

文章编号:1673-1689(2009)06-0854-04

血红蛋白降解菌的分离筛选与鉴定

陶艳华¹, 姚大伟¹, 王政¹, 郭士兵¹, 李臻兴², 杨德吉^{*1}

(1. 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 江西省种鸡场, 江西 南昌 330220)

摘要: 为了从环境中筛选高效降解血红蛋白的菌株, 采用鲜血琼脂平板, 以产生溶血圈比值大小为判定标准, 从南京某屠宰场下水道中分离到一株具有较强降解血红蛋白能力的菌株 NJM4。经形态学观察、生理生化测定和 16S rRNA 基因分析(GenBank 登陆号为 EU234500), 初步认为该菌株为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。该菌株在血红蛋白溶液中可将其逐渐降解为小分子的多肽。在血红蛋白发酵培养基中于 37 °C、120 r/min 培养 24 h, 降解率达 53.64%。

关键词: 血红蛋白; 降解; 分离; 鉴定

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Isolation and Identification of Hemoglobin Degradation Microorganism

TAO Yan-hua¹, YAO Da-wei¹, WANG Zheng¹, GUO Shi-bing¹,
LI Zhen-xing², YANG De-ji^{*1}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China; 2. Breeder Farm of Jiangxi, Nanchang 330220, China)

Abstract: To obtain high efficient degradation bacteria of hemoglobin, strain NJM4 from slaughterhouse sewer in Nanjing was isolated by blood agar plate. The ability of degeneration hemoglobin was assessed by hemolysis circle ratio. Initially, the strain was identified as *Bacillus pumilus* based on morphology observation, physicochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis (GenBank ID: EU234500). The results showed that the hemoglobin could be degraded into small molecular multi-peptides, and after 24 h incubation under 37 °C, 120 r/min, the degradation rate of hemoglobin could reach to 53.64%.

Key words: hemoglobin, degradation, separation, identification

畜禽血液是一种宝贵的蛋白质资源。一方面由于其蛋白质含量很高, 如猪血中蛋白质占鲜血的 17%~20%。联合国粮农组织农业部在推荐开发利用血粉的第 32 号报告中, 把血粉与骨粉、肉粉、鱼粉、动物下脚料做了较详细的比较, 结果表明, 血粉的蛋白质含量最高, 而且必须氨基酸全部具备;

另一方面, 血粉的特殊营养价值与含铁高有关, 血内含铁量比现有的所有其他产品都高, 而且铁吸收率很高^[1]。虽然血粉中粗蛋白达 79.9%, 不过其中难以消化的血红蛋白占 70%以上。另外血红蛋白相对分子质量大, 动物缺乏专业性消化血红蛋白的酶类, 使得血粉中大部分蛋白质难以消化。目前血

收稿日期: 2008-12-19

* 通讯作者: 杨德吉(1963-), 男, 江苏南京人, 农学博士, 教授, 主要从事临床病理学及分子生物学在兽医临床上的应用等方面的研究。Email: djyang@njau.edu.cn

粉的工业化生产工艺仅能部分改善血红蛋白的消化率,但难以解决消化率低的问题。目前饲料蛋白质资源开始出现严重的短缺,其中最重要的饲料蛋白质——鱼粉的产量这些年来一直在持续下降,价格一路飙升。因此开发新的饲料蛋白质作为鱼粉的替代品迫在眉睫,而将产量巨大的畜禽屠宰血液用高效菌株发酵后作为优质蛋白饲料源,不失为最佳途径之一^[2-4]。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集

从南京双环屠宰场的下水道环境中采样。

1.2 培养基

鲜血琼脂培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉浸膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,蒸馏水 1 000 mL,琼脂粉 15.0 g,新鲜血液 50 mL,pH 7.4~7.6。

种子培养基:葡萄糖 10.0 g,酵母膏 5.0 g,蛋白胨 5.0 g,KH₂PO₄ 1.0 g,Na₂CO₃ 1.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0。

血红蛋白发酵培养基:葡萄糖 4.0 g,磷酸氢二钾 0.4 g,氯化钠 0.5 g,磷酸二氢钾 0.6 g,硫酸镁 0.1 g,硫酸铁 0.02 g,新鲜羊血红蛋白 10.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0。

1.3 主要仪器设备

隔水式恒温培养箱,日立 H-7650 透射电子显微镜,PTC-200 PCR 仪,Tanon GIS-2500 凝胶成像系统,TGL-16G 台式离心机,WH-2 微型旋涡混合仪,DYC2-30 型电泳槽,手提式压力蒸汽灭菌器等。

1.4 方 法

1.4.1 菌株分离 将采集的样品 2 g 加入到 10 mL 营养肉汤中,振荡 1 min,静置 5 min,吸取上清液接种到营养肉汤培养基,在 37 °C 下培养 48 h。将培养后的细菌连续 10 倍稀释涂鲜血琼脂培养基平板,在 37 °C 下培养 24 h。从各单菌落中判断产生溶血圈比值的大小,对溶血圈比值较大的细菌进行分离培养,重复 3~5 次,经镜检纯化为止。

1.4.2 菌落形态观察 菌落形态特征观察采用平板直接观察法。

1.4.3 菌体形态观察 光学显微镜和透射电子显微镜观察菌体的大小、形状及其特殊构造。

1.4.4 生理生化反应鉴定 按文献[5]进行细菌生理生化特性的鉴定。

1.4.5 细菌 16S rRNA 基因分析 煮沸法提取细菌总 DNA^[6],采用 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 反应^[7]。上游引物:5'-AGAGTTTGATCCT-

GGCTCAG-3';下游引物:5'-AAGGAGGTGATC-CAGCCGCA-3'。用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。PCR 产物由南京基天生物技术有限公司测序分析。

1.4.6 血红蛋白降解效果观察 取经 48 h 扩大培养后的种子培养液 10 μL,接种于装有 200 μL 50 g/L 羊血红蛋白溶液的 96 孔培养板中,37 °C 下培养 36 h。分别采集 0、10、18、24、36 h 的液体培养物,12 000 r/min 离心 5 min,得到的上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.4.7 血红蛋白降解率测定 在血红蛋白发酵培养基分别添加 1%、2%、3%、4% 的经 48 h 扩大培养后的种子培养液,并在 37 °C、转速为 120 r/min 的摇床中连续培养。采用凯氏定氮法测定血红蛋白降解率(血红蛋白降解率=可溶性氮/样品中总氮×100%)。

1.4.8 急性毒性试验 选取 18~22 g 小白鼠分 3 组,每组 6 只。第一组灌服菌液 1 mL/只(4×10¹¹ CFU/mL);第二组灌服菌液 1 mL/只(4×10¹⁰ CFU/mL);第三组灌服菌液 1 mL/只(4×10⁹ CFU/mL),连续观察 7 d。

2 结 果

2.1 菌株的筛选

从鲜血琼脂平板上筛选到一株溶血圈比值最大的细菌,编号为 NJM4。

2.2 菌落形态特征

NJM4 菌落呈乳白色,圆形,边缘不整齐,表面光滑,有微皱褶突起,有光泽,不透明。

2.3 菌体形态特征

NJM4 为革兰氏阳性芽孢杆菌,芽孢位于菌体中央,见图 1。NJM4 大小约 0.5 μm×2.0 μm,周生鞭毛。

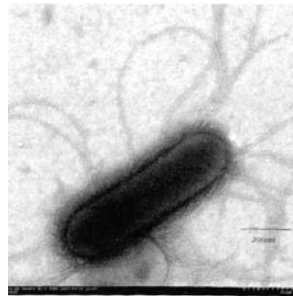


图 1 NJM4 透射电镜图片(×6 000)

Fig. 1 NJM4 TEM picture(×6 000)

2.4 细菌生理生化特性

NJM4 的生理生化特性见表 1。

表 1 菌株 NJM4 与短小芽孢杆菌 ATCC 14884 的比较

Tab. 1 Comparisons of phenotypic features of NJM4 and ATCC 14884

| 特性 | 菌株 NJM4 | 菌株 ATCC 14884 |
|--------------|---------|---------------|
| 革兰氏染色 | + | + |
| 接触酶 | + | + |
| 厌氧生长 | - | - |
| V.P | + | + |
| 卵黄反应 | - | - |
| 生长 | | |
| pH 5.7 | + | + |
| NaCl(7 g/dL) | + | + |
| 产酸 | | |
| 葡萄糖 | + | + |
| 阿拉伯糖 | - | + |
| 木糖 | - | + |
| 甘露醇 | - | + |
| 利用 | | |
| 柠檬酸盐 | + | + |
| 丙酸盐 | - | - |
| 水解 | | |
| 酪素 | + | + |
| 淀粉 | - | - |

+, 阳性; -, 阴性

2.5 细菌 16S rRNA 基因分析

NJM4 16S rRNA 基因扩增电泳结果显示, 该菌 16S rRNA 基因约 1 500 bp, GenBank 登录号为 EU234500。序列比较分析显示该细菌与短小芽孢杆菌相似性达 99.9%, 结合细菌形态学观察, 生理生化特性鉴定, 初步认为该菌株可能为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)。

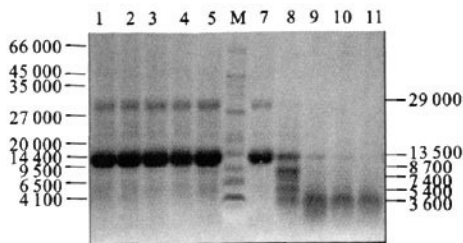
2.6 血红蛋白降解产物 SDS-PAGE 电泳结果

如图 2 所示, 10 h 后血红蛋白 (13 500) 被降解成小分子的多肽 (8 700, 7 400, 5 400, 3 600 等), 且随时间的增加, 13 500, 8 700, 7 400, 5 400 的电泳条带的密度逐渐减小, 甚至消失。

2.7 血红蛋白降解率

凯氏定氮法 (GB/T 5009.5-1985) 测定, 取连续培养 24 h 的血红蛋白降解产物 10 mL。加入 10% 三氯乙酸溶液 10 mL 混匀。静置 30 min, 4 000 r/min 离

心 5 min, 取上清液测可溶性氮质量浓度, 见表 2。



1~5: 血红蛋白未接种 NJM4 的对照组, 采样时间分别为 0、10、18、24、36 h; M: 蛋白质相对分子质量标准 (66 000, 45 000, 35 000, 27 000, 20 000, 14 400, 9 500, 6 500, 4 100); 7~11: 血红蛋白接种 NJM4 的试验组, 采样时间分别为 0、10、18、24、36 h。

图 2 血红蛋白降解产物 SDS-PAGE

Fig. 2 The SDS-PAGE picture of Hb degradation products

表 2 血红蛋白降解率

Tab. 2 Hemoglobin degradation rate

| 接种体积分数/% | 可溶性氮质量浓度/(g/L) | 总氮质量浓度/(g/L) | 血红蛋白降解率/% |
|----------|----------------|--------------|-----------|
| 1 | 0.325 4 | 1.122 | 29.00 |
| 2 | 0.449 0 | 1.122 | 40.02 |
| 3 | 0.543 8 | 1.122 | 48.47 |
| 4 | 0.601 9 | 1.122 | 53.64 |

2.8 急性毒性试验

经过一周的试验, 各试验组小白鼠均未观察到发病或死亡。

3 结 语

作者从南京双环屠宰场的下水道中分离得到一株血红蛋白降解高效菌株 NJM4 (CGMCC No. 2337), 该菌株为革兰氏阳性芽孢杆菌, 大小约 $0.5 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$, 周生鞭毛, 经形态学观察、生理生化测定和 16S rRNA 基因分析 (GenBank 登陆号为 EU234500), 该菌株与短小芽孢杆菌相似性达 99.9%, 初步认定该菌株可能为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)。

通过血红蛋白降解能力测定, 证明了 NJM4 降解血红蛋白能力较强, 采用凯氏定氮法测定血红蛋白降解率, 培养 24 h 后血红蛋白降解率可达 53.64%。

作者筛选出的血红蛋白降解高效菌株 NJM4 可使血红蛋白降解成易被消化吸收的多肽和氨基酸等产物, 可用于畜禽屠宰废弃血液资源的开发利用, 利用产量巨大的畜禽屠宰血液在高效菌株发酵

后作为优质蛋白饲料源,特别是将血液蛋白转化成 持续发展,且具有广阔的应用前景。
饲料,不仅可以变废为宝、保护环境,还可以促进可

参考文献(References):

- [1] 李洪龙,文玉兰. 饲用血粉的应用现状[J]. 国外畜牧学-猪与禽, 2004, 24 (3): 24-26.
LI Hong-long, LIU Yu-lan Current status of application of blood meal[J]. **Animal Science Abroad-Pigs and Poultry**, 2004, 24 (3): 24-26. (in Chinese)
- [2] 张滨,马美湖,万佳蓉. 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)基因鉴定及出血 Hb 降解技术[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27 (3): 68-72.
ZHANG Bin, MA Mei-hu, WAN Jia-rong. Identification of *Bacillus pumilus* and study on the degradation of poultry Hemoglobin[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27 (3): 68-72. (in Chinese)
- [3] 付祖姣,陈宇,莫湘涛,等. 复合菌株发酵猪血粉的条件研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30 (5): 28-32.
FU Zu-jiao, CHEN Yu, MUO Xiang-tao, et al. Study on conditions of swine blood meal fermentation with compound strain [J]. **Microbiology**, 2003, 30 (5): 28-32. (in Chinese)
- [4] 方俊,卢向阳,莫瑾,等. 发酵猪血优良菌株 A32 的筛选[J]. 食品工业技术, 2006, 27 (1): 55-56.
FANG Jun, LU Xiang-yang, MO Jin, et al. Separation of fermenting blood meal strain A32[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2006, 27 (1): 55-56. (in Chinese)
- [5] 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: 349-370.
- [6] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 663-667.
- [7] Marcelino T S, Stephen J G. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16SrRNA genes by PCR [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996, 62 (2): 625-630.

(责任编辑:李春丽)