

红河传统发酵豆豉中高纤溶活性菌株的分离筛选及其纤溶酶基因分析

龚福明^{1,2}, 李晓然¹, 宋园亮¹, 罗义勇¹, 张忠华¹, 柳陈坚¹

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500) (2. 德宏职业学院基础医学部, 云南芒市 678400)

摘要: 运用脱脂乳固体培养基及纤维蛋白固体培养基的两步分离筛选法, 从云南红河传统发酵豆豉中分离筛选具有高产豆豉纤溶酶活性的菌株, 同时对它们的豆豉纤溶酶基因进行克隆分析, 以期新型功能性豆豉的研发提供备选菌株及理论依据。研究结果表明, 两步分离筛选法能有效地从云南红河传统发酵豆豉中筛选到高产豆豉纤溶酶的菌株 *Bacillus subtilis* LC-2-1, 对该高产菌株的豆豉纤溶酶成熟肽基因分析及预测结果表明, 菌株 *B subtilis* LC-2-1 确实能分泌一种由 825 个碱基编码 275 个氨基酸残基且分子量约为 27.4 kDa 的豆豉纤溶酶, 与纳豆激酶及其他豆豉纤溶酶相比差异显著, 同源性仅为 85.1%。同时其豆豉纤溶酶活性分析结果则表明, 菌株 *B subtilis* LC-2-1 所产纤溶酶活性较高, 可达 79.84 U/mL。因此, 本研究结果将为新型且具有溶血栓功能发酵豆豉的研发提供备选菌株及理论依据。

关键词: 传统发酵豆豉; 豆豉纤溶酶; 分离筛选; 基因分析;

文章编号: 1673-9078(2014)8-76-81

Screening of High-yield Fibrinolytic Enzyme-producing Strains from Traditional Fermented Douchi (Honghe, Yunnan) and Analysis of the Gene Encoding the Fibrinolytic Enzyme

GONG Fu-ming^{1,2}, LI Xiao-ran¹, SONG Yuan-liang¹, LUO Yi-yong¹, ZHANG Zhong-hua¹, LIU Chen-jian¹

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

(2. Basic Medical Department, Dehong Vocational College, Mangshi, 678400, China)

Abstract: High-yield fibrinolytic enzyme-producing bacterial strains were isolated and screened from traditionally fermented douchi from Honghe, by a two-step screening method, in which skim milk agar and fibrin agar were used. The bacterial gene encoding the fibrinolytic enzyme was cloned and analyzed to provide bacterial reference strains and a theoretical basis to develop a new version of functional douchi. Using these methods, a high-yield fibrinolytic enzyme-producing strain *Bacillus subtilis* LC-2-1 was successfully isolated, which secreted a kind of douchi fibrinolytic enzyme. The molecular mass of the enzyme was 27.4 kDa that contained 275 amino acids encoded by 825-bp. Compared to other douchi fibrinolytic enzymes and nattokinase, the enzyme produced by *B. subtilis* LC-2-1 showed significant differences, and the amino acid sequence homology was 85.1%. Additionally, the enzyme had high fibrinolytic activity, which was up to 79.84 U/mL. Thus, these results could provide a bacterial reference strain and theoretical basis to develop a new version of fermented douchi with thrombolytic activity.

Key words: traditional fermented douchi; douchi fibrinolytic enzyme; isolation and screening; genetic analysis

豆豉纤溶酶 (Douchi fibrinolytic enzyme, DFE) 是中国学者受日本学者 Sumi^[1]等研究纳豆激酶 (Nattokinase, NK) 启发, 从中国传统发酵豆豉中分

收稿日期: 2014-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160309)

作者简介: 龚福明 (1982-), 男, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为应用食品微生物; 李晓然, 并列第一作者

通信作者: 柳陈坚 (1968-), 博士, 教授, 研究方向为应用微生物、食品营养与安全

离纯化的一类由杆菌属细菌分泌产生并具有纤溶活性的丝氨酸蛋白酶^[2]。研究表明, DFE 可以通过激活体内纤溶酶原及增加内源性纤溶酶活性等机制发挥溶栓作用, 在发挥溶栓作用时有着纤溶活性高、无毒副作用、不引起内出血、半衰期长及可口服等优点, 因此 DFE 无论作为抗血栓新药, 还是作为预防心脑血管疾病的保健食品, 均具有极高的开发应用价值^[3-4]。云南除海拔 2600 米以上的高寒山区外, 全省各地全年均可播种夏大豆^[5], 因此云南的大豆资源极其丰富。云南

独特的气候条件与多样的人文环境,为创造特有的传统发酵豆豉资源提供了极佳条件,其中红河州的豆豉资源尤为丰富,但是由于多方面原因使人们未能正确认识云南传统发酵豆豉的营养价值,使其长期处于手工作坊式生产状态。

基于上述现状,本研究首先以脱脂乳固体培养基对具有蛋白酶活性菌株进行初筛,随后采用纤维蛋白固体培养基对具有纤溶酶活性菌株进行复筛,同时应用茚三酮法测定纤溶酶活性,并由此探究云南省红河州传统发酵豆豉中高产豆豉纤溶酶菌株的分布状况及其特性,以期为具有高营养附加值发酵豆豉的工业化生产及开发,尤其是具有溶血栓作用的新型功能性发酵豆豉研发提供备选菌株及理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验样品

采集自云南省红河州的63个传统发酵豆豉样品。

1.2 试验用培养基

营养肉汤(杭州天和微生物试剂,加2%琼脂后即NA平板);17%明胶培养基:22g营养肉汤培养基中加入明胶170g,用去离子水定容至1L,121℃灭菌15min;LB培养基:10g胰蛋白胨,5g酵母浸膏,10g氯化钠,去离子水定容至1L,121℃灭菌15min;0.3%纤维蛋白琼脂糖平板^[6]:将3.0g纤维蛋白溶于500mL灭菌磷酸盐缓冲液(浓度为50mmol/L,pH7.4)中搅拌过夜;然后将10g琼脂糖溶于500mL灭菌磷酸盐缓冲液(浓度为50mmol/L,pH7.4),待琼脂糖溶液冷却至70℃时将二者混匀配制成平板,每个平板25mL,凝固后打孔(孔径为6.0mm)。

1.3 试验用试剂及溶液

1.3.1 主要试剂

胶原蛋白, Sigma; 明胶, Sigma; 三氯乙酸, 简称TCA, 天津市化学研究所; 茚三酮, 天津市化学研究所; CTAB, Novon; Tris base, Novon; 1.25 U EX Taq DNA聚合酶, Takara, Dalian, China; 16S rDNA通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCAT-GGCTCAG-3'和1492R: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3', 北京鼎国生物技术有限责任公司; UNI-Q-10柱式DNA胶回收试剂盒, 上海生工; 试验用试剂除特别注明外, 均为分析纯。

1.3.2 主要溶液

0.01 mol/L L-亮氨酸溶液(Novon): 将0.1312 g L-

亮氨酸溶于0.2 mol/L柠檬酸缓冲液, 最终定容至100 mL; 0.3 mol/L三氯乙酸: 4.89 g三氯乙酸, 添加蒸馏水混匀并定容至100 mL, 4℃避光保存; 柠檬酸缓冲液(pH 5.0): 21.0 g柠檬酸溶于250 mL蒸馏水及200 mL 1 mol/L NaOH, 将pH调至5.0后定容至500 mL, 4℃保存; 0.3%纤维蛋白溶液: 将15.4 g Na₂HPO₄和1.25 g NaH₂PO₄溶于800 mL蒸馏水, 将pH调至7.4后加入3.0 g纤维蛋白, 待纤维蛋白溶解后定容至1 L; 氯化锡溶液: 将0.1 g氯化锡溶于6.2 mL柠檬酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 5.0, 用时配制); 快检缓冲液: 2 mol/L NaOH 2.5 mL, 10% SDS 2.5 mL, 0.5 mol/L EDTA 0.5 mL, 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 2.5 mL, 超纯水定容至50 mL。

1.4 试验用试剂及溶液

恒温摇床, 上海智诚 ZHWY-200D; 电子分析天平, 德国赛多利斯 SI-234; PCR仪, ABI PCR system 2720, Singapore; 高速冷冻离心机, 德国 SIGMA 3-18K; 紫外分光光度计, 英国 GENOVA; 恒温水槽, KTS-2346, 日本 AS ONE; 金属浴, 日本 FUNAKOSHI。

1.5 豆豉中高纤溶活性菌株的分离鉴定

1.5.1 豆豉中高纤溶活性菌株的分离与筛选

无菌条件下将精确称取的1.0 g各豆豉样品置于5 mL灭菌生理盐水中捣碎, 浸泡30 min, 充分洗脱附着微生物后, 取20 μL适宜稀释度的混悬液(10⁻⁶和10⁻⁷)涂布至NA平板, 35℃倒置培养48 h, 随后根据菌落形态从每个平板上随机挑取5~10个克隆菌落进行纯化^[7]与编号, 再用5 mL灭菌营养肉汤对纯化菌株进行扩大培养(35℃, 170 r/min振荡培养48 h), 并分别将20 μL纯化增菌液接种至5 mL明胶培养基中, 35℃培养48 h后, 置于4℃静置30 min以检验菌株的明胶液化能力, 同时用脱脂乳培养基检测明胶液化试验阳性菌株的产蛋白酶能力。最后对产蛋白酶能力强, 即脱脂乳培养基上透明圈明显的菌株进行复壮, 然后各取50 μL离心上清(8000 r/min, 4℃, 10 min)滴加至纤维蛋白平板, 35℃孵育48 h, 观察菌株的产纤溶蛋白酶能力。

1.5.2 高纤溶活性菌株的分子生物学鉴定

首先应用CTAB法提取待测菌株的基因组DNA^[4], 然后用16S rDNA通用引物^[8]对其进行扩增, 反应体系为50 μL: 2 μL DNA模板, 25 μL 1.25 U ExTaq酶混合液(TaKaRa), 引物F27和R1492各1 μL(浓度均为10 μmol/L), 21.0 μL ddH₂O; 扩增程序为

95 °C 5 min, 1 个循环; 95 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 随后 72 °C 延伸 10 min。最后将扩增产物进行纯化测序, 并将测序结果在 GenBank 中进行比对, 当标准株与参考株的核苷酸序列同源性大于 97% 时, 可将它们确定为同一个种^[9]。

1.5.3 纤溶酶活性测定 (茚三酮法)^[10-11]

1.5.3.1 L-亮氨酸标准曲线绘制

将 0.01 mol/L L-亮氨酸标准液依次稀释至 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 μmol/mL, 分别取不同浓度的亮氨酸 200 μL 与 50 mmol/mL Tris-HCl 缓冲液 300 μL (pH 7.5, 含 0.5 mmol/mL CaCl₂) 及 0.3 mol/L TCA 溶液 500 μL 混合, 37 °C 振荡反应 2 h (150 r/min), 然后再分别吸取 100 μL 上述各亮氨酸反应上清 (12000 r/min, 4 °C, 10 min) 与 900 μL 柠檬酸缓冲液、100 μL 氯化锡溶液及 2 mL 茚三酮溶液振荡混匀, 100 °C 水浴煮沸 20 min 后定容至 10 mL, 检测 570 nm 的吸光度 (OD), 每个浓度同时测定三个样品, 最终以亮氨酸浓度为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线。

1.5.3.2 纤溶活性测定

将 200 μL 待测菌株的离心上清与 300 μL 0.3% 纤维蛋白溶液混合, 然后加入 500 μL 0.3 mol/L TCA 溶液, 37 °C 振荡反应 2 h (150 r/min), 每个样品做三个平行, 反应结束后将离心上清 (12000 r/min, 4 °C, 10 min) 即粗酶反应液置于 -20 °C 灭活 30 min, 然后取 100 μL 灭活反应液按上述方法检测 570 nm 的 OD 值。同时以 500 μL 50 mmol/mL 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 含 0.5 mmol/mL CaCl₂) 作为空白对照; 以 200 μL 粗酶液与 300 μL 的 Tris-HCl 缓冲液混合作为酶空白对照 (每个样品做一个对照); 200 μL Tris-HCl 缓冲液与 300 μL 0.3% 纤维蛋白溶液混合作为底物对照, 并计算该酶在 37 °C, pH 7.5 时的纤溶酶活性 (最终样品 OD 值=样品 OD 值-酶空白对照 OD 值-底物对照 OD 值; 计算公式=(A×C)/T, A 代表样品反应液中亮氨酸的含量, C 代表样品稀释倍数, T 代表反应时间)。

1.6 豆豉由来高纤溶活性菌株的 DFE 基因分析

1.6.1 DFE 基因扩增

根据 DFE 基因成熟肽核苷酸序列设计引物(上游引物 5'-CGCCATGGCGCAGTCCGTGCTTAC-3'; 下游引物 5'-GTCGGATCCTTACTGAGCTGCCGCTGTAC-3')^[12-13]进行基因扩增; 反应体系为 25 μL: 包括 1 μL DNA 模板, 12.5 μL 5 U ExTaq 酶混合液

(TaKaRa), 上游引物和下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), 10.5 μL ddH₂O; 扩增程序为 94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。另外, 同时以 DFE 前导肽与成熟肽核苷酸序列设计引物(上游引物: 5'-CTGAATTCGCAGGGAAATCAAACGG-3'; 下游引物: 5'-TGATCCGATTACGAATGC-3')进行扩增, 反应体系同上, 扩增程序为 94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 150 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.6.2 豆豉纤溶酶基因的核苷酸序列分析

应用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒将上述 PCR 产物直接进行纯化, 随后将 DFE 成熟肽基因连接至相应载体, 反应体系 10 μL, 包含 2 μL 载体 (Invitrogen PCR@2.1 vector), 10×连接缓冲液 1 μL、无菌水 4 μL、T4 DNA 连接酶 1 μL 及 2 μL 新鲜 PCR 纯化产物, 混匀后置于 14 °C 金属浴进行连接反应过夜。连接完成后将其与 100 μL 感受态细胞(*Escherichia coli* DH5α) 混匀, 冰浴 30 min 后 42 °C 水浴热激 90 s, 随后冰浴 2 min 并与 1 mL LB 液体培养基混合, 37 °C 振荡培养 3 h (250 r/min)。培养结束后离心 30 s (4 °C, 6000 r/min), 弃上清, 取 100 μL 沉淀涂布至氨苄青霉素平板, 37 °C 培养过夜, 随机挑取菌落, 用快检缓冲液裂解菌体, 然后进行琼脂糖凝胶电泳检测, 最后将含有目的基因片段的阳性单克隆菌落用 LB 液体培养基培养过夜, 用于双向测序(北京三博公司)与保存, 并将测序结果提交 NCBI (National Center for Biotechnology Information, NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行核苷酸同源比对, 同时对核苷酸序列进行系统进化分析及氨基酸序列的预测分析。

1.7 数据处理与分析

本研所得实验数据均采用计算 RSD 值的统计软件进行计算处理, 所得平均值和标准偏差均由两个以上样品的测量结果经计算得到; 在进行核苷酸序列比对时, 首先利用 CLUSTAL X^[14]软件对核苷酸序列进行多重比对, 后再利用 MEGA 4.0 软件构建系统进化树 (NJ 法, neighbor-joining method)^[15], 由此分析豆豉纤溶酶的系统进化, 最后再利用 DNAMAN 软件对豆豉纤溶酶的氨基酸序列进行预测分析。

2 结果与讨论

2.1 豆豉中高纤溶活性菌株的分离与筛选

云南红河等地区有着丰富的豆豉资源, 在这些传

统发酵豆豉中蕴藏着大量的微生物资源,其中蕴含的枯草芽孢杆菌具有药食兼用特性,因此它被广泛应用于工农业生产及药物研发等方面,而其所具备的溶栓特性更是近年的研究热点。由于诸多原因,云南的豆豉资源未被充分利用,本研究正是基于这一现状,利用现代发酵技术并根据生产需要从云南传统发酵豆豉中筛选功能性菌株进行多菌种混合发酵,以期开发出风味独特、保健功能及市场前景良好的新型功能性豆豉。

筛选高活性纤溶酶菌株的传统方法是以大量液体培养为基础,再辅以含凝血酶及纤维蛋白原的固体培养基进行筛选,此方法存在工作量庞大、成本高,筛选效率低及重复性差等不足。与之相比,本研究采用的以脱脂乳固体培养基进行初筛,再辅以纤维蛋白固体培养基进行复筛,同时采用茚三酮法测定纤溶酶活

性的两步固态分离法则具有简便易行、工作量小、成本低,重复性好等优势。表1结果显示,云南省红河州传统发酵豆豉中蕴藏大量产纤溶酶微生物菌株,其比例占分离菌株的32.8%,其中分离自建水样品的菌株产纤溶酶能力最强,其纤溶圈直径均值可高达 2.07 ± 0.22 cm。随后实施的纤溶蛋白复筛结果表明,编号为LC-2-1的菌株纤溶能力最强,它的分子生物学鉴定结果表明,菌株LC-2-1与枯草芽孢杆菌的同源性高达100%,因此将它命名为*B subtilis* LC-2-1 (GenBank No. JX993831)。另外,表1结果还表明,分离自红河州传统发酵豆豉中的菌株在产纤溶酶特性上存在明显的地域差异,推测导致该差异的原因可能与产地气候、豆豉生产发酵工艺及后发酵阶段所添加香辛料不同有关,具体原因还有待于进一步实验验证。

表1 不同地区豆豉由来菌株产蛋白酶能力的差异

Table 1 The different protease activities between various fermented douchi collected from different regions

样品产地	分离菌株数	明胶试验阳性	蛋白酶试验阳性	蛋白酶透明圈直径/cm
红河	24	10	8	1.79 ± 0.32
元阳	18	10	7	1.83 ± 0.26
绿春	21	13	6	1.92 ± 0.25
个旧	17	9	4	1.73 ± 0.12
弥勒	41	16	15	1.93 ± 0.26
开远	25	5	4	1.96 ± 0.12
石屏	27	17	15	2.03 ± 0.15
建水	34	15	9	2.07 ± 0.22
合计	207	95	68	-

注:结果为平均值±标准偏差。

2.2 DFE 活性测定

豆豉纤溶酶活性测定方法通常有纤维蛋白平板法、酶标仪法、酶联免疫吸附法、四肽底物法等多种方法,虽然这些方法各自具有相应优势,然而却普遍存在误差较大、重复性差、方法复杂、使用条件受限等不足^[16]。本研究所采用的茚三酮法则克服上述不足,具有简便易行、准确及重复性好等优点。本次研究采用茚三酮法测定纤溶酶活性时的亮氨酸标准线性回归方程为线性回归方程 $y=0.192x-0.006$, $R=0.999$,同时将每分钟水解纤维蛋白产生 $1\ \mu\text{mol}$ 亮氨酸所需酶量定义为一个酶活单位(U/mL),而最终测定结果表明,菌株*B subtilis* LC-2-1的纤溶酶活性最高,可达 $79.84\ \text{U/mL}$ 。

2.3 DFE 基因分析

2.3.1 DFE 基因的 PCR 扩增

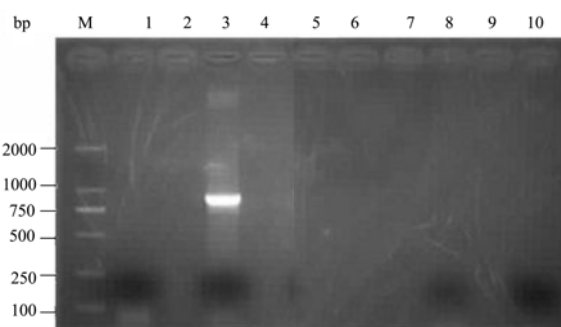


图1 菌株*B. subtilis* LC-2-1所产豆豉纤溶酶的成熟肽基因与前肽-成熟肽基因扩增结果

Fig.1 The amplifying results of mature fibrinolytic enzyme and mature enzyme with pre-peptide derived from *B. subtilis* LC-2-1

注: Lane M: DNA marker; Lane 1: 空白对照; Lane 3 菌株LC-2-1的MA扩增结果; Lane 6: LC-2-1菌株的Q扩增结果。

DFE成熟肽基因(MA)和前导肽-成熟肽基因(Q)的核苷酸序列是豆豉纤溶酶分子研究的目的基因,本研究分别按照DFE成熟肽基因和前导肽-成熟肽基因

设计引物,对 *B subtilis* LC-2-1 菌株的 DFE 基因进行扩增。结果表明,只有运用豆豉纤溶酶成熟肽基因设计的引物才能扩增出约 800 bp 的目的基因片段(图 1),而运用前导肽-成熟肽基因设计的引物则未能扩增出相应的目的基因片段;由此可初步推测上述两菌株所分泌的纤溶酶基因与 DFE 的全基因相比存在一定变异。

2.3.2 DFE 基因分析

DFE 是一类由杆菌属细菌分泌产生的单链多肽纤溶酶,其成熟肽由 825 个脱氧核糖核酸编码的 275 个氨基酸残基组成,分子量约为 27.7 kDa,活性中心高度保守,由 Asp-32, His-64 和 Ser-221 三个氨基酸残基组成^[17]。本研究中分离自红河传统发酵豆豉的 DFE 成熟肽基因序列经 DNAMAN 软件进行氨基酸序列预测分析,结果表明菌株 *B subtilis* LC-2-1 所分泌产生的 DFE 成熟肽由 275 个氨基酸组成(图 2),分子量约为 27.4 kDa,与文献报道的结果相符。

将预测的 DFE 成熟肽氨基酸序列与 *Bacillus subtilis* subsp. Natto BEST195 (YP_005560283), *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* DC-12 (ZP_11393657) 及 *Bacillus subtilis* DC-2(ABA29609)所分泌的纤溶酶进行同源性分析(图 3,表 3),分析发现 4 种不同来源的纤溶酶分属两大类群(图 3),本研究中的实验菌株 *B subtilis* LC-2-1 所分泌的 DFE 氨基酸序列与 *B amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* DC-12 (ZP_11393 ZP_11393657657)由来 DFE 的氨基酸序列相比差异较小,差异率仅为 0.7%(表 3);而与 *B subtilis* subsp. Natto BEST195 (YP_005560283)和 *B subtilis* DC-2 (ABA29609)由来 DFE 的氨基酸序列相比差异较大,可达 14.9%(表 3)。而图 4 的分析结果则表明,红河传统发酵豆豉中获得的 DFE 与 *B subtilis* subsp. Natto BEST195 (YP_005560283)和 *B subtilis* DC-2 (ABA29609)由来 DFE 存在较大差异,但它们均保有丝氨酸蛋白酶活性中心的三个高度保守氨基酸残基(Asp-32、His-64、Ser-221;图 4 中红色矩形框标记部分)。此外,由于本实验未对所获得的 DFE 进行分离纯化及相应生化特性研究,因此还有待于对源自菌株 *B subtilis* LC-2-1 的 DFE 进行大量制备表达及分离纯化,同时对其生化特性进行研究,以期为后续的研究奠定理论基础。

综上所述,云南传统发酵豆豉中确实存在着分泌产生豆豉纤溶酶的微生物资源,而本研究所创建的以脱脂乳固体培养基进行初筛,再以纤维蛋白固体培养基进行复筛的筛选体系确实可行。为更好提升发酵豆

豉的保健功能及风味,后续发酵试验将以 *B subtilis* LC-2-1 主要试验对象,深入探讨豆豉的纯种发酵或多菌种混合发酵的可能性,实现功能性豆豉开发应用的产业化;也坚信随着研究的深入实施,云南豆豉资源将得到有效开发,达到物尽其用。

1	ATGGCGCAGTCCGTCGCTTACGGCGTATCAGACATTAAAGCCCTGCTCGACTCTCAA	10	20	30	40	50	60
1	M A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q						
61	GGCTTCACCGGATCAAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGATTCTCTCAT	70	80	90	100	110	120
21	G F T G S N V K V A V I D S G I D S S H						
121	CCTGATTTAAAGGTAGCAGGGGGGGCCAGCATGGTTCCTCTGAAACAAATCCTTTCCAA	130	140	150	160	170	180
41	P D L K V A G G A S M V P S E T N P P Q						
181	GACAACAACCTCTCAGGAACCTCACGTTGCCGGTACAGTTGCCGCTCTTAATAACTCAGTC	190	200	210	220	230	240
61	D N N S H G T H V A G T V A A L N N S V						
241	GGTGATTAGGCGTTGCGCCAAAGCGCATCTTTACGGCTGTTAAAGTTCTCGGCGCTGAC	250	260	270	280	290	300
81	G V L G V A P S A S L Y A V K V T G A D						
301	GGTTCGGCCAGTACAGCTGGATCATTAAAGGAAATGAGTGGCGATCGCAACAATATG	310	320	330	340	350	360
101	G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M						
361	GACGTTATTAACATGAGCCTCGCGGACCTCTGGTTCTGCAGCGTTAAAGCGCGGAT	370	380	390	400	410	420
121	D V I N M S L G G P S G S A A L K A A V						
421	GACAAGCCGTTGCTTCCGGCGTGTAGTGTAGCGCCAGCGGTACGAAAGCCACTTCC	430	440	450	460	470	480
141	D K A V A S G V V V A A A G N E G T S						
481	GGCGGCTCAAGCACAGTGGGCTACCTGGTAAATACCTCTGTGATTCGCGTAGGGGCA	490	500	510	520	530	540
161	G G S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A						
541	GTTAAGCAGCAGCAACCAAGCAGCATCTCTCAAGCGTGGTTCGAGCTTGATGTCATG	550	560	570	580	590	600
181	V N S S N Q R A S F S S V G S E L D V M						
601	GCACCGGCTCTCTATCCAAGCAGCTTCTGGAAACAAATACGGCGGCTACAATGGT	610	620	630	640	650	660
201	A P G V S I O S T L P G N K Y G A Y N G						
661	ACGTCAATGGCATCTCGCAGCTTCCCGGCGGCTGCTTTGATCTTTTAAAGCACCCG	670	680	690	700	710	720
221	T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P						
721	AACTGGACAACACTCAAGTCCGCGAGCTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTGGTGAT	730	740	750	760	770	780
241	N W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D						
781	GCTTTCTACTACGGAAAGGGCTGATCAAGTACAGCGGCGAGCTCAGTAA	790	800	810	820	830	
261	A F Y Y G K G L I N V Q A A A Q *						

图2 *B subtilis* LC-2-1由来豆豉纤溶酶成熟肽编码基因序列及其相应氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide (upper line) and deduced amino acid (lower line) sequences of subtilisin DFE gene which derived from *B. subtilis*

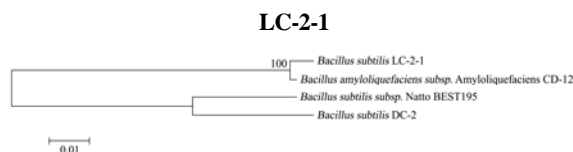


图3 *B subtilis* LC-2-1由来豆豉纤溶酶氨基酸序列的同源性分析

Fig.3 A phylogenetic tree showing the relationship of deduced amino acid sequences of different subtilisin fibrinolytic enzymic gene

Note: The tree was constructed using neighbor-joining analysis based on partial deduced amino acid sequences of subtilisin fibrinolytic enzymic gene, numbers at nodes indicate bootstrap values (n=500 replicates). Bar: 0.01 nucleotides substitution per site.

表2 豆豉纤溶酶基因差异率比较

Table 2 The differences of evolutionary rate between various

DFE genes				
序号及菌株编号	1	2	3	4
1. LC-2-1				
2. YP_005560283	0.149			
3. ZP_11393657	0.007	0.14		
4. ABA29609	0.149	0.056	0.149	

Note: YP_005.pro: YP_005560283 alkaline serine kinase [*B. subtilis* subsp. *Natto* BEST195]; ZP_113.pro: ZP_11393657 subtilisin [*B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* DC-12]; ABA296.pro: ABA29609 nattokinase precursor [*B. subtilis*] DC-2; LC-2-1 .pro : JX_993831 mature peptide of DFE [*B. subtilis*] LC-2-1.

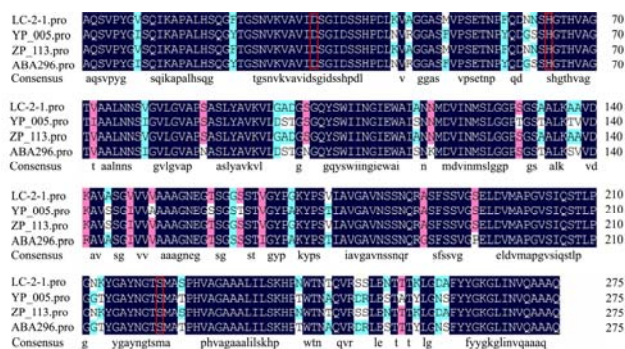


图4 *B. subtilis* LC-2-1由来豆豉纤溶酶与已知成熟肽氨基酸序列同源性比对结果

Fig.4 Alignment comparison of amino acid sequences of mature peptide of fibrinolytic enzyme derived from *B. subtilis* LC-2-1 between registered sequences

3 结论

3.1 本研究所创建的以脱脂乳固体培养基进行初筛,再以纤维蛋白固体培养基进行复筛并用茛苕三酮法测定DFE酶活的筛选体系确实可行,可用于云南传统发酵豆豉等传统发酵制品中产DFE菌株的分离筛选。

3.2 本研究从红河传统发酵豆豉中成功分离到具有高纤溶活性的菌株 *B. subtilis* LC-2-1,其分泌的DFE活性更是高达79.84 U/mL,因此它们均可应用于后续功能性发酵豆豉研发。

3.3 本研究所获得DFE与 *B. subtilis* subsp. *Natto* BEST195 (YP_005560283)及 *B. subtilis* DC-2 (ABA29609)由来DFE的氨基酸序列相比差异显著,

同源性仅为85.1%。

参考文献

[1] Sumi H, Hamada H, Tsushima H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a typical and popular soybean food in the Japanese diet [J]. *Experientia*, 1987, 43(10): 1110-1111

[2] HUANG SH, PAN SH, CHEN GG, et al. Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62: 124-130

[3] Kakahara Y, Matsufuji H, Chino M. et al. Extraction and detection of endogenous soybean DNA from fermented foods [J]. *Food Control*, 2006, 17(1): 808-813

[4] Pylaev TE, Khanadeev VA, Khlebtsov BN, et al. Colorimetric and dynamic light scattering detection of DNA sequences by using positively charged gold nanospheres: a comparative study with gold nanorods [J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(28):285501

[5] 王玉兰. 云南省大豆科研生产现状及发展潜力[J]. *大豆通报*, 2003, 2:3-4

WANG Yu-lan. Present situation and developing potentiality of soybean product and scientific research of Yunnan province [J]. *Soybean bulletin*, 2003, 2: 3-4

[6] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1952, 40(2): 346-351

[7] Harrigan WF, Mcmance ME. Statistical methods for the selection and examination of microbial colonies, in: W F Harrigan, M E Mc Mance [M]. London: Academic Press, 1976

[8] Kim TW, Lee JH, Kim SE, et al. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 131(2-3): 265-271

[9] Goebel BM, Stackebrand TE. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments [J]. *Applied and Environmental*, 1994, 60(5): 1614-1621

[10] Rojanarata T, opanasopit P, Ngawhirunpat T, et al. Ninhydrin reaction on thiol-reactive solid and its potential for the quantitation of D-penicillamine [J]. *Talanta*, 2010, 82(2): 444-449

[11] Mubeen G, Noor K. Spectrophotometric method for analysis

- of metformin hydrochloride [J]. Indian Journal of Pharmaceutical science, 2009, 71(1): 100-102
- [12] XU ZR, YANG YM, GUI QF, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant lumbrokinase PI239 in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2010, 69(2): 198-203
- [13] XIAO L, ZHANG RH, PENG Y, et al. Highly efficient gene expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) in *Bacillus subtilis* mediated by the promoter of alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(17): 1365-1369
- [14] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and clustal X version 2 [J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948
- [15] Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building [J]. Molecular Biology and Evolution, 2010, 27(2): 221-224.
- [16] 张旭. 豆豉纤溶酶的纯化、生化特性研究及其体内外溶栓效果的评价[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012
ZHANG Xu. Purification, biochemical characterization research of douchi fibrinolytic enzyme and in vitro and in vivo evaluation of thrombolytic effect [D]. Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 2012
- [17] Peng Y, Yang X, Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2005, 69(2): 126-132