

一株地衣芽胞杆菌产碱性蛋白酶条件优化

周魏¹, 曾嵩玉¹, 余金凤¹, 向军¹, 马忠仁¹, 丁功涛¹, 周雪雁^{*1,2}, 张福梅^{*1}

1 西北民族大学生物医学研究中心, 甘肃 兰州 730030

2 西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730124

周魏, 曾嵩玉, 余金凤, 向军, 马忠仁, 丁功涛, 周雪雁, 张福梅. 一株地衣芽胞杆菌产碱性蛋白酶条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2753-2766

Zhou Wei, Zeng Songyu, Yu Jinfeng, Xiang Jun, Ma Zhongren, Ding Gongtao, Zhou Xueyan, Zhang Fumei. Optimization of alkaline protease production by a strain of *Bacillus licheniformis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2753-2766

摘要:【背景】碱性蛋白酶是众多芽胞杆菌的发酵产物, 是工业上极其重要的一类酶。【目的】利用酪素培养基从环境样品中筛选出一株产碱性蛋白酶的菌株, 对传代次数、发酵的碳源、氮源、金属离子、磷酸盐、初始 pH、接种量和温度进行优化, 提高其产碱性蛋白酶的能力并降低发酵成本。【方法】采用革兰氏染色法、扫描电镜、生理生化试验、16S rRNA 基因序列对分离的菌株进行鉴定; 采用单因素、Plackett-Burman、最陡爬坡和响应面试验优化碱性蛋白酶的发酵条件, 使用 Minitab 对试验数据进行分析。【结果】经鉴定分离菌株为地衣芽胞杆菌, 命名为 *Bacillus licheniformis* NWMCC0046。优化后的发酵培养基组成为(g/L): 豆粕 50.00, 葡萄糖 10.00, 酵母浸膏 13.46, CaCl₂ 0.50, Na₂HPO₄·12H₂O 4.00, KH₂PO₄ 0.30; 优化后的培养条件为: pH 7.5, 34.81 °C, 接种量 4.13%。在此条件下, 摇瓶发酵 48 h 时碱性蛋白酶活性达到 165.41 U/mL, 较优化前提高了 8.04 倍。【结论】通过发酵培养基组成和条件优化有效提高了地衣芽胞杆菌产碱性蛋白酶的能力, 为碱性蛋白酶的后续研究提供了参考。

关键词: 地衣芽胞杆菌; 碱性蛋白酶; Plackett-Burman 设计; 最陡爬坡试验; 响应面法

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目(31920210126); 甘肃省自然科学基金(21JR1RA197); 甘肃省科技厅“科技助力经济 2020”重点专项(SQ2020YFF0405583); 甘肃省教育厅优秀研究生创新之星项目(2021CXZX-682)

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (31920210126); Natural Science Foundation of Gansu Province (21JR1RA197); Science and Technology Department “Science and Technology for Economic 2020” Key Special Project of Gansu Province (SQ2020YFF0405583); Education Department Excellent Postgraduate Innovation Star Project of Gansu Province (2021CXZX-682)

*Corresponding authors: E-mail: ZHOU Xueyan: zhouxueyan2005@xbmu.edu.cn; ZHANG Fumei: zhangfumei1978@163.com

Received: 2021-11-23; Accepted: 2022-02-02; Published online: 2022-03-28

Optimization of alkaline protease production by a strain of *Bacillus licheniformis*

ZHOU Wei¹, ZENG Songyu¹, YU Jinfeng¹, XIANG Jun¹, MA Zhongren¹, DING Gongtao¹, ZHOU Xueyan^{*1,2}, ZHANG Fumei^{*1}

1 Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

2 Life Science and Engineering College, Northwest Minzu University, Lanzhou 730124, Gansu, China

Abstract: [Background] Alkaline protease, a fermentation product of many *Bacillus* species, is an important enzyme in industry. [Objective] An alkaline protease-producing strain was isolated by casein medium from an environmental sample. The passage number, carbon source, nitrogen source, metal ions, phosphate, initial pH, inoculum amount and temperature of the fermentation were optimized to increase the alkaline protease production of the strain and to reduce the cost of fermentation. [Methods] The isolates were identified via Gram staining, scanning electron microscopy, physiological and biochemical tests, and 16S rRNA sequence analysis. The fermentation conditions were optimized by single factor test, Plackett-Burman experiment, the steepest ascent method, and response surface methodology. The experimental data were analyzed in Minitab. [Results] The strain was identified as *B. licheniformis* and named *B. licheniformis* NWMCC0046. The optimized formula of the fermentation medium was determined as soybean meal 50.00 g/L, glucose 10.00 g/L, yeast extract 13.46 g/L, CaCl₂ 0.50 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 4.00 g/L, and KH₂PO₄ 0.30 g/L. The fermentation conditions were optimized as pH 7.5, 34.81 °C and the inoculum amount of 4.13%. Under these conditions, the alkaline protease activity reached 165.41 U/mL in 48 h of shake flask fermentation, which was 8.04 times higher than that before optimization. [Conclusion] The optimization of the medium formula and fermentation conditions improved the ability of *B. licheniformis* to produce alkaline protease, providing a reference for subsequent research on alkaline protease.

Keywords: *Bacillus licheniformis*; alkaline protease; Plackett-Burman design; the steepest ascent method; response surface methodology

蛋白酶约占工业酶的 65%，碱性蛋白酶具有在碱性条件下催化效率高和稳定性好等优点，是世界上蛋白酶中用量最多的一类^[1-2]。这些碱性蛋白酶在洗涤剂^[3-5]、制革^[6]和废物处理^[7-9]等行业得到广泛应用。微生物所产的碱性蛋白酶具有生产成本低、耗时少、产量高、效益高、稳定性好和专一性好的特点，已成为工业酶的主要来源。

地衣芽胞杆菌是一种应用广泛的益生菌，

能产生多种活性物质，比如脂肪酶、淀粉酶和蛋白酶。地衣芽胞杆菌生产的碱性蛋白酶是工业酶中应用最广泛的酶。培养基的组成和培养条件直接影响蛋白酶的产量，目前已有大量研究利用响应面法优化地衣芽胞杆菌产碱性蛋白酶的能力，如：Mirzapour 等^[8]采用响应面法优化地衣芽胞杆菌 PTCC 1595 碱性蛋白酶活力，发酵 72 h 可达 283.70 U/mL；Bhunja 等^[10]通过响应面法优化产酶条件使地衣芽胞杆菌 NCIM

2042 碱性蛋白酶活力达到 315.28 U/mL; Haddar 等^[11]通过响应面法优化地衣芽胞杆菌 RP1 的产酶能力, 酶活由 233 U/mL 提高到 1 400 U/mL。然而以往工作只涉及一种氮源对产酶的影响, 忽略了地衣芽胞杆菌对于氮源的依赖性, 而且设计的影响因素过于单一^[12]; 最陡爬坡试验初始值及步长也因试验条件而定, 优化效果无法达到最佳^[13]。

本研究通过较为全面的单因素试验、Plackett-Burman 设计、最陡爬坡试验和响应面设计相结合的方法对从屠宰场废弃血污放置土壤中筛选的地衣芽胞杆菌的产酶条件进行优化, 以期为后续碱性蛋白酶的开发应用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品

试验样品采集于西藏某屠宰场废弃血污放置土壤(经纬度: 89°60'92.18"E, 28°91'00.74"N, 海拔 4 000 m 左右)。

1.1.2 培养基

酪素培养基(g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0, NaCl 5.0, 干酪素 10.0, 牛肉浸粉 3.0, 琼脂 20.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

初始发酵培养基(g/L): 豆粕 40.0, 玉米粉 30.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.0, KH_2PO_4 0.3, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

干酪素, 上海阿拉丁公司; 福林酚和豆粕, 北京索莱宝科技有限公司; 葡萄糖、碳酸钠和三氯乙酸等均为国产分析纯。紫外分光光度计, 赛默飞公司; 便携式 pH 计, 上海梅特勒-托利多有限公司。

1.2 方法

1.2.1 产蛋白酶菌株的分离鉴定

用无菌离心管将土壤样品进行梯度稀释并涂布于干酪素平板, 37 °C 恒温培养 48 h, 挑取透明水解圈最大的菌落进一步纯化后甘油冻存。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[14]对分离菌株的菌体细胞及菌落形态特征、培养特性、糖利用能力、触酶等生理生化反应进行菌种鉴定。菌株基因组 DNA 提取及 16S rRNA 基因序列分析参照周雪雁等^[7]所述方法。

1.2.2 蛋白酶活力测定方法

取保存于-80 °C 的甘油菌接种于 50 mL LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 8-10 h 活化菌体细胞。250 mL 锥形瓶装 50 mL LB 培养基, 将一级种子液按 2% (体积分数)接种量接入 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 8-10 h。250 mL 锥形瓶装 50 mL 发酵培养基, 将二级种子液按 5% (体积分数)接种量转接至发酵培养基中, 37 °C、180 r/min 摇瓶发酵培养 48 h, 测定发酵液酶活力。

采用 Folin-酚法测定蛋白酶活力^[7]。以每毫升样品在 40 °C、pH 11.0 条件下每分钟水解酪蛋白产生的酪氨酸质量(μg)来表示碱性蛋白酶活力单位(U)。

1.2.3 单因素试验

(1) 培养基优化

分别对产酶培养基种子液传代次数、碳源、氮源、金属离子和磷酸盐进行优化, 其他产酶参数参照 1.1.2, 按照 1.2.2 测定发酵液酶活力。

(2) 培养条件优化

对产酶初始 pH、温度和接种量进行优化, 其他产酶参数参照 1.1.2, 按照 1.2.2 测定发酵液酶活力。

1.2.4 响应面试验

(1) Plackett-Burman 试验设计

以蛋白酶活力(Y)为响应值, 将上述 8 个

单因素利用 Minitab 软件进行 $n=12$ 的 Plackett-Burman (PB) 试验设计。PB 试验设计的各因素与水平如表 1 所示。

(2) 最陡爬坡实验

根据 Plackett-Burman 试验结果, 根据各因素相关系数设计显著影响因子合适的步长和爬坡方向, 其他因子为最佳值, 以获得响应面试验的中心点。

(3) 中心复合试验

采用中心复合试验 (central composite design, CCD) 对酵母浸膏(A)、温度(B)和接种量(C)进行优化, 试验方案中的各因素和水平如表 2 所示。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素及水平

Table 1 Plackett-Burman experiment design factors and levels

Factor	Level	
	Low (-1)	High (+1)
A: Glucose (g/L)	5.0	20.0
B: Soybean meal (g/L)	45.0	55.0
C: Yeast extract (g/L)	1.0	10.0
D: CaCl ₂ (g/L)	0.3	1.0
E: Phosphate (g/L)	0.0	2.5
F: pH	7.5	9.0
G: Inoculum amount (%)	3.0	5.0
H: Temperature (°C)	33.0	37.0
X ₁	-1	+1
X ₂	-1	+1
X ₃	-1	+1

表 2 中心复合试验因素与水平

Table 2 Central composite experiments factors and levels

Factor	Level				
	-2	-1	0	+1	+2
A: Yeast extract (g/L)	2.6	6.0	11.0	16.0	19.4
B: Temperature (°C)	33.4	34.2	35.4	36.6	37.4
C: Inoculum amount (%)	3.5	3.8	4.2	4.6	4.9

2 结果与分析

2.1 产蛋白酶菌株的分离与鉴定

2.1.1 形态学鉴定

用酪素培养基初筛到一株透明圈极其明显的菌株, 其透明圈直径(D)与菌落直径(d)比值分别达到 14.6 (结果未展示), 表明该菌株具有较高的蛋白酶生产能力, 该菌株命名为 NWMCC0046。菌株 NWMCC0046 在酪素培养基上菌落呈灰白色, 扁平, 表面湿润有褶皱, 具黏性(图 1A)。经革兰氏染色, 菌株 NWMCC0046 为杆状菌, 菌体细胞呈蓝紫色, 鉴定为革兰氏阳性菌(100 \times , 图 1B)。电镜观察显示, 该菌菌体呈杆状, 大小为(0.2–0.4) $\mu\text{m} \times$ (1.0–1.5) μm (图 1C)。

2.1.2 生理生化特征

菌株 NWMCC0046 不发酵乳糖, V-P 试验阳性, 能利用枸橼酸盐, 水解淀粉, 同时可产生 DNA 酶, 还原硝酸盐, 但不产硫化氢。能利用葡萄糖、木糖醇、淀粉和明胶等多种碳源, 对氮源的利用能力及蛋白质代谢能力较相同分离基质的其他菌株更强。对阿莫西林、头孢西丁、环丙沙星、阿米卡星及氯霉素敏感, 而对头孢他啶和红霉素固有耐药。

2.1.3 16S rRNA 基因序列分析

将得到的 16S rRNA 基因序列(1 372 bp)与 NCBI 已提交的序列进行比对。其结果显示 NWMCC0046 与 *Bacillus licheniformis* DSM 13 的序列相似性为 99.85%, 与 *Bacillus licheniformis* BCRC 11702 的序列相似性为 99.23%。将分离菌株的 16S rRNA 基因序列和 BLAST 结果中的序列进行比对并构建系统发育树(图 2)。NWMCC0046 与地衣芽胞杆菌位于同一个分支上, 相似性高达 99%以上, 具有较近的遗传距离, 鉴定为地衣芽胞杆菌。

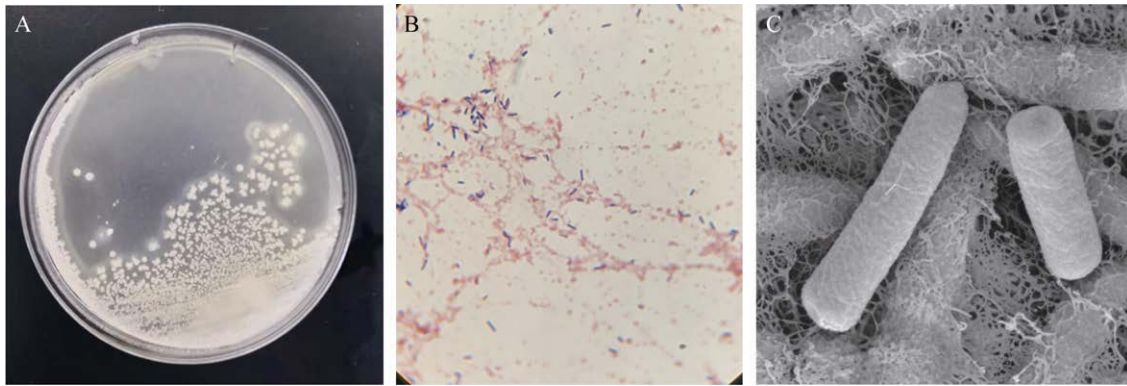


图 1 菌株 NWMCC0046 形态学鉴定结果 A: 菌落形态; B: 革兰氏染色结果; C: 扫描电镜结果

Figure 1 Morphological identification results of strain NWMCC0046. A: Colony morphology; B: Gram staining results; C: Scanning electron microscopy results.

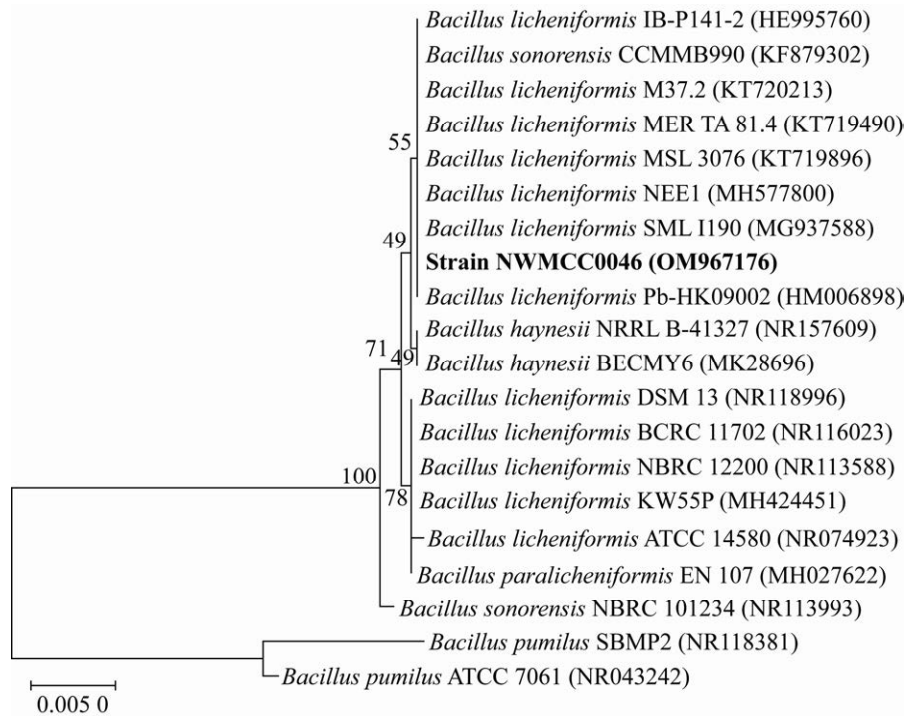


图 2 基于 16S rRNA 基因序列建立的 NWMCC0046 菌株系统发育树 菌株的 GenBank 登录号用括号内的序号表示; 分支结点处的数字表示可信度; 标尺的数据 0.005 0 代表进化距离; 黑体编号代表本次实验分离得到菌株序列; *B. pumilus* ATCC 7061 (NR043242)和 *B. pumilus* SBMP2 (NR118381)是外类群

Figure 2 Phylogenetic tree of strain NWMCC0046 based on 16S rRNA sequence. The GenBank accession number of the strain is indicated by the serial number in brackets; The number at the branch node indicates the credibility; the scale data 0.005 0 represents the evolutionary distance; The bold numbers represented the cultures isolated in this study; *B. pumilus* ATCC 7061 (NR043242) and *B. pumilus* SBMP2 (NR118381) are outgroup.

2.2 单因素试验结果

2.2.1 传代次数对产酶的影响

多次传代可能会引起菌种的退化,使菌种的繁殖力降低、产酶能力降低甚至丧失的现象^[15]。当传代2次后,NWMCC0046碱性蛋白酶活力达到49.17 U/mL(图3A)。因此试验接种产酶培养基的菌液均选择传代2次的种子液。

2.2.2 最佳碳源的确定

选用7种碳源进行培养基碳源优化,当碳源为葡萄糖时,NWMCC0046碱性蛋白酶活力最高,麦芽糖和蔗糖次之,玉米粉最低(图3B)。当选择浓度为10 g/L的葡萄糖时酶活最高,达到76.58 U/mL(图3C)。这与产碱性蛋白酶菌株*Bacillus licheniformis* N-2的研究结果^[16]一致。葡萄糖含量太低导致营养不足,影响菌生长代谢;而葡萄糖含量太高导致渗透压增大,影响菌株的生长和产酶^[17]。因此,选择10 g/L的葡萄糖作为后续优化的碳源。

2.2.3 最佳氮源的确定

选用8种氮源进行优化,有机氮源作为唯一氮源对NWMCC0046产碱性蛋白酶的促进效果显著优于无机氮源。以豆粕为氮源时,碱性蛋白酶活力最高(图3D)。当培养基中豆粕质量浓度为50 g/L时,酶活力达81.17 U/mL,继续提高豆粕质量浓度,碱性蛋白酶活力呈下降趋势(图3E)。由于不同来源的氮源对菌体生长和产酶促进作用不同,复合氮源能进一步促进菌株产蛋白酶^[18],因此向发酵培养基中添加第二氮源,探究其对本菌株产碱性蛋白酶的影响。补充氮源能显著促进本菌产碱性蛋白酶,添加酵母浸膏促进产酶的效果最好(图3F)。当培养基中酵母浸膏浓度为10 g/L时,碱性蛋白酶活力达到90.22 U/mL(图3G)。

2.2.4 最佳金属离子的确定

金属离子可稳定目的产物,促进菌体细胞

的代谢。添加 Ca^{2+} 时对该菌产碱性蛋白酶的促进效果最好(图3H)。当培养基中 CaCl_2 浓度为0.5 g/L时促进效果最好,碱性蛋白酶活力为75.21 U/mL(图3I)。因此,选择浓度为0.5 g/L的 CaCl_2 为发酵培养基提供金属离子。

2.2.5 最佳磷酸盐浓度的确定

磷酸盐为菌株提供足够的磷元素,并调节培养基pH值。固定 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 与 KH_2PO_4 质量比为13:1,高浓度磷酸盐对产酶抑制较明显,磷酸盐浓度为1.27 g/L时,碱性蛋白酶活力为76.48 U/mL;磷酸盐浓度进一步提升会导致酶活力下降。当磷酸盐浓度达到7.5 g/L时,酶活力无明显变化(图3J),确定产酶最佳磷酸盐浓度为1.27 g/L。即 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 浓度为4 g/L、 KH_2PO_4 浓度为0.3 g/L。

2.2.6 最佳初始pH的确定

pH可以改变培养基成分的离子化程度,影响菌株的代谢过程。培养基初始pH 7.5时,碱性蛋白酶活力达76.00 U/mL;初始pH<7.0时对酶活抑制较大;初始pH>8.0时,碱性蛋白酶活力降低并呈现稳定水平,与酸性环境相比,菌株对碱性环境的耐受性较强(图4A)。

2.2.7 最佳接种量的确定

适宜的接种量可以有效提高发酵速度,接种量太小会造成微生物生长缓慢,接种量太大则会导致菌株产蛋白酶效率下降。当接种量为1%~4%(体积分数)时,碱性蛋白酶活力随着接种量的增加而增加,接种量为4%时酶活力为84.01 U/mL(图4B)。

2.2.8 最佳产酶温度的确定

细胞中的糖类、脂质和蛋白质等营养物质都需要酶在合适的温度下进行催化分解,因此温度对菌株代谢过程有重要影响^[19]。随着温度升高,碱性蛋白酶活力先升高后降低,35℃时酶活力达84.07 U/mL(图4C)。

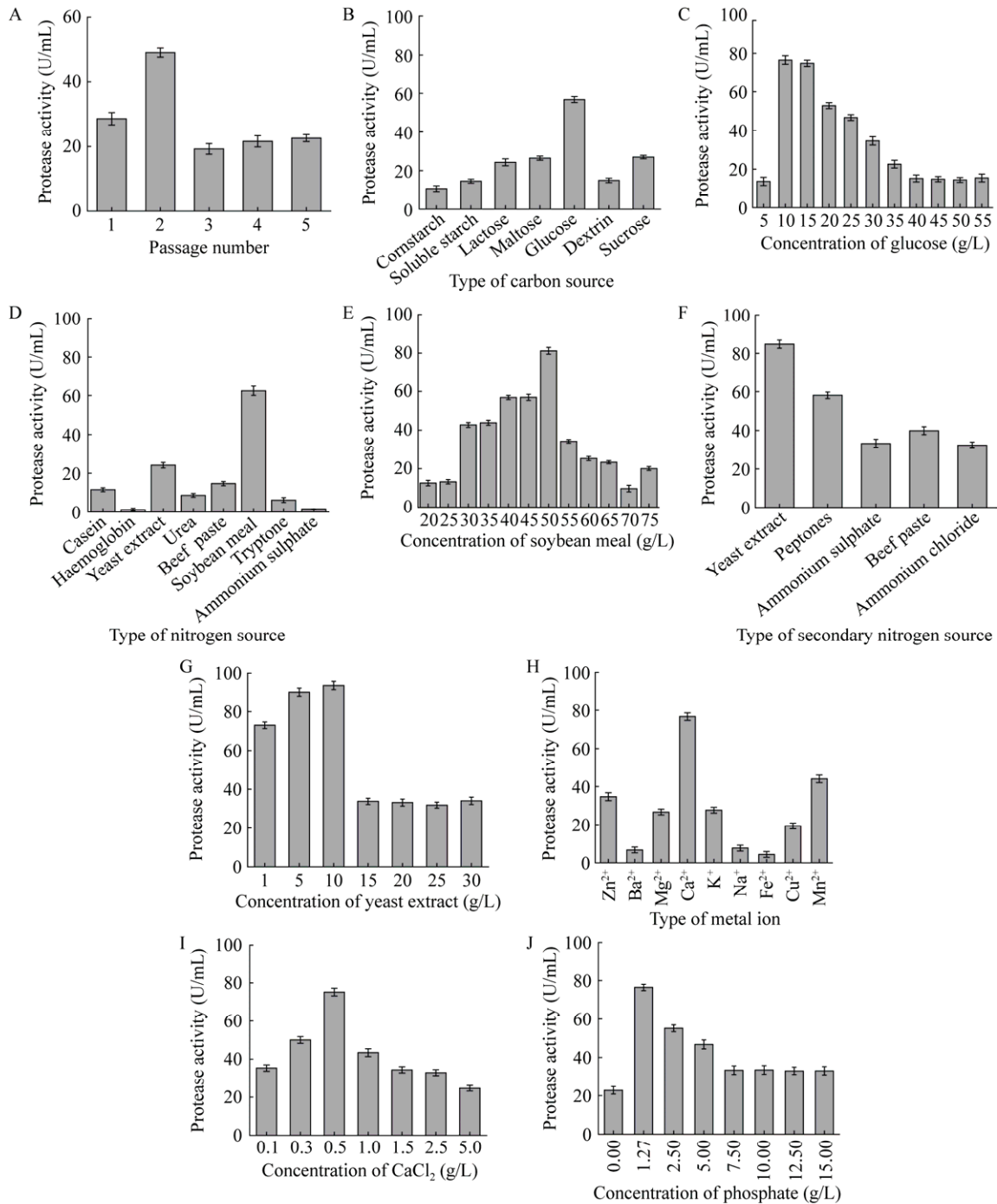


图 3 培养基成分对菌株 NWMCC0046 产碱性蛋白酶的影响 A: 传代次数; B: 碳源种类; C: 葡萄糖浓度; D: 氮源种类; E: 豆粕浓度; F: 第二氮源种类; G: 酵母浸膏浓度; H: 金属离子; I: CaCl₂ 浓度; J: 磷酸盐浓度

Figure 3 Effects of medium composition on the alkaline protease production of strain NWMCC0046. A: Passage number; B: Type of carbon source; C: Concentration of glucose; D: Type of nitrogen source; E: Concentration of soybean meal; F: Type of secondary nitrogen source; G: Concentration of yeast extract; H: Type of metal ion; I: Concentration of CaCl₂; J: Concentration of phosphate.

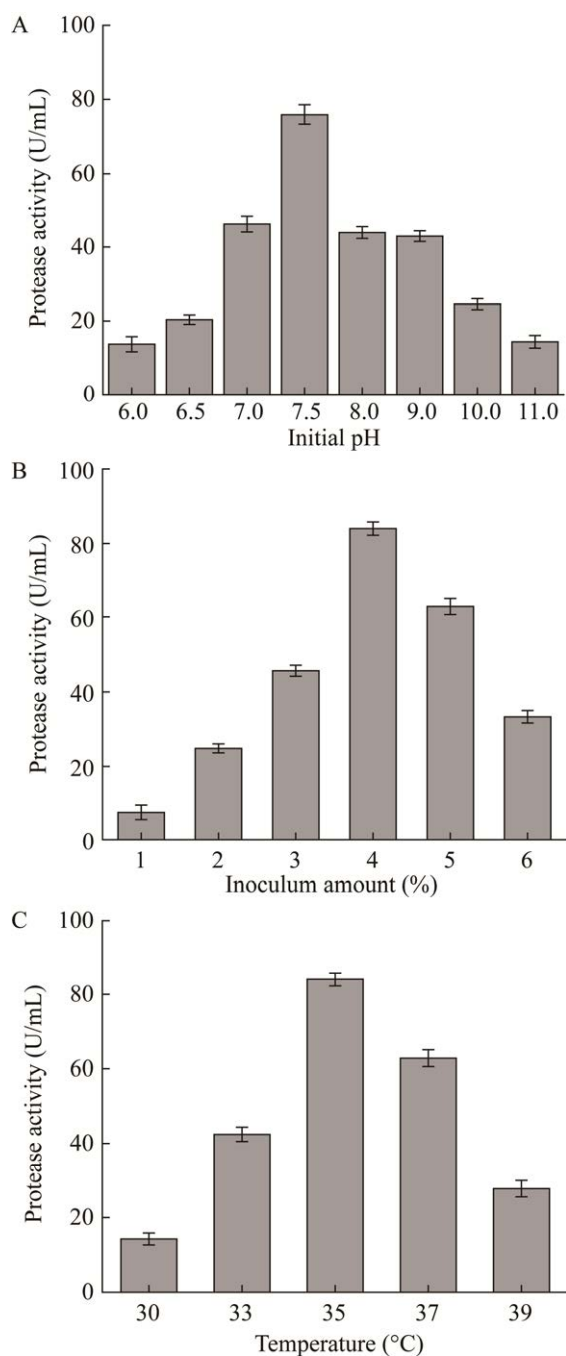


图4 培养条件对菌株 NWMCC0046 产碱性蛋白酶的影响 A: 初始 pH; B: 接种量; C: 温度

Figure 4 Effects of culture conditions on the alkaline protease production of strain NWMCC0046. A: Initial pH; B: Inoculum amount; C: Temperature.

2.3 响应面试验

2.3.1 Plackett-Burman 试验设计结果

用 Minitab 软件设计 Plackett-Burman ($n=12$) 试验对单因素试验中的 8 个因素进行显著性考察(表 3)。酵母浸膏、温度和接种量在进行 F 检验后, $P<0.01$, 选取以上 3 个极显著因素进行下一步优化试验(表 4)。

2.3.2 最陡爬坡试验结果

在其他因素不变的前提下, 当酵母浸膏为 11.00 g/L、温度为 35.40 °C、接种量为 4.20%时, 碱性蛋白酶活力达 152.63 U/mL, 以此条件作为中心复合试验的中心值(表 5)。

2.3.3 中心复合试验设计与结果分析

将酵母浸膏、温度、接种量作为变量, 以蛋白酶活力(Y)为响应值, 进行响应面设计(表 6)。利用 Minitab 软件对试验结果进行分析, 得到回归方程为:

$$Y = -5128 + 35.43A + 317.4B - 227C - 0.5405A^2 - 6.15B^2 - 77.7C^2 - 5.06AC + 26.86BC$$

模型中除了 AB 影响不显著之外, 其余对 Y 值影响极显著(表 7)。接种量与温度、酵母浸膏的等高线较陡, 说明两者交互作用对酶活影响极显著, 而酵母浸膏与温度之间几乎无交互作用(图 5)。模型 $F=26.09$, $P<0.0001$, $R^2=0.9592$, $R^2_{adj}=0.9224$, 说明模型的可信度较高, 可以用于实际碱性蛋白酶生产的预测与分析。

2.3.4 模型预测与验证试验

利用 Minitab 软件预测得到发酵培养基最佳工艺参数为: 酵母浸膏浓度为 13.46 g/L, 温度 34.81 °C, 接种量为 4.13%, 这些条件下理论最高酶活可达到 166.37 U/mL。利用上述试验条件进行 6 次平行验证, 测得蛋白酶平均酶活为 (166.37 ± 1.13) U/mL(图 6)。实际值与预测值较为接近, 说明响应面法优化能较好地预测地衣芽胞杆菌 NWMCC0046 产碱性蛋白酶的实际情况。

表 3 Plackett-Burman 试验结果
Table 3 Results of Plackett-Burman design

Glucose (g/L)	Soybean meal (g/L)	Yeast extract (g/L)	CaCl ₂ (g/L)	Phosphate (g/L)	Initial pH	Inoculum amount (%)	Temperature (°C)	X ₁	X ₂	X ₃	Protease activity (U/mL)
20.00	45.00	10.00	0.30	0.00	7.50	5.00	37.00	+1	-1	+1	67.86±0.13
20.00	55.00	1.00	1.00	0.00	7.50	3.00	37.00	+1	+1	-1	74.49±0.35
5.00	55.00	10.00	0.30	2.50	7.50	3.00	33.00	+1	+1	+1	53.98±0.41
20.00	45.00	10.00	1.00	0.00	9.00	3.00	33.00	-1	+1	+1	80.83±0.19
20.00	55.00	1.00	1.00	2.50	7.50	5.00	33.00	-1	-1	+1	3.02±0.01
20.00	55.00	10.00	0.30	2.50	9.00	3.00	37.00	-1	-1	-1	131.19±0.11
5.00	55.00	10.00	1.00	0.00	9.00	5.00	33.00	+1	-1	-1	77.21±0.28
5.00	45.00	10.00	1.00	2.50	7.50	5.00	37.00	-1	+1	-1	82.64±0.41
5.00	45.00	1.00	1.00	2.50	9.00	3.00	37.00	+1	-1	+1	43.13±0.15
20.00	45.00	1.00	0.30	2.50	9.00	5.00	33.00	+1	+1	-1	24.13±0.17
5.00	55.00	1.00	0.30	0.00	9.00	5.00	37.00	-1	+1	+1	18.82±0.13
5.00	45.00	1.00	0.30	0.00	7.50	3.00	33.00	-1	-1	-1	3.5±0.03
10.00	50.00	5.00	0.50	1.27	8.00	4.00	35.00	0	0	0	143.01±0.27
10.00	50.00	5.00	0.50	1.27	8.00	4.00	35.00	0	0	0	140.87±0.18
10.00	50.00	5.00	0.50	1.27	8.00	4.00	35.00	0	0	0	146.85±0.21

表 4 Plackett-Burman 试验方差分析

Table 4 The variance of the Plackett-Burman design

Source	df	Sum of squares	Mean square	F value	P value
Model	12	34 834.3	2 902.9	316.18	0.003
Linear	11	16 032.6	1 457.5	158.75	0.006
A: Glucose	1	871.1	871.1	94.88	0.01
B: Soybean meal	1	267.2	267.2	29.1	0.033
C: Yeast extract	1	8 890.1	8 890.1	968.32	0.001
D: CaCl ₂	1	318.7	318.7	34.71	0.028
E: Phosphate	1	19.7	19.7	2.15	0.28
F: Initial pH	1	672.3	672.3	73.23	0.013
G: Inoculum amount	1	1 072.4	1 072.4	116.81	0.008
H: Temperature	1	2 565.5	2 565.5	279.44	0.004
X ₁	1	36.1	36.1	3.93	0.186
X ₂	1	6.7	6.7	0.73	0.482
X ₃	1	1 312.9	1 312.9	143.01	0.007
Error	2	18.4	9.2		
Total	14	34 852.6			

表 5 最陡爬坡试验结果

Table 5 The steepest ascent method results

Run	Yeast extract (g/L)	Temperature (°C)	Inoculum amount (%)	Protease activity (U/mL)
1	1.00	33.00	5.00	76.98±0.21
2	6.00	34.20	4.60	134.87±0.11
3	11.00	35.40	4.20	152.63±0.09
4	16.00	36.60	3.80	122.35±0.26
5	21.00	37.80	3.40	118.58±0.18
6	26.00	39.00	3.00	106.95±0.05
7	31.00	40.20	2.60	91.65±0.11

3 讨论与结论

本研究从西藏土壤中筛选出一株产碱性蛋白酶菌株,命名为 NWMCC0046。对该菌株进行形态学鉴定和分子生物学鉴定,鉴定结果为地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)。对地衣芽胞杆菌 NWMCC0046 产酶条件进行优化,优化后的

表 6 中心复合试验结果

Table 6 Results of central composite experiments

Standard	Run	A: Yeast extract (g/L)	B: Temperature (°C)	C: Inoculum amount (%)	Y: Protease activity (U/mL)
16	1	11.00	35.40	4.20	149.63±0.01
17	2	11.00	35.40	4.20	153.42±0.13
18	3	11.00	35.40	4.20	160.86±0.09
13	4	11.00	35.40	3.53	107.33±0.16
8	5	16.00	36.60	4.60	134.62±0.23
19	6	11.00	35.40	4.20	166.37±0.07
14	7	11.00	35.40	4.87	131.15±0.16
2	8	16.00	34.20	3.80	166.01±0.35
6	9	16.00	34.20	4.60	134.42±0.27
9	10	2.59	35.40	4.20	100.36±0.19
12	11	11.00	37.42	4.20	120.68±0.17
10	12	19.41	35.40	4.20	131.99±0.25
7	13	6.00	36.60	4.60	140.03±0.13
3	14	6.00	36.60	3.80	79.54±0.05
1	15	6.00	34.20	3.80	114.96±0.17
4	16	16.00	36.60	3.80	119.86±0.21
15	17	11.00	35.40	4.20	164.69±0.04
11	18	11.00	33.38	4.20	137.99±0.31
5	19	6.00	34.20	4.60	118.65±0.27
20	20	11.00	35.40	4.20	155.25±0.16

表 7 中心复合试验方差分析

Table 7 The variance of the central composite experiments

Source	<i>df</i>	Sum of squares	Mean square	<i>F</i> value	<i>P</i> value	Significant
Model	9	10 219.8	1 135.54	26.09	0.000	**
Linear	3	2 898.3	966.10	22.20	0.000	**
<i>A</i>	1	1 757.5	1 757.49	40.38	0.000	**
<i>B</i>	1	581.3	581.33	13.36	0.004	**
<i>C</i>	1	559.5	559.47	12.85	0.005	**
Square	3	5 044.0	1 681.32	38.63	0.000	**
<i>A</i> ²	1	2 631.5	2 631.48	60.46	0.000	**
<i>B</i> ²	1	1 131.3	1 131.31	25.99	0.000	**
<i>C</i> ²	1	2 226.3	2 226.35	51.15	0.000	**
Two-factor interaction	3	2 277.6	759.20	17.44	0.000	**
<i>AB</i>	1	127.3	127.28	2.92	0.118	Not significant
<i>AC</i>	1	820.3	820.33	18.85	0.001	**
<i>BC</i>	1	1 330.0	1 329.99	30.56	0.000	**
Residual	10	435.2	43.52			
Lack of fit	5	214.5	42.89	0.97	0.512	Not significant
Pure error	5	220.8	44.15			
Total	19	10 655.1				

注: **: 影响极显著, $P < 0.01$

Note: **: Highly significant effect, $P < 0.01$.

发酵培养基为: 豆粕 50 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 酵母浸膏 13.46 g/L, CaCl_2 0.5 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4 g/L, KH_2PO_4 0.3 g/L; 优化后的培养 pH 值为 7.5、温度为 34.81 °C、接种量为 4.13%。在此条件下, 摇瓶发酵 48 h 碱性蛋白酶活力达到 165.41 U/mL, 较优化前提高了 8.04 倍。此外, 试验值和预测值之间的高度相似反映了所采用的实验设计的准确性和有效性。

国内外对地衣芽胞杆菌发酵产碱性蛋白酶的优化主要集中在碳源与氮源, 而培养基其他成分的研究相对较少^[20-21]。氮源对于地衣芽胞杆菌极为重要^[22], 豆粕含有种类繁多的蛋白质、无机盐、维生素和促生长因子, 比其他氮源更有营养, 更能促进蛋白酶的产生, 本研究产酶所需豆粕高于以往报道^[20,23]。酵母浸膏作为第二氮源能提高菌株的生长速率及蛋白酶得率,

这在地衣芽胞杆菌产酶优化试验中鲜见。碱性蛋白酶研究集中在高产菌株的筛选上, 却忽略了在发酵过程中菌种传代次数带来的问题^[11]。本研究表明连续传代 2 次后菌种会发生退化, 蛋白酶活力与种子液传代次数显著相关, 传代次数过多会使菌种的繁殖力及产酶能力降低。与 Haddar 等^[11]和王颖等^[24]的研究结果一致, 高浓度的磷酸盐减弱了菌株的产酶能力, 这是因为高浓度的磷酸盐浓度抑制了蛋白酶合成途径中某种酶的活性。弱酸性环境中, 各种金属很容易引起不良的氧化还原反应, 导致细胞死亡, 从而降低蛋白酶的产量^[25]。研究发现, 地衣芽胞杆菌产酶最适 pH 值普遍在 7.0-9.0 之间^[20,26], 极少数的芽胞杆菌在强碱性条件下产酶^[27], 筛选菌最适 pH 与刘海进等^[28]的研究结果相似, 均在 pH 值为 7.5 时有最大酶活力。与

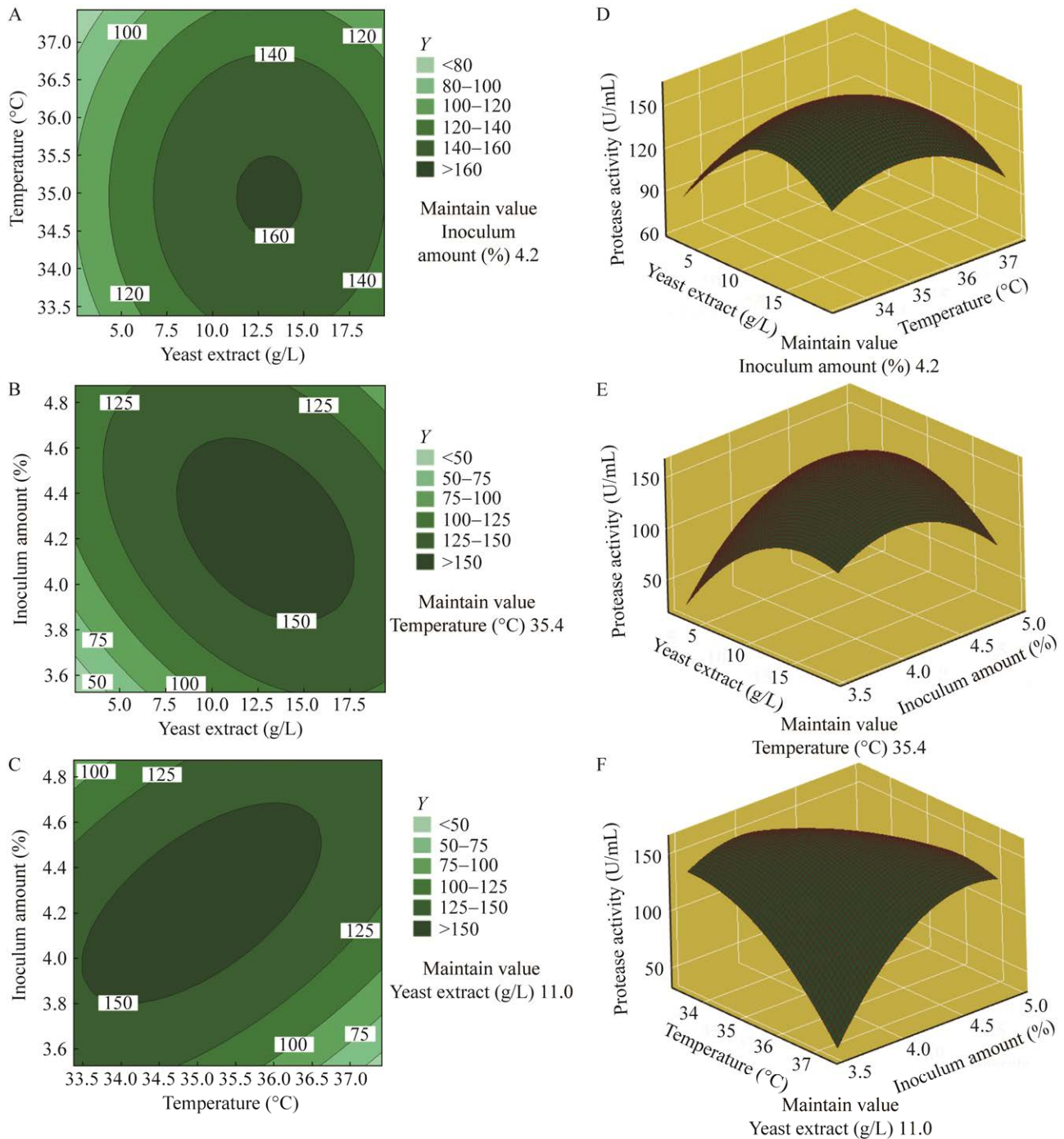


图 5 酵母浸膏、温度及接种量的等高线图和响应面图 A: 温度和酵母浸膏的等高线图; B: 接种量和酵母浸膏的等高线图; C: 接种量和温度的等高线图; D: 温度和酵母浸膏的响应面图; E: 接种量和酵母浸膏的响应面图; F: 接种量和温度的响应面图

Figure 5 Contour plot and surface plot of the influence of yeast extract, temperature and inoculum amount on protease activity. A: Contour plot of temperature and yeast extract; B: Contour plot of inoculum ratio and yeast extract; C: Contour plot of inoculum amount and temperature; D: Surface plot of temperature and yeast extract; E: Surface plot of inoculum ratio and yeast extract; F: Surface plot of inoculum amount and temperature.

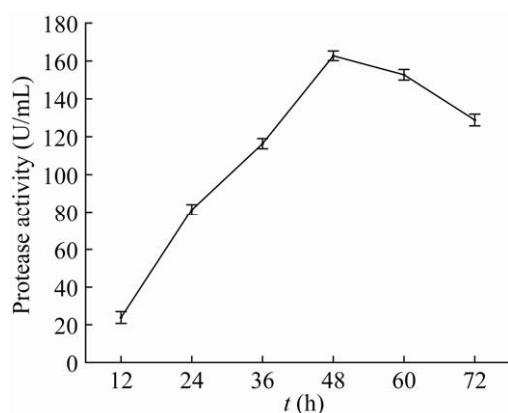


图6 地衣芽胞杆菌 NWMCC0046 产碱性蛋白酶曲线

Figure 6 *Bacillus licheniformis* NWMCC0046 alkaline protease production curve.

其他菌株相比, NWMCC0046 产碱性蛋白酶能力较强, 发酵产酶原料廉价易得、发酵条件易满足。后续工作将围绕碱性蛋白酶的纯化、酶学特性及工业应用的可能性展开研究。

REFERENCES

- [1] 曹慧, 张腾月, 赵龙妹, 李源, 杨佳萌, 张朋振, 任世威, 张会会. 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 H, Zhang TY, Zhao LM, Li Y, Yang JM, Zhang PZ, Ren SW, Zhang HH. Identification and characterization of a high protease-producing strain from soil[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2072-2081 (in Chinese)
- [2] Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(1): 115-126
- [3] Paul T, Das A, Mandal A, Jana A, Halder SK, Mohapatra PK, Pati BR, Mondal KC. Smart cleaning properties of a multi tolerance keratinolytic protease from an extremophilic *Bacillus tequilensis* hsTKB2: prediction of enzyme modification site[J]. Waste and Biomass Valorization, 2014, 5(6): 931-945
- [4] Hmidet N, El-Hadj Ali N, Haddar A, Kanoun S, Alya SK, Nasri M. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: characterization and potential application as detergent additive[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 47(1/2/3): 71-79
- [5] Rachadech W, Navacharoen A, Ruangsit W, Pongtharangkul T, Vangnai AS. An organic solvent-, detergent-, and thermo-stable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5[J]. Mikrobiologija, 2010, 79(5): 630-638
- [6] Cao S, Li DK, Ma XX, Xin QL, Song JZ, Lu FP, Li Y. A novel unhairing enzyme produced by heterologous expression of keratinase gene (*kerT*) in *Bacillus subtilis*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2019, 35(8): 122
- [7] 周雪雁, 米玛普尺, 马咸莹, 马忠仁, 丁功涛. 1株血红蛋白分解菌的分离鉴定及其蛋白酶活力测定[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(2): 66-71
Zhou XY, Mimapuchi, Ma XY, Ma ZR, Ding GT. Isolation and determination of protease activity of a haemoglobin-degrading bacteria[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(2): 66-71 (in Chinese)
- [8] Mirzapour KA, Moosavi-Nasab M, Aminlari M. Gelatin production using fish wastes by extracted alkaline protease from *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(12): 5175-5180
- [9] Adetunji CO, Adejumo IO. Efficacy of crude and immobilized enzymes from *Bacillus licheniformis* for production of biodegraded feather meal and their assessment on chickens[J]. Environmental Technology & Innovation, 2018, 11: 116-124
- [10] Bhunia B, Dey A. Statistical approach for optimization of physicochemical requirements on alkaline protease production from *Bacillus licheniformis* NCIM 2042[J]. Enzyme Research, 2012, 2012: 905804
- [11] Haddar A, Hmidet N, Ghorbel-Bellaaj O, Fakhfakh-Zouari N, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Alkaline proteases produced by *Bacillus licheniformis* RP1 grown on shrimp wastes: application in chitin extraction, chicken feather-degradation and as a dehairing agent[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2011, 16(4): 669-678
- [12] Ageitos JM, Vallejo JA, Sestelo ABF, Poza M, Villa TG. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2205-2213
- [13] Tiwary E, Gupta R. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15): 6103-6110
- [14] 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
- Dong XZ, Cai MY. Manual for the Systematic Identification of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [15] 尚利明, 秦哲, 张景艳, 王旭荣, 王磊, 孔晓军, 陈婕, 杨志强, 王学智, 李建喜. 种子液传代次数对益生菌 FGM 株发酵黄芪转化多糖的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(6): 136-139
- Shang LM, Qin Z, Zhang JY, Wang XR, Wang L, Kong XJ, Chen J, Yang ZQ, Wang XZ, Li JX. Effect of FGM strain passage times on the transformation of *Astragalus polysaccharide* from *Astragalus membranaceus* by fermentation[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(6): 136-139 (in Chinese)
- [16] Qazi JI, Baig S, Syed QU, Nadeem M. Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2[J]. Food Technology and Biotechnology, 2008, 46(4): 388-394
- [17] Pawar SV, Rathod VK. Optimization of novel and greener approach for the coproduction of uricase and alkaline protease in *Bacillus licheniformis* by Box-Behnken model[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2018, 48(1): 24-33
- [18] 冒鑫哲, 彭政, 周冠宇, 堵国成, 张娟. 枯草芽孢杆菌高产角蛋白酶发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(17): 138-144
- Mao XZ, Peng Z, Zhou GY, Du GC, Zhang J. Optimized fermentation for improving keratinase production by *Bacillus subtilis* WB600[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(17): 138-144 (in Chinese)
- [19] 王东, 荣家萍, 唐自钟, 布同良, 陈惠. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶的发酵条件[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(1): 143-151
- Wang D, Rong JP, Tang ZZ, Bu TL, Chen H. Response surface method optimization of fermentation conditions for *Bacillus subtilis* producing neutral protease[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(1): 143-151 (in Chinese)
- [20] 孙倩, 陈复生, 丁长河, 薛静玉. 地衣芽孢杆菌产碱性蛋白酶发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 174-177, 192
- Sun Q, Chen FS, Ding CH, Xue JY. Optimization of alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(13): 174-177, 192 (in Chinese)
- [21] Pathak AP, Deshmukh KB. Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: a Lonar soda lake isolate[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2012, 50(8): 569-576
- [22] Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody-Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, Lopez de Leon A, Xiang H, Gusti V, Clausen IG, et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species[J]. Genome Biology, 2004, 5(10): R77
- [23] 胡悦, 李汉文, 喻晨, 余华顺, 姚鹃, 龚大春. LiCl-ARTP 复合诱变选育高产碱性蛋白酶菌株及其发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2021, 40(02): 59-65
- Hu Y, Li HW, Yu C, Yu HS, Yao J, Gong DC. Breeding of high yield alkaline protease strain by LiCl-ARTP compound mutation and fermentation condition optimization[J]. China Brewing, 2021, 40(02): 59-65
- [24] 王颖, 高翔, 周君, 张春丹, 李晔, 王祖忠, 袁贝, 戴娟, 钱琴莲, 苏秀榕. 以浒苔为碳源的地衣芽孢杆菌发酵产蛋白酶条件优化[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 117-122
- Wang Y, Gao X, Zhou J, Zhang CD, Li Y, Wang ZZ, Yuan B, Dai J, Qian QL, Su XR. Optimization of fermentation conditions for protease production by *Bacillus licheniformis* with enteromorpha prolifera as carbon source[J]. Food Science, 2016, 37(7): 117-122 (in Chinese)
- [25] Varela E, Ming TE. Effect of pH and oxalate on hydroquinone-derived hydroxyl radical formation during brown rot wood degradation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 6025-6031
- [26] 令利军, 焦正龙, 王军英, 马稳霞, 李子彬, 赵云花, 张玺, 冯娟娟. 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
- Ling LJ, Jiao ZL, Wang JY, Ma WX, Li ZB, Zhao YH, Zhang X, Feng JJ. Production and characterization of extracellular protease from biocontrol strain *Bacillus licheniformis* TG116[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2559-2568 (in Chinese)
- [27] 王珊珊, 陈燕, 刘盾, 陈玄阳, 黄家驹, 程爽. 地衣芽孢杆菌 LS-1 产蛋白酶发酵条件的优化[J]. 安徽农学通报, 2018, 24(24): 22-24
- Wang SS, Chen Y, Liu D, Chen XY, Huang JJ, Cheng S. Optimization of fermentation conditions of a protease-producing strain LS-1[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2018, 24(24): 22-24 (in Chinese)
- [28] 刘海进, 钱坤, 李吕木, 许发芝, 丁小玲, 景志远. 地衣芽孢杆菌 D-1 产碱性蛋白酶培养条件的优化[J]. 激光生物学报, 2011, 20(3): 409-412, 387
- Liu HJ, Qian K, Li LM, Xu FZ, Ding XL, Jing ZY. Optimization of culture conditions of alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* D-1[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2011, 20(3): 409-412, 387 (in Chinese)