产耐盐蛋白酶深海细菌的分离鉴定

赵谋明，舒会，崔春，雷芬芬，唐雪鹭
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：本文采用高盐富集、复筛发酵及耐盐稳定性实验的方式，从深海海泥中筛选产耐盐蛋白酶的深海海洋细菌。从深海海洋微生物中共筛选出 25 株耐盐菌，在这 25 株菌株中有 14 株在酪蛋白平板上能产生较大的水解圈；通过发酵复筛及耐盐稳定性实验，筛选得到一株酶活性能高且耐盐稳定性好的菌株，将其编号为 SWJSS3；对菌株 SWJSS3 进行 16S rDNA 的鉴定并初步研究了盐浓度对产酶情况和酶稳定性的影响。菌株 SWJSS3 在 0~10% (*m/V*）的盐浓度条件下均能生长，在 0~10%的盐浓度下，菌液 OD_{600} 的吸光值范围为 0.08-1.98; 通过发酵复筛其所产生的蛋白酶酶活在盐浓度为 1%时达最高，为 233.56±2.16 U/mL; 所产蛋白酶在终浓度为 15% (*m/V*)的 NaCl 溶液下，混匀 4 ℃保存 1 h，残余酶活为初始酶活的 40.70±2.06%，继续存放一段时间到第 9 h，酶活基本保持不变；通过 16S rDNA 鉴定其为铜绿假单胞菌，与 *Pseudomonas aeruginosa RP28 16S rDNA* 的相似性达到 99%以上。

关键词：深海海洋细菌；蛋白酶；耐盐稳定性；分离鉴定

文章篇号：1673-9078(2015)3-50-54 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.009

The Isolation and Identification of Deep-sea Bacteria That Produce Salt-tolerant Proteases

ZHAO Mou-ming, SHU Hui, CUI Chun, LEI Fen-fen, TANG Xue-lu
(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: This study was aimed at screening deep-sea bacteria that produce salt-tolerant proteases from deep-sea mud samples based on high-salt accumulation, fermentation rescreening, and salt-tolerant stability tests. Twenty-five strains of deep-sea marine microorganisms were selected, 14 of which demonstrated an increase in hydrolysis cycles on casein plates. A strain with high enzyme activity and salt stability was obtained based on fermentation rescreening and a salt-tolerance test, and was labeled as SWJSS3. Strain SWJSS3 was identified using 16S rDNA and a preliminary study on the effects of salt concentration on its protease yield and stability was conducted. The strain was able to grow in medium with salt concentrations between 0% and 10% and an OD_{600} of the bacterial suspension ranging from 0.08 to 1.98. The activity of proteases produced by SWJSS3 was maximal for a 1% salt concentration in the fermentation rescreening (233.56 ± 2 U/mL). After treatment with 15% (final concentration) sodium chloride solution at 4 ℃ for 1 h, the enzyme activity decreased to 40.70 ± 2.06% of the initial enzyme activity, but remained stable for up to 9 h. strain SWJSS3 was identified as *Pseudomonas aeruginosa*, exhibiting 99% 16S rDNA sequence similarity to *P. aeruginosa RP28*.

Key words: deep-sea marine bacteria; protease; salt stability; isolation and identification

海洋是生命的发源地，占地球表面积的 70%，拥有地球 80%的生物资源[1]。海洋环境一般存在着高盐、高压、寡营养、低温等特点。海洋微生物为了适应这些极端环境，在长期的进化过程中逐渐形成了一些独特的生理生化功能或遗传体系，并可产生新的功能活性物质，如多肽、胞外多糖、蒽醌类衍生物、大环内酯类、萜类、生物碱等[2]。目前已经鉴定和研究出的海洋微生物尚不足其生物总量的 5%，已发现的活性物质就更少，仅占总数的 1%左右[3]。

已报道的海洋微生物所产酶类主要有蛋白酶、碱性磷酸单脂酶、脂肪酶、溶菌酶、DNA 拓扑异构酶等，且已获得了部分相关酶的目的基因并对其生物表达和功能结构有了深入的研究[4]；其中不同的蛋白酶因具有不同的酶切位点，在一定程度上能够为不同的加工目的提供选择[5]，故其被广泛应用于洗涤、食品、医药、饲料废弃物处理等各个行业，在工业应用和科学研究等领域都有重要的作用，在酶制剂市场更可占到 65%的份额[6]。耐盐微生物或耐盐蛋白酶因其在高盐

收稿日期：2014-07-14

基金项目：深海微生物活性物质挖掘与其利用技术（2012AA092104）；热带海洋微生物新型耐盐特异性蛋白酶的挖掘与应用（2013418018-7）；广东省海洋经济创新发展区域示范专项（GD2012-D01-002）

作者简介：赵谋明（1964-），男，教授，博士生导师，研究方向为食品生物技术

环境下仍能生长，蛋白酶保留有较高活性和稳定性，故在污水处理、酱油发酵等领域受到研究者的青睐。目前国内外很多学者已经对耐盐微生物或耐盐蛋白酶有了一定的研究，其中 D Wang[7]等从米曲霉中分离筛选出一株耐高盐的中性蛋白酶并研究了其酶学性质；S D Gohel[8]等研究了一株耐盐碱的放线菌的热力学稳定性及特征；Mahadevan[9]等研究了产耐盐蛋白酶的铜绿假单胞菌的耐盐机制。

本文旨在利用海洋环境的高盐特点，通过高盐富集、复筛发酵和酶活测定等方式从深海海泥中筛选出耐盐且高产蛋白酶的菌株，以期利用其高产蛋白酶和在高盐环境下酶活较稳定的特点将其应用于酱油发酵、泡菜腌制、鱼露风味形成等食品加工领域或污水处理、生物降解、皮革脱毛等工业领域。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验筛选菌种所用样品取自中国南海、太平洋的深海海泥及红树林的不同区域。

人工海水由高级海水素（广州市海宝生物科技有限公司）配制而成，1 kg 海水素可配制 30 L 人工海水。

Folin 试剂：根据 GB/T 23527-2009[10]规定的方法配制。

酪氨酸购自 Sigma 公司，酪蛋白、酵母粉、牛肉膏等试剂均为市售分析纯。

1.2 培养基

富集培养基（g/L 人工海水）（1）：蛋白胨 5，酵母粉 1，磷酸铁 0.1，pH 7.2±0.1。

富集培养基（g/L 人工海水）（2）：蛋白胨 5，酵母粉 1，磷酸铁 0.1，氯化钠 100，pH 7.2±0.1。

筛选培养基（酪蛋白平板）g/L 人工海水）：酪蛋白 10，牛肉浸粉 3，磷酸二氢钾 2，琼脂粉 15，pH 7.2±0.1。

种子培养基：同富集培养基（1）。

发酵培养基（g/L 人工海水）：葡萄糖 5，酵母粉 10，磷酸氢二钾 0.5，氯化钙 1，硫酸铵 1，硫酸镁 0.3，氯化钠 10，pH 7.2±0.1。

保藏培养基（g/L 人工海水）：牛肉膏 4，蛋白胨 6，氯化钠 5，酵母粉 2，琼脂粉 15，pH 7.2±0.1。

1.3 方法

1.3.1 样品的富集及初筛

样品富集：称取 1 g 海泥样品于 50 mL 加有玻璃珠的灭菌离心管中，加入 10 mL 0.9%的无菌生理盐水后置于水浴摇床中振荡培养 30 min 使其充分分散，取 1 mL 上清液于富集培养基（1）中，37 ℃、180 r/min 恒温培养 12 h 后取 1 mL 于富集培养基（2）中，37 ℃、180 r/min 恒温培养 24 h。

样品初筛：取 2 次富集后的培养液 1 mL 用 0.9%的无菌生理盐水将其梯度稀释为 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3} 三个浓度，从中各取 100 μL 加注到已凝固的酪蛋白平板上，涂布均匀，倒置在 37 ℃恒温培养箱中培养 24 h。

分离纯化：从上述酪蛋白平板上挑取形态不同且有明显水解圈的单菌落，在新的酪蛋白平板上反复划线分离三次，得到纯的培养物接种到试管保藏斜面上，保藏于 4 ℃冰箱中。

1.3.2 样品的复筛

将上述保藏在试管斜面上的纯培养物活化三次后接种到种子培养基中，于 37 ℃、180 r/min 恒温振荡培养箱中培养 12 h，以 1%接种量接种到发酵培养基中，相同条件下培养 48 h，取出离心，取上清液即得粗酶液。粗酶液做适当稀释后测其酶活。

1.3.3 酶活的定义

酶活力单位的定义：1 mL 酶制剂在一定温度下，1 min 内水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活力单位。采用 Folin-酚显色法测酶活[11]，再按下式计算出酶活：

$$酶活力(U/mL)=\Delta OD_{680}\times K\times(4/10)\times N$$

注：OD_{680}：待测样品与空白对照之间的吸光度差值；K：吸光系数，即 OD 值为 1.0 时对应的 1 mL 酪氨酸的质量（μg），本实验中 K=94.309；4：反应试剂总体积（mL）；10：反应时间（min）；N：粗酶液的稀释倍数。

1.3.4 耐盐蛋白酶菌株的筛选

取一定量具有酶活的粗酶液稀释5倍与NaCl混合，使盐浓度为15%，以相同处理方式但不加NaCl的粗酶液为对照，4 ℃冰箱中放置3 h，分别测其残余酶活，计算相对值。

$$相对酶活/\%=加NaCl的残余酶活/不加NaCl的粗酶酶活$$

1.3.5 16S rDNA 分子鉴定及生物进化树

细菌总DNA的测定：按照CTAB[12]方法。

16S rDNA的分子鉴定：使用细菌通用的16S rDNA基因的通用引物，引物序列为：（正向引物5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’）和（反向引物5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’）。PCR反应总体系为（50 μL），包括:模板基因DNA 1.25 μL；上下游引物（20 μmol/L）各2.5 μL；Taq DNA聚合酶0.5 μL；10×buffer 5.0 μL；4种脱氧核苷酸混合物dNTP（各2.5 mmol/L）4.0 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 4.0 μL，双蒸水

（ddH_2O）30.25 μL。PCR反应程序采用两步法：第一步预变性94 ℃、2 min，变性98 ℃、10 s，退火55 ℃、1 min，延伸68 ℃、30 s（25个循环）,最后一次延伸时间延长到10 min；第二步，利用测序仪对样本的PCR扩增片段进行测序。（16S rDNA基因的克隆与测序由广州基迪奥生物科技有限公司完成）。

16S rDNA基因系统发育树：将测出的物种的16S rDNA基因序列输入到NCBI上的数据库中进行BLAST的分析，与GenBank中所有已测定的模式菌株的16S rDNA序列进行比较，根据比较结果下载相关的模式菌株的16S rDNA基因序列输入到文档中，使用Clustal软件进行比对，将比对结果导入MEGA6.0软件中构建细菌的16S rDNA基因系统发育树。

1.3.6 菌株 SWJSS3 在不同盐浓度下的生物量及产蛋白酶的最适盐浓度分析

在发酵培养基已有盐浓度的基础上继续添加向发酵培养基中补加 NaCl，使发酵培养液的其盐浓度分别达到为 1%、2%、3%、4%、5%、10%。另以盐浓度为 0%的发酵培养液为对照，37 ℃、180 r/min 恒温培养 48 h 后取出；以未接种的发酵液调零，在 600 nm 处测其 OD 值，而后将各盐浓度下的发酵液离心，测定所得粗酶液的酶活力。

1.3.7 菌株 SWJSS3 的粗酶液在 15%高盐环境下存放不同时间的耐盐稳定性

将菌株 SWJSS3 的粗酶液稀释 5 倍后补加一定量的 NaCl，使其盐浓度为 15%，以存放相同处理方式但不加 NaCl 的粗酶液为对照，4 ℃冰箱中放置 1 h、3 h、5 h、7 h、9 h，在不同时间点分别取样测量各自的粗酶酶活，计算其酶活的相对值。

相对酶活/%＝加*NaCl*的残余酶活/不加*NaCl*的粗酶酶活

1.3.8 数据分析

数据平均测定三次取其平均值，用 Excel 2003 进行数据分析处理并作图，实验数据表示为“平均值±标准偏差”的形式。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶产生菌的筛选及分离

从深海海泥样品中，以 10%高盐富集的方式筛选出 25 株耐盐微生物，其中有 14 株在初筛酪蛋白平板上能产生明显的水解圈，以 3 次划线分离将这 14 株菌纯化后点接至酪蛋白平板，37 ℃恒温培养 36 h 后，每株菌各取 3 个平行测其水解圈和菌落直径，结果见表 1。可知菌落直径（DC）为 0.61~2.00 cm，水解圈直径（DTC）为 0.89~3.81 cm，水解圈与菌落直径的比值（DTC/DC）范围为 1.46~4.03，其中比值在 3.50 以上的有 7 株，分别为 A1、A4、A5、B6、B7、B10、C12。

将 14 株菌进行 37 ℃、48 h 摇瓶发酵复筛，结果如表 1 所示，蛋白酶活在 200 U/mL 以上的有 5 株，分别是 A1、A3、A4、B10、C12，酶活最高的是菌株 A3，达到 233.56 U/mL，菌株 A2、B6、B9、C11 的酶活力均低于 20 U/mL，故不做进一步研究。从 DTC/DC 的比值和蛋白酶活的高低可看出，液体发酵产蛋白酶的能力与水解圈的大小并不一定呈正相关，这可能是菌株在固体和液体培养基中产酶能力不同所致，相关研究中也有类似报道[13]，所以不能仅由水解圈大小来判定产酶的酶活高低。

表 1 微生物产蛋白酶菌株的筛选结果

Table 1 Screening of protease producing strains

菌株	菌落直径/cm	水解圈直径/cm	水解圈/菌落圈	蛋白酶活/(U/mL)
A1	0.61±0.07	2.15±0.24	3.52±0.03	220.87±7.45
A2	1.18±0.05	2.26±0.17	1.92±0.13	2.88±0.52
A3	0.89±0.01	2.51±0.14	2.82±0.25	233.56±2.16
A4	0.68±0.02	2.51±0.21	3.69±0.41	221.85±7.88
A5	0.78±0.06	2.75±0.08	3.53±0.19	98.10±4.87
B6	0.81±0.01	2.95±0.04	3.64±0.08	8.88±1.01
B7	0.78±0.04	2.88±0.26	3.69±0.33	124.56±5.28
B8	2.00±0.01	3.81±0.28	1.91±0.32	74.99±2.83
B9	0.61±0.08	0.89±0.25	1.46±0.68	1.45±0.48
B10	0.71±0.07	2.82±0.20	4.03±0.44	203.95±8.94
C11	0.62±0.08	1.75±0.11	2.82±0.21	13.01±1.28
C12	0.81±0.09	2.85±0.17	3.52±0.24	203.16±8.48
C13	1.08±0.02	2.11±0.14	1.95±0.09	21.67±2.97
C14	1.01±0.04	3.01±0.07	2.98±0.32	168.93±5.66

2.2 耐盐蛋白酶菌株的筛选

将酶活高于 20 U/mL 的 10 株菌的发酵液稀释 5 倍配成终浓度为 15%的 NaCl 溶液，混匀后存放于 4 ℃冰箱，3 h 后测其残余酶活，以不加 NaCl 的菌株发酵液为对照，计算相对酶活值（%），结果如表 2 所示，从表中可以看出菌株 A3 的相对活力最高，为 40.70%，结合表 1 所示的初筛和复筛结果，确定 A3 为后续实验的研究对象，将其编号为 SWJSS3。

2.3 菌株 SWJSS3 的 16S rDNA 的序列分析及生物进化树

提取菌株 SWJSS3 的基因组 DNA，进行 16S

rDNA 的 PCR 扩增反应，将纯的扩增产物送到广州基迪奥生物科技有限公司进行测序，得到供试菌株的 16S rDNA 序列。通过 BLAST 软件将其与 GenBank 中所有已测得的原核生物的 16S rDNA 序列进行比对，将比对结果中相近的模式生物的 16S rDNA 序列下载下来用 Clustal 软件进行分析，导入到 MEGA 6.0 软件中构建细菌的 16S rDNA 基因系统发育树，结果如图 1 所示，从系统发育树可以看出菌株 SWJSS3 与 *Pseudomonas aeruginosa* RP28（KJ631608.1）处于同一分支上，其相似性达到 99%以上，故可确定 SWJSS3 为铜绿假单胞菌属。

表 2 蛋白酶耐盐菌株的筛选

Table 2 Screening of strains producing salt-tolerant proteases

菌株	发酵酶活 /(U/mL)	残余酶活 /(U/mL)	相对活力 /%
A1	220.87±7.45	76.07±3.57	34.44±2.85
A3	233.56±2.16	95.05±3.56	40.70±2.06
A4	221.85±7.88	71.74±5.37	32.34±2.92
A5	98.10±4.87	27.18±2.82	27.70±1.82
B7	124.56±5.28	36.72±4.25	29.48±1.46
B8	74.99±2.83	20.01±2.64	26.68±2.17
B10	203.95±8.94	63.18±4.65	30.98±3.59
C12	203.16±8.48	65.25±4.27	32.12±2.82
C13	21.67±2.97	3.18±0.33	14.66±2.86
C14	168.93±5.66	46.85±3.39	27.74±2.28

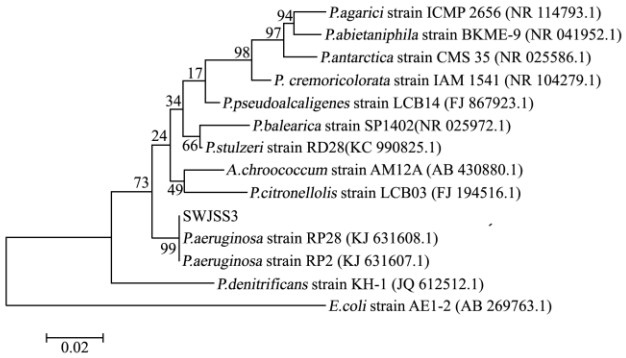


图 1 依据 16S rDNA 序列构建的供试菌株 SWJSS3 及相关菌株的系统发育树

Fig.1 The phylogenetic tree of the test strain SWJSS3 and related strains based on 16S rDNA sequences

2.4 菌株 SWJSS3 在不同盐浓度下的生物量及产蛋白酶的最适盐浓度

在发酵培养基已有盐浓度的基础上继续添加 NaCl，使其发酵培养液的盐浓度分别达到 1%、2%、3%、4%、5%、10%，以盐浓度为 0%的发酵培养液为对照，37 ℃、180 r/min 摇床培养 48 h 后测其生物量及酶活，结果如图 2 所示，可以看出，菌株 SWJSS3 在 0%~10%的盐浓度下其 OD_{600} 值为 0.08~1.98，说明菌株 SWJSS3 在 0%~10%的盐浓度下均可生长；菌株 SWJSS3 产蛋白酶的最适盐浓度为 1%和 2%，其对应酶活分别为 235 U/mL 和 226 U/mL，在 0%、3%盐浓度下酶活较低，在 4%、5%、10%的盐浓度下基本无酶活。说明该菌株在 0%~10%的盐环境下能够生长且在 1%~3%的盐浓度下生物量较高，但当盐浓度超过 4%时，菌株已基本不产蛋白酶。

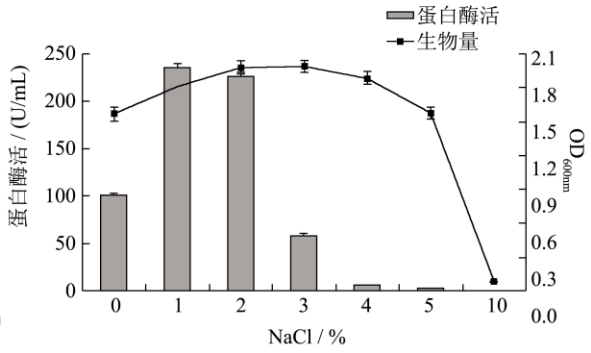


图 2 氯化钠对菌株 SWJSS3 产蛋白酶和生物量的影响

Fig.2 The effects of NaCl on protease and biomass production for strain SWJSS3

2.5 菌株 SWJSS3 的粗酶液在 15%高盐环境下存放不同时间的耐盐稳定性

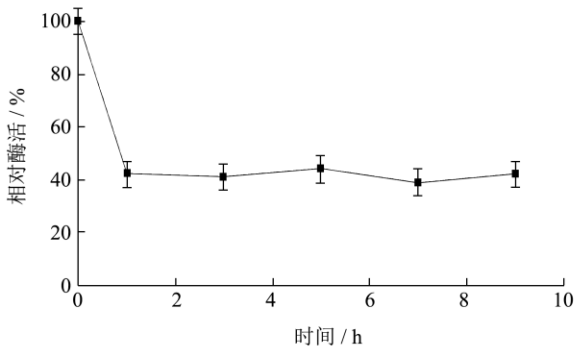


图 3 氯化钠对菌株 SWJSS3 生产的蛋白酶稳定性的影响

Fig.3 The effects of NaCl on the stability of proteases produced by strain SWJSS3

取菌株 SWJSS3 的粗酶液稀释 5 倍与一定量的 NaCl 混合，使其盐浓度为 15%，放置在 4 ℃冰箱中，在 1 h、3 h、5 h、7 h、9 h 时各取一定量测其酶活，以不加 NaCl 的发酵液为对照，结果如图 3 所示。以不加 NaCl 时的初始酶活为 100%，蛋白酶活在 1 h 内已降到初始酶活的 40%左右，在后面的数小时内酶活基本保持稳定，说明 NaCl 加入到发酵液后，蛋白酶

出现了瞬时失活效应，其后高浓度的 NaCl 则对蛋白酶的稳定性有一定的提高作用，相关现象在其它文献中也有报道[14]。

3 结论

3.1 本研究从深海海泥中筛选出一株酶活性能高且耐盐稳定性好的菌株 SWJSS3，据 16S rDNA 测序后与 GenBank 中的模式菌株进行比对，鉴定该菌株为 *Pseudomonas aeruginosa*。该菌株产蛋白酶的发酵培养基所需最适盐浓度为 1%，蛋白酶活达到 230 U/mL 左右，粗酶在 15% NaCl 溶液中会产生瞬时失活效应，残余酶活为初始酶活的 40%左右。

3.2 实验结果显示，菌株 SWJSS3 是一株具有较好的酶活性能和耐盐稳定性的菌株，其在生产中的应用有待进一步研究。

参考文献

[1] Chi Z, Liu Z Q. Marine yeasts and their applications in mariculture [J]. Journal of Ocean University of China (English Edition), 2006, 5(3): 251-256

[2] Blunt J W, Copp B R, Munro M H G, et al. Marine natural products [J]. Nat Prod Rep, 2011, 28: 196-268

[3] 周世水,丁金国,姚汝华.海洋微生物药物的开发和应用[J].工业微生物,2002,32(2):48-51
ZHOU Shi-shui, DING Jin-guo, YAO Ru-hua. Development and application of marine microorganism drugs [J]. Industrial Microbiology, 2002, 32(2): 48-51

[4] 郝建华.海洋低温碱性蛋白酶的基因克隆、序列分析及结构模建和功能研究[D].中国海洋大学,2003
HAO Jian-hua. Clonings, equeneeanalysis, strueture model and function study of marine low-temperature alkaline protease [D]. Chinese Marine University, 2003

[5] 赵谋明,雷芬芬,钟泓波,等.微小杆菌属 SWJS2 蛋白酶对鱼肉酶解特性的研究[J].现代食品科技,2014,30(2):153-158
ZHAO Mou-ming, LEI Fen-fen, ZHONG Hong-bo, et al. Enzymatic hydrolysis of fish proteins using protease produced by exiguobacterium sp.SWJS2 [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(2): 153-158

[6] Song Q, Zhang X. Characterization of a novel non-specific nuclease from thermophilic bacteriophage GBSV1 [J]. BMC biotechnology, 2008, 8(1): 43

[7] D Wang, Z Y Zheng, J Feng, et al. A high salt tolerant neutral protease from aspergillus oryzae:purification, characterization and kinetic properties [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2013, 49(4): 378-385

[8] S D Gohel, S P Singh. Characteristics and thermodynamics of a thermostable protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 56: 20-27

[9] Mahadevan, Surianarayanan, Dhandapani, et al. Batch kinetic studies on growth of salt tolerant Pseudomonas aeruginosa secreting protease in a biocalorimeter [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2010, 15(4): 670-675

[10] GB/T 23527-2009 蛋白酶制剂[S].中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
GB/T 23527-2009 Protease preparations [S]. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of People's Republic of China

[11] 顾瑾麟,夏永军,张红发,等.开菲尔粒中高产蛋白酶菌株的筛选及培养基优化[J].现代食品科技,2013,29(3):558-562
GU Jin-lin, XIA Yong-jun, ZHANG Hong-fang, et al. Screening of high protease-producing bacteria of kefir grians and optimization of fermentation media [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(3): 558-562

[12] Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria.current protocols in molecular biology [M]. New York: J Wiley & Sons, 1987, 2.10 -2.12

[13] 刘永强.中度嗜盐菌产功能酶菌株的筛选及发酵条件优化[D].东北林业大学,2012
LIU Yong-qiang. Screening of moderately halophilic bacterium for production function enzyme and optimizing of the fermentation conditions [D]. Northeast Forestry University, 2012

[14] 王栋.米曲霉蛋白酶在高盐环境的催化动力学及其在酱油酿造中的应用[D].江南大学,2013
WANG Dong. Catalytic kinetics of aspergillus oryzae protease in high-salt eevironment and its application in soy sauce fermentation [D]. University Of The South, 2013