

# 碱性蛋白酶产生菌的筛选鉴定及培养优化

程仕伟<sup>1</sup>, 王梦龙<sup>1</sup>, 冯志彬<sup>1</sup>, 程显好<sup>2</sup>

(1. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025; 2. 鲁东大学 菌物科学与技术研究院, 山东 烟台 264025)

**摘要:** 通过对筛选的产碱性蛋白酶菌株进行形态观察、生理生化试验和 16S rDNA 序列分析鉴定, 确定高活力菌株为解淀粉芽孢杆菌。发酵碳源、氮源和金属盐的优化, 确定优化培养组分。对接种体积分数、培养温度和培养 pH 进行研究, 确定最佳培养条件。在最优条件下培养 18 h 后获得最大酶活力为 395.18 U/mL, 产酶能力比优化前提高了 2.55 倍。该研究为深入研究工业发酵生产碱性蛋白酶提供了参考。

**关键词:** 碱性蛋白酶; 16S rDNA; 解淀粉芽孢杆菌; 筛选鉴定; 发酵优化

中图分类号: Q 93 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2012)12—1314—06

## Isolation and Identification of the Alkaline Protease-Producing Bacteria and Optimization of Its Culture Conditions

CHENG Shi-wei<sup>1</sup>, WANG Meng-long<sup>1</sup>, FENG Zhi-bin<sup>1</sup>, CHENG Xian-hao<sup>2</sup>

(1. School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China; 2. Institute of Fungi Science and Biotechnology, Ludong University, Yantai 264025, China)

**Abstract:** Research of screening and fermentation about *Bacillus* sp. as the protease producing strain is extremely necessary due to their characteristics of heat and pH stability. In this study, strain with producing alkaline protease was screened from the offshore soil of Yantai and the morphological, physiological and biochemical characteristics as well as 16S rDNA sequence homology of the isolation were studied. From the above characteristics, the strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. For industrial production of protease, the optimum nutrition and environmental conditions were determined. Under the optimum conditions, the maximum protease activity reached at 395.18 U/mL at 18 h, which was about 2.55 fold higher than that of the original medium. The study provides reference data for further industrial fermentation production of alkaline protease.

**Keywords:** alkaline protease, 16S rDNA, *Bacillus amyloliquefaciens*, isolation and identification, optimization

收稿日期: 2012-03-26

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目(J12LD02); 鲁东大学科研基金项目(LY20083305)。

作者简介: 程仕伟(1976—), 男, 山东潍坊人, 工学博士, 讲师, 主要从事微生物酶技术方面的研究。E-mail: swbiotech@yeah.net

作为重要的商业用酶之一,蛋白酶约占工业用酶市场的60%<sup>[1]</sup>,据报道,2005年全球蛋白水解酶销售收入为1~1.2亿美元<sup>[2]</sup>。蛋白酶在食品、洗涤、纺织及皮革等行业有着广泛的应用<sup>[3]</sup>,此外随着生物催化技术的飞速发展,蛋白酶在制药和有机合成工业也有众多应用<sup>[5]</sup>。近年来碱性蛋白酶作为工业催化剂得到广泛使用,尤其是作为无磷洗衣粉的添加剂使用,使碱性蛋白酶商业制剂的销售占整个蛋白酶市场的1/3以上。

几乎所有的生物体均有蛋白酶的存在,但是只有高产率的胞外蛋白酶生产菌株才具有工业应用价值<sup>[6]</sup>。微生物生产蛋白酶技术的开发还存在产物活性不高、性质差异大、基因工程菌不稳定等问题的制约,因此筛选高产碱性蛋白酶生产菌株仍是解决诸多问题的重要手段<sup>[7]</sup>。由于芽胞杆菌的高热和酸碱稳定性,多数商业蛋白酶的生产菌株采用芽胞杆菌来源,故芽胞杆菌来源蛋白酶的筛选显得尤为重要<sup>[8]</sup>。作者从近海土壤中筛选一株产碱性蛋白酶的芽胞杆菌,经生理生化鉴定和16S rDNA序列比对进行分类,旨在提供高产蛋白酶的出发菌株,为后期深入发酵优化、酶学性质研究及基因重组菌构建提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

碱性蛋白酶产生菌:烟台近海土壤筛选得到;酪蛋白和蛋氨酸:购自Sigma公司;其余试剂均为分析纯。

### 1.2 碱性纤维素酶产生菌的分离筛选

采集山东烟台近海的有机质丰富土壤,稀释并煮沸5 min后涂布筛选培养基(L)。酪蛋白15 g,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  1.96 g,  $CaCl_2$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1.4 mg,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  1.6 mg,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  5.0 mg,  $CoCl_2$  0.5 mg,琼脂20 g,pH 9.0。在30℃培养72 h后测定透明圈与菌落直径比。挑取直径比较大菌落接种复筛培养基(在初筛培养基基础上添加20 g/L葡萄糖,pH 7.0)发酵36 h后测定酶活力。

### 1.3 菌株鉴定

**1.3.1 形态观察与生理生化鉴定** 观察菌落形态,经简单染色、革兰氏染色和芽胞染色后镜检。菌株生理生化鉴定方法参照《工业微生物实验技术》<sup>[9]</sup>,

结果与《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[10]</sup>对照。

**1.3.2 菌株16S rDNA序列分析鉴定** 菌株YT73序列由上海美吉生物医药科技有限公司测定。细菌基因组抽提试剂盒(Axygen)提取菌株基因组,得到DNA进行电泳分析。PCR引物:16S-F AGAGTTT GATCCTGGCTCAG,16S-R AAGGAGGTGATCCAGC CGCA。PCR程序设定:预变性95℃5 min,循环95℃30 s,55℃30 s,72℃90 s,35个循环,延伸10 min。电泳检测,切胶测序。将获得序列提交NCBI,获得GenBank登录号,通过Blast进行同源性比较,构建系统发育树。

### 1.4 培养组分对菌株产酶的影响

采用LB培养基在37℃和200 r/min下活化菌种,培养20 h后转接发酵培养基,考察不同碳源、氮源和金属元素对菌株YT73产碱性蛋白酶的影响。发酵24 h后测定蛋白酶活性。

### 1.5 培养条件对菌株产酶的影响

采用优化后培养组分(g/L):果糖10,酵母粉5,蛋白胨3,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  14.4,  $K_2HPO_4$  3.62,硫酸亚铁0.5,硫酸镁0.5,硫酸锌0.5,硫酸锰0.5。200 r/min下发酵24 h后测定蛋白酶活力,比较不同温度、pH值和接种量对菌株YT73产酶的影响。

### 1.6 蛋白酶活力与菌体浓度测定

国标SB/T 10317-1999法测定蛋白酶活力<sup>[11]</sup>。1 mL 1%酪蛋白40℃水浴保温5 min后加入稀释酶液1 mL,40℃反应10 min。以2 mL、0.4 mol/L三氯乙酸终止反应,继续置于水浴保温20 min后5 000 r/min离心10 min。取滤液1 mL,加5 mL 0.4 mol/L碳酸钠和1 mL Folin试剂,40℃保温20 min后测定660 nm处吸光值。空白对照在添加酪蛋白前加三氯乙酸使酶失活。酶活力单位定义为:在上述条件下,每分钟水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸的酶量为一个酶活单位。

菌体浓度测定:发酵液稀释适当倍数,以纯净水为对照,在600 nm下测定吸光值。

## 2 结果与分析

### 2.1 产酶菌株筛选

从不同土样中分离纯化出267株在pH 9.0的筛选培养基上能形成蛋白质水解圈的微生物菌株。选出10株透明圈直径与菌落直径比值大于6的菌株发酵培养36 h后,测定酶活,见表1。其中菌株

YT73 产酶能力最高,因此选取 YT73 菌株进行后续研究。

表 1 产酶菌株筛选

菌株	水解圈与透明圈直径比	酶活/(U/mL)
YT17	6.4	67.58
YT29	6.8	66.23
YT51	9.8	113.71
YT73	11.3	155.42
YT84	7.2	79.52
YT105	12.1	148.32
YT169	11.8	152.69
YT192	6.3	55.42
YT216	7.6	81.47
YT239	7	76.14

### 2.2 菌株 YT73 形态与生理生化鉴定

菌株 YT73 在筛选培养基上培养 36 h 后,呈圆形、乳白色、表面光滑且有微皱褶状突起,不透明无光泽,边缘不整齐。经显微镜检为杆状且不成链、革兰氏阳性菌、菌体大小为 2.884 6 μm,产芽孢且在菌体中央侧偏位置。菌株生理生化指标鉴定结果见表 2。对照《常见细菌系统鉴定手册》,初步判定为芽孢杆菌属。

### 2.3 菌株 YT73 的 16S rDNA 分子鉴定

以菌株 YT73 的总 DNA 为模板,采用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,检验得到一条 1 420 bp 的条带,见图 1。切胶测序得到 16S rDNA 序列(GenBank 登录号:JN657265)。将序列在 NCBI 上进行同源性比较,结果显示同源性较高的菌株为

*Bacillus sp.*,同源性为 98%~100%。采用 MEGA 软件进行系统发育树分析,结果见图 2。

表 2 生理生化试验结果

Tab.2 Results of the physiological and biochemical

生理生化试验	菌株 YT73	生理生化试验	菌株 YT73
糖酵解	-	三糖铁	-
淀粉水解	+	木糖	+
VP 测定	+	麦芽糖	+
9 g/dL NaCl	+	糊精	+
13 g/dL NaCl	+	苯丙氨酸脱氨酶	-
15 g/dL NaCl	-	硫化氢酶	-
18 g/dL NaCl	-	温度 20 °C	+
明胶液化	+	30 °C	+
甲基红试验	+	40 °C	+
过氧化氢酶	+	50 °C	-
尿素酶	-	60 °C	-

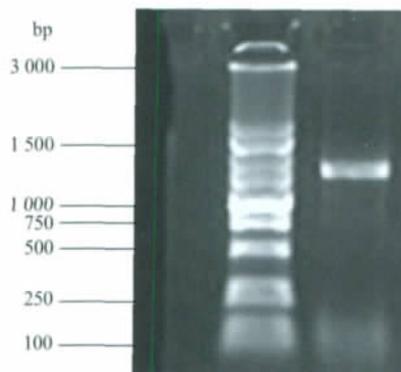


图 1 菌株 YT73 的 16S rDNA 的 PCR 产物电泳分析  
Fig.1 PCR Electrophoresis production of strain YT73 by 16S rDNA

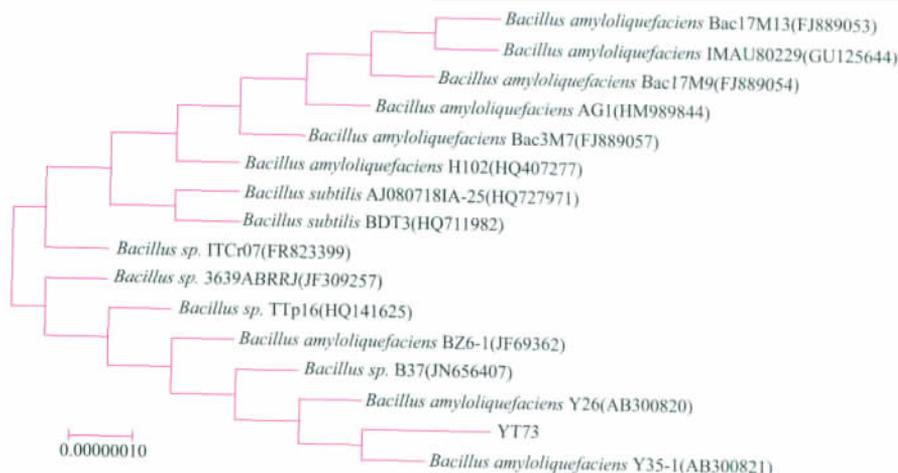


图 2 基于 16S rDNA 的系统发育树  
Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

细菌分类学家认为,当16S rDNA的同源性高于97%时,可以认为属内同种,低于95%则认为是属外成员。综合其形态与生理生化特征,将菌株YT73鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。芽孢杆菌来源蛋白酶报道多见于*Bacillus mojavensis*<sup>[12]</sup>,*Bacillus clausii*<sup>[13]</sup>,*Bacillus aquimaris*<sup>[14]</sup>,*Bacillus subtilis*<sup>[15]</sup>等,有关*Bacillus amyloliquefaciens*来源还少见报道。

### 2.4 培养组分对菌株产酶的影响

不同碳源对菌株YT73产蛋白酶的影响见图3。初始发酵培养基(g/L):碳源10,酵母粉3,蛋白胨5,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 14.4,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.62,pH 7.0。由图3可以看出,碳源对发酵产酶的影响顺序为果糖>乳糖>甘露糖>木糖>麦芽糖>葡萄糖>淀粉>糊精,其中果糖为最佳产酶碳源。

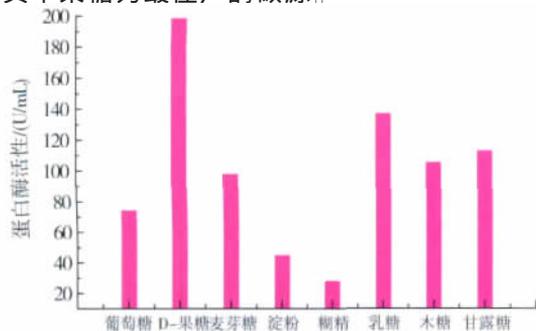


图3 碳源对发酵产酶的影响

Fig.3 Effect of carbon resources on the protease production

氮源对菌株YT73产酶的影响见图4。初始发酵培养基(g/L):果糖10,氮源8,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 14.4,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.62,pH 7.0。有机氮源有利于菌株产碱性蛋白酶,而采用速效氮源培养后产酶量均较低。酵母粉、蛋白胨和牛肉膏作氮源对产蛋白酶有利,其中酵母粉为最佳产酶氮源。

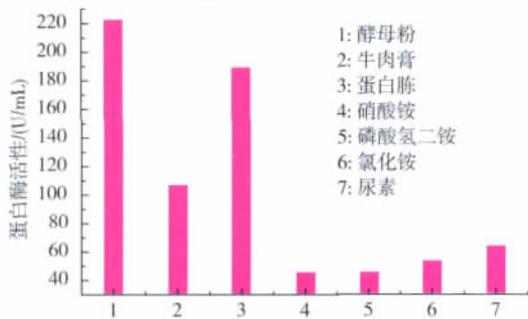


图4 氮源对发酵产酶的影响

Fig.4 Effect of nitrogen resources on the protease production

金属盐对*Bacillus amyloliquefaciens* YT73产蛋白酶的影响见图5。初始培养基(g/L):果糖10,酵母粉5,蛋白胨3,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 14.4,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.62,金属盐0.5,pH 7.0。硫酸亚铁、硫酸镁、硫酸锌和硫酸锰对碱性蛋白酶产生有激活作用,硫酸铜和氯化钙抑制碱性蛋白酶的表达。

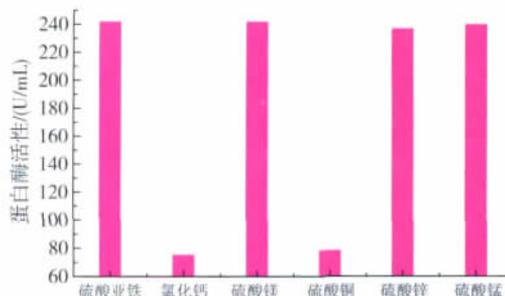


图5 金属元素对发酵产酶的影响

Fig.5 Effect of metal salts on the protease production

### 2.5 培养条件对菌株产酶的影响

采用优化后培养基考察接种量对菌株产酶的影响见图6。培养基(g/L):果糖10,酵母粉5,蛋白胨3,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 14.4,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.62,硫酸亚铁0.5,硫酸镁0.5,硫酸锌0.5,硫酸锰0.5,pH 7.0。当接种体积分数为4%时获得最大碱性蛋白酶活性。

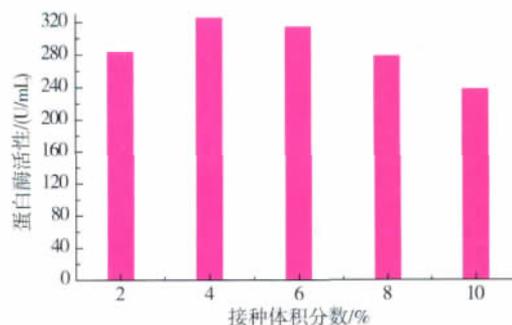


图6 接种体积分数对发酵产酶的影响

Fig.6 Effect of inoculum on the protease production

培养温度对*Bacillus amyloliquefaciens* YT73产碱性蛋白酶的影响见图7。培养温度在28~32℃之间有利于蛋白酶的生产,当培养温度过高或过低时均导致蛋白酶活性降低,其中在30℃培养温度下获得最大酶活性。

发酵培养基初始pH对菌株YT73产碱性蛋白酶的影响见图8。在pH 7~8偏碱性环境中对碱性蛋白酶的生产有利,其中培养基初始pH为7.5时获得最大酶活性,为322.53 U/mL。

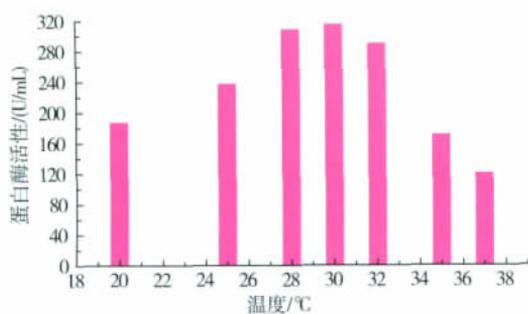


图7 培养温度对发酵产酶的影响

Fig.7 Effect of culture temperature on the protease production

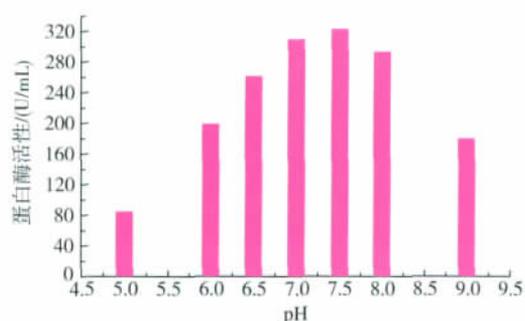


图8 初始 pH 对发酵产酶的影响

Fig.8 Effect of initial pH on the protease production

### 2.6 发酵产碱性蛋白酶培养曲线

采用优化培养基(pH 7.5),接种体积分数 4%, 30 °C和 200 r/min 下发酵培养,结果见图 9。发酵初期碱性蛋白酶产量随菌体浓度增加而升高,在 18 h 时获得最大酶活性,为 395.18 U/mL,菌体浓度为

22.9(OD<sub>600</sub>),随后酶活性呈平缓降低趋势。而在培养 22 h 时获得最大菌体量,为 25.12(OD<sub>600</sub>),此时碱性蛋白酶的活性值为 371.36 U/mL。

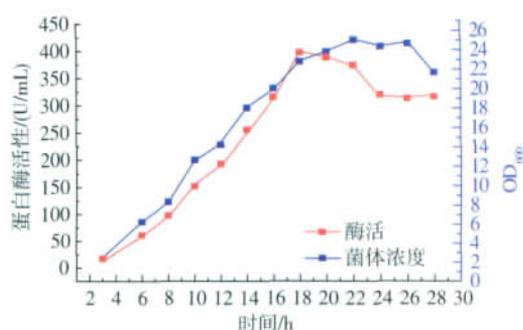


图9 发酵产碱性蛋白酶的培养曲线

Fig.9 Time course of the alkaline protease production

## 3 结语

从 267 株产碱性蛋白酶菌株中筛选到一株高产菌株 YT73,经形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析鉴定为解淀粉芽孢杆菌。对菌株 YT73 产酶培养组分和培养条件进行优化,优化后的培养基:10 g/L 果糖,5 g/L 酵母粉,3 g/L 蛋白胨,14.4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O,3.62 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.5 g/L 硫酸亚铁,0.5 g/L 硫酸镁,0.5 g/L 硫酸锌,0.5 g/L 硫酸锰,pH 7.5。在培养温度 30 °C,接种体积分数 4%下发酵 18 h 后碱性蛋白酶的活力为 395.18 U/mL,本研究为后续菌株改造和发酵罐代谢调控提供良好基础。

## 参考文献:

- [1] Banerjee C U, Sani R K, Azmi W, et al. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive[J]. *Process Biochem*, 1999, 35: 213-239.
- [2] Godfrey T, West S. *Industrial Enzymology*[M]. New York:Stocholm Press, 1996:1-7.
- [3] Haki G D, Rakshit S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review[J]. *Bioresour Technol*, 2003, 89: 17-34.
- [4] 尹静,蔡宇杰,廖祥儒,等.一株从腐烂蓝藻中分离的细菌的鉴定及其发酵产蛋白酶研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(6):911-916.  
YIN Jing, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Identification of a bacterium isolated from the decayed cyanobacteria and its fermentation for protease production[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(6):911-916. (In Chinese)
- [5] Gupta A, Khare S K. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA[J]. *Enzyme Microb Tech*, 2007, 41: 11-16.
- [6] Singh J, Vohra R M, Sahoo D K. Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture[J]. *Process Biochem*, 2004, 39: 1093-1101.
- [7] Reddy L V A, Wee Y J, Yun J S, et al. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches[J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 2242-2249.
- [8] Genckal H, Tari C. Alkaline protease production from alkaliphilic *Bacillus sp.* isolated from natural habitats[J]. *Enzyme Microb*

- Tech**, 2006, 39: 703-710.
- [9] 杜连祥等. 工业微生物实验技术[M]. 天津:天津科学技术出版社,1992:114-130.
- [10] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:349-398.
- [11] SB/T 10317-1999[S], 蛋白酶活力测定法.
- [12] Beg Q K, Sahai V, Gupta R. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor[J]. **Process Biochem**, 2003, 39: 203-209.
- [13] Oskouie S F G, Tabandeh F, Yakhchali B, et al. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*[J]. **Biochem Eng J**, 2008, 39: 37-42.
- [14] Shivanand P, Jayaraman G. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast[J]. **Process Biochem**, 2009, 44: 1088-1094.
- [15] 熊晖,展锐,苟萍,等. 丁鲷肠道中枯草芽孢杆菌蛋白酶生理生化性质的研究[J]. 生物技术, 2009, 19(4): 34-36.  
XIONG Hui, ZHAN Rui, GOU Ping, et al. Physiologic and biochemical character of the protease produced by *Bacillus subtilis* from intestine of *Tinca tinca* L[J]. **Biotechnology**, 2009, 19(4): 34-36. (in Chinese)

## 会 议 信 息

会议名称(中文): 第十一次全国营养科学大会

所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学、植物营养学、动物食品科学

开始日期: 2013-05-15                      结束日期: 2013-05-17

所在城市: 浙江省杭州市

主办单位: 中国营养学会

协办单位: 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所 中国科学院营养科学研究所 中国农业部食物与营养发展研究所

承办单位: 中国国际科技会议中心

全文截稿日期: 2013-01-31

联系人: 姚滢秋, 丁昕, 常朝辉

联系电话: 010-83554781-816、810、826

E-MAIL: cns2012@vip.126.com

会议网站: [http://www.cnsoc.org/cn/news\\_info.asp?nid=1492](http://www.cnsoc.org/cn/news_info.asp?nid=1492)

会议名称(中文): 国际转基因技术协会第十一届世界大会

会议名称(英文): 11th Transgenic Technology Meeting

所属学科: 遗传与发育生物学、生物技术与生物工程、生物信息学、进化与系统生物学

开始日期: 2013-02-25                      结束日期: 2013-02-27

所在国家: 中华人民共和国              所在城市: 广东省广州市

主办单位: 国际转基因技术协会      承办单位: 中国病理生理学会

联系人: Prof. Ming Zhao

E-MAIL: [tt2013@transtechsociety.org](mailto:tt2013@transtechsociety.org)

会议网站: <http://www.transtechsociety.org/tt2013/>