

一株新的短芽孢杆菌低温弹性蛋白酶的发酵优化

樊陈¹, 高兆建^{1*}, 张桂英², 王东星¹

(1. 徐州工程学院食品(生物)工程学院, 江苏徐州 221008; 2. 徐州万佳牧业科技发展有限公司, 江苏徐州 221100)

摘要 [目的]优化短芽孢杆菌 XZE116 菌株的培养条件使之产生高活性的胞外弹性蛋白酶。[方法]通过单因子和正交试验对 XZE116 菌株产胞外弹性蛋白酶的培养基及发酵条件进行优化。[结果]该菌株产酶最佳培养基组成为:葡萄糖 0.5%、蔗糖 0.1%、干酪素 0.5%、酵母膏 0.5%、 K_2HPO_4 0.1%、 KH_2PO_4 0.5%、 $MgCl_2$ 0.01%;最佳发酵条件为:250 ml 三角烧瓶中装液量 40 ml、接种量 5%、摇瓶转速 200 r/min、pH 8.4、发酵温度为 27 °C、发酵时间为 72 h。XZE116 菌株在最佳培养条件下,该菌株的酶活力提高了 1.6 倍。[结论]研究可为这株新的短芽孢杆菌进行发酵工业生产提供依据,同时为进一步利用该菌株产生的弹性蛋白酶奠定基础。

关键词 低温弹性蛋白酶;短芽孢杆菌;发酵优化

中图分类号 S188+.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)22-09424-03

Optimization of Fermentation Conditions for Production of A Extracellular Elastase from A Newly Isolated *Bacillus brevis*

FAN Chen et al (College of Food (Biological) Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou, Jiangsu 221008)

Abstract [Objective] The present work aimed to optimize the culture conditions to produce extracellular elastase by *Bacillus brevis* XZE116. [Method] Culture conditions were optimized to produce the extracellular elastase by the single factor and orthogonal tests. [Result] The optimal medium components were: glucose 0.5%, sucrose 0.1%, casein 0.5%, yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.5%, $MgCl_2$ 0.01%. The optimal culture conditions were: 40 ml medium in 250 ml triangular flask, inoculum's volume 5%, shaking speed of 200 r/min, initial pH 8.4, at 27 °C for 72 h. The enzyme activity was improved by Mg^{2+} , and inhibited by Co^{2+} and Zn^{2+} at 1 mol/L. The enzyme activity was increased by 160%. [Conclusion] This study will be helpful to the future commercial development of the new bacteria-based antiviral ribonuclease fermentation process.

Key words Cold temperature elastase; *Bacillus brevis*; Fermentation optimization

弹性蛋白酶是一种以水解不溶性弹性蛋白质为主的广谱蛋白水解酶,目前它主要从动物胰脏中分离获得^[1]。除此以外,该酶也在微生物类群中广有分布,在假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[2-4]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[5]、微球菌(*Micrococcus luteus*)^[6]、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)^[7]都有分泌胞外蛋白酶的报道。弹性蛋白酶有优良的水解特性,在不同种类蛋白质存在的情况下,对不溶性的弹性蛋白具有较高的水解活性,故在肉类加工中,弹性蛋白酶可以用于肉的嫩化处理,使肉类的品质变得柔软、多汁和易于咀嚼,并可缩短肉的烹调时间、改善肉的风味、增加其营养价值^[8-9]。在医药领域,弹性蛋白酶可作为治疗高血脂症、防止动脉粥样硬化的生化药物^[10]。在生物防治中,弹性蛋白酶能降解昆虫坚硬的表皮结构蛋白,使生防菌侵入昆虫体内,快速杀死病虫害。从猪胰脏提取弹性蛋白酶会受到原料限制,同时分离纯化成本高,故酶的生产成本高,价格昂贵,也仅局限于作为药物使用。微生物来源的弹性蛋白酶特性同动物来源的基本相同,因此通过微生物发酵获得弹性蛋白酶具有广泛的前景。

徐州工程学院食品(生物)工程学院实验室分离到 1 株产低温弹性蛋白酶活性较高的短芽孢杆菌。为了提升短芽孢杆菌弹性蛋白酶的活性,笔者对影响短芽孢杆菌产酶的因素进行优化,并获得最佳发酵条件,以期为该菌株进行发酵

工业生产提供依据,同时为进一步利用该菌株产生的弹性蛋白酶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。从徐州肉联厂附近土壤中分离筛选获得,通过鉴定确定为短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*),命名为菌株 XZE116。

1.1.2 培养基。斜面培养基:葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,NaCl 5 g/L,琼脂 15 g/L,pH 7.2~7.4,121 °C 灭菌 20 min。种子培养基:蛋白胨 5 g/L,葡萄糖 10 g/L,酵母膏 5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L,pH 7.0,121 °C 蒸汽灭菌 15 min。摇瓶发酵基础培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L,葡萄糖 5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L,pH 7.2,121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 试剂与仪器。主要试剂:弹性蛋白、刚果红-弹性蛋白购自 Sigma 公司,其余均为国产分析纯。主要仪器:UV-1750 紫外分光光度计,日本岛津公司 SIGMA-3k15 台式高速冷冻离心机,德国 SIGMA 公司;THZ225 大容量恒温振荡器,太仓市华美生化仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 弹性蛋白酶活性测定。弹性蛋白酶活性测定参照文献报道的方法^[11]。

1.2.2 种子液的培养。将 XZE116 菌株接种于斜面培养基上,37 °C 下培养 18 h 后接种于装有 30 ml 种子培养基的 250 ml 三角瓶中,于 37 °C、200 r/min 转速,恒温振荡摇床上培养 18 h。

1.2.3 产酶基础发酵条件。将培养好的的种子液以 6% 的接种量接种于已灭菌好的装有 40 ml 产酶发酵培养基的容量

基金项目 国家科技富民强县专项行动计划项目(BN2010060);江苏省企业博士集聚计划项目;大学生创新创业基金项目(201111)。

作者简介 樊陈(1989-),男,江苏泰州人,从事食品生物技术研究,E-mail:466790165@qq.com。*通讯作者,副教授,博士,从事食品生物技术研究,E-mail:gaozhaojian@126.com。

收稿日期 2013-07-10

在 250 ml 的容量瓶中,30 ℃ 下于 200 r/min 的恒温振荡摇床上培养 48 h。

1.2.4 菌株 XZE116 产酶条件的优化。在基础发酵培养基和基础发酵条件基础上进行优化。前一步优化的条件用于后一步优化试验中。以下试验中,菌株 XZE116 活化、种子培养、发酵条件所有试验均设 3 个平行。发酵液离心后,取上清液测定弹性蛋白酶活力。

1.2.5 培养基组分的优化。培养基组分的优化包括单因子试验:确定碳源、氮源及无机盐和其浓度;确定最佳产酶培养基组成。

1.2.6 培养条件的优化。在优化的产酶培养基基础上,对不同发酵时间、温度、pH、接种量这些不同培养条件采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行 4 因素 3 水平正交试验,检测其对菌株产酶能力的影响。

2 结果与分析

2.1 产酶培养基的单因素试验优化

2.1.1 碳源对菌株 XZE116 产酶的影响。在产酶基础培养基中加入葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉以及其复配组分作为碳源,研究碳源对菌株 XZE116 产酶及对菌体生长的影响,结果见表 1。结果表明,菌株以 0.5% 可溶性淀粉为单一碳源时,产酶极低;而以麦芽糖、蔗糖、乳糖为单一碳源时,酶活较高;以葡萄糖为唯一碳源时,酶活是在单一碳源中是最高的。在复合碳源中,0.5% 葡萄糖 + 0.1% 蔗糖为复合碳源时酶活最高。充分说明葡萄糖对菌体的生长和酶的合成具有重要作用,当再加入二糖时,酶活明显高于单一的葡萄糖,这可能是发酵初期菌体大量消耗了葡萄糖,在发酵后期时,开始利用双糖。

表 1 碳源对菌株 XZE116 产弹性蛋白酶的影响

碳源种类及 质量分数	弹性蛋白酶活 U/ml	$OD_{600\text{ nm}}$
0.5% 葡萄糖	28.40	3.1
0.5% 蔗糖	21.50	2.1
0.5% 麦芽糖	18.60	2.4
0.5% 乳糖	22.40	2.3
0.5% 可溶性淀粉	6.20	1.2
0.5% 稻草粉	4.50	0.7
0.5% 葡萄糖 + 0.1% 蔗糖	32.75	3.7
0.5% 葡萄糖 + 0.1% 麦芽糖	30.50	3.1
0.5% 葡萄糖 + 0.1% 乳糖	31.60	3.1

2.1.2 氮源对菌株 XZE116 产酶的影响。氮源主要用于菌体合成细胞结构的原料和含氮代谢物,以上述碳源研究为基础,通过改变发酵培养基中的氮源,来研究不同氮源及配比对菌株 XZE116 生长和产酶的影响。选用硫酸铵、硝酸钠、氯化铵及若干种有机氮源对菌株生长和产酶活力的影响进行了探讨。结果表明(表 2),菌体对氮源利用情况存在较大差异,有机氮源普遍优于无机氮源,可能是由于有机氮源中所含的少量氨基酸或者是蛋白质经菌体外源酶水解获得的胨、肽、氨基酸等组成的水溶性混合物更容易被细菌分解利用,或在菌体生长过程中可能有诱导合成酶的作用。另外

一个原因可能是菌体利用无机氮源后,培养基的 pH 下降过快,超出了磷酸盐的缓冲范围,培养基 pH 不适于菌体生长。在有机氮源中,其中以干酪素为氮源产酶最高,蛋白胨次之。因此,后续试验选择干酪素作为氮源。

表 2 氮源对菌株 XZE116 产弹性蛋白酶的影响

氮源种类及 质量分数	弹性蛋白酶活 U/ml	$OD_{600\text{ nm}}$
0.5% 蛋白胨	34.6	3.6
0.5% 酵母膏	30.1	2.8
0.5% 干酪素	37.6	3.2
0.5% 牛肉膏	27.1	2.8
0.25% 硫酸铵	16.2	1.4
0.25% 硝酸铵	17.6	1.3
0.25% 氯化铵	5.4	1.1

2.1.3 无机盐对菌株生长和产酶的影响。金属离子是维持细胞生长和菌体生长代谢过程中酶活性构象的必要因素。为了确定对菌体生长和产酶最佳的金属离子,在发酵培养基中添加不同金属离子,结果如表 3 所示。不同金属离子对菌体生长和产酶的影响差异显著, Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 对菌体生长和产酶影响不大, Mn^{2+} 明显抑制了菌体生长和产酶,相反, Mg^{2+} 在很大程度上促进了生长和产酶。

表 3 金属离子对菌株 XZE116 产弹性蛋白酶的影响

金属离子	弹性蛋白酶活 U/ml	$OD_{600\text{ nm}}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40.5	3.5
FeSO_4	39.1	3.2
MnSO_4	29.6	3.4
CaCl_2	37.4	3.6
ZnSO_4	35.6	3.5
CoCl_2	34.7	3.3

2.2 产酶发酵条件优化

2.2.1 培养基起始 pH 对菌株 XZE116 产酶的影响。将培养基的起始 pH 分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,进行发酵试验,研究起始 pH 对菌株 XZE116 产酶的影响,结果见图 1。

由图 1 可知,起始 pH 对菌株 XZE116 产弹性蛋白酶有很大的影响。pH 较低时,菌株 XZE116 生长非常缓慢,严重影响了产酶;当 pH 逐渐上升时,菌株产酶的活力逐渐升高,pH 到达 8.0 时,产酶的酶活最高,pH 再增大,酶活反而下降。因此,菌株 XZE116 产酶的最适 pH 是 8.0。

2.2.2 发酵温度对菌株 XZE116 产酶的影响。在发酵培养基上接入菌种,分别于 15、20、25、30、35、40 ℃ 下以 200 r/min 的转速培养 36 h,研究发酵温度对菌株 XZE116 产酶的影响,结果见图 2。

由图 2 可见,温度对菌体生长和产酶量的影响较大,在 15 ~ 25 ℃ 范围内酶产量随温度的升高而增大,酶活力在 25 ℃ 最高,说明菌体最适生长温度与最适产酶温度并不一致,综合考虑菌体生长量与产酶量,确定菌体最优发酵温度为 25 ℃。

2.2.3 发酵时间对菌株 XZE116 产酶的影响。种子液按照

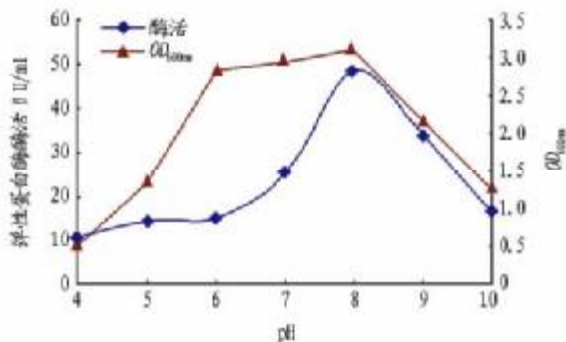


图1 起始 pH 对菌株 XZE116 产弹性蛋白酶的影响

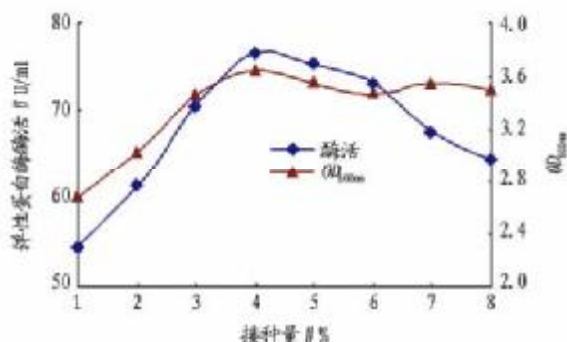


图4 接种量对菌株 XZE116 产弹性蛋白酶的影响

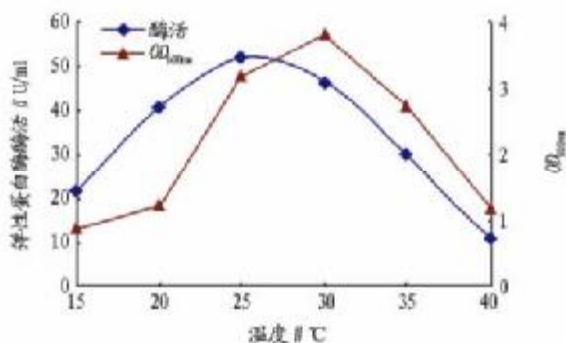


图2 发酵温度对菌株 XZE116 产弹性蛋白酶的影响

6%的接种量接种到优化的产酶培养基中,于最适条件下培养,从第24小时起,每隔12h取样测定发酵液上清液的酶活,研究发酵时间对菌株 XZE116 产酶的影响,结果见图3。由图3可知,菌株在发酵前期随着发酵时间的延长,上清液中的酶活不断提高。培养72h时,胞外的弹性蛋白酶的活力达到最大,随着培养时间的继续延长,由于菌株的老化以及积累代谢产物的影响,到72h以后,酶活逐渐下降。因此,菌株 XZE116 产酶的最适培养时间为72h。

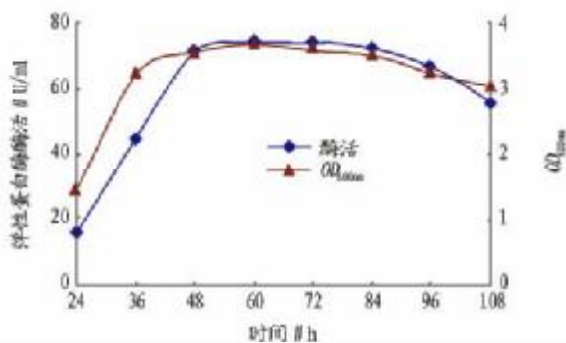


图3 发酵时间对菌株 XZE116 产弹性蛋白酶的影响

2.2.4 装液体积分数对弹性蛋白酶发酵的影响。在250ml三角瓶中,装入50ml培养基,灭菌冷却后,按照体积分数为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%的接种量接入种子液,在25℃发酵72h,测定酶活力,结果见图4。

2.2.5 产酶培养条件的正交试验优化。通过单因素试验,可以看出发酵温度、发酵时间、培养基 pH 及接种量对菌株 XZE116 产弹性蛋白酶有较大的影响,对上述4个因素,依据 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验,因素与水平设计见表4,正交试验结果与分析见表5。

表4 正交试验因素水平设计

水平	因素			
	发酵时间 (A)//h	培养温度 (B)//°C	培养基 pH (C)	接种量 (D)//%
1	68	23	7.6	3
2	72	25	8.0	4
3	76	27	8.4	5

表5 正交试验结果分析

试验号	因素				弹性蛋白酶活力//U/ml
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	74.4
2	1	2	2	2	67.9
3	1	3	3	3	81.3
4	2	1	2	3	86.5
5	2	2	3	1	76.2
6	2	3	1	2	85.7
7	3	1	3	2	69.4
8	3	2	1	3	60.7
9	3	3	2	1	73.1
k ₁	74.533	76.767	73.600	74.567	
k ₂	82.800	68.267	75.833	74.333	
k ₃	67.733	80.033	75.633	76.167	
R	15.067	11.766	2.233	1.834	

由表4和表5可以看出,在不同因素组合的情况下,对菌株 XZE116 培养液弹性蛋白酶活性产生有一定的影响,并且差异比较显著。各因素影响产酶效果的次序为:A(发酵时间)>B(培养温度)>C(培养基 pH)>D(接种量),因此,时间在试验中起主导作用,培养温度次之,培养基 pH 再次之,接种量的影响相对较小。菌株 XZE116 产弹性蛋白酶的最佳条件是 A₂B₃C₂D₃,即发酵时间为72h、发酵温度为27℃、培养基 pH 为8.0、接种量为5%。在最佳条件下进行3次验证试验,平均酶活为88.76 U/ml。

3 结论

试验通过单因子和正交试验优化短芽孢杆菌产胞外弹性蛋白酶条件,研究结果表明,该菌株产酶的最佳培养基组成为:葡萄糖0.5%、蔗糖0.1%、干酪素0.5%、酵母膏0.5%、K₂HPO₄0.1%、KH₂PO₄0.5%、MgCl₂0.01%;以最佳产酶培养基为基础,最佳发酵条件为:250ml三角烧瓶中装

(下转第9436页)

(如藁县、武清等农业县);另一类经济水平较高,受机会成本影响,农户在粮食生产上的投入不足造成农用地利用不足的区县(如西青、北辰等近郊区县),因此,未来可通过调动发达地区农户种粮积极性和改善不发达地区农业生产条件来挖掘农用地利用潜力。

3.2 讨论

(1)农用地分等选择具有指示生产力高低水平作用的等指数作为量化依据,尽管等指数不具有产量意义,但却在相当程度上可以指示农用地产量水平的高低状态。因此,在未知各等别农用地不同层次粮食可获得生产能力的情况下,选择用等指数的差值作为农用地粮食生产潜力高低的指示指标是完全可以的,而且此差值指数表征了农用地最原始的潜力方向和潜力高低。

(2)农用地整治和潜力挖掘需要同时考虑农地规模和单位面积潜力,以提高农地整理的整体效益、效率,将有限的投资首先放在产出效益最明显的地区。由于规模优势对农用地粮食综合生产潜力优势具有正效应,因此笔者认为,农用地保护和整理改造工作应重点考虑具有规模优势的区域,以提高农用地保护和整理的整体效益。一般情况下,利用潜力挖掘可以通过市场调节,而自然潜力挖掘则需要更多的技术和资本投入,因此近期农用地整理挖潜项目可以安排在具有规模优势和利用潜力优势区,而远期则考虑安排在具有规模优势和自然潜力优势区。

(3)对于不同潜力区未来挖潜方向,该研究仅根据农用地分等主要影响因素对粮食生产的限制性高低进行了分类。研究结果可作为农用地整理项目设计的参考,具体到农用地整理项目,则还需要从整理工程的角度进一步设计和细化。虽然该研究以农用地分等单元为基础起算单元,然后将结果汇总到区县尺度,减弱了研究结果在自然分布上的规律性,但从另一个角度看,汇总到区县更有利于从管理层面明确挖

潜重点区域并落实项目。

参考文献

- [1] 王建国,单艳红,杨林章.我国农用地分等定级理论与方法探讨[J].农业系统科学与综合研究,2002,18(2):84-88.
- [2] 张凤荣,徐艳,张晋科,等.农用地分等定级估价的理论、方法与实践[M].北京:中国农业大学出版社,2008:1-50.
- [3] 中华人民共和国国土资源部.农用地分等规程[S].北京:中国标准出版社,2003:1-7.
- [4] 郑新奇,杨树佳,象伟宁,等.基于农用地分等的基本农田保护空间规划方法研究[J].农业工程学报,2007,23(1):66-71.
- [5] 王红梅,廖丽君,杜国明,等.基于农用地分等的基本农田补划案例分析[J].农业工程学报,2008,24(10):52-55.
- [6] 鄢文聚,张蕾娜,陈桂坤,等.基于农用地分等的耕地占补平衡项目评价研究[J].中国土地科学,2008,22(10):58-63.
- [7] 陈桂坤,程锋,苏强,等.补充耕地数量质量按等级折算研究进展[J].资源与产业,2009,11(2):5-7.
- [8] 钱凤魁,王秋兵,董婷婷,等.农用地等级折算成果在耕地占补平衡中的应用[J].农业工程学报,2008,24(8):100-103.
- [9] 刘玉,门明新,许喙,等.农用地综合生产能力测算及应用研究——以霸州市为例[J].中国农业科技导报,2008,10(1):87-92.
- [10] 苏强,张蕾娜,赵玉领.基于农用地分等成果的产能核算研究[J].资源与产业,2008,10(5):88-91.
- [11] 崔永清,门明新,许喙,等.河北省不同耕作区综合产能空间分异规律[J].农业工程学报,2008,24(5):84-89.
- [12] 吴克宁,程先军,黄勤,等.基于分等成果的农用地综合生产能力[J].农业工程学报,2008,24(11):51-56.
- [13] 张玉娟,周勇,宁晓峰,等.农用地分等成果在土地整理项目分析和评价中的应用[J].农业工程学报,2008,24(S1):172-176.
- [14] 陈亚恒,刘会玲,张俊梅,等.农用地分等成果在耕地整理潜力计算中的应用[J].农业工程学报,2008,24(S1):177-180.
- [15] 杨建锋,王令超,杨新民,等.基于农用地分等的耕地整理建设等级目标研究——以豫西北太行山地丘陵类型区为例[J].地域研究与开发,2009,28(4):100-104.
- [16] 潘瑜春,刘巧芹,陆洲,等.基于农用地分等的区域耕地整理规划[J].农业工程学报,2009,25(S2):260-266.
- [17] 熊镇邦,毛阳海.基于比较优势原理的西藏农业结构转型研究[J].阿坝师范学院学报,2009,26(1):83-87.
- [18] 辛良杰,李秀彬.谈明洪中国区域粮食生产优势度的演变及分析[J].农业工程学报,2009,25(2):222-227.
- [19] 徐志刚,傅龙波,钟甫宁.中国粮食生产的区域比较优势分析[J].中国农业资源与区划,2001,21(1):45-48.
- [20] 赵占军,赵清涛.河北省主要粮食作物区域比较优势分析[J].河北农业科学,2002,6(3):30-36.

(上接第9426页)

液量40 ml、接种量5%、摇瓶转速200 r/min、pH 8.0、培养温度为27℃、培养时间为72 h。用单因素试验对碳、氮源的种类的选择,以及正交试验对发酵条件进行了优化试验,初步确定了该菌株弹性蛋白酶发酵的最佳发酵条件,使其弹性蛋白酶产量可达到比优化前产量提高1.6倍。最终结果具有良好的优化效果。该试验结果仅是在三角瓶培养水平上获得的,要实现产业化开发,还需进行深层液体通风发酵罐条件下的中间放大试验,有关工作正在进行中。

参考文献

- [1] ERLENDSSON L E U S, FILIPPUSON 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] 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.
- [3] BESSON C, FAVRE-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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] TAKAJ H, KONDOU M, HISATSUKA T. Alkaline elastase from an *Alkalophilic Bacillus* strain on the tenderization of beef meat [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(12): 2364-2368.
- [9] CONSIDINE T, HEALY A. Proteolytic specificity of elastase on bovine beta-casein [J]. Food Chemistry, 1999, 66(4): 463-470.
- [10] ROBERT L, ROBERT A M, JACOTOT B. Elastin elastase atherosclerosis revisited [J]. Atherosclerosis, 1998, 140(2): 281-295.
- [11] LIN X J, XU W T, HUANG K L. Cloning, expression and characterization of recombinant elastase from *Pseudomonas aeruginosa* in *pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2009, 63(2): 69-74.