

一株产蛋白酶芽孢杆菌的筛选和初步鉴定

田永航^{1,2*}, 张大为^{1,2}, 张洁^{1,2}, 王和飞^{1,2}, 徐云升^{1,2#}

¹海南热带海洋学院食品科学与工程学院, 海南 三亚

²海南省海洋食品工程技术研究中心, 海南 三亚

Email: areckting@hntou.edu.cn, #lyxys@hntou.edu.cn

收稿日期: 2020年11月21日; 录用日期: 2020年12月17日; 发布日期: 2020年12月29日

摘要

利用选择性培养基从海南地区的虾酱中筛选获得一株产蛋白酶菌株, 经过形态学观察、生理生化分析和分子生物学鉴定其为芽孢杆菌(*Bacillus* sp. 6#)。研究表明, 该菌株的最适生长温度在33℃左右, 最适pH为6~8, 最适盐浓度在5%~10%之间, 能耐受接近20%的盐度, 菌株表现出对较高环境温度和盐度的耐受能力。菌株能产胞外蛋白酶, 加速蛋白水解。*Bacillus* sp. 6#可为工业化纯种生产模式下虾酱生产提出一种参考。

关键词

虾酱, 分离, 鉴定, 弯曲芽孢杆菌, 蛋白酶

Isolation and Identification of a Protease-Producing *Bacillus*

Yonghang Tian^{1,2*}, Dawei Zhang^{1,2}, Jie Zhang^{1,2}, Hefei Wang^{1,2}, Yunsheng Xu^{1,2#}

¹School of Food Science and Engineering, Hainan Tropical Ocean University, Sanya Hainan

²Hainan Engineering Research Center of Seafood, Sanya Hainan

Email: areckting@hntou.edu.cn, #lyxys@hntou.edu.cn

Received: Nov. 21st, 2020; accepted: Dec. 17th, 2020; published: Dec. 29th, 2020

Abstract

A protease-producing strain was selected from shrimp paste in the Hainan area using a selective medium. After morphological observation, physiological and biochemical analysis, and molecular

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 田永航, 张大为, 张洁, 王和飞, 徐云升. 一株产蛋白酶芽孢杆菌的筛选和初步鉴定[J]. 微生物前沿, 2020, 9(4): 164-170. DOI: 10.12677/amb.2020.94022

characterization, it was identified as *Bacillus* sp. 6#. The research results show that the optimal growth temperature of the strain is about 33°C, the optimal pH is 6~8, the optimal salt concentration is between 5% and 10%, and it can tolerate salinity close to 20%. The strain shows tolerance to higher ambient temperature and salinity. The strain showed a strong tolerance to high temperature and high salt. The strain secret extracellular enzyme to accelerate proteolysis *Bacillus* sp. 6# can provide a feasible reference for the industrialization of shrimp paste production.

Keywords

Shrimp Paste, Isolation, Identification, *Bacillus flexus*, Protease

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

虾酱是海南及我国沿海地区传统的发酵调味品,蛋白水解是影响虾酱感官和风味最重要的因素之一。发酵过程中,酸、碱和蛋白酶共同推动蛋白水解进程。早期,肌肉组织的内源蛋白酶释放出来参与组织蛋白的水解。随着发酵进行,微生物代谢产生的胞外蛋白酶和肽酶将肌肉蛋白进一步水解。水解形成的小分子化合物促进酶促反应和非酶化学反应,形成非蛋白的含氮化合物,进而形成食物的特殊营养、香味、pH值和口感[1]。海南地处热带,常年气温较高,海南虾酱中盐度较高,虾酱中微生物有较好的温度和盐度适应能力[2]。因此,从海南虾酱中分离产蛋白酶的微生物,可能获得发酵特性较好的菌株。本研究以海南传统虾酱为实验材料。首先,应用Gibbons培养基对富集后的细菌分离和纯化。然后对菌株的蛋白水解能力进行定性和定量分析。最后结合菌株的菌落和细胞形态、生理生化特征和16S rDNA序列信息确定菌株的分类学地位。研究结果可为解析虾酱风味形成的分子机制和虾酱的工业化生产提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料和试剂

2.1.1. 实验原料

羊栏镇、天涯区、崖州区、乐东县、东方市、万宁市、琼海市、秀英区、澄迈县、海口市等海南沿海地区的15份传统虾酱样品。

2.1.2. 培养基

Gibbons培养基[3]:胰蛋白胨5.0g,酵母粉10.0g,柠檬酸钠3.0g,氯化钾2.0g,硫酸镁·7H₂O 20.0g,氯化钠50.0g,添加1000mL蒸馏水,琼脂15g。调pH7.2,121°C灭菌20min。

酪蛋白琼脂平板[4]:分别称取10g脱脂奶粉和3g琼脂,分别溶于100mL蒸馏水,然后分开灭菌两种溶液。待溶液冷却至48°C左右,将两种溶液混合均匀倒平板。

2.1.3. 主要试剂

酪蛋白/胰蛋白胨、酵母粉、无水硫酸镁、柠檬酸钠、氯化钠、氯化钾、琼脂/琼脂糖、脱脂乳粉、Tris碱、EDTA-Na·2H₂O、溶菌酶、溴酚蓝、二甲苯青、甘油、硼酸、海藻糖、抗坏血酸钠、Taq酶(ET101-02-04,天根生化科技(北京)有限公司)等。

2.1.4. 主要设备

超净工作台(SW-CJ-1FD): 苏州安泰空气技术有限公司; 恒温培养箱(SPX-150B-Z 型): 博讯实业有限公司医疗设备厂; 紫外可见分光光度计(T6 新世纪): 北京普析通用仪器有限责任公司; 高速冷冻离心机(Sigma-16): Sigma; 恒温震荡培养箱(HO45HYA): 上海知楚仪器有限公司; 高通量组织研磨器(SCIENTZ-48): 宁波新芝生物科技股份有限公司; 电泳仪(DYY-10C 型): 北京六一; 精密分析天平(AR2140): 梅特勒-托利多仪器有限公司; PCR 仪(T100™): Bio-Rad; 凝胶成像系统(GDS-1302): Aplegen 等。

2.2. 实验方法

2.2.1. 具有蛋白质水解能力菌株的筛选

1) 细菌的富集及初步筛选

将 20.0 g 虾酱样品加入装有 180 ml 无菌生理盐水的锥形瓶中, 振荡 30 min。静置, 取上清液 100 ul 接种于 5.0 ml Gibbons 液体培养基中进行富集[3]。取 0.5 ml 富集培养液按 10 倍梯度稀释, 选合适梯度浓度接种于 Gibbons 固体培养基, 30℃ 培养 24~48 h。取单菌落进行分离纯化, 纯化的菌株用 15% 甘油保存备用[5]。

2) 初筛具有蛋白水解能力菌株

将活化的菌株点接到酪蛋白琼脂平板上, 适宜温度下培养 24 h。以不接菌的平板为空白组, 观察菌落周围是否形成透明圈[6]。

3) 定量分析菌株对蛋白质的水解能力

参考文献制作酪氨酸标准曲线[7]。配制梯度浓度的酪氨酸溶液, 反应后用紫外分光光度计在 680 nm 处测定光密度。平行测定 3 次, 以酪氨酸的含量为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 制作标准曲线。

Folin-酚法定量分析菌株蛋白水解能力[8]。吸取菌液 1.00 mL 与酪蛋白溶液反应, 用福林试剂进行显色, 测定显色反应后的光密度。用酪氨酸标准曲线和光密度计算酪蛋白水解后生成酪氨酸的量。在 40℃ 和合适 pH 值条件下, 1 min 内水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量为 1 个蛋白酶活力单位[9]。

2.2.2. 菌株的初步鉴定

1) 形态学观察

记录菌落形态一致的菌株, 并在光学显微镜下观察菌株被革兰氏染色的细胞形态[10]。

2) 菌株生理生化特征分析

(1) 最适温度

将菌株活化后接种到 Gibbons 液体培养基中, 用不接菌的 Gibbons 液体培养基做空白组, 将培养基分别放入 28℃、30℃、31℃、32℃、33℃、36℃ 和 37℃ 等温度下培养 24 h。每个温度三组平行实验, 用紫外分光光度计测定 OD_{600 nm} 下的吸光值, 考察菌株对温度的适应能力[11]。

(2) 最适盐浓度

取菌液 100 uL 加入 10 mL 液体 Gibbons 培养基中, 培养 24 h 后制成菌悬液。用低吸附枪头分别取 2 ul 菌液, 接到 0%、2%、5%、10%、15% 和 20% 等不同盐浓度的培养基中, 每个盐浓度做三组平行实验。在适宜温度下培养 24h 后, 用紫外分光光度计测 OD_{600 nm} 下的吸光值, 考察菌株的耐盐能力[12]。

(3) 最适 pH 值

取菌液 100 uL 加入 10 mL 液体 Gibbons 培养基中, 培养 24 h 后制成菌悬液。用低吸附枪头分别取 2 ul 菌液, 接到不同 pH 值的 Gibbons 液体培养基中, 每个 pH 值做三组平行实验。在适宜温度下培养 24 h 后, 用紫外分光光度计测 OD_{600 nm} 下的吸光值, 考察菌株的耐酸能力[13]。

(4) 菌株生长的生长曲线

根据菌株的酸碱适应能力, 配制合适的 Gibbons 液体培养基。用低吸附枪头分别取 2 ul 菌液, 接到 Gibbons 液体培养基中, 合适温度下分别培养 2、4、6、8、10、12、16 和 24 小时。以不接菌的培养基做空白组, 用紫外分光光度计测不同培养时间菌液 OD_{600nm} 下的吸光值, 考察菌株的生长特性[14]。

3) 分子鉴定

(1) DNA 提取

菌株 DNA 提取参考文献进行, -20℃ 保存 DNA 样品[15]。

(2) PCR 扩增

采用细菌扩增通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增[16]。PCR 扩增反应体系参考试剂盒(ET101-02-04, 天根生化科技有限公司): 引物 1 uL, DNA 模板 1.0 uL, Taq PCR Master mix 0.2 uL, ddH₂O 14.8 uL。PCR 扩增反应程序: 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 次循环, 72℃ 10 min, 4℃ 保温[17]。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送公司测序(上海生工)。

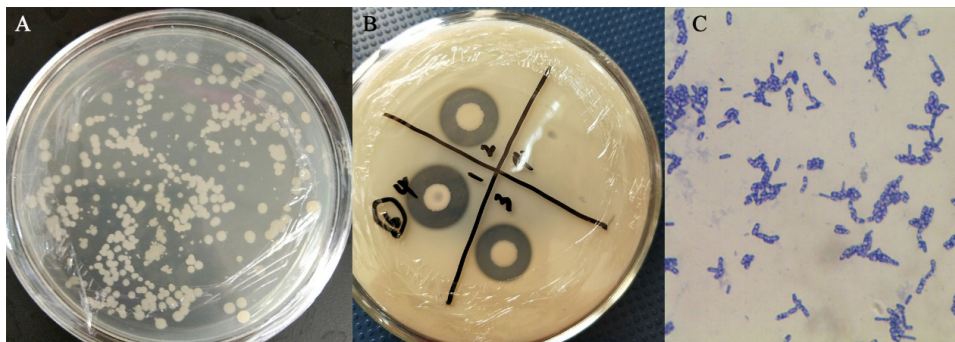
(3) 测序和系统发育树构建

将测得序列在 NCBI 中进行同源性比较, 然后用 Mega7.0.14 软件构建系统发育进化树[18]。根据系统发育树, 结合菌株的形态和生理生化特征初步确定菌株的分类学地位。

3. 结果与分析

3.1. 筛选蛋白水解能力的菌株

按照 2.2.1.1 的方法, 将 15 份虾酱进行涂布培养, 共获得 124 个菌株纯化菌株。其中 6[#]菌株的菌落形态呈淡米黄色, 不透明, 边缘光滑, 湿润且扁平(图 1(A))。按照 1.2.1.2 的方法, 用酪蛋白琼脂平板定性检测菌株的蛋白水解能力, 菌株培养 24 小时后, 菌株能显著水解蛋白, 在平板上形成透明圈(图 1(B))。按照 2.2.2.1 的方法, 对 6[#]菌株进行革兰氏染色观察, 菌株为革兰氏阳性芽孢杆菌(图 1(C))。



备注: (A) 6[#]菌株菌落形态; (B) 定性分析 6[#]菌株的蛋白水解能力; (C) 6[#]菌株的革兰氏染色。

Figure 1. Screening and analysis of Protease Producing Strains

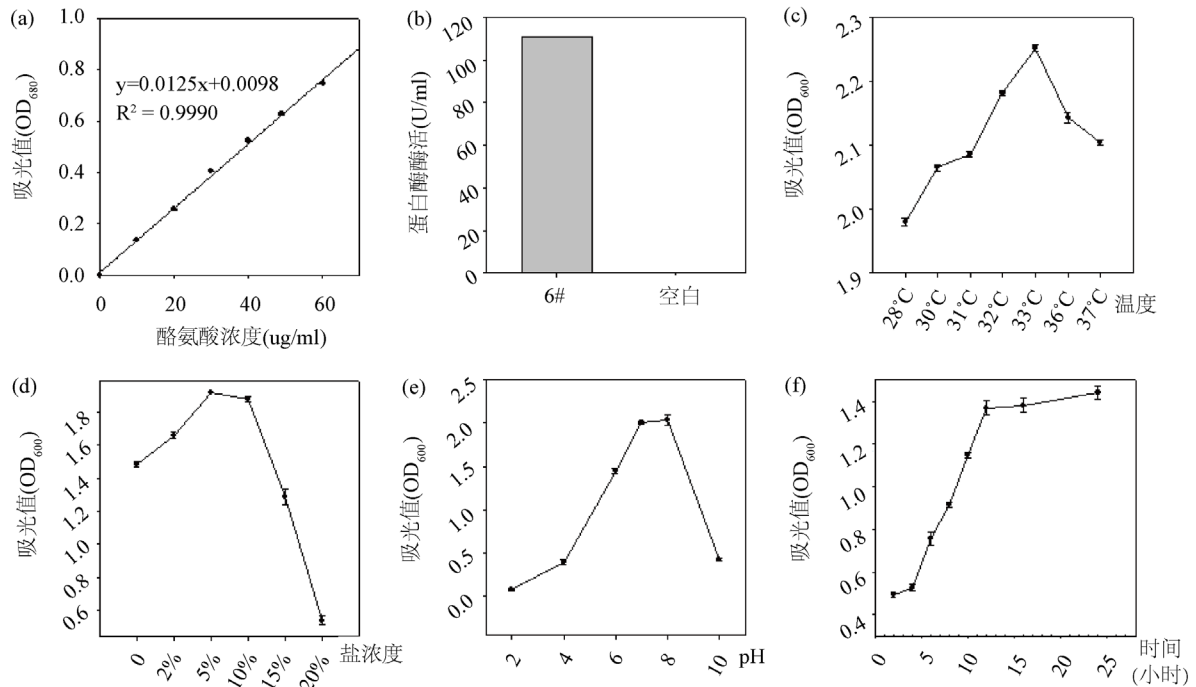
图 1. 产蛋白酶菌株的初步筛选和分析

3.2. 菌株的生理生化特性分析

3.2.1. 定量分析 6[#]菌株的蛋白水解能力

根据 2.2.1.3 所述的方法制作标准曲线(图 2(a))。以酪氨酸浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 标准曲线回归方程为 $y = 0.0125x + 0.0098$, 相关系数 $R^2 = 0.9990$, 吸光值与酪氨酸浓度之间的线性关系显著。根据标准曲线及回归方程, 可算出当吸光值为 1 时酪氨酸的含量 96.2 ug/mL, 吸光常数 $K = 96.2$ 。

利用标准曲线,采用 Folin 试剂法定量测得 6[#]菌株的粗酶液活力为 $111 \pm 0.03\text{U}$ (图 2(b))。结合图 1(B)和图 2(b)可知,6[#]菌株可产生胞外蛋白酶,将蛋白水解成酪氨酸等氨基酸,供给菌株新陈代谢所需要的营养。已有研究表明,菌株蛋白水解能力与菌株的酶系相关,包括胞外酶、转运系统和多种胞内酶[19]。同时,菌株的蛋白质水解会生成的氨基酸及多肽等小分子物质可能影响虾酱的风味。



注: (a) 酪氨酸标准曲线; (b) 6[#]菌株发酵液酶活; (c) 菌株温度适应性; (d) 菌株的耐盐能力; (e) 菌株的耐酸能力; (f) 菌株的生长曲线; OD₆₈₀ 和 OD₆₀₀ 分别表示紫外分光光度计在 680 nm 和 600 nm 的吸光值。

Figure 2. Physiological and biochemical characteristics of strains

图 2. 菌株的生理生化特性

3.2.2. 菌株的基本生理生化特性

按 2.2.2.2 所述方法,测得菌株生长的温度适应能力(图 2(c))。由图可知,菌株的最适温度在 33°C 左右,菌株有较好的温度适应能力,能适应海南当地的较高的环境环境温度。温度高过 33°C 后,菌株生长受到一定的抑制,但仍表现出较高的紫外吸收光。在虾酱发酵的过程,可利用菌株对温度适应的特性,优化发酵温度,缩短发酵时间。

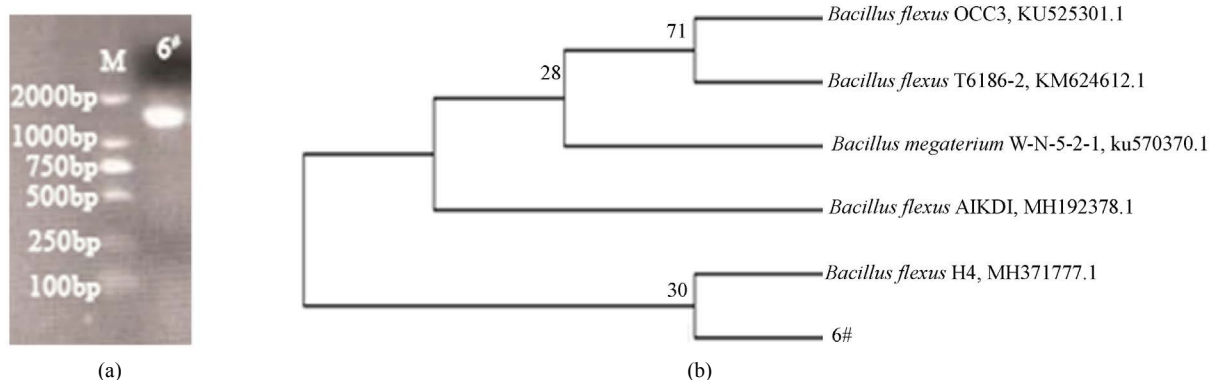
按 2.2.2.2 所述方法,测得菌株生长的最适盐浓度(图 2(d))。由图可知,菌株生长的最适盐浓度在 5%~10% 之间。在 15% 的盐浓度下,菌株仍有较好的生长能力。在 20% 的盐浓度条件下,菌株受到明显的抑制,但培养 24 小时后,仍可测出一定的微生物。总体看来,菌株有较好的盐度适应能力。

按 2.2.2.2 所述的方法,测得菌株在不同 pH 条件下的生长情况(图 2(e))。由图可知,菌株在 pH 为 2 到 4 之间的生长缓慢,在 pH 为 4 到 7.5 之间的生长速度加快。pH 值为 6~8 是菌株最合适的生长酸碱度,在 pH 值为 7.5~10 时,菌株的生长能力受到抑制。

按 2.2.2.2 所述方法,测得菌株的生长曲线(图 2(f))。由图可知,菌株的生长迟缓期约在 2~6 h, 10 h 左右为对数生长期,约 15 h 左右后进入生长稳定期。稳定期曲线呈略为上扬,可能后期代谢废物影响了吸光度的测量,但两点间在统计学上没有显著差异。

3.3. 菌株的分子鉴定

按照 2.2.2.3 所述方法, 以 6[#]菌株的 DNA 为模板, 以 27F 和 1492R 为引物进行 PCR 扩增和电泳检测(图 3(a)), PCR 产物送上海生工测序。将测序结果与 NCBI 数据库中已知序列进行同源性比对, 获得近缘物种的 16S rDNA 序列, 并用 Mega7.0.14 构建 6[#]菌株的系统发育树(图 3(b))。6[#]菌株与弯曲芽孢杆菌 *Bacillus flexus* H4 的相似度为 99.85%, 结合菌株的形态和生理生化特性, 6[#]暂命名为 *Bacillus* sp. 6[#]。参考 98.5% 的分类标准[20], 99.85% > 98.5%, 6[#]菌株可能为弯曲芽孢杆菌。



注: (a) PCR 扩增和电泳检测 6[#]菌株的 16S rDNA; (b) 6[#]菌株的系统发育树

Figure 3. Analysis of 16S rDNA of strain 6 by sequencing

图 3. 测序分析 6[#]菌株的 16S rDNA

4. 讨论和结论

本研究从海南地区的传统虾酱中筛选获得了一株产蛋白酶菌株, 经过形态学观察、生理生化分析和分子生物学鉴定其为芽孢杆菌, 菌株可能为弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*), 暂命名为 *Bacillus* sp. 6[#]。本研究发现, 该菌株的最适生长温度在 33℃ 左右, 最适合盐浓度在 10% 左右, 能耐受接近 20% 的盐度, 菌株有较好的温度和盐度适应能力。菌株能产胞外酶白酶, 加速蛋白水解, 影响虾酱的感官和品质。已有研究表明, 弯曲芽孢杆菌具有分解胆固醇[21]、抗氧化[22]和抗菌[23]等益生特性。因此, *Bacillus* sp. 6[#] 可为工业化纯种生产模式下虾酱生产提供一种可行的参考。

基金项目

海南热带海洋学院青年专项基金(RHDQN201832)、2018 年三亚市专项科研试制项目(2018KS01)和 2016 年校级学科带头人及博士科研启动项目(RHDXB201623)。

参考文献

- [1] Wang, W., Xia, W., Gao, P., et al. (2017) Sarcoplasmic Protein Hydrolysis Activity of *Lactobacillus plantarum* 120 Isolated from Suanyu: A Traditional Chinese Low Salt Fermented Fish. *Journal of Food Processing and Preservation*, **41**, e12821. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12821>
- [2] 陈永敢, 陈川平, 张来军. 南海虾酱的营养成分分析[J]. 中国调味品, 2018, 43(2): 145-147+51.
- [3] Gutiérrez, C. and González, C. (1972) Method for Simultaneous Detection of Proteinase and Esterase Activities in Extremely Halophilic Bacteria. *Applied Microbiology*, **24**, 516-517. <https://doi.org/10.1128/AEM.24.3.516-517.1972>
- [4] 陈超. 产蛋白酶乳酸菌种的筛选及应用研究[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [5] 陈丽媛, 张庆华, 徐冲, 等. 光合细菌的分离、保存及其同化磷能力研究[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(3): 43-46.

- [6] 周绍琴, 曾海英, 杨承友. 传统豆瓣辣酱中高产蛋白酶芽孢杆菌的筛选及鉴定[J]. 食品科技, 2015, 40(8): 288-293.
- [7] 苏媛宁, 夏玉, 林捷, 等. 乳酸菌蛋白降解及产香能力分析[J]. 中国酿造, 2014, 33(3): 36-39.
- [8] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., *et al.* (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- [9] 吕加平, 骆承庠, 刘凤民. 乳酸菌蛋白水解力的测定及研究[J]. 东北农业大学学报, 1999, 30(1): 3-5.
- [10] Coico, R. (2006) Gram Staining. *Current Protocols in Microbiology*, A.3C.1-A.3C.2.
- [11] 张延杰, 王静雪, 牟海津. 嗜盐性蛋白酶产生菌 *Virgibacillus* sp. P-4 的筛选鉴定及其特性分析[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 102-108.
- [12] 李玉梅. 耐盐高降解蛋白菌株的筛选及其复合菌株的研究[D]: [硕士学位论文]. 兰州: 兰州交通大学, 2014.
- [13] 刘桂芳. 嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌 β -半乳糖苷酶和蛋白水解活性的研究[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2004.
- [14] 朱艳蕾. 细菌生长曲线测定实验方法的研究[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(5): 108-112.
- [15] 刘朝军, 沈定霞. 16SrDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(7): 774-776+9.
- [16] Lane, D. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons, New York, 115-175.
- [17] Schloss, P.D., Gevers, D. and Westcott, S.L. (2011) Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS ONE*, **6**, e27310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027310>
- [18] Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (1994) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software for Microcomputers. *Bioinformatics*, **10**, 189-191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.2.189>
- [19] 杜越欧, 侯俊财. 乳酸菌蛋白水解体系及相关基因表达的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 383-386+91.
- [20] Janda, J.M. and Abbott, S.L. (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**, 2761-2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- [21] Shobharani, P. and Halami, P.M. (2014) Cellular Fatty Acid Profile and H⁺-ATPase Activity to Assess Acid Tolerance of *Bacillus* sp. for Potential Probiotic Functional Attributes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 9045-9058. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5981-3>
- [22] Shobharani, P., Prakash, M. and Halami, P.M. (2015) Probiotic *Bacillus* spp. in Soy-Curd: Nutritional, Rheological, Sensory, and Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*, **80**, M2247-M2256. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13004>
- [23] Ramasubburayan, R., Susan, T., Pradeep Kumar, V., *et al.* (2014) Isolation, Screening and Optimization of Culture Conditions for Enhanced Antibacterial Activity by a Marine Epibiotic Bacterium *Bacillus flexus* APGI against Fouling Bacterial Strains. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **8**, 2909-2920.