



一株产碱性蛋白酶菌株的筛选鉴定及酶学特性研究

万文结, 薛芷筠, 张泽文, 李晓华, 程国军, 何冬兰*

中南民族大学生命科学院, 湖北 武汉 430074

摘要:【目的】从丝茅草中筛选得到产蛋白酶菌株并研究驯化过程中微生物群落结构, 以及探究该菌株的生长特性和蛋白酶的酶学特性。【方法】通过高通量测序探究来源于丝茅草的菌株在不同培养条件下细菌种类及丰度, 通过选择性培养基来筛选能够分解酪素并产生蛋白酶的菌株, 通过单因素试验方法确定环境因子对菌株生长和蛋白酶活性的影响。【结果】微生物群落结构在基础培养基和牛肉膏蛋白胨培养基中不同。通过含酪素的选择性培养基里筛选到 1 株产蛋白酶菌株 H-16 经生理生化试验和 16S rDNA 鉴定知该菌株属于 *Escherichia marmotae*, 菌株 H-16 能产生分子量为 70 kDa 左右的单亚基蛋白酶。胰蛋白胨、蔗糖、30 °C 或 35 °C、pH 7 分别为菌株生长的最适氮源、碳源、温度和 pH。菌株 H-16 分泌的蛋白酶最适 pH 为 6-8, 在 50 °C 及 6% 盐度以下酶活性几乎不受影响。此外, Cu(II) 和 Ag(I) 等金属离子能够抑制蛋白酶的活性。【结论】该菌株 H-16 为嗜中温菌株, 能够产生碱性蛋白酶。

关键词: 蛋白酶, 菌株筛选, 分子鉴定, 酶学性质

蛋白酶是一组能够催化水解肽键的酶, 其广泛存在于动物内脏、植物茎叶及果实和微生物中。蛋白酶按照其反应的最适 pH 值, 可分为酸性蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶^[1]。蛋白酶作为最重要的工业酶之一, 占据着超过 65% 的工业酶市场^[2-3], 其中微生物产蛋白酶占据世界工业酶总量的 40%^[4]。在过去的几十年里, 一些产蛋白酶的微生物陆续被发现, 如真菌类中的霉菌及酵母菌^[5-7]等, 细菌中的枯草芽孢杆菌属 (*Bacillus subtilis*)^[8-9], 盐单胞菌属 (*Halomonas*)^[10] 和短芽孢

菌属 (*Brevibacillus*)^[11] 等。近年来, 世界各地对蛋白酶的需求呈现上升的趋势, 人们愈发关注高产蛋白酶菌株的研究。倪永清等^[12] 从天山一号冰川底部筛选得到 27 株产蛋白酶的耐低温菌株。陈明霞等^[13] 从北极海水样品中分离出 68 株产低温蛋白酶菌株。如何获得新的高产蛋白酶菌株, 如何利用基因工程改造菌株以提高菌株产蛋白酶能力, 如何优化菌株发酵生产蛋白酶条件, 这些越来越成为当前研究的热点。

本文鉴于中国民间采用无虫柔嫩经消毒后的

基金项目: 国家自然科学基金(31070087)

*通信作者。Tel: +86-27-67842825; Fax: +86-27-67842014; E-mail: hdl@mail.scuec.edu.cn

收稿日期: 2016-10-17; 修回日期: 2016-11-30; 网络出版日期: 2017-01-19

丝茅草来发酵豆制品的传统方法, 制得的豆豉产品中氨基酸含量丰富且口味一绝的特点, 通过定向驯化的方法, 从恩施土家族苗族自治州民间酿造用的丝茅草表面筛选得到 1 株能够代谢黄豆和酪素并能产生蛋白酶的菌株, 对该菌株进行了初步的分类鉴定和最佳生长条件的确定。此外, 对该菌的产酶特性和环境因子对该蛋白酶活性的影响进行了初步探讨, 以期为该蛋白酶大规模生产和保存奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要培养基

基础培养基(g/L): 干酪素 4.000, CaCl₂ 0.002, FeSO₄·6H₂O 0.002, MgSO₄·7H₂O 0.500, KH₂PO₄ 0.360, Na₂HPO₄·10H₂O 1.070, ZnCl₂ 0.014, NaCl 0.160, pH 7.0–7.2。

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 3, 胰蛋白胨 10, NaCl 5, pH 7.0–7.2。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母浸出物 5, NaCl 10, pH 7.0–7.2。

1.2 微生物群落结构分析

将少许丝茅草剪碎并用无菌水浸湿, 将其加入盛有 20 g 左右煮熟的黄豆的锥形瓶里, 转动锥形瓶使丝茅草与黄豆充分接触, 然后将锥形瓶置于 30 °C 下培养 10–14 d。

待黄豆霉变后, 加入 20 mL 无菌水并于 200 r/min 下振摇 1 h。按照 1% 的接种率, 将菌悬液分别接种于基础培养基与牛肉膏蛋白胨培养基, 于 30 °C、200 r/min 下培养 5 d。待培养结束后, 取 5 mL 菌液送上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序, 以确定来源于丝茅草表面的微生物在不同培养条件下微生物群落结构的改变。

1.3 产蛋白酶菌株的筛选

吸取 5 mL 上述菌悬液, 接种至 100 mL 基础培养基里, 30 °C、200 r/min 下培养 5 d。待培养结束后, 按 10% 的接种率将菌液接种于新的基础培养基里, 于相同条件下培养 4 d, 依此驯化 5 个循环。

将驯化结束后的菌液进行梯度稀释, 吸取 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 和 10⁻⁸ 稀释度的菌液各 0.1 mL, 均匀涂布于固体基础培养基上, 然后置于 30 °C 培养箱中培养 1 d。挑取平板上长势较好的单菌落, 划线于固体基础培养基平板上, 依此挑取单菌落划线传代培养 6 次。

挑取 1 个传代纯化多次后的单菌落, 接种于 100 mL 基础培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h。待培养结束后, 吸取 2 mL 菌液, 于 12000 r/min 离心 2 min。吸取 1 mL 离心后的上清液, 加入 2 mL 预先于 37 °C 温育的 0.5% 酪素溶液, 37 °C 水浴 30 min。随后加入 3 mL 10% TCA 溶液终止反应, 然后于 12000 r/min 离心 5 min。吸取 1 mL 上清液, 测定 L-Tyr 含量。此外, 以不加 0.5% 酪素为空白对照, 测定 L-Tyr 含量。L-Tyr 标准曲线的制作参照姜锡瑞等^[14]的方法。

蛋白酶活定义: 在 37 °C 下, 每分钟水解酪素产生 1 μg L-Tyr 为 1 个酶活力单位(1 U)。

酶活力(U/mL) = $N(C - C_0 - C_1)/t$, N 为酶液稀释倍数, C 为实验组 L-Tyr 浓度(μg/mL), C_0 为 0.5% 酪素中 L-Tyr 浓度(μg/mL), C_1 为对照组 L-Tyr 浓度(μg/mL), t 为反应的时间(min)。

1.4 菌株 H-16 生理生化鉴定

挑取菌株 H-16 的 1 个单菌落, 接种于不同的培养基中, 观察培养基颜色的变化。生理生化指标^[15]包括 VP 试验、淀粉水解试验和甲基红试验等。

1.5 菌株 H-16 分子鉴定

使用 TIANGEN DNA 提取试剂盒(天根生化科技,北京)提取 H-16 细菌总 DNA。参照文献[16]里的方法扩增菌株 16S rDNA,吸取 50 μ L PCR 产物送武汉擎科创新生物科技有限公司测序。将测得的 16S rDNA 序列上传至 NCBI 中与已知菌株的 16S rDNA 比对,使用 MEGA 6^[17]软件构建系统进化树。

1.6 菌株 H-16 最适生长条件确定

挑取菌株 H-16 的 1 个单菌落 接种于 100 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。将菌液于 6000 r/min 离心 10 min,用无菌水洗涤菌体,再用无菌水重悬菌株至菌液 OD_{600} 值为 1。该溶液作为菌株 H-16 种子菌液备用,并采取 1%的接种率应用于后续实验中。

1.6.1 氮源对菌株 H-16 生长的影响:分别将胰蛋白胨(Tryptone)、酵母浸出物(Yeast extract)、 $NaNO_2$ 、 KNO_3 、 NH_4Cl 、尿素(Urea)或甘氨酸(Glycine)按 1% (W/V)加到基础培养基里。将菌株 H-16 接种于上述 7 种培养基(pH 7)中,于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h 后测定 OD_{600} 。

1.6.2 碳源对菌株 H-16 生长的影响:选用确定的最佳氮源,加至基础培养基中以替代干酪素。分别将葡萄糖(Glucose)、蔗糖(Surcose)、 α -乳糖(α -Lactose)、麦芽糖(Maltose)、海藻糖(Trehalose)、D-木糖(D-xylose)、甘露醇(Mannitol)或山梨醇(Sorbitol)按 1% (W/V)加到基础培养基里。将菌株 H-16 接种于上述 8 种培养基(pH 7)中,于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h 后测定 OD_{600} 。

1.6.3 温度对菌株 H-16 生长的影响:选用确定的最适氮源和碳源,加至基础培养基(pH 7)中,将菌株 H-16 接种至培养基中,分别于 15、20、25、30、35、40、45 $^{\circ}$ C,200 r/min 培养 24 h 后测定 OD_{600} 。

1.6.4 pH 对菌株 H-16 生长的影响:选用确定的

最佳氮源和碳源的基础培养基,调节培养基初始 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10,于最适温度、200 r/min 培养 24 h 后测定 OD_{600} 。

1.6.5 菌株生长曲线的确定:按 1%接种率,将菌株 H-16 种子菌液接种于含最佳氮源、最佳碳源、最佳 pH 的基础培养基里,于 200 r/min、最适温度下培养 48 h,每 4 h 取样测定菌液的 OD_{600} 。

1.7 菌株 H-16 蛋白酶表达

1.7.1 蛋白酶活力测定:将菌株 H-16 种子菌液 ($OD_{600}=1$)按 1%接种率接种于基础培养基中,200 r/min、30 $^{\circ}$ C 培养 48 h,每 12 h 取样测定菌液 OD_{600} 和蛋白酶活力。

1.7.2 蛋白酶位置确定:吸取 10 mL 上述菌株 H-16 培养 24 h 后的菌液,12000 r/min 离心 2 min,保留上清液(发酵上清液)。菌株 H-16 先用无菌水洗涤 2 次后,再用 5 mL 无菌水重悬,干冰上超声破碎 10 min (25 W,工作 5 s,间隔 5 s),12000 r/min 离心 2 min,保留上清液(超声上清液)和沉淀(全菌蛋白)。发酵上清液、超声上清液和全菌蛋白经 SDS-PAGE 和 PAGE 分析后以确定蛋白酶存在的位置和分子量大小。

1.8 蛋白酶特性研究

吸取 100 mL 菌株 H-16 于基础培养基里培养 24 h 后的菌液,离心收集上清液。上清液于-20 $^{\circ}$ C 保存。

吸取 1 mL 发酵上清液于不同试管中,加入 1 mL 缓冲液,调节 pH 至 4、5、6、7、8、9。pH 4-5,使用 50 mmol/L HAc-NaAc 缓冲液调节;pH 6-9,使用 50 mmol/L Tris-HCl 调节。吸取 1 mL 发酵上清液于不同试管中,分别于 20、30、40、50、60、70 $^{\circ}$ C 温育 30 min。吸取 1 mL 发酵上清液于不同试管中,用 NaCl 调节盐度至盐度为 2%、

4%、6%、8%、10%、12%。吸取 1 mL 发酵上清液于不同试管中，依次加入 0.01 mL 1 mol/L 的 Ni(II)、Ca(II)、Cu(II)、Mn(II)、Ag(I)、Co(II)、Fe(III)、Zn(II)或 Li(I)溶液。以上各混合物于 37 °C 预热 5 min 后，加入 2 mL 0.5%酪素溶液，37 °C 反应 30 min。待反应结束后，加入 3 mL 10% TCA 溶液终止反应。12000 r/min 离心 2 min，吸取 1 mL 上清液测定蛋白酶活力。

相对酶活力(%)=100%×处理后酶活力(U/mL)/初始酶活力(U/mL)。

2 结果和分析

2.1 微生物群落结构的变化

图 1 揭示了来源于丝茅草的细菌在基础培养基(记为 Casein)和牛肉膏蛋白胨培养基(记为 Beef tryptone)里培养 5 d 后微生物群落结构在门与属分类水平上的差异。在门分类水平上(图 1-A)，牛肉膏蛋白胨培养基里的厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度(78.68%)明显高于变形菌门(Proteobacteria)相对丰度(21.26%)，而基础培养基里的变形菌门

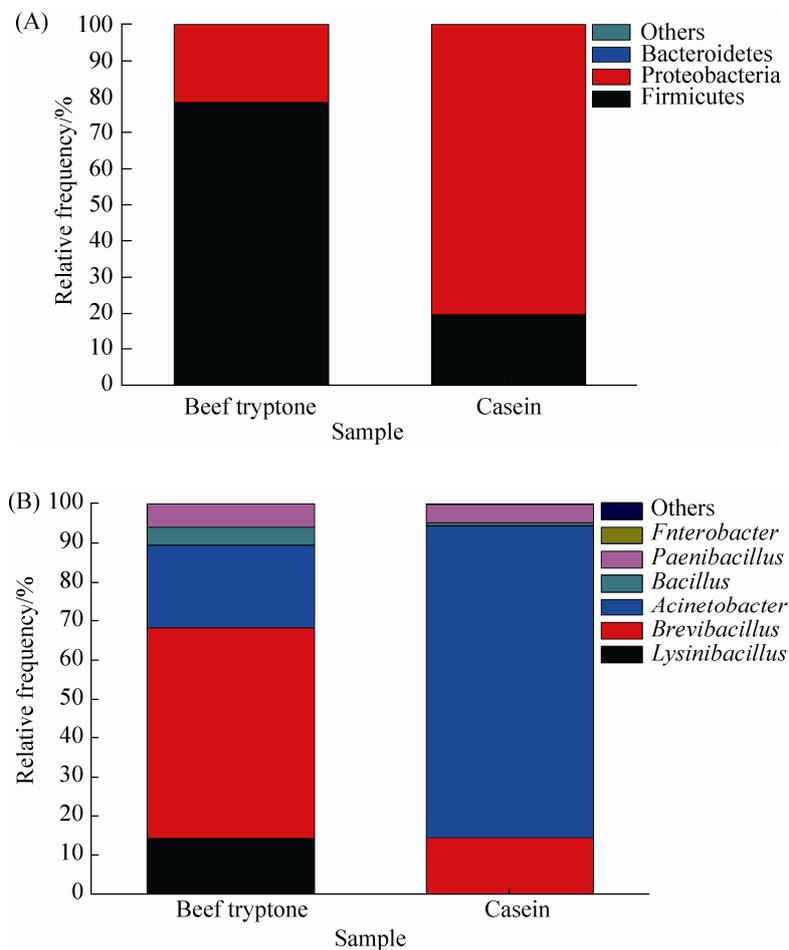


图 1. 16S rRNA 基因高通量测序确定不同驯化条件下微生物群落结构改变

Figure 1. Microbial community structure shift during acclimation as determined by Illumina sequencing of 16S rRNA genes. A: Relative abundance of 16S rRNA gene sequences classified to phylum levels; B: Relative abundance of 16S rRNA gene sequences classified to genus levels.

(Proteobacteria)相对丰度(79.93%)明显高于厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度(19.99%),其他门类细菌的相对丰度明显较小。在属分类水平上(图 1-B),球形芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus*)、短杆菌属 (*Brevibacillus*)、不动细菌属(*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)出现在上述 2 种培养基里且其相对丰度不同。其中在牛肉膏蛋白胨培养基里,短杆菌属(*Brevibacillus*)的相对丰度(54.05%)明显高于其他属细菌的相对丰度;在基础培养基里,不动细菌属(*Acinetobacter*)的相对丰度(79.83%)明显高于其他属细菌的相对丰度。

2.2 菌株 H-16 的鉴定

菌株 H-16 为革兰氏阴性细菌,其 VP 试验、甲基红试验、尿素水解试验、产氨试验、过氧化氢接触试验和丙二酸盐试验均显示出阳性反应

(表 1),其淀粉水解试验、柠檬酸试验、吲哚试验、明胶液化试验和硫化氢试验均呈现出阴性反应。此外,其能够代谢利用葡萄糖、 α -乳糖、D-木糖、海藻糖、鼠李糖、蔗糖、麦芽糖、山梨醇和甘露醇,不能够分解代谢乙醇、甲醇、草酸、乙酸钠和酒石酸钾钠。基于生理生化特征,菌株 H-16 初步认定属于 *Escherichia* 属。

菌株 H-16 的 16S rRNA 序列上传到 NCBI 与已知菌株 16S rRNA 序列进行比对,该 1503 bp 的 16S rRNA 片段与已知的菌株 *Escherichia marmotae* strain HT07301 的 16S rRNA (Accession number: NR 136472.1) 显示出 99%相似度。菌株 H-16 和 *Escherichia marmotae* strain HT073016 处在系统进化树的同一分支上(图 2)。基于生理生化实验和 16S rRNA 序列分析,菌株 H-16 可鉴定为 *Escherichia marmotae*。

表 1. 菌株 H-16 主要的生理生化特征
Table 1. Main physiological-biochemical properties of strain H-16

Objects	Results	Objects	Results
Gram stain	-	Utilization of α -lactose	+
Voges-Proskauer test	+	Utilization of sucrose	+
Methyl red test	+	Utilization of D-xylose	+
Starch hydrolysis test	-	Utilization of maltose	+
Citrate salt test	-	Utilization of trehalose	+
Indole test	-	Utilization of rhamnose	+
Production of ammonia test	+	Utilization of sorbitol	+
H ₂ S test	-	Utilization of mannitol	+
Urea hydrolysis test	+	Utilization of methanol	-
H ₂ O ₂ exposure test	+	Utilization of ethanol	-
Gelatin liquefaction test	-	Utilization of oxalic acid	-
Malonate test	+	Utilization of sodium acetate	-
Utilization of glucose	+	Utilization of potassium sodium tartrate	-

+ : positive reaction ; - : negative reaction.

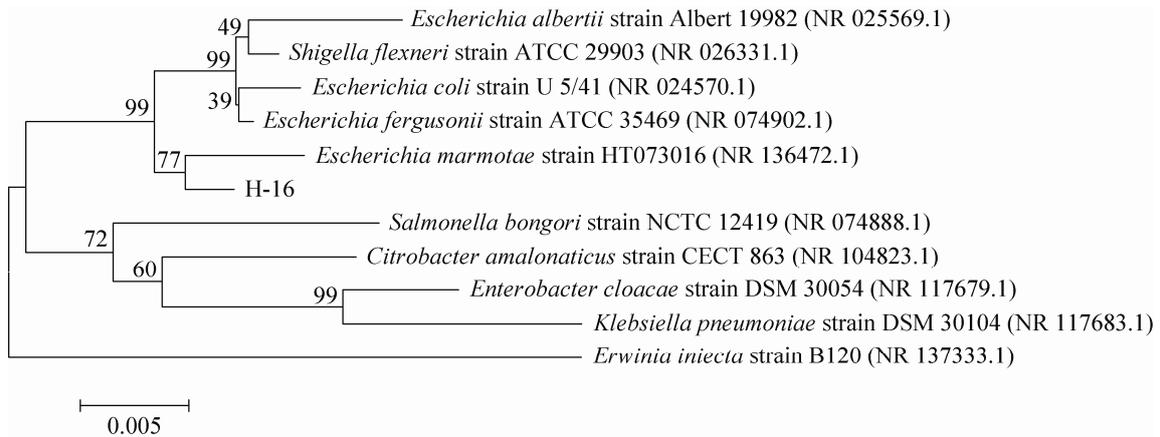


图 2. 基于 16S rRNA 序列的系统进化树

Figure 2. The phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences. Numbers at the nodes represented the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 resampled datasets. The scale bar represented 0.5% sequence divergence.

2.3 环境因子对菌株 H-16 生长的影响

如图 3-A 所示, 菌株 H-16 在含胰蛋白胨或酵母浸出物培养基中的生长明显优于在含 NaNO_2 、Urea、Glycine 或 NHCl_4 ($P<0.01$) 和 KNO_3 ($P<0.05$) 培养基中的生长。菌株 H-16 在这 7 种氮源的培养基里呈现出如下的生长顺序: 胰蛋白胨>酵母浸出物> KNO_3 > NaNO_2 > NHCl_4 >Urea>Glycine。因此, 菌株 H-16 利用有机氮源的偏好大于无机氮源, 且不同的氮源对于菌株 H-16 的生长有明显的影 响。在这 7 种氮源中, 胰蛋白胨最适合菌株 H-16 生长。

如图 3-B 所示, 菌株 H-16 在含蔗糖、海藻糖或甘露醇培养基中的生长明显高于在含葡萄糖、 α -乳糖、麦芽糖、D-木糖或山梨醇培养基中的生长($P<0.01$)。由此可见, 蔗糖是菌株 H-16 生长的最佳碳源。

如图 3-C 所示, 菌株 H-16 能够在较宽温度范围内生长且呈现出不同的生物量。菌株在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 或 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 下生长得最好, 明显优于在 $15\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 或 $40\text{ }^\circ\text{C}$ ($P<0.01$), $25\text{ }^\circ\text{C}$ ($P<0.05$) 的生长情况。由此可见, 菌株 H-16 是一种嗜中温的细菌, $30\text{ }^\circ\text{C}$

或 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 可作为其生长的最佳温度。

如图 3-D 所示, 菌株 H-16 在 pH 6、7 和 8 生长得较好, 在 pH 5 和 9 的生长明显较差($P<0.01$), 在 pH 4 生长得最差($P<0.01$)。因此, pH 7 为菌株 H-16 生长的最佳 pH。

菌株 H-16 在含胰蛋白胨和蔗糖的基础培养基 (pH 7) $30\text{ }^\circ\text{C}$ 的生长曲线如图 3-E 所示, 菌株 H-16 经过短暂的调整期(从 0 至 4 h)后, 其逐渐进入对数生长期(4 至 24 h), 随后菌株的生长速率降低而进入稳定期。根据菌株 H-16 的生长曲线, 培养 20 h 后的菌株可以作为起始菌株进行扩大培养。

2.4 蛋白酶活力

如图 4 所示, 菌株 H-16 于基础培养基里培养 48 h 后, 发酵上清液的酶活力和菌液的 OD_{600} 随培养时间变化而变化。发酵上清液蛋白酶活力于第 24 h 时达到最大酶活 4.32 U/mL , 然后逐渐降低至第 48 h 下的 2.59 U/mL 。由此可见, 当菌株生物量达到最大时(培养至第 24 h), 菌株 H-16 分泌的蛋白酶酶活最高, 这为菌株 H-16 大规模生产蛋白酶提供了指导意义。

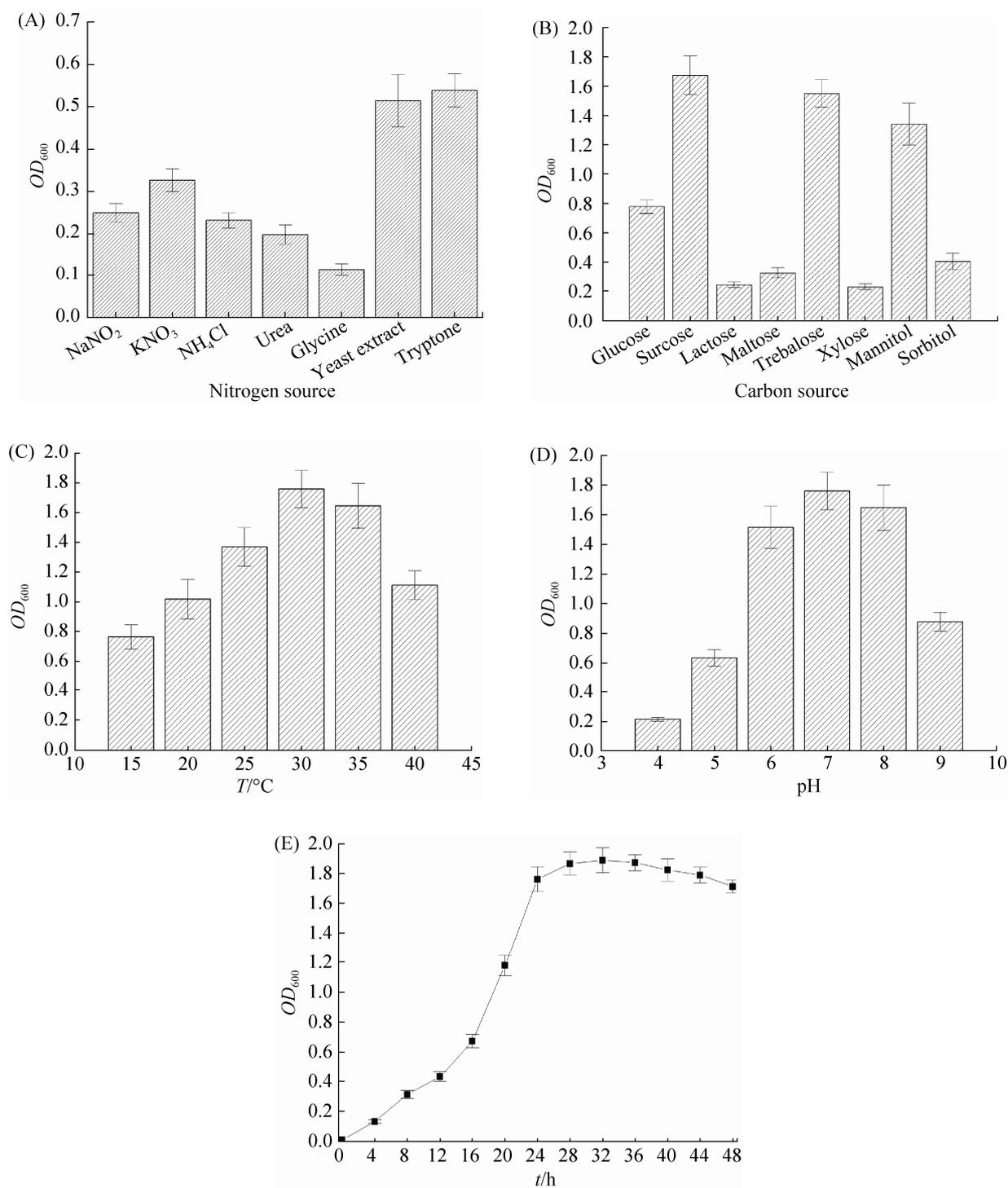


图 3. 菌株 H-16 在不同培养条件下的生物量

Figure 3. Biomass of strain H-16 in different conditions. A: the effect of nitrogen source on growth characteristics of strain H-16; B: the effect of carbon source on growth characteristics of strain H-16; C: the effect of temperature on growth characteristics of strain H-16; D: the effect of pH on growth characteristics of strain H-16; E: the growth curve of strain H-16 in optimum condition. The results were the mean values of three replicates, error bars represented standard error.

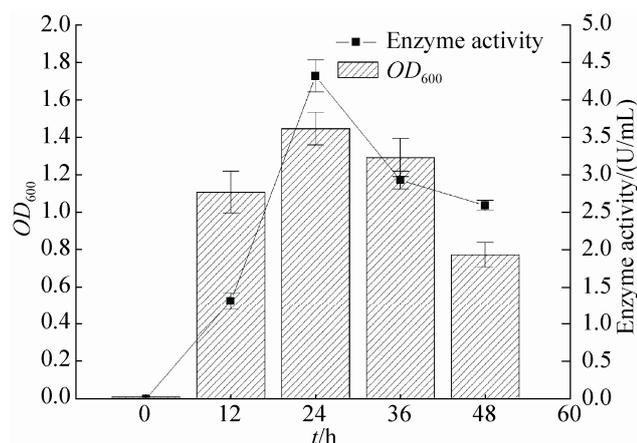


图 4. 菌株 H-16 培养 48 h 发酵上清液的酶活力
Figure 4. The enzyme activity of fermentation supernatant during strain H-16 cultured for 48 h. The results were the mean values of three replicates, error bars represented standard error.

2.5 电泳确定蛋白酶位置

如图 5 所示, 菌株 H-16 于基础培养基和 LB 培养基中培养 24 h 后, 各组分溶液经 SDS-PAGE 检测(lane 1–5), 来源于基础培养基的发酵上清液 (lane 3)于 70 kDa 附近有一条带, 来源于 LB 培

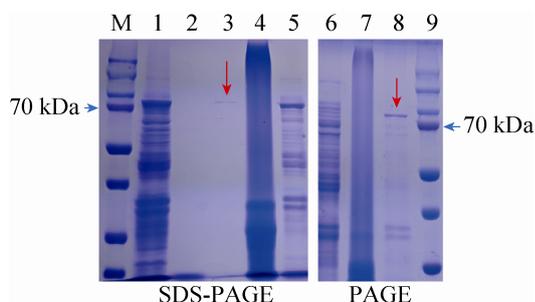


图 5. 电泳检测蛋白酶
Figure 5. Detection of protease by electrophoresis. M: prestained protein ladder; lane 1: whole bacterial protein of strain H-16 in casein medium; lane 2: fermentation supernatant of strain H-16 in LB medium; lane 3: fermentation supernatant of strain H-16 in casein medium; lane 4: casein medium; lane 5: ultrasonic fermentation of strain H-16; lane 6: ultrasonic fermentation of strain H-16; lane 7: casein medium; lane 8: fermentation supernatant of strain H-16 in casein medium; lane 9: prestained protein ladder.

养基的发酵上清液(lane 2)里并未出现该条带。各组分溶液经 PAGE 检测知(lane 6–9), 来源于基础培养基的发酵上清液(lane 8)于 70 kDa 附近有一条带。由此可知, 该分子量约 70 kDa 的蛋白可能为菌株 H-16 分泌的蛋白酶, 且该蛋白酶为单亚基蛋白。

2.6 蛋白酶活特性研究

如图 6-A 所示, 菌株 H-16 分泌的蛋白酶经不同 pH 缓冲液处理后, 其在 pH 6、7 和 8 能够保持较大的酶活, 相对酶活均超过 90%。在 pH 4、5 和 9, 该蛋白酶的相对酶活分别为 36.15%、52.14% 和 76.32%。该结果表明, 菌株 H-16 产生的蛋白酶最适 pH 为 6–8。

如图 6-B 所示, 菌株 H-16 产生的蛋白酶活性几乎不受低温(40 °C)的影响, 当温度达到 50 °C 和 60 °C 时, 相对酶活分别为 85.67%和 45.32%。当温度高达 70 °C 时, 该蛋白酶活性几乎丧失, 相对酶活仅为 18.56%。高温能够改变蛋白酶的空间结构, 进而影响酶的活性。菌株 H-16 分泌的蛋白酶只能在中温(50 °C)下维持较大的酶活力。

如图 6-C 所示, 低盐度(6%)不影响该蛋白酶的活性, 高盐度(8%)影响该蛋白酶的活性。高浓度的 NaCl 破坏了蛋白酶的双水层和双电层, 进而影响了蛋白酶的溶解度, 因而酶活发生改变。

如图 6-D 所示, 终浓度均为 10 mmol/L 的 Ni(II)、Cu(II)、Mn(II)、Ag(I)、Co(II)、Fe(III)、Zn(II)和 Li(I)对菌株 H-16 产生的蛋白酶的活性具有明显的 ($P < 0.05$) 抑制作用(相对酶活均小于 80%), 特别是 Cu(II)和 Ag(I)能够强烈地抑制该蛋白酶的活性, 相对酶活分别为 45.26%和 31.78%。该浓度下 Ca(II)对蛋白酶活没有显示出抑制作用。该蛋白酶活性中心可能含有能与金属离子结合的基团, 因而当其处于这些金属离子溶液中时, 该蛋白酶活性中心结构发生改变, 进而影响蛋白酶活。

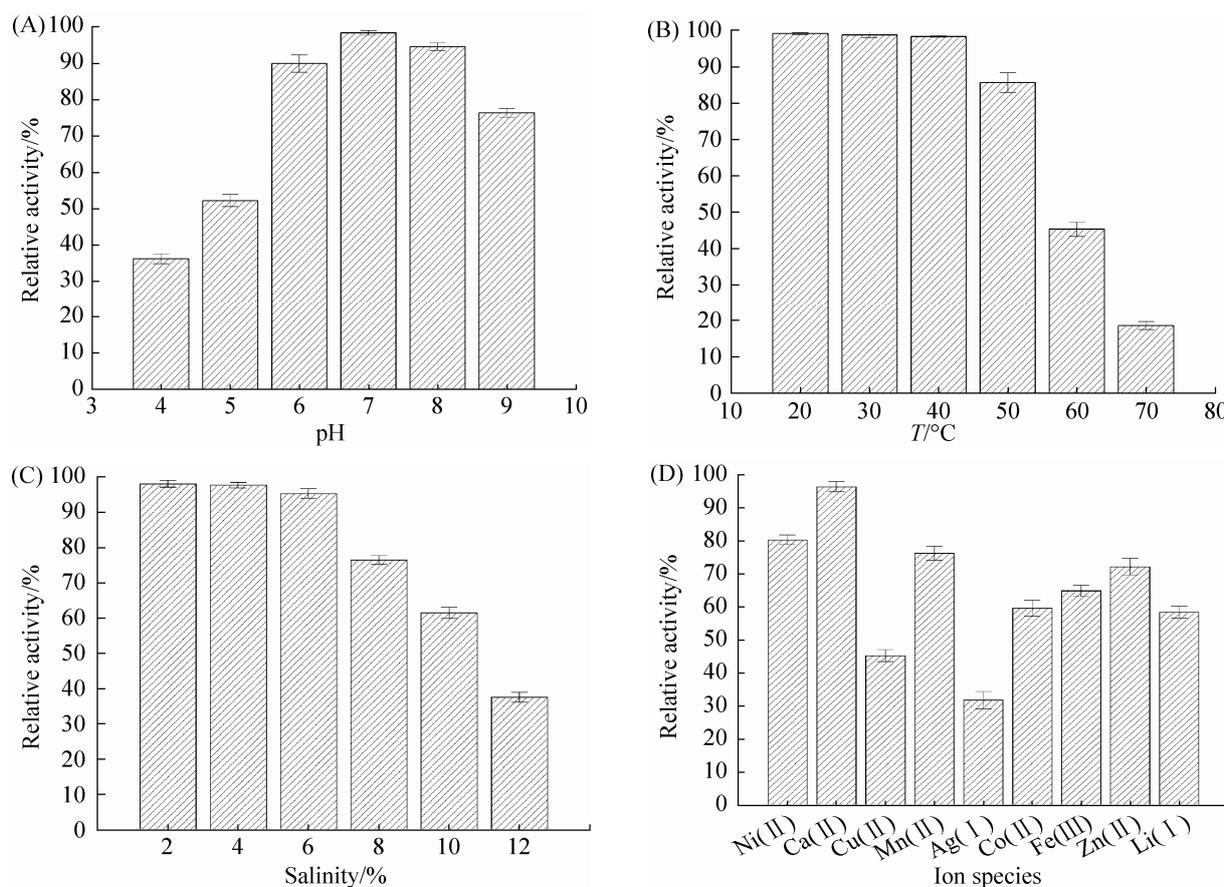


图 6. 不同条件下蛋白酶的相对酶活

Figure 6. Relative enzyme activity of protease in different conditions. A: the effect of pH on enzyme activity of protease; B: the effect of temperature on enzyme activity of protease; C: the effect of salinity on enzyme activity of protease; D: the effect of metal ion on enzyme activity of protease. The results were the mean values of three replicates, error bars represented standard error.

3 讨论

本实验通过选择性培养基筛选到 1 株产碱性蛋白酶菌株 *Escherichia marmotae* H-16, 该研究首次报道了 *Escherichia marmotae* 能够分泌蛋白酶。最新研究发现, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[12]、黄杆菌属(*Chryseobacterium*)^[13]和肠杆菌属(*Enterobacter*)^[16]等中亦存在一些产蛋白酶的细菌。此外, 在细菌驯化的过程中, 发现微生物群落结构在不同培养基里发生了改变, 这为定向富集某类细菌提供了指导意义。

碳源、氮源、温度和 pH 等环境因子能够影响

细菌的生长^[18]。有机氮比无机氮营养丰富, 因而菌株 H-16 在有机氮中生长得较好。不同种类的碳源具有不同的组成和底物分解率, 因而决定菌株 H-16 对不同种类碳源的吸收利用率不同。当蔗糖、海藻糖或甘露醇作为底物时, 菌株 H-16 高效地吸收和降解这些糖类使细胞处于“饱食”状态, 因此菌株 H-16 能够快速完成生长和增殖而不消耗自身的能量和物质。当葡萄糖、乳糖、麦芽糖、D-木糖或山梨醇作为底物时, 这些糖类较慢地被菌株 H-16 吸收和降解且细胞处于“饥饿”状态, 因而菌株 H-16 为维持基本的代谢而消耗自身的物质和能量。温度和 pH 影响蛋白质结构和酶促反应速

率,进而影响细菌的生长。菌株 H-16 最适生长温度为 30 °C 或 35 °C,最适生长 pH 为 7,这与沙雷氏菌 A₂₉-2^[18]表现出的耐冷性质有所不同。

菌株 H-16 在基础培养基中培养 24 h 后的酶活可达最大值 4.32 U/mL,该菌株表达出的蛋白酶酶活虽远远不及库德里阿兹威毕赤酵母菌^[19]在优化条件下表达出的蛋白酶酶活(2504.8 U/mL),但菌株 H-16 在最佳条件下培养后或经过基因工程改造后可能获得较为可观的蛋白酶活力。

SDS-PAGE 和 PAGE 检测发现,菌株 H-16 能够生成分子量大小为 70 kDa 的单亚基蛋白酶。来源于动物的胃蛋白酶为 35 kDa,胰蛋白酶 24 kDa;来源于植物的木瓜蛋白酶为 23 kDa。马俊阳等^[6]从米曲霉分离出两组蛋白酶组分,分子量为 37 kDa 和 45 kDa。由此可见,菌株 H-16 分泌的蛋白酶可能为一种新型的蛋白酶。

菌株 H-16 分泌的蛋白酶能在 pH 6–8 保持较大的酶活,该蛋白酶处于低温(50 °C)和低盐度(6%)下仍能保持较大酶活,这与 *Enterobacter hormaechei* 2N01^[16]表达出的蛋白酶具有相似的酶学性质。此外, Ni(II)、Cu(II)、Mn(II)、Ag(I)、Co(II)、Fe(III)、Zn(II) 和 Li(I) 均能抑制该蛋白酶活性。这些酶学特性的确定为该酶的使用和保存提供了借鉴意义。

参 考 文 献

- [1] Mahajan RT, Badgujar SB. Biological aspects of proteolytic enzymes: a review. *Journal of Pharmacy Research*, 2010, 3(9): 2048–2068.
- [2] Sundararajan S, Kannan CN, Chittibabu S. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: potential application as a dehairing agent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111(2): 128–133.
- [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. *Food and Bioprocess Processing*, 2014, 92(4): 335–342.
- [4] Raval VR, Pillai S, Rawal CM, Singh SP. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. *Process Biochemistry*, 2014, 49(6): 955–962.
- [5] Zhao PC, Deng YW. Study on mutation breeding of high acid protease-producing strains by plasma mutagenesis. *Cereal and Food Industry*, 2013, 20(5): 59–64, 67. (in Chinese) 赵培城, 邓颜威. 等离子体注入法诱变选育高产酸性蛋白酶菌株的研究. *粮食与食品工业*, 2013, 20(5): 59–64, 67.
- [6] Ma JY, Zhuge B, Fang HY, Zong H, Sun J, Gong XH, Zhuge J, Lou XX, Feng Q. Purification and characterization of proteases from *Aspergillus oryzae*. *Microbiology China*, 2014, 41(1): 83–89. (in Chinese) 马俊阳, 诸葛斌, 方慧英, 宗红, 孙进, 龚星慧, 诸葛健, 楼笑笑, 冯倩. 米曲霉蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究. *微生物学通报*, 2014, 41(1): 83–89.
- [7] Lario LD, Chaud L, Almeida MDG, Converti A, Sette LD, Pessoa A Jr. Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *Fungal Biology*, 2015, 119(11): 1129–1136.
- [8] Ibrahim ASS, Al-Salamah AA, Elbadawi YB, El-Tayeb MA, Ibrahim SSS. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2015, 18(3): 236–243.
- [9] Chen HT, Fu JL, Yang YM, Liang YJ, Xie WH, Zhu MJ. Studies on neutral protease production using *Bacillus subtilis* and fed-batch culture. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 38(3): 43–48. (in Chinese) 陈鸿图, 傅金磊, 杨月明, 梁颖婕, 谢文化, 朱明军. 枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶的特性及补料研究. *食品与发酵工业*, 2012, 38(3): 43–48.
- [10] Rathod MG, Pathak AP. Optimized production, characterization and application of alkaline proteases from taxonomically assessed microbial isolates from Lonar soda lake, India. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 7: 164–173.
- [11] Mishra VK. Optimization of thermotolerant alkaline protease production from *Brevibacillus brevis* strain BT2 using surface response methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 7: 87–94.
- [12] Ni YQ, Gu YL, Shi XW, Zheng XJ, Han L, Zhou H, Cheng GD. Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacteria producing protease from sediments of the bottom layer of the Glacier No. 1 in the Tianshan mountains. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(2): 164–172. (in Chinese) 倪永清, 顾燕玲, 史学伟, 郑晓吉, 韩亮, 周红, 程国栋. 天山一号冰川底部沉积层产蛋白酶耐低温菌株的筛选及其系统发育. *微生物学报*, 2013, 53(2): 164–172.
- [13] Chen MX, Li HY, Chen WW, Diao WC, Liu CZ, Yuan M, Li XH. Isolation, identification and characterization of 68 protease-producing bacterial strains from the Arctic. *Acta*

- Microbiologica Sinica*, 2013, 53(7): 702–709. (in Chinese)
陈明霞, 李和阳, 陈维维, 刁伟程, 刘承忠, 袁敏, 李晓虹. 68 株北极产蛋白酶菌株的筛选、鉴定以及部分酶学性质. *微生物学报*, 2013, 53(7): 702–709.
- [14] 姜锡瑞, 段钢. 新编酶制剂实用技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] Sun YH, Zhou KY, Xiong Z. Screening and identification of protease-producing bacterium from intestinal canal of *Dendrolimu* and liquid culture studies. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(14): 18–21. (in Chinese)
孙佑赫, 周开艳, 熊智. 松毛虫肠道产蛋白酶菌株的筛选鉴定及培养条件研究. *中国农学通报*, 2012, 28(14): 18–21.
- [17] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [18] Zhang XY, Guli NZ, Ku ML, Chen WL, Wang XB, Yang J, Wang XW, Han YP, Wu Y. Screening, identification and growth characteristics of a low-temperature proteinase producing strain. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(5): 145–148, 152. (in Chinese)
张晓燕, 古丽娜孜, 库米拉, 陈卫林, 王小标, 杨静, 王雪薇, 韩艳鹏, 武运. 一株产低温蛋白酶菌株的筛选、鉴定及生长特性的研究. *食品工业科技*, 2014, 35(5): 145–148, 152.
- [19] Zhang D, Min WH, Liu JS, Xie HM, Zhang C, Li SX, Fang L. Response surface optimization of fermentation conditions for protease production by *Pichia kudriavzevii* yeast. *Food Science*, 2011, 32(13): 248–253. (in Chinese)
张丹, 闵伟红, 刘景圣, 解蕙铭, 张春, 李锁霞, 方丽. 响应面法优化蛋白酶菌株发酵条件. *食品科学*, 2011, 32(13): 248–253.

Isolation and identification of an alkaline protease producing strain and study on enzymatic properties

Wenjie Wan, Zhijun Xue, Zewen Zhang, Xiaohua Li, Guojun Cheng, Donglan He*

College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] We isolated and identified a protease producing bacterium from *Rhizoma Imperatae*. [Methods] The species and abundances of bacteria from *Rhizoma Imperatae* were determined by high-throughput sequencing. The protease producing strain was screened by using selective medium containing casein. Besides, the effects of environmental factors on bacterial growth and protease activity were determined by single factor experiment. [Results] A protease producing strain H-16 was isolated from selective medium and identified as *Escherichia marmotae* by physiological-biochemical experiments and 16S rDNA sequence analysis. Strain H-16 could produce a protease with molecular weight of about 70 kDa. Tryptone, sucrose, 30 °C or 35 °C, and pH 7 were the optimum nitrogen source, carbon source, temperature, and pH, respectively, for the growth of strain H-16. The protease produced by strain H-16 exhibited optimum activity for casein between pH 6 and 8, and it did not lose much enzyme activity under the conditions of below 50 °C and less than 6% salinity. In addition, Cu(II), Ag(I), and other metal ions could inhibit the activity of the protease. [Conclusion] Strain H-16 could be a good candidate for protease production.

Keywords: protease, strain screening, molecular identification, enzymatic properties

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070087)

*Corresponding author. Tel: +86-27-67842825; Fax: +86-27-67842014; E-mail: hdl@mail.scuec.edu.cn

Received: 17 October 2016; Revised: 30 November 2016; Published online: 19 January 2017