



## 土壤中高产蛋白酶菌株产酶条件及酶学性质

曹慧<sup>Δ\*1</sup> 张腾月<sup>Δ1</sup> 赵龙妹<sup>1</sup> 李源<sup>2</sup> 杨佳萌<sup>1</sup> 张朋振<sup>1</sup> 任世威<sup>1</sup> 张会会<sup>1</sup>

1 河南科技大学动物科技学院 河南 洛阳 471000

2 平顶山国家高新技术产业开发区管委会 河南 平顶山 467000

**摘要:**【背景】微生物蛋白酶已经成为工业用蛋白酶的主要来源, 筛选具有特殊环境适应性的微生物成为生物酶资源的开发热点。【目的】通过对青藏高原土壤微生物产蛋白酶菌株的筛选、优化及相关特性研究, 寻找新的蛋白酶资源, 为高原菌种资源利用提供科学依据。【方法】采用形态学和分子生物学对筛选菌株进行菌种鉴定, 利用单因素试验和正交试验对菌株进行发酵条件优化及酶学性质的探究。【结果】筛选出一株高产蛋白酶菌株 XC2, 经鉴定菌株 XC2 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。XC2 最优产酶条件: 可溶性淀粉 4.0%, 牛肉膏 1.0%,  $K^+$  0.6%, 培养温度 34 °C、初始 pH 7.0、接种量 2.0% 的条件下 200 r/min 振荡培养 13 h, 所产蛋白酶活力最高为 638.5 U/mL。XC2 所产蛋白酶最适反应温度 60 °C, 最适 pH 9.0; 40–50 °C、pH 8.0–10.0 条件下酶活稳定性较高;  $Mn^{2+}$  对酶活力有明显激活作用, 而  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  对酶活力有明显抑制作用。【结论】枯草芽孢杆菌 XC2 有较强的产碱性蛋白酶的能力, 具有较好的应用前景。

**关键词:** 蛋白酶, 筛选鉴定, 产酶条件优化, 酶学性质, 青藏高原

## Identification and characterization of a high protease-producing strain from soil

CAO Hui<sup>Δ\*1</sup> ZHANG Teng-Yue<sup>Δ1</sup> ZHAO Long-Mei<sup>1</sup> LI Yuan<sup>2</sup> YANG Jia-Meng<sup>1</sup>  
ZHANG Peng-Zhen<sup>1</sup> REN Shi-Wei<sup>1</sup> ZHANG Hui-Hui<sup>1</sup>

1 College of Animal Science & Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China

2 Pingdingshan National Hi-Tech Industrial Development Zone, Pingdingshan, Henan 467000, China

**Abstract:** [Background] Microbial protease has become the main source of industrial enzyme preparation. Screening microorganisms with special environmental adaptability has become a research hotspot. [Objective] To isolate and screen the strain with high protease activity from the alpine meadow soil on the Tibetan Plateau, and optimize the enzyme production conditions and explore enzymatic

**Foundation items:** Doctor of Philosophy Degree Support Program from Henan University of Scientific and Technology (13480077); Research and Development Program of Qinghai Province (2017-NK-153, 2019-NK-173)

ΔThese authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: caohui349425@163.com

Received: 22-02-2020; Accepted: 16-05-2020; Published online: 04-06-2020

基金项目: 河南科技大学博士科研启动资金(13480077); 青海省重点研发计划(2017-NK-153, 2019-NK-173)

Δ对本文贡献相同

\*通信作者: E-mail: caohui349425@163.com

收稿日期: 2020-02-22; 接受日期: 2020-05-16; 网络首发日期: 2020-06-04

properties. **[Methods]** Strains were identified by morphology and molecular biological identification. The fermentation condition and enzymatic properties were studied by single factor and/or orthogonal test. **[Results]** Strain XC2 with high protease activity was identified as *Bacillus subtilis*. The optimum fermentation conditions were: soluble starch 4.0%, beef extract 1.0%,  $K^+$  0.6%, 34 °C, pH 7.0, inoculum amount 2.0%, rotation speed 200 r/min after 13 h. The highest protease activity of XC2 reached 638.5 U/mL. The optimum reaction temperature and pH of the protease was 60 °C and 9.0 respectively. The enzyme activity is relative stable between 40 and 50 °C or pH 8.0–10.0. The protease activity of XC2 was significantly enhanced by  $Mn^{2+}$ , but significantly reduced by  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  and  $Fe^{3+}$ . **[Conclusion]** *Bacillus subtilis* XC2 can efficiently produce alkaline protease, with good application prospect.

**Keywords:** Protease, Screening and identification, Fermentation conditions optimization, Enzymatic properties, Tibetan Plateau

蛋白酶是一类催化蛋白质水解生成多肽及小分子氨基酸的酶, 广泛应用于洗涤剂、制革、裘皮、明胶、丝绸脱胶、食品、饲料加工和医药等行业<sup>[1-3]</sup>。其中, 在饲料中加入蛋白酶可以有效改善畜禽, 特别是幼龄畜禽的生产性能, 提高免疫力, 促进内源酶分泌, 降低日粮中抗营养因子的抑制作用<sup>[4]</sup>。目前, 商业化蛋白酶按来源可分为动物蛋白酶、植物蛋白酶和微生物蛋白酶<sup>[5-6]</sup>, 其中, 微生物蛋白酶因其独特的优越性逐渐成为工业用蛋白酶的主要来源<sup>[7-8]</sup>。近年来, 筛选特殊生境下具有特殊环境适应特性的微生物也成为生物酶资源开发的热点之一<sup>[9-10]</sup>。

青藏高原是世界上海拔最高、面积最大的高原, 其独特的高原气候和地域特征构成了特有的生态环境, 这使得青藏高原土壤微生物具有独特的环境适应特性, 而当前对青藏高原特色微生物的开发利用还相对有限<sup>[11-14]</sup>。本研究旨在通过对青藏高原土壤微生物产蛋白酶菌株的筛选优化及相关特性研究, 以期寻找新的蛋白酶资源, 为今后的工业应用和进一步开展分子生物学方面的研究奠定理论基础, 并为高原菌种资源利用提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

采样地点位于青海省海北州门源县, 37°N,

101°E, 海拔 3 175 m, 属高原大陆性气候, 具有典型的日照时间长、太阳辐射强、昼夜温差大等高原寒温湿润性气候特征, 年平均气温为 0.8 °C, 年平均降水量为 520 mm。青藏高原高寒草甸土壤属于寒冻锥形土, 具有土壤发育年青、土层浅薄、有机质含量丰富等特征, 土壤 pH 值在 7.3 左右<sup>[15]</sup>。用梅花形采样法, 取高寒草甸 0–10 cm 土壤, 过 2 mm 土壤筛, 装入采样袋, –20 °C 保存备用。

#### 1.1.2 主要培养基

筛选培养基(g/L): 脱脂奶粉 50.0, 琼脂粉 20.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min, 倒平板备用。

纯化培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 琼脂粉 20.0, pH 7.0–7.5,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 蔗糖 10.0, NaCl 5.0, pH 7.0–7.5,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

福林酚、脱脂奶粉, 北京索莱宝科技有限公司; 蛋白胨、牛肉膏、琼脂粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 干酪素, 国药集团化学试剂有限公司; Triton X-100 基因组提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; 碳酸钠、三氯乙酸等均为国产分析纯。

气浴恒温振荡器, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 恒温水浴锅, 上海科玺仪器有限公司; 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 产蛋白酶菌株的筛选

初筛：无菌水稀释土壤样品，取 $10^{-3}$ 土壤稀释液 200  $\mu\text{L}$  均匀涂布于筛选培养基，28  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h，挑取单菌落纯化培养。挑取纯化后的单菌落点接种于筛选培养基，28  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h，观察菌落透明圈，挑选有较大透明圈的菌株为初筛菌株。

复筛：初筛菌株接种于发酵培养基中，28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 24 h，取发酵上清液 12 000 r/min 离心 10 min 制备粗酶液，测定蛋白酶活力，选取酶活力最高的菌株为目标菌株。

### 1.2.2 蛋白酶活力的测定

采用 Folin-酚法测定蛋白酶活力。200  $\mu\text{L}$  粗酶液与 200  $\mu\text{L}$  底物(2%酪蛋白溶液)混匀，40  $^{\circ}\text{C}$  反应 10 min 后立即加入 600  $\mu\text{L}$  的 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应，静置 10 min 后 12 000 r/min 离心 10 min。取 100  $\mu\text{L}$  离心后的上清液，依次加入 500  $\mu\text{L}$  的 0.4 mol/L 碳酸钠溶液、100  $\mu\text{L}$  福林酚试剂，混匀，40  $^{\circ}\text{C}$  保温显色 20 min 后，于波长 650 nm 处测定吸光度值。以先加入三氯乙酸终止反应的一组为对照组。

酶活定义：在 pH 7.0、40  $^{\circ}\text{C}$  条件下，每分钟水解 2%酪蛋白溶液产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位(U/mL)。

### 1.2.3 菌株鉴定

菌株形态鉴定：菌株于纯化培养基 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 48 h，观察菌落形态。挑取单菌落涂片，革兰氏染色镜检观察形态。参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[16]</sup>进行菌株形态观察和菌体特征描述。

分子生物学鉴定：用 Triton X-100 基因组提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA。参照文献[17]的方法，选择通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTG GCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTA CGACTT-3')扩增菌株的 16S rRNA 基因序列，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果与 NCBI 中已知菌株进行比对。

### 1.2.4 产蛋白酶菌株发酵条件的优化

#### (1) 碳源对菌株产蛋白酶的影响

在初始发酵培养基中分别添加 1% (质量体积比)的葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、淀粉为碳源，目标菌株在 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 24 h，测定蛋白酶活力。培养基中添加不同浓度(1.0%、1.5%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%)的最佳碳源，同上条件培养，测定蛋白酶活力。

#### (2) 氮源对菌株产蛋白酶的影响

选择蔗糖为碳源，培养基中分别添加 1% (质量体积比)的干酪素、牛肉膏、蛋白胨、硝酸钠、硫酸铵为氮源，同上条件培养目标菌株，测定蛋白酶活力。培养基中添加不同浓度(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、3.0%、4.0%)的最佳氮源，同上条件培养，测定蛋白酶活力。

#### (3) 金属离子对菌株产蛋白酶的影响

选择蔗糖为碳源、蛋白胨为氮源，培养基中分别添加 0.5% (质量体积比)的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ ，同上条件培养目标菌株，测定蛋白酶活力。培养基中添加不同浓度(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%)的最佳金属离子，同上条件培养，测定蛋白酶活力。

#### (4) 培养温度对菌株产蛋白酶的影响

调节培养温度，目标菌株分别在 22、25、28、31、34、37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 24 h，测定蛋白酶活力。

#### (5) 摇床转速对菌株产蛋白酶的影响

目标菌株分别在摇床转速为 170、200、230 r/min 的条件下振荡培养 24 h，测定蛋白酶活力。

#### (6) 初始 pH 值对菌株产蛋白酶的影响

调节培养基 pH 值，目标菌株在初始 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的培养基中振荡培养 24 h，测定蛋白酶活力。

#### (7) 接种量对菌株产蛋白酶的影响

种子液接种量分别为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%，目标菌株振荡培养 24 h，测定蛋白

酶活力。

#### (8) 营养条件正交实验设计

发酵条件优化基础上, 采用  $L_9(3^4)$  正交表进行正交试验, 研究碳源、氮源、金属离子对目标菌株产蛋白酶的影响。每个处理设定 3 个重复。正交试验设计表见表 1。

#### (9) 菌株生长曲线的测定

在优化后发酵条件下培养目标菌株, 用血球计数板计活菌数, 以芽孢染色法观察记录芽孢杆菌生长发育时期, 测定蛋白酶活力, 绘制出菌株的生长曲线和产酶曲线。

### 1.3 酶学性质研究

#### 1.3.1 酶最适反应温度

测定目标菌株粗酶液在 20、30、40、50、60、70、80 °C 下的蛋白酶活力。

#### 1.3.2 酶的热稳定性

粗酶液在 40、50、60、70 °C 下分别保温 20、40、60、80、100 min, 取出冰浴, 40 °C 测定剩余蛋白酶活力。

#### 1.3.3 酶最适反应 pH

粗酶液分别与 pH 值为 6.0、7.0、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、11.0、12.0 的底物在 40 °C 反应, 测定蛋白酶活力。

#### 1.3.4 酶的 pH 稳定性

粗酶液与 pH 值为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的缓冲液 1:1 (体积比) 混合, 4 °C 静置 1 h, 40 °C 测定剩余蛋白酶活力。

#### 1.3.5 各种金属离子对蛋白酶活力的影响

在反应体系中分别加入 10 mmol/L 的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ , 以不添加金属离子为对照组, 40 °C 反应测

表 1 XC2 营养条件优化的正交试验设计

Table 1 Orthogonal experiment of liquid medium optimization of strain XC2

水平	因子 Factors		
Level	A Soluble starch (g/L)	B Beef extract (g/L)	C $\text{K}^+$ (g/L)
1	30	5	6
2	40	10	8
3	50	15	10

定目标菌株蛋白酶活力。

### 1.4 数据处理

用 SPSS 18.0 进行方差分析及差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 产蛋白酶菌株的筛选

从样品中筛选出多株产蛋白酶的菌株, 通过比较水解圈直径与菌落直径的比值和初筛蛋白酶活力, 筛选出一株高产蛋白酶的菌株 XC2 (图 1), 初筛蛋白酶活力为 251.7 U/mL。

### 2.2 菌株的鉴定

形态鉴定: XC2 为白色不透明菌落, 边缘不规则呈裂叶状, 易挑起, 菌落直径 10–13 mm, 有皱褶, 微凸, 湿润, 无光泽(图 1)。革兰氏阳性菌, 菌体为短杆状, 单个或成对, 有芽孢, 为椭圆或卵圆, 端生(图 2), 初步判定为芽孢杆菌。



图 1 菌株 XC2 菌落形态

Figure 1 Colony morphology of strain XC2

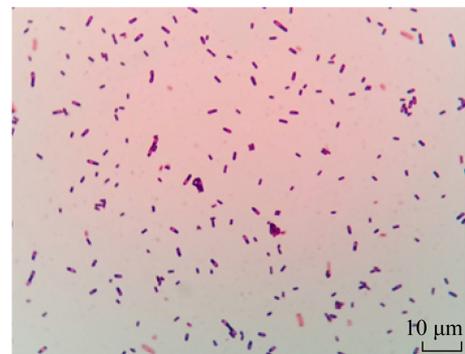


图 2 菌株 XC2 的革兰氏染色结果

Figure 2 Gram stain of strain XC2

分子鉴定：菌株 XC2 的 16S rRNA 基因序列(登录号为 MT437043)与已知菌株 *Bacillus subtilis* strain CZ-BHG005 的 16S rRNA 基因(登录号为 KT765841.1)显示出 99%相似度，确定菌株 XC2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

## 2.3 菌株 XC2 发酵条件的优化

### 2.3.1 碳源对菌株 XC2 产蛋白酶的影响

碳源种类对菌株产蛋白酶有显著影响( $P<0.05$ )，其中，以可溶性淀粉为碳源时，菌液酶活力最高；其次是果糖和葡萄糖；蔗糖和乳糖为碳源时酶活力较低(图 3)。因此，选择可溶性淀粉为最适碳源。

可溶性淀粉添加量对菌株 XC2 产蛋白酶的影响结果表明，淀粉添加量由 1.0%增加到 5.0%时产酶量逐渐增加，添加量为 4.0%和 5.0%时酶活力最高(图 4)。因此，选择 4.0%作为淀粉的最适添加量。

### 2.3.2 氮源对菌株 XC2 产蛋白酶的影响

硫酸铵、硝酸钠等无机氮作为氮源时，菌株 XC2 不能正常生长；而有机氮源能被菌株利用，其中以牛肉膏为氮源时 XC2 酶活力最高(图 5)。因此，选择牛肉膏为最适氮源。

探究牛肉膏添加量对菌株产蛋白酶的影响结果表明，牛肉膏添加量为 1.0%时，菌株产酶量最高；随着牛肉膏的添加量增加，酶活力明显降低

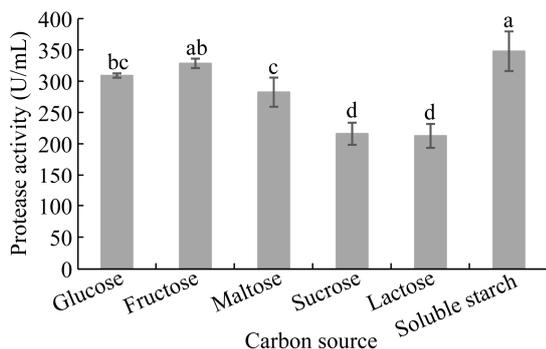


图 3 碳源对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 3 The effect of different carbon sources on protease production of strain XC2

注：不同字母表示差异显著， $P<0.05$ 。下同。

Note: Different letters indicate significant difference,  $P<0.05$ . The same below.

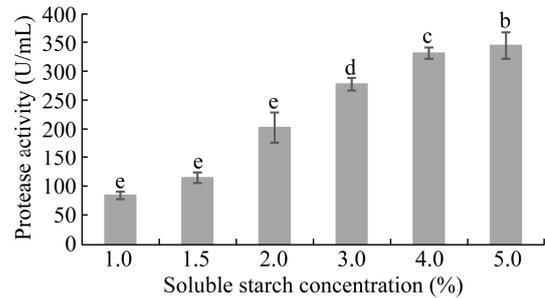


图 4 可溶性淀粉添加量对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 4 The effect of soluble starch concentration on protease production of strain XC2

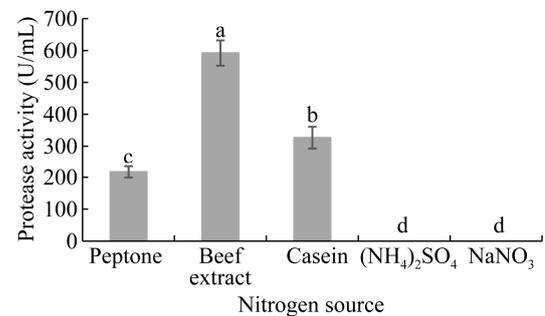


图 5 氮源对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 5 The effect of different nitrogen sources on protease production of strain XC2

(图 6)，可能是牛肉膏浓度过高使培养基的渗透压增加，导致细胞脱水或死亡，从而抑制了酶的表达。因此，选择 1.0%作为牛肉膏的最适添加量。

### 2.3.3 金属离子对菌株 XC2 产蛋白酶的影响

当培养基中加入  $K^+$ 时，XC2 蛋白酶活力显著高于其他处理，其次是  $Na^+$ 和  $Mg^{2+}$ 。  $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 等对蛋白酶都有不同程度的抑制作用，尤其是  $Zn^{2+}$ 和  $Fe^{2+}$ 对蛋白酶的抑制作用极其显著(图 7)。

$K^+$ 的添加量对菌株产蛋白酶的影响结果表明，随着培养基中  $K^+$ 浓度的增加，菌株产酶量不断增加，当添加量为 0.8%时菌株产酶量最高。因此，选择 0.8%作为  $K^+$ 的最适添加量(图 8)。

### 2.3.4 培养温度对菌株 XC2 产蛋白酶的影响

从图 9 可知，培养温度对菌株产蛋白酶有较大的影响。34 °C 培养时，蛋白酶活力显著高于其他温度。因此，选择 34 °C 作为发酵培养基的培养温度。

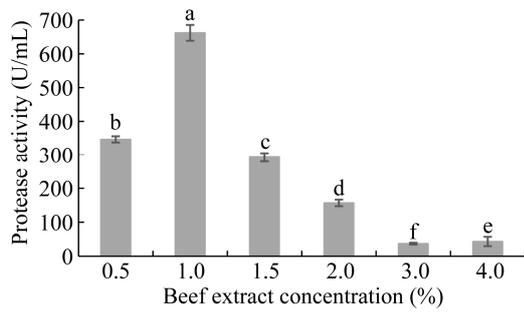


图 6 牛肉膏添加量对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 6 The effect of beef extract concentration on proteinase production of strain XC2

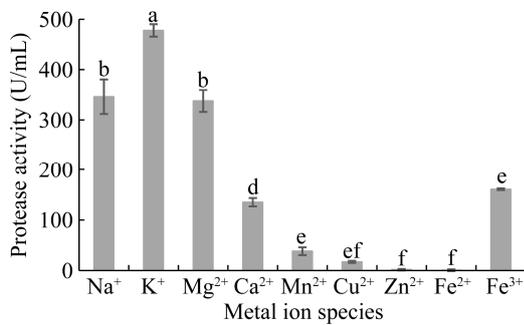


图 7 金属离子对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 7 The effect of different metal ions on proteinase production of strain XC2

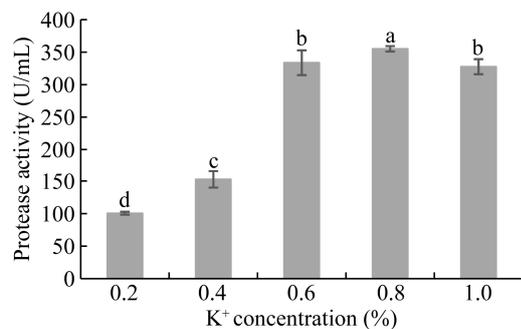


图 8 K<sup>+</sup>的添加量对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 8 The effect of K<sup>+</sup> concentration on proteinase production of strain XC2

### 2.3.5 摇床转速对菌株 XC2 产酶的影响

摇床转速对菌株 XC2 产蛋白酶的影响结果见图 10。在摇床转速为 200 r/min 时, 蛋白酶活力最大。因此, 选择转速 200 r/min 作为发酵培养的转速。

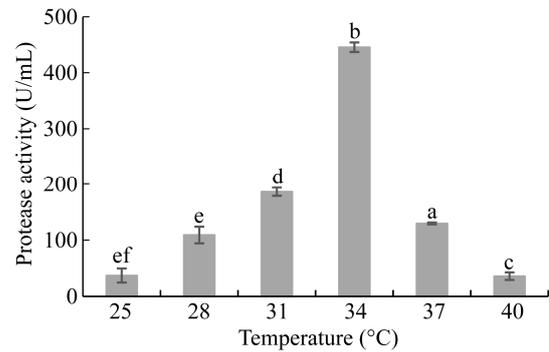


图 9 培养温度对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 9 The effect of cultural temperature on proteinase production of strain XC2

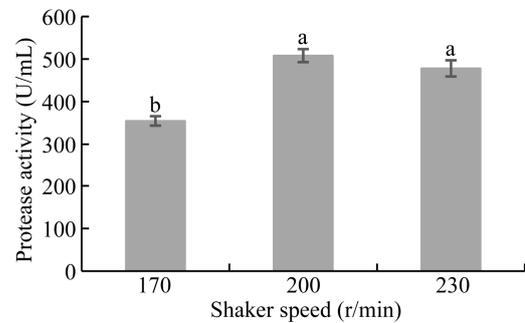


图 10 转速对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 10 The effect of shaker speed on proteinase production of strain XC2

### 2.3.6 初始 pH 值对菌株 XC2 产蛋白酶的影响

从图 11 可知, 随着培养基初始 pH 值升高, 蛋白酶活力逐渐增大; 但初始 pH 值大于 7.0 后, 酶活力开始下降。因此, 选择培养基初始 pH 值 7.0 作为发酵培养基的起始 pH 值。

### 2.3.7 接种量对菌株 XC2 产蛋白酶的影响

从图 12 可知, 接种量为 2.0% 时, 蛋白酶活力最大; 随着接种量继续增加, 蛋白酶活力呈下降趋势。原因可能是当接种量较大时, 菌体前期生长迅速, 营养物质被迅速消耗, 并产生大量代谢废物, 抑制中后期菌体的生长。因此, 选择接种量为 2.0% 作为发酵培养的接种量。

### 2.3.8 营养条件正交实验设计

在以上优化结果的基础上, 以蛋白酶活力为考察指标, 选取可溶性淀粉添加量(A)、牛肉膏添加量(B)、金属离子 K<sup>+</sup>添加量(C) 3 个因素进行正交试验, 试验结果见表 2。

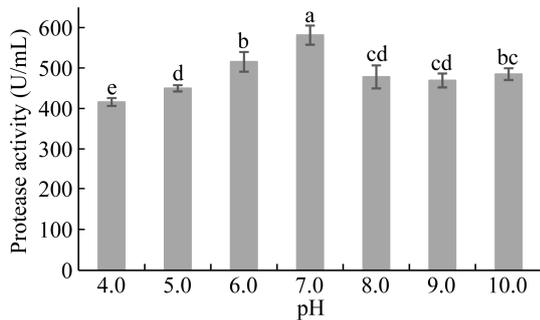


图 11 初始 pH 值对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 11 The effect of initial pH on proteinase production of strain XC2

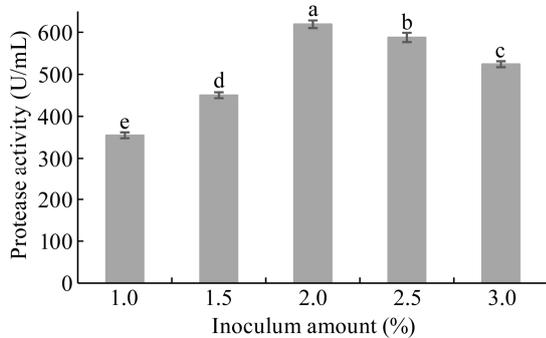


图 12 接种量对菌株 XC2 产蛋白酶的影响  
Figure 12 The effect of inoculum amount on proteinase production of strain XC2

表 2 菌株 XC2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal experiments of strain XC2

序号 No.	因子 Factors			酶活 Enzyme activity (U/mL)
	A Soluble starch (g/L)	B Beef extract (g/L)	C K <sup>+</sup> (g/L)	
1	1	1	1	205.1
2	1	2	2	347.8
3	1	3	3	359.2
4	2	1	2	193.4
5	2	2	3	371.3
6	2	3	1	342.6
7	3	1	3	225.9
8	3	2	1	413.5
9	3	3	2	366.8
$k_1$	304.0	208.1	320.4	
$k_2$	302.4	377.5	302.7	
$k_3$	335.4	356.2	318.8	
R	33.0	169.4	17.7	

通过正交试验结果可知,  $R_B > R_A > R_C$ , 3 个因素对试验结果的影响顺序为  $B > A > C$ , 利用 SPSS 统计软件计算得到  $F_A=18.97$ 、 $F_B=455.56$ 、 $F_C=5.13$ , 即牛肉膏(B)在这 3 个因素中影响最大, 可溶性淀粉(A)次之, K<sup>+</sup>(C)最小。由表 2 可以得出, 最优配方为  $A_3B_2C_1$ , 即可溶性淀粉 5%, 牛肉膏 1%, K<sup>+</sup> 0.6%。

### 2.3.9 菌株生长曲线的测定

在最优培养基和发酵条件下, 菌株 XC2 的生长曲线见图 13。种子液接入培养基的 0–5 h 为生长迟缓期; 5–21 h 为对数生长期, 菌体数量快速增多; 19 h 时菌体开始形成芽孢; 21 h 时菌体数量达到最大值; 21 h 后, 菌体数量明显下降, 80% 以上菌体已经形成芽孢, 菌株进入衰亡期。菌株 XC2 产生的蛋白酶在 0–5 h 酶活力较低且增幅缓慢, 6 h 后酶活力快速增大, 13 h 时酶活达到最大值(638.5 U/mL), 13 h 后蛋白酶活力急剧下降。

## 2.4 酶学性质研究

### 2.4.1 酶的最适反应温度

分别在不同温度下进行酶反应, 以蛋白酶活力最大值为 100%。从图 14 可知, 该蛋白酶最适反应温度为 60 °C, 20–60 °C 时酶活力随温度升高而增大, 半失活温度为 30 °C, 60 °C 后酶活力迅速降低。

### 2.4.2 酶的温度稳定性

从图 15 可知, 在 40 °C 和 50 °C 时该蛋白酶较稳定, 保温 80 min 后仍有较高酶活; 60 °C 和 70 °C 时随着保温时间增加, 蛋白酶活力迅速降低, 说明该酶不适于高温下应用。

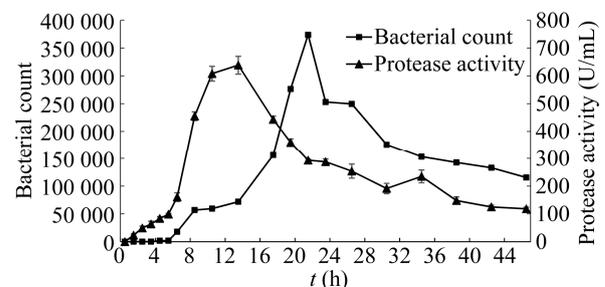


图 13 菌株 XC2 的生长曲线  
Figure 13 Growth curve of strain XC2

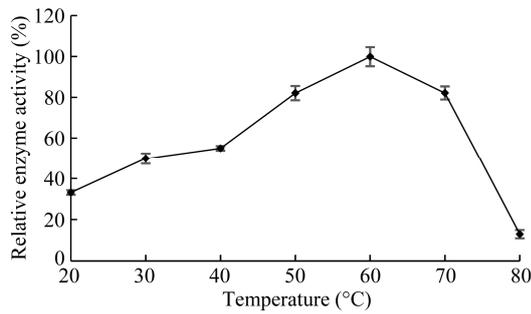


图 14 XC2 蛋白酶的最适反应温度

Figure 14 The optimum temperature for protease activities of strain XC2

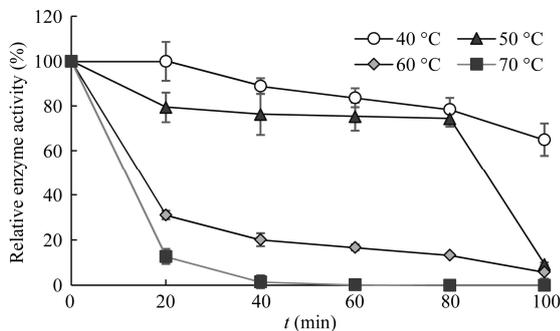


图 15 温度对 XC2 蛋白酶稳定性的影响

Figure 15 The effect of temperature on stability of protease activity from strain XC2

### 2.4.3 酶的最适反应 pH

pH 5.0 时该蛋白酶相对酶活仅为 5.2%，pH 值大于 6.0 后，酶活力迅速升高，pH 9.0 时该酶活力达到最高值，说明该蛋白酶最适反应 pH 为 9.0；在 pH 10.0–12.0 时该蛋白酶仍有较高活力(图 16)。

### 2.4.4 酶的 pH 稳定性

该蛋白酶在 pH 8.0–10.0 时保持稳定，处理 1 h 后仍保持 82% 以上酶活，说明 XC2 蛋白酶属于碱性蛋白酶(图 17)。

### 2.4.5 不同金属离子对酶的影响

从图 18 可知，不同金属离子对该蛋白酶活力的影响存在明显差异。以不添加金属离子的蛋白酶活力为 100%，添加  $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  对酶活力有明显激活作用，相对酶活分别为 132.1%、110.6%、110.1%； $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  对酶活力有明显抑制作用，其中  $Fe^{3+}$  抑制作用最强，相对酶活仅为 34.5%； $Na^+$ 、 $K^+$  对酶活影响不大。

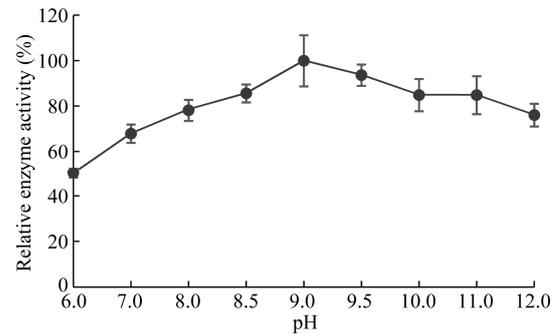


图 16 XC2 蛋白酶的最适反应 pH

Figure 16 The optimum pH for protease activities of strain XC2

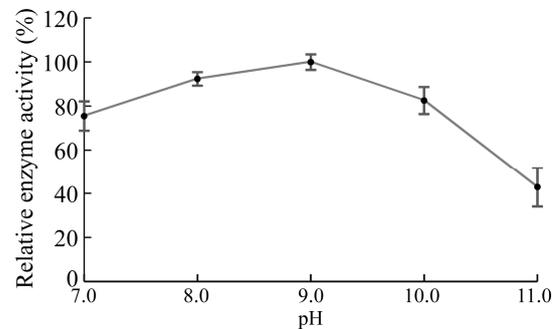


图 17 pH 对 XC2 蛋白酶稳定性的影响

Figure 17 The effect of pH values on stability of protease activity from strain XC2

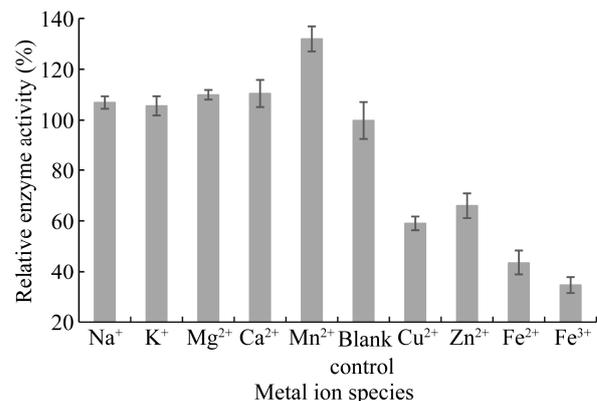


图 18 金属离子对 XC2 蛋白酶的影响

Figure 18 The effect of different metal ions on protease activity of strain XC2

## 3 讨论与结论

本研究从青藏高原土壤中筛选出一株高产蛋白酶菌株，命名为 XC2，初筛蛋白酶活力为 251.7 U/mL。对该菌株进行菌种鉴定(包括形态学

和分子生物学鉴定), 鉴定结果为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。枯草芽孢杆菌是一种应用广泛的益生菌, 具有对环境友好、对粮食安全、对人体及动植物无危害的优良特点<sup>[18]</sup>, 应用于畜牧业、酶制剂产业等领域<sup>[19]</sup>。枯草芽孢杆菌生产的蛋白酶、淀粉酶是工业酶中应用最为广泛的酶, 仅二者就占到了整个工业酶市场的 50%<sup>[20]</sup>。

对枯草芽孢杆菌 XC2 进行发酵条件优化及酶学性质研究的结果显示, 该菌株最优产蛋白酶条件为: 可溶性淀粉 4.0%, 牛肉膏 1.0%,  $K^+$  0.6%, 培养温度 34 °C、初始 pH 7.0、接种量 2.0%、转速 200 r/min。优化后该菌株产蛋白酶活力为 638.5 U/mL, 较优化前提高了 2.5 倍。该蛋白酶最适反应温度为 60 °C, 最适 pH 值为 9.0, 在 pH 8.0–10.0、40–50 °C 时酶活力稳定, 金属离子  $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  对酶活力有明显激活作用,  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  对酶活力有明显抑制作用, 其中  $Fe^{3+}$  抑制作用最强。

蛋白酶在工业用酶中占有很大比例, 约占酶总量的 65%。按反应最适 pH 分为中性蛋白酶、酸性蛋白酶和碱性蛋白酶<sup>[21-22]</sup>。碱性蛋白酶具有碱性条件下酶活不受影响和温度耐受范围较广等优点, 是全世界工业酶中用量最大的酶制剂之一<sup>[2]</sup>。

研究表明, 从独角莲中分离出产碱性蛋白酶的地衣芽孢杆菌 TG116, 该酶最适 pH 为 8.5, 最适反应温度为 50 °C, 有良好的温度和 pH 稳定性, EDTA 对酶活有强烈的抑制作用, 金属离子  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^+$ 、 $Co^{2+}$ 、 $K^+$  等对酶活具有一定的抑制作用<sup>[23]</sup>。从大豆及其发酵制品筛选出枯草芽孢杆菌枯草亚种 W1, 其可产生中性蛋白酶和碱性蛋白酶, 最佳培养条件为初始 pH 9.0、接种量 4.0%、35 °C 培养 48 h, 所产中性蛋白酶酶活为 40.39 U/mL, 碱性蛋白酶酶活力为 52.02 U/mL, 总蛋白酶酶活力为 92.41 U/mL<sup>[24]</sup>。来自裙带菜的产低温碱性蛋白酶菌株 *Bacillus* sp. QD-1 在以蔗糖为碳源、蛋白胨为氮源, 初始 pH 9.0、培养温度 25 °C、接种量 10% 的条件下 150 r/min 振荡培养

48 h, 所产蛋白酶活力最高达 995 U/mL; 该蛋白酶最适温度 20 °C, 最适 pH 9.0,  $Mn^{2+}$  对该酶有较强的激活作用,  $Zn^{2+}$ 、EDTA 和 PMSF 对该酶有抑制作用<sup>[25]</sup>。

本研究中枯草芽孢杆菌 XC2 产碱性蛋白酶能力较强, 所产蛋白酶有良好的 pH 稳定性和温度稳定性, 在洗涤剂、食品加工、皮革制造、纺织制造等工业上具有较好的应用前景, 可为工业应用提供科学依据。后续工作将会在此基础上对目标蛋白酶进行分离鉴定, 扩展菌株的应用方式。

## REFERENCES

- [1] Hu XZ, Wang J. Advances in protease production and its applications[J]. Industrial Microbiology, 2008, 38(4): 49-61 (in Chinese)  
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
- [2] Sharma KM, Kumar R, Panwar S, et al. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(1): 115-126
- [3] Rani K, Rana R, Datt S. Review on latest overview of proteases[J]. International Journal of Current Life Sciences, 2012, 2(1): 12-18
- [4] Liu G, Jiang N, Zhang AZ. Application and research progress of protease in broiler diet[J]. Feed Review, 2018(11): 11-12, 16 (in Chinese)  
刘干, 姜宁, 张爱忠. 蛋白酶的生物学意义及在肉鸡日粮中的应用研究进展[J]. 饲料博览, 2018(11): 11-12, 16
- [5] Xu S, Li RQ, Zheng ZH, et al. Properties of extracellular protease of microbe DH-2 from mangrove and optimization of enzyme producing conditions[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(6): 120-127 (in Chinese)  
徐珊, 李任强, 郑振华, 等. 红树林微生物 DH-2 胞外蛋白酶的性质及产酶条件优化[J]. 生物技术通报, 2018, 34(6): 120-127
- [6] Wan WJ, Xue ZJ, Zhang ZW, 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 (in Chinese)  
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
- [7] Xiao HQ, Lin QL, Li YZ, et al. Study advance of microbial alkaline protease[J]. China Food Additives, 2005(5): 60-64 (in Chinese)  
肖怀秋, 林亲录, 李玉珍, 等. 微生物碱性蛋白酶研究进

- 展[J]. 中国食品添加剂, 2005(5): 60-64
- [8] Xu JG, Tian CR, Hu QP, et al. Proteinase producing strains: screening and condition optimization[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(10): 112-115 (in Chinese)  
徐建国, 田呈瑞, 胡青平, 等. 高产蛋白酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(10): 112-115
- [9] Zhang R, Zeng RY. Isolation of a deep-sea strain that produces alkaline protease and studies on its fermentation condition[J]. Microbiology China, 2001, 28(4): 5-9 (in Chinese)  
张锐, 曾润颖. 极端微生物产碱性蛋白酶菌株的筛选及发酵条件研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(4): 5-9
- [10] Qin YM, Liu CM, Zheng X, et al. Recent application advance and prospect of neutral protease on food industry[J]. The Food Industry, 2017, 38(3): 210-213 (in Chinese)  
秦艳梅, 刘春卯, 郑翔, 等. 微生物中性蛋白酶在食品工业的最新进展及应用前景[J]. 食品工业, 2017, 38(3): 210-213
- [11] Wang K. Isolation of phytase-producing microbes in the soils of Tibetan Plateau and the phytase properties[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou Jiaotong University, 2016 (in Chinese)  
王凯. 青藏高原土壤中产植酸酶微生物的筛选及酶学特性研究[D]. 兰州: 兰州交通大学硕士学位论文, 2016
- [12] Zhao LM. Research progress on soil microbial diversity in Qinghai-Tibet Plateau[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(14): 6-12 (in Chinese)  
赵龙妹. 青藏高原土壤微生物多样性研究进展[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 6-12
- [13] Liu YX, Cao PX, Ma HM, et al. Research progress on soil microbial diversity and its influencing factors in Qinghai-Tibet Plateau[J]. Environmental Ecology, 2019, 1(6): 1-7 (in Chinese)  
刘怡萱, 曹鹏熙, 马红梅, 等. 青藏高原土壤微生物多样性及其影响因素研究进展[J]. 环境生态学, 2019, 1(6): 1-7
- [14] Xue K, Zhang B, Zhou ST, et al. Soil microbial communities in alpine grasslands on the Tibetan Plateau and their influencing factors[J]. Chinese Science Bulletin, 2019, 64(27): 2915-2927 (in Chinese)  
薛凯, 张彪, 周姝彤, 等. 青藏高原高寒草地土壤微生物群落及影响因子[J]. 科学通报, 2019, 64(27): 2915-2927
- [15] Zhao XQ, Zhou XM. Ecological basis of alpine meadow ecosystem management in Tibet: HaiBei alpine meadow ecosystem research station[J]. Ambio, 1999, 28(8): 642-647
- [16] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)  
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
- [17] Sun YH, Zhou KY, Xiong Z. Screening and identification of protease-producing bacterium from intestinal canal of *Dendrolimu* and liquid culture studies[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(14): 18-21 (in Chinese)  
孙佑赫, 周开艳, 熊智. 松毛虫肠道产蛋白酶菌株的筛选鉴定及培养条件研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(16): 18-21
- [18] Yan Y, Liu YJ, Chen F. An overview of the application research of *Bacillus subtilis*[J]. Biology Teaching, 2019, 44(2): 2-3 (in Chinese)  
闫杨, 刘月静, 陈芳. 枯草芽孢杆菌的应用现状概述[J]. 生物学教学, 2019, 44(2): 2-3
- [19] Zhu XL, Yu WW. Study on optimization of spore production in fermentation medium about *Bacillus subtilis* B53[J]. Chemical Engineering Design Communications, 2016, 42(6): 105-106 (in Chinese)  
朱晓立, 俞巍巍. 枯草芽孢杆菌产芽孢发酵培养基的优化研究[J]. 化工设计通讯, 2016, 42(6): 105-106
- [20] Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(1): 1-17
- [21] Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 597-635
- [22] Deng JY. Research progress in microbial alkaline protease[J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(3): 293-296 (in Chinese)  
邓菊云. 微生物碱性蛋白酶研究进展[J]. 现代食品科技, 2008, 24(3): 293-296
- [23] Ling LJ, Jiao ZL, Wang JY, et al. Production and characterization of extracellular protease from biocontrol strain *Bacillus licheniformis* TG116[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2559-2568 (in Chinese)  
令利军, 焦正龙, 王军英, 等. 地衣芽孢杆菌 TG116 胞外蛋白酶产酶条件与酶学性质[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2559-2568
- [24] Liu XY, Feng J, Han A, et al. Isolation and optimization of *Bacillus subtilis* W1 strain with high neutral/alkaline protease activity[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 157-163 (in Chinese)  
刘晓艳, 封健, 韩傲, 等. 高产中/碱性蛋白酶的枯草芽孢杆菌 W1 菌株的筛选及条件优化[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 157-163
- [25] Wang FW, Duan SJ, Tong LJ, et al. Identification of producing low-temperature alkaline protease strains from *Undaria pinnatifida* and fermentation conditions and enzymatic properties[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(2): 85-91 (in Chinese)  
王凤舞, 段书娟, 仝令君, 等. 产低温碱性蛋白酶菌株 QD-1 的鉴定及产酶条件和酶学性质[J]. 中国食品学报, 2017, 17(2): 85-91