

# 海南近海水域产碱性蛋白酶菌株的分离筛选及发酵条件优化

冯璨, 马香, 刘柱, 李宏, 李娟娟, 彭欣, 唐燕琼\*

海南大学生命科学学院, 海南 海口 570100

冯璨, 马香, 刘柱, 李宏, 李娟娟, 彭欣, 唐燕琼. 海南近海水域产碱性蛋白酶菌株的分离筛选及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4291-4304

Feng Can, Ma Xiang, Liu Zhu, Li Hong, Li Juanjuan, Peng Xin, Tang Yanqiong. Isolation and screening of alkaline protease-producing strains from Hainan offshore areas and optimization of the fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4291-4304

**摘要:**【背景】微生物蛋白酶在工业生物技术具有广阔的应用前景。在微生物蛋白酶中,碱性蛋白酶占全球酶总产量的50%以上,获取产碱性蛋白酶的新微生物资源具有重要意义。【目的】在海南近海贝类养殖基地海泥中筛选获得高产碱性蛋白酶的菌株,对其生长特性进行探究并优化菌株产酶条件,获得新的蛋白酶生产资源。【方法】以酪素培养基为筛选培养基,采用形态学结合系统发育分析鉴定菌株,通过响应面实验优化菌株的产酶条件。【结果】筛选获得一株高产碱性蛋白酶的菌株F3,鉴定为粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)。菌株在最优产酶条件下发酵酶活达到(339.36±4.30) U/mL。【结论】筛选获得的菌株粘质沙雷氏菌F3有较好的产碱性蛋白酶的能力。

**关键词:** 微生物筛选; 碱性蛋白酶; 响应面分析

## Isolation and screening of alkaline protease-producing strains from Hainan offshore areas and optimization of the fermentation conditions

FENG Can, MA Xiang, LIU Zhu, LI Hong, LI Juanjuan, PENG Xin, TANG Yanqiong\*

School of Life Sciences, Hainan University, Haikou 570100, Hainan, China

**Abstract:** [Background] Microbial proteases have broad application prospects in industrial

基金项目: 国家自然科学基金(31860676)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31860676)

\*Corresponding author: E-mail: tyq68@hainanu.edu.cn

Received: 2022-03-02; Accepted: 2022-03-30; Published online: 2022-04-25

biotechnology. Among microbial proteases, alkaline proteases account for more than 50% of the world's total enzyme production. It is of great significance to explore new microbial resources that synthesize alkaline proteases. **[Objective]** Strains with high production of alkaline proteases were screened from the sea mud of Hainan offshore shellfish breeding base and their growth characteristics were explored. Moreover, the conditions for the enzyme production were optimized. Thereby, new protease-producing resources were obtained. **[Methods]** Casein medium was employed for screening the protease producers and the yielded strain was identified by morphological and phylogenetic analysis. The enzyme production conditions of the strain were optimized by response surface methodology. **[Results]** Strain F3 with high production of alkaline protease was screened out and identified as *Serratia marcescens*. The enzyme activity in the fermentation broth of the strain was up to (339.36±4.30) U/mL under the optimal conditions. **[Conclusion]** *S. marcescens* F3 has strong ability to produce alkaline protease.

**Keywords:** microbial screening; alkaline protease; response surface methodology

碱性蛋白酶是一类具有生物活性的蛋白酶,可在碱性条件下催化蛋白质中的部分肽键,水解为短肽或氨基酸<sup>[1]</sup>。碱性蛋白酶可以从多种来源获得,包括微生物、动物和植物<sup>[2]</sup>。然而,动植物来源的蛋白酶无法满足日益增长的工业需求,这激发了人们对微生物蛋白酶的浓厚兴趣,不同来源分离的产碱性蛋白酶微生物多有报道(表 1)。微生物碱性蛋白酶不仅在生物体的代谢过程中发挥着重要作用,而且由于其与化学催化剂相比具有更强的特异性、温和的反应条件和环境友好性,以及易于失活或控制,因此,在皮革加工、洗涤添加剂和饲料添加等工业生产中有着广泛的应用<sup>[11-13]</sup>。

我国有得天独厚的海洋资源,海岸线绵长,跨越了从温带到热带的辽阔海域,是世界上海洋生物多样性最丰富的国家之一,因此从海洋中获取生物资源也具有优势条件<sup>[14-15]</sup>。海南省地处我国南海之滨,其独特的热带季风气候构成了特有的生态环境,这也使得热带海域的微生物更能适应高温、高盐、缺氧等环境特点,抗逆性较强。目前,我国对于热带海洋微生物资源的开发利用十分有限,从海洋中筛选不同特性的微生物已经成为当前研究的热点。本文

从海南近海贝类养殖基地淤泥中筛选出产碱性蛋白酶活性高的菌种,对其进行微生物学鉴定,优化发酵产酶条件,以期为工业生产及应用提供新的菌株与蛋白酶制剂,并为热带海洋菌种资源利用提供科学依据。

表 1 产碱性蛋白酶的菌种名称和来源

Table 1 Names and sources of strains producing alkaline protease

来源	菌种名称	参考文献
Sources	Strains name	References
海洋沉积物	香鱼海槽芽孢杆菌	[3]
Marine sediments	<i>Bacillus alveayuensis</i> CAS 5	
家禽养殖场	耐盐芽孢杆菌	[4]
Poultry farm	<i>Bacillus halodurans</i> RSCVS-PF21	
油田	沙福芽孢杆菌	[5]
Oilfield	<i>Bacillus safensis</i> RH12	
丝茅草	早獭埃希氏菌	[6]
Silk thatch	<i>Escherichia marmotae</i>	
红树林沉积物	弧菌	[7]
Mangrove sediments	<i>Vibrio</i> sp.	
深海	链霉菌	[8]
Deep sea	<i>Streptomyces</i> MML1614	
海水	短小芽孢杆菌	[9]
Seawater	<i>Bacillus pumilus</i> MP27	
贝类肠道	弧菌	[10]
Shellfish gut	<i>Vibrio</i> sp.	

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 样 品

从海南省海口市东寨港红树林、桂林洋近海生蚝等贝类养殖基地采集淤泥、水样, 具体信息见表 2。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

酪氨酸标准品, 北京索莱宝科技有限公司; 福林酚试剂和干酪素, 国药集团化学试剂有限公司。

紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 高速台式离心机, 艾本德股份公司; 扫描电子显微镜, 日立公司。

#### 1.1.3 培 养 基

分离筛选培养基(g/L): 酪蛋白 3.0, 酵母提取物 2.0, 明胶 5.0, 琼脂粉 15.0, pH 9.5。种子培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 酵母粉 5.0, 琼脂粉 15.0。基础发酵培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 10.0, 磷酸氢二钾 5.0, NaCl 10.0, pH 9.5。所有培养基于  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min, 其中葡萄糖(称取 10 g 溶解于 50 mL 无菌水中, 在超净工作台内用 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤除菌)与其他培养基分别灭菌后混合。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 产碱性蛋白酶菌株的筛选

初筛: 称取 10 g 泥样加入到装有玻璃珠和

90 mL 无菌水的锥形瓶中, 梯度稀释至  $10^{-3}$ – $10^{-5}$ , 取 0.2 mL 涂布于分离筛选培养基平板上, 于 30  $^{\circ}$ C 培养直至有透明圈出现。将透明圈较大的菌株多次划线培养, 直至得到纯的菌株。

复筛: 初筛菌株接种于发酵培养基中, 30  $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 48 h。在 4  $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液即为粗酶液, 采用 Folin 酚法测定蛋白酶活性[16]。酶活定义: 在 pH 9.0、40  $^{\circ}$ C 条件下, 每分钟水解 1%酪素溶液产生 1  $\mu$ g 酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位(U/mL)。

#### 1.2.2 菌 株 鉴 定

形态学鉴定: 接种菌株于种子培养基上, 30  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 观察培养基上菌落的大小、形态、质地等外表特征。利用扫描电子显微镜 S-3000N 观察其细胞形态。

分子生物学鉴定: 采用 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增<sup>[17]</sup>, 将测序结果在 NCBI 上与已知菌种进行比对分析, 用 MEGA 10.0 软件采取邻接法构建系统发育树<sup>[17]</sup>。

#### 1.2.3 生长曲线和产酶曲线绘制

在无菌环境中, 将  $OD_{600}$  为 0.02 的菌液接入基础发酵培养基中, 30  $^{\circ}$ C、150 r/min 恒温培养。自接种 6 h 起, 间隔 6 h 取发酵液, 测定相应的  $OD_{600}$  值及碱性蛋白酶酶活, 实验重复 3 次, 根据数据绘制菌株 F3 的生长曲线及产酶变化曲线。

表 2 采样信息表

Table 2 Sampling information table

样品编号 Sample No.	采样时间 Sampling time	采样地点 Sampling location	采样经纬度 Sampling latitude and longitude	水深 Water depth (m)	样品类型 Sample type
1	2021-4-12	海南省海口市东寨港近海生蚝、虾养殖基地 Offshore oyster and shrimp breeding base in Dongzhai port, Haikou city, Hainan province	110 $^{\circ}$ 35'E, 19 $^{\circ}$ 51'N	1.5	淤泥、水样 Sludge, water samples
2	2021-4-12	海南省海口市桂林洋近海贝类养殖基地 Guilin Yang Offshore shellfish breeding base, Haikou city, Hainan province	110 $^{\circ}$ 49'E, 19 $^{\circ}$ 98'N	1.2	淤泥、水样 Sludge, water samples

### 1.2.4 产碱性蛋白酶菌株发酵条件优化

#### (1) 单因素条件优化

以吸光度值为指标, 利用单因素实验研究碳源、氮源、pH、装液量、接种量、氯化钠浓度、磷酸盐浓度对产碱性蛋白酶活力的影响。分别选取碳源: 果糖、麦芽糖、半乳糖、蔗糖和葡萄糖, 浓度为 0、5、10、20 和 30 g/L; 氮源: 硫酸铵、酪蛋白、酵母粉、氯化铵和尿素, 浓度为 10、20、30、40 和 50 g/L; pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0; 装液量: 在 500 mL 锥形瓶中分别倒入 50、100、150 和 200 mL 培养基; 接种量:  $OD_{600}$  值为 0.01、0.02、0.05 和 0.10; 氯化钠浓度: 5、10、20、30、40 和 50 g/L; 磷酸盐浓度: 5、10、20、30 和 40 g/L。实验设置 3 组重复, 对发酵条件进行初步优化, 确定较佳因素的实验参数范围。

#### (2) 响应面优化设计

对单因素实验中确定的 7 个因素(半乳糖、蛋白胨、pH、磷酸氢二钾、氯化钠、接种量和装液量)进行 Plackett-Burman 实验设计, 每个因素取高、低 2 个水平, 如表 3 所示。

对结果进行回归分析, 比较各因素对菌株 F3 产酶影响的显著性, 运用 Design Expert 8.0 软件, 以碱性蛋白酶活力为响应值设计 Box-Behnken 实验, 以此得出菌株 F3 的最佳发

表 3 Plackett-Burman 实验因素及水平

Table 3 Plackett-Burman experimental factors and levels

因素 Factors	低水平 Low level (-1)	高水平 High level (+1)
A 半乳糖 Galactose (g/L)	20	30
B 蛋白胨 Peptone (g/L)	20	30
C pH	9	11
D 接种量 Inoculum ( $OD_{600}$ )	0.01	0.02
E NaCl (g/L)	5	8
F 装液量 Liquid volume (mL)	150	250
G $K_2HPO_4$ (g/L)	10	15

酵培养基条件。

### 1.2.5 质谱鉴定

将菌株 F3 在最适发酵条件下进行发酵, 收集有活性的粗酶液送样至北京诺禾致源科技公司进行质谱鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 产碱性蛋白酶菌株的筛选

从海南近海淤泥中分离得到了纯培养菌株 67 株, 其中能产生蛋白酶透明圈的菌株 33 株, 挑选了 7 株水解圈( $D$ )和菌落直径( $d$ )比值( $D/d$ )相对较大的菌株进行酶活测定, 实验结果如图 1 所示。

由图 1 中可以看出, 所选的 7 株菌经过发酵培养, 有 4 株产酶酶活超过 100 U/mL, 其中菌株 F3 产蛋白酶酶活最高, 因此选择菌株 F3 作为出发菌种进行后续的实验研究。

### 2.2 产碱性蛋白酶菌株的鉴定

#### 2.2.1 菌落和细胞形态特征

菌株 F3 在固体培养基平板上培养 12 h 后, 观察到的结果如图 2 所示, 单菌落呈圆形, 颜

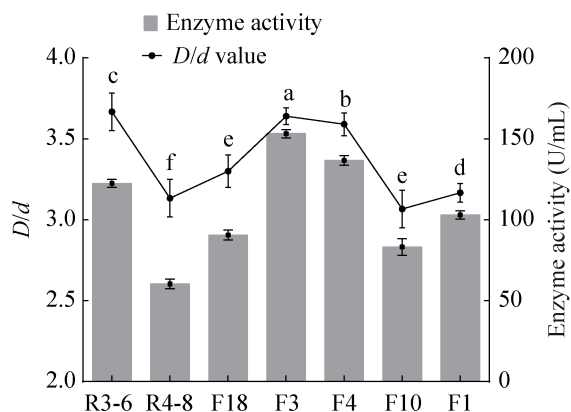


图 1 各菌株酶活和对应  $D/d$  值 不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平差异显著, 下同

Figure 1 Enzyme activity and corresponding  $D/d$  value of each strain. Different lowercase letters indicate significant differences at the  $P < 0.05$  level, the same below.

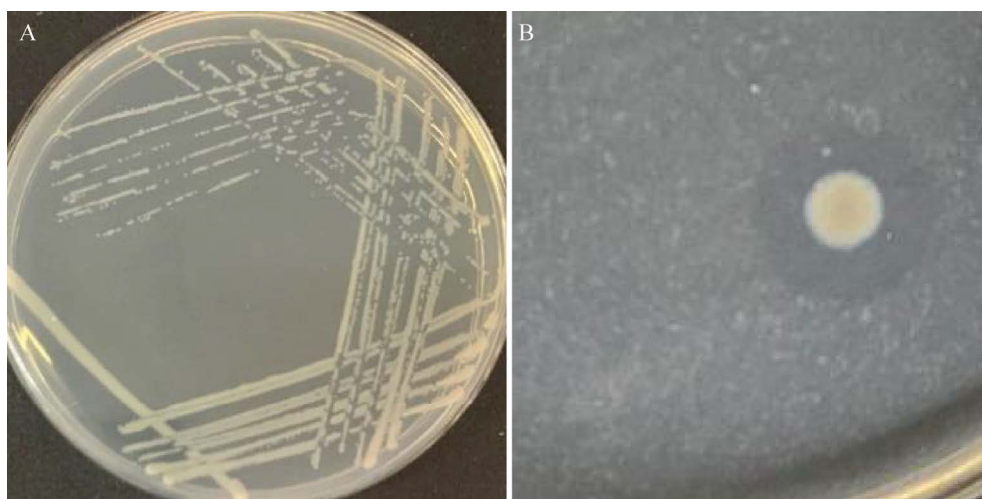


图 2 菌株 F3 在种子培养基(A)和酪素筛选培养基(B)的形态图

Figure 2 Morphology of strain F3 in seed medium (A) and casein selection medium (B).

色为乳白色，表面光滑且湿润，外轮廓平整规则。通过扫描电子显微镜观察(图 3)，可以发现细胞分散存在，多为直杆状，直径为  $0.4\text{--}0.7\ \mu\text{m}$ ，长为  $0.7\text{--}1.2\ \mu\text{m}$ ，端圆。

### 2.2.2 分子生物学鉴定

PCR 扩增后得到菌株 F3 的 16S rRNA 基因序列，利用 GenBank 中的 BLAST 程序检索结果表明，该菌与沙雷氏菌属的相似度极高，因此选择合适的模式菌株的 16S rRNA 基因序列，采用 MEGA 10.0 软件构建菌株 F3 的系统发育树(图 4)，菌株 F3 与 *Serratia marcescens* 聚在同

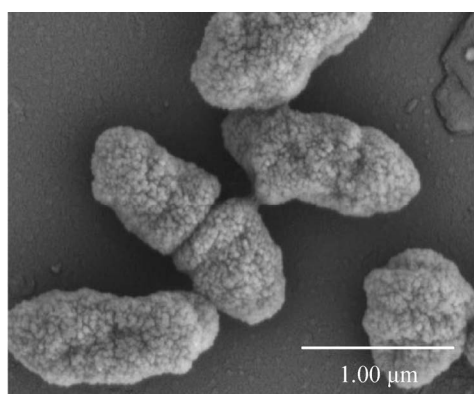


图 3 菌株 F3 扫描电镜图

Figure 3 Scanning electron microscope image of strain F3.

一支且可信度极高。

### 2.3 生长曲线和产酶曲线的绘制

如图 5 所示，菌株 F3 在 0–36 h 时处于快速生长状态，此时酶活力也随之增加。36–60 h 时菌株生长进入稳定期，此时菌体量最大。酶活力在 48 h 时达到最高值，达到了  $(151.3\pm 2.6)\ \text{U/mL}$ 。随着发酵时间的延长，酶活不再随之增加。因此确定后期发酵培养时间为 48 h。

### 2.4 产酶发酵条件优化

#### 2.4.1 单因素实验

##### (1) 温度对菌株 F3 产酶的影响

由图 6 可以看出，培养温度为  $22\text{--}30\ ^\circ\text{C}$  时菌株 F3 产酶活力逐渐升高，达到  $30\ ^\circ\text{C}$  时蛋白酶活力达到最大值，而当培养温度继续升高时酶活力呈急剧下降趋势。因此后续选择  $30\ ^\circ\text{C}$  作为发酵培养的温度。

##### (2) 不同碳源对产酶的影响

碳源对菌株 F3 产蛋白酶有重要的影响，以半乳糖为碳源时菌液酶活力最高；其次是麦芽糖、果糖、葡萄糖；以蔗糖为碳源时酶活力较低(图 7A)。因此选择半乳糖作为发酵培养基的碳源。

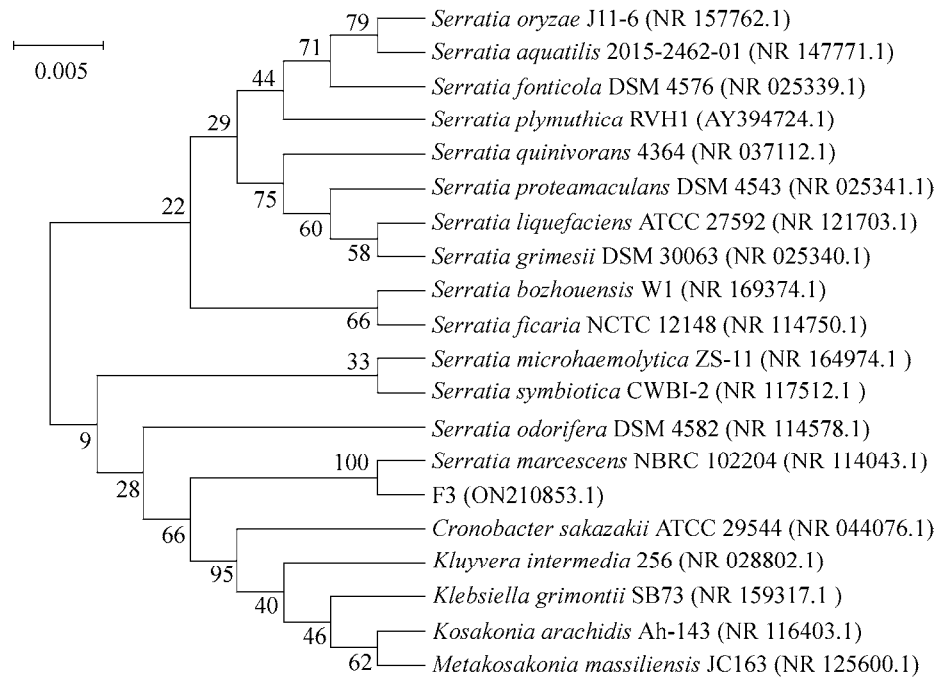


图4 利用 neighbor-joining 法构建菌株 F3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 括号中序号是相关菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字是 bootstrap 支持率; 标尺刻度 0.005 是序列差异的分支长度  
Figure 4 Construction of strain F3 phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences using neighbor-joining. Numbers in parentheses are the accession numbers of related strains; The numbers in each branch points are percentages supported by bootstrap; Bar=0.005 is nucleotide divergence.

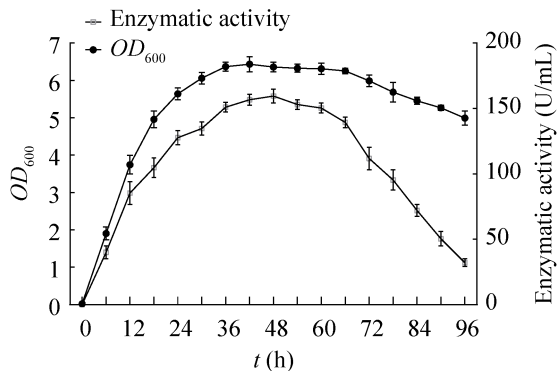


图5 菌株 F3 的生长曲线及产酶曲线图  
Figure 5 Growth curve and enzyme production curve of strain F3.

半乳糖添加量对菌株 F3 产蛋白酶的影响也十分显著, 半乳糖浓度由 0 增加到 30 g/L 时产酶量呈现先增加后降低的趋势, 浓度为 20 g/L 时酶活力最高(图 7B)。因此选择 20 g/L 作为半乳糖的最适添加量。

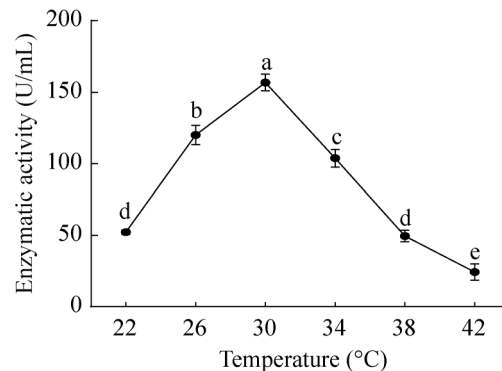


图6 温度对菌株 F3 产碱性蛋白酶的影响  
Figure 6 Effect of temperature on the production of alkaline protease by strain F3.

### (3) 不同氮源对产酶的影响

硫酸铵、氯化铵等无机氮作为氮源时, 菌株 F3 生长状况不佳, 因此酶活很低; 而有机氮源能被菌株 F3 更好利用, 其中蛋白胨为氮源时酶活最高(图 8A)。因此选择蛋白胨为最适氮源。

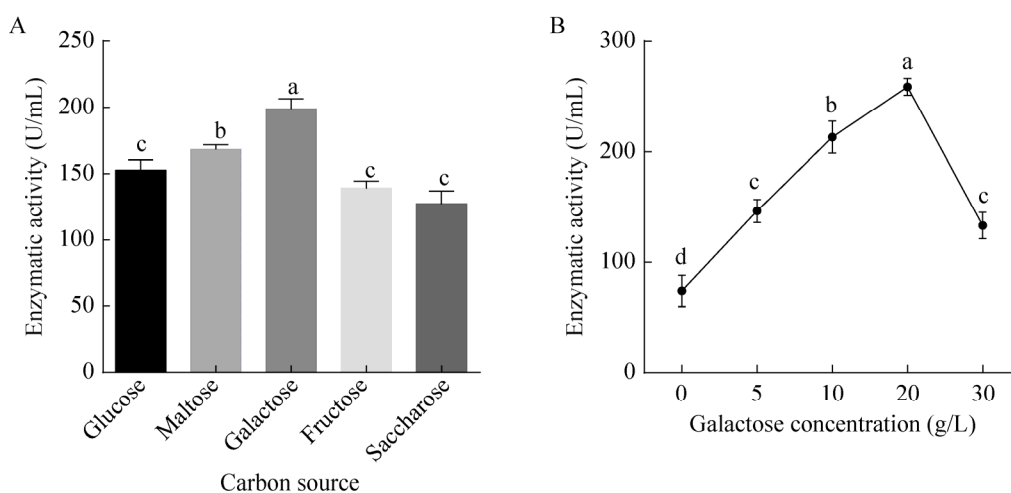


图7 碳源(A)及半乳糖浓度(B)对菌株 F3 产碱性蛋白酶的影响

Figure 7 Effect of carbon source (A) and galactose concentration (B) on alkaline protease production of strain F3.

蛋白胨浓度对菌株 F3 产蛋白酶的影响实验结果表明(图 8B), 蛋白胨浓度为 20 g/L 时菌株产酶活力最高; 随着蛋白胨浓度的增加, 酶活力明显降低, 因此选择 20 g/L 为蛋白胨的最适浓度。

#### (4) 不同初始 pH 对产酶的影响

pH 对于菌株的生长有着重要的影响。如图 9 所示, 当培养基初始 pH 值逐渐升高, 蛋白酶

活力逐渐增大; 当初始 pH 值大于 9.0 后酶活力显著下降。因此选择 pH 9.0 作为发酵培养基的起始 pH 值。

#### (5) 不同装液量对产酶的影响

由图 10 可知, 当使用 500 mL 锥形瓶, 装液量为 50、100 和 150 mL 时, 酶活力显著高于装液量为 200 mL 时。考虑到经济效益最大化, 选择 150 mL 为发酵培养基的最佳装液量。

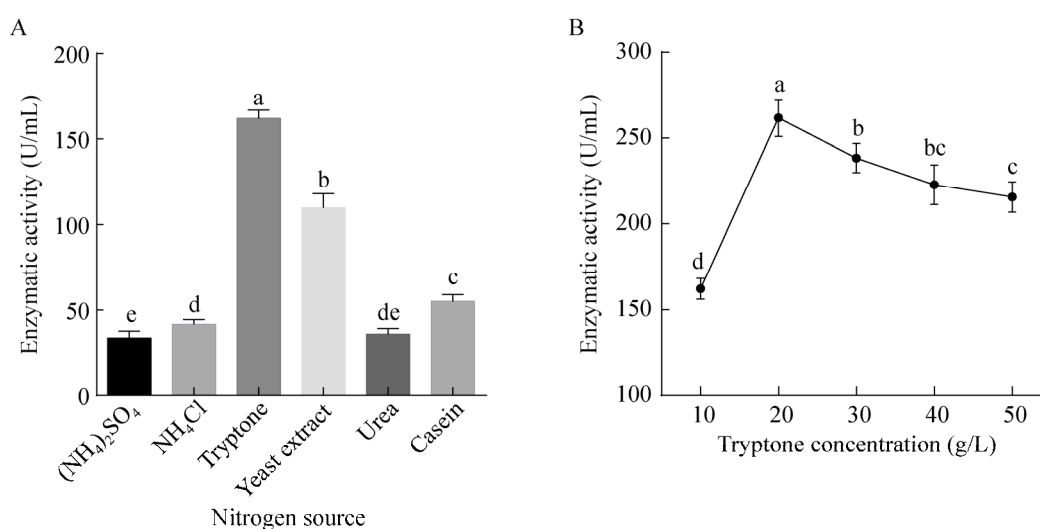


图8 氮源(A)及蛋白胨浓度(B)对菌株 F3 产碱性蛋白酶的影响

Figure 8 Effect of nitrogen source (A) and peptone concentration (B) on alkaline protease production of strain F3.

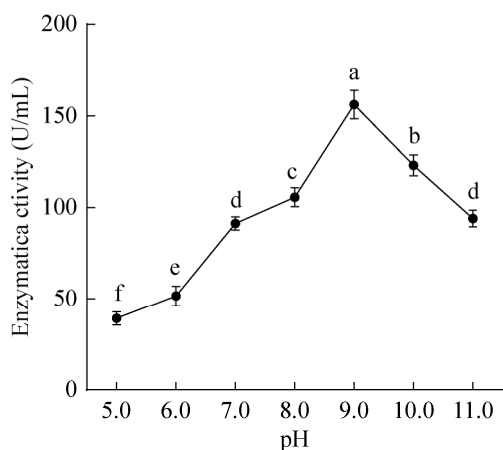


图9 pH对菌株F3产碱性蛋白酶的影响  
Figure 9 Effect of pH on the production of alkaline protease by strain F3.

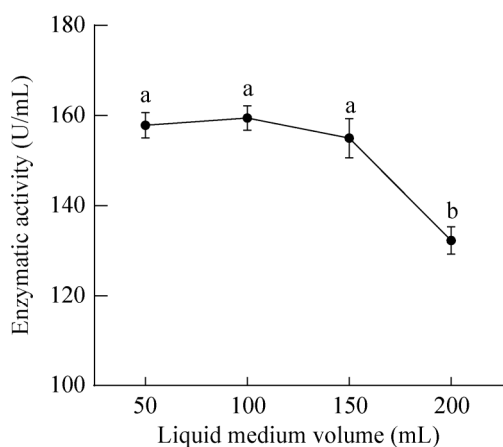


图10 装液量对菌株F3产碱性蛋白酶的影响  
Figure 10 Effect of liquid loading on the production of alkaline protease by strain F3.

#### (6) 不同接种量对产酶的影响

由图11可知,当接种量超过0.02的 $OD_{600}$ 时,随着接种量的增加,酶活力呈下降趋势,可能是由于接种量大导致菌体前期生长较快,消耗营养物质多,同时产生了大量代谢废物,从而抑制了菌体的正常生长。接种量为0.01、0.02的 $OD_{600}$ 时,蛋白酶活力最大,因此选择0.01的 $OD_{600}$ 作为起始接种量。

#### (7) 氯化钠浓度对产酶的影响

氯化钠可以维持细胞的渗透压,是培养基

中不可或缺的成分<sup>[18]</sup>。由图12可以看出,NaCl为5 g/L时蛋白酶活力最高,随着NaCl浓度的增加,酶活下降趋势明显,因此确定最佳NaCl浓度为5 g/L。

#### (8) 磷酸盐浓度对产酶的影响

磷元素不仅是生物体细胞内磷脂、ATP等的重要组分,还参与生命活动的重要代谢过程<sup>[19]</sup>。由图13可以看出,磷酸氢二钾浓度对产酶的

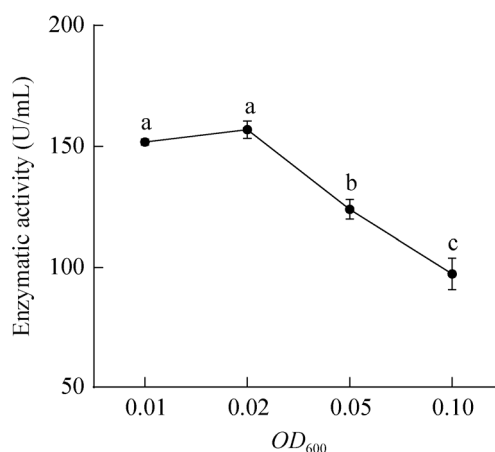


图11 接种量对菌株F3产碱性蛋白酶的影响  
Figure 11 Effect of inoculation amount on alkaline protease production of strain F3.

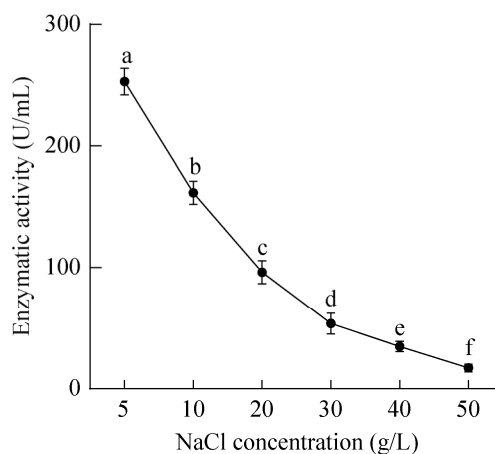


图12 氯化钠浓度对菌株F3产碱性蛋白酶的影响  
Figure 12 Effect of sodium chloride concentration on the production of alkaline protease by strain F3.



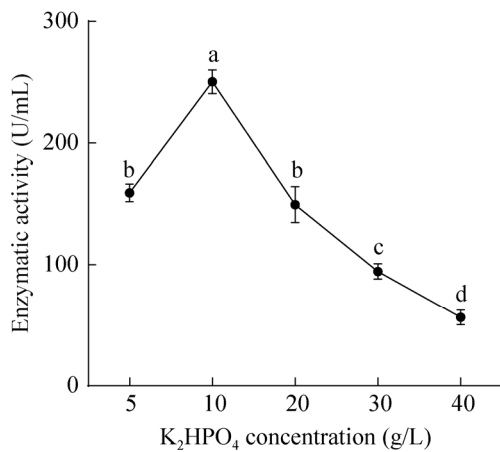


图 13 磷酸盐浓度对菌株 F3 产碱性蛋白酶的影响  
Figure 13 Effect of phosphate concentration on the production of alkaline protease by strain F3.

影响效果十分显著。其中,当磷酸氢二钾浓度为 10 g/L 时,碱性蛋白酶酶活明显高于其他浓度。

#### 2.4.2 响应面实验设计

##### (1) Plackett-Burman 试验设计

采用 Plackett-Burman 试验设计进行碱性蛋

白酶酶活测定的结果见表 4。利用 Design Expert 8.0 软件分析各因素对菌株 F3 产碱性蛋白酶影响的显著性结果见表 5。

由表 5 对多因子显著性分析结果可知,该回归模型  $F=15.12$ 、 $P<0.01$ ,线性回归模型极显著。由表 5 各因素  $F$  值可知,在发酵优化分析中,各因素对菌株 F3 产碱性蛋白酶的影响重要性排序为: pH>半乳糖>盐度>磷酸氢二钾>接种量>装液量>蛋白胨,其中 pH、半乳糖和氯化钠的  $P$  值分别小于 0.01 或 0.05,说明这 3 个因素对产碱性蛋白酶酶活有极显著或显著影响,因此选择这 3 个因素作为主要的影响因子进行后续的爬坡试验。

##### (2) 最陡爬坡试验

根据上述分析结果设计最陡爬坡试验方案,如表 6 所示,当半乳糖浓度为 10 g/L、pH 值为 8.5、氯化钠为 5 g/L 时酶活最高,为  $(336.9\pm 3.4)$  U/mL,因此选择该条件作为 Box-Behnken 实验的中心点。

表 4 Plackett-Burman 实验组合设计及结果

Table 4 Plackett-Burman experimental combination design and results

实验号 No.	因素水平 Factor levels							酶活 Enzyme activity (U/mL)
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	
	半乳糖 Galactose	蛋白胨 Peptone	pH	接种量 Inoculum	NaCl	装液量 Liquid volume	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	333.1±7.3
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1	234.8±4.1
3	-1	-1	-1	1	-1	1	1	338.4±2.2
4	-1	1	1	-1	1	1	1	166.8±6.5
5	1	1	1	-1	-1	-1	1	126.8±1.4
6	1	-1	1	1	-1	1	1	137.6±9.6
7	-1	1	-1	1	1	-1	1	261.2±8.3
8	1	-1	1	1	1	-1	-1	131.6±5.2
9	-1	-1	1	-1	1	1	-1	172.4±0.3
10	1	1	-1	1	1	1	-1	233.2±10.5
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	331.6±9.1
12	-1	1	1	1	-1	-1	-1	226.8±7.8

表5 Plackett-Burman 实验中各因素的显著性分析

Table 5 Significance analysis of various factors in Plackett-Burman experiment

来源 Sources	平方和 Adj SS	均方差 Adj MS	自由度 DF	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	67 009.29	9 572.76	7	15.120	0.009 8	**
A 半乳糖 Galactose	7 655.80	7 655.80	1	12.090	0.025 4	*
B 蛋白胨 Peptone	0.19	0.19	1	0.001	0.987 1	NS
C pH	49 446.84	49 446.84	1	78.080	0.000 9	**
D 接种量 Inoculum	112.24	112.24	1	0.180	0.695 4	NS
E NaCl	7 217.71	7 217.71	1	11.400	0.027 9	*
F 装液量 Liquid volume	359.71	359.71	1	0.570	0.493 0	NS
G K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 216.80	2 216.80	1	3.500	0.134 7	NS
误差 Error	2 533.26	633.31	4			
总和 Cor total	69 542.54		11			

Note: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; NS: Not significant.

### (3) Box-Behnken 试验回归分析

为确定半乳糖、pH 和氯化钠这 3 个因素之间的交互作用，进行三因素三水平的响应面试验，其试验因素及水平见表 7，Box-Behnken 试验设计的方案及实验结果见表 8，数据用 Design Expert 8.0 软件进行回归分析，结果见表 9。

表6 最陡爬坡实验设计及结果

Table 6 Experimental design of steepest climbing

实验号 No.	A 半乳糖 Galactose (g/L)	C pH	E NaCl (g/L)	酶活 Enzyme activity (U/mL)
1	25	10.0	6.5	286.3±5.3
2	20	9.5	6.0	304.5±6.7
3	15	9.0	5.5	328.1±5.1
4	10	8.5	5.0	336.9±3.4
5	5	8.0	4.5	301.2±7.2

表7 响应面分析试验因素及水平

Table 7 Response surface analysis test factors and levels

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
A 半乳糖 Galactose (g/L)	8	10.0	12
C pH	8	8.5	9
E NaCl (g/L)	4	5.0	6

表8 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 8 Box-Behnken experimental design and results

实验号 No.	A 半乳糖 Galactose	C pH	E NaCl	酶活 Enzyme activity (U/mL)
1	0	0	0	335.4±8.1
2	-1	-1	0	310.9±2.3
3	0	-1	-1	309.4±1.6
4	0	-1	1	316.3±3.9
5	1	1	0	321.5±5.2
6	-1	0	-1	289.5±6.3
7	-1	1	0	287.5±2.8
8	0	0	0	336.2±1.1
9	0	1	1	301.2±3.7
10	1	0	-1	320.7±2.9
11	0	0	0	339.1±4.1
12	1	0	1	319.2±2.3
13	1	-1	0	326.3±2.4
14	-1	0	1	299.2±6.1
15	0	1	-1	289.5±2.7
16	0	0	0	333.8±4.6
17	0	0	0	334.2±4.1

表 9 Box-Behnken 试验回归方程和方差分析

Table 9 Box-Behnken test regression equation and analysis of variance

来源	平方和	均方差	自由度	F 值	P 值	显著性
Sources	Adj SS	Adj MS	DF	F value	P value	Significance
模型 Model	4 884.73	542.75	9	101.43	<0.000 1	**
A 半乳糖 Galactose	1 265.04	1 265.04	1	236.41	0.000 1	**
C pH	499.28	499.28	1	93.31	<0.000 1	**
E NaCl	89.78	89.78	1	16.78	0.004 6	**
AC	86.49	86.49	1	16.16	0.005 1	**
AE	31.36	31.36	1	5.86	0.046 0	*
CE	5.76	5.76	1	1.08	0.334 0	NS
A <sup>2</sup>	470.42	470.42	1	87.91	0.000 1	**
C <sup>2</sup>	781.07	781.07	1	145.97	<0.000 1	**
E <sup>2</sup>	1 367.24	1 367.24	1	255.51	0.000 1	**
残差 Residual	37.46	5.35	7			
失拟 Lack of fit	19.71	6.57	3	1.48	0.347 2	NS
纯误差 Pure error	17.75	4.44	4			
总和 Cor total	4 922.19		16			

Note: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; NS: Not significant;  $R^2 = 0.992\ 4$ ;  $AdjR^2 = 0.982\ 6$ ;  $PredR^2 = 0.930\ 3$ ;  $CV\% = 0.73$ ;  $Adeq\ precisor = 27.796$ .

由表 9 可知, 该模型的  $P$  值小于 0.01, 说明该模型具有极高显著性; 失拟项  $P$  值为  $0.347\ 2 > 0.05$ , 不显著, 说明实验误差小; 相关系数  $R^2$  为  $0.992\ 4$ , 说明有 99.24% 的数据可以用该模型确定; 变异系数 (coefficient of variance, CV) 值为  $0.73\% < 10\%$ , 说明二次回归方程可以很好地对响应值进行预测。方差分析结果表明, 半乳糖、pH、盐度的一次项和二次项均对碱性蛋白酶酶活的回归模型影响极显著 ( $P < 0.01$ )。半乳糖浓度和 pH ( $P < 0.01$ ) 对碱性蛋白酶酶活效果的交互影响极显著, 半乳糖浓度和盐度 ( $P < 0.05$ ) 对碱性蛋白酶酶活效果的交互影响显著, 盐度和 pH ( $P > 0.05$ ) 对碱性蛋白酶酶活效果的交互影响不显著。

利用 Design Expert 8.0 软件对该模型进行分析, 得到回归方程:  $R = 335.74 + 12.58A - 7.9C + 3.35E + 4.65AC - 2.8AE + 1.2CE - 10.57A^2 - 13.62C^2 - 18.02E^2$ 。各因素交互作用对产碱性蛋白酶活力的曲面图和等高线图如图 14 所示。

### 2.4.3 最佳产酶条件确定与验证

由 Design Expert 8.0 软件分析可知最佳的产酶条件为: 半乳糖  $11.09\ g/L$ , pH  $8.4$ , 盐度  $5.04\ g/L$ , 蛋白胨  $20\ g/L$ , 接种量  $0.01$  的  $OD_{600}$ , 磷酸氢二钾  $10\ g/L$ , 装液量为  $150\ mL/500\ mL$ , 培养温度  $30\ ^\circ C$ , 培养时间  $48\ h$ , 相应的发酵液中碱性蛋白酶活力理论预测值可达到  $340.02\ U/mL$ 。以此条件进行了 3 组平行实验, 获得的酶活为  $(339.36 \pm 4.3)\ U/mL$ , 所测得数值占理论预测值的  $99.81\%$ , 说明该模型可信度高, 符合预期实验结果。

### 2.5 质谱鉴定结果与分析

通过数据库比对发现, 该酶与 *Serratia marcescens* 的 Periplasmic serine endoprotease DegP-like (PSEE) 匹配度较高, 序列相似度达  $45.2\%$ , 匹配得分为  $66.12$ 。该蛋白质 ID 是 A0A1L6QLX1, 相对分子质量为  $47.4\ kDa$ , 等电点为  $9.08$ 。图 15 为活性物质质谱鉴定序列, 红色粗体部分表示活性物质与 PSEE 匹配的肽段。

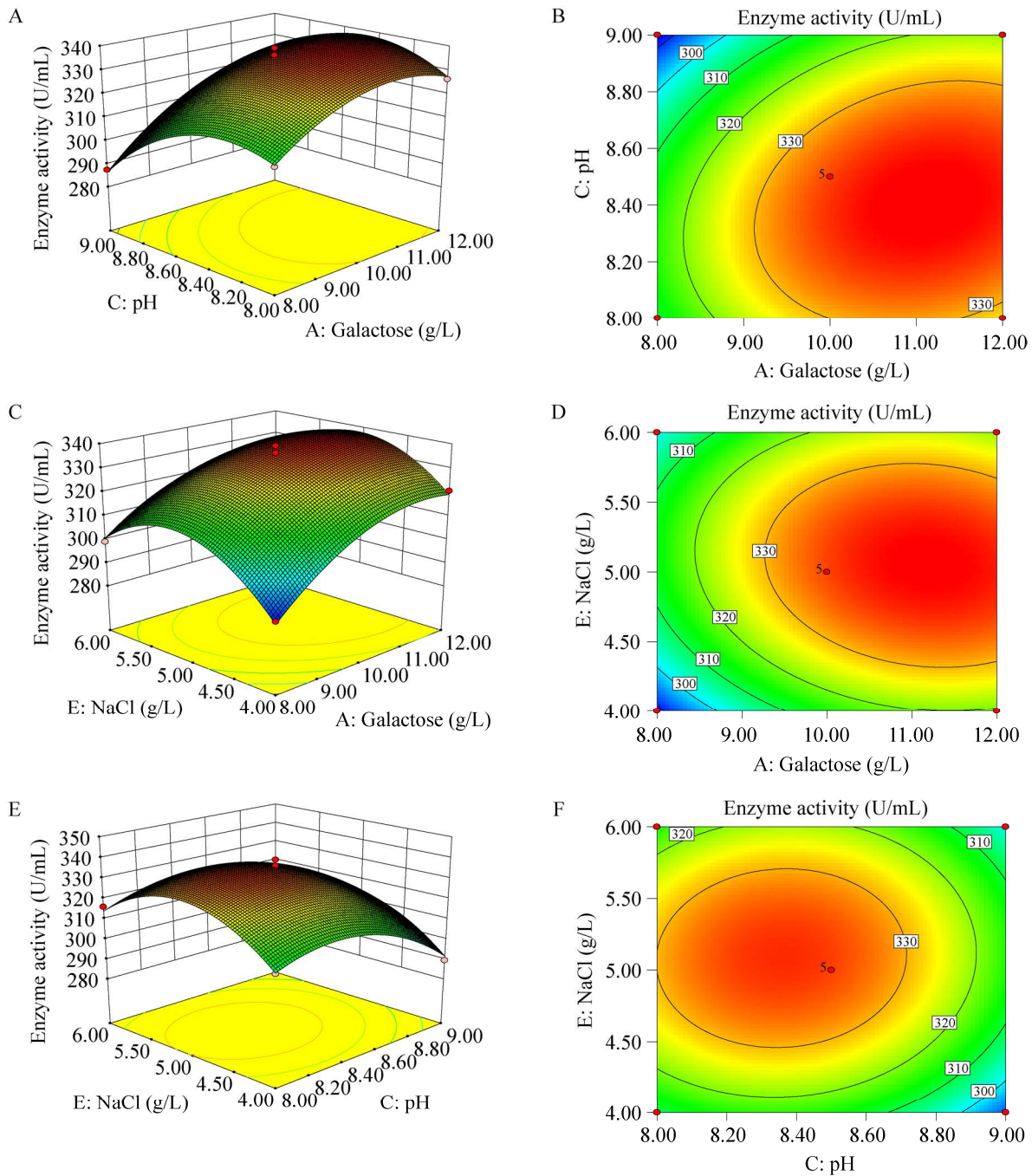


图 14 各因素交互作用对碱性蛋白酶酶活影响的响应面 and 对应等高线图 A 和 B: 半乳糖和 pH 交互作用对酶活影响的响应面 and 对应等高线图; C 和 D: 半乳糖和 NaCl 交互作用对酶活影响的响应面 and 对应等高线图; E 和 F: NaCl 和 pH 交互作用对酶活影响的响应面 and 对应等高线图

Figure 14 Response surface and corresponding contour map of the interaction of various factors on the enzyme activity of alkaline protease. A, B: Response surface and corresponding contour map of the effect of galactose and pH interaction on enzyme activity; C, D: Response surface and corresponding contour map of the effect of galactose and NaCl interaction on enzyme activity; E, F: Response surface and corresponding contour plot of the effect of NaCl and pH interaction on enzyme activity.

MKKKSLILSA	LAMSLGLAFS	AVPVANAALP	VAVQGQPLPS
LAPMLEK <b>VLP</b>	<b>AVVSVHVAGT</b>	<b>QVQRQQLPEE</b>	<b>FRRRFGPNFP</b>
<b>GQQQSSRPFE</b>	<b>GLGSGVHDA</b>	<b>AKGYVLTNNH</b>	<b>VINNADKIRV</b>
<b>QLNDGRELDA</b>	<b>KLVGRDEQSD</b>	<b>IALLQLSDTK</b>	<b>NLTAIKMADS</b>
<b>DQLRVGDFAV</b>	AVGNPFGLGQ	TATSGHISAL	GRTGLNLEGL
ENFIQTDAI	NRGNSGGALV	NLNGELIGIN	TAILAPSGGN
VGIGFAIPSN	MAQNLSQQLI	EFGEVKRGLL	GIK <b>GSEMTPD</b>
<b>MAKAFNTDAQ</b>	<b>RGAFFVSEVLP</b>	<b>KSAAAKAGIK</b>	<b>AGDILVSDG</b>
<b>KPVNSFAELR</b>	<b>AKVGTTPAGK</b>	TLKVGLLRDG	KPQEVSVTLD
NSESASTNAE	TLSPALQGVV	LSNGALPSGD	KGVKVENVDK
<b>GSTAAQIGLQ</b>	<b>KGDVIIGVNR</b>	<b>QRVDSITALR</b>	<b>KVLEAKPPVM</b>
<b>ALNIVRGTTET</b>	<b>IYLLLR</b>		

图 15 活性物质质谱鉴定序列 红色粗体部分表示活性物质与 PESS 匹配的肽段

Figure 15 Active substance mass spectrometry identification sequence. The part in bold red indicates the peptide that matches the active substance with PESS.

### 3 讨论与结论

本研究采集海南近海贝类养殖基地海泥, 对碱性蛋白酶生产菌株进行酪素平板初筛和酶活测定复筛, 获得了一株产碱性蛋白酶活力达 (153.78±2.5) U/mL 的粘质沙雷氏菌。利用单因素和响应面优化设计法, 对发酵产碱性蛋白酶培养条件进行了优化, 预测该菌株最佳产酶条件为: 半乳糖 11.09 g/L, pH 8.4, 盐度 5.04 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 接种量 0.01 的  $OD_{600}$ , 磷酸氢二钾 10 g/L, 装液量为 150 mL/500 mL, 培养温度 30 °C, 培养时间 48 h。通过实验验证, 碱性蛋白酶活力达到 (339.36±4.3) U/mL, 较优化前提高了 2.21 倍。菌株 F3 初始酶活是 *Bacillus weihenstephanensis* ZJ1502 的 3.78 倍、*Aspergillus* sp. 的 1.56 倍及 *Bacillus subtilis* W1 的 4.63 倍。优化后酶活提高倍数大于 *Aspergillus* sp.、*Bacillus subtilis* GA CAS8、*Bacillus subtilis* W1 和 *Jeotgalicoccus* sp.。由此可见, 菌株 F3 产碱性蛋白酶能力及发酵优化结果较其他菌株<sup>[20-24]</sup>有较大优势。

粘质沙雷氏菌 F3 产碱性蛋白酶能力较强, 而且发酵培养速度较快, 但工业化应用碱性蛋白酶主要以纯酶为最终目标。后续工作会分离纯化目标酶, 对酶学性质进行探究。

### REFERENCES

- [1] 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
- [2] Bashir F, Asgher M, Hussain F, Randhawa MA. Development and characterization of cross-linked enzyme aggregates of thermotolerant alkaline protease from *Bacillus licheniformis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 944-951
- [3] Annamalai N, Rajeswari MV, Balasubramanian T. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes[J]. Food and Bioproducts Processing, 2014, 92(4): 335-342
- [4] Singh Chauhan R, Mani Mishra R. Characterization of alkaline protease producing *Bacillus halodurans* RSCVS-PF21 isolated from poultry farm soil[J]. Biosciences Biotechnology Research Asia, 2020, 17(2): 385-392
- [5] Rekik H, Zaraï Jaouadi N, Gargouri F, Bejar W, Frikha F, Jmal N, Bejar S, Jaouadi B. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 1227-1239
- [6] 万文结, 薛芷筠, 张泽文, 李晓华, 程国军, 何冬兰. 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 WJ, Xue JX, Zhang ZW, Li XH, Cheng GJ, He DL. 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)
- [7] Subhashini P, Annamalai N, Saravanakumar A, Balasubramanian T. Thermostable alkaline protease from newly isolated *Vibrio* sp.: extraction, purification and characterisation[J]. Biologia, 2012, 67(4): 629-635
- [8] Ramesh S, Rajesh M, Mathivanan N. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2009, 32(6): 791-800
- [9] Baweja M, Singh PK, Sadaf A, Tiwari R, Nain L, Khare SK, Shukla P. Cost effective characterization process and molecular dynamic simulation of detergent compatible alkaline protease from *Bacillus pumilus* strain MP27[J]. Process Biochemistry, 2017, 58: 199-203

- [10] 胡志恒, 李玉梅, 李强. 海洋贝类肠道弧菌 21Z1 碱性蛋白酶的分离纯化及酶学性质[J]. 济南大学学报(自然科学版), 2018, 32(1): 77-82  
Hu ZH, Li YM, Li Q. Purification and characterization of alkaline protease from marine shellfish *Vibrio* sp. 21Z1[J]. Journal of University of Jinan: Science and Technology, 2018, 32(1): 77-82 (in Chinese)
- [11] Mehdi WA, Yusof F, Farhan LO, Mehde AA, Raus RA. Levels of antioxidant enzymes and alkaline protease from pulp and peel of sunflower[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2017, 7(6): 533-537
- [12] Nounou MI, Zaghoul TI, Ahmed NA, Eid AA, El-Khordagui LK. Skin permeability enhancement by *Bacillus subtilis* alkaline protease: application to transdermal drug delivery[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 529(1/2): 423-432
- [13] 王朋辉, 王伟贤, 杨涛, 曾晖, 芮泽宝, 李东华, 黄平. 碱性蛋白酶洗涤性能的影响因素[J]. 日用化学工业, 2021, 51(11): 1109-1117  
Wang PH, Wang WX, Yang T, Zeng H, Rui ZB, Li DH, Huang P. Influencing factors on washing performance of alkaline protease in liquid detergent[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2021, 51(11): 1109-1117 (in Chinese)
- [14] 孙凤芹, 汪保江, 李光玉, 刘秀片, 杜雅萍, 赖其良, 邵宗泽. 南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1578-1587  
Sun FQ, Wang BJ, Li GY, Liu XP, Du YP, Lai QL, Shao ZZ. Diversity of bacteria isolated from the south China Sea sediments[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(12): 1578-1587 (in Chinese)
- [15] Li SM, Tian XP, Niu SW, Zhang WJ, Zhang S, Ju JH, Zhang CS. Antimycins from marine *Streptomyces* sp. SCSIO 1635 from the south China Sea[J]. Natural Product Research and Development, 2011, 23(1): 10-14, 42
- [16] 傅雄, 李德强, 莫豪. 用紫外分光光度法测定 2709 碱性蛋白酶的活性[J]. 江苏食品与发酵, 1988, 4(2): 12-15  
Fu X, Li DQ, Mo H. Determination of the activity of 2709 alkaline protease by UV spectrophotometry[J]. Jiangsu Food and Fermentation, 1988, 4(2): 12-15 (in Chinese)
- [17] Rymaszewska A. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* on the basis of a fragment of the 16S rDNA gene[J]. Folia Biologica, 2005, 53(3/4): 199-203
- [18] 郭艳霞, 贾丽艳, 畅盼盼, 张丽, 周士琦. 响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌 YB19 产中性蛋白酶发酵条件[J]. 中国调味品, 2021, 46(4): 16-20, 37  
Guo YX, Jia LY, Chang PP, Zhang L, Zhou SQ. Optimization of fermentation conditions for neutral protease produced by *Bacillus velezensis* YB19 by response surface methodology[J]. China Condiment, 2021, 46(4): 16-20, 37 (in Chinese)
- [19] 宋立立, 李志国. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产蛋白酶的发酵条件[J]. 饲料研究, 2020, 43(7): 81-85  
Song LL, Li ZG. Optimization of fermentation conditions for protease production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology[J]. Feed Research, 2020, 43(7): 81-85 (in Chinese)
- [20] Mokashe N, Chaudhari A, Patil U. Optimal production and characterization of alkaline protease from newly isolated halotolerant *Jeotgalicoccus* sp.[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015, 4(2): 235-243
- [21] 贾天梅. 产耐热型碱性蛋白酶菌株筛选、发酵条件优化及其酶学性质研究[D]. 杭州: 浙江工商大学硕士学位论文, 2018  
Jia TM. Study on screening of thermostabilable alkaline protease strain, optimization of fermentation condition and its enzymatic properties[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2018 (in Chinese)
- [22] Mustefa Beyan S, Venkatesa Prabhu S, Mumecha TK, Gameda MT. Production of alkaline proteases using *Aspergillus* sp. isolated from injera: RSM-GA based process optimization and enzyme kinetics aspect[J]. Current Microbiology, 2021, 78(5): 1823-1834
- [23] Sathishkumar R, Ananthan G, Arun J. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015, 4(2): 214-220
- [24] 刘晓艳, 封健, 韩傲, 高宁, 连莲, 国立东. 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  
Liu XY, Feng J, Han A, Gao N, Lian L, Guo LD. 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)