

马长中, 辜雪冬, 池福敏, 等. 西藏自治区产碱性弹性蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离及鉴定[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 502–504.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.144

# 西藏自治区产碱性弹性蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离及鉴定

马长中, 辜雪冬, 池福敏, 罗章, 杨林

(西藏农牧学院食品科学学院, 西藏林芝 860000)

**摘要:**从西藏自治区不同海拔地区的屠宰场土壤中分离得到 180 株菌株, 经过初筛和复筛, 获得 1 株产碱性弹性蛋白酶较高的菌株 XZJ4, 结合生理生化特征和 16S rDNA 序列分析, 鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

**关键词:**碱性弹性蛋白酶; 分离; 鉴定; 枯草芽孢杆菌

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0502-03

弹性蛋白酶是一种以水解不溶性弹性硬蛋白为特征的广谱蛋白水解酶, 是一种肽链内切酶<sup>[1-2]</sup>, 广泛存在于动物胰脏和微生物类群中, 细菌、真菌、放线菌中均存在。弹性蛋白酶是一种经济价值较高的酶制剂<sup>[3-4]</sup>。弹性蛋白酶作为一种水解专一性较广的内肽酶, 对很多蛋白质均有水解能力<sup>[5]</sup>。当弹性蛋白与其他蛋白共存时, 它会优先水解弹性蛋白, 弹性蛋白酶可作为理想的肉类嫩化剂应用于食品工业和日常生活中<sup>[6-7]</sup>。此外, 弹性蛋白酶还可应用于农副产品深加工、高蛋白食品制作、罐头工业, 也可作为益生菌保健食品的促菌剂和婴儿食品的强化剂<sup>[8-10]</sup>。胰脏是弹性蛋白酶的主要来源, 由于脏器资源不足, 胰弹性蛋白酶一直供不应求。由微生物发酵生产弹性蛋白酶成本低、产量大、设备利用率高, 且不受原料来源的限制; 因此, 利用微生物发酵生产弹性蛋白酶是一条有效途径。目前, 由微生物发酵法生产弹性蛋白酶, 关键在于筛选到产弹性蛋白酶的高产菌株。本研究首次从西藏自治区不同海拔地区的屠宰场附近采集土样, 并从中分离得到产碱性弹性蛋白酶的菌株 XZJ4, 结合生理生化特征和 16S rDNA, 鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2015-11-14

基金项目: 西藏自治区自然科学基金 (编号: Z2012A076)。

作者简介: 马长中 (1975—), 男, 四川遂宁人, 硕士, 副教授, 主要从事高原特色农畜产品加工及贮藏研究。Tel: (0894) 5826471; E-mail: 414767450@qq.com。

### 1.1 样品采集

选取西藏自治区林芝市、拉萨市、日喀则市、阿里地区 4 个不同海拔地区的屠宰场, 在其附近的土样中采集样品共 30 份。

### 1.2 主要试剂

pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 HindⅢ、T<sub>4</sub> DNA 连接酶等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。小量 PCR 产物试剂盒购自 Omega Bio Tek 公司。其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.3 培养基

培养基的配制参照文献 [11]。

### 1.4 培养方法

种子斜面及平板培养均于 37℃ 下培养 24 h。进行复筛发酵培养时, 将 20 mL 发酵培养基加入 250 mL 三角瓶中, 接种后置于旋转式摇床, 于 32~37℃、180 r/min 条件下发酵培养 24 h。

### 1.5 粗酶制备<sup>[12]</sup>

将细菌发酵液以 10 000 r/min 离心 10 min, 收集去菌体发酵液进行硫酸铵分级盐析 (30%~65% 饱和度), 将沉淀溶于 0.05 mol/L、pH 值 9.0 的硼酸缓冲液中即为粗酶液。

### 1.6 酶活力的测定

采用分光光度法<sup>[13]</sup>测定弹性蛋白酶活力。称取 10 mg 刚果红-弹性蛋白溶于 1 mL 水中, 加入 1 mL 适当稀释的酶液以及 1 mL pH 值 7.4 的 0.2 mol/L 硼酸缓冲液, 于 37℃ 下振荡反应 30 min; 加入 2 mL pH 值 6.0 的 0.7 mol/L 磷酸钠缓冲液终止反应, 过滤后取上清液, 于波长 495 nm 处测定光密

[8] 黎尚豪, 叶清泉, 刘富瑞, 等. 固氮蓝藻作为水稻肥源的研究[J]. 水生生物学集刊, 1962(1): 55-61.

[9] 黎尚豪. 固氮蓝藻作为水稻肥源的研究[J]. 水生生物学集刊, 1981, 7(3): 417-423.

[10] 尹娟, 费良军, 田军仓, 等. 水稻田中氮肥损失研究进展[J]. 农业工程学报, 2005, 21(6): 189-191.

[11] 孙志梅, 武志杰, 陈利军, 等. 农业生产中的氮肥施用现状及其环境效应研究进展[J]. 土壤通报, 2006, 37(4): 782-786.

[12] Ju X T, Xing G X, Chen X P, et al. Reducing environmental risk by

improving N management in intensive Chinese agricultural systems [J]. PNAS, 2009, 106(9): 3041-3046.

[13] 栗铁申. 我国氮肥施用现状、问题和对策[J]. 农民科技培训, 2010, 7: 23-24.

[14] Parker F P, Javier Z C. Available nitrogen from animal manures [J]. California Agriculture, 1981, 35(7/8): 24.

[15] 谢小玲, 李海锋, 李雪莹, 等. 土壤全氮半微量定氮法与自动定氮仪定氮法的比较分析[J]. 生态环境学报, 2012, 21(6): 1071-1074.

度,采用蒸馏水替代酶液的反应体系为空白对照。在此反应条件下,溶解 1 mg 刚果红 - 弹性蛋白底物所需的酶量定义为 1 个弹性蛋白酶活力单位(U)。

1.7 菌落形态观察及生理生化特征

菌体形态特征观察和生理生化鉴定的方法主要参照文献[14-16]。

1.8 XZJ4 菌株的分子生物学鉴定

采用 16S rDNA 寡核苷酸通用引物:P1,5′ - AGAGTTT-GATCATGGCTCAG - 3′; P2, 5′ - TACGGTTACCTTGT-TACGACTT - 3′。PCR 反应按以下扩增程序进行:96 ℃ 预变性 1 min;95 ℃ 30 s,56 ℃ 45 s,72 ℃ 2 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经电泳检测后,将剩余的 PCR 产物纯化,连接到 pMD18 - T 载体,委托上海鼎安生物科技有限公司完成。采用 Blast 在线软件对测序结果进行相似性分析,构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌的筛选

通过对 30 个样品进行混合富集培养、弹性蛋白平板初筛、分离纯培养,获得 180 株产碱性弹性蛋白酶的菌株。对弹性蛋白水解圈与菌落直径之比(H/C)较大的 90 株菌株进行摇瓶复筛,得到 1 株酶活力最高的菌株,编号为 XZJ4,酶活为 33 U/mL。

2.2 菌株 XZJ4 的形态和生理生化特征

2.2.1 形态特征 将菌株 XZJ4 接种于弹性蛋白培养基上,于 30 ℃ 下倒置培养 48 h,形成蛋白水解圈(图 1)。图 1 显示,该菌株菌落呈圆形、乳白色、不透明,隆起度较高。显微镜下形态见图 2,为革兰氏阳性杆菌,大小(宽×长)为(1.0~1.4) μm×(2.0~2.4) μm,两端钝圆,单个排列或短链状排列。芽孢椭圆位于菌体中央,有鞭毛,无荚膜。

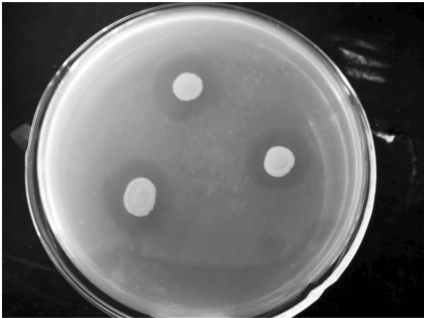


图1 弹性蛋白平板水解透明圈

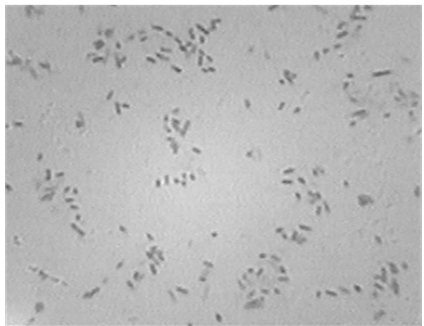


图2 显微镜观察(1 000×)

2.2.2 生理生化特征 由生理生化特征试验结果(表 1)可知,菌株 XZJ4 葡萄糖产酸、水解淀粉、木糖产酸、L - 阿拉伯糖产酸、柠檬酸盐利用、硝酸盐还原、接触酶、甘露醇产酸试验为阳性,葡萄糖产气、厌氧生长、吡啶、丙二酸盐、卵黄卵磷脂酶试验为阴性,这与已报道的枯草芽孢杆菌具有相同或近似的生理生化特征<sup>[17-18]</sup>。

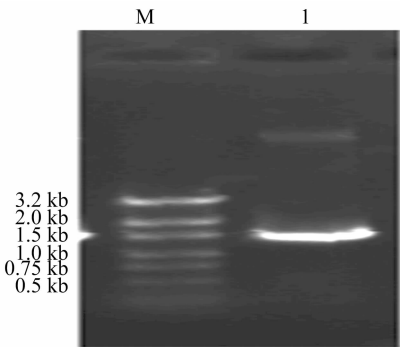
表 1 菌株 XZJ4 的生理生化特征

特征	试验结果
葡萄糖产酸	+
水解淀粉	+
木糖产酸	+
L - 阿拉伯糖产酸	+
柠檬酸盐利用	+
硝酸盐还原	+
接触酶	+
甘露醇产酸	+
葡萄糖产气	-
厌氧生长	-
吡啶	-
丙二酸盐	-
卵黄卵磷脂酶	-

注:“+”为阳性,“-”为阴性。

2.3 菌株 XZJ4 的分子生物学鉴定

利用 P1、P2 引物扩增 16S rDNA 区域,片断大小约为 1 500 bp(图 3),与预期相符。将产物进行凝胶电泳检测,纯化后连接 pMD18 - T 载体,筛选出的阳性转化子委托上海鼎安生物科技有限公司完成。



M—DNA Marker W2003; 1—16S rDNA PCR产物

图3 16S rDNA扩增产物电泳分析

将测序结果在 GenBank 的 Blast 上进行比对,扩增片段与 GenBank 上报道的枯草芽孢杆菌( *Bacillus subtilis*, GenBank 登录号 NBRC13719) 16S rDNA 的同源性达 100%,与枯草芽孢杆菌( GenBank 登录号 JCM1465) 16S rDNA 的同源性达 99%。序列采用 Blast 软件与数据库中已知的 16S rDNA 进行相似性比对,应用 ClustalX 软件对目的序列进行比对和聚类分析,使用 MEGA 6.06 生物软件构建进化树(图 4)。

系统进化树结果表明,XZJ4 菌株属于芽孢杆菌属,与模式菌株枯草芽孢杆菌亲缘性最近。

3 结论与讨论

选取西藏自治区不同海拔地区的屠宰场,在其附近的土样中采样30份样品。通过混合富集培养、弹性蛋白平板初

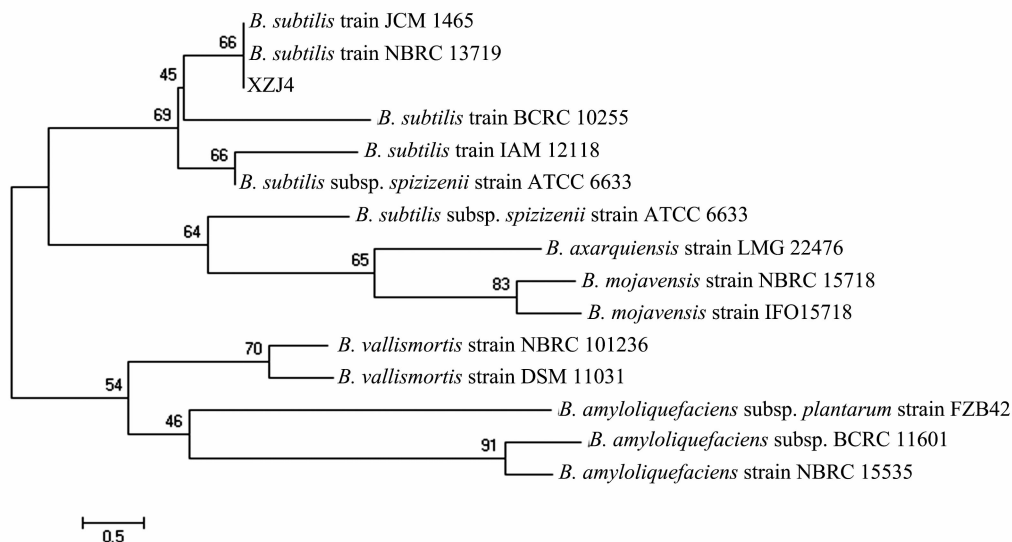


图4 XZJ4 菌株 16S rDNA 系统进化树

筛、分离纯培养获得 180 株产碱性弹性蛋白酶的菌株,对弹性蛋白水解圈与菌落直径之比( $H/C$ )较大的 90 株菌株进行摇瓶复筛,得到 1 株酶活力最高的菌株,编号为 XZJ4,酶活为 30 U/mL。结合生理生化 and 16S rDNA 序列分析,鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。本研究为进一步筛选高产碱性弹性蛋白酶菌株及其工业化发酵奠定了基础,下一步可通过克隆该菌株的弹性蛋白酶基因构建基因工程菌,以期西藏自治区本土碱性弹性蛋白酶的工业化发酵生产提供依据。

#### 参考文献:

- [1]姚刚,程建军,孙鹏,等. 枯草芽孢杆菌发酵产碱性蛋白酶的研究[J]. 食品科学,2009,30(23):347-351.
- [2]刘书亮,詹莉,吴琦,等. 枯草芽孢杆菌弹性蛋白酶对蛋白质水解及肉类嫩化的效果[J]. 食品科技,2010,35(6):163-165.
- [3]傅明亮,刘晓杰,刘婧,等. 地衣芽孢杆菌弹性蛋白酶纯化和性质研究[J]. 食品科学,2011,32(7):216-219.
- [4]王丽丽,高忠涛,杜冰,等. 洗毛用枯草芽孢杆菌产蛋白酶发酵条件优化[J]. 科技导报,2010,28(7):63-67.
- [5]谢凤行,赵玉洁,周可,等. 产胞外淀粉酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及其紫外诱变育种[J]. 华北农学报,2009,24(3):78-82.
- [6]关国雄,颜颖,林哲甫. 弹性蛋白酶和木瓜蛋白酶对不同蛋白质水解能力的比较[J]. 食品科学,1992(3):4-6.
- [7]陈卓君,干雷,许文涛,等. 重组弹性蛋白酶在猪肉嫩化中的应用[J]. 食品科学,2010,31(7):42-45.
- [8]郭本恒. 功能乳制品[M]. 北京:中国轻工业出版社,2001:55-

60.

- [9]吕健. 碱性弹性蛋白酶的发酵条件及酶学性质研究[D]. 北京:中国农业科学院,2000:102-104.
- [10]陆恒,慎重利. 牛奶的科学[J]. 食品研究与开发,2002(2):6-8.
- [11]马长中,田广楼,辜雪冬,等. 林芝产弹性蛋白酶嗜碱芽孢杆菌的分离及鉴定[J]. 食品与发酵科技,2011,47(5):52-54,71.
- [12]肖昌松,吕健,田新玉,等. 嗜碱芽孢杆菌 XE22-4-1 碱性弹性蛋白酶发酵条件的研究[J]. 微生物学报,2001,41(5):611-616.
- [13]陈启和,何国庆,邬应龙. 弹性蛋白酶产生菌的筛选及其发酵条件的初步研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2003,29(1):59-64.
- [14]Kreger N Y, van Rij G. The yeasts: a taxonomic study. Third revised and enlarged edition [M]. The Netherlands: Elsevier Science Publisher B, 1984.
- [15]张纪忠. 微生物学分类[M]. 上海:复旦大学出版社,1990:78-80.
- [16]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:62-63.
- [17]白兰芳,高慧,刘明启,等. 产果胶酶枯草芽孢杆菌的鉴定、发酵条件优化及产物酶学性质的研究[J]. 中国畜牧杂志,2011,47(19):63-68.
- [18]陈相达,戴慧慧,刘燕,等. 一株高产淀粉酶枯草芽孢杆菌的筛选、鉴定及产酶条件的优化[J]. 温州医学院学报,2011,41(1):40-43,47.