. 中国乳品业,1998(5):35-39.
HUI Yi. Determination of Psychrophilic bacteria in raw milk[J]. **China Dairy Industry**,1998(5):35-39.(in Chinese)

[7] 王克新,房玉国,张丽宏. 液体乳中嗜冷菌的测定[J]. 乳品工业,2001(5):31-32.
WANG Ke-xin,FANG Yu-guo,ZHANG Li-hong. Determination of numbers of psychrotrophic mi-croorganisms in milk[J]. **China Dairy Industry**,2001(5):31-32.(in Chinese)

[8] John G H,Noel R K,Peter H A,et al. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. **Ninth Edition. [S.I.]:Lippincott Williams & Wilkins**,2000.

[9] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994:145-178.

[10] 卢焱,叶萍,王靖,等. 铜绿假单胞菌全细胞脂肪酸气相色谱分析及应用[J]. 中华医院感染学杂志,1997,7(1):7-10.
LU Yan,YE Ping,WANG Jin,et al. Gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis and its application for the identification of Ps. Aeruginosa[J]. **Chinese Journal of Nosocomiology**,1997,7(1):7-10.(in Chinese)

[11] 颜子颖,王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998.

[12] 钱斯亮,蔡宇杰,廖祥儒,等. 热稳定性过氧化氢酶高产菌的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 西北农业学报,2008,17(2):238-

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

242.

QIAN Si-liang,CAI Yu-jie,LIAO Xiang-ru,et al. Screening,identification and enzymatic properties of the thermal stability Catalase-Producing strain[J]. **Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica**,2008,17(2):238-242.(in Chinese)

[13] **李玲,陈林,杨文革,等. 一株他克莫司产生菌的筛选及鉴定**[J]. **食品与生物技术学报**,2010,29(3):416-420.
LI Ling,CHEN Lin,YANG Wen-ge,et al. Isolation and Identification of a tacrolimus producing strain [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(3):416-420.(in Chinese)

[14] **于洁,孙志宏,张家超,等**. 16S rDNA-RFLP **技术鉴定西藏地区乳制品中的乳杆菌**[J]. **食品与生物技术学报**,2009,28(6):804-810.
YU Jie,SUN Zhi-hong,ZHANG Jia-chao,et al. Identification of lactobacillus isolated from Home-Made fermented milk in tibet by 16S rDNA-RFLP[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(6):804-810.(in Chinese)

[15] Secades P,Alvarez B,Guijarro J A. Purification and characterization of a psychrophilic,calcium-Induced,Growth-Phase-Dependent metalloprotease from the Fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. **Appl Environ Microbiol**,2001,67:2436-2444.

[16] Gundlapalli S N,Reddy G I,Matsumoto P S,et al. Psychrophilic pseudomonads from antarctica:*Pseudomonas antarctica sp. nov.*, *Pseudomonasmeridiana sp. nov.* and *Pseudomonas proteolyticasp. nov*[J]. **Int J Syst Evol Micr**,2004,54,713-719.

[17] Garrity G M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriplogy[M]. **Second Edition. [S.I.]:Springer Publisher**,2005.

[18] Fujiwara N,Masui A,Lmanaka T,et al. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from and alkaliphilic a thermophilic *Bacillus sp.*[J]. **J Biotechnol**,1993,30(2):245-246.

[19] Beadell J S,Clark D S. Probing stability-activity relationship in the thermophilic protease from Thermoplasma acidphilum by random mutagenesis[J]. **Extremephiles**,2001,5(1):3-10.

会　议　信　息

会议名称(中文)： 第十一次全国营养科学大会
所属学科： 生物物理学、生物化学及分子生物学,植物营养学,动物食品科学
开始日期： 2013-05-15　　**结束日期：** 2013-05-17
所在城市： 浙江省　杭州市　　**主办单位：** 中国营养学会
协办单位： 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所 中国科学院营养科学研究所 中国农业部食物与营养发展研究所
承办单位： 中国国际科技会议中心
联系人： 姚滢秋,丁昕,常朝辉　　**联系电话：** 010-83554781-816、810、826
E-MAIL：cns2012@vip.126.com
会议网站： http://www.cnsoc.org/cn/news_info.asp?nid=1492
会议背景介绍： 中国营养学会第十一次全国营养科学大会暨 DRIs 国际研讨会将于 2013 年 5 月 15-17 日在杭州举办。这是中国营养学界四年一次的盛会,会议主题为 DRIs 新进展:循证营养科学与实践。本次大会将推出 2013 修订版《中国居民膳食营养素参考摄入量 DRIs》。会议将邀请 WHO 等国际组织,以及亚洲、欧洲、北美等相关专家与国内专家围绕 DRIs 国内外进展、制定方法等进行研讨交流,旨在搭建 DRIs 国际交流的学术平台。
会议的交流将由大会报告、分会场报告和板报交流三个部分组成。中国营养学会 9 月份起开始向全国营养学界及相关专业工作者征收学术论文。欢迎内地、台湾、香港、澳门及国外的营养专业人员,食品、农业、预防医学等相关领域科技人员踊跃投稿,积极参加会议,共享近年营养学研究和实践的发展成果。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net