

产蛋白酶菌株的筛选鉴定及产酶优化

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2023.01.008

张程 谭琴
陈露露 冉松
任新萍 曾晓希

湖南工业大学
生命科学与化学学院
湖南 株洲 412007

摘要: 为筛选出高产蛋白酶的菌株,通过干酪素培养基筛选到一株高产蛋白酶的菌株 BJ-4,经鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。对菌株的产酶条件进行单因素及响应面优化,确定最佳产酶条件为:葡萄糖 0.5%、牛肉膏 1.5%、培养温度 37.61 °C、培养初始 pH 值 6.84、接种量 1.36%,优化后酶活力同比增长了 71.01%。菌株 BJ-4 在工业中具有一定的应用前景。

关键词: 蛋白酶;解淀粉芽孢杆菌;条件优化;酶活力

中图分类号: TQ925⁺.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2023)01-0062-09

引文格式: 张程,谭琴,陈露露,等.产蛋白酶菌株的筛选鉴定及产酶优化[J].包装学报,2023,15(1):62-70.

1 研究背景

蛋白酶是工业生物酶的主要来源之一,在丝绸脱胶^[1]、食品工业、制革工业^[2]、酿造、医药、毛皮软化^[3]、饲料加工、洗涤剂等领域得到广泛应用^[4]。蛋白酶主要来源于微生物、动物内脏、植物茎叶和果实^[5],根据来源可分为微生物蛋白酶、动物蛋白酶和植物蛋白酶。微生物蛋白酶由于具有生产周期短、产量高、不受空间和时间的限制、经济效益高、应用范围大的诸多优点,逐渐受到工业生产的青睐^[6]。芽孢杆菌是工业生产中微生物蛋白酶的主要生产者。因此,筛选出性能稳定且高产蛋白酶的菌株具有重要意义。为弥补蚕丝化学脱胶工艺的不足,张学松^[7]从丝厂周围的土壤中分离、筛选得到了一株对蚕丝具

有显著脱胶能力的芽孢杆菌。结果表明,利用生物蛋白酶对蚕丝脱胶,可使蚕丝柔软、光滑和光泽,同时降低对环境的危害^[8]。郑翔等^[9]用基因工程方法构建了一株枯草芽孢杆菌菌株即重组蛋白酶,并用于皮革脱毛。结果表明,该蛋白酶能不损伤皮革质量。侯燕燕等^[10]发现了一种新的胞内丝氨酸蛋白酶 ISPr 的异源表达,并将其用于山羊皮脱毛。蛋白酶在制造业的大量使用,有效降低了原料消耗,提高了产品得率,改善了产品质量,取得了较明显的经济和社会效益。

本研究从湖南工业大学食堂周边土壤、食堂餐厨垃圾、泔水中取样并筛选高产蛋白酶菌株,通过测定菌株产酶活力,确定目标菌株,然后进行产酶条件优化,以期为提高蛋白酶活力和蛋白酶的大规模生产应

收稿日期:2022-10-12

基金项目:湖南省教育厅科学研究基金资助重点项目(22A0402);湖南省高新技术产业科技创新引领计划项目(2020NK2001);湖南省教育厅科学研究基金资助项目(20C0622);湖南省自然科学基金资助项目(2020JJ5127);湖南省科技创新平台/人才计划项目(2019TP1029)

作者简介:张程(1999-),女,湖南永州人,湖南工业大学硕士生,主要研究方向为环境微生物,

E-mail:1632451207@qq.com

通信作者:曾晓希(1972-),女,湖南娄底人,湖南工业大学教授,博士,主要从事微生物选育和环境污染生物修复研究,

E-mail:zengxiaoxi2003@163.com

用提供参考。

2 实验

2.1 材料

2.1.1 样品来源

样品来自湖南工业大学食堂周边土壤、食堂餐厨垃圾和泔水。

2.1.2 主要培养基

富集培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, pH 7.2~7.4, 121 °C 灭菌 20 min;

干酪素培养基: 干酪素 4 g, 琼脂粉 20 g, 浓度为 0.1 mol/L 的 NaOH 20 mL, 蒸馏水定容至 1000 mL, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min;

基础发酵培养基: 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 10 g, NaCl 10 g, 干酪素 5 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min。

2.2 方法

2.2.1 产蛋白酶菌株的筛选

富集: 将样品与无菌水按质量比 1:5 混合并进行 30 min 摇床培养, 然后按 1% 接种量取混合液加入到富集培养基中, 在 180 r/min、35 °C 的摇床中震荡培养 12 h。

初筛: 对富集培养基进行 10 倍梯度稀释, 取不同稀释梯度的菌液 100 μ L 涂布, 35 °C 培养 24 h, 挑取不同类型的单菌落在 LB 培养基上纯化培养得到单菌落。将纯化后单菌落用灭菌后的牙签点接于干酪素培养基平板上, 35 °C 培养 24 h。随后, 观察菌落周围是否出现透明圈, 选取具有较大透明圈的菌株进行保藏。

复筛: 先活化初筛菌株, 再以 1% 接种量接种于基础发酵培养基中, 在 180 r/min、35 °C 的摇床中震荡培养 2 d, 将发酵液离心后取上清液, 测定其蛋白酶活力, 筛选出蛋白酶活力最高的菌株作为目标菌株。

蛋白酶活力的测定: 采用 Folin-酚法测定蛋白酶活力。蛋白酶活力定义如下: 在 40 °C、pH 7.0 的条件下, 每分钟水解质量分数为 2% 的酪蛋白溶液产生 1 μ g 酪氨酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位 (U/mL) [11]。

2.2.2 菌株的生长曲线和产酶曲线

将目标菌株活化, 以 1% 接种量接种至 LB 培养基中, 在 180 r/min、35 °C 的摇床中震荡培养, 每隔

2 h 取一次样, 测定 OD_{600} 值, 绘制菌株的生长曲线。

取上述活化菌液接种到基础发酵培养基中, 在 180 r/min、35 °C 的摇床中震荡培养, 每隔 12 h 取一次样, 测定酶活性, 绘制菌株的产酶曲线。

2.2.3 菌株鉴定

形态学鉴定: 目标菌株于 35 °C 下培养 12~24 h, 观察并记录其颜色、形态、大小等特征。

生理生化鉴定: 参考《常见细菌系统鉴定手册》中的方法 [12], 进行常见的生理生化指标鉴定。

分子生物学鉴定: 提取 DNA, 用细菌通用引物进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增, 将 PCR 扩增产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 再利用 NCBI 和 MEGA6 软件进行分析。

2.2.4 菌株产酶条件的优化

1) 碳源及添加量

为探究菌株发酵的最佳碳源, 将基础发酵培养基中碳源分别替换为果糖、蔗糖、乳糖和淀粉, 测定发酵培养基的蛋白酶活力, 并确定最佳碳源。选择最佳碳源种类, 对其添加量进行优化。最佳碳源的质量分数分别为 0.1%、0.3%、0.5%、0.8%、1.0% 时, 测定发酵液的蛋白酶活力, 进而确定碳源的最适添加量。

2) 氮源及添加量

在含最佳碳源的发酵培养基中, 将氮源分别替换为牛肉膏、酵母浸粉、硝酸钠和硫酸铵, 测定发酵培养基的蛋白酶活力, 并确定最佳氮源。最佳氮源的添加量按 0.5% 的梯度从 0.5% 增至 2.5%, 测定发酵液的蛋白酶活力, 进而确定氮源的最适添加量。

3) 培养温度

在含最佳碳源、最佳氮源的发酵培养基中, 将发酵培养温度分别设置为 30, 33, 35, 37, 40 °C, 测定发酵液的蛋白酶活力, 进而确定最佳培养温度。

4) 初始 pH 值

在含最佳碳源、最佳氮源的发酵培养基中, 将发酵的初始 pH 值分别设置为 4, 5, 6, 7, 8, 在最佳培养温度下进行发酵培养, 测定发酵液的蛋白酶活力, 进而确定最佳初始 pH。

5) 接种量

在含最佳碳源、最佳氮源的发酵培养基中, 最佳初始 pH 下对接种量进行优化。接种量按 0.5% 的梯度从 0.5% 增至 2.5%, 最佳培养温度下进行发酵培养, 测定发酵液的蛋白酶活力, 进而确定最适接种量。

6) 响应面分析

根据上述单因素产酶条件的优化结果,本研究选取培养温度、初始 pH 值和接种量作为响应面试验变量,以蛋白酶活力作为响应值,采用 Box-Behnken 法进行 3 因素 3 水平的响应面试验,如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 试验因素及水平

Table 1 Box-Behnken test factors and levels

水平	培养温度 /℃	初始 pH 值	接种量 /%
-1	35.0	6.0	1.0
0	37.5	7.0	1.5
1	40.0	8.0	2.0

3 结果与分析

3.1 产蛋白酶菌株的筛选

从环境样品中分离出多株具有产蛋白酶能力的菌株,通过比较水解透明圈与菌落的直径比以及蛋白酶活性,筛选得到了一株高产蛋白酶菌株 BJ-4,如图 1 所示。

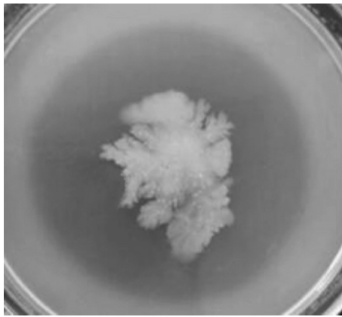


图 1 菌株 BJ-4 的水解透明圈图

Fig. 1 Hydrolytic transparent circle diagram of strain BJ-4

3.2 菌株的鉴定

1) 形态学鉴定

菌株 BJ-4 单菌落形态如图 2 所示。

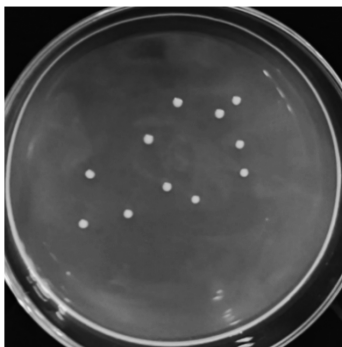


图 2 菌株 BJ-4 的菌落形态图

Fig. 2 Colony morphology diagram of strain BJ-4

由图 2 可知,菌株为乳白色,圆形,不透明,边缘无褶皱,菌落较小,易于挑起。菌体呈现革兰氏阳性,有芽孢,呈短杆状。初步判定该菌体为芽孢杆菌。

2) 生理生化鉴定

菌株 BJ-4 的生理生化鉴定结果如表 2 所示。由表 2 可知,菌株 BJ-4 有利用蔗糖、葡萄糖、乳糖、木糖醇进行发酵的能力;菌株 BJ-4 的柠檬酸盐试验结果为阴性,表明其不能以柠檬酸盐作为唯一碳源进行生长发育;菌株 BJ-4 能产生淀粉酶,使淀粉水解,也能产生胞外酶和过氧化氢酶;甲基红试验结果为阴性、V. P. 试验结果为阳性,表明该菌株可以分解葡萄糖生成丙酮酸,丙酮酸脱羧后会形成酮、醇类中性产物;苯丙氨酸脱氨试验结果为阴性,表明菌株 BJ-4 不能产生苯丙氨酸脱氨酶,不能使培养基中的苯丙氨酸脱氨变成苯丙酮酸;吲哚试验结果为阳性,表明其含有色氨酸酶,能分解蛋白胨中的色氨酸形成吲哚。

表 2 菌株 BJ-4 的生理生化鉴定

Table 2 Physiological and biochemical identification of strain BJ-4

项目	结果	项目	结果
葡萄糖发酵	+	淀粉水解	+
蔗糖发酵	+	明胶液化	+
乳糖发酵	+	过氧化氢酶	+
木糖醇发酵	+	甲基红试验	-
产酸	-	V. P. 试验	+
产气	-	苯丙氨酸脱氨	-
柠檬酸盐	-	吲哚试验	+

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

3) 分子生物学鉴定

菌株 BJ-4 的测序结果比对如图 3 所示。从系统发育树可以看出,菌株 BJ-4 与解淀粉芽孢杆菌的亲缘关系最近,相似度高达 100%。经鉴定,菌株 BJ-4 为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

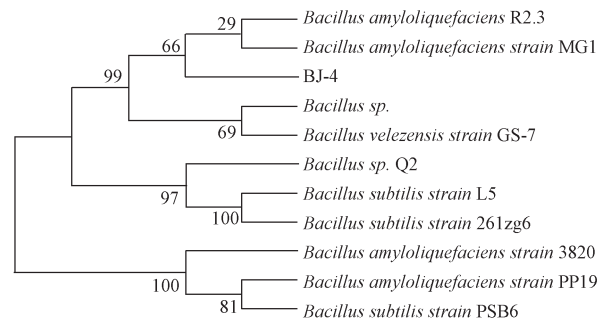


图 3 菌株 BJ-4 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain BJ-4

3.3 菌株的生长曲线和产酶曲线

菌株 BJ-4 的生长曲线如图 4 所示。由图 4 可知, 在 0~6 h 内菌株生长缓慢, 位于生长延滞期, 此时的菌株表现为体积增大、代谢活跃, 但菌体数量增加不明显; 6~16 h 菌体位于对数生长期, 菌体数量呈对数增长; 16 h 之后, 菌体增长速度逐渐减缓, 趋于平稳, 在 22 h 时生长达到峰值; 之后, 菌体的衰退死亡速率超过新生速率, 菌体进入衰亡期。

菌株 BJ-4 的产酶曲线如图 5 所示。由图 5 可知, 菌株 BJ-4 的酶活力呈先上升后下降的趋势; 接种后菌株的酶活力逐步升高, 并在 36 h 处达到最高值, 之后, 酶活力下降, 可能原因是代谢废物的积累对蛋白酶产生不利影响, 致使发酵液中的酶活力下降。

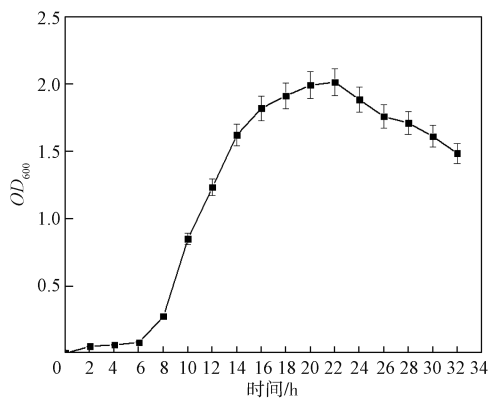


图 4 菌株 BJ-4 的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of strain BJ-4

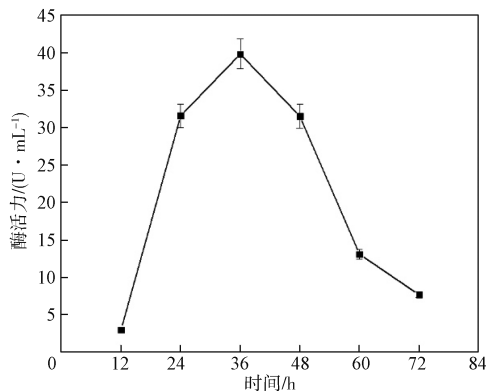


图 5 菌株 BJ-4 的产酶曲线

Fig. 5 Enzyme production curve of strain BJ-4

将菌株 BJ-4 与张文静^[13]、李曹龙^[14]、刘静^[15]等筛选出的 *Bacillus subtilis* PC2、*Bacillus tequilensis* C9 和 A28 产蛋白酶菌株的培养时间、产酶效果进行对比, 结果如表 3 所示。从表 3 可以看出, *Bacillus subtilis* PC2、*Bacillus tequilensis* C9 菌株的培养周期

长, 产酶能力较强; 而 A28 菌株的培养周期短, 但酶活力较低。本研究筛选得到的产蛋白酶菌株 BJ-4 培养 12 h 后, 开始产生大量的蛋白酶, 且在 36 h 时酶活力达到最高, 为 39.86 U/mL, 相比其他菌株培养时间较短, 产酶能力较强。

表 3 菌株 BJ-4 与已发表菌株的产蛋白酶能力对比

Table 3 Comparison of protease production capacity between strain BJ-4 and published strains

菌株	培养时间/h	酶活力/(U·mL ⁻¹)
BJ-4	36	39.86
<i>Bacillus subtilis</i> PC2	48	29.48
<i>Bacillus tequilensis</i> C9	48	41.65
A28	30	2.03

3.4 菌株发酵产酶条件的优化

3.4.1 碳源及添加量

菌株发酵产酶受碳源种类的影响, 测试结果如图 6 所示。由图 6 可知, 不同碳源时菌株 BJ-4 发酵产酶能力由高到低依次为葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、淀粉。以葡萄糖作为唯一碳源时, 蛋白酶酶活力最高, 其次是蔗糖, 果糖与乳糖的相差不大, 而当碳源是淀粉时, 蛋白酶酶活力最低。因此, 选择葡萄糖作为最佳碳源。

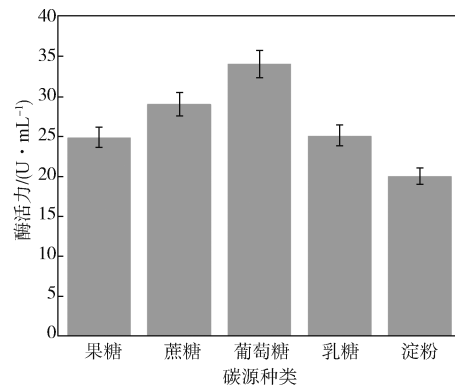


图 6 碳源种类对发酵产酶的影响

Fig. 6 Influence of carbon source types on enzyme production by fermentation

葡萄糖的添加量对菌株发酵产酶的影响如图 7 所示。由图 7 可知, 葡萄糖的添加质量分数从 0.1% 增加到 0.5% 时, 蛋白酶酶活力不断提升; 当葡萄糖的添加质量分数为 0.5% 时, 蛋白酶酶活力最大; 葡萄糖的添加质量分数大于 0.5% 后, 蛋白酶酶活力反而逐渐降低, 可能是由葡萄糖的浓度过高形成的代谢阻遏效应导致的。因此, 选择葡萄糖的最适添加质量分数为 0.5%。

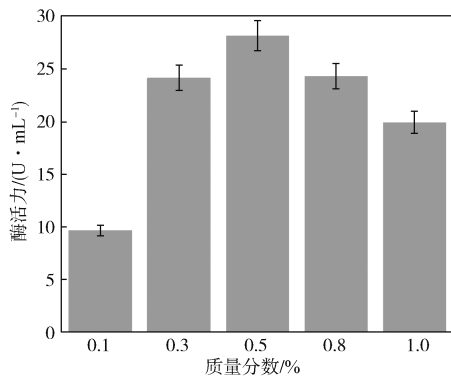


图7 葡萄糖添加量对发酵产酶的影响

Fig. 7 Influence of glucose addition amount on enzyme production by fermentation

3.4.2 氮源及添加量

氮源不仅可以为菌株的生长发酵提供氮元素，还能在一定程度上缩短发酵周期，提高产酶能力。本研究选择牛肉膏、蛋白胨、酵母浸粉、硝酸钠和硫酸铵5种氮源进行优化，测试结果如图8所示。由图8可知，不同氮源时菌株BJ-4发酵产酶能力由高到低依次为牛肉膏、蛋白胨、酵母浸粉、硝酸钠、硫酸铵。以牛肉膏作为唯一氮源时，蛋白酶活力最高，而以硫酸铵或硝酸钠作为唯一氮源时，菌株BJ-4所产蛋白酶的酶活性极低，可能原因是该菌株几乎不能利用无机氮源生长产酶。有相关文献介绍，有机氮源比无机氮源在诱导芽孢杆菌属产酶方面效果更为显著^[16]。本实验结果与文献得到的结论相吻合。因此，选择牛肉膏作为后续条件优化发酵培养基的最适氮源。

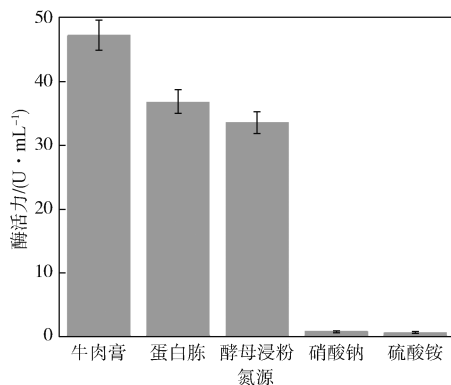


图8 氮源种类对发酵产酶的影响

Fig. 8 Influence of nitrogen source types on enzyme production by fermentation

牛肉膏添加量对发酵产酶的影响如图9所示。由图9可知，牛肉膏的添加质量分数从0.5%增加到1.5%时，蛋白酶活力不断增加；当牛肉膏的添加质量

分数为1.5%时，蛋白酶活力达到最高；牛肉膏的添加质量分数大于1.5%后，蛋白酶的酶活反而逐渐降低，可能是牛肉膏的浓度过高不利于微生物代谢，从而抑制产酶。因此，选择牛肉膏的最适添加质量分数为1.5%。

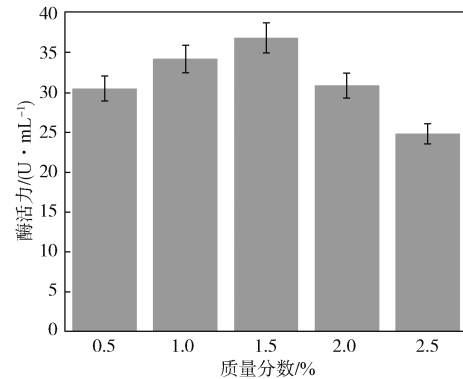


图9 牛肉膏添加量对发酵产酶的影响

Fig. 9 Influence of beef paste addition amount on enzyme production by fermentation

3.4.3 培养温度

发酵培养温度对菌株BJ-4发酵产酶的影响如图10所示。由图10可知，37℃以下，蛋白酶活力随着发酵培养温度升高而升高，二者呈现出正相关；当发酵培养温度为37℃时，蛋白酶活力最大；发酵培养温度继续增加，酶活力呈现下降趋势，可能是培养温度过高使菌株的生长代谢所需的酶活性下降，从而抑制菌株的生长，蛋白酶合成受阻，活性降低。因此，选择37℃作为最适发酵培养温度。

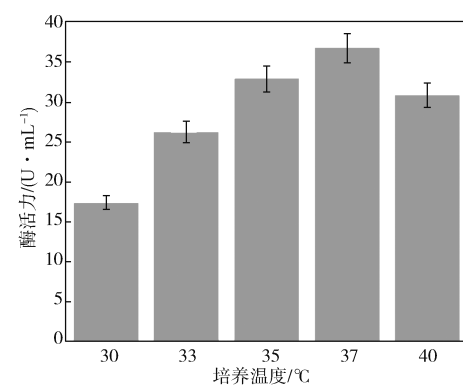


图10 培养温度对发酵产酶的影响

Fig. 10 Influence of temperature on enzyme production by fermentation

3.4.4 初始 pH 值

pH值能够改变细胞膜的通透性，影响细胞新陈代谢和酶促反应的进行，间接影响细胞产酶^[17]。乔

传丽等^[18]从新疆传统发酵酸牛奶中分离出多株产蛋白酶菌株, 研究发现它们最合适的初始 pH 值均为 5.0; 陈茏^[19]筛选得到一株解淀粉芽孢杆菌, 研究发现最佳初始 pH 值为 7.0。因此, 本研究分析了初始 pH 值对菌株 BJ-4 发酵产酶的影响, 测试结果如图 11 所示。由图 11 可知, 随着初始 pH 值的升高, 菌株 BJ-4 发酵产蛋白酶的酶活性先逐渐增强后逐渐下降; 初始 pH 值为 6.0 时, 酶活力最大。因此, 菌株 BJ-4 的最适初始 pH 值为 6.0。

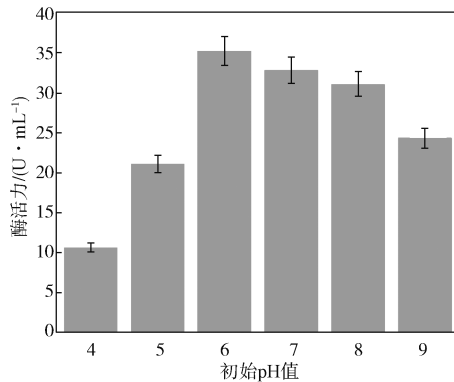


图 11 初始 pH 值对发酵产酶的影响

Fig. 11 Influence of initial pH on enzyme production by fermentation

3.4.5 接种量

接种量对菌株 BJ-4 发酵产酶的影响如图 12 所示。由图 12 可知, 接种量为 0.5%~2.0% 时, 蛋白酶酶活力相差不大, 接种量为 1.5% 时酶活力最大; 随着接种量的继续增加, 酶活力呈现下降趋势, 可能原因是接种量过大, 使菌体数量急剧增加, 导致营养物质的消耗加快, 代谢废物积累, 不利于蛋白酶的合成。因此, 选择 1.5% 为菌株 BJ-4 的最适接种量。

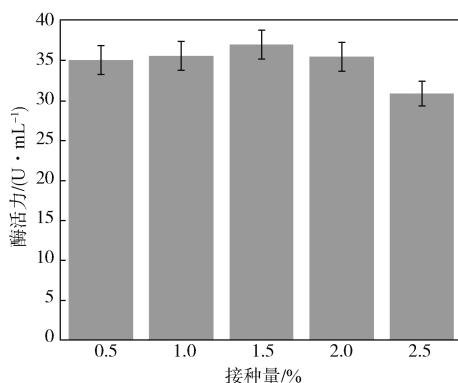


图 12 接种量对发酵产酶的影响

Fig. 12 Influence of inoculation amount on enzyme production by fermentation

3.4.6 响应面优化

使用 Design Expert 8.0.6 软件对表 4 数据进行二次多元回归拟合, 得到酶活力 (Y) 对温度 (A)、pH (B) 和接种量 (C) 的二次多项式回归模型:

$$Y = 40.60 + 0.11A - 0.39B - 0.59C - 0.65AB - 0.72AC - 0.21BC - 4.29A^2 - 1.99B^2 - 1.07C^2$$

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Box-Behnken test design and results

编号	$A/^\circ\text{C}$	B	$C/\%$	$Y/(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$
1	35.0	6	1.5	33.73
2	40.0	6	1.5	35.31
3	35.0	8	1.5	34.63
4	40.0	8	1.5	33.62
5	35.0	7	1.0	34.36
6	40.0	7	1.0	35.97
7	35.0	7	2.0	35.94
8	40.0	7	2.0	34.67
9	37.5	6	1.0	39.17
10	37.5	8	1.0	38.41
11	37.5	6	2.0	37.09
12	37.5	8	2.0	35.49
13	37.5	7	1.5	40.17
14	37.5	7	1.5	41.32
15	37.5	7	1.5	39.70
16	37.5	7	1.5	40.65
17	37.5	7	1.5	41.16

为验证模型的可行性, 进行了显著性检验和方差分析, 结果如表 5 所示。模型的 P 值为 $0.0007 < 0.001$, 表明不同试验之间差异极显著; 失拟项 P 值为 $0.1751 > 0.05$, 差异不显著, 说明实验误差小; 模型拟合系数 $R^2 = 0.9533$, 校正复相关系数 $R^2_{\text{adj}} = 0.8932$, 表明模型在实验数据中的拟合度较好、可信度较高。

表 5 二次回归模型方差分析

Table 5 Analysis of variance of quadratic regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	114.82	9	12.76	15.87	0.0007	显著
A	0.10	1	0.10	0.13	0.7303	
B	1.24	1	1.24	1.54	0.2543	
C	2.78	1	2.78	3.46	0.1051	
AB	1.68	1	1.68	2.09	0.1919	
AC	2.07	1	2.07	2.58	0.1523	
BC	0.18	1	0.18	0.22	0.6538	
A^2	77.54	1	77.54	96.42	<0.0001	
B^2	16.61	1	16.61	20.66	0.0027	
C^2	4.85	1	4.85	6.04	0.0437	
残差	5.63	7	0.80			
失拟项	3.80	3	1.27	2.77	0.1751	不显著
纯误差	1.83	4	0.46			
总差	120.45	16				

为分析培养温度 (A)、pH (B) 和接种量 (C) 之间交互作用对菌株 BJ-4 发酵产酶的影响, 绘制了二维等高线图和三维响应曲面图 (图 13), 并依据影响程度确定最佳因素水平。等高线可以反映因素之间的交互作用, 椭圆形表示两个因素之间的交互作用显著, 而圆形则相反。由图 13 可知, AB 和 BC 的等高线图趋近圆形, 表明 AB 和 BC 之间的交互作用对酶活性影响不显著; 而 AC 组的等高线图趋近椭圆, 说明 AC 的交互作用对酶活性的影响显著。 AB 和 AC 组的响应曲面陡峭, 且在培养温度变化方向曲

线变化明显, 随着温度的升高, 酶活力先增加后降低; 而 BC 组的响应曲面平缓, 表明初始 pH 值和接种量的变化对酶活性影响不大。

综上, 最终试验预测的最佳产酶条件如下: 培养温度为 $37.61\text{ }^{\circ}\text{C}$, 初始 pH 值为 6.84 , 接种量为 1.36% 。酶活力的最大预测值为 40.70 U/mL 。为了验证试验的准确性, 在预测的最佳产酶条件下展开试验, 测得蛋白酶活力为 40.06 U/mL , 与预测值相差较小, 酶活力提高了 71.01% 。以上说明本次响应面试验设计的拟合程度高, 得到的最佳产酶条件具有较高的可信度。

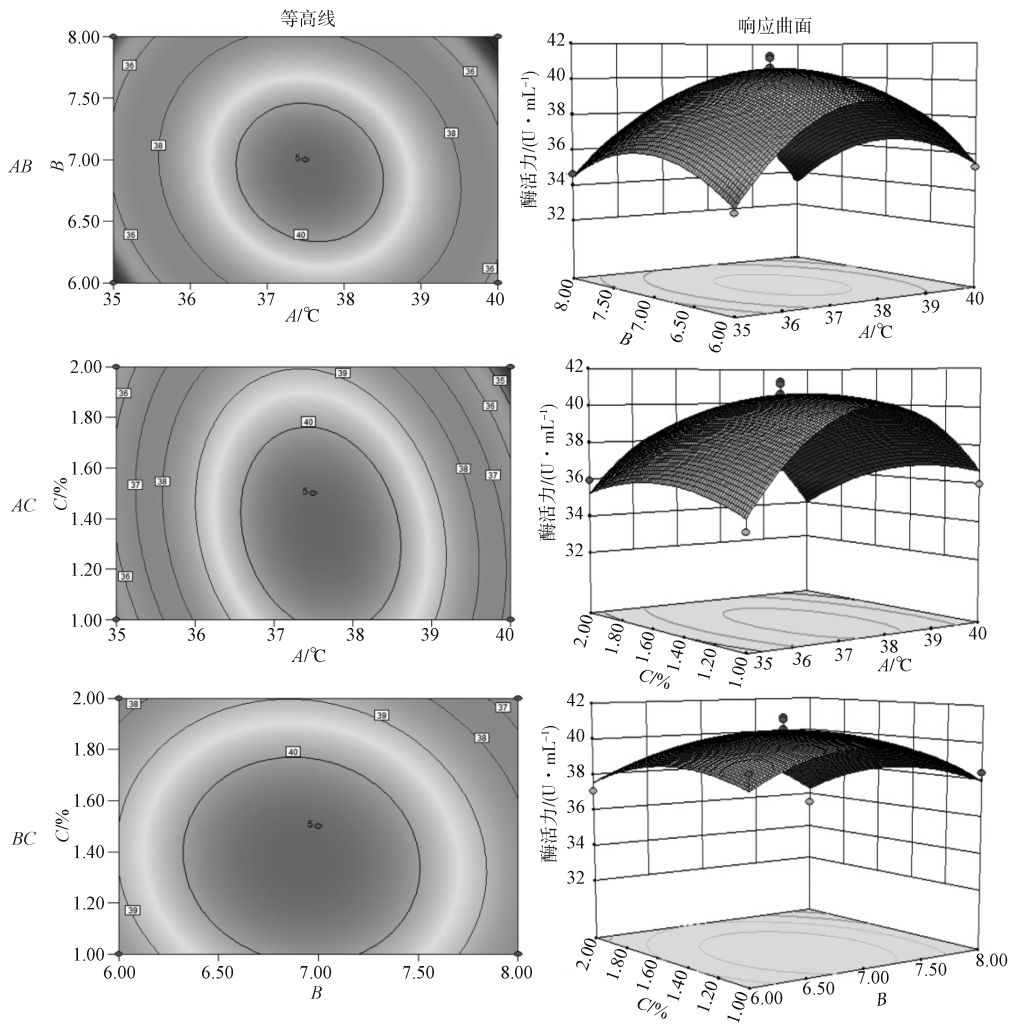


图 13 交互作用影响酶活性的等高线图及响应曲面图

Fig. 13 Contour diagram and response surface diagram of interaction affecting enzyme activity

4 结论

解淀粉芽孢杆菌是一种益生菌, 具有良好的抑菌

效果, 在植物病害防治方面得到广泛的应用。其产生的蛋白酶、淀粉酶是工业酶的主要来源。本研究从湖南工业大学食堂周边取样, 筛选得到了一株高产蛋白

酶菌株 BJ-4。该菌株为革兰氏阳性菌, 菌体有芽孢, 呈短杆状, 经鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌。对菌株 BJ-4 产酶条件进行优化, 单因素优化结果显示最佳产酶条件为: 葡萄糖质量分数 0.5%、牛肉膏 1.5%、培养温度 37 ℃、初始 pH 值 6.0、接种量 1.5%; 响应面优化结果显示最佳产酶条件为: 培养温度 37.61 ℃、初始 pH 值 6.84、接种量 1.36%。经单因素和响应面优化后酶活力提升了 71.01%。本研究分离得到的解淀粉芽孢杆菌具有生产中性蛋白酶的能力, 在纺织、皮革、食品等领域具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] PRATHUMPAI W, PROMBOON A, WERAPAN B, et al. Pilot-Scale Protease Production by *Bacillus Sp.* C4 for Silk Degumming Processes[J]. *Journal of Natural Fibers*, 2022, 19(3): 1055–1068.
- [2] ERRASTI M E, TORRES M J, MERCERAT J R, et al. Plant Proteases from *Carica Papaya* and *Vasconcellea Quercifolia* with Potential Application for a Cleaner Processing in Tanneries[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2020, 38(5): 357–366.
- [3] ZHANG X, GAO M C, ALI CHATTHA S, et al. Application of Acidic Protease in the Pickling to Simplify the Pelt Bating Process[J]. *Journal of Leather Science and Engineering*, 2021, 3(1): 27.
- [4] MATKAWALA F, NIGHOJKAR S, KUMAR A, et al. Microbial Alkaline Serine Proteases: Production, Properties and Applications[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2021, 37(4): 63.
- [5] 万文结, 薛芷筠, 张泽文, 等. 一株产碱性蛋白酶菌株的筛选鉴定及酶学特性研究[J]. *微生物学报*, 2017, 57(5): 737–747.
WAN Wenjie, XUE Zhijun, ZHANG Zewen, et al. Isolation and Identification of an Alkaline Protease Producing Strain and Study on Enzymatic Properties[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(5): 737–747.
- [6] RAZZAQ A, SHAMSI S, ALI A, et al. Microbial Proteases Applications[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 110.
- [7] 张学松. 蚕丝脱胶酶高产菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2009.
ZHANG Xuesong. Screening, Identification and Fermentation Condition Optimization of a Silk Degumming Bacteria[D]. Chongqing: Southwest University, 2009.
- [8] 胡学智, 王 俊. 蛋白酶生产和应用的进展[J]. *工业微生物*, 2008, 38(4): 49–61.
HU Xuezhi, WANG Jun. Advances in Protease Production and Its Applications[J]. *Industrial Microbiology*, 2008, 38(4): 49–61.
- [9] 郑 翔, 胡美荣, 刘春卯, 等. 一株皮革脱毛用工程菌的构建及酶法脱毛应用[J]. *中国皮革*, 2016, 45(10): 21–26.
ZHENG Xiang, HU Meirong, LIU Chunmao, et al. Construction of a Strain and Application in Enzyme Unhairing[J]. *China Leather*, 2016, 45(10): 21–26.
- [10] 侯燕燕, 鲁凤娟, 李晓广, 等. 芽孢杆菌胞内丝氨酸蛋白酶 ISPr 的克隆表达及脱毛应用[J]. *皮革科学与工程*, 2018, 28(3): 20–23, 31.
HOU Yanyan, LU Fengjuan, LI Xiaoguang, et al. Cloning and Heterologous Expression of an Intracellular Serine Protease ISPr from *Bacillus Sp.* LCB10 for Dehairing[J]. *Leather Science and Engineering*, 2018, 28(3): 20–23, 31.
- [11] 曹 慧, 张腾月, 赵龙妹, 等. 土壤中高产蛋白酶菌株产酶条件及酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2072–2081.
CAO Hui, ZHANG Tengyue, ZHAO Longmei, et al. Identification and Characterization of a High Protease-Producing Strain from Soil[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(7): 2072–2081.
- [12] 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: 349–399.
DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 349–399.
- [13] 张文静, 佟 晔, 杨锡文, 等. 高产中性蛋白酶菌株的筛选、优化及中试放大[J]. *生物技术进展*, 2022, 12(1): 112–119.
ZHANG Wenjing, TONG Ye, YANG Xiwen, et al. Screening and Optimization of High-Yield Neutral Protease-Producing Strains and Pilot Scale-Up[J]. *Current Biotechnology*, 2022, 12(1): 112–119.
- [14] 李曹龙, 秦 艳, 欧秀玲, 等. 高温产蛋白酶菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. *中国酿造*, 2012, 31(12): 98–101.
LI Caolong, QIN Yan, OU Xiuling, et al. Screening of Thermostable Protease-Producing Bacterium and Its Enzyme-Producing Condition[J]. *China Brewing*, 2012, 31(12): 98–101.
- [15] 刘 静, 刘张虎, 张雨霏. 环境中产蛋白酶菌株的筛选及其产酶条件的优化[J]. *生物化工*, 2019, 5(6): 36–39.

- LIU Jing, LIU Zhanghu, ZHANG Yufei. Screening of Protease Strains in Environment and Optimization of Enzyme Production Conditions[J]. Biological Chemical Engineering, 2019, 5(6): 36-39.
- [16] GAJJU H, BHALLA T C, AGARWAL H O. Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic *Bacillus Coagulans* PB-77[J]. Pakistan Journal of Botany, 1996, 36(6): 153-155.
- [17] 罗健东, 郑平香, 陈修. 细胞内 pH 与细胞凋亡[J]. 生命科学, 1997, 9(5): 218-221.
- LUO Jiandong, ZHENG Pingxiang, CHEN Xiu. Intracellular pH and Apoptosis[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 1997, 9(5): 218-221.
- [18] 乔传丽, 金丹, 蒋艾廷, 等. 传统发酵酸牛奶中产蛋白酶酵母菌的筛选及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(5): 73-78.
- QIAO Chuanli, JIN Dan, JIANG Aiting, et al. Screening of Yeast with High Protease Activities from Traditional Yogurt and Optimization of Enzyme Conditions[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(5): 73-78.
- [19] 陈 茏. 产蛋白酶菌株的筛选及酶学性质的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- CHEN Long. Screening of Protease-Producing Strains and Study on Their Enzymatic Properties[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.
- (责任编辑: 邓 彬)

Screening and Identification of Protease-Producing Strain and Optimization of Enzyme Production

ZHANG Cheng, TAN Qin, CHEN Lulu, RAN Song, REN Xinping, ZENG Xiaoxi

(College of Life Science and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: In order to screen high-yield protease strains, a strain BJ-4 with high-yield protease was screened by casein medium and identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The enzyme production conditions of the strain were optimized by single factor and response surface optimization. The optimal enzyme production conditions were determined as glucose 0.5%, beef extract 1.5%, culture temperature 37.61 °C, initial pH 6.84 and inoculation amount 1.36%. The optimized enzyme activity increased by 71.01%. Strain BJ-4 is promising in industrial applications.

Keywords: protease; *Bacillus amyloliquefaciens*; condition optimization; enzyme activity