



## 北黄海沉积物可培养产蛋白酶细菌分离鉴定

伍朝亚<sup>1,2</sup>, 李岩<sup>2</sup>, 曲慧敏<sup>2,3</sup>, 张振鹏<sup>2</sup>, 解志红<sup>2\*</sup>, 孟宪刚<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>兰州交通大学化学与生物工程学院, 甘肃 兰州 730070

<sup>2</sup>中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003

<sup>3</sup>烟台大学海洋学院, 山东 烟台 264005

**摘要:**【目的】揭示北黄海沉积物中可培养产胞外蛋白酶细菌及蛋白酶多样性, 增加人们对北黄海生态系统中产蛋白酶菌多样性的认识, 为海洋产蛋白酶微生物的挖掘提供菌群资源。【方法】分别将 5 个北黄海沉积物样品梯度稀释涂布至酪蛋白明胶筛选平板, 选择性分离产蛋白酶细菌; 并通过分析基于 16S rRNA 基因序列的系统发育关系, 揭示这些细菌的分类地位和遗传多样性; 分别测定胞外蛋白酶活性并对酶活较高的 39 株菌进行基于苯甲基磺酰氟(PMSF, 丝氨酸蛋白酶抑制剂)、邻菲罗啉(o-phenanthroline, O-P, 金属蛋白酶抑制剂)、E-64 (半胱氨酸蛋白酶抑制剂)和 pepstatin A (天冬氨酸蛋白酶抑制剂) 4 种抑制剂的酶活抑制实验以及所有菌株对 3 种底物(酪蛋白、明胶、弹性蛋白)的水解能力; 分析这些细菌所产胞外蛋白酶的特性及多样性。【结果】从 5 个北黄海沉积物样品中分离获得 66 株产蛋白酶细菌, 这些菌株隶属于 Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria 和 Firmicutes 4 个门的 7 个属, 其中 *Pseudoalteromonas* (69.9%)、*Sulfitobacter* (12.1%)和 *Salegentibacter* (10.6%)是优势菌群; 沉积物中可培养的产蛋白酶细菌的丰度为  $10^4$  CFU/g; 蛋白酶酶活抑制实验表明所有测定菌株产生的胞外蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶和/或金属蛋白酶, 仅有少数菌株所产蛋白酶具有半胱氨酸蛋白酶或天冬氨酸蛋白酶活性。【结论】北黄海沉积物中可培养产蛋白酶细菌类群较为丰富, *Pseudoalteromonas*、*Sulfitobacter* 和 *Salegentibacter* 菌株是优势菌群, 测定菌株所产胞外蛋白酶主要是丝氨酸蛋白酶和/或金属蛋白酶。

**关键词:** 海洋沉积物, 产蛋白酶细菌, 多样性, 丝氨酸蛋白酶, 北黄海

蛋白酶是能催化蛋白质肽键水解的一类酶, 普遍存在于动物、植物及微生物中, 在洗涤、皮革、银洗、医药、食品、饲料、化工等行业广泛应用, 需求量约占酶制剂市场的 40%–60%<sup>[1-3]</sup>, 微

生物是工业蛋白酶制剂的主要来源<sup>[3]</sup>。目前用于蛋白酶生产的微生物大多来源于陆地或淡水环境, 而随着工业发展已不能满足对蛋白酶不同特征需求的多样性<sup>[4]</sup>。地球表面的 2/3 以上由海洋覆盖,

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA11020403); 山东省自主创新及成果转化专项(2014ZZCX07303)

\*通信作者。孟宪刚, Tel: +86-931-4956524, E-mail: mengxg@mail.lzjtu.cn; 解志红, Tel: +86-535-2109183, E-mail: zhxie@yic.ac.cn

收稿日期: 2016-11-02; 修回日期: 2017-04-01; 网络出版日期: 2017-04-14

这些沉积物中存在着大量的产多种酶及代谢产物的微生物。因此, 寻找并开发海洋来源的产蛋白酶微生物资源, 利于发现新型蛋白酶产生菌种及蛋白酶基因资源。

近年来, 对海洋沉积物中产蛋白酶细菌和其产蛋白酶多样性的研究逐渐兴起, Olivera 等在 2007 年从采自亚南极地区的海洋沉积物中筛选得到 19 株产蛋白酶细菌, 对其进行系统发育分析表明这些菌隶属于 *Pseudoaeromonas*、*Shewanella*、*Colwellia*、*Planococcus* 属和 *Flavobacteriaceae* 科, 但未对其胞外蛋白酶类型进行研究<sup>[5]</sup>。Zhou 等来自中国南海深海沉积物和南极洲乔治王岛的沿海沉积物样品中分别筛选到 78 和 105 株产蛋白酶细菌, 并分析了产蛋白酶细菌及它们所产的胞外蛋白酶的多样性, 结果显示, 南海深海沉积物分离到的产蛋白酶细菌主要属于 *Gammaproteobacteria* 类群, 分别属于 *Pseudoaeromonas*、*Alteromonas*、*Marinobacter*、*Idiomarina*、*Halomons*、*Vibrio*、*Shewanella*、*Pseudomonas* 和 *Rheinheimera* 属, 其中 *Alteromonas* (34.6%) 和 *Pseudoaeromonas* (28.2%) 是优势类群<sup>[6]</sup>。从乔治王岛沉积物分离到的产蛋白酶细菌主要属于 *Actinobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidetes* 和 *Proteobacteria* 4 个门, 优势类群为 *Bacillus* (22.9%)、*Flavobacterium* (21.0%) 和 *Lacinutrix* (16.2%)<sup>[7]</sup>。他们对这些细菌胞外蛋白酶的多样性研究结果表明, 沉积物中细菌产的胞外蛋白酶几乎都是丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶<sup>[6-7]</sup>。最近 Zhang 等从胶州湾 6 个样点的沉积物样品中筛选到 69 株产蛋白酶细菌分布于 *Bacteroidetes*、*Firmicutes* 和 *Proteobacteria* 3 个门的 9 个属, 包括 *Asinibacterium*、*Photobacterium*、*Bacillus*、*Vibrio*、*Shewanella*、*Pseudoalteromonas*、

*Halobacillus*、*Microbulbifer* 和 *Psychrobacter*, 其中 *Photobacterium* (39.4%)、*Bacillus* (25.8%)、*Vibrio* (19.7%) 和 *Shewanella* (7.6%) 菌株是优势菌群, 这些细菌所产的胞外蛋白酶主要也是丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶<sup>[8]</sup>。

北黄海位于渤海以东, 是山东半岛、辽东半岛和朝鲜半岛之间的暖温带半封闭海域, 海域面积约为 80000 km<sup>2</sup>, 平均水深 40 m<sup>[9]</sup>。沿岸河流如鸭绿江、大洋河、庄河、登沙河及碧流河等河流常年流入北黄海<sup>[10]</sup>。但目前尚没有对北黄海沉积物中产蛋白酶细菌及其胞外蛋白酶多样性的研究。国内外关于蛋白酶产生菌的报道多来自极地深海沉积物中, 对于浅海沉积物中产蛋白酶微生物则关注较少, 北黄海独特的地理、气候及环境特征, 可能蕴藏着新的产蛋白酶细菌及蛋白酶资源。本研究针对采集自北黄海 5 个站点的沉积物样品, 使用酪蛋白明胶平板选择性分离了产胞外蛋白酶细菌, 对所有分离到的菌株进行基于 16S rRNA 基因序列分析, 确定了这些菌的系统发育地位, 并通过对胞外蛋白酶酶活抑制剂实验及对不同蛋白底物的降解能力分析了胞外蛋白酶的多样性, 以期发掘酶活较高的新的海洋微生物及蛋白酶资源服务于工业化生产和应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** 酵母提取物(Oxoid)、蛋白胨(Oxoid)、酪素(Sigma)、明胶(上海生工)、弹性蛋白(Sigma)、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma), 1,10-phenanthroline (O-P, Sigma), E-64 (Sigma), Pepstatin A (Sigma)。Eppendorf AG

PCR 仪(杭州晶格科学仪器有限公司), DYY-6C 电泳仪(北京市六一仪器厂), 凝胶成像仪(北京友华照钦医疗器械有限公司 Bio-Rad 生命科学授权代理商), THZ-100 恒温培养摇床和 DK-8D 电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司), Sorvall ST16R 小型高速冷冻离心机(Thermo Fisher Germany), Thermo Scientific Multiskan FC 酶标仪(深圳市华德维康科技有限公司)。

**1.1.2 培养基:** 酪蛋白明胶筛选培养基、2216E 培养基、酪蛋白固体培养基、明胶固体培养基、弹性蛋白固体培养基以及发酵培养基均参照文献[11]。

## 1.2 样品采集

沉积物样品采集自 2014 年 9 月中国科学院烟台海岸带研究所北黄海航次, 用 0.05 m<sup>2</sup> 不锈钢 Gray O'Hara 箱式采泥器在调查站位采集沉积物样品, 去除表面可能被污染的样品, 用无菌 60 mL 注射器(无鲁尔接口末端)收集沉积物海底表面以下大约 5 cm 的样品, 立刻转移至无菌自封袋内低温保存, 表层沉积物温度和 pH 值原位测定。采样船上用干冰低温保存样品, 返回实验室之后, 用于分析有机碳(OrgC)和有机氮(OrgN)含量的样品在-20 °C 保存, 用于菌株筛选的样品于-4 °C 保存北黄海海底沉积物的 5 个站点 S1、S2、S3、S4、S5。使用 PE 2400 Series II CHNS/O 分析仪(Perkin Elmer, 美国)检测样品中的有机碳和有机氮的含量。

## 1.3 胞外蛋白酶产生菌的选择性分离及保藏

称取 1 g 沉积物样品, 用无菌海水以 10 倍稀释梯度稀释至 10<sup>-6</sup>, 混匀后取 100 μL (10<sup>-2</sup>-10<sup>-6</sup>) 的稀释样品涂布于酪蛋白明胶筛选培养基平板上, 置于 20 °C 培养 2-7 d。挑取不同菌落形态的产透明水解圈的单菌落, 每个平板仅挑取 1 株具

有同一种菌落形态的细菌形态菌株, 在相同的培养基上采用连续划线的方法纯化菌株, 之后使用 2216E 液体培养基扩大培养至对数期, 取 1 mL 菌液, 加入终浓度为 20% 的甘油, 保藏于-80 °C<sup>[6,8]</sup>。

## 1.4 菌株基因组 DNA 的提取

将所有纯化后的菌株接种至 2216E 液体培养基中, 待生长至对数期后收集菌体, 使用天根细菌基因组提取试剂盒(TIANGEN Bacteria DNA Kit)提取所有菌株的基因组 DNA, 提取方法及流程按照试剂盒要求操作。提取后用 Nano Drop 检测 DNA 纯度, 检测合格的 DNA 样品于-20 °C 冷冻保存待用。

## 1.5 16S rRNA 基因的扩增及序列测定

选用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 扩增所有菌株的 16S rRNA 基因序列<sup>[4]</sup>, 引物序列及 PCR 反应体系及程序参照文献[6], PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序<sup>[12-13]</sup>。测序得到的序列提交至 NCBI 数据库, 登录号为: KX889923-KX889987, KX853082。

## 1.6 菌株系统发育分析

将测得的 16S rRNA 序列在 NCBI 进行 BLAST 程序在线比对, 并从 GenBank 中下载相似性最高近缘物种的模式菌株序列, 使用 MEGA 5.0 的 Clustal 程序比对后, 并选择邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统进化树, 选择 Kimura two-parameter model, 自展值设定为 1000<sup>[14-15]</sup>。并通过 MEGA 5.0 计算所有菌株之间及菌株与模式菌株之间的相似性。

## 1.7 蛋白酶酶活的测定

**1.7.1 酪氨酸标准曲线的制作:** 用 50 mmol/L

Tris-HCl (pH 8.0)配成 1 mg/mL 酪氨酸标准溶液, 并逐步稀释成 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100  $\mu\text{g/mL}$  的酪氨酸溶液, 分别取各浓度液体 100  $\mu\text{L}$ , 并分别加入 500  $\mu\text{L}$  0.4 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液和 100  $\mu\text{L}$  Folin-phenol (Sigma), 40  $^\circ\text{C}$  显色 10 min 后于 660 nm 测吸光度, 制作标准曲线。

**1.7.2 蛋白酶对酪蛋白酶活的测定:** 使用福林酚-试剂法测定蛋白酶活。分别将活化后的菌体接种到酪蛋白明胶发酵培养基中, 15  $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养, 3 d 后取适量发酵液, 13000 r/min 离心弃沉淀, 上清即为粗酶液<sup>[16]</sup>, 向 100  $\mu\text{L}$  粗酶液中加入已于 40  $^\circ\text{C}$  预热的 100  $\mu\text{L}$  2%酪素溶液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 配制), 40  $^\circ\text{C}$  水浴 10 min。加入 200  $\mu\text{L}$  0.4 mol/L 三氯乙酸(TCA)终止反应, 40  $^\circ\text{C}$  保温 10 min。13000 r/min 离心 3 min, 取 100  $\mu\text{L}$  上清, 加入 500  $\mu\text{L}$  0.4 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 加入 100  $\mu\text{L}$  Folin-phenol, 40  $^\circ\text{C}$  显色 10 min, 于 660 nm 测吸光度<sup>[17]</sup>。酶活力单位 IU 定义为: 在以上条件下, 每毫升液体酶水解酪蛋白时每分钟释放 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸所需要的酶量。

**1.7.3 蛋白酶的抑制剂实验:** 取 100  $\mu\text{L}$  粗酶液, 分别加入终浓度为 1.0 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 1.0 mmol/L 邻菲罗啉(O-P), 0.1 mmol/L E-64 和 0.1 mmol/L Pepstatin A, 20  $^\circ\text{C}$  放置 20 min 后, 测定对酪蛋白酶活, 以不加抑制剂的对照组酶活减去加入抑制剂后的酶活即为抑制率<sup>[6]</sup>。

**1.7.4 菌株在不同底物平板上水解圈的测定:** 将各菌株在 2216E 固体活化培养基上进行划线, 倒置于 28  $^\circ\text{C}$  培养 24 h, 然后挑取少许菌体分别点接于酪蛋白平板、明胶平板和弹性蛋白平板上, 15  $^\circ\text{C}$  培养 5 d, 测量水解圈直径和菌落直径的大小, 并计算其比值<sup>[6]</sup>。

**1.7.5 部分产蛋白酶细菌的菌种保藏:** 将部分代

表菌株 70420 (MCCC 1K0324)、70309 (MCCC 1K03262)、70372 (MCCC 1K03263)、70377 (MCCC 1K03264)、70383 (MCCC 1K03265)、70384 (MCCC 1K03266)、70398 (MCCC 1K03268)、70402 (MCCC 1K03269)、70428 (MCCC 1K03270)、70436 (MCCC 1K03271)保藏到中国海洋微生物菌种保藏中心。

## 2 结果和分析

### 2.1 北黄海海底表层样品的特点

5 个站点海底表层沉积物样品的采集地点、海水深度、温度、pH、有机碳含量、有机氮含量以及总碳和总氮比例如图 1 和表 1 所示。5 个站点中水深最深的是 S1 (50.8 m) 和 S4 (51 m), 从表 1 可以得出温度跟水深有关系, 水深越深温度越低, 最低温度为 9.21  $^\circ\text{C}$ , 各个样品的 pH 均是中性偏碱, 最大 pH 为 8.05, OrgC 的含量为 0.15%–0.97%, OrgN 的含量为 0.02%–0.09%, 站点 S5 的 C/N 比最高, 为 54, 站点 S1 的 C/N 比最低, 为 5.07。

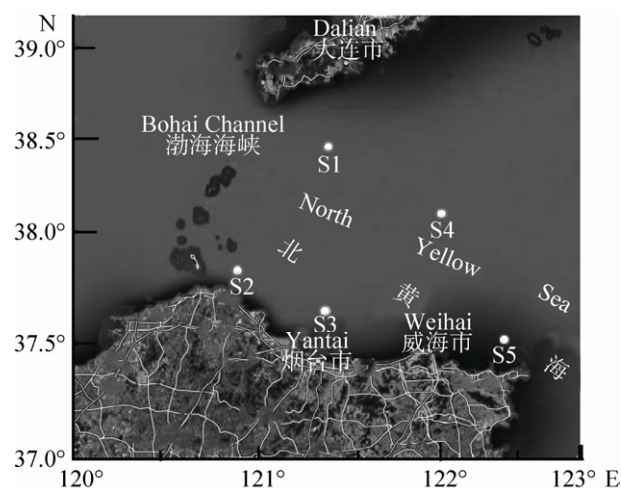


图 1. 北黄海沉积物位点分布图

Figure 1. Geographic location of sampled sediment stations in the North Yellow Sea.

表 1. 站点信息

Table 1. Characteristics of the sampling stations

Station	Location (E, N)	Depth/m	T/°C	pH	OrgC/%	OrgN/%	C/N
S1	121.51°, 38.51°	50.8	9.27	7.85	0.15	0.03	5.07
S2	120.97°, 37.91°	18.0	19.50	8.05	0.42	0.05	8.20
S3	121.49°, 37.71°	18.0	19.50	8.05	0.42	0.06	7.18
S4	122.18°, 38.19°	51.0	9.21	7.84	0.96	0.09	10.39
S5	122.55°, 37.57°	24.1	17.12	7.98	0.97	0.02	54.00

## 2.2 沉积物样品中产蛋白酶细菌的丰度

在初筛培养基稀释度为  $10^{-1}$ – $10^{-4}$  的涂布平板上培养后长出大量的菌落, 同一样点的分离平板上菌落颜色、大小和形态一致的认为是一种菌, 对同一种菌的菌落数量和稀释倍数进行统计计算, 得出产蛋白酶细菌的丰度约为  $10^4$  个/g 沉积物样品。各个沉积物站点有机质的含量和 C/N 比的不同并没有导致可培养的产蛋白酶细菌丰度明显差异。经纯化后得到 66 株产蛋白酶细菌 (图 2)。

## 2.3 产蛋白酶细菌多样性分析

基于菌株 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树如图 3 所示, 66 株菌分别隶属于 Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria 和 Firmicutes 4 个门的 7 个属。除了菌株 70427 属于 Actinobacteria 的 *Nesterenkonia*, 菌株 70428 属于 Firmicutes 的 *Chryseomicrobium* 之外, 其余的菌株都隶属于 Bacteroidetes 门中的 *Salegentibacter* 和 Proteobacteria 的 *Pseudoalteromonas*、*Marinobacter*、*Sulfitobacter*、*Vibrio*, 其中 *Pseudoalteromonas* (69.9%)、*Sulfitobacter* (12.1%) 和 *Salegentibacter* (10.6%) 是优势类群, 其余属的细菌分别占有所有菌株的 1.5% 和 3.0%。对分离自各个站点菌株的分类地位统计如图 2 所示, 46 株属于 *Pseudoalteromonas* 的菌株在 5 个不同站

点的沉积物样品中均有分布, 并且是所有站点的优势菌群。站点 S4 的细菌物种多样性最为丰富, 除 *Vibrio* 的其余 6 个属的菌株都有分布, 其中有 17 株属于 *Pseudoalteromonas*, 4 株属于 *Salegentibacter*, 各有 1 株属于 *Marinobacter*、*Sulfitobacter*、*Nesterenkonia*、*Chryseomicrobium*。相对其他 3 个站点, 站点 S2 和 S5 的菌株物种多样性最小, 其菌株都分布于 2 个属: *Pseudoalteromonas* 和 *Sulfitobacter*。站点 S1 有 16 株菌, 菌株数量仅次于站点 S4, 其菌株分布于 *Salegentibacter*、*Pseudoalteromonas*、*Marinobacter* 3 个属。分离自站点 S3 的 9 株分布于 *Pseudoalteromonas*、*Sulfitobacter*、*Vibrio* 3 个属。

基于菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树如图 3 所示, 共有 46 株菌属于 *Pseudoalteromonas*, 其中 40 株之间相似性为 100%, 它们与 *Pseudoalteromonas hodoensis* H7<sup>T</sup> 的相似性最高为 100%; 70372 (KX889958)、70377 (KX889959) 和 70384 (KX889962) 相似性最高为 99.7%–99.9%, 它们都与 *Pseudoalteromonas tetraodonis* IAM 14160<sup>T</sup> 的相似性最高为 99.8%–100%; 70436 (KX889987) 与菌株 *Pseudoalteromonas espejiana* NBRC 102222<sup>T</sup> 相似性最高为 99.9%; 70323 (KX889931) 和 70383 (KX889961) 在进化树上聚为一个小分支, 其相似性 99.9%, 这两株菌与 *Pseudoalteromonas*

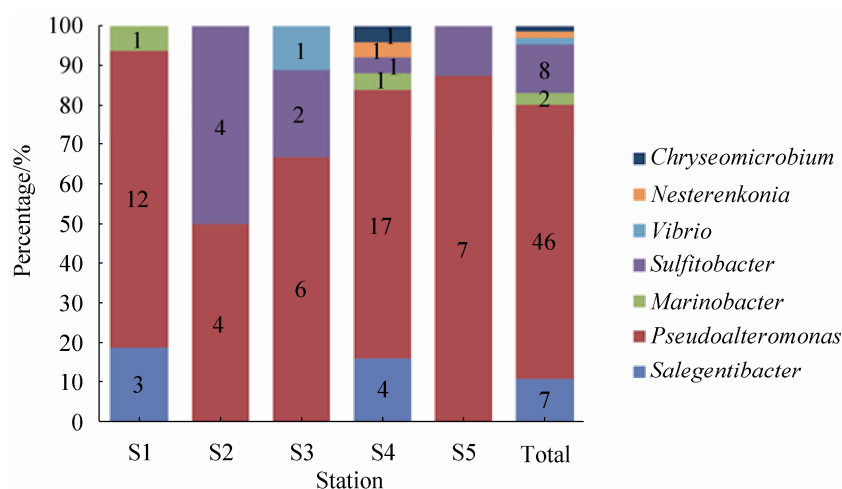


图 2. 北黄海沉积物中的产蛋白酶细菌的百分比丰度

Figure 2. Relative abundances of the phylogenetic groups of cultivable protease-producing bacteria recovered from sediment samples of North Yellow Sea. The number in parentheses above each bar indicates the total number of sequences it represents. Different genera are indicated by the numbers at the right of each section.

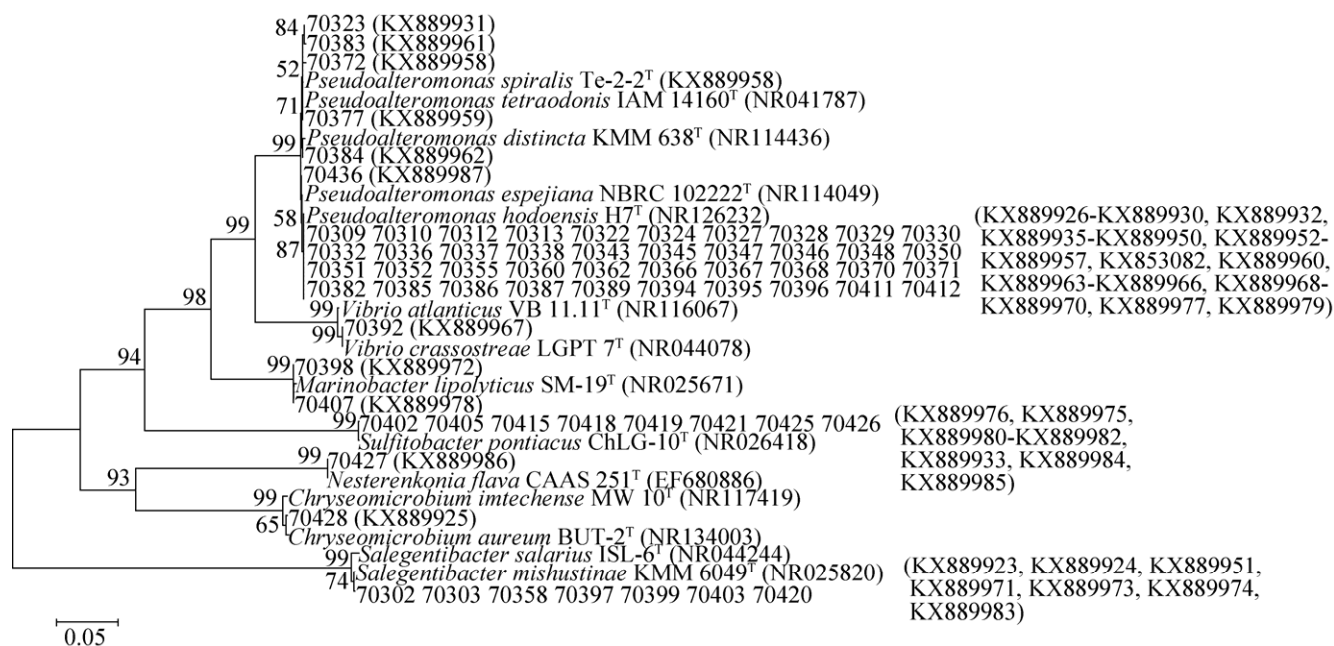


图 3. 北黄海沉积物中产蛋白酶细菌的 16S rRNA 基因 NJ 系统发育树

Figure 3. Neighbor-joining tree of the protease-producing bacteria isolated from five sampled sediment stations in the North Yellow Sea based on their 16S rRNA gene sequences. The accession numbers in GenBank database are indicated after the bacterial names. The boldfaced strains are protease-producing bacteria isolated in this study. Bootstrap analyses were made with 1000 cycles and only bootstrap values > 50% are shown at the branch points. Scale bar indicates 0.05% changes/site.

*tetraodonis* IAM 14160<sup>T</sup> 相似性最高为 99.8%。属于 *Sulfitobacter* 的 8 株菌 70402 (KX889976)、70405 (KX889975)、70415 (KX889980)、70418 (KX889981)、70419 (KX889982)、70421 (KX889933)、70425 (KX889984) 和 70426 (KX889985) 的相似性为 100%，它们与 *Sulfitobacter pontiacus* GhLG-10<sup>T</sup> 的相似性最高为 99.8%。菌株 70392 与 *Vibrio crassostreae* LGP<sup>T</sup> 相似性为 100%。细菌 70398 和 70407 相似性为 100%，其与 *Marinobacter lipolyticus* SM-19<sup>T</sup> 的相似性最高为 99.8%。菌株 70427 与 *Nesterenkonia flava* CAAS 251<sup>T</sup> 的相似性最高为 100%。菌株 70428 与 *Chryseomicrobium aureum* BUT-2<sup>T</sup> 的相似性最高为 99.7%。属于 *Salegentibacter* 的 7 个菌株 70302 (KX889923)、70303 (KX889924)、70358 (KX889951)、70397 (KX889971)、70399 (KX889973)、70403 (KX889974) 和 70420 (KX889983) 的相似性为 100%，其与 *Salegentibacter mishustinae* KMM 6049<sup>T</sup> 的相似性最高为 99.8%。

#### 2.4 北黄海沉积物中产蛋白酶细菌胞外蛋白酶多样性

对 66 株菌进行液体发酵培养，测定发酵液酶活，发现有 27 株菌的粗酶液酶活较低，不能客观反映蛋白酶抑制率，因此对其余的 39 株测定了基于苯甲基磺酰氟(PMSF, 丝氨酸蛋白酶抑制剂)、邻菲罗啉(O-P, 金属蛋白酶抑制剂)、E-64 (半胱氨酸蛋白酶抑制剂)和 Pepstatin A (天冬氨酸蛋白酶抑制剂) 4 种蛋白酶抑制剂的蛋白酶酶活抑制率，并分析了这些菌的胞外蛋白酶种类及多样性。

如表 2 所示，PMSF 对 39 株菌的蛋白酶活性均有抑制作用，抑制率为 2.34%–98.35%，表明这些菌株都能产生丝氨酸蛋白酶；其中 PMSF 对 8 株菌(70351、70389、70362、70386、70436、70420、

70329、70346)的胞外蛋白酶抑制率超过 90%，仅对 1 株菌(70338)的抑制率较低(<10%)，表明这些菌株产的蛋白酶主要或全部是丝氨酸蛋白酶。O-P 对 33 株的胞外蛋白酶活性有抑制作用，抑制率为 1.16%–97.62%，对 29 株菌的抑制率明显(抑制率>10%)，其中菌株 70385 胞外蛋白酶被 O-P 抑制最为显著(抑制率>90%)。从表 2 结果可以看出，绝大多数蛋白酶菌株产蛋白酶的活性都能够同时被 PMSF 和 O-P 抑制，表明这些菌株能够同时产生丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。E-64 对 10 株菌的蛋白酶酶活有抑制作用，抑制率为 1.81%–17.55%，但仅对 1 株菌(70420)有较为明显的抑制作用(>10%)。Pepstatin A 对 16 株菌的蛋白酶酶活有抑制作用，抑制率为 1.19%–13.68%，但仅对 1 株菌(70399)有较为明显的抑制作用(>10%)。这表明这些酶活抑制测定菌株的蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶和/或金属蛋白酶，仅少部分菌株有天冬氨酸或半胱氨酸蛋白酶活性。

为了进一步研究来自北黄海沉积物中 66 株产蛋白酶细菌所产的胞外蛋白酶的多样性，还测定了所有菌株对 3 种不同底物酪蛋白、明胶和弹性蛋白的降解能力。结果如表 2 所示，除 70421 不能在酪蛋白平板产生水解圈，70336、70337、70338、70392、70402、70405 和 70427 不能在明胶平板上产生水解圈外，所有菌株都能在酪蛋白平板和明胶平板上产生明显的水解圈。其中 70303、70397、70399、70403 和 70420 对酪蛋白有较强的水解能力(H/C>5)，70397 的水解能力最强，其 H/C 为 6.75；菌株 70397、70399 和 70420 对明胶有较强的水解能力(H/C>5)，70399 水解能力最强，其 H/C 为 7.20。有 48 株菌在弹性蛋白平板上能产生水解圈，其中 70420 的水解能力最强，其 H/C 为 4.33。

表 2. 北黄海沉积物产蛋白酶细菌胞外蛋白酶多样性分析

Table 2. Diversity analysis of the extracellular proteases produced by strains screened from the North Yellow Sea sediments

Phylum (Strain number)	Genus (Strain number)	Strain	H/C ratio <sup>a</sup>			Inhibition ratio <sup>b</sup> /%			
			Casein	Gelatin	Elastin	PMSF (1 mmol/L)	O-P (1 mmol/L)	E-64 (0.1 mmol/L)	P-A (0.1 mmol/L)
Bacteroidetes (7)	<i>Salagentibacter</i> (7)	70403	6.00	4.14	1.45	85.35	1.16	0	0
		70358	3.57	2.40	4.20	63.54	0	0	0
		70399	5.33	7.20	3.20	51.50	14.06	0	13.68
		70302	4.33	1.50	3.33	36.49	0	0	0
		70303	5.00	1.25	4.20	72.82	10.87	2.17	3.07
		70397	6.75	5.63	1.67	37.74	0	0	0.95
		70420	5.33	7.00	4.33	98.14	10.36	17.55	3.56
Proteobacteria (57)	<i>Pseudoalteromonas</i> (46)	70348	3.00	1.69	1.64	76.61	49.13	0	8.28
		70347	1.57	1.83	1.67	66.42	10.43	0	0
		70412	2.11	1.36	1.31	–	–	–	–
		70383	3.07	3.20	0	–	–	–	–
		70336	2.43	0	1.17	–	–	–	–
		70332	3.06	1.13	1.45	–	–	–	–
		70384	2.13	1.71	0	–	–	–	–
		70312	3.40	1.46	2.08	28.87	45.98	0	2.42
		70368	2.65	2.67	1.36	70.00	36.41	0	0.00
		70389	2.93	3.57	1.55	92.43	46.37	0	2.90
		70436	2.94	3.53	2.00	97.39	8.38	0	0.59
		70360	3.06	1.77	1.93	45.00	0	0	0
		70385	3.08	3.27	1.90	63.65	97.62	7.28	2.49
		70382	3.06	3.21	2.17	–	–	–	–
		70367	2.60	2.89	2.00	53.36	38.52	0	0
		70366	2.69	1.82	1.67	81.53	42.05	0	0
		70310	3.07	1.43	1.45	63.36	40.13	0	3.60
		70355	2.87	2.09	1.64	73.15	46.78	0	6.23
		70309	2.71	2.07	1.55	39.06	0	0	0
		70322	2.80	1.64	1.64	51.78	16.04	2.61	0
		70323	2.07	1.77	0	–	–	–	–
		70313	2.88	1.92	2.08	45.42	12.50	0	0
		70346	2.50	2.20	1.27	98.35	50.96	3.35	0
70337	2.38	0	1.27	85.58	45.75	5.93	0		
70345	2.30	1.36	2.44	–	–	–	–		
70338	2.07	0	1.33	2.34	14.89	0	0		
70330	3.07	1.50	1.50	10.58	3.42	0	0		
70324	2.78	1.15	1.62	68.22	34.35	0	8.45		
70350	2.31	1.64	1.55	70.06	40.81	0	2.50		
70329	3.00	1.57	2.00	98.20	48.47	0	1.19		
70328	3.00	1.67	1.45	29.26	17.38	0	0		

(待续)



(续表 2)

		70327	2.80	1.40	1.25	–	–	–	–
		70377	2.93	2.00	0	–	–	–	–
		70394	2.30	3.27	1.78	–	–	–	–
		70396	2.65	3.91	1.45	–	–	–	–
		70372	3.53	3.50	0	–	–	–	–
		70395	2.58	3.38	1.67	–	–	–	–
		70371	3.06	3.73	1.33	65.51	19.25	3.21	0
		70370	2.83	3.08	1.40	63.54	33.67	1.81	5.39
		70387	3.25	3.00	1.89	42.00	36.61	0	0
		70351	2.11	1.50	1.50	90.01	31.25	3.39	2.71
		70386	3.00	2.94	1.70	96.93	54.17	2.48	0
		70352	3.20	2.00	1.67	69.20	26.08	0	6.78
		70411	2.93	1.15	1.46	78.22	45.74	0	6.65
		70362	3.08	2.00	1.42	94.57	49.55	0	0.29
		70343	1.69	1.46	1.40	–	–	–	–
	<i>Marinobacter</i> (2)	70398	2.16	1.80	0	–	–	–	–
		70407	1.88	1.55	0	–	–	–	–
	<i>Sulfitobacter</i> (8)	70419	2.49	1.31	0	–	–	–	–
		70402	4.37	0	0	–	–	–	–
		70418	1.55	2.16	0	–	–	–	–
		70415	1.84	2.33	0	–	–	–	–
		70426	1.77	1.91	0	–	–	–	–
		70425	2.83	1.78	0	–	–	–	–
		70405	1.59	0	0	–	–	–	–
		70421	0	3.14	0	–	–	–	–
	<i>Vibrio</i> (1)	70392	2.60	0	0	–	–	–	–
Actinobacteria (1)	<i>Nesterenkonia</i> (1)	70427	2.86	0	0	–	–	–	–
Firmicutes (1)	<i>Chryseomicrobium</i> (1)	70428	1.40	5.57	0	33.90	0	0	0

<sup>a</sup>H/C ratio: the ratio of the hydrolytic zone diameter versus the colony diameter of a colony on the plate. <sup>b</sup>Inhibition ratio: the result of control activity minus the relative activity of a sample with an inhibitor.

### 3 讨论

产蛋白酶细菌是海洋有机氮降解的主要参与者, 在氮循环过程中起着重要作用<sup>[16,18]</sup>, 产蛋白酶的海洋细菌具有耐盐、耐压、耐酸碱、耐高低温等特性, 是具有多种抗逆能力菌株和基因的重要来源<sup>[19]</sup>。然而对于海洋沉积物中产蛋白酶细菌多样性及其胞外蛋白酶的多样性的研究尚少。本研究从北黄海沉积物 5 个样品中获得 66 株产蛋白酶细菌, 并通过对其 16S rRNA 基因的系统发育分

析, 揭示了其多样性; 并通过测定其蛋白酶酶活抑制实验和对不同底物的水解实验, 分析了其胞外蛋白酶多样性。

本研究筛选到的 66 株菌属于 4 个门的 7 个属, 包括 Bacteroidetes 的 *Salegentibacter*, Proteobacteria 的 *Pseudoalteromonas*、*Marinobacter*、*Sulfitobacter*、*Vibrio*, Actinobacteria 的 *Nesterenkonia* 和 Firmicutes 的 *Chryseomicrobium*。其中 *Pseudoalteromonas* (69.9%)、*Sulfitobacter* (12.1%) 和 *Salegentibacter* (10.6%) 是优势菌群。国内外同行的研究表明

Proteobacteria 特别是 Gammaproteobacteria 细菌是亚南极地区乔治王岛、中国南海、胶州湾沉积物中产蛋白酶细菌的优势菌, *Pseudoalteromonas* 菌株广泛分布于这些样点, 而且也是中国南海沉积物中的优势菌群<sup>[6-8]</sup>。*Marinobacter* 菌株是中国南海沉积物样品中产蛋白酶细菌的一员<sup>[6]</sup>。*Vibrio* 菌株在中国南海、胶州湾沉积物中也被分离得到<sup>[6,8]</sup>。而本研究发现的属于 *Sulfitobacter* 菌株、*Nesterenkonia* 菌株、*Chryseomicrobium* 菌株和 *Salegentibacter* 菌株有产蛋白酶活性, 之前都未见报道。分离自北黄海的产蛋白酶细菌多样性在门水平上与之前在阿根廷、中国南海、南极乔治王岛、中国胶州湾相当, 但在属水平上少, 如这些样点分离到的 *Shewanella*、*Colwellia*、*Planococcus*、*Alteromonas*、*Marinohacter*、*Idiomarina*、*Halomoms*、*Rheinheimera*、*Asinibacterium*、*Photobacterium*、*Bacillus*、*Halobacillus*、*Microbulbifer*、*Psychrobacter* 等属的菌株在本研究中都未分离到<sup>[5-8]</sup>, 这可能与样点分布及样品分离时挑菌等主观因素造成, 其基本可以代表该海域沉积物中产蛋白酶细菌多样性, 但由于分离方法局限性不能代表所有细菌的多样性。新分离的这些菌中属于 *Sulfitobacter*、*Nesterenkonia*、*Chryseomicrobium*、*Salegentibacter* 的菌株, 拥有产蛋白酶特性, 为本文首次报道, 其中 *Salegentibacter* 的 7 株菌均对 3 种蛋白有较强的水解能力, 特别是菌株 70397 的水解能力最强, 其在酪蛋白平板上  $H/C \geq 6.75$ ; 70399 对明胶水解能力最强, 其  $H/C \geq 7.20$ 。70420 对弹性蛋白的水解能力最强, 其  $H/C \geq 4.33$ 。此外, 该属菌株产生的胞外蛋白酶活性较高, 酶活值 33–72 IU。这些新分离到的菌株对于开发海洋功能性微生物资源具有一定的借鉴作用。

虽然各个样点菌株类群有所差异(图 2), 但未

发现细菌多样性和 OrgC、OrgN 含量或者 C/N 之间有明显的相关性, 这与之前报道一致<sup>[6,8]</sup>。北黄海是中国传统渔业捕鱼场所, 而且有大量的海水水产养殖兴起, 有多种水生动物如海参、对虾、鱼等养殖业密集<sup>[20]</sup>, *Pseudoalteromonas* 菌株与水产动物能发生互作<sup>[21]</sup>, 此外该类菌还能产生次级代谢产物抑制其他细菌的生长<sup>[22]</sup>, 这可能也是其是优势菌的原因。在水深较深、温度最低的 2 个样点(S1, S4)分离到的 *Pseudoalteromonas* 菌株最多(表 1), 这与水深较深的样点中 *Pseudoalteromonas* 是优势产蛋白酶细菌的报道一致, 与产蛋白酶的 *Pseudoalteromonas* 具有较强的冷适应性相关<sup>[23]</sup>。本研究选取的 5 个样点中, S4 站点分离到的菌在属水平上多样性最为丰富, 这可能与 S4 靠近北黄海深海中心, 受潮海与南黄海物质与能量交换较大<sup>[24]</sup>, 而少受养殖业等人类干预的影响造成 *Pseudoalteromonas* 等菌株的富集有关。

在蛋白酶酶活抑制实验中, 39 株测定菌株的蛋白酶酶活均被 PMSF 抑制, 抑制率为 2.34%–98.35%; 33 株菌的蛋白酶酶活被 OP 抑制, 抑制率为 1.16%–97.62%。除 1 株 PMSF 抑制不显著的菌(抑制率 < 10%, 70338, 抑制率为 2.34%)被 OP 显著抑制。而 3 株被 OP 抑制不显著的菌(抑制率 < 10%, 70403、70436、70330)被 PMSF 显著抑制外, 其余菌株均较显著被 PMSF 和 OP 抑制(表 2)。虽然 E-64 对 10 株菌和 Pepstatin A 对 16 株菌的酶活有抑制作用, 但都仅对 1 株菌有较为明显的抑制作用(抑制率 > 10%)。这表明所有测定的菌株其蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶和/或金属蛋白酶, 仅有少量菌株产的蛋白酶为天冬氨酸蛋白酶或半胱氨酸蛋白酶, 这与之前报道的产蛋白酶细菌胞外蛋白酶多样性结果一致<sup>[6]</sup>。在对所有 66 株菌进行基于酪蛋白、明胶和弹性蛋白的水解实验中,

所有菌株都能在酪蛋白和/或明胶的平板上产生水解圈,这与所有菌株的分离培养基为酪蛋白-明胶培养基一致<sup>[6]</sup>。而仅有 48 株菌能水解弹性蛋白,这与弹性蛋白结构复杂有关,这也与之前报道一致<sup>[6]</sup>。*Pseudoalteromonas* 菌株被认为是深海沉积物中蛋白酶酶活较高的一类菌<sup>[25]</sup>,本研究筛选到的 *Pseudoalteromonas* 菌株亦有较强的水解蛋白的能力。而本研究分离到的菌株 *Salegentibacter* 中 (5/7),对三种蛋白具有更强的水解能力,这些菌代表了本研究蛋白酶酶活最高的菌株。而其余 5 个属 *Marinobacter*、*Sulfitobacter*、*Vibrio*、*Nesterenkonia*、*Chryseomicrobium* 的菌株虽然也有较强水解酪蛋白、明胶的能力,但都不能水解弹性蛋白。因此,*Salegentibacter* 和 *Pseudoalteromonas* 的菌株可能 在北黄海沉积物中的有机氮降解过程中发挥着更为重要的作用。此外,虽然 *Pseudoalteromonas*、*Sulfitobacter* 和 *Salegentibacter* 的不少菌株其 16S rRNA 基因相似性为 100%,它们可能属于同一个种,但菌株间蛋白酶活性及蛋白酶种类有一定的差异(表 2),因此高效菌的选取应以菌株为单位进行筛选。

本研究首次报道了北黄海产蛋白酶细菌及蛋白酶多样性,从北黄海的 5 个站点分离到 66 株产胞外蛋白酶细菌,通过系统发育分析表明,这些细菌属于 4 个门的 7 个属,其中 *Pseudoalteromonas* (69.9%)、*Sulfitobacter* (12.1%)和 *Salegentibacter* (10.6%)是优势菌群。蛋白酶酶活抑制实验表明,所有测定菌株产生的蛋白酶属于丝氨酸和/或金属蛋白酶。对所有菌株进行 3 种底物的水解实验表明,所有菌株能降解酪蛋白和/或明胶,仅 *Pseudoalteromonas* 和 *Salegentibacter* 菌株具有水解弹性蛋白的能力,且 *Salegentibacter* 菌株对 3 种底物具有更强的蛋白水解能力。本研究筛选到的

*Sulfitobacter*、*Nesterenkonia*、*Chryseomicrobium*、*Salegentibacter* 为首次报道的胞外蛋白酶产生菌,为海洋产蛋白细菌及新蛋白酶的挖掘提供了新的产蛋白酶细菌及基因资源。

## 参 考 文 献

- [1] Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 597–635.
- [2] Ni YQ, Gu YL, Shi XW, Zheng XJ, Han L, Zhou H, Cheng GD. Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacteria producing protease from sediments of the bottom layer of the Glacier No.1 in the Tianshan Mountains. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(2): 164–172. (in Chinese)  
倪永清, 顾燕玲, 史学伟, 郑晓吉, 韩亮, 周红, 程国栋. 天山一号冰川底部沉积层产蛋白酶耐低温菌株的筛选及其系统发育. *微生物学报*, 2013, 53(2): 164–172.
- [3] Gupta R, Beg Q, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(1): 15–32.
- [4] Chen MX, Li HY, Chen WW, Diao WC, Liu CZ, Yuan M, Li XH. Isolation, identification and characterization of 68 protease-producing bacterial strains from the Arctic. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(7): 702–709. (in Chinese)  
陈明霞, 李和阳, 陈维维, 刁伟程, 刘承忠, 袁敏, 李晓虹. 68 株北极产蛋白酶菌株的筛选、鉴定以及部分酶学性质. *微生物学报*, 2013, 53(7): 702–709.
- [5] Olivera NL, Sequeiros C, Nievas ML. Diversity and enzyme properties of protease-producing bacteria isolated from sub-Antarctic sediments of Isla de Los Estados, Argentina. *Extremophiles*, 2007, 11(3): 517–526.
- [6] Zhou MY, Chen XL, Zhao HL, Dang HY, Luan XW, Zhang XY, He HL, Zhou BC, Zhang YZ. Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South China Sea. *Microbial Ecology*, 2009, 58(3): 582–590.
- [7] Zhou MY, Wang GL, Li D, Zhao DL, Qin QL, Chen XL, Chen B, Zhou BC, Zhang XY, Zhang YZ. Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and bacterial extracellular proteases in the coastal sediments of King George Island, Antarctica. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e79668.
- [8] Zhang XY, Han XX, Chen XL, Dang HY, Xie BB, Qin QL, Shi M, Zhou BC, Zhang YZ. Diversity of cultivable

- protease-producing bacteria in sediments of Jiaozhou Bay, China. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1021.
- [9] Du JT, Chen HT, Tian L. Heavy metals in the surface sediments of the north yellow sea and its ecological risk. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(S1): 167–172, 178. (in Chinese)  
杜俊涛, 陈洪涛, 田琳. 北黄海表层沉积物中重金属含量及其污染评价. 中国海洋大学学报, 2010, 40(S1): 167–172, 178.
- [10] Li SY, Miao FM, Liu GX. The distribution and environmental background values of the heavy metals in the sediment of the North Huanghai Sea. *Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas*, 1994, 12(3): 20–24. (in Chinese)  
李淑媛, 苗丰民, 刘国贤. 北黄海沉积物中重金属分布及环境背景值. 黄渤海海洋, 1994, 12(3): 20–24.
- [11] Zhou MY. Microbial and extracellular proteases diversity and organic nitrogen degradation mechanism in sediments of the South China Sea and Fildes Peninsula, Antarctic. Doctor Dissertation of Shandong University, 2013. (in Chinese)  
周明扬. 中国南海和南极菲尔德斯半岛海域沉积物中微生物、蛋白酶的多样性及有机氮的降解机制. 山东大学博士学位论文, 2013.
- [12] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*, 1992, 24(12): 104–108.
- [13] Li Y, Li XY, Liu YJ, Wang ET, Ren CG, Liu W, Xu HL, Wu HL, Jiang N, Li YZ, Zhang XL, Xie ZH. Genetic diversity and community structure of rhizobia nodulating *Sesbania cannabina* in saline-alkaline soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 2016, 39(3): 195–202.
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [16] Chen XL, Zhang YZ, Gao PJ, Luan XW. Two different proteases produced by a deep-sea psychrotrophic bacterial strain, *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Marine Biology*, 2003, 143(5): 989–993.
- [17] Chen DF, Huang YY, Yuan XL, Cathles III LM. Seep carbonates and preserved methane oxidizing archaea and sulfate reducing bacteria fossils suggest recent gas venting on the seafloor in the Northeastern South China Sea. *Marine and Petroleum Geology*, 2005, 22(5): 613–621.
- [18] Zhao HL, Chen XL, Xie BB, Zhou MY, Gao X, Zhang XY, Zhou BC, Weiss AS, Zhang YZ. Elastolytic mechanism of a novel M23 metalloprotease pseudoalterin from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. CF6-2: cleaving not only glycol bonds in the hydrophobic regions but also peptide bonds in the hydrophilic regions involved in cross-linking. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(47): 39710–39720.
- [19] Qu J, Liu KH, Ding XW, Deng BW, Chen WQ, Guo QL, Tian XP, Zhang S, Li WJ. Fungal diversity and enzyme activities in marine sediments in the South China Sea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(5): 552–562. (in Chinese)  
曲佳, 刘开辉, 丁小维, 邓百万, 陈文强, 郭庆兰, 田新朋, 张偲, 李文均. 南海局部海洋沉积物中真菌多样性及产酶活性. 微生物学报, 2014, 54(5): 552–562.
- [20] Choi CY, Battley PF, Potter MA, Rogers KG, Ma ZJ. The importance of Yalu Jiang coastal wetland in the North Yellow Sea to Bar-tailed Godwits *Limosa lapponica* and Great Knots *Calidris tenuirostris* during northward migration. *Bird Conservation International*, 2015, 25(1): 53–70.
- [21] Ma YX, Sun FX, Zhang CY, Bao PY, Cao SQ, Zhang MY. Effects of *Pseudoalteromonas* sp. BC228 on digestive enzyme activity and immune response of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Ocean University of China*, 2014, 13(6): 1061–1066.
- [22] Romoli R, Papaleo MC, De Pascale D, Tutino ML, Michaud L, LoGiudice A, Fani R, Bartolucci G. GC-MS volatilomic approach to study the antimicrobial activity of the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. TB41. *Metabolomics*, 2014, 10(1): 42–51.
- [23] Yu ZC, Zhao DL, Ran LY, Mi ZH, Wu ZY, Pang XH, Zhang XY, Su HN, Shi M, Song XY, Xie BB, Qin QL, Zhou BC, Chen XL, Zhang YZ. Development of a genetic system for the deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 13.
- [24] Lü XX, Song JM, Li XG, Yuan HM, Zhan TR, Li N, Gao XL. Geochemical characteristics and early diagenesis of nitrogen in the northern Yellow Sea sediments. *Acta Geologica Sinica*, 2005, 79(1): 114–123. (in Chinese)  
吕晓霞, 宋金明, 李学刚, 袁华茂, 詹天荣, 李宁, 高学鲁. 北黄海沉积物中氮的地球化学特征及其早期成岩作用. 地质学报, 2005, 79(1): 114–123.
- [25] Xiong HR, Song LS, 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.

# Cultivable protease-producing bacteria in the sediments of North Yellow Sea

Chaoya Wu<sup>1,2</sup>, Yan Li<sup>2</sup>, Huimin Qu<sup>2,3</sup>, Zhenpeng Zhang<sup>2</sup>, Zhihong Xie<sup>2\*</sup>, Xiangang Meng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

<sup>2</sup> Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

<sup>3</sup> School of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, Shandong Province, China

**Abstract:** **[Objective]** To uncover the diversity of extracellular protease-producing bacteria and to expand our knowledge on protease-producing bacteria in the sediments of North Yellow Sea, and to screen efficient protease production strains that might provide flora resources for mining marine protease-producing microorganisms. **[Methods]** Protease-producing bacteria were isolated by using casein gelatin plate from 5 sediment samples of the North Yellow Sea. The bacteria diversity was evaluated through phylogenetic analyses based on 16S rRNA genes. The protease diversity was evaluated through the inhibition tests for 39 strains with higher enzymatic activities by using 4 inhibitors: phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF, serine protease inhibitor), 1,10-phenanthroline (O-P, metalloproteinase inhibitor), E-64 (cysteine protease inhibitor) and pepstatin A (aspartic protease inhibitor). Furthermore, degradation abilities for different protein substrates such as casein, gelatin and elastin were evaluated through observing hydrolytic zones. **[Results]** A total of 66 protease-producing strains were isolated from 5 sediment samples. These isolates were classified into 7 genera of 4 phyla including Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes, with *Pseudoalteromonas* (69.9%), *Sulfitobacter* (12.1%) and *Salegentibacter* (10.6%) as the dominant. The richness of the cultivable protease-producing bacteria reached 10<sup>4</sup> cells/g in all sediment samples. The inhibition tests indicated that all the tested strains produced serine protease and/or metal protease, only a few strains produced cysteine protease or aspartic protease. **[Conclusion]** The cultivable protease-producing bacteria in the North Yellow Sea are diverse with *Pseudoalteromonas*, *Sulfitobacter* and *Salegentibacter* bacteria as the dominant groups and the extracellular proteases belong to serine proteases and/or metalloproteinases.

**Keywords:** marine sediment, protease-producing bacteria, diversity, serine protease, North Yellow Sea

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA11020403) and by the Shandong Independent Innovation and Achievement Transformation Program (2014ZZCX07303)

\*Corresponding author. Xiangang Meng, Tel: +86-931-4956524, E-mail: mengxg@mail.lzjtu.cn; Zhihong Xie, Tel: +86-535-2109183, E-mail: zhxie@yic.ac.cn

Received: 2 November 2016; Revised: 1 April 2017; Published online: 14 April 2017