

文章编号:1673-1689(2011)06-0911-06

一株从腐烂蓝藻中分离的细菌的鉴定及其 发酵产蛋白酶研究

尹静¹, 蔡宇杰¹, 廖祥儒^{*1}, 郝之奎¹, 李婷婷¹, 李桂英¹, 张大兵²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏汉邦科技有限公司, 江苏 淮安 223001)

摘要: 应用形态学、生理生化和 16S rRNA 基因序列分析方法, 鉴定了从腐烂蓝藻中分离得到的一株细菌, 利用液态发酵法探讨了碳、氮源等对其发酵产蛋白酶的影响并研究了其部分酶学性质。结果表明, 该菌可归入沙雷氏菌属, 定名为 *Serratia marcescens* SYBC YH, 其最适碳源为果糖、葡萄糖、羽毛粉或玉米粉, 最适氮源为玉米浆粉、酵母膏和牛肉膏; 该菌还可以蓝藻为唯一氮源发酵产耐有机溶剂蛋白酶。该酶的最适温度为 40 °C, 最适 pH 为 7.0。

关键词: 蛋白酶; 细菌鉴定; 发酵; *Serratia marcescens* SYBC YH

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Identification of a Bacterium Isolated from the Decayed Cyanobacteria and Its Fermentation for Protease Production

YIN Jing¹, CAI Yu-jie¹, LIAO Xiang-ru^{*1}, HAO Zhi-kui¹,

LI Ting-ting¹, LI Gui-ying¹, ZHANG Da-bing²

(1. Educational Ministry Key Laboratory of Industrial Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiang Su Hanbon Science & Technology Co. Ltd, Huai'an 223001, China)

Abstract: Morphological aspects, physiological and biochemical characters and 16 S rRNA sequence were utilized to identify the bacterium isolated from the decayed cyanobacteria in this study, and liquid state fermentation was utilized to evaluate the effect of carbon and nitrogen resources on its protease production. The data showed that the bacterium isolated was belonged to the genus *Serratia* designated as *Serratia marcescens* SYBC YH. The optimal carbon resource was fructose, glucose, feather powder, or powder of corn seed. The optimal nitrogen resource was corn steep powder, yeast extract or beef extract. The strain could produce protease by liquid state fermentation with cyanobacteria as sole nitrogen resource to produce organic solvent tolerant protease. The optimal catalytic temperature and pH was 40°C and 7.0 respectively.

Key words: protease, bacterium identification, fermentation, *Serratia marcescens*

收稿日期: 2010-10-23

基金项目: 国家 863 计划项目 (2010AA101501)。

* 通信作者: 廖祥儒 (1964—), 男, 江西南康人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化与分子生物学研究。Email: 13771104596@163.com

蛋白酶广泛应用于食品、制革、洗涤、饲料、医药等领域^[1],但其应用也受到酶学性质的限制,因此筛选具有特殊性质的蛋白酶受到许多学者的关注。目前应用的蛋白酶主要来自于动物、植物和微生物细胞,而微生物蛋白酶的生产则因原料易得、酶种多样和便于工业放大备受各界青睐。微生物蛋白酶主要来自丝状真菌、酵母、细菌和放线菌。随着多肽合成对蛋白酶的需求,耐有机溶剂蛋白酶产生菌的筛选也受到日益重视;但早期的耐有机溶剂蛋白酶多来自耐有机溶剂的微生物^[2-4],这些微生物产生的蛋白酶在高浓度亲水性有机溶剂中稳定性差;而有关耐亲水性有机溶剂蛋白酶的研究相对较少^[5]。

研究从腐烂蓝藻中分离得到了一种高产蛋白酶的细菌,谨就菌的鉴定、产酶发酵及酶学性质展开研究,为其进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株分离

腐烂蓝藻于2009年11月,采自无锡太湖梅梁湾。称取腐烂蓝藻5g置于250mL三角瓶中,加LB培养基(蛋白胨10g/L,酵母膏5g/L,NaCl10g/L,pH7.0)100mL,在30℃、200r/min下震荡培养20h。将培养物稀释 10^8 倍,涂布于LB平板,挑取单菌落再划线于LB平板,挑取单菌落保存于LB斜面培养基中备用。

1.2 形态学和生理生化特征鉴定

将待选菌株划线于LB固体(含2%琼脂)培养基,在30℃下培养2d,观察其菌落形态;并在电子显微镜下观察菌株的细胞形态。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)^[6]和《工业微生物实验技术手册》^[7]等文献中的方法进行生理生化实验鉴定。脂肪酸组成采用HPLC法进行分析。

1.3 16S rDNA的PCR扩增及分析

菌体基因组DNA的提取见参考文献^[8]。以细菌DNA为模板,Primer A:5'-CAGCAGCCGCGG-TAATAC-3'和Primer B:5'-CGATTACTAGCGATTCC-3',Primer 01:5'-GCTCAGATTGAACGCTG-3'和Primer 02:5'-CCGCAGGTTC-CCCTACG-3'分别进行扩增。PCR反应条件见文献^[9],PCR产物测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。将测序结果在NCBI中进行Blast后交送GenBank数据库,与数据库中已有序列进行系统发育分析。

1.5 发酵产酶

1.5.1 种子培养 250mL的三角瓶装液量为50

mL,从平板接入一环菌,旋转式摇床转速200r/min摇瓶培养,30℃培养10h。

1.5.2 发酵产酶 250mL的三角瓶装液量为50mL,接入培养10h的种子菌悬液,接种体积分数为10%,旋转式摇床转速200r/min摇瓶发酵,不同培养条件下培养18h。

1.5.3 酶的制备 取一定体积发酵液在 $15\,000\times g$ 条件下冷冻离心20min,上清液即为胞外蛋白酶粗酶液。

1.6 蛋白酶活力测定

蛋白酶活力测定以Azocasein为底物,取0.1mL粗酶液,加入0.5mL Azocasein溶液(1g Azocasein加入100mL 50mmol/L pH值为8.0的Tris-HCl溶解),于40℃保温20min(对照加入酶液后即加入1.9mL 10% TCA)后加入酶液后即加入1.9mL 10% TCA终止反应, $10\,800\times g$ 离心15min,加入2.0mL 0.5mol/L NaOH后在440nm下比色测定;以1mL发酵液40℃OD₄₄₀变化0.001min定义为1个酶活单位。

1.7 有机溶剂对酶稳定性的影响

取粗酶液4mL加有机溶剂4mL制备成含有50%有机溶剂的混合液,在30℃200r/min下震荡保温1h后测定其中的蛋白酶活性。以起始酶活为100%,计算保温后蛋白酶的相对活性。

1.8 数据分析

采用软件SPSS12.5进行数据分析,所有数据来自最少3个独立实验,并各有至少3个重复。

2 结果

2.1 菌的形态

在LB固体培养基上30℃培养1d后菌株SYBC YH出现红色菌落,2d后菌落颜色加深,呈深紫红色,菌落直径达约3mm,不透明,圆形,中间稍隆起,粘稠,边缘整齐光滑。细胞经扫描电镜观察,为细胞呈短杆状,长约1.5μm,直径约0.5μm,端圆(图1),周边有芽孢显现。其菌落形态和细胞形态符合沙雷氏菌属的特征,系有芽孢的沙雷氏菌。

2.2 菌的生理生化鉴定

生理生化特征鉴定见表1。由表1可知,该菌为革兰氏阴性,VP反应阳性,接触酶反应阳性,能发酵多种糖类产酸,其大部分生理生化特性与粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)最为接近。该菌的脂肪酸组成见表2,结果显示其主要脂肪酸为16:0(26.47%)、16:1w7c/15 iso 2OH(12.43%)、17:0 cyclo(13.33%)、14:0 3OH/16:1 ISO I

(8.96%)、10:0 3OH(7.22%), 与我们鉴定的其它沙雷氏菌均不相同, 因此将其命名为 *Serratia* SYBC YH。

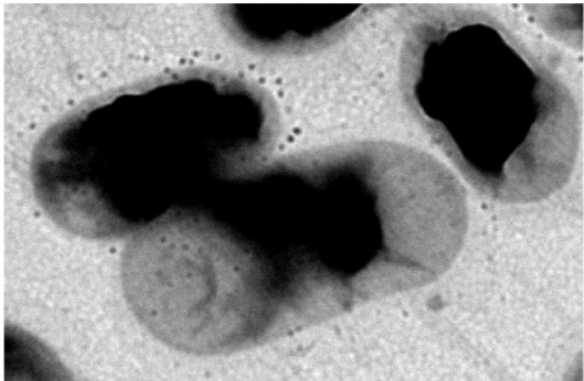


图 1 *Serratia marcescens* SYBC YH 菌株的电镜照片
Fig.1 Electronic microscope diagram of the strain *Serratia marcescens* SYBC YH

表 1 *Serratia marcescens* SYBC YH 菌株的生理生化特征
Tab.1 The physiological and biochemical charactors of the strain *Serratia marcescens* SYBC YH

特性	SYBC YH	特性	SYBC YH
M. R.	—	甲基红	+
V. P.	+	过氧化氢	+
纤维二糖	+	麦芽糖	—
肌醇	+	明胶	+
甘油	+	蔗糖	+
木糖	—	鼠李糖	—
阿拉伯糖	—	葡萄糖	+
丙二酸盐	—	淀粉水解	—
尿素	—	吲哚实验	—
乙醇氧化	+	接触酶	+
柠檬酸盐	+	革兰氏染色	—

表 2 菌株 *Serratia marcescens* SYBC YH 的脂肪酸组成
Tab.2 Fatty acid composition of the strain *Serratia marcescens* SYBC YH

脂肪酸类型	脂肪酸质量分数/%	
	SYBCYH	SYBC08
饱和酸		
10:0	0.16	0
12:0	1.24	1.89
13:0	0.09	0.12
14:0	5.40	6.03
15:0	0.73	1.97

续表 2

脂肪酸类型	脂肪酸质量分数/%	
	SYBCYH	SYBC08
16:0	26.47	22.90
17:0	0.49	0.82
18:0	0.24	0.15
19:0	0	0
羟基酸		
8:0 3OH	0	0
10:0 3OH	7.22	9.94
11:0 3OH	0.15	0.32
12:0 2OH	1.00	1.67
12:0 3OH	2.89	3.69
12:1 3OH	2.32	2.72
14:0 2OH	3.60	5.14
15:0 2OH	0	0.06
15:0 3OH	0	0.12
16:0 3OH	0.17	0.13
不饱和酸		
13:1 AT12-13	0	0.12
16:1 w5c	0.12	0.08
18:1 w7c	10.70	4.67
环脂酸		
17:0 cyclo	13.33	17.28
19:0 cyclo w8c	1.38	2.71
其它		
12:0 ALDE	0.18	11.62
14:0 3OH/16:1 ISO I	8.96	4.52
16:1 w7c/15 iso 2OH	12.43	10.94
Unknown		
a	0.70	0.68
b	0	1.21

注:SYBC08 为 *Serratia marcescens* SYBC08, 保存于中国科学院微生物研究所国家菌种保藏中心, 编号为:CGMCC 3449。

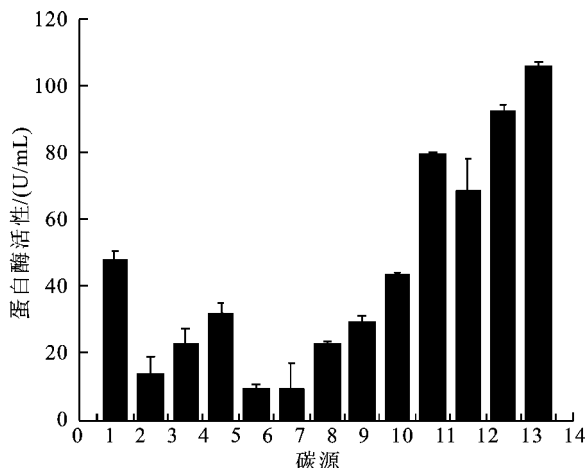
2.3 分子鉴定

以 Primer A 和 Primer B 为引物扩增菌株 *Serratia* SYBC YH 的 16S rRNA 基因部分片段, 测序结果显示, 序列与 *Serratia marcescens* 的 16S rRNA 基因的相似性超过99%。根据 *S. marcescens* 的 16S rRNA 基因序列设计引物 Primer 01 和

Primer 02, PCR 扩增获得 1534 个碱基的基本完整的序列, 利用 Blast 软件将该序列(待提交 GenBank,) 与 GenBank 中收集的所有细菌的进行比对, 结果显示 *Serratia* SYBC YH 的 16S rRNA 基因序列与 *Serratia marcescens* strain A3 的 16S rRNA 基因序列相似性最高, 相似度为 99.9%, 结合生理生化等特性, 确定 *Serratia* SYBC YH 属于 *Serratia marcescens* 因此最总定名为 *Serratia marcescens* SYBC YH。

2.4 碳源对发酵产蛋白酶的影响

分别以等摩尔碳的蛋白胨加牛肉膏、糊精、甘油、牛肉膏、精淀粉、乳糖、小麦粉、酵母膏、黄豆粉、果糖、葡萄糖、羽毛粉或玉米粉为碳源, 以 10 g/L 的 NH_4NO_3 为氮源发酵, 菌株产蛋白酶水平不尽相同(见图 2)。其中以果糖、葡萄糖、羽毛粉或玉米粉为碳源时最有利于该菌产蛋白酶, 其次为黄豆粉和蛋白胨加酵母膏, 再就是甘油、牛肉膏、小麦粉和酵母膏, 作用最小的是糊精、淀粉和乳糖。



1, 蛋白胨加牛肉膏; 2, 糊精; 3, 甘油; 4, 牛肉膏; 5, 精淀粉; 6, 乳糖; 7, 小麦粉; 8, 酵母膏; 9, 黄豆粉; 10, 果糖; 11, 葡萄糖; 12, 羽毛粉; 13, 玉米粉

图 2 碳源对 *Serratia marcescens* SYBC YH 产蛋白酶的影响

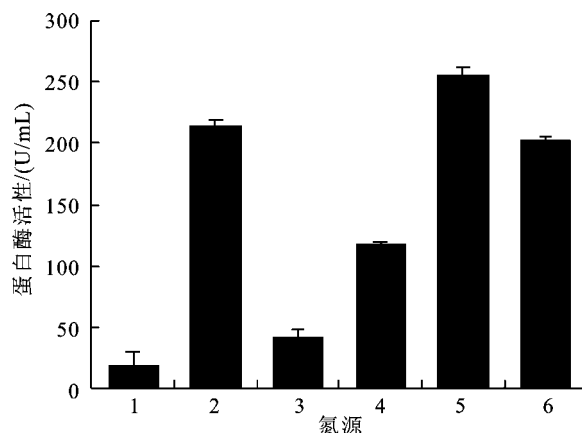
Fig. 2 Effect of carbon resources on protease production by *Serratia marcescens* SYBC YH

2.5 氮源对发酵产酶的影响

以 10 g/L 葡萄糖为碳源, 分别以等摩尔氮的蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、玉米浆粉、豆粕和尿素为氮源发酵, 菌株产过氧化氢酶的情况如图 3 所示。结果表明, 玉米浆粉、酵母膏和牛肉膏最有利于该菌产蛋白酶, 其次为蛋白胨和酵母膏, 尿素和豆粕则不利于产酶。

2.6 蓝藻添加量对发酵产酶的影响

本研究所采用的蓝藻浆为无锡太湖人工打捞后装入取样袋, 冰箱 4 °C 冷冻备用, 需要时按克数



1, 豆粕; 2, 酵母膏; 3, 尿素; 4, 蛋白胨; 5, 玉米浆粉; 6, 牛肉膏

图 3 氮源对 *Serratia marcescens* SYBC YH 产过氧化氢酶的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen resources on protease production by *Serratia marcescens* SYBC YH

称取。以 10 g/L 葡萄糖和不同量的蓝藻浆分别为碳源和氮源为培养基, 在 30 °C, 200 r/min 震荡培养 18 h, 菌株发酵产蛋白酶的情况见图 4, 说明该菌产蛋白酶水平开始随蓝藻浆加入量的增加而迅速升高($P < 0.01$), 当蓝藻浆添加量达到 30 g/L 时产酶达到最高。说明该菌可以蓝藻为唯一氮源发酵产蛋白酶。

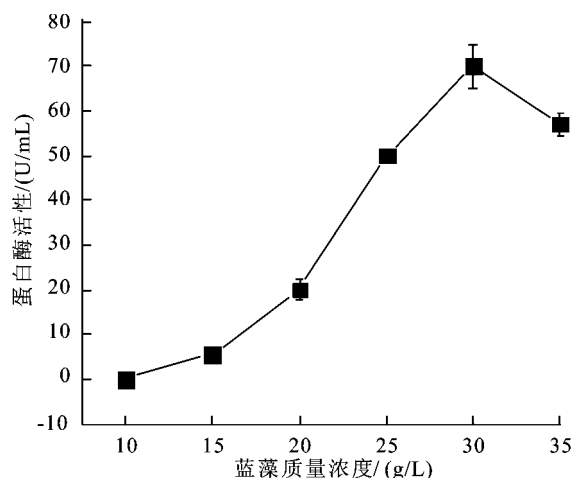


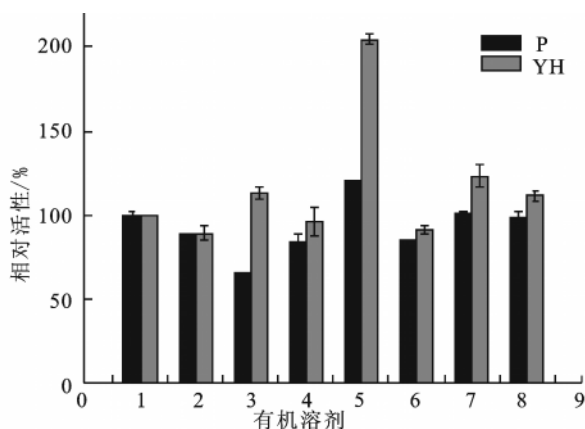
图 4 添加蓝藻作为唯一氮源对 *Serratia marcescens* SYBC YH 产过氧化氢酶的影响

Fig. 4 Effect of addition of cyanobacteria as sole nitrogen resource on catalase production by *Serratia marcescens* SYBC YH

2.7 溶剂对粗酶活性的影响

在 50% 的有机溶剂中 1 h, 蛋白酶活性的变化与有机溶剂的种类有关(见图 5)。其中 *Serratia marcescens* SYBC YH 蛋白酶稳定性明显较好($P < 0.01$)。在正庚烷、甲苯、丙酮、或二甲基亚砜中, 该菌的蛋白酶活性均明显高于对照($P < 0.05$), 则说

明其有较好地耐受有机溶剂的特性。



1, 对照; 2, 正辛醇; 3, 正庚烷; 4, 环己烷; 5, 甲苯; 6, 丁醇; 7, 丙酮; 8, 二甲基亚砜

图 5 有机溶剂对菌株 *Serratia marcescens* SYBC YH 和 P 蛋白酶活性的影响

Fig. 5 Effect of organic solvents on the activity of protease from *Serratia marcescens* SYBC YH or strain P

2.8 *Serratia marcescens* SYBC YH 蛋白酶的最适温度和最适 pH

温度对 *Serratia marcescens* SYBC YH 蛋白酶纯酶的催化活性影响较大(见图 6);在 0~40 °C 范围内,该酶的活性随温度的升高迅速增大,并在 40 °C 时达到最大值,因此在该测定条件下此酶的最适温度为 40 °C;但温度超过 40 °C 后,该酶的活性又随温度的进一步升高而急剧下降,并在 80 °C 时接近 0。

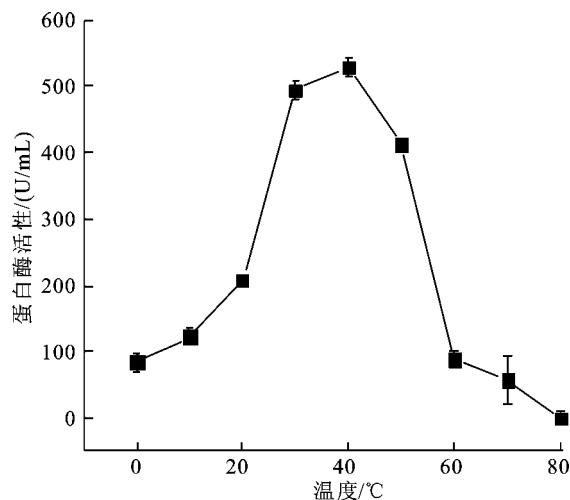


图 6 温度对 *Serratia marcescens* SYBC YH 蛋白酶活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the activity of protease purified from *Serratia marcescens* SYBC YH

Serratia marcescens SYBC YH 蛋白酶纯酶的催化活性受反应液 pH 值的影响相对较小(见图 7),反应液 pH 值在 4~9 的范围内该酶的催化活性均能维持在最高活性的 90% 以上的水平,说明起催

化作用能适应较大的 pH 值范围。在 pH 值为 7 时,该酶活性最高,因此其最适 pH 值应为 7。

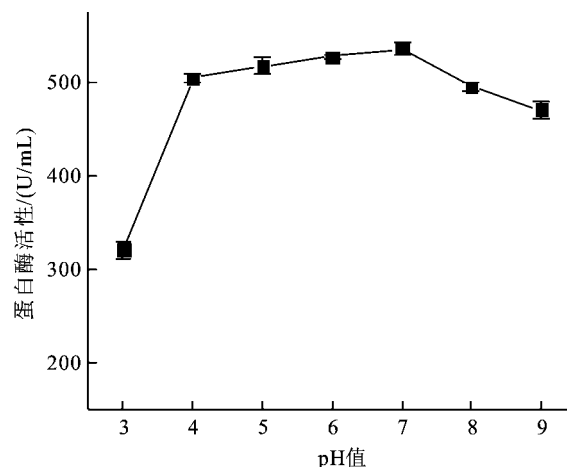


图 7 pH 对 *Serratia marcescens* SYBC YH 蛋白酶活性的影响

Fig. 7 Effect of pH value on the activity of protease purified from *Serratia marcescens* SYBC YH

3 讨 论

根据形态鉴定,生理生化特性比较和 16S rRNA 基因序列分析,从腐烂蓝藻中分离得到的菌株 SYBC YH 虽然与现有的粘质沙雷氏菌菌株有一定区别^[9-10],尤其是其产芽孢的特性,接近于 *Serratia marcescens* SYBC08 和 Ajithkumar 等发现的产芽孢的粘质沙雷氏菌^[11],但与许多粘质沙雷氏菌菌株不同。鉴于其 16S rRNA 基因序列明显接近粘质沙雷氏菌,该菌株应归属于沙雷氏菌属的粘质沙雷氏菌,定名为 *Serratia marcescens* SYBC YH。

从发酵产蛋白酶的情况来看,果糖、葡萄糖、羽毛粉或玉米粉均可以作为菌株 *Serratia marcescens* SYBC YH 的较好碳源,而玉米浆粉、酵母膏和牛肉膏则比较适合做氮源。另外,以蓝藻浆作为唯一氮源该菌也可以发酵产蛋白酶,但其对藻毒素的作用还待验证,最佳发酵条件也还待进一步研究。

目前已有不少学者从 *Bacillus*^[12-14], *Serratia*^[5], *Pseudomonas*^[2-3, 15-16], *Synergistes*^[17] 等属的微生物中分离得到耐有机溶剂的蛋白酶,但这些菌株多为极端微生物,仅 *Synergistes* 属于非极端菌;它们产生的蛋白酶在疏水性有机溶剂中都有较高的稳定性,但在极性有机溶剂中稳定性差。*Serratia marcescens* SYBC YH 是一种非极端菌,我们的结果也表明,该菌所产蛋白酶在正庚烷、甲苯、丙酮、或二甲基亚砜均有较好稳定性,说明其对极性有机溶剂也有较高的耐受性;这就为其在有机相催化中的应用提供了基础。至于该菌产蛋白酶的发

酵调控,所产酶的酶学性质及分子特征等皆还待进一步研究。蓝藻是水环境污染的产物,每年打捞蓝藻对降低水污染和减少蓝藻危害至关重要;但蓝藻的高值化利用已成为有效清除污染瓶颈。从我们的结果可以看出,从腐烂蓝藻中分离的菌株 *Serratia marcescens* SYBC YH 可以蓝藻为唯一氮源发酵产耐有机溶剂的蛋白酶,另外,*Serratia* 属所产的灵菌红素也是高效的杀藻剂^[18],可为蓝藻的治理和

有效利用提供了一条新的途径。

4 结 语

通过以上分析,从腐烂蓝藻中分离的菌株 SYBC YH 可定名为 *Serratia marcescens* SYBC YH,是一种产芽孢的粘质沙雷氏菌。该菌可以蓝藻为唯一氮源发酵产耐有机溶剂的蛋白酶。

参考文献(References):

- [1] Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases; molecular approaches and industrial applications [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002, 59: 15—32.
- [2] Geok LP, Razak CNA, Rahman RNZRA, et al. Isolation and screening of all extracellular organic solvent-tolerant protease producer [J]. **J Biochem Eng**, 2003, 13(1): 73—77.
- [3] Gupta A and Khare SK. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. **Biores Technol**, 2006, 97: 1788—1793.
- [4] Ghorbel B, Kamoun AS, Nasri M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BGI [J]. **Enzyme Microbial Technol**, 2003, 32(5): 513—518.
- [5] Wan MH, Wu B, Ren W, et al. Screening, characterization, and cloning of a solvent-tolerant protease from *Serratia marcescens* MH6 [J]. **J Microbiol Biotechnol**, 2010, 20(5): 881—888.
- [6] 布坎南 RE, 吉本斯 NE 等编. 杰氏细菌鉴定手册 [M]. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组译. 北京: 科学出版社, 1984, 453—454.
- [7] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 145—178.
- [8] 黄培堂. 分子克隆 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2002. 485—486.
- [9] 钱斯亮, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 热稳定性过氧化氢酶高产菌的筛选、鉴定及酶学性质研究 [J]. **西北农业学报**, 2008, 17(2): 238—242.
- QIAN Siliang, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Screening, identification and enzymatic properties of the thermal stability catalase-producing strain [J]. **Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica**, 2008, 17(2): 238—242. (in Chinese)
- [10] 蓝卉, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 一株低温脂肪酶产生菌的筛选鉴定与产酶发酵初探 [J]. **食品与生物技术学报**, 2009, 28: 550—554.
- LAN Hui, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Isolation and identification of a cold adapted lipase producing strain and the preliminary research on the fermentation to produce lipase [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28: 550—554. (in Chinese)
- [11] Ajithkumar B, Ajithkumar VP, Iriye R, et al. Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank [J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2003, 53: 253—258.
- [12] Rahman RNZRA, Mahamad S, Salleh AB, et al. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b [J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2007, 34: 509—517.
- [13] Li S, He BF, Bai ZZ, et al. A novel organic solvent-stable alkaline protease from organic solvent tolerant *Bacillus licheniformis* YP1A [J]. **J Mol Catal B: Enzym**, 2009, 56: 85—88.
- [14] Fang YW, Liu S, Wang SJ, et al. Isolation and screening of a novel extracellular organic solvent-stable protease producer [J]. **Biochem Engin J**, 2009, 43: 212—215.
- [15] Ogino H, Yasui K, Shiotani T, et al. Organic solvent-tolerant bacterium which secretes an organic solvent-stable proteolytic enzyme [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1995, 61: 4258—4262.
- [16] Gupta A, Roy I, Khare SK, et al. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA [J]. **J Chromatogr A**, 2005, 1065: 155—161.
- [17] Kumar AG, Venkatesan R, Rao BP, et al. Utilization of tannery solid waste for protease production by *Synergistes* sp. in solid-state fermentation and partial protease characterization [J]. **Engin Life Sci**, 2009, 9: 66—73.
- [18] 刘伯雅, 魏东芝, 鲁思然, 等. 灵菌红素对有害藻类的除藻活性研究 [J]. **中国环境科学**, 2010, 30: 477—482.
- LIU Boya, WEI Dongzhi, LU Siran, et al. Algicidal activity of prodigiosin against harmful algae [J]. **China Environmental Science**, 2010, 30: 477—482. (in Chinese)