耐盐碱性蛋白酶菌株 LK-3 的筛选及酶学性质

刘可玉[1]，　宁喜斌[*1,2,3,4]

（1. 上海海洋大学 食品学院，上海 201306；2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心，上海 201306；3. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估试验室（上海），上海 201306；4. 国家淡水水产品加工技术研发分中心（上海），上海 201306）

摘要：为了寻找产碱性蛋白酶活性高且稳定性良好的野生菌株，作者从上海临港区域的东海海水中筛选出一株高产稳定且耐盐的产碱性蛋白酶菌株。对该菌株的形态学特性、生理特性以及16S rDNA 基因序列进行测序和分析，确定该菌株为同温层芽孢杆菌（*Bacillus stratosphericus*），并命名为 *B. stratosphericus* LK-3。酶学性质研究结果显示，该酶的最适作用条件为温度 35 ℃、pH 8.5、最适接种体积分数 7%，该酶在上述条件下发酵 72 h 的酶活力为（581.74±0.81）U/mL。此外该酶具有较好的耐盐性，即使在 40 g/dL 的高饱和盐质量浓度下仍然保持 22.03%的相对原始酶活力。蛋白酶的耐盐性是一个有价值的特性，可将其纯化后作为洗涤剂的生物添加剂应用于工业生产。

关键词：碱性蛋白酶；菌株 LK-3 筛选；同温层芽孢杆菌；酶学性质；耐盐菌

中图分类号：Q 936　　**文章编号：**1673-1689（2024）03-0046-08　　**DOI：**10.12441/spyswjs.20211227003

Screening and Enzymatic Properties of Salt-Tolerant Alkaline Protease Strain LK-3

LIU Keyu[1]，　*NING Xibin*[*1,2,3,4]

（1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China；2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China；3. Aquatic Product Storage and Fresh-Keeping Quality Safety Risk Assessment Laboratory （Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China；4. National R&D Branch Center for Freshwater Aquatic Products Processing Technology (Shanghai), Shanghai 201306, China）

Abstract：In order to screen a wild-type strain with high alkaline protease activity and good stability, and to achieve industrial-scale production of protease, a stable high-yield salt-tolerant alkaline protease-producing strain was isolated from seawater of the East China Sea in the Lin'gang region of Shanghai. The morphological characteristics, physiological characteristics, and 16S rDNA gene sequence of the strain were analyzed and sequenced, and the strain was identified as *Bacillus stratosphericus* and named *B. stratosphericus* LK-3. The enzymatic properties study revealed that the optimal conditions for enzyme action were 35 ℃, pH 8.5, and inoculation amount of 7%. Under these

收稿日期：2021-12-27　　**修回日期：**2022-03-25

基金项目：国家自然科学基金项目（81572989）。

* **通信作者：**宁喜斌（1964—），男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事食品安全及微生物学研究。E-mail：xbning@shou.edu.cn

conditions, the enzyme activity reached (581.74±0.81) U/mL after 72 h fermentation. In addition, the enzyme showed good salt tolerance and maintained 22.03% of the relative original enzyme activity even under a high saturated salt concentration of 40 g/dL. The salt tolerance of protease is a valuable characteristic, and the alkaline protease produced by strain LK-3 could be purified and used as a biological detergent additive in industrial production.

Keywords: alkaline protease, screening of strain LK-3, *Bacillus stratosphericus*, enzymatic properties, salt-tolerant bacteria

随着消费者对环境友好产品日益关注,越来越多的化学过程被酶法所取代[1],碱性蛋白酶占世界酶产量的 50%以上[2]。蛋白水解酶存在于所有生物体内,对细胞生长和分化至关重要。蛋白水解酶在细胞代谢过程中发挥重要作用,因此在工业界也备受关注[3]。海洋微生物能够产生多种具有重要生态作用和工业应用前景的活性物质[4],与化学催化剂相比,海洋微生物碱性蛋白酶具有特异性强、反应条件温和、易于存活或控制等优点[5],能够满足各种工业过程的市场需求[6-7]。蛋白酶是一种能够破坏蛋白质氨基酸间肽键的酶类[8]。蛋白酶在各个行业均发挥着重要的作用,如奶酪等奶制品的生产、利用羽毛、角、头发和指甲等废弃物生产高附加值的蛋白质浓缩产品,皮革脱毛,配制洗涤剂,生产营养重要的氨基酸等[9-11]。

国内外研究人员对蛋白酶的活性进行了大量研究,其中中性蛋白酶[12]和碱性蛋白酶[13]的研究最为常见。Sharma 等在蜡样芽孢杆菌 RSA1 中分离了一种新的热稳定巯基依赖性纤溶蛋白酶,并通过 Plackett-Burman 设计以及响应面法进一步优化了其产酶活力,最终验证了蜡样芽孢杆菌 RSA1 分离的纤溶蛋白酶是一种新型的纤溶蛋白酶,具有很高的稳定性和有效性,可分别作为溶栓剂和去除血斑的药物[14]。对 BT21 菌株的研究发现,其在洗涤剂中具有良好的稳定性,该实验表明了碱性蛋白酶可在去污剂配方中添加使用[15]。

蛋白水解酶对酸碱度、温度、金属离子、表面活性剂和有机溶剂等因素的耐受度一直饱受关注,寻找产碱性蛋白酶活性高且稳定性良好的野生菌株,在降低生产成本的同时实现蛋白酶的工业化生产是当下需要解决的问题[16]。针对上述问题,作者从上海临港东海海水中分离、筛选出一株高产、稳定、耐盐的碱性蛋白酶菌株,并对该菌株的部分酶学性质进行了研究,进一步探索了同温层芽孢杆菌产蛋白酶物理化学参数,旨在为今后碱性蛋白酶在工业上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种来源 2020 年 10 月于上海浦东新区临港区域东海区域采集样品,用无菌采样器完成整个样品的采集工作。采集深度为 30~100 cm 的海水样品,采集深度为 3~10 cm 的海泥样品(样品采集用三点采样法),样品采集于无菌袋内,在 1 h 内送回实验室处理。

1.1.2 试剂 DNA 提取试剂盒:Sigma-Aldrich(中国)有限公司;PCR 扩增引物:上海百力格生物技术有限公司;NaCl、$K_2HPO_4·3H_2O$、$MgSO_4·7H_2O$、Na_2CO_3、$NaH_2PO_4·12H_2O$、葡萄糖及其他试剂:均为分析纯。

1.1.3 培养基 初筛培养基(组分 g/L):蛋白胨 10.0,氯化钠 5.0,琼脂 15,121 ℃灭菌 20 min。脱脂奶粉分别于 75、65 ℃灭菌 30 min,在无菌操作台将两者混合。

干酪素固体平板(组分 g/L):A 液含有干酪素 20,$Na_2HPO_4·12H_2O$ 5.35,溶于 200 mL 蒸馏水中,70 ℃水浴 2 h;B 液含有 KH_2PO_4 15,溶于 200 mL 蒸馏水中。AB 液混合后加入琼脂 15 g,加水补齐至 1 000 mL,调节 pH 为 7.5。

复筛培养基(组分 g/L):蛋白胨 10,葡萄糖20,酵母浸膏 5,$K_2HPO_4·3H_2O$ 1.0,$NaH_2PO_4·12H_2O$ 0.5,NaCl 5,$MgSO_4·7H_2O$ 0.28;调节 pH 为 7.5。

基础培养基(组分 g/L):氯化钠 5,蛋白胨 10,牛肉膏 3;调节 pH 为 7.5。

发酵培养基:同复筛培养基。

1.2 主要仪器与设备

UV-1800PC 紫外可见分光光度计:美谱达(上海)仪器有限公司;台式高速离心机:安亭科学(上海)仪器厂;CX41RF 显微镜:东京奥林匹斯公司;

THZ-300 恒温培养摇床：上海一恒科技有限公司；GelDoc XR 凝胶成像仪：Bio-Rad(美国)公司。

1.3 实验方法

1.3.1 碱性蛋白酶产生菌的初筛 取 1 mL 海水样品加入 99 mL 基础培养基中，于 37 ℃、160 r/min 摇床中富集 24 h。使用灭菌后的生理盐水将富集后的菌液制备成 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 共 5 个梯度稀释的菌悬液，选取稀释度为 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 的菌悬液各 100 μL 涂布分离，每个梯度的菌悬液涂布 3 个平板，于 37 ℃培养 24 h。挑选能够产无色透明圈的菌株作为筛选标准，将挑选的菌株于初筛培养基上进行纯种划线，用接种环在干酪素平板上点种纯化后的菌株，于 30 ℃恒温培养箱中培养 72 h，选择产生水解圈较大的菌落，将其用于蛋白酶产生菌的后续研究，并测量菌落周围水解圈的直径(D)以及菌落的直径大小(d)，计算 D/d 值，选择 D/d 大于 4 的菌株进一步纯种划线，将所选的菌株接种于斜面后保藏于 4 ℃。

1.3.2 碱性蛋白酶产生菌的复筛 粗酶液的制备：将纯化后菌种接种于基础培养基中(100 mL 接种于 250 mL 培养基)，于 37 ℃、160 r/min 活化 24 h，在发酵培养基(100 mL 接种于 250 mL 培养基)中接入体积分数 4%活化后的菌种，30 ℃、160 r/min 发酵 72 h，于 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min，收集无菌体上清液。

碱性蛋白酶活力的测定：酶活由改进的福齐亚·侯赛因奶酪分解试验确定[17]。将含有 1 mL 酪蛋白(在 50 mmol/L 硼酸缓冲液中制备，pH 10.5)和 1 mL 无细胞酶溶液的反应混合物在 40 ℃温育 2 min，通过添加 2 mL 的 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应。静置 10 min 后，过滤沉淀物收集滤液。将 1 mL 滤液和 1 mL 福林试剂加入 5 mL 的 0.4 mol/L 碳酸钠溶液中，40 ℃水浴显色 20 min，于 680 nm 下测定吸光度。

蛋白酶酶活定义：在标准测量条件下，每分钟释放 1 μmol 酪氨酸所需的酶量定义为一个酶活单位，单位为 U/mL。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 形态学鉴定 将产酶的菌株在基础固体平板上画 S 形曲线进行分离纯化，37 ℃培养 24 h 后观察菌落形态以及显微镜下单细菌形态。

1.4.2 生理生化鉴定 对菌株理化特性进行了系统的鉴定，包括 V-P 实验、甲基红实验、ONPG、H_2S 产生实验、糖发酵实验以及麦芽糖利用实验等[18-19]。

1.4.3 16S rDNA 序列分析和系统发育树构建 根据 DNA 试剂盒提取总脱氧核糖核酸。向 PCR 反应体系(25 μL)内加入 0.5 μL 模板 DNA，0.5 μL 正向引物 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 0.5 μL 反向引物 1 492R(5′-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′)，12.5 μL 的 2×PCR Master 以及 11.0 μL 的 ddH_2O。扩增产物进行 16S rDNA 序列测定后，通过 Bankit 向 GenBank 申请登录号(GenBank Accession)，并构建发育树[20]。

1.5 酶学性质初步研究

1.5.1 酶最适作用温度及热稳定性 用适量的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)对粗酶液进行稀释，设定 25、30、35、37、40、45 ℃共 6 个反应温度。产物在 4 ℃以 10 000 r/min 离心 10 min，按照上述 6 个不同的温度条件，检查无细胞提取物中的蛋白酶酶活，将酶活最大者定义为 100%。

热稳定性：将不含细菌的粗酶液分别放置在无菌试管中，分别在 4、20、30、40、50、70 ℃保温相同的时间，每隔 12、24、36、48、72、90 h 对样品进行分析测定，将原始粗酶液的酶活定义为 100%。

1.5.2 酶最适作用 pH 及其 pH 稳定性 分别配制 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4(pH 6.0~7.0)、Tris-HCl(pH 7.5~9.0)以及 $NaHCO_3$-NaOH(pH 9.5~11.0)的缓冲液(浓度均为 50 mmol/L)。设定 pH 6.0~11.0 共 11 个反应 pH。产物在 4 ℃以 10 000 r/min 离心 10 min，按照上述不同反应 pH 的条件，检查无细胞提取物中的蛋白酶酶活，将酶活最大者定义为 100%。

pH 稳定性：测定在不同 pH(6.0~11.0)缓冲液条件下的粗酶液在最适温度下孵化 1、2 h 后粗酶液酶活的残留量，以未做处理的粗酶液的酶活为 100%。

1.5.3 酶最适接种体积分数 在最适温度以及最适 pH 条件下，设定不同的接种体积分数(1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%)，在 150 r/min 的摇床中发酵 72 h。发酵产物在 4 ℃于 10 000 r/min 离心 10 min，检查无细胞提取物中的蛋白酶酶活，将最大酶活定义为 100%。

1.5.4 最适发酵时间的确定 在最适的温度、pH 以及添加量的条件下，在摇床中以 150 r/min 分别

发酵 0、12、24、36、48、60、72、84 h。产物在 4 ℃以 10 000 r/min 离心 10 min,检查无细胞提取物中的蛋白酶酶活,将最大酶活定义为 100%。

1.5.5 NaCl 质量浓度对酶活力的影响 分别配置不同质量浓度 NaCl(1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40 g/dL)的发酵培养基溶液。将以上发酵培养基于 150 r/min 摇床发酵 72 h,分别测定不同质量浓度 NaCl 的无细胞提取物中碱性蛋白酶的活力,以未添加 NaCl 的实验组为空白对照,其酶活定义为 100%。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

2.1.1 碱性蛋白酶菌株的初筛 在脱脂牛奶固体培养基上挑取能够利用脱脂奶粉的菌株,筛选 *D*/*d* 大于 4 的菌株进行复筛实验,细菌在脱脂牛奶固体培养基以及干酪素固体培养基中产透明圈情况见图 1。

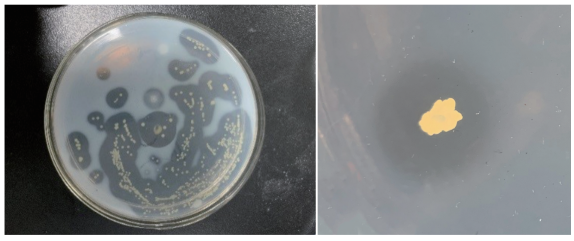


图 1 菌株产透明圈结果

Fig. 1 Results of transparent circle produced by strains

2.1.2 碱性蛋白酶菌株的复筛 从初筛培养基中挑选 158 株能够产水解圈的菌株,对得到的 7 株 *D*/*d* 大于 4 的菌株进行发酵复筛,各菌株所产碱性蛋白酶酶活反映了产酶能力。表 1 是 *D*/*d* 大于 4 的菌株发酵产蛋白酶酶活的检测结果,显示酶活最高的菌株为 LK-3,其经优化后的酶活为(581.74±0.81) U/mL,而刘晓艳等筛选菌株的酶活为 52.02 U/mL[21],徐雅芫等筛选的菌株所产蛋白酶酶活仅为 18.79 U/mL[22],Badhe 等筛选的菌株酶活为 20.74 U/mL[23]。作者将 LK-3 菌株作为目的菌株,进一步做产酶特性研究,并进行菌株鉴定。

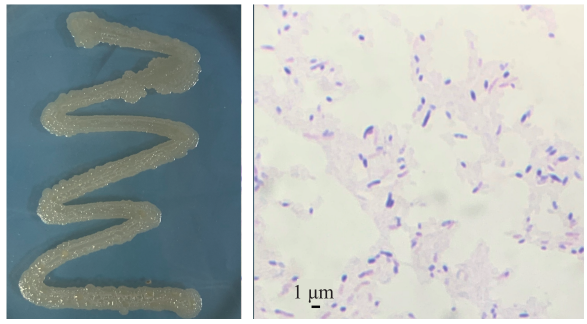
2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌种的形态观察 菌株 LK-3 为革兰氏阳性细菌,呈短杆扁平状,菌体呈群居状态,可形成明显的芽孢。菌落为不规则圆形,边缘有较小的突起,单菌落呈土黄色,不透明,菌落与培养基接触紧密容易挑取。挑取单菌落在基础固体培养基上进行划线培养,结果见图 2(a)。菌体在光学显微镜下形态见图 2(b),LK-3 菌株单细胞形态呈杆状,两端呈圆润状态。

表 1 碱性蛋白酶产生菌的筛选结果

Table 1 Screening results of alkaline protease-producing bacteria

菌株	水解圈直径 *D*/mm	菌落直径 *d*/mm	*D*/*d*	酶活/(U/mL)
LK-3	9.8	1.3	7.54	581.74
LK-4	19.9	4.5	4.42	394.37
LK-5	18.1	3.5	5.17	409.90
LK-8	9.2	2.1	4.38	396.31
LK-9	17.1	2.9	5.89	410.87
LK-22	12.2	2.5	4.88	404.08
TK-12	9.6	1.9	5.05	451.65



(a)基础培养基中菌落形态 (b)油镜下细菌形态

图 2 菌株 LK-3 的菌落形态及光学形态

Fig. 2 Colony morphology and optical morphology of strain LK-3

2.2.2 生理生化鉴定 对菌株 LK-3 分离物的形态和生理特征的鉴定结果见表 2。菌株 LK-3 革兰氏染色后为阳性,淀粉水解、MR 实验、接触酶以及吲哚实验生化鉴定结果均为阳性,V-P、ONPG、明胶液化以及 H_2S 产生实验结果显示均为阴性。依据表 2 可判定该菌为同温层芽孢杆菌属。

2.2.3 16S rDNA 鉴定及系统发育树构建 菌株 LK-3 的 PCR 产物见图 3。条带长度约为 1 500 bp,经 16S rDNA 测序后其条带长度为 1 381 bp,BLAST 序列比对结果显示,有超过 5 000 株菌与菌株 LK-3 序列相似,下载不同类别且同源性高的菌株序列,利用 MEGA7 建立系统发育树,结果见图4。发现菌株 LK-3 和 *Bacillus stratosphericus* strain 41KF2a^T (NR 042336.1)处于同一分支,且相似度为100%,表

明菌株 LK-3 为芽孢杆菌属(*Bacillus*),此外发育树中 Bootstrap 检验值为 99。结合已鉴定的生理生化以及形态学结果可确定菌株 LK-3 为同温层芽孢杆菌 (*Bacillus stratosphericus*)[24]。菌株 LK-3 的 16S rDNA 序列向 GenBank 申请的登录号为 MZ433244。

表 2 菌株 LK-3 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain LK-3

测定项目	结果	测定项目	结果
淀粉水解	+	阿拉伯糖	+
吲哚	+	甘露醇	+
硝酸盐还原	–	麦芽糖	+
酪氨酸分解	–	葡萄糖产酸	+
接触酶	+	葡萄糖产气	–
V-P 实验	–	MR 实验	+
柠檬酸利用实验	+	H_2S 产生实验	–
ONPG	–	明胶液化	–
氧化酶实验	–	甲基红	–

注:"+"代表阳性,"–"代表阴性。

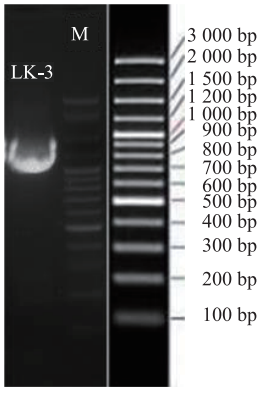


图 3 菌株 LK-3 的 PCR 产物电泳图

Fig. 3 Electrophoresis bands of PCR products of strain LK-3

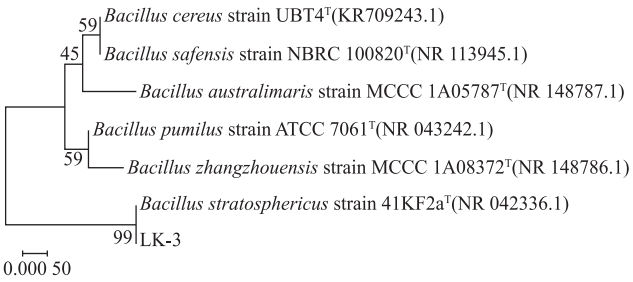


图 4 菌株 LK-3 的 16S rDNA 序列分析系统发育树

Fig. 4 16S rDNA sequence analysis phylogenetic tree of strain LK-3

2.3 菌株 LK-3 酶学性质初步研究

2.3.1 最适作用温度及热稳定性 温度是微生物生长代谢的重要因素之一。图 5(a)为 LK-3 所产碱性蛋白酶酶活与温度之间的关系。当体系温度在 25~35 ℃时,酶活不断升高;温度高于 35 ℃时,酶活开始下降;在 50 ℃时酶活仅为 45.82%,说明该酶不具有耐高温的特性;温度在 35~37 ℃时,蛋白酶保持了 80%以上的相对酶活。由图 5(a)可知,35 ℃为该酶的最适作用温度,属于中温酶类。该酶的最适作用温度低于曹红等从海洋源鱿鱼中筛选出甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)所产碱性蛋白酶的最适反应温度(40 ℃)[25],与刘晓艳等从大豆及其制品中筛选出的枯草芽孢杆菌枯草亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis*)所产中/碱性蛋白酶的最适反应温度(35 ℃)一致[21]。

从图 5(b)可知,获得的碱性蛋白酶在 4~30 ℃较宽的温度范围内具有较好的稳定性。4 ℃时稳定性最好,孵育 96 h 后活性基本保持不变。随着温度的升高和孵育时间的加长,粗酶液的相对活性逐渐降低。在 50 ℃下保温 48 h 后酶失去活性,在 40 ℃保温 90 h 后酶失去活性,在 70 ℃处理 24 h 分离获得的粗酶液完全失活。

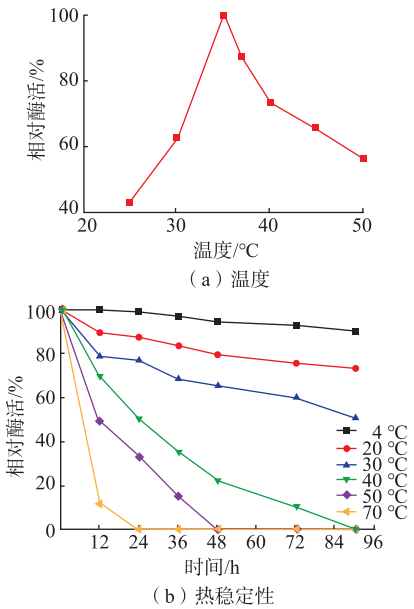


图 5 酶的最适温度及热稳定性

Fig. 5 Optimum temperature and thermal stability of enzymes

2.3.2 最适作用 pH 分别考察同温层芽孢杆菌 LK-3 所产碱性蛋白酶酶活及其稳定性与发酵培养

基起始 pH 的关系。图 6(a)为在不同 pH 下的相对酶活。当 pH 在 6.0~7.0 时,剩余相对酶活很低;当 pH 在 7.0~8.5 时,此时的相对酶活出现骤升的现象;但当 pH>8.5 时,酶活又出现骤降;当 pH 升高到 11.0 时,此时的剩余相对酶活仅为 13.37%。表明本研究所产碱性蛋白酶的最适作用 pH 为 8.5,属于碱性酶类,与 Suberu 等人报道的结果一致[26-28]。

从图 6(b)可以看出,碱性蛋白酶在 pH 7.5~10.0 相对稳定,且酶液在 pH 8.5 时最稳定。孵育 2 h 后,酶活仍保留 91.25%。在 pH 10.0 孵育 2 h 后,78%的酶活仍然存在。在 pH 11.0 处理 2 h,其酶活性依然保持 56.37%,表明该蛋白酶具有良好的 pH 稳定性。

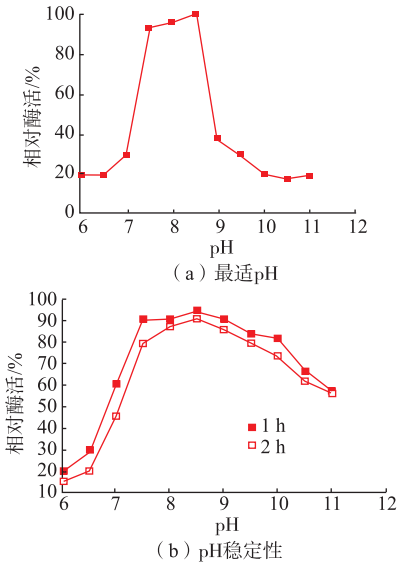


图 6 酶的最适 pH 及 pH 稳定性

Fig. 6 Optimum pH and pH stability of enzymes

2.3.3 最适接种体积分数 图 7 为接种体积分数对 LK-3 所产碱性蛋白酶的影响。接种体积分数在 1%~7%时发酵罐中的相对酶活上升速度较快,在接种体积分数为 7%时达到最大原始酶活,超过 7%后相对酶活开始下降,在接种体积分数为 9%时为最低值,再增加菌液的量,相对酶活基本保持不变,此时相对酶活降为 73.89%。

2.3.4 最适发酵时间 图 8 为发酵时间对 LK-3 所产碱性蛋白酶的影响。发酵时间在 0~12 h 时发酵罐中的相对酶活基本保持不变;12~72 h 细菌快速生长并大量产酶,相对酶活快速上升,在 60~72 h 时细菌数量达到最大值,此时相对酶活也达到最大值;超过 72 h 后部分细菌开始衰亡,相对酶活开始下降,在 12 h 内相对酶活下降到 50.96%。

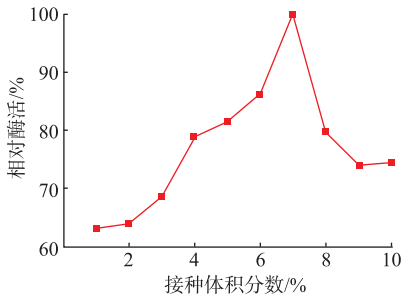


图 7 接种体积分数对 LK-3 所产碱性蛋白酶酶活的影响

Fig. 7 Effects of inoculation amount on the alkaline protease produced by LK-3

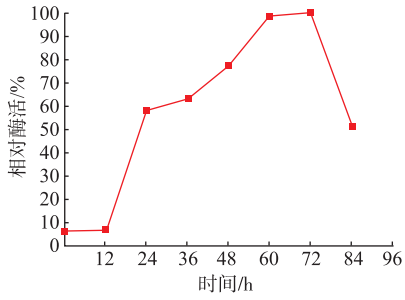


图 8 发酵时间对 LK-3 所产碱性蛋白酶酶活的影响

Fig. 8 Effects of fermentation time on the alkaline protease produced by LK-3

2.3.5 NaCl 质量浓度对酶活的影响 由图 9 可知,在氯化钠质量浓度为 1~5 g/dL 时,该蛋白酶保持了约 60%的原始酶活。在氯化钠质量浓度为 1~4 g/dL 时活性逐渐上升,在4 g/dL 时酶活达到最大值,随着 NaCl 质量浓度的继续增加,酶活开始明显下降。然而,即使在 40 g/dL 的高饱和盐质量浓度下,相对酶活仍然保持在22%。蛋白酶的耐盐性是一个有价值的特征,是洗涤剂中蛋白酶制剂的核心成分。因此,含有耐盐蛋白酶的洗涤剂可以使洗涤更有效。蛋白酶的耐盐性使其有望成为洗涤剂配方中的生物添加剂。

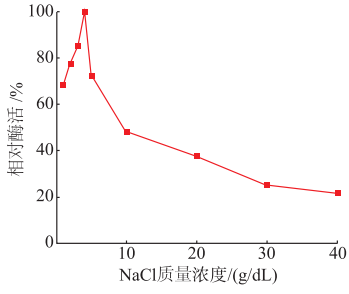


图 9 NaCl 对碱性蛋白酶活力的影响

Fig. 9 Effects of NaCl on the alkaline protease activity

3 结 语

作者用脱脂牛奶平板法和干酪素固体平板法从上海浦东新区临港区域的东海海水中分离出一株高产碱性蛋白酶的菌株 LK-3，对该菌株的形态学、生理特征、生化特征以及 16S rDNA 基因序列测序和分析后，确认该菌株为同温层芽孢杆菌属(*Bacillus stratosphericus*)，命名为 *B. stratosphericus* LK-3。菌株 LK-3 的 GenBank 登录号为MZ433 244。该酶的最适条件为温度 35 ℃、pH 8.5。在 35 ℃、pH 8.5、接种体积分数 7%的条件下发酵 72 h 为最大产酶能力，经测定菌株 LK-3 在此条件下所产碱性蛋白酶的酶活为(581.74±0.81) U/mL。该酶即使在高饱和盐质量浓度下依然保持一定的酶活，有望成为洗涤剂配方中的生物添加剂。

作者筛选高产碱性蛋白酶且性状稳定的野生型菌株同温层芽孢杆菌 LK-3，将其进行有效的基因重组及表达，可广泛应用于医药、食品等行业，为利用微生物来源进行产酶发酵提供了依据。

参考文献：

[1] HOU J J, WENG R Y, JIANG W W, et al. *In-situ* preparation of novel sedimentary rock-like Fe_3O_4 by rice-husk mesoporous silica as templates for effective remove As(Ⅲ) from aqueous solutions[J]. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2021, 9(5): 105866.

[2] KNIGHT V, SANGLIER J J, DITULLIO D, et al. Diversifying microbial natural products for drug discovery[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003, 62(5/6): 446-458.

[3] GUPTA A, ROY I, PATEL R K, et al. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp[J]. **Journal of Chromatography A**, 2005, 1075(1/2): 103-108.

[4] FARHA A K, TRAT T, PURUSHOTHAMAN A, et al. Phylogenetic diversity and biotechnological potentials of marine bacteria from continental slope of eastern Arabian Sea[J]. **Journal of Genetic Engineering & Biotechnology**, 2018, 16(2): 253-258.

[5] TAMADONI J S, BARZKAR N. Marine bacterial chitinase as sources of energy, eco-friendly agent, and industrial biocatalyst[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 120: 2147-2154.

[6] BARZKAR N. Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 161: 1216-1229.

[7] JAHROMI S T, BARZKAR N. Future direction in marine bacterial agarases for industrial applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018, 102(16): 6847-6863.

[8] BAYOUDH A, GHARSALLAH N, CHAMKHA M, et al. Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2000, 24(4): 291-295.

[9] ANWAR A, SALEEMUDDIN M. Alkaline proteases: a review[J]. **Bioresource Technology**, 1998, 64(3): 175-183.

[10] HAKIM A, BHUIYAN F R, IQBAL A, et al. Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillussubtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 by using organic municipal solid wastes[J]. **Heliyon**, 2018, 4(6): e00646.

[11] GUPTA R, BEG Q K, LORENZ P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 59(1): 15-32.

[12] SHI C, ZHANG Y, YIN Y, et al. Amino acid and phosphorus digestibility of fermented corn-soybean meal mixed feed with *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* fed to pigs[J]. **Journal of Animal Science**, 2017, 95(9): 3996-4004.

[13] NOUNOU M I, ZAGHLOUL T I, AHMED N A, et al. Skin permeability enhancement by *Bacillus subtilis* alkaline protease: application to transdermal drug delivery[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2017, 529(1/2): 423-432.

[14] SHARMA C, SALEM G E M, SHARMA N, et al. Thrombolytic potential of novel thiol-dependent fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* RSA1[J]. **Biomolecules**, 2019, 10(1): 3-10.

[15] EL K M I, ELGAMMAL E W, AHMED E F, et al. Detergent stable thiol-dependant alkaline protease produced from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21: purification and kinetics[J]. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2021, 35: 102046.

[16] EMRAN M A, ISMAIL S A, HASHEM A M. Production of detergent stable thermophilic alkaline protease by *Bacillus*

licheniformis ALW1[J]. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**，2020，26：101631.

[17] HUSSAIN F，KAMAL S，REHMAN S，et al. Alkaline protease production using response surface methodology，characterization and industrial exploitation of alkaline protease of *Bacillus subtilis* sp[J]. **Catalysis Letters**，2017，147(5)：1204-1213.

[18] HANSEN T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Amsterdam: Springer Science & Business Media, 1986.

[19] 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.

[20] 陈成，宁喜斌. 产 β- 内酰胺酶菌株的筛选、鉴定及酶学性质初步研究[J]. 食品与发酵工业，2019，45(24)：77-83.
CHEN C，NING X B. Screening，identification and analysis of β-lactamase-producing strains [J]. **Food and Fermentation Industries**，2019，45(24)：77-83.（in Chinese）

[21] 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.
LIU X Y，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）

[22] 徐雅芫，李吕木，许发芝，等. 一株产碱性蛋白酶芽孢杆菌的筛选、鉴定及应用初探[J]. 激光生物学报，2011，20(6)：830-837.
XU Y Y，LI L M，XU F Z，et al. Screening，identification and application of a new *Bacillus* producing alkaline protease[J]. **Acta Laser Biology Sinica**，2011，20(6)：830-837.（in Chinese）

[23] BADHE P，JOSHI M，ADIVAREKAR R. Optimized production of extracellular proteases by *Bacillus* subtilis from degraded abattoir waste[J]. **Journal of BioScience and Biotechnology**，2016，5：29-36.

[24] XIAO Y X，LI J，WU P J，et al. An alkaline thermostable laccase from termite gut associated strain of *Bacillus stratosphericus*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**，2021，179：270-278.

[25] 曹红，王秀娟，翁佩芳，等. 海洋源蛋白酶产生菌筛选及酶学特性的初步研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(2)：93-100.
CAO H，WANG X J，WENG P F，et al. Preliminary study on screening of high protease production strain from marine and its enzymology characteristics[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2019，38(2)：93-100.（in Chinese）

[26] SUBERU Y，AKANDE I，SAMUEL T，et al. Optimization of protease production in indigenous *Bacillus* species isolated from soil samples in Lagos，Nigeria using response surface methodology[J]. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**，2019，18：101011.

[27] 刘晓艳，封健，韩傲，等. 高产中/碱性蛋白酶的枯草芽孢杆菌 M1 菌株的筛选及条件优化[J]. 现代食品科技，2020，36(4)：157-163.
LIU X Y，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)

[28] 张玲瑜，苗建银，曹愚，等. 米糠蛋白 ACE 抑制肽的酶解制备及活性研究[J]. 食品与机械，2022，38(3)：160-166.
ZHANG L Y，MIAO J Y，CAO Y，et al. Enzymatic preparation and activity study of rice bran protein-derived ACE inhibitory peotides[J]. **Food & Machinery**，2022，38(3)：160-166.(in Chinese)