

产蛋白酶波茨坦短芽孢杆菌的鉴定及产酶条件优化

梁安健¹, 石沁兰¹, 王金丽¹, 朱成林¹, 邹立扣², 朱鹏程^{3*}, 李东亮³, 唐俊妮^{1*}

(1. 西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610041) (2. 四川农业大学资源学院, 四川成都 611830)
(3. 四川中烟工业有限责任公司, 四川成都 610021)

摘要: 该研究旨在提高一株环境分离菌株的产酶效率, 为后续菌株及其蛋白酶的应用提供前期实验基础。通过水解圈法初步检测菌株 S8 的产蛋白酶能力, 并通过 16S rRNA 序列比对确认其为波茨坦短芽孢杆菌。通过单因素试验确定了最佳培养条件和培养基添加成分。并采用 Plackett-Burman 设计和最陡爬坡试验对培养条件和培养基进行响应面优化。优化结果显示, 在发酵时间为 38.70 h、菌液接种量为 1.84% (V/V)、发酵温度为 35 °C、酵母粉添加量为 23.70 g/L、胰蛋白胍添加量为 11.70 g/L、MgSO₄ 添加量为 20.20 g/L 的条件下, 菌株的产酶活力可达到 114.79 U/mL, 相比优化前提升了 209.70%。研究结果为该菌株的后续发酵应用提供了科学数据。

关键词: 波茨坦短芽孢杆菌; 产蛋白酶; 产酶条件优化; 响应面法

文章编号: 1673-9078(2024)05-73-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0648

Identification of a Protease Producing *Brevibacillus borstelensis* Strain and Optimization of Enzyme Production Conditions

LIANG Anjian¹, SHI Qinlan¹, WANG Jinli¹, ZHU Chenglin¹, ZOU Likou², ZHU Pengcheng^{3*},
LI Dongliang³, TANG Junni^{1*}

(1. College of Food Sciences and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

(2. College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611830, China)

(3. Sichuan China Tobacco Industry Co. Ltd., Chengdu 610021, China)

Abstract: In order to improve the enzyme production efficiency of an environmentally isolated strain, and provide a preliminary experimental basis for the subsequent application of the strain and its protease, the protease production ability of strain S8 was preliminarily detected using the hydrolysis circle method, and its identity as *Brevibacillus borstelensis* was confirmed by comparing the 16S rRNA sequences. The optimal culture conditions and medium components were determined through single-factor experiments. Finally, the culture conditions and medium were further optimized using response surface methodology with the help of Plackett-Burman design and the steepest ascent method. The optimization results showed that the optimal conditions are as follows: a fermentation time of 38.70 h, an inoculum size of 1.84% (V/V), a fermentation temperature at 35 °C, a yeast powder addition of 23.70 g/L, a pancreatic digest of casein addition of 11.70 g/L,

引文格式:

梁安健, 石沁兰, 王金丽, 等. 产蛋白酶波茨坦短芽孢杆菌的鉴定及产酶条件优化[J]. 现代食品科技, 2024, 40(5): 73-83.

LIANG Anjian, SHI Qinlan, WANG Jinli, et al. Identification of a protease producing *Brevibacillus borstelensis* strain and optimization of enzyme production conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 73-83.

收稿日期: 2023-05-31

基金项目: 四川省重点实验室开放课题项目 (川烟工技 [2022]220 号)

作者简介: 梁安健 (2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与食品微生物, E-mail: 1731462872@qq.com

通讯作者: 朱鹏程 (1986-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 卷烟配方技术, E-mail: 13071617@qq.com; 共同通讯作者: 唐俊妮 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品微生物, E-mail: 392783291@qq.com

and a MgSO_4 addition of 20.20 g/L. The resulting enzyme production activity of the strain reached 114.79 U/mL, which was 209.70% higher than that under non-optimized conditions. The results of this study provide scientific data for the subsequent fermentation application of this strain.

Key words: *Brevibacillus borstelensis*; protease producing; enzyme production condition optimization; response surface methodology

蛋白酶是一类能催化蛋白质肽键水解产生短肽或氨基酸的酶, 可将蛋白质的氨基酸长序列切割成小片段, 被许多人称为生物学版的瑞士军刀, 可调节大多数生理过程, 在生命周期中至关重要^[1]。其这一生物学特性被广泛应用于食品工业^[2]、医药^[3]、皮革加工^[4]以及动物饲料^[5]等领域。蛋白酶通常分布于微生物、动物内脏、植物茎叶以及果实等^[6,7], 与动植物源相比, 微生物具有极高遗传多样性, 可产生多种类型的蛋白酶, 可适应不同底物和反应条件。其次, 微生物可在简单的培养基中快速繁殖, 且可进行大规模发酵生产, 降低蛋白酶生产成本。此外, 通过优化培养条件和基因工程技术, 可进一步提高蛋白酶产量, 满足工业生产需求。最后, 微生物可通过分离、培养的方式进行保存, 并进行连续的发酵生产, 与动植物相比, 减少了对自然资源的依赖^[8]。据文章报道^[9-12], 具有产蛋白酶能力的微生物主要有米曲霉菌、黑酵母菌、粘质沙雷氏菌及芽孢杆菌等, 又以芽孢杆菌属的微生物为主要来源, 芽孢杆菌属产蛋白酶能力强, 产生的蛋白酶根据耐酸碱碱性不同, 被分为酸性、中性以及碱性蛋白酶, 这一特性在酶工业上具有重要用途, 使其成为蛋白酶生产领域的研究热点^[13]。目前研究中, 芽孢杆菌高产蛋白酶菌株主要为枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌以及解淀粉芽孢杆菌^[14], 而关于波茨坦短芽孢杆菌产蛋白酶能力的探究却鲜有报道。

因此, 本文以一株环境分离菌株为目标菌株, 首先对其进行鉴定, 然后从生长条件、培养基成分等关键工艺因素进行单因素试验, 利用 Design Expert 13 进行 Box-Behnken 试验得到并验证培养条件与培养基成分关于蛋白酶活力的模型, 探究其产蛋白酶的最佳条件, 以期能为蛋白酶工业生产方法提供理论基础, 并为菌株的后续利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株来源

菌株 S8 由四川农业大学赠予 (分离来源于环

境, 未鉴定)。

1.1.2 试剂与培养基

NaCl、HCl、NaOH、 NaCO_3 、脱脂奶粉、琼脂、干酪素、胰蛋白胨、酵母粉、牛肉浸粉、明胶、可溶性淀粉、三氯乙酸分析纯, 北京索莱宝科技有限公司; 福林酚、乳酸、乳酸钠、L-酪氨酸分析纯, 上海源叶生物科技有限公司; TSA、TSB 培养基、MRS 肉汤培养基, 青岛海博生物公司; 蛋白酶筛选培养基^[15]: 体积分数为 60% 的脱脂牛奶, 38% 超纯水, 2% 琼脂, 1 000 mL, 110 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 仪器与设备

GHP-9270D 恒温培养箱, 上海齐欣科学仪器有限公司; 5810R 冷冻离心机, 艾本德 (上海) 国际贸易有限公司; SP-726 酶标仪, 上海沛欧分析仪器有限公司; SP-176 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; MLS-3030H 高压蒸汽灭菌锅, 上海拜格生物科技发展有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株产蛋白酶的初筛与鉴定

1.2.1.1 菌种活化

取出保存在 -80 °C 冰箱中的 S8 菌液, 以 2% (V/V) 的接种量接种于 10 mL TSB 培养基中, 35 °C、180 r/min 摇床培养 24 h。

1.2.1.2 菌株产蛋白酶筛选

将蛋白酶筛选培养基倒入平板中, 静置凝固后, 打孔器打孔, 注入 150 μL 活化后的菌液, 35 °C 培养 48 h 后, 观察平板中是否出现水解圈, 以 HE 值 (水解圈直径 / 菌落直径) 初步判断菌株产蛋白酶能力^[16]。

1.2.1.3 菌株鉴定

参考潘国杨等^[17]的方法对菌株 S8 进行分子生物学鉴定, 将目标菌株 DNA 提取后送样至上海生工进行测序。

1.2.1.4 菌株生长曲线测定

参考刘银坤等^[18]的方法进行改进, 将活化后的 S8 菌液以 2% (V/V) 的接种量接种在 TSB 培养基

中, 35 °C、180 r/min 环境下培养, 每隔 2 h 于无菌环境中取样, 测定 OD₆₀₀, 空白对照为未接种菌株的 TSB 培养基置于相同的环境中培养, 使用酶标仪测定 OD₆₀₀, 每个时间点平行测定 3 次, 记录数据。

1.2.2 单因素试验探究培养条件对菌株产酶能力的影响

1.2.2.1 蛋白酶活力测定

参照 GB/T 23527-2009 《蛋白酶制剂》, 使用福林酚法测定蛋白酶活力, 以 L-酪氨酸绘制标准曲线, 再以酪蛋白为酶解反应底物, 进行蛋白酶活力测定。

1.2.2.2 培养时间对产酶能力影响

将活化菌液以 2% (V/V) 的接种量接种于 TSB 培养基中, 在 35 °C、180 r/min 条件下培养, 每隔 6 h 取样测定蛋白酶活力。

1.2.2.3 培养温度对产酶能力影响

将活化菌液以 2% (V/V) 的接种量接种于 TSB 培养基中, 分别在 20、25、30、35、40 °C, 180 r/min 条件下培养 36 h 后, 取样测定蛋白酶活力。

1.2.2.4 培养基初始 pH 值对产酶能力影响

TSB 培养基初始 pH 值调整为 4、5、6、7、8、9、10 后, 分别以 2% (V/V) 的接种量将活化菌液接种于各 pH 值梯度中, 35 °C、180 r/min 条件下培养 36 h 后, 取样测定蛋白酶活力。

1.2.2.5 接种量对产酶能力影响

将活化菌液分别按 2%、4%、6%、8%、10% (V/V) 的接种量接入 TSB 中, 35 °C、180 r/min 条件下培养 36 h, 取样测定蛋白酶活力。

1.2.3 响应面优化培养条件试验设计

1.2.3.1 Plackett-Burman (PB) 试验筛选显著因子

PB 试验可对单因素结果进行误差分析以及验证模型的充分性^[19], 并筛选出对响应值影响显著的因素, 进行后续实验。选取影响菌株产酶能力的 4 个培养条件作为自变量, 菌株蛋白酶活力 U 为响应值, 利用 Design Expert 13, 选择 N=11 的 PB 设计。每个因素设置高 (+1) 低 (-1) 两个水平, 筛选对菌株产蛋白酶活力影响最显著的 3 个因素进行后续实验^[20]。

1.2.3.2 最陡爬坡试验确定响应面中点

参照王晓洁等^[21]的方法, 进行最陡爬坡试验设计, 确保响应面得出的结果为最高点, 建立响应面拟合方程的模型, 预测酶活力最高时的培养条件。根据 PB 试验结果, 选择三个因素, 确定爬坡试验的爬坡方向及步长, 若因素估计系数为正则选取高水平, 负选取低水平, 找出酶活力最大时的培养条

件, 作为 BB 试验的中心点。

1.2.3.3 Box-Behnken (BB) 设计确定最佳培养条件

响应面试验可以得出各因素对于响应值 (蛋白酶活力) 的作用以及判断因素之间是否存在交互作用^[22]。以蛋白酶活力为响应值、PB 试验筛选出的 3 个因素为自变量, 设计三因素三水平的响应面试验, 建立多元二次回归数学方程来拟合自变量与响应值之间的函数关系, 从而预测菌株产酶的最佳培养条件。

1.2.3.4 验证试验

对模型进行显著性检验, 通过 BB 试验得到最佳产酶培养条件理论的酶活最高值, 按照得出的最佳培养条件培养后测定菌株产酶活力实际值, 将理论值与实际值进行比较, 判断模型是否存在偏差。

1.2.4 单因素试验探究培养基成分对菌株产酶的影响

1.2.4.1 不同碳源对产酶能力影响

参考蔡文等^[23]的方法, 在 TSB 培养基中分别以 1% (V/V) 的胰蛋白胨、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉作为唯一碳源, 控制其他条件不变, 于 35 °C、180 r/min 条件下培养 36 h, 取样测定蛋白酶活力, 确定最佳碳源种类。调整最佳碳源质量浓度为 5、10、15、20、25 g/L, 确定碳源最适浓度。

1.2.4.2 不同氮源对产酶能力影响

参考卢丽媛等^[24]的方法进行试验。TSB 培养基中分别以 1% (V/V) 的酵母粉、牛肉浸粉、明胶、尿素、硫酸铵、豆粕作为唯一氮源, 控制其他条件不变, 于 35 °C、180 r/min 条件下培养 36 h, 取样测定蛋白酶活力, 确定最佳碳源种类。调整最佳碳源质量浓度为 5、10、15、20、25 g/L, 确定氮源最适浓度。

1.2.4.3 不同无机盐对产酶能力影响

参考宋立立等^[25]的方法, 在 TSB 培养基中分别以 1% (V/V) 的 NaCl、CaCl₂、KNO₃、MgSO₄ 作为无机盐, 控制其他条件不变, 于 35 °C、180 r/min 条件下培养 36 h, 取样测定蛋白酶活力, 确定最佳无机盐。调整最佳无机盐质量浓度为 5、10、15、20、25 g/L, 确定无机盐最适浓度。

1.2.5 响应面优化培养基成分

1.2.5.1 最陡爬坡试验确定 BB 优化培养基中心点

通过氮源、碳源、无机盐浓度的单因素试验分析确定最陡爬坡的步长及方向, 设计试验找出产蛋白酶活力的最大值时的最佳培养基配比, 作为培养基配比优化 BB 试验的起始中心点。

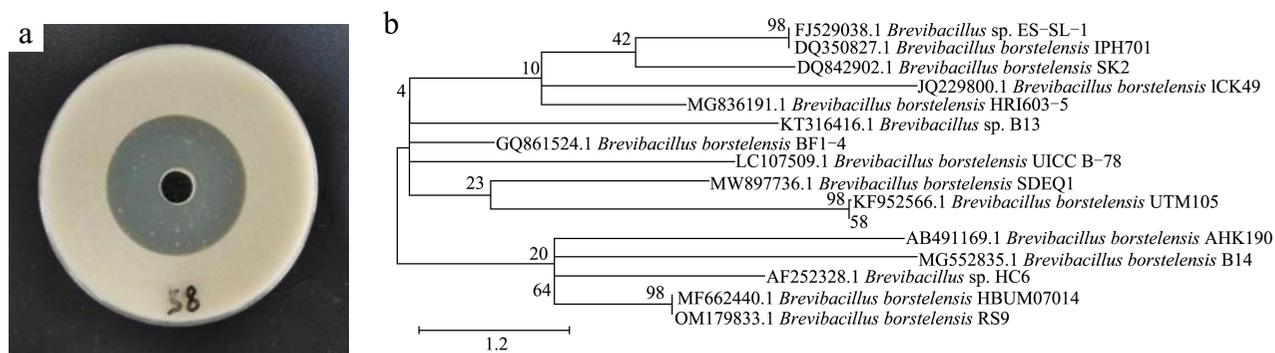


图1 S8产蛋白酶情况及比对鉴定结果

Fig.1 The protease production and identification results of strain S8

注: a 为 S8 在牛奶培养基上的生长情况, b 为菌株 S8 的系统发育树。

1.2.5.2 BB设计确定最佳培养基配比

以菌株产蛋白酶的酶活力为响应值, 氮源浓度、碳源浓度、无机盐浓度为自变量, 设计三因素三水平的响应面试验, 建立多元二次回归数学方程来拟合自变量与响应值之间的函数关系, 获得菌株产酶的最佳培养基配比^[26]。

1.2.5.3 验证试验

对 BB 试验得出的模型进行显著性检验, 并按照所得出的最佳培养基成分分配比培养菌株后, 将酶活力的实际值与模型预测值相比较, 判断模型是否有偏差。

1.3 数据处理

所有试验均进行 3 次重复性试验, 所得数据经过 IBM SPSS Statistics 27 的单因素 ANOVA 进行显著性分析 ($P < 0.05$), 使用 Origin 2022 进行绘图, 使用 DE 13 进行 PB 试验、最陡爬坡试验、BB 试验的试验设计及分析。

2 结果与分析

2.1 S8菌株产蛋白酶能力及16S rRNA鉴定结果

将 S8 菌液注入打孔后的蛋白酶筛选培养基中, 培养 36 h, 蛋白酶筛选培养基出现明显的水解圈, 表明该菌株具有产蛋白酶能力; 菌株经过 16S rRNA 鉴定并使用 MEGA 11 构建进化树, 结果显示 S8 与已知菌株 *Brevibacillus borstelensis* 处于同一分支, 且和 *Brevibacillus borstelensis* strain UTM105 亲缘关系最近, 为 99.60%。因此判断菌株 S8 为波茨坦短芽胞杆菌 (*Brevibacillus borstelensis*), 水解圈情况及系统发育树如图 1a 和图 1b 所示。

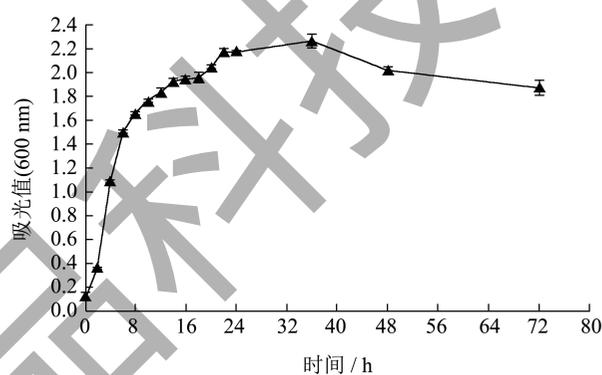


图2 波茨坦短芽胞杆菌 S8 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Brevibacillus borstelensis* S8

2.2 S8菌株的生长曲线

由图 2 可知, 0~4 h 是菌株 S8 的延滞期, 在此之后进入对数生长期, 直至 14 h 达到稳定期后, 菌株生长逐渐不再大幅波动, 36 h 达到最大值后, 菌株生长活力逐渐下降, 菌株生长趋势与陶怡等^[27]研究的枯草芽胞杆菌生长趋势基本吻合。

2.3 培养条件单因素优化结果

培养时间对菌株产酶能力结果如图 3a 所示, 菌株从 6 h 开始产酶, 培养至 12 h 蛋白酶开始堆积, 直到 36 h 活力达到最大值, 之后快速下降。李茂林等^[28]推断芽胞杆菌产酶呈现这一趋势, 是菌株在前期处于繁殖生长期, 菌体量大, 使得酶积累量增多, 而到培养后期菌体逐渐转变为产芽孢, 不再产酶, 且原先积累的酶持续消耗, 酶活力降低。因此, 确定 36 h 为最佳产酶培养时间。

郭艳霞等^[29]的研究表明, 温度是影响芽胞杆菌产蛋白酶能力的主要环境因素之一。试验结果如图 3b 所示, 在 35 °C 条件下培养, 菌株酶活力达

到最高点 80.29 U/mL, 继续培养后酶活力开始呈现下降趋势, 因此可知 35 °C 为菌株最适培养温度, 也是芽孢杆菌的最佳产酶温度^[30]。

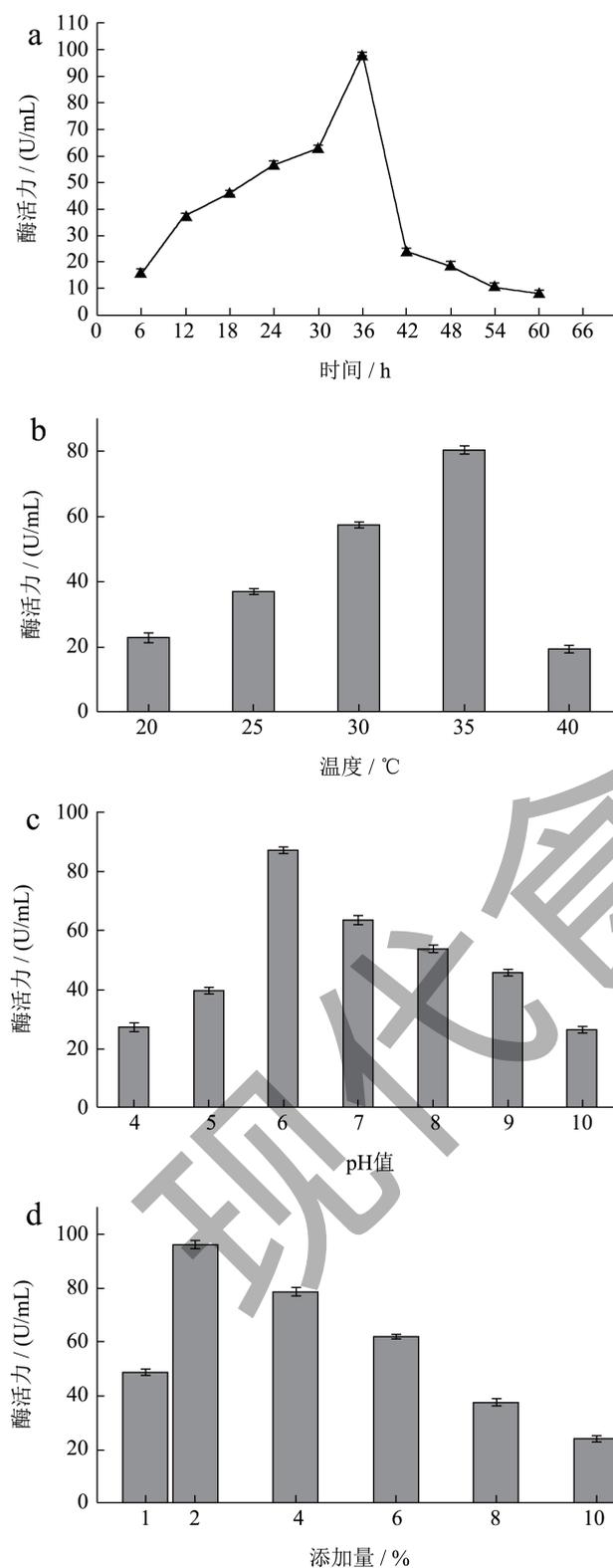


图3 不同培养条件对蛋白酶活力的影响

Fig.3 Effect of culture conditions on protease activity

环境的酸碱度是影响微生物生长的重要因素之一, 培养基 pH 值不仅影响菌株的生长繁殖, 还会对其发酵产物产生影响, 尤其是发酵产物的稳定性。根据图 3c 可知, 初始 pH 值为 6 时酶活力达到最高, 而 pH 值大于或小于 6 的培养基中培养, 酶活力随着 pH 值逐渐极端化在迅速降低, 因此确定最适 pH 值为 6^[31]。

较大的接种量可使菌体快速进入稳定期, 但由于培养基中的营养成分有限, 培养基中的营养成分很快被消耗, 限制菌株生长, 从而影响产酶能力; 较小的接种量可使对数生长期延长, 但也导致产酶能力上升缓慢, 增加成本^[32]。因而接种选择合适与否直接关系到生长周期和酶的产量。保持其他条件不变, 接种量分别为 2%、4%、6%、8%、10% (V/V) 时, 菌株 S8 产蛋白酶能力如图 3d 所示。随着接种量的增大, 菌株酶活逐渐降低。当接种量为 2% 时, 菌株产酶酶活达到最大值, 因此判断最佳初始菌液添加量为 2%。

2.4 响应面优化菌株产酶培养条件

2.4.1 PB设计筛选显著因素结果

影响菌株产蛋白酶能力的环境因素主要包括培养时间、培养温度、初始 pH 值、菌液接种量等, 利用 PB 试验对这些因素进行分析, 筛选出 3 个影响最显著的因素进行后续试验。PB 试验结果如表 1 所示, 各因素水平及效应评价如表 2 所示。根据表 2 可知, 影响最显著的 3 个因素依次为菌液接种量、培养时间、培养温度, 后续试验控制初始 pH 值不变。

表 1 PB试验结果

Table 1 Results of PB design

序号	温度/°C	时间/h	pH 值	接种量/%	酶活力/(U/mL)
1	40	24	7	6	77.65
2	30	36	5	6	29.66
3	40	36	5	6	76.06
4	40	24	7	6	27.35
5	30	24	5	2	79.94
6	40	36	5	2	89.29
7	30	36	7	2	98.65
8	30	24	5	6	13.53
9	40	36	7	2	64.06
10	30	24	7	2	46.76
11	40	24	5	2	59.58
12	30	36	7	6	30.88

表 2 PB试验各因素水平及效应评价

Table 2 Factor level and effect evaluation of PB design

编号	因素	估计系数	P 值	影响顺序
A	温度	2.90	0.15	3
B	时间	4.49	0.05	2
C	pH 值	-1.68	0.40	4
D	接种量	-5.37	0.02	1

2.4.2 最陡爬坡试验确定响应面中心点

通过 PB 试验筛选出 3 个对菌株产酶能力最显著的因素分别为接种量、培养时间、培养温度，因此以上述 3 个因素进行最陡爬坡试验确定响应面中心点。因为温度、时间的效应系数为正值，因此选择高水平进行爬坡试验，而接种量的效应系数为负值，则选择低水平进行爬坡试验，试验结果如表 3 所示，由结果可知第 5 组试验结果为最高值，因此培养条件选择 35 °C、30 h、2% 接种量作为 BB 试验的中心点。

表 3 最陡爬坡试验结果

Table 3 Result of steep climbing experimental

编号	温度/°C	时间/h	接种量/%	酶活力/(U/mL)
1	15	6	6	14.71
2	20	12	5	29.66
3	25	18	4	45.93
4	30	24	3	70.66
5	35	30	2	96.45
6	40	36	1	77.39

2.4.3 BB响应面优化菌株产酶培养条件

根据 PB 试验的结果选择 3 个对产酶能力影响最显著的因素进一步进行 BB 响应面优化试验，以最陡爬坡试验中的最高点为中点，BB 试验设计及结果如表 4 所示。使用 DE13 软件对 BB 试验的结果进行回归分析，所得的模型方程为 $Y=98.47+1.36*A-4.33*B+3.23*C-0.81*AB-5.44*AC+7.24*BC-10.92*A^2-14.76*B^2-10.01*C^2$ ，其中 Y 代表蛋白酶活力，A、B、C 分别代表时间、接种量以及温度。回归模型方差分析如表 5 所示，该模型的 F 值为 51.04，P 值 < 0.01，说明该模型极显著，失拟项 F 值为 1.44，P 值 > 0.05，则失拟项不显著。模型的决定系数 $R^2=0.99$ ，证明模型具有良好的相关性，矫正决定系数为 0.97，与 R^2 较为接近，说明

模型拟合度高。

根据获得的二次回归方程及试验方差分析结果，借助 DE13 软件可绘制不同组合因素之间的响应面分析图（图 4），进而更加直观地观察因素之间的交互作用对菌株产蛋白酶能力的影响。观察底部等高线表示越接近圆形则两因素之间交互作用不显著，反之，越接近椭圆形则表示交互作用越显著^[33,34]。由响应面图可知，随着各因素数值的增加，菌株产蛋白酶活力呈现先增加后减少的趋势，根据表 5 分析因素 A、C 之间存在交互，因素 B、C 之间存在交互，共同影响菌株产蛋白酶的酶活力，并且接种量与温度之间的交互作用最显著。

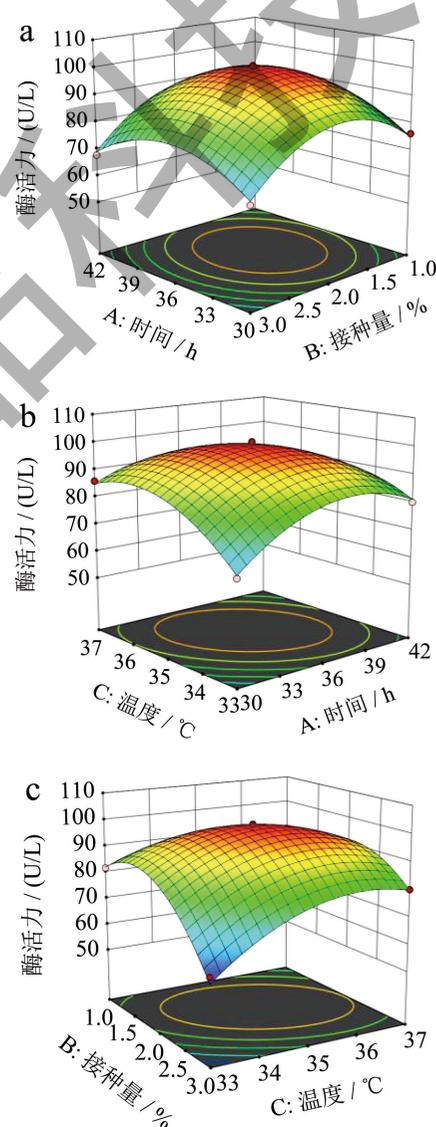


图 4 各因素交互作用对菌株产酶活力影响的响应面图

Fig.4 Contour plots, response surface plots of the interactive effect of each factor on the enzyme production activity of the strains

表 4 BB设计优化培养条件及结果

Table 4 BB design optimization of culture conditions and results

编号	A: 时间/h	B: 接种量/%	C: 温度/°C	酶活力/(U/mL)
1	36	2	35	101.16
2	36	2	35	100.10
3	42	1	35	80.60
4	36	3	37	80.12
5	36	2	35	104.72
6	36	3	33	61.16
7	36	1	37	71.76
8	30	2	33	66.56
9	30	2	37	85.88
10	36	2	35	104.72
11	36	2	35	104.75
12	42	2	37	77.64
13	30	3	35	66.60
14	36	1	33	81.76
15	30	1	35	76.20
16	42	2	33	80.10
17	42	3	35	67.76

表 5 培养条件优化模型方差分析

Table 5 Analysis of variance for the proposed quadratic polynomial model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	2 627.73	9	291.97	51.04	<0.000 1	**
A- 时间	14.74	1	14.74	2.58	0.152 5	
B- 接种量	150.34	1	150.34	26.28	0.001 4	**
C- 温度	83.33	1	83.33	14.57	0.006 6	**
AB	2.62	1	2.62	0.46	0.52	
AC	118.59	1	118.59	20.73	0.002 6	**
BC	209.67	1	209.67	36.65	0.000 5	**
A ²	501.77	1	501.77	87.71	<0.000 1	**
B ²	917.48	1	917.48	160.37	<0.000 1	**
C ²	421.60	1	421.60	73.69	<0.000 1	**
残差	40.05	7	5.72			
失拟项	20.81	3	6.94	1.44	0.355 4	
纯误差	19.23	4	4.81			
总和	2 667.78	16				

注: 无 “*” 表示差异不显著 ($P>0.05$); “**” 表示差异极显著 ($P<0.01$)。

2.4.4 模型验证试验

利用 Design Expert 13 软件进行分析后, 得到菌株产酶培养条件的最优参数为: 培养时间 38.70 h, 菌液接种量为 1.84% (V/V), 培养温度 35 °C。在此培养条件下重复 3 次试验, 测得菌株产蛋白酶活力的平均值为 95.89 U/mL, 与预测值 97.23 U/mL 偏差 1.37%, 表明该模型能较准确地预测菌株产蛋白酶活力的实际情况。

2.5 培养基成分单因素优化结果

2.5.1 最佳碳源及碳源浓度探究结果

如图 5a 所示, 在将胰蛋白胨、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉分别作为唯一培养基碳源时, 添加 1% 胰蛋白胨 (V/V) 的培养基所得的酶活力高达 78.53 U/mL, 因此判断胰蛋白胨为菌株的最佳碳源。探究胰蛋白胨质量浓度对于菌株产酶能力影响的试验结果如图 5b 所示, 当质量浓度为 10.00 g/L 时菌株产酶能力达到最大值 101.47 U/mL, 因此可判断 10.00 g/L 为最佳胰蛋白胨质量浓度。

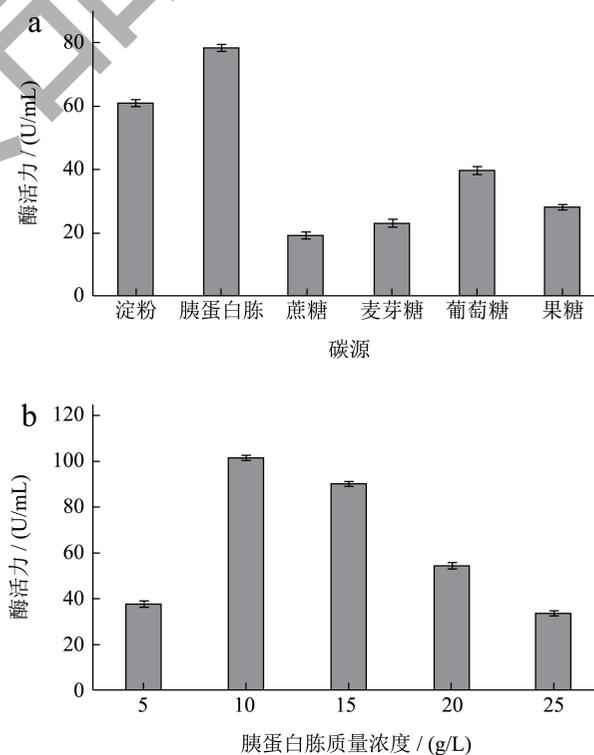


图 5 不同碳源及胰蛋白胨质量浓度对蛋白酶活力的影响

Fig.5 Effect of different carbon sources and tryptone concentrations on protease activity

2.5.2 最佳氮源及氮源浓度探究结果

如图 6a 所示, 当选择用酵母粉、牛肉浸粉等有

机氮源时,酶活力均高于硝酸铵、明胶等无机氮源,张晓瑞等^[35]认为出现这一情况的原因是有机氮源富含氨基酸、维生素等微生物生长所需的营养物质可直接参与转氨或脱氨反应,从而提高菌株产酶效果。选择用酵母粉作为菌株唯一氮源时,酶活力达到最大值 90.88 U/mL,所以选择用酵母粉作为菌株的唯一氮源进行后续试验。酵母粉浓度对菌株产酶能力影响的试验结果如图 6b 所示,当酵母粉添加质量浓度为 20.00 g/L 时酶活力达到最高值 98.82 U/mL,因此判断最佳氮源添加量为 20.00 g/L。

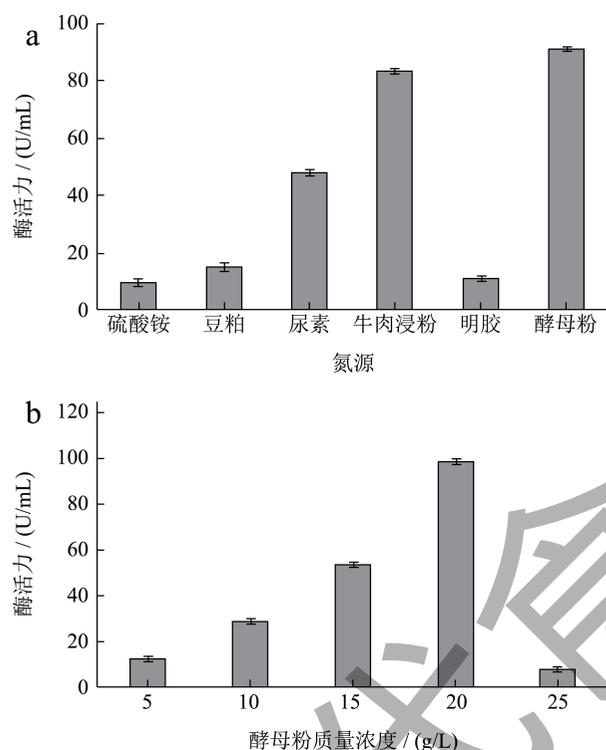


图 6 不同氮源及酵母粉质量浓度对蛋白酶活力的影响

Fig.6 Effect of different nitrogen sources and yeast meal concentrations on protease activity

2.5.3 最适无机盐种类及无机盐浓度探究结果

在酶的生理生化作用中,无机盐发挥着重要作用,它不仅是酶的重要组成成分,还可作为酶的抑制剂与激活剂^[36]。在 TSB 培养基的基础上分别添加氯化钠、氯化钙、硝酸钾、硫酸镁作为培养基唯一无机盐离子来源,最佳培养条件培养后测定蛋白酶活力,以筛选最适无机盐,结果如图 7a 所示。当选择使用硫酸镁作为唯一无机盐时,菌株产蛋白酶活力达到最高 85.88 U/mL,研究表明^[37,38]Mg²⁺通常对中性蛋白酶有激活作用,作用机理为 Mg²⁺在反应过程中置换了蛋白酶内活性部位的一部分 Zn²⁺,另

一方面其与蛋白酶结构中的非活性位点的氨基酸相结合,从而形成稳定化学键,导致酶活力的提高。因此选择硫酸镁进行最适添加量的探究,试验结果如图 7b 所示。当添加量为 20 g/L 时,蛋白酶活力达到最高 101.47 U/mL,因此最适无机盐及其质量浓度为 20 g/L 的硫酸镁。

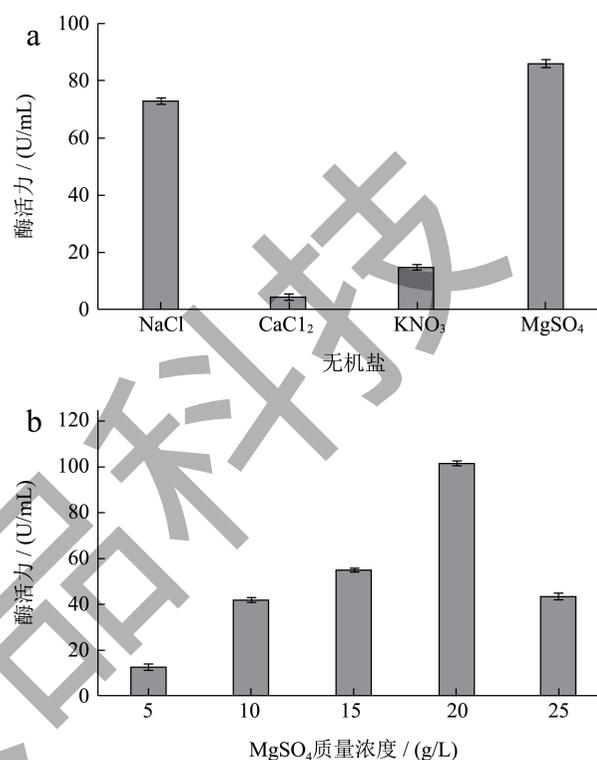


图 7 不同无机盐及 MgSO₄ 质量浓度对蛋白酶活力的影响

Fig.7 Effect of different inorganic salts and MgSO₄ concentrations on protease activity

2.6 响应面优化产酶培养基配方

2.6.1 BB设计响应面优化产酶培养基

对影响菌株产蛋白酶活力的 3 个培养基主要成分进行配比优化,表 6 为 BB 设计优化产酶培养基配方的试验设计。利用 DE-13 所得回归方程为:

$$Y=131.29-27.06*A+8.68*B+0.147\ 1*C+1.47*AB-0.882\ 4*AC+1.18*BC-36.53*A^2-13.88*B^2-6.24*C^2$$

其中 Y 代表菌株产蛋白酶活力, A、B、C 分别代表酵母粉、胰蛋白胨、MgSO₄ 的添加量。

由表 7 方差分析可知,该模型的 F 值为 543.66, P<0.01,说明该模型极显著,失拟项 F 值为 0.09, P>0.05,则失拟项不显著,模型决定系数 R²=0.998 6,说明模型具有良好相关性,模型矫正决定系数 R²_{adj}=0.996 7,与 R² 相近,因此模型拟合程度高。

表 6 BB设计优化产酶培养基配方及结果

Table 6 BB design optimize culture medium and result

编号	A: 酵母粉添加量/(g/L)	B: 胰蛋白胨添加量/(g/L)	C: MgSO ₄ 添加量/(g/L)	酶活力/(U/mL)
1	30	10	30	61.18
2	10	10	30	116.47
3	20	10	20	131.76
4	20	10	20	131.76
5	20	10	20	129.41
6	20	10	20	131.76
7	20	15	30	122.35
8	20	15	10	120.00
9	10	5	20	102.35
10	10	15	20	114.12
11	30	10	10	62.35
12	20	5	10	102.35
13	20	5	30	100.00
14	30	5	20	44.71
15	10	10	10	114.12
16	30	10	30	131.76
17	10	10	30	62.35

表 7 培养基优化模型方差分析

Table 7 Medium optimization model ANOVA

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	13 496.18	9	1 499.58	543.66	<0.000 1	**
A- 酵母粉添加量	5 857.44	1	5 857.44	2 123.58	<0.000 1	**
B- 胰蛋白胨添加量	602.25	1	602.25	218.34	<0.000 1	**
C- MgSO ₄ 添加量	0.173	1	0.173	0.062 7	0.809 4	
AB	34.54	1	34.54	12.56	0.001	**
AC	3.11	1	3.11	1.13	0.323 3	
BC	22.03	1	22.03	8.01	0.044	*
A ²	5 618.52	1	5 618.52	2 036.96	<0.000 1	**
B ²	811.45	1	811.45	294.19	<0.000 1	**
C ²	163.7	1	163.7	59.35	0.000 1	**
残差	19.31	7	2.76			
失拟项	14.88	3	4.96	4.48	0.090 8	
纯误差	4.43	4	1.11			

注：“*”表示差异显著 ($P>0.05$)；“**”表示差异极显著 ($P<0.01$)。

根据所得模型回归方程及试验报告，借助 DE13 软件绘制各因素间的响应面图（图 8）。由各因素间的响应面图可知随着各因素数值的升高，蛋白酶活力均呈现先增加后降低的趋势，且酵母粉添

加量对蛋白酶活力影响相较于胰蛋白胨添加量与 MgSO₄ 添加量更大，由于 AB 的 P 值 <0.05 ，因此判断 AB 之间的交互作用对蛋白酶活力的影响极显著，而 BC 的 P 值为 $0.04<0.05$ ，所以判断 AB 的

交互对蛋白酶活力的影响具有显著影响, A^2 、 B^2 、 C^2 的 P 值 < 0.05 , 说明各因素对酶活的独立影响影响极显著。

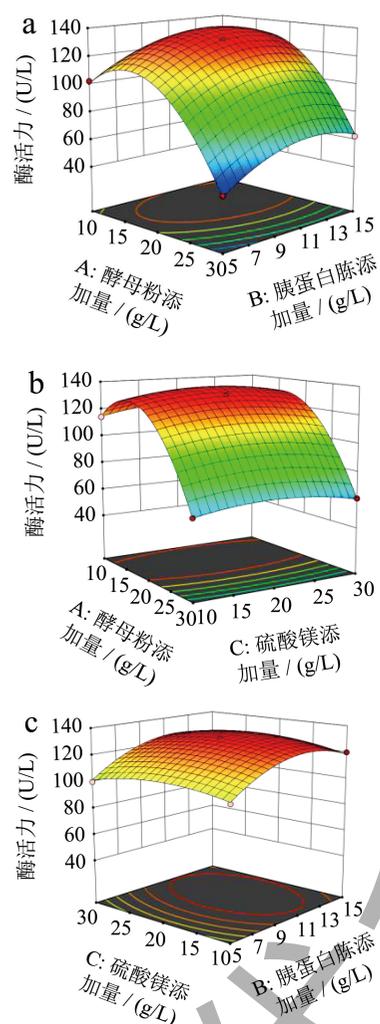


图 8 各成分添加量对蛋白酶活力影响的响应面图

Fig.8 Contour plots of the effect of the addition of peptone and magnesium sulfate on protease activity

2.6.2 培养基优化模型验证试验

利用 DE 13 软件进行最高点预测, 得到的培养基配方为 23.7 g/L 酵母粉、11.7 g/L 胰蛋白胨、20.2 g/L $MgSO_4$, 最优培养条件、最优培养基下培养, 重复 3 次试验, 测得蛋白酶活力的平均值为 114.79 U/mL, 与预测值 117.90 U/mL 偏差 2.64%, 说明模型可以预测实际的菌株产蛋白酶活力的情况, 陈秋绪等^[39]、张程等^[40]分离的芽孢杆菌优化后的酶活力分别为 45.30、40.70 U/mL, 均低于本研究所得结果。

3 结论

目前对芽孢杆菌产蛋白酶的研究主要集中在枯

草芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌, 而关于波茨坦芽孢杆菌的研究却很少。本研究鉴定了一株产蛋白酶的波茨坦短芽孢杆菌, 通过以单因素试验为基础对菌株产酶条件进行响应面优化, 为工业生产蛋白酶提供了新的菌种资源。研究表明, 菌株 S8 的最适产酶条件为发酵时间 38.70 h、菌液接种量 1.84% (V/V)、发酵温度 35 °C、酵母粉添加量 23.70 g/L、胰蛋白胨添加量 11.7 g/L、 $MgSO_4$ 添加量 20.2 g/L, 在此条件下, 蛋白酶活力最高达 114.79 U/mL, 与菌株初始酶活 37.06 U/mL 对比提高了 209.70%, 较响应面优化培养条件后的蛋白酶活力 95.89 U/mL 提高 19.7%。

目前国内关于波茨坦短芽孢杆菌的研究较少, 而国外对其产酶特性的研究主要集中在产淀粉酶、果胶酶上, 本实验探究了波茨坦短芽孢杆菌产蛋白酶的能力, 为后续菌株蛋白酶的应用提供了前置实验基础。后续还需对其酶学特性、食品应用安全性及进行实验探究, 以期能为蛋白酶工业生产、应用提供新思路。

参考文献

- [1] SHEN H B, CHOU K C. Identification of proteases and their types [J]. *Anal Biochem*, 2009, 385(1): 153-160.
- [2] GOKOGLU N, YERLIKAYA P, UCAK I, et al. Effect of bromelain and papain enzymes addition on physicochemical and textural properties of squid (*Loligo vulgaris*) [J]. *J Food Meas Charact*, 2017, 11(1): 347-353.
- [3] ORIANO M, AMATI F, GRAMEGNA A, et al. Protease-Antiprotease imbalance in bronchiectasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5996.
- [4] 吴芳彤, 曹倩荣, 郑翔, 等. 保护剂提高皮革用蛋白酶稳定性的研究[J]. *皮革与化工*, 2021, 38(4): 1-6, 22.
- [5] 沈晓勇, 林峰, 马涛, 等. 双酶法制备饲料级小麦低聚肽的工艺研究[J]. *饲料研究*, 2023, 46(5): 65-69.
- [6] 贾昕昕, 赵佳男, 季芳, 等. 高产中性蛋白酶芽孢杆菌的筛选鉴定及酶学性质研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(1): 106-112, 132.
- [7] RAJKUMAR R, JAYAPPRIYAN K R, RENGASAMY R. Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus megaterium* RRM2: application in detergent and dehairing industries [J]. *J Basic Microbiol*, 2011, 51(6): 614-624.
- [8] CONTESINI F J, MELO R R, SATO H H. An overview of *Bacillus proteases*: from production to application [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2018, 38(3): 321-334.
- [9] MAMO J, KANGWA M, FERNANDEZ H M,

- et al. Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation [J]. *Braz J Microbiol*, 2020, 51(2): 571-584.
- [10] KRISHNAMURTHY A, BELUR P D. A novel fibrinolytic serine metalloprotease from the marine *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*: Purification and characterization [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112: 110-118.
- [11] CHEN H, WU J, HUANG X, et al. Overexpression of *Bacillus circulans* alkaline protease in *Bacillus subtilis* and its potential application for recovery of protein from soybean dregs [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 968439.
- [12] KHALID A, YE M, WEI C, et al. Production of β -glucanase and protease from *Bacillus velezensis* strain isolated from the manure of piglets [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2021, 51(5): 497-510.
- [13] DU L, WANG J, CHEN W, et al. Isolation and purification of *Bacillus amyloliquefaciens* D1 protease and its application in the fermentation of soybean milk to produce large amounts of free amino acids [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2023, 195(1): 451-466.
- [14] 胡连清,刘雯雯,刘婉茹,等.糯红高粱中产蛋白酶内生酵母筛选鉴定及发酵特性研究[J].食品与发酵工业,2023,49(5):74-80.
- [15] 于德涛,李纪元,刘烁,等.水貂源高产蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及酶学性质[J].微生物学通报,2023,50(9):4078-4089.
- [16] DUSSAULT D, VU K D, LACROIX M. Enhancement of Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2016, 8(3): 170-175.
- [17] 潘国杨,安飞宇,曹恺欣,等.传统发酵豆酱中嗜盐四联球菌的分离鉴定及增鲜菌株筛选[J].食品科学,2022,43(14):111-117.
- [18] 刘银坤,李昊,李子昕,等.牦牛源短小芽孢杆菌TS1的分离鉴定及其生物学特性研究[J/OL].南京农业大学学报:1-12[2023-04-17].
- [19] 陈晨,钱林,于稳欠,等.利用响应面分析法优化深绿木霉Tr16液体发酵产孢培养基研究[J].安徽农业科学,2020,48(10):117-120.
- [20] LIU S, FANG Y, LV M, et al. Optimization of the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus sphaericus* DS11 with response surface methodology [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(20): 7924-7929.
- [21] 王晓洁,孟凡强,周立邦,等.响应面优化侧孢短芽孢杆菌产短杆菌素发酵培养基[J].食品工业科技,2022,43(4):153-160.
- [22] 刘诗宇,陈浩,王棋,等.生防细菌X33的鉴定及产抑菌活性物质培养条件优化研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2020,32(6):20-28.
- [23] 蔡文,吴鑫颖,张倩颖,等.高斯芽孢杆菌产中性蛋白酶条件优化及其对烟叶发酵的影响[J].食品与发酵科技,2022,58(3):92-98,118.
- [24] 卢丽媛,周丽艳,宋天悦,等.1株产蛋白酶菌株的分离鉴定及其产酶条件的优化[J].现代畜牧兽医,2022,398(1):1-7.
- [25] 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.
- [26] 李娜,附俊杰,刘军,等.一株产中性蛋白酶菌株的筛选及其发酵产酶条件优化[J].食品工业科技,2023,44(1):189-199.
- [27] 陶怡,黄晓润,佟硕秋,等.枯草芽孢杆菌IspA影响细菌型豆豉中四甲基吡嗪的合成研究[J].食品与发酵科技,2022,58(6):9-15.
- [28] 李茂琳,谭军,王红英,等.一株产胶原蛋白酶细菌的鉴定及产酶条件优化[J].食品工业科技,2019,40(14):118-126.
- [29] 郭艳霞,贾丽艳,畅盼盼,等.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.
- [30] 加苏尔·阿不都克里木,努尔古丽·热合曼.坎儿井水产蛋白酶菌株X-34产酶条件及其部分酶学特性研究[J].中国饲料,2018,614(18):13-17.
- [31] 朱绍辉,王斌,夏伟,等.几株高产蛋白酶菌株的分离鉴定及初步研究[J].中国畜牧兽医,2013,40(7):182-186.
- [32] 张宇洁,王丽军,李梦,等.一株产低温 β -半乳糖苷酶微生物的筛选鉴定、产酶条件及其酶学特性[J].微生物学通报,2019,46(3):609-617.
- [33] FAN H, DUMONT M J, SIMPSON B K. Extraction of gelatin from salmon (*Salmo salar*) fish skin using trypsin-aided process: optimization by Plackett-Burman and response surface methodological approaches [J]. *Food Sci Technol*, 2017, 54(12): 4000-4008.
- [34] 蔡亚慧,王青,王文玉,等.暹罗芽孢杆菌LW-1产 γ -聚谷氨酸发酵培养基的优化[J].食品工业科技,2021,42(16):163-170.
- [35] 张晓瑞,刘晓晖,付博,等.烟草中淀粉降解菌的筛选、鉴定及发酵工艺优化[J].食品与机械,2021,37(2):34-41.
- [36] 余茜,张国丽,敖晓琳.金属离子对微生物蛋白酶活性的影响及机理[J].中国食品学报,2019,19(4):287-294.
- [37] KOZAK J J, GRAY H B, GARZA R A. Structural stability of the SARS-CoV-2 main protease: can metal ions affect function? [J]. *J Inorg Biochem*, 2020, 211: 111179.
- [38] ZHANG X, YANG J, GAO H, et al. Substituting sodium by various metal ions affects the cathepsins activity and proteolysis in dry-cured pork butts [J]. *Meat Sci*, 2020, 166: 108132.
- [39] 陈秋旭,卫春会,吴玲,等.浓香型酒醋中一株高产蛋白酶菌株的鉴定及产酶条件的优化[J].食品科技,2023,48(2):7-13.
- [40] 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.