

68 株北极产蛋白酶菌株的筛选、鉴定以及部分酶学性质

陈明霞^{1,2}, 李和阳^{2*}, 陈维维¹, 刁伟程¹, 刘承忠¹, 袁敏¹, 李晓虹¹

¹ 华侨大学化工学院, 厦门 361021

² 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005

摘要:【目的】从北极海水样品中分离产蛋白酶细菌, 并对其初步的分类鉴定, 为低温蛋白酶的低温适应性及其应用研究奠定基础。【方法】通过酪蛋白筛选培养基低温培养的方法从北极水样中分离出 68 株产蛋白酶细菌, 采用 16S rRNA 基因 PCR-RFLP(限制性酶切多态性)方法及传统的表型特性分析对所分离纯化的菌株进行分类, 每种细菌类型各取 1 株代表菌株进行 16S rRNA 基因序列测定、GenBank 数据库 blast 分析以及通过 DNAMAN 软件进行系统进化树分析。对代表菌株的蛋白酶酶学性质进行初步研究。【结果】68 个菌株可归为 3 种类型(54.41%、42.65% 和 2.94%), 分别以菌株 6、11 和 52 为代表菌株。16S rRNA 基因序列分析结果表明, 菌株 11 与比目鱼黄杆菌(*Chryseobacterium scopthalmum*)具有 98.24% 的同源性; 菌株 52 与嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)具有 98.55% 的同源性; 菌株 6 与 *Stenotrophomonas rhizophila* 具有 96.50% 的同源性, 可能为该属的新物种。对 3 种类型代表菌株进行表型性状研究显示, 菌株 6、11 和 52 为革兰氏阴性、直杆状、不产胞外脂肪酶和淀粉酶, 具有强的蛋白酶活性。菌株 6 的蛋白酶最适酶活温度为 55℃, 最适宜 pH 为 6.7; 菌株 11 的蛋白酶最适酶活温度为 40℃, 属于低温酶, 最适酶活 pH 约为 8.5; 菌株 52 的蛋白酶最适酶活温度为 65℃, 最适酶活 pH 为 7.4。【结论】本文首次报道了 *Stenotrophomonas* 和 *Chryseobacterium* 的菌株在北极海水样品中的分布, 充实了极地产蛋白酶菌的种属分布多样性, 为后续低温蛋白酶的研究和应用奠定了基础。

关键词: 北极, 蛋白酶, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)07-0702-08

蛋白酶是一类催化肽链中肽键水解的酶类, 已广泛应用于食品、医药、洗涤、纺织、制革、废物处理和银的回收等领域, 是世界三大工业用酶之一, 其市场占有率约占整个商品酶销售量的 40% - 65%^[1-3]。该酶广泛分布于动物、植物及微生物中。

20 世纪 90 年代以来, 随着基因工程的加入、发酵技术的发展及新型发酵设备的发明, 微生物日益成为工业酶制剂的主要来源。目前已知的多数商业化的微生物蛋白酶主要来源于芽胞杆菌属细菌 (*Bacillus*) 的中性或碱性蛋白酶, 最佳的酶活温度一

基金项目: 国家自然科学基金(41006117); 国家海洋公益性行业专项经费项目(200805064, 201205013); 华侨大学高层次人才科研启动项目(12BS206)

* 通信作者。Tel/Tax: +86-592-2195769; E-mail: heyangli@126.com

作者简介: 陈明霞(1980-), 女, 福建惠安县人, 讲师, 微生物专业, 主要从事海洋微生物分子多样性研究。E-mail: chenmx1257@163.com

收稿日期: 2012-09-21; **修回日期:** 2013-03-02

一般在 55℃ - 70℃, 已不能满足日新月异的工业技术发展和应用的需要, 因此寻找和开发新型的微生物低温碱性蛋白酶资源仍然是目前国内外的研究热点。

低温蛋白酶的最适酶活温度一般在 40℃ 以下, 主要由低温微生物(嗜冷菌和耐冷菌)产生^[4-5]。低温蛋白酶在食品、洗涤、皮革等工业具有广泛应用前景, 有着中温蛋白酶无法取代的优越性, 因此自 20 世纪 70 年代以来, 世界上已有许多实验室在从事低温蛋白酶的研究, 已从海水、嗜冷的生物以及高山、极地泥土等样品中分离到产低温蛋白酶的菌株。目前报道的产低温蛋白酶的主要菌属有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[6], 土地杆菌属 (*Pedobacter*)^[7], 交替假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)^[8-10], 黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)^[11], 海杆菌属 (*Marinobacter*)^[12], 科尔韦尔氏菌属 (*Colwellia*)^[7], 希瓦氏菌属 (*Shewanella*)^[13], 黄杆菌属 (*Flavobacterium*)^[14], 固氮螺菌属 (*Azospirillum*)^[15] 等。

本文通过低温培养的方法从北极海水样品中分离到 68 株产蛋白酶细菌, 并对其初步的分类鉴定及酶学研究, 以期为低温蛋白酶的低温适应性及其开发和应用研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 样品 B02: 中国第四次北极考察于 2010-7-10 在 B02 站位 (53.328499°N, 169.960434°E, 水深 1937 m, 水温 8℃, 盐度 32.9) 采集底层水样, -20℃ 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: *AfaI*、*MspI* 限制性核酸内切酶, *Taq* DNA Polymerase, 购自大连宝生物有限公司, 酪素、蛋白胨和酵母提取物为广东环凯微生物科技有限公司, 琼脂粉购自厦门泰京生物技术有限公司, DNA Marker (DL 2000), Lowry 法蛋白浓度测定试剂盒、胶回收试剂盒、dNTPs 购自上海生工, 其它试剂皆为市售分析纯。PCR 仪 (Bio-rad), 凝胶成像分析系统 (天能科技 (上海) 有限公司), TG16-W 微量高速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司), Centrifuge 5417R (Eppendorf), 电泳系统 (北京六一仪器厂), FDU-2100 冷冻干燥仪 (上海森超贸易有限公司), SPECTRA MAX 190 酶标仪 (苏州安泰空

气技术有限公司)。

1.1.3 培养基: (1) 酪蛋白筛选培养基: 酪素 10 g, 酵母粉 0.5 g, 琼脂 15 g, 加过滤海水补足体积至 1 L, pH 7.0 - 7.5。(2) 2216E 培养基: 参考林念炜等^[12] 的描述配制。(3) 发酵培养基: 酵母粉 0.2 g, 蛋白胨 1 g, 酪素 1 g, NaCl 15 g, 加 ddH₂O 补足体积至 1 L, pH 7.2 - 7.4。

1.2 产蛋白酶细菌的分离纯化

取 1 mL 水样依次梯度稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 个梯度, 取 200 μL 各梯度样品, 分别涂布于酪蛋白筛选培养基上, 每梯度设 3 个平行。于 15℃ 培养箱培养 6 d。选取菌落周围具有明显蛋白水解圈的菌株于 2216E 平板进行 3 次以上划线纯化培养。

1.3 16S rRNA 基因核酸内切酶酶切图谱分析 (16S rRNA 基因 RFLP 分析)

用灭菌牙签挑取各纯化菌株的部分菌落于 50 μL 碱裂解液中 (SDS 1%, NaOH 0.1 mol/mL) 进行碱裂解。裂解产物用无菌蒸馏水稀释 5 - 10 倍。取 1.0 μL 上述细胞裂解物为模板, 以细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')^[16] 对每个模板进行 2 个平行的 PCR 反应; 将所有产物集合并纯化; 将纯化后的 PCR 产物用限制性内切酶 *AfaI* 和 *MspI* 双酶切。以 5% (m/V) 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 分析 16S rRNA 基因的酶切电泳谱型, 计算每种不同谱型的出现频率。

1.4 16S rRNA 基因序列分析及系统发育分析

根据 16S rRNA 基因 RFLP 分析结果, 不同 RFLP 酶切电泳谱型的代表菌株的 16S rDNA 基因序列由南京金斯特生物科技有限公司测定, 所得序列去除无效序列后在 NCBI 上利用 Blastn 程序 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) 搜索 GenBank 核酸蛋白序列数据库所有相关序列, 确定各类群的种属特性。利用 DNAMAN (version 5.1, Lynnon BioSoft) 软件进行序列同源性分析并构建 16S rRNA 基因系统进化树。

1.5 代表菌株的形态及生理生化特性鉴定

代表菌株最适生长温度、菌落形态、革兰氏染色、运动性、淀粉酶实验、明胶酶 (蛋白酶) 实验、脂肪酶实验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[17]。

1.6 蛋白酶粗酶样品制备及酶活力测定

将代表菌株分别接种于发酵培养基, 在 15℃,

200 r/min培养4-5 d。将发酵液在4℃, 6800 × g 离心10 min, 收集上清, 真空冷冻干燥, 蒸馏水溶解后过夜透析, 透析液再次冷冻干燥获得蛋白酶粗酶样品, 将粗酶样品用蒸馏水溶解, 得到粗酶液。采用Lowry法(Folin-酚法)测定蛋白酶活力(参考国家标准(GB/T23527—2009)及试剂盒说明书), 酶活力单位为30℃条件下每分钟水解酪素产生相当于1 μg酪氨酸所需的酶量。

1.7 温度对蛋白酶活性的影响

分别将200 μL粗酶液与800 μL酪蛋白溶液(1%, pH 8.0)混匀, 分别在0℃-90℃测定酶活力, 以酶活力最高时为100%, 计算其他条件下的相对酶活力, 绘制酶活温度曲线。

1.8 pH对蛋白酶活性的影响

分别将200 μL粗酶液与800 μL不同pH值(pH 5.0-10.0)的缓冲液(含1%酪蛋白)混匀, 在适宜的酶活温度下测定酶活力, 以酶活力最高时为100%, 计算其他条件下的相对酶活力, 绘制酶活pH曲线。

2 结果和分析

2.1 菌落形态

分离纯化的68株细菌在酪蛋白筛选培养基上生长的菌落类型主要有3大类: 乳白色(37株), 橘色(29株)和浅黄色(2株)。各菌落形态见表1。

2.2 16S rRNA基因分析及系统发育树构建

用AfaI和MspI限制性内切酶对上述68个菌株16S rRNA基因进行双酶切及聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(RFLP分析), 结果表明68株细菌可归为3种酶切电泳谱型, 该分类结果与菌落形态相符(表1)。每种类型的菌株由于形态、生理生化等特性相似, 固随机挑取1株代表菌株进行16S rRNA基因的序列分析及系统发育进化分析(表1和图1), 结果显示菌株6和52与嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)有较高的同源性(分别为96.50%和98.55%); 菌株11与比目鱼黄杆菌(*Chryseobacterium scophthalmum*)有较高同源性(98.24%)。

表 1. 68 株北极细菌菌落形态、16S rRNA 基因 RFLP 分型及进化亲缘关系

Table 1. Colony morphology, 16S rRNA gene-RFLP analysis and phylogenetic affiliations of 68 bacteria strains from the Arctic

RFLP type	Colony morphology	Strains	Representative strain	Accession number	Nearest species (Type strain)	Identity/%
I	Creamy white, convex, moist, shiny, opaque, entire edges	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 58, 59, 60, 61, 62, XH21, XH30, XH32	6	JX495785	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> -p10 (NR_028930)	96.50
II	Orange, circular, moist, smooth, shiny, opaque, entire edges	7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 32, 33, 55, 56, 57, 64, XH27, XH29	11	JX495786	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i> LMG 13028 (NR_025386)	98.24
III	Light yellow, convex, moist, shiny, opaque, entire edges	26, 52	52	JX495787	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> -p10 (NR_028930)	98.55

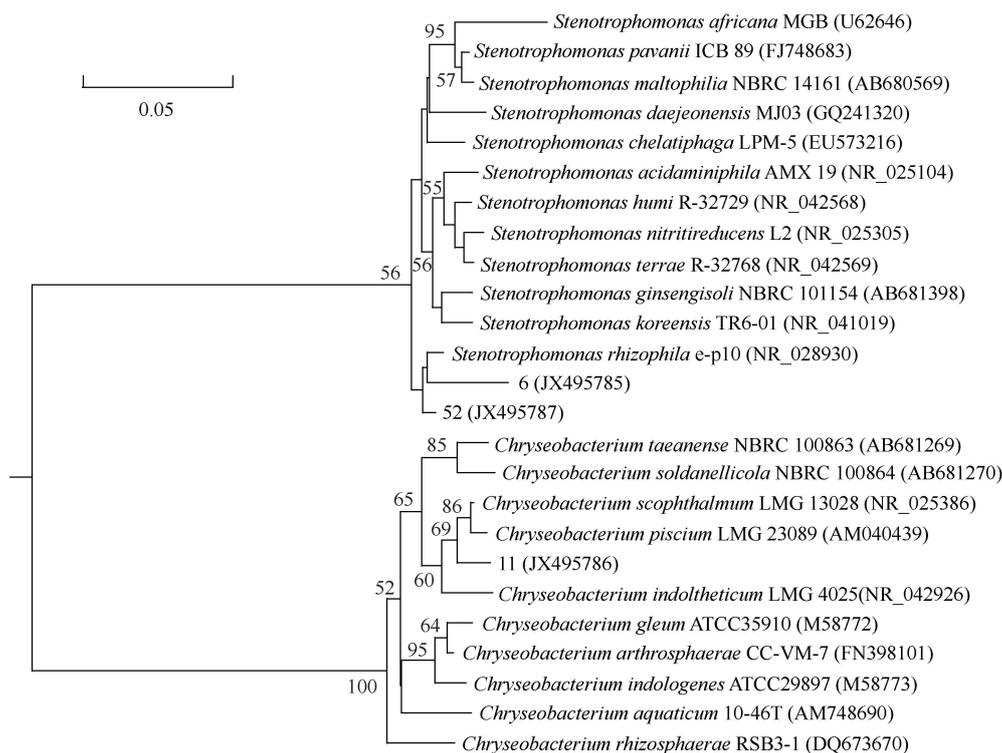


图 1. 根据 16S rRNA 基因序列构建菌株 6、11 和 52 的系统发育进化树

Figure 1. Phylogenetic tree based on bacterial 16S rRNA gene of strains 6, 11 and 52. The dendrogram was constructed from a matrix of pairwise genetic distances by the neighbor-joining method using the DNAMAN program. The bootstrap values above 50% from 1000 replicates are shown. The accession number of each 16S rRNA gene sequence is given in parenthesis. The scale bar represents 5 substitutions per 100 bp.

2.3 代表菌株的形态及生理生化特性

代表菌株 6、11、52 的个体形态及生理生化特征如表 2 所示。

表 2. 代表菌株的表型特征

Table 2. Phenotypic characteristics of strains 6, 11 and 52

Characteristic	Strain 6	Strain 11	Strain 52
Colony color	Creamy white	Orange	Light yellow
Cell form	Straight rods	Straight rods	Straight rods
Capsule	-	-	-
Gram stain	-	-	-
Motility	+	-	+
Lipase	-	-	-
Amylase	-	-	-
Protease/Gelatinase	+	+	+
Optimum temperature	30°C	20°C - 25°C	25°C - 30°C

-, negative; +, positive.

2.4 温度和 pH 对蛋白酶活性的影响

菌株 11 (LCZ8) 所产蛋白酶, 在 0 - 87.7°C 范围

内具有酶活, 在 20°C 低温下可以保留 40% 以上的酶活力, 最适酶活温度为 40°C (图 2-A)。在最适温度 40°C 放置 90 min, 保持 74.21% 的酶活力。该蛋白酶在 pH 6.5 - 10.0 范围内具有较高酶活, 最适酶活 pH 约为 8.5 (图 2-D)。在 4°C 将该酶在 pH 8.5 的环境放置 5 d 后, 其活性基本保持不变。

菌株 52 (YM52) 所产蛋白酶在 0 - 90°C 范围内具有酶活, 0 - 30°C 范围内保持 40% 左右的酶活, 35 - 80°C 酶活较高, 最适酶活温度为 65°C (图 2-B)。该蛋白酶在 pH 6 - 9 范围内具有较高活性, 最适酶活 pH 为 7.4 (图 2-E)。在最适 pH 和最适温度下, 经过 60 min 后, 酶活下降了 60% 以上, 而 4°C 下酶活较为稳定, 酶活基本保持不变。

菌株 6 (DWC6) 所产蛋白酶最适酶活温度为 55°C (图 2-C), 最适宜 pH 为 6.7 (图 2-F)。在最佳酶活温度 55°C 下保温 60 min 后, 保持 85.8% 的酶活。4°C 下酶活稳定。

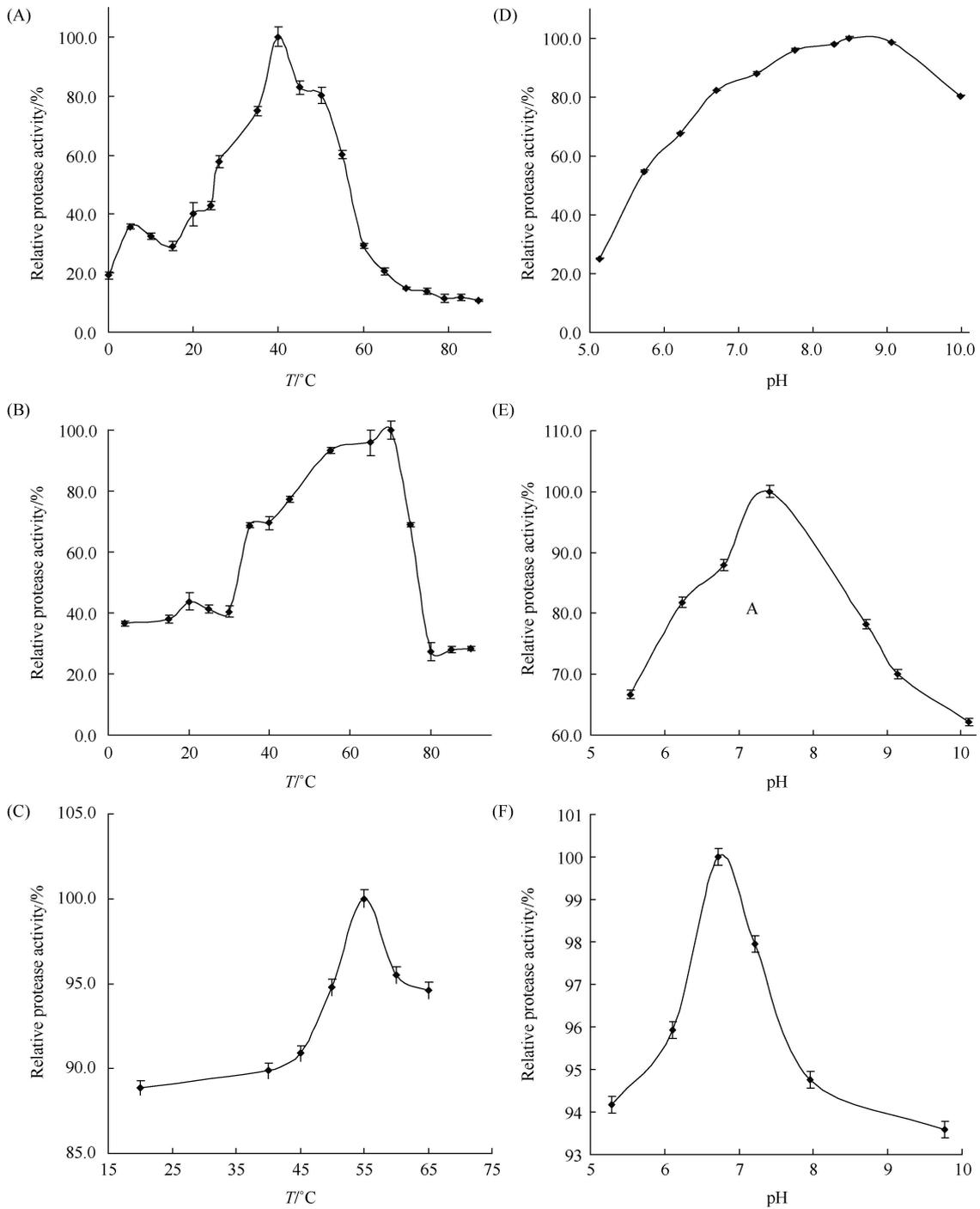


图 2. 温度和 pH 对代表菌株蛋白酶活性的影响

Figure 2. Effect of temperature and pH on the activity of protease from three representative strains. A and D, strain 11 (LCZ8); B and E, strain 52 (YMS2); C and F, strain 6 (DWC6).

3 讨论

本文采用低温培养的方法从北极海水样品中分离到 68 株产蛋白酶的菌株,根据 16S rRNA 基因序

列分析及系统进化树分析以及部分形态生理生化特性分析将它们归属为 3 个类群,代表菌株分别为 6、11 和 52。根据 Drancourt 等^[18-19]提出 16S rDNA 基因序列同源性鉴定规则,菌株 11 所代表的类群 16S rRNA 基因与 *Chryseobacterium scopthalmum* 具有

98.24% 同源性, 该类群与 *Chryseobacterium scopthalmum* 可能为同一个菌种, 但这需要进一步的 DNA-DNA 杂交实验进行准确验证, 因此暂时将之鉴定为 *Chryseobacterium* sp. 11; 菌株 6 和 52 所代表的类群与 *Stenotrophomonas rhizophila* 有较高的同源性(分别为 96.50% 和 98.55%), 菌株 52 所代表的类群与 *Stenotrophomonas rhizophila* 可能为同一个菌种, 同样暂时将之鉴定为 *Stenotrophomonas* sp. 52; 菌株 6 所代表的类群可能为 *Stenotrophomonas* 新种, 暂时将之鉴定为 *Stenotrophomonas* sp. 6。

黄杆菌属 (*Chryseobacterium*), 属于拟杆菌门 (Bacteroidetes) 黄杆菌科 (Flavobacteriaceae), 是一类 1994 年以后才重新划分和界定的种属^[20], 目前为止, 该属已含有 63 个不同的菌种, 不产芽孢、不运动、杆状, 多数菌种产典型的黄色或橘黄色非扩散性 flexirubin 色素, 部分菌种嗜冷, 具有强活性蛋白酶, 可能与物质的腐败或某些临床细菌感染病有关系。该类细菌广泛分布于土壤、淡水、海洋环境、极地环境、食物产品及临床样品等^[21]。由于 *Chryseobacterium* 的生长环境多种多样, 且其蛋白酶具有较高的活性, 将为各类商业蛋白酶的开发和利用提供有利的菌种资源库, 具有巨大的潜在商业价值, 但是目前关于该类细菌的环境类群及其蛋白酶的深入研究仍然较少^[22-24]。*Chryseobacterium scopthalmum*, 原名为 *Flavobacterium scopthalmum*, 最早分离自苏格兰近海海水及比目鱼体内, 是比目鱼的病原菌^[25]。我们所分离的菌株 11 也属于嗜冷微生物, 其最适生长温度在 20-25℃, 可能是极地低温环境下的土著细菌。初步酶活特性分析表明该菌蛋白酶最佳酶活温度为 40℃ 左右, 其蛋白酶在低温下具有较高酶活和稳定性, 属于低温碱性蛋白酶, 可望应用于化妆品、洗涤剂、皮革制造、饲料发酵、环境废弃物处理等等领域, 具有重要的研究和应用价值。

寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*), 属于 Gammaproteobacteria, 黄单胞杆菌目 (Xanthomonadales), 黄单胞杆菌纲 (Xanthomonadaceae), 目前仅有 10 种不同的物种。广泛分布于自然界中, 部分菌种可引起人类疾病^[26]。该类细菌不含芽孢, 具有运动性, 菌落为白色、黄色或绿色, 最佳生长温度为 35℃ 左右, 属于耐冷微生物。具有蛋白酶活性, 最佳酶活温度一般在 50-65℃ 范围内^[27], 是开发蛋白酶的另一类重要菌

种来源。菌株 6 所产蛋白酶最适酶活温度为 55℃, 酶活稳定, 可用于中温蛋白酶的研究应用; 菌株 52 所产蛋白酶虽然最适酶活温度为 55℃, 但其酶活在最适温度下不稳定而在低温下稳定, 这类蛋白酶可能是耐冷细菌长期适应低温环境而表现出的分子适应性, 可为耐冷微生物的冷适机制研究提供重要的研究材料。

目前, 对于极地微生物的研究主要集中于南极地区, 北极微生物的研究才刚刚起步, 尚无关于北极海洋环境中 *Stenotrophomonas* 和 *Chryseobacterium* 的菌株的相关报道, 本文首次报道了 *Stenotrophomonas* 和 *Chryseobacterium* 的菌株在北极海水样品中的分布, 充实了极地产蛋白酶菌的种属分布多样性, 同时为后续低温蛋白酶的开发利用及冷适机制研究奠定了基础。此外, 这两大类“淡水”细菌(其最适宜生长盐度为 0-20)在北极海水中大量分布的现象也是值得我们继续探讨的生态学问题。其分布是否与洋流或海冰的迁移有关, 抑或它们就是土著微生物? 它们是如何适应这种相对高盐的环境并长期存活下来, 在生态位上扮演着怎样的角色? 所有这些问题是我们未来研究的兴趣之一, 还需要更多的后继实验数据加以验证和阐述。

参考文献

- [1] Johnvesly B, Naik GR. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 2001, 37(2):139-144.
- [2] Gupta R, Beg Q, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(1):15-32.
- [3] Saeki K, Ozaki K, Kobayashi T, Ito S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 103(6):501-508.
- [4] Kasana RC. Proteases from psychrotrophs: An overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 2010, 36(2):134-145.
- [5] Singh SK, Singh SK, Tripathi VR, Khare SK, Garg SK. Comparative one-factor-at-a-time, response surface (statistical) and bench-scale bioreactor level optimization of thermoalkaline protease production from a psychrotrophic *Pseudomonas putida* SKG-1 isolate. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(12):114-126.
- [6] Singh SK, Singh SK, Tripathi VR, Khare SK, Garg SK. A novel psychrotrophic, solvent tolerant *Pseudomonas putida* SKG-1 and solvent stability of its psychro-

- thermoalkalitable protease. *Process Biochemistry*, 2011, 46(7):1430-1435.
- [7] Margesin R, Dieplinger H, Hofmann J, Sarg B, Lindner H. A cold-active extracellular metalloprotease from *Pedobacter cryoconitis*-production and properties. *Research in Microbiology*, 2005, 156(4):499-505.
- [8] Shi C, Kan G, Xie Q, Wang X, Wang M, Sun H. Screening and ferment of antarctic low-temperature bacterium producing alkaline protease. *Food Science and Technology*, 2012, 37(3):11-15. (in Chinese)
史翠娟, 阚光锋, 解秋菊, 王晓飞, 王敏, 孙慧丽. 高产碱性蛋白酶低温菌的筛选及发酵. *食品科技*, 2012, 37(3):11-15.
- [9] Chen J, Li W, Luo N, Xiong J, Yang J. Isolation and characterization of cold-adapted strain *Pseudoalteromonas* sp. ArcB82306 producing protease. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16(6): 858-862. (in Chinese)
陈吉刚, 李文晨, 罗楠, 熊鹃, 杨季芳. 产蛋白酶北极海洋耐冷菌 ArcB82306 的筛选及其蛋白酶性质. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(6): 858-862.
- [10] Xiong H, Song L, Xu Y, Tsoi MY, Dobretsov S, Qian PY. Characterization of proteolytic bacteria from the Aleutian deep-sea and their proteases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, 34(1): 63-71.
- [11] Margesin R, Schinner F. Characterization of a metalloprotease from psychrophilic *Xanthomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 79(2-3): 257-262.
- [12] Lin N, Zhang R, Zhao J, Zeng R. Cold-active protease from antarctic bacterium *Marinobacter* sp. strain R2: Fermentation condition and enzyme properties. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, 43(6):865-869. (in Chinese)
林念炜, 张锐, 赵晶, 曾润颖. 南极产低温蛋白酶菌株 *Marinobacter* sp. R2 的发酵条件及酶学性质研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(6):865-869.
- [13] Kulakova L, Galkin A, Kurihara T, Yoshimura T, Esaki N. Cold-Active Serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* strain ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 611-617.
- [14] Kim EH, Cho KH, Lee YM, Yim JH, Lee HK, Cho JC, Hong SG. Diversity of cold-active protease-producing bacteria from Arctic terrestrial and marine environments revealed by enrichment culture. *The Journal of Microbiology*, 2010, 48(4):426-432.
- [15] Oh KH, Seong CS, Lee SW, Kwon OS, Park YS. Isolation of a psychrotrophic *Azospirillum* sp. and characterization of its extracellular protease. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 174(1): 173-178.
- [16] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(12): 5685-5689.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [18] Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(10):3623-3630.
- [19] Drancourt M, Berger P, Raoult D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(5):2197-2202.
- [20] Vandamme P, Bernardet JF, Segers P, Kersters K, Holmes B. New perspectives in the classification of Flavobacteria; description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(4): 827-831.
- [21] Bernardet JF, Hugo C, Bruun B. The Genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia* // Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes. 2nd eds. Vol. 7 Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria. Singapore: Springer, 2006:638-676.
- [22] Liu J, Min H, Zhang J, Shao A. Characterization of a strain producing cold-adapted protease and enzyme purification. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2006, 32(3): 251-256. (in Chinese)
刘静, 闵航, 章骥, 邵爱萍. 一株产低温蛋白酶菌株的筛选鉴定及纯酶研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2006, 32(3):251-256.
- [23] Pan HJ, Teng LJ, Chen YC, Hsueh PR, Yang PC, Ho SW, Luh KT. High protease activity of *Chryseobacterium indologenes* isolates associated with invasive infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2000, 33(4):223-226.
- [24] Bach E, Daroit DJ, Corrêa AP, Brandelli A. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. *Biodegradation*, 2011, 22(6): 1191-1201.
- [25] Mudarris M, Austin B, Segers P, Vancanneyt M, Hoste B, Bernardet JF. *Flavobacterium scopthalmum* sp. nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(3):447-453.

- [26] Palleroni NJ. *Genus IX. Stenotrophomonas* Palleroni and Bradbury 1993, 608^{VP}//Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd eds. Vol. 2 The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. New York: Springer, 2004;107-116.
- [27] Yan Z, Bi C, Xin X, Luo W, Dai Y, Wang B. Isolation and identification of a high-protease-producing

Stenotrophomonas maltophilia strain and its enzymatic characteristics. *Journal of Microbiology*, 2010, 30(5):7-11. (in Chinese)

闫志勇, 毕春霞, 辛晓妮, 罗玮, 代玉梅, 王斌. 1 株高产蛋白酶嗜麦芽寡养单胞菌的分离鉴定及其酶学活性的研究. *微生物学杂志*, 2010, 30(5):7-11.

Isolation, identification and characterization of 68 protease-producing bacterial strains from the Arctic

Mingxia Chen^{1,2}, Heyang Li^{2*}, Weiwei Chen¹, Weicheng Diao¹, Chengzhong Liu¹, Min Yuan¹, Xiaohong Li¹

¹College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

²Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

Abstract: [**Objective**] We screened and identified protease-producing bacterial strains from the Arctic, the results would help find cold-adapted protease. [**Methods**] In total 68 protease-producing strains were screened from the Arctic using the casein-agar plate under low temperature. All strains were classified using the 16S rRNA gene-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and traditional phenotypic test. One strain was chosen to be the representative strain from each group respectively and identified using 16S rRNA gene sequence analysis, GenBank database Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), phylogenetic analysis and phenotypic features analysis. The enzymatic properties of the representative strains were determined. [**Results**] The 68 strains belonged to 3 groups (54.41%, 42.65% and 2.94%), and strains 6, 11 and 52 were the representative strains respectively. The results of the 16S rRNA gene sequence analysis showed that: Strain 11 was most closely related to *Chryseobacterium scophthalmum* with 98.24% sequence similarity; strain 52 was most closely related to *Stenotrophomonas rhizophila* with 98.55% sequence similarity; strain 6 was most closely related to *Stenotrophomonas rhizophila* with 96.50% sequence similarity, which might represent a novel species of the genus. The phenotypic study showed that: strains 6, 11 and 52 were Gram negative, straight rod-shaped, did not produce extracellular lipase and amylase, possessed strong proteolytic activity. The optimal temperature and pH for the enzyme activity were 55°C and 6.7 for the protease from strain 6, 40°C and 8.5 for the protease from strain 11 and 65°C and 7.4 for the protease from strain 52. [**Conclusion**] The research firstly introduced the distribution of *Stenotrophomonas* and *Chryseobacterium* specieses in the Arctic marine water, extended the diversity of the protease-producing bacteria from the Arctic, and provided a useful basis for further study of cold-adapted protease.

Keywords: the Arctic, protease, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41006117), by the Marine Public Welfare Project (200805064, 201205013) and by the Research Foundation for High-level Talents of Huaqiao University (12BS206)

* Corresponding author. Tel /Fax: +86-592-2195769; E-mail: heyangli@126.com

Received: 21 September 2012/Revised: 2 March 2013