

一株海洋中性蛋白酶高产菌 S-3685 的 鉴定及产酶条件*

马子宾^{1,2} 郑鸿飞¹ 刘均忠¹ 郝建华¹ 孙 谡^{1①}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要 通过生理生化、分子生物学、单因子优化等方法研究了来自南海海域一株产中性蛋白酶菌株 S-3685, 并对其在 250 ml 摇瓶中的培养条件进行了优化。结果显示, 该菌株初步确定为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 发酵培养的最佳碳、氮源分别为葡萄糖 10 g/L 和豆面 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, 酵母膏 5 g/L。无机盐 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 Na_2CO_3 、 KH_2PO_4 最佳浓度分别为 0.2 g/L、2.0 g/L、1.0 g/L; 菌株在培养基起始 pH=7.0、4%接种量、15 ml/250 ml (v/v)装液量和 30℃的条件下, 发酵 72 h 获得较高的酶产量。在最佳培养条件下产酶量为 4250 U/ml, 是优化前的 5 倍。

关键词 海洋微生物; 中性蛋白酶; 芽孢杆菌属; 鉴定; 培养条件优化

中图分类号 Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0131-07

海洋以其独特的低温、高压、高盐环境造就了海洋生物的多样性与独特性(肖峰等, 2011)。从海洋微生物中筛选所需的生物活性物质是近些年研究的热点。而海洋微生物酶的研究已经成为发达国家开发新型酶制剂的重要途径(孙谡等, 2000)。

中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程研究室从南海海水中筛选得到了产中性蛋白酶的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. S-3685。芽孢杆菌生长快、长势旺, 是重要的工业微生物菌种, 几乎 35%的蛋白酶都是由芽孢杆菌生产的(Kalisz, 1988)。蛋白酶是一类非常重要工业用酶, 它在洗涤剂、饲料、制革脱毛、生丝脱胶、有机合成、酒类澄清、明胶及蛋白胨产生、肉质嫩化和医药治疗等方面广为应用(Rao *et al*, 1998), 约占酶制剂市场的 60%(Nascimento *et al*, 2004)。蛋白酶是目前工业化运用最成功、产量最大的一类酶。而中性蛋白酶是食品、饲料、医药、皮革加工及生物降解中不可或缺的一种酶。本研究通

过优化该菌产酶的条件以提高其单位酶产量, 为工业生产创造条件, 并为进一步的研究与应用打下良好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

菌株由中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋资源与酶工程室分离保藏。

活化培养基: 葡萄糖 1%, 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, pH 为 7.0;

基础发酵培养基: 配方与活化培养基相同。固体培养基添加 2%琼脂粉。

1.2 菌株的鉴定

采用 16S rDNA 基因直接测序法进行分子生物学鉴定。总 DNA 的提取采用 CTAB 法(张爱联, 2008)。PCR 扩增采用引物 27F(5'-AGAGTTTGTATCTGGT-

* 国际科技合作与交流(2014DFG30890)、国家自然科学基金(41376175)和青岛市科技计划项目(14-2-4-11-jch)共同资助。马子宾, E-mail: zibinma@163.com

① 通讯作者: 孙 谡, 研究员, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-05-19, 收修改稿日期: 2015-07-20

CAG-3')和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-TT-3')。PCR 反应条件: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 40 s, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 1.5 min, 30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物送生物工程(上海)有限公司完成纯化与测序工作。将所测定菌株的 16S rDNA 序列提交至 EzBioCloud 通过 BLAST 检索已有序列进行相似性比较分析, 下载与实验菌株亲缘关系较近的序列, 用 BioEdit 软件进行多序列比对, 采用 MEGA6.05 软件的邻接法(Neighbor-joining method)绘制系统发育树。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养方法 从保存的斜面上取一环菌体至 25 ml 液体种子培养基(250 ml 三角瓶), 30℃、200 r/min 培养 20 h, 转入基础培养基中, 同条件下培养 72 h。发酵结束后, 发酵液 10000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 稀释适当倍数后测活。

1.3.2 酶活力的测定方法 按照轻工行业标准(QBT 1803-1993)进行, 酶活力单位 U 定义为: 每毫升液体酶在 40℃、pH 为 7.0 条件下水解酪蛋白, 每分钟释放 1 μg 酪氨酸所需的酶量。

1.3.3 单因素试验设计(王萍, 2006)¹⁾ 保持其他发酵条件不变, 分别依次改变碳源、氮源、无机盐、接种量、装液量、起始 pH、发酵温度和发酵时间来确定各因素的最佳水平。每个实验重复两次, 每次设 3 个平行, 每组数据重复两次测定, 通过取各组数据的均值来评价各因素对产酶的影响(Genckal *et al*, 2006)。

2 结果与分析

2.1 高产中性蛋白酶菌株的鉴定

2.1.1 菌株 S-3685 生理生化特征 对菌株 S-3685 进行了生理生化鉴定实验, 根据《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》(1984)所述, 菌株 S-3685 耐盐性较好, 在 7% NaCl 培养液中生长良好, 10% NaCl 溶液中呈现弱生长。生长 pH 范围为 5.0–11.0。生长温度范围较宽, 在 4–40℃环境下均可良好生长。其他生理生化鉴定结果见表 1。

2.1.2 序列分析 PCR 扩增结果为 1422 bp 的基因序列, GenBank 登陆号为 KJ023685, 在 EzBioCloud 上经序列同源性检索, 得到相似度 95%以上均为芽孢杆菌, 通过 MEGA6.05 软件 Neighbor-joining 选项绘制发

表 1 菌株 S-3685 的生理生化特性
Tab.1 Physiological and biochemical properties of strain S-3685

特征 Characteristics	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	芽孢杆菌 S-3685 <i>Bacillus sp. S-3685</i>
革兰氏染色 Gram stain	+	+
鞭毛 Flagellum	侧生 Lateral	侧生 Lateral
宽度 Width (μm)	0.7–0.8	0.36–0.55
长度 Length (μm)	2–3	2.4–3.2
厌氧生长 Anaerobic growth	–	–
酪素水解 Hydrolysis of casein	+	+
葡萄糖产酸 Acid production of glucose	+	–
葡萄糖产气 Gas production of glucose	–	–
V.P 实验 V.P experiment	+	–
M.R. 实验 M.R. experiment	–	–
吲哚实验 Indole experiment	–	–
柠檬酸盐实验 Citrate experiment	+	+
H ₂ S 实验 H ₂ S experiment	–	–
淀粉水解实验 Hydrolysis of starch	+ ^a	–

育树, Bootstrap 重复 1000 次, 模型选择核酸 p-distance, 得到结果如图 1。由图 1 可以看出, S-3685 与 *Bacillus safensis* 在同一分支上, 在进化位置上最为接近。

因此, 根据生理生化鉴定结果和 16S rDNA 鉴定结果, 将此产中性蛋白酶的菌株 S-3685 鉴定为芽孢杆菌属。

2.2 单因素实验设计与分析

2.2.1 碳源对蛋白酶产量的影响 将培养基中的牛肉膏换为不同碳源, 即葡萄糖、糊精、麦芽糖、乳糖、蔗糖、玉米面、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、牛肉膏、甘油、麸皮, 添加量为 10 g/L。

由图 2 可以看出, 以基础培养基为出发点, 将牛肉膏替换成不同种类碳源, 以基础培养基单位酶活力为 1。葡萄糖对酶活力的影响是较大的, 酶活力为标准的两倍多。葡萄糖是重要的碳源, 对众多菌种的培养有较好的促进作用, 如纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)。因此, 选用葡萄糖为最佳碳源, 筛选氮源。

2.2.2 氮源对蛋白酶产量的影响 使用多种氮源代替原培养基中蛋白胨, 如牛肉膏、酵母膏、鱼蛋白胨、胰蛋白胨、尿素、硫酸铵、豆面、酵母膏(10 g/L)+牛肉膏(10 g/L)、豆面(10 g/L)+酵母膏(10 g/L)+牛肉膏(10 g/L)等, 添加量为 10 g/L。

1) 王萍. 蛋白酶高产海洋酵母的筛选、发酵条件优化及酶性质的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2006

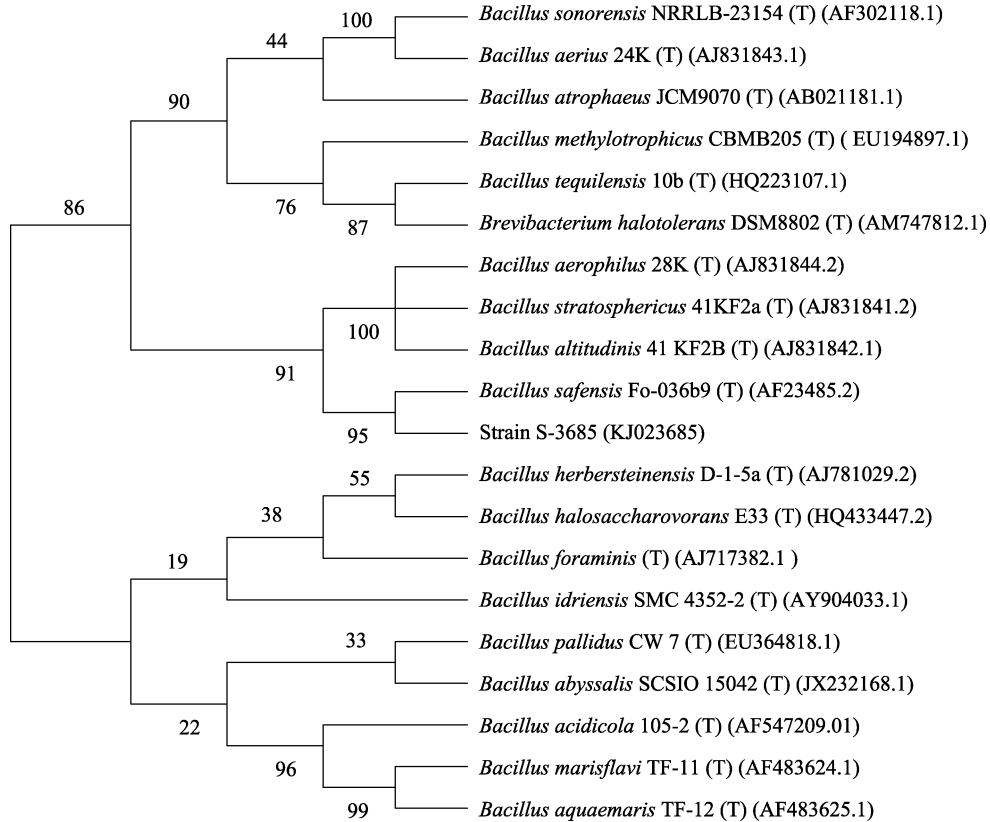


图 1 根据 16S rDNA 序列同源性构建菌株 S-3685 的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of strain S-3685 based on 16S rDNA sequence homology

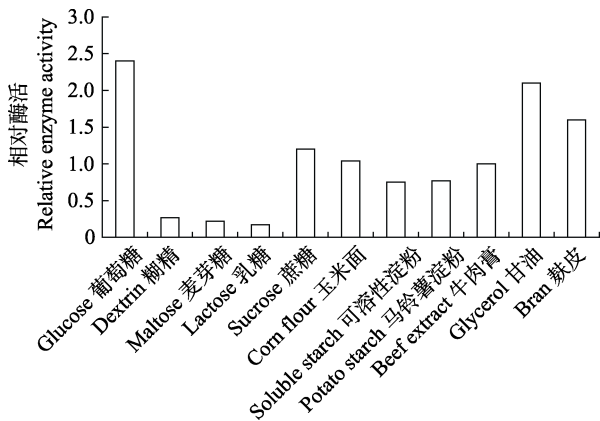


图 2 碳源种类对产酶的影响

Fig.2 Effect of carbon source on the production of protease

以葡萄糖、蛋白胨作为碳氮源的单位酶活力为 1。由图 3 可以看出，蛋白酶的产量和氮源的使用息息相关，在氮源添加量为 10 g/L 时，豆面、牛肉膏和酵母膏复合氮源对酶活力的影响是极大的，是蛋白胨的近 5 倍。通常有机氮源较无机氮源更适合用于提高碱性蛋白酶的产率(李祖明等, 2008)，可能是因为氨基酸或铵盐的快速代谢抑制了酶分子的合成。复合培养基除含有丰富的蛋白质、多肽和游离氨基酸外，还含有少量的糖类、脂肪、无机盐、维生素及某些生长因子

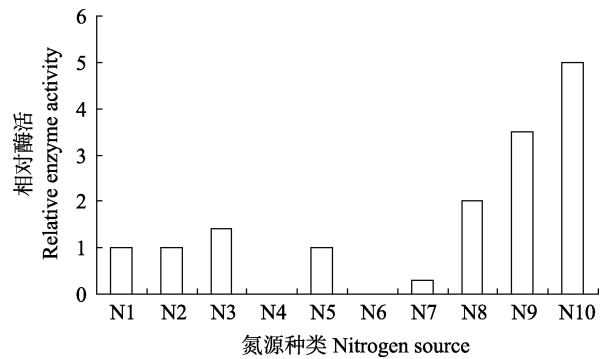


图 3 氮源种类对产酶的影响

Fig.3 Effect of nitrogen source on the production of protease

N1: Peptone(蛋白胨); N2: Beef extract(牛肉膏); N3: Yeast extract(酵母膏); N4: Fish peptone(鱼蛋白胨); N5: Nancreas peptone(胰蛋白胨); N6: Urea(尿素); N7: Ammonium sulfate(硫酸铵); N8: Bean flour(豆面); N9: Beef extract + yeast extract(牛肉膏 + 酵母膏); N10: Bean flour(豆面) + beef extract(牛肉膏) + yeast extract(酵母膏)

(黄薇等, 2007)，所以选择豆面、牛肉膏和酵母膏复合氮源进行之后的试验。

2.2.3 碳氮源浓度的筛选 以 10 g/L 葡萄糖为碳源，添加不同浓度的豆面，筛选豆面的适宜添加量，

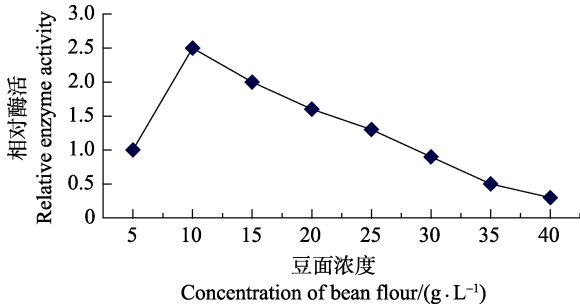


图4 豆面浓度对产酶的影响

Fig.4 Effect of bean flour concentration on the production of protease

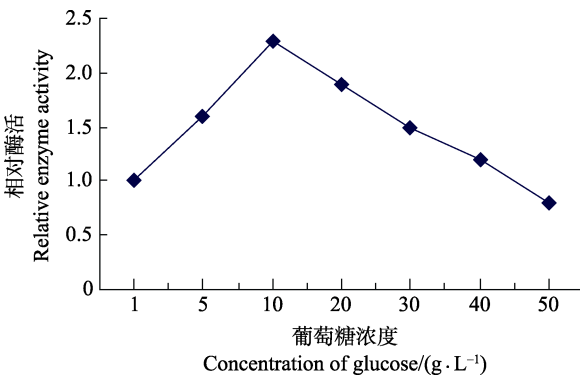


图5 葡萄糖浓度对产酶的影响

Fig.5 Effect of glucose concentration on the production of protease

再以最适豆面浓度筛选葡萄糖浓度。结果显示：

以 10 g/L 葡萄糖和 5 g/L 豆面浓度为碳氮源时的单位酶活力为 1，逐渐增加豆面含量；随着含量的增加，单位酶活力也在缓慢增加，并在 10 g/L 浓度时达到最高值，随着豆面含量的增加，单位酶活力开始下降(图 4)。

以 1 g/L 葡萄糖和 10 g/L 豆面浓度为碳氮源时的单位酶活力为 1，随着葡萄糖浓度的增大，产量呈上升趋势，并在 10 g/L 含量处达到最大值；随后再增加葡萄糖含量，产量反而有所下降，可知过高浓度的碳源或许是因溶氧的原因，或许是阻遏抑制的原因会导致单位酶活力的下降(包兴艳等, 2013)，因此，选取单位酶活力最高值时即葡萄糖 10 g/L 和豆面 10 g/L 的添加量为合适的培养基浓度图 5。

2.2.4 无机盐对发酵产中性蛋白酶的影响 主要考察 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2CO_3 (经试验验证 Na_2CO_3 比 NaCl 对酶活影响更大)不同添加量对产酶量的影响。由图 6-图 8 可以看出， KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2CO_3 分别在添加量为 0.1%、0.02%、0.2%时，菌株 S-3685 产酶量达到最高；高浓度 Na_2CO_3 对菌株 S-3685 产酶具有抑制作用。

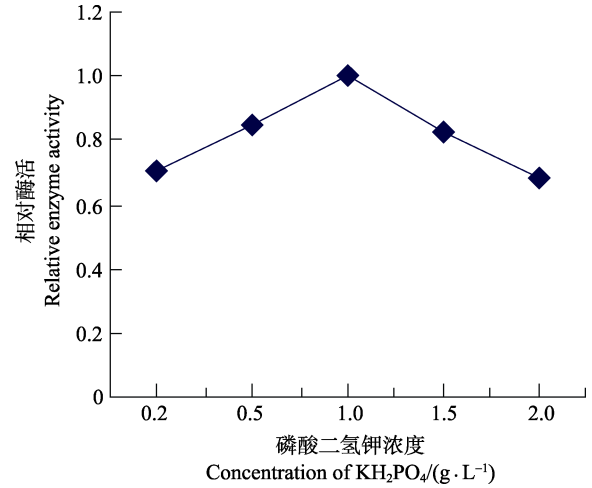


图6 磷酸二氢钾浓度对产酶的影响

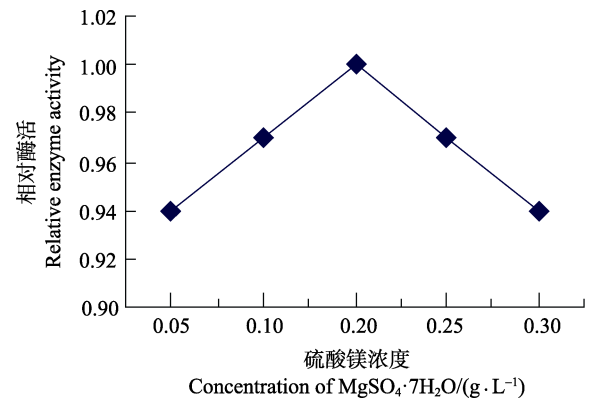
Fig.6 Effect of KH_2PO_4 on the production of protease

图7 硫酸镁浓度对产酶的影响

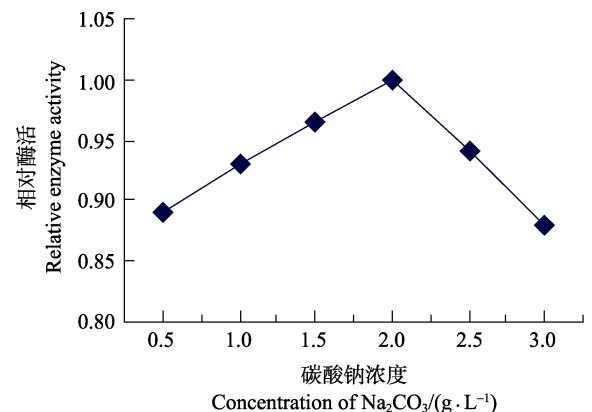
Fig.7 Effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on the production of protease

图8 碳酸钠浓度对产酶的影响

Fig.8 Effect of Na_2CO_3 on the production of protease

2.2.5 接种量对发酵产中性蛋白酶的影响 在 250 ml 的发酵培养基中分别按照体积分数 1%、2%、3%、4%、6%、8%、10%接入种子培养液，由图 9 可知，发酵最佳接种量为 4%。

2.2.6 装液量对发酵产中性蛋白酶的影响 在 250 ml 三角瓶中考察不同装液量对 S-3685 产酶的影响, 由图 10 可知, 装液量对酶产量的影响相对较小。在较低装液量水平(≤ 50 ml)酶产量相对稳定; 在较高的装液量水平时, 酶产量减少, 这主要是由于溶氧较低, 供氧不足而造成的。

2.2.7 起始 pH 对发酵产中性蛋白酶的影响 其他条件不变, 考察发酵培养基的起始 pH 对菌株产酶的影响。由图 11 可知, 起始 pH 为 7 时, 酶产量相对较高。

2.2.8 发酵温度对发酵产中性蛋白酶的影响 考察不同温度(25、30、33、37、40 $^{\circ}$ C)对产酶的影响, 从

图 12 可以看出, 该菌在相对较低温度(30 $^{\circ}$ C)下, 产酶较高; 较高温度条件下(>33 $^{\circ}$ C), 产酶量明显下降。这与菌株 S-3685 来自海洋环境并长期适应低温环境有关。

2.2.9 发酵时间对发酵产中性蛋白酶的影响 从种子培养液中按 4%(v/v)接种入 15 ml/250 ml 三角瓶中, 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养, 间隔取样, 测定酶活力。结果如图 13 所示, 在培养 72 h 后, 酶产量达到最大, 因此, 在实验条件下, 最佳培养时间为 72 h。

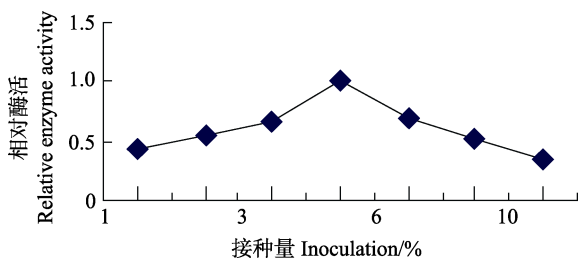


图 9 接种量对产酶的影响

Fig.9 Effect of inoculation on the production of protease

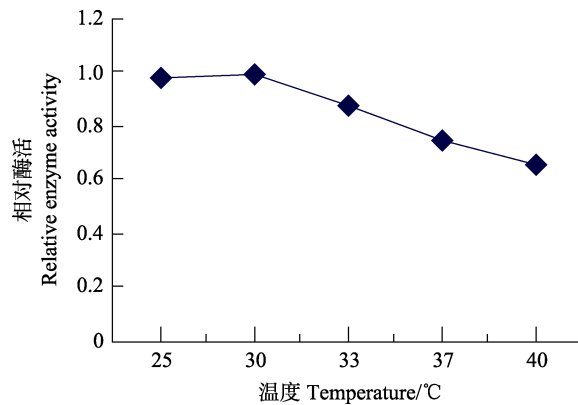


图 12 发酵温度对产酶的影响

Fig.12 Effect of temperature on the production of protease

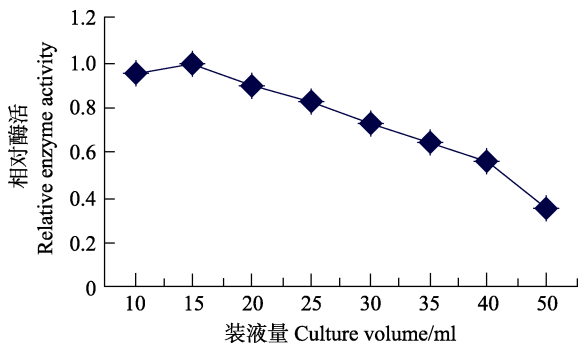


图 10 装液量对产酶的影响

Fig.10 Effect of culture volume on the production of protease

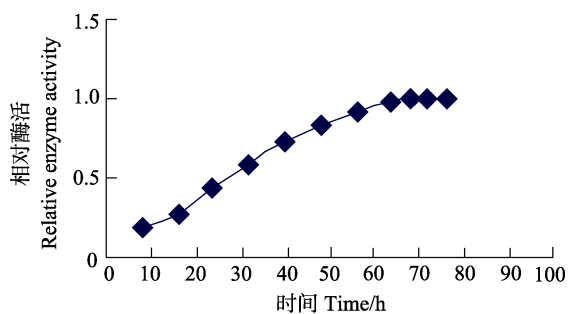


图 13 发酵时间对产酶的影响

Fig.13 Effect of culturing time on the production of protease

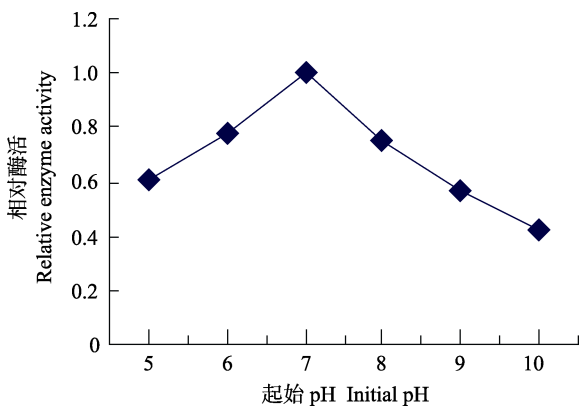


图 11 起始 pH 对产酶的影响

Fig.11 Effect of initial pH on the production of protease

3 讨论

目前, 国内外商品中性蛋白酶的生产以动、植物中提取和微生物发酵为主, 微生物发酵研究主要集中在菌株的筛选, 培养基和培养条件的优化, 考虑中性蛋白酶的应用, 仍需要寻找具有特殊酶学性质和酶分子结构的中性蛋白酶。Fujii 等(1983)从 *B.stearothermophilus* CU21 细菌中克隆得到中性蛋白酶基因, 并在另一菌株中成功表达, 使得酶活提高了近 15 倍。Tsuchiya 等(1997)将一个细胞的蛋白酶基因克隆表达在大肠杆菌中, 得到了适应性和产酶能力更强的菌株。Kim 等(1996)将具有溶纤作用的蛋白酶用于降解血栓。Hirokawa 等(2005)将中性蛋白酶用于血红蛋白

含量的测定。某种中性蛋白酶可以分解线虫角质层和明胶,在切断线虫病感染方面有潜在用途(Niu *et al.*, 2006)。本研究从南海海域的海水中筛选并保藏于实验室有蛋白酶活性的菌株,经反复筛选和纯化,得到产酶较高、较稳定的菌株 S-3685,经菌株部分生理生化实验和 16S rDNA 基因序列比较,将菌株鉴定为芽孢杆菌属。芽孢杆菌是生产蛋白酶的传统菌株,具有产蛋白酶量大、耐高温等特点(赵丹, 2006)¹⁾,是值得工业开发的一种菌。通过摇瓶发酵过程中对其培养基和培养条件的改变,确定了发酵培养的最佳碳氮源葡萄糖和豆面的浓度分别为 10 g/L 和 10g/L,无机盐 MgSO₄·7H₂O、Na₂CO₃、KH₂PO₄ 最适浓度分别为 0.2、2.0、1.0 g/L;在培养基起始 pH 为 7.0、4%接种量、15 ml/250 ml(v/v)装液量和 30℃的条件下,发酵 72 h 获得较高的酶产量。在最适培养条件获得酶产量 4250 U/ml,与未优化的 880 U/ml 相比,优化效果显著。目前,本实验室正在进行 S-3685 中性蛋白酶产酶的胁迫诱导、分离纯化、序列分析和酶学性质的研究工作。从现有的研究结果看,该酶具有其独特的酶学性质和分子结构,有进一步研究的价值。

参 考 文 献

- 包兴艳,郝建华,陈世建,等.产酯酶 B1 海洋枯草芽孢杆菌 C5 发酵条件优化.应用与环境生物学报,2012,18(6): 999-1003
- 李祖明,李鸿玉,荣瑞芬,等.碱性蛋白酶生产菌的育种及其液态发酵条件的研究.食品研究与开发,2008,29(5): 19-24
- 孙谧,王跃军,张云波,等.一株产低温碱性蛋白酶嗜冷海洋细菌 YS-9412-130 的分离和培养条件研究.海洋水产研究,2000,21(4): 1-6
- 肖峰,张浩,王斌,等.一株产中性蛋白酶海洋细菌的筛选与初步鉴定.食品与药品,2011,13(3): 89-93
- 张爱联.生物化学与分子生物学实验教程.北京:中国农业大学出版社,2008
- 中国科学院微生物研究所翻译组.伯杰细菌鉴定手册(第八版).北京:科学出版社,1984
- 中华人民共和国轻工业行业标准 QBT 1803-1993.工业酶制剂通用试验方法,129-133
- Fujii M, Takagi M, Imanaka T, *et al.* Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus steartherophilus* in a vector plasmid and its expression in *Bacillus steartherophilus* and *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1983, 154(2): 831-837
- Genckal H, Tari C. Alkaline protease production from alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. Enzyme Microb Technol, 2006, 39(4): 703-710
- Hirokawa K, Shimoji K, Kajiyama N. An Enzymatic Method for the Determination of HemoglobinA_{1c}. Biotechnol Lett, 2005, 27(14): 963-968
- Kalisz HM. Microbial proteinases. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 1988(36): 1-65
- Kim W, Choi K, Kim Y, *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Appl Environ Microbiol, 1996, 6(2): 2482-88
- Niu QH, Huang XW, Zhang L, *et al.* A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. Arch Microbiol, 2006, 185(6): 439-448
- Nascimento WCA, Martins MLL. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp.. Braz J Microbiol, 2004, 35(1-2): 91-96
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge M, *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(3): 597-635
- Tsuchiya K, Ikeda I, Tsuchiya T, *et al.* Cloning and expression of an intracellular alkaline protease gene from alkaliphilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. Biosci, Biotech Biochem, 1997, 61(2): 298-303

(编辑 陈严)

1) 赵丹.产碱性蛋白酶芽孢杆菌的分离、发酵条件研究及其初步应用.中国农业大学硕士研究生学位论文,2006

Identification of a Marine Bacterium S-3685 with High Neutral Protease and Optimization of Its Fermentation Conditions

MA Zibin^{1,2}, ZHENG Hongfei¹, LIU Junzhong¹, HAO Jianhua¹, SUN Mi^{1①}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The S-3685 strain, a marine bacterium producing neutral protease, was screened from South China Sea. It was identified as a *Bacillus* sp. based on the morphology, the biochemical characteristics, and the 16S rDNA sequencing results. This strain was gram-positive, and the spore located in the middle had ellipse or columnar shapes. The bacterial colony was round, protuberance, and milk white on the agar culture-medium. The surface of the bacterial colony was smooth and moist (30°C, 24 h). Over time the colony slightly shriveled bumps in the middle. The length was 2.4–3.2 microns. The strain grew under the pH 5.0–11.0, and could grow normally at the temperature 4–40°C. We then explored the fermentation conditions using a 250 ml shake flask. The optimum sources of carbon and nitrogen were glucose (10 g/L) and pulse flour (10 g/L) respectively, plus the beef extract (5 g/L) and the yeast extract (5 g/L). The optimum concentrations of MgSO₄·7H₂O, Na₂CO₃ and KH₂PO₄ were 0.2 g/L, 2.0 g/L and 1.0 g/L respectively. The optimum initial pH of the culture medium for the protease production was 7.0. The optimized culture conditions were: inoculums at 4%, broth content at 15 ml/250ml(v/v), temperature at 30°C, and culture for 72 h. After the optimization, the productivity of protease was increased by 5 times (from 850 to 4250 U/ml).

Key words Marine microorganism; Neutral protease; *Bacillus* sp.; Identification; Culture optimization

① Corresponding author: SUN Mi, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn