

# 耐有机溶剂蛋白酶产生菌 MSP03 的 产酶条件优化

陈健, 卢洋\*, 周翔

(连云港市食品药品检验检测中心, 江苏连云港 222000)

**摘要:**通过正交实验和单因素实验对巨大芽孢杆菌 MSP03 产耐有机溶剂蛋白酶的培养基配方和发酵产酶条件进行优化。得到最佳发酵培养基配方为:糊精 3 g/L, 豆粕粉 1 g/L,  $K_2HPO_4$  0.1 g/L。发酵条件为:装液量 70 mL/250 mL, 接种量 5%, 初始 pH 7.0, 于 25℃ 发酵 36 h。通过优化,耐有机溶剂蛋白酶活性增加到 248.65 U/mL, 是优化前的 1.7 倍, 具有潜在的工业应用价值。

**关键词:**耐有机溶剂蛋白酶; 巨大芽孢杆菌; 培养基优化; 发酵条件优化

中图分类号: Q814

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2021)S-0289-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2021.S.059

## Optimization of enzyme production conditions for strain MSP03 producing organic solvent-stable protease

CHEN Jian, LU Yang\*, ZHOU Xiang

(Lianyungang Food and Drug Inspection Center, Lianyungang 222000, China)

**Abstract:** The culture medium formula and fermentation conditions for the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus megaterium* MSP03 are optimized through orthogonal experiment and single factor experiment. The optimal fermentation medium formula are obtained as follows:  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  of dextrin,  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  of soybean meal powder and  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  of  $K_2HPO_4$ . The optimal fermentation conditions are determined as follows: the liquid volume is 70 mL/250 mL, the inoculation volume is 5%, the initial pH is 7.0, and the fermentation has been performed at 25℃ for 36 h. Through optimization, the activity of organic solvent-stable protease increases to  $248.65 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , which is 1.7 times that before optimization, and has a potential industrial application value.

**Key words:** organic solvent-stable protease; *Bacillus megaterium*; optimization of culture medium; optimization-of fermentation conditions

蛋白酶( EC 3. 4. 21-24)是工业上常用的酶,可催化肽键的水解。微生物蛋白酶,特别是来自芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)的微生物蛋白酶,已成为工业上不可缺少的生物催化剂<sup>[1]</sup>。蛋白酶广泛用于肽合成、蛋白质加工、洗涤剂添加、食品加工、制药、制革和污水处理等领域<sup>[2-4]</sup>。近年来,人们越来越多地关注蛋白酶在有机合成中的应用,因为蛋白酶在合成短肽的应用中具有许多优点<sup>[5-7]</sup>。由蛋白酶在非水或水-有机介质中合成的短肽在食品和制药行业中有广泛的应用,但由于合成过程中它们经常失活或反应速率低,因此不利于大量生产<sup>[8-9]</sup>。如果蛋白酶在有机溶剂中天然稳定并在其中表现出高活性,则它们对于合成反应将更有价值。

耐有机溶剂的细菌具有在有机溶剂存在下生存的独特能力。迄今为止,已经报道了从多种菌株中

分离出耐有机溶剂蛋白酶,可分为假单胞菌属<sup>[10]</sup>、芽孢杆菌属<sup>[11]</sup>和红球菌属<sup>[12]</sup>。从假单胞菌属中分离的耐有机溶剂蛋白酶已有报道<sup>[13]</sup>。同时,也已探索了以许多不同的芽孢杆菌种类生产有机溶剂蛋白酶,包括蜡状芽孢杆菌<sup>[14]</sup>、地衣芽孢杆菌<sup>[15]</sup>、球形芽孢杆菌<sup>[16]</sup>和枯草芽孢杆菌<sup>[17]</sup>。然而关于巨大芽孢杆菌的细胞外蛋白酶报道很少<sup>[18-20]</sup>。

来自极端微生物的酶在细胞外生产率相对较低,这极大限制了其在工业中的应用。细胞外蛋白酶的产生很大程度上受到培养基成分和其他因素的影响,例如通气、接种量、温度、pH 和发酵时间。通常,没有确定的培养基可以最佳地生产任何代谢物,因为不同微生物来源的遗传多样性会导致每种生物都有其自身的产酶条件,以最大程度地代谢产物<sup>[21]</sup>。因此,设计合适的培养基至关重要,培养基

收稿日期:2021-04-14;修回日期:2021-06-15

作者简介:陈健(1977-),男,本科,高级工程师,主要从事食品及食品相关产品检验及实验室管理工作;卢洋(1987-),女,本科,主管药师,主要从事食品与药品微生物学研究,通讯联系人,luyang6789@139.com。

的组成、浓度、收率和容积生产率都会影响产品收率<sup>[22]</sup>。Priya 等<sup>[23]</sup>从牛奶工业废料中分离出一种新颖耐有机溶剂蛋白酶的巨大芽孢杆菌 AU02, 并采用响应面法优化发酵培养基, 酶活性达到 43.6 U/mL, 而在 7 L 发酵罐中培养时酶活性提高到 53 U/mL。Liu 等<sup>[16]</sup>使用响应面法优化了球形芽孢杆菌 DS11 产耐有机溶剂蛋白酶的最适发酵培养基, 结果表明菌株在甘油 12.47 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.73 g/L 和 pH 8.25 条件下蛋白酶活性从 465.06 U/mL 增加到 1 182.68 U/mL。通过响应面法实现了枯草芽孢杆菌 DM-04 在深层发酵中最佳可产 518 U/mL 蛋白酶<sup>[17]</sup>。以上研究均表明, 培养基和发酵条件的优化对于菌株产酶量有着巨大影响。然而, 用于培养基优化的常规实验方法非常耗时, 需要大量实验来研究培养基的每个因素对产酶的影响。正交实验可以考虑变量之间的相互作用, 是优化培养基最广泛使用的统计技术。本文介绍了从巨大芽孢杆菌 MSP03 中获得耐有机溶剂蛋白酶, 涉及菌株 MSP03 发酵培养基和产酶条件的优化, 以提高耐有机溶剂蛋白酶的产酶量, 促进该酶的应用, 并为进一步研究耐有机溶剂酶的耐受机制奠定基础。

## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂及仪器

菌株巨大芽孢杆菌 MSP03, 由本实验室前期筛选所得。

糊精、葡萄糖、乳糖、果糖、酪蛋白, 国药集团化学试剂有限公司; 豆粕, 福州元柏贸易有限公司; 福林酚, 日本 Takara 生物公司; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 上海三爱思试剂有限公司; 其他生化试剂均为分析纯, 由上海生工生物工程技术有限公司提供。

SW-CJ-ICU 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; BL-50A 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司; DK-S24 电热恒温水浴锅、电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; Centrifuge 5418 小型高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; HZQ-X100 振荡培养箱, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; YP2001N 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司。

### 1.2 培养基配制

#### 1.2.1 筛选培养基

琼脂 10 g/L, 脱脂奶粉 2 g/L, 蒸馏水 500 mL, pH 自然。

#### 1.2.2 初始培养基

2216E: 蛋白胨 5 g/L, 酵母粉 1 g/L, 磷酸高铁 0.01 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.6~7.8。

NA: 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 3 g/L, NaCl 10 g/L, 蒸馏水 100 0 mL, pH 自然。

YPAD: 酵母粉膏 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

NYDA: 葡萄糖 10 g/L, 牛肉膏 8 g/L, 酵母粉 5 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

LB: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, 蒸馏水 1 000 mL。

PDB: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0

BPY: 葡萄糖 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, NaCl 5 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

NB: 牛肉膏 3 g/L, 酵母粉 5 g/L, 葡萄糖 2.5 g/L, NaCl 3 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.005 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

BPDB: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 牛肉膏 20 g/L, NaCl 1.5 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 种子液制备

吸取 100 μL 菌株至筛选培养基中, 于 37℃、180 r/min 条件下培养 24 h 至生长对数期作为种子液。

#### 1.3.2 初始培养基的筛选

选择 9 种常见的培养基, 将菌株 MSP03 种子液以 1% 接种量分别接种至初始培养基, 于 37℃、180 r/min 发酵 48 h 后, 测定不同培养基种的蛋白酶活性, 重复 3 次实验。选取酶活性较高的 LB 培养基作为基础培养基, 进行后续实验。

#### 1.3.3 单因素培养基优化

初始发酵条件: 初始 pH 7.0, 接种量 1%, 装液量 100 mL/250 mL, 温度 37℃, 180 r/min 发酵 48 h。

碳源的确定: 分别添加 5 g/L 的酵母粉、可溶性淀粉、无水葡萄糖、糊精、蔗糖、乳糖、果糖, 以酵母粉为对照。

氮源的确定: 分别添加 10 g/L 的蛋白胨、豆粕、玉米浆、尿素、牛肉膏、脱脂奶粉, 以蛋白胨为对照。

无机盐的确定: 分别添加 10 g/L 的 NaCl、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>, 以 NaCl 为对照。

#### 1.3.4 正交实验

在单因素实验的基础上, 以培养基成分(糊精、豆粕和 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 为基础按 3 因素 3 水平设计

$L_9(3^3)$  正交实验。于 37℃、180 r/min 发酵 48 h 后,测定蛋白酶活性,确定最佳培养基配方。

### 1.3.5 发酵条件优化

初始发酵条件:初始 pH 7.0,接种量 1%,装液量 100 mL/250 mL,温度 37℃,180 r/min 发酵 48 h。

根据以下方法设置培养条件,并测定蛋白酶活性。发酵温度:20、25、30、35、37℃;发酵时间:12、24、36、48、60、72 h;接种量:1%、3%、5%、8%、10%、15%;初始 pH:5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0;装液量:30、50、70、90、110 mL/250 mL。

### 1.3.6 酶活测定方法

采用福林酚法测定耐有机溶剂蛋白酶活性<sup>[24]</sup>。具体步骤如下:菌株发酵液于 12 000 r/min、4℃ 离心 5 min 后,上清液用于测酶活性。取 1 mL 1% 酪蛋白底物、2 mL 酶液混匀,于 30℃ 水浴孵育 1.5 h,加入 2 mL 三氯乙酸离心(条件同上)。取 1 mL 上清液加 5 mL NaCO<sub>3</sub>、1 mL 福林酚试剂混匀,于 40℃ 水浴孵育 20 min,测定 A<sub>680</sub>。空白样是在同等条件下通过不孵育而阻断底物与酶的反应。以组内最高酶活为 100%、与最高酶活的比值为相对酶活值。以上条件下,每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量定义为一个酶活单位,U/mL。酶活计算公式如式(1):

$$X = (A_{680} \times K \times 4) / (T \times n) \quad (1)$$

式中: $X$  为酶活力,U/mL; $K$  为吸光度常数;4 为反应体系的体积,mL; $T$  为酶促反应时间,min; $n$  为稀释倍数。

### 1.3.7 数据处理与分析

每组重复 3 次实验,结果采用平均值±标准方差( $n=3$ )表示。正交实验采用正交实验助手设计并用 SPSS statistics 23 分析,实验结果采用 Origin 2018 作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基优化

#### 2.1.1 培养基筛选结果

通过比较菌株 MSP03 在 9 种不同培养基中的酶活大小,确定该菌产耐有机蛋白酶的最适初始培养基。结果表明,菌株 MSP03 在 BPDB 培养基中的酶活最高,为 177.125 U/mL,在 LB 培养基中的酶活次之,为 154.375 U/mL(表 1)。考虑到经济因素和配制的难易度,选择 LB 培养基为初始培养基,并进行后续实验。

表 1 不同培养基对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

培养基种类	2216E	NA	YPAD	BPDB	NB
相对酶活/%	53.8	67.3	44.2	100.0	60.6
培养基种类	PDB	LB	BYP	NYDA	
相对酶活/%	52.9	86.5	82.7	45.2	

#### 2.1.2 碳源对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

选择可溶性淀粉、糊精、蔗糖等 6 种常见碳源替代 LB 培养基中碳源,研究不同碳源对菌株 MSP03 发酵产酶的影响,结果见表 2。糊精作为碳源时发酵液酶活最高,为 131.125 U/mL。

表 2 碳源对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

碳源种类	可溶性淀粉	糊精	蔗糖	乳糖	果糖	无水葡萄糖
相对酶活/%	72.5	100.0	74.5	78.4	72.5	78.0

#### 2.1.3 氮源对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

选择豆粕粉、玉米浆、尿素等 5 种常见氮源替代 LB 培养基中氮源,研究不同氮源对菌株 MSP03 发酵产酶的影响,结果见表 3。豆粕粉作为氮源时发酵液酶活最高,为 127.875 U/mL,而牛肉膏的酶活最低,为 16.875 U/mL。推测豆粕粉中含有丰富的蛋白质、氨基酸及其他多种营养成分,更有利于菌株生长。而牛肉膏中的蛋白质可能发生了某种程度的降解,无法提供菌株生长所需的氮源。因此,选择廉价的豆粕粉作为最佳氮源。

表 3 氮源对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

氮源种类	豆粕粉	玉米浆	尿素	脱脂奶粉	牛肉膏
相对酶活/%	100.0	68.3	65.4	96.2	13.5

#### 2.1.4 无机盐对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

选择 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub> 等 8 种常见无机盐添加至 LB 培养基,研究不同金属离子对菌株 MSP03 发酵产酶的影响,结果见表 4。无机盐为 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 时发酵液酶活最高,为 135 U/mL。

表 4 无机盐对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

无机盐种类	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
相对酶活/%	100.0	52.9	69.2	63.5
无机盐种类	CuSO <sub>4</sub>	BaCl <sub>2</sub>	MnSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>
相对酶活/%	58.7	70.2	62.5	75.0

#### 2.1.5 正交实验优化

根据单因素实验结果选择糊精、豆粕粉和 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 为正交实验的 3 个因素,设计 3 因素 3 水平

$L_9(3^3)$  正交实验, 结果见表 5。对比单因素实验结果, 通过  $R$  值的计算, 比较 3 个因素对菌株 MSP03 发酵产酶的影响。糊精和豆粕粉的  $R$  值较大,  $K_2HPO_4$  的  $R$  值较小。通过各个因素及交互对比, 不同因素对菌株 MSP03 发酵产酶的影响力依次为: 糊精 > 豆粕粉 >  $K_2HPO_4$ 。得到的最优培养基配方为: 糊精 3 g/L, 豆粕粉 1 g/L,  $K_2HPO_4$  0.1 g/L。在该条件下发酵, 菌株 MSP03 所产耐有机溶剂蛋白酶活为 248.65 U/mL, 为初始酶活的 1.71 倍。

表 5  $L_9(3^3)$  正交实验设计及结果分析

序号	糊精/ (g·L <sup>-1</sup> )	豆粕粉/ (g·L <sup>-1</sup> )	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / (g·L <sup>-1</sup> )	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )
1	1	1	0.1	172.5
2	1	2	0.2	32.25
3	1	3	0.3	60.75
4	2	1	0.2	69
5	2	2	0.3	30.75
6	2	3	0.1	7.785
7	3	1	0.3	115.875
8	3	2	0.1	97.875
9	3	3	0.2	167.25
$k_1$	265.5	357.375	278.16	
$k_2$	107.535	160.875	268.5	
$k_3$	381	235.785	207.375	
$R$	273.465	196.5	70.785	

## 2.2 发酵条件优化

### 2.2.1 温度对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

选择不同温度 (20、25、30、35、37℃) 下测定发酵液酶活性, 研究温度对菌株 MSP03 发酵产酶的影响, 结果见图 1。酶活性随温度的升高先增加后降低, 表明温度过高或过低都不利于菌株 MSP03 产酶, 25℃ 时酶活最高, 为 192.5 U/mL。

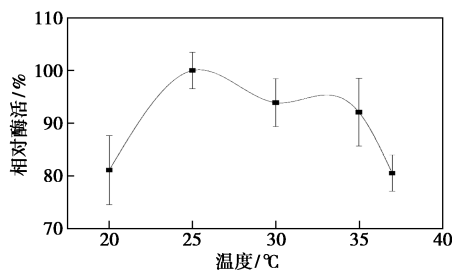


图 1 温度对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

### 2.2.2 发酵时间对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

选择不同时间 (12、24、36、48、60、72 h) 下测定发酵液酶活性, 研究时间对菌株 MSP03 发酵产酶的影响, 结果见图 2。酶活在 12~36 h 时升高, 并在

36~72 h 时降低, 发酵 36 h 时酶活最高, 为 166.125 U/mL。

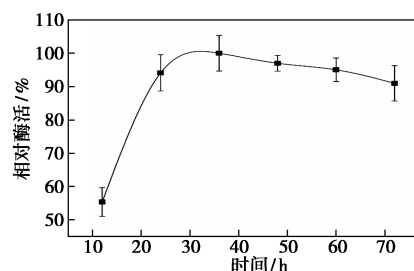


图 2 时间对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

### 2.2.3 初始 pH 对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

选择不同 pH (5.0~10.0) 下测定发酵液酶活性, 研究初始 pH 对菌株 MSP03 发酵产酶的影响, 结果见图 3。酶活在 pH 5.0~7.0 时急剧升高, 而在 pH 7.0~10.0 时缓慢降低, 初始 pH 7.0 时酶活最高, 为 197.25 U/mL。

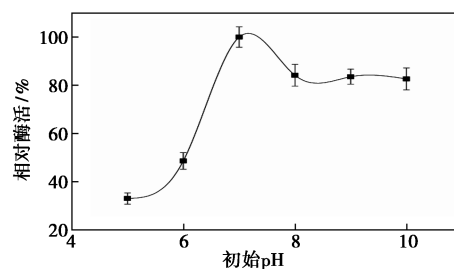


图 3 初始 pH 对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

### 2.2.4 接种量对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

选择不同接种量 (1%、3%、5%、8%、10%、15%) 下测定发酵液酶活性, 研究接种量对菌株 MSP03 发酵产酶的影响, 结果见图 4。接种量为 1%~5% 时酶活升高, 而在 5%~15% 时酶活降低, 接种量为 5% 时酶活最高, 为 165.375 U/mL。

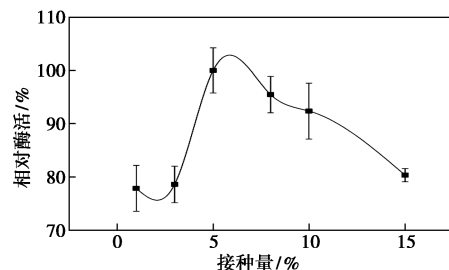


图 4 接种量对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

### 2.2.5 装液量对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

选择不同装液量 (30~110 mL/250 mL) 下测定发酵液酶活性, 研究接种量对菌株 MSP03 发酵产酶的影响, 结果见图 5。装液量为 30~70 mL/250 mL 时酶活缓慢升高, 而在 70~110 mL/250 mL 时酶活

急剧降低,装液量 70 mL/250 mL 时酶活最高,为 174.375 U/mL。

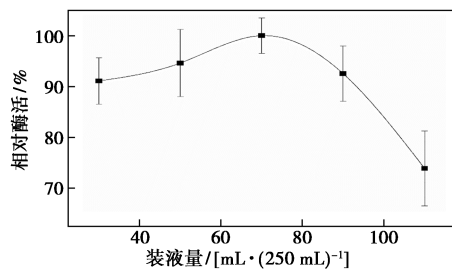


图5 装液量对菌株 MSP03 发酵产酶的影响

### 3 结论

本研究利用正交实验优化了巨大芽孢杆菌 MSP03 的发酵培养基配方,得到最佳配方为:糊精 3 g/L,豆粕粉 1 g/L,  $K_2HPO_4$  0.1 g/L。通过单因素实验优化了菌株 MSP03 发酵产酶条件,结果表明,菌株 MSP03 在装液量 70 mL/250 mL、接种量 5%、初始 pH 7.0、于 25℃ 发酵 36 h 时产酶量最大。通过优化,耐有机溶剂蛋白酶酶活增加到 248.65 U/mL,是优化前的 1.7 倍。

### 参考文献

[1] Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline proteases: A review [J]. *Biore-source Technology*, 1998, 64(3): 175-183.

[2] 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.

[3] Aladdin A, Alsaheb R, Pareek A, et al. Biotechnological aspects and pharmaceutical applications of bacterial proteases [J]. *Der Pharmacia Lettre*, 2017, 9(2): 9-20.

[4] 秦艳梅, 刘春卯, 郑翔, 等. 微生物中性蛋白酶在食品工业的最新进展及应用前景 [J]. *食品工业*, 2017, 38(3): 210-213.

[5] Carrea G, Riva S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2000, 39(13): 2226-2254.

[6] Panke S, Held M, Wubbolts M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(4): 272-279.

[7] Waghmare S R, Gurav A A, Mali S A, et al. Purification and characterization of novel organic solvent tolerant 98 kDa alkaline protease from isolated *Stenotrophomonas maltophilia* strain SK [J]. *Protein Expression and Purification*, 2015, 107: 1-6.

[8] Ogino H, Yamada M, Watanabe F, et al. Peptide synthesis catalyzed by organic solvent-stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 in monophasic aqueous-organic solvent systems [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88(5): 513-518.

[9] Kumar D, Bhalla T C. Microbial proteases in peptide synthesis: Approaches and applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 66(6): 726-736.

[10] Ramos J L, Duque E, Huertas M J, et al. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(14): 3911-3916.

[11] Bustard M T, Whiting S, Cowan D A, et al. Biodegradation of high-concentration isopropanol by a solvent-tolerant thermophile, *Bacillus pallidus* [J]. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2002, 6(4): 319-323.

[12] Paje M L, Neilan B A, Couperwhite I A. *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene [J]. *Microbiology*, 1997, 143(Pt 9): 2975-2981.

[13] Tang X Y, Pan Y, Li S, et al. Screening and isolation of an organic solvent-tolerant bacterium for high-yield production of organic solvent-stable protease [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 7388-7392.

[14] Xu J, Jiang M, Sun H, et al. An organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Bacillus cereus* WQ9-2: Purification, biochemical properties, and potential application in peptide synthesis [J]. *Bioresource Technol*, 2010, 101(20): 7991-7994.

[15] Rachadech W, Navacharoen A, Ruangsit W, et al. An organic solvent-, detergent-, and thermostable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5 [J]. *Microbiology*, 2010, 79(5): 620-629.

[16] 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]. *Bioresource Technol*, 2010, 101(20): 7924-7929.

[17] Rai S K, Mukherjee A K. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwpirase) from *Bacillus subtilis* DM-04 [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48(2): 173-180.

[18] Keay L, Feder J, Garrett L R, et al. *Bacillus megaterium* neutral protease, a zinc-containing metalloenzyme [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1971, 229(3): 829-835.

[19] Kuhn S, Fortnagel P. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding a calcium-dependent exoproteinase from *Bacillus megaterium* ATCC 14581 [J]. *J Gen Microbiol*, 1993, 139(1): 39-47.

[20] Wittchen K D, Meinhardt F. Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement [J]. *Applied Microbiology Biotechnol*, 1995, 42(6): 871-877.

[21] Ellaiah P, Srinivasulu B, Adinarayana K. A review on microbial alkaline proteases [J]. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2002, 61(9): 690-704.

[22] Joachimsthaler E A, Stam A. Four approaches to the classification problem in discriminant analysis: An experimental study [J]. *Decision Sciences*, 1988, 19(2): 322-333.

[23] Priya J D, Divakar K, Prabha M S, et al. Isolation, purification and characterisation of an organic solvent-tolerant  $Ca^{2+}$ -dependent protease from *Bacillus megaterium* AU02 [J]. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 2014, 172(2): 910-932.

[24] 胡晟源, 刘姝, 来蒋丽, 等. 耐有机溶剂蛋白酶产生菌 MSP05 的筛选、鉴定及酶学性质研究 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(21): 103-107, 113. ■