

## 新的产弹性蛋白酶菌株的筛选与鉴定

刘双发 安德荣\* 苟丽霞 李娜

(西北农林科技大学植保学院与陕西省农业分子生物学重点实验室 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 本研究从秸秆中分离得到一株弹性蛋白酶高产菌, 并对该菌株进行鉴定, 以期为实现其工业化生产提供理论依据。采用酪蛋白(脱脂奶粉)进行初筛后, 以弹性蛋白(牛筋)进行复筛, 并对筛选结果进行检验, 然后对所得菌株结合形态、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列进行分类鉴定, 得到一株弹性蛋白酶高产菌株 LSF-97。结果显示, 菌株 LSF-97 与短小芽孢杆菌同源率达到 100%, 形态及生理生化特征与模式菌也显示高度一致性, 故将其确定为短小芽孢杆菌。

**关键词:** 芽孢杆菌, 蛋白酶, 筛选, 鉴定

## Screening and Identification of a New Elastase-producing Strain

LIU Shuang-Fa AN De-Rong\* GOU Li-Xia LI Na

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The study provide a theoretical basis for the industrial production of a elastase-high-yield strain which was isolated from the straw, and the selected strain was identified. The screening strategy included casein (skim milk) plate selecting and elastin (beef tendon) re-screening. And then, the morphological, physiological and biochemical characteristics as well as 16S rRNA sequence homology of the selected strain were studied. Finally, the strain LSF-97 which had a excellent decomposing ability to beef tendon was obtained. The results showed that the strain LSF-97 is relative to the *Bacillus pumilus* with 100 % similar in sequence under the phylogenetic tree, the morphological and physiological and biochemical characteristics are also consistent with pattern of bacteria. So it was identified as *Bacillus pumilus*.

**Keywords:** *Bacillus*, Elastase, Screening, Identification

弹性蛋白酶(Elastase)是一种以水解不溶性弹性蛋白为特征的广谱性蛋白水解酶。自从 1949 年发现以来<sup>[1]</sup>, 各国科学家对其的研究便表现得十分活跃, 从最初的酶源和纯化研究到现今的分子遗传机理的探索, 研究水平越来越深入, 很大程度上拓宽了其应用领域。目前, 弹性蛋白酶在医药、

食品、农业、轻工业、服装加工、环保和生物技术等领域被广泛运用<sup>[2-6]</sup>, 并具有极大的开发潜力和商业价值。在我国, 弹性蛋白酶的生产还主要是从猪胰脏中提取, 受到脏器资源不足、提取工艺复杂等因素的限制, 不利于酶制剂的可持续性发展, 而国外通过微生物发酵生产已取得了巨大的经济效

益<sup>[7]</sup>。另外,微生物生产弹性蛋白酶技术的开发还存在产物活性不高、性质差异大、基因工程菌不稳定等问题的制约,而筛选出弹性蛋白酶的高产菌株是解决诸多问题的关键所在。从自然中直接去筛选稳定高产菌株无疑是最为直接和行之有效的方法。本研究从秸秆中筛选到一株高产弹性蛋白酶的芽孢杆菌,并利用 16S rRNA 对其进行分类鉴定,旨在提供一株高产蛋白酶出发菌株,并对其发酵条件和酶学性质做进一步的探讨,为实现其工业化生产提供指导和理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株:**分离自杨凌农业高新开发区农场的稻秆和麦秆。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**脱脂奶粉、牛筋、弹性蛋白(购自 Sigma 公司)、旋转式振荡摇床、超净工作台、电热恒温水浴锅、电子分析天平(北京赛多利斯天平公司)、恒温培养箱(上海博迅实业有限公司)、普通光学显微镜(Olympus)、分光光度计(Bachem)、高蒸汽灭菌锅(Tomy SX-500)、PCR 仪(Bio-Rad)、台式高速离心机(Hermle Z160)。

### 1.2 培养基

**1.2.1 斜面培养基(% , W/V):**蛋白胨 1.0, 酵母浸膏 0.5, NaCl 1.0, 琼脂 2.0, pH 7.0。

**1.2.2 初筛培养基(% , W/V):**脱脂奶粉 2.5, 酵母膏 0.1, 葡萄糖 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, 琼脂 2.0, pH 7.0。

**1.2.3 复筛培养基(% , W/V):**牛筋 2.5, 酵母膏 0.2, 葡萄糖 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, pH 自然。

**1.2.4 种子培养基(% , W/V):**葡萄糖 1.0 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub> 0.01, pH 自然。

**1.2.5 基础发酵培养基(% , W/V):**干酪素 2.5, 酵母膏 0.2, 葡萄糖 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, pH 8.0。

### 1.3 培养方 法

**1.3.1 斜面培养:**将菌株接种于固体斜面,置于 38°C 恒温箱中培养 18 h~24 h 后于 4°C 冰箱中保存备用。

**1.3.2 平板初筛培养:**将菌株接种于初筛培养基,置于 38°C 恒温箱中培养 32 h。

**1.3.3 种子培养:**将菌株在无菌条件下接种于 80 mL 种子培养基中,170 r/min、38°C 摇瓶培养 18 h~24 h。

**1.3.4 发酵及复筛培养:**在装有液体培养基 80 mL

的 250 mL 三角瓶中,按 5%接种量接种种子培养液后,在旋转式摇床上 38°C、170 r/min 培养 48 h。

### 1.4 实验方 法

**1.4.1 初筛:**取样品少许剪碎,放入 250 mL 三角瓶中铺满底部,加蒸馏水浸过样品,装量不超过三角瓶容量的 1/2,加少量石灰,塞好棉塞,煮沸 10 min,自然冷却后放置到 37°C 培养 48 h,待液面出现白色菌膜后,取该培养液在平板培养基上涂布稀释和划线,38°C 培养 24 h。通过染色法观察菌体及芽孢进行镜检。然后将形成的单菌落点接于初筛平板培养基上,38°C 培养 32 h,测量并计算水解圈与菌落直径比值(HC 值)。

**1.4.2 复筛:**将初筛所得菌株进行摇瓶复筛,以表观判断其产酶活性。将初筛得斜面菌种移接于种子液体培养基,38°C 培养 18 h~24 h 后按 5%的接种量接种于 80 mL 牛筋复筛培养基,培养 48 h 后观察比较。

**1.4.3 检验:**将初筛所得菌株进行摇瓶复筛,测酶活后与牛筋复筛结果比较,检验复筛结果可靠性。将初筛得斜面菌种移接于种子液体培养基,38°C 培养 18 h~24 h 后按 5%的接种量接种于 80 mL 基础发酵培养基,培养 48 h 后测酶活。

**1.4.4 酶活稳定性试验:**采用基础发酵培养基对最佳菌株进行发酵培养试验,连续 5 次,每次 3 个平行。测酶活,检测其产酶稳定性。

**1.4.5 高产菌株的鉴定:**1) 菌体形态及生理生化特征。观察所筛菌株菌落特征,扫描电镜观察其菌体形态,革兰氏染色以及生理生化反应参照东秀珠《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[8]</sup>进行。

2) 16S rRNA 遗传学鉴定。(1) 细菌总 DNA 的提取:将菌种稀释涂布于 LB 平板培养,24 h 后挑取单菌落少许至 100 μL 双蒸水中,煮沸 8 min 后 12000 r/min 离心 3 min,取上清液稀释 10 倍和 100 倍。

(2) 16S rRNA 序列扩增与回收:PCR 反应体系(25 μL)为:2.0 μL Primer (10 μmol/L) (5'-AGAGTT TGATCMTGGCTCAG-3'), 2.0 μL Primer (10 μmol/L) (5'-GGCGGTGTGTACAAG-3'), 2.5 μL 10×buffer、2.0 μL MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)、0.5 μL dNTPs(2.5 mmol/L)、0.5 μL *Taq* DNA 酶(5 U/μL)、13.5 μL ddH<sub>2</sub>O、2 μL 模板 DNA。反应程序为:94°C 4 min; 94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 3 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物用 0.7%的琼脂糖凝胶进行电泳分析,然后进行 1.0%的琼脂糖凝胶电泳,切割目标条带,采用 DNA 凝胶回收试剂盒(购自西安沃尔森生物工程公司)回收纯化。

(3) 16S rRNA 序列分析: 将纯化的 PCR 产物回收后送上海生工生物工程公司测序, 测序结果通过 Blast 在 NCBI+EMBL+DDBJ+PDB 基因库中进行同源性比较, 构建系统发育树。

**1.4.6 蛋白酶活力测定方法:** 采用 Sacher 方法<sup>[9]</sup>并参照中国现行药用弹性蛋白酶测定方法进行。该法以与染料偶联的不溶性底物经酶作用而溶解至水相, 反应上清液的光密度反映底物被消化的程度。称取 10 mg 地衣红-弹性蛋白溶于 1 mL 水中, 加 2 mL pH 值 7.4、0.2 mol/L 硼酸缓冲液, 取 1 mL 适当稀释酶液于 38°C 振荡反应 20 min, 加入 pH 值 6.0、0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液 2 mL 终止反应, 离心过滤后取上清液测 495 nm 光密度, 以不加酶液和底物的反应系统为空白对照。在此反应条件下溶解 1 mg 地衣红-弹性蛋白底物所需的酶量定义为 1 个弹性蛋白酶活性单位(U)。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选

通过对所采集的样品煮沸处理后进行增殖培养, 再以涂布稀释法得到单菌落, 镜检后挑取菌落点接于初筛培养基上, 共得到具有产蛋白酶能力的菌株 114 株(见表 1), 选取 HC 值大于 1.5 的菌株进行摇瓶复筛, 发现实验室编号 LSF-63 号和 LSF-97 号中牛筋完全被分解, 无沉淀出现, 颜色由最初的无色透明变成褐色透明, 分解效果最佳且稳定(见图 1), 然后选取从进行复筛的菌株中选取 10 株(包括 63 和 97)进行酶活检验(结果见表 2), 复筛结果与酶活检测结果显示一致性。选取 97 号作为下一步研究菌株。采用基础发酵培养基对其进行产酶稳定性试验, 传代 5 次。由表 3 可知, 该菌株产酶稳定且最高酶活可高达 88.3 U/mL。

### 2.2 菌株鉴定

**2.2.1 菌株形态特征:** 菌株 LSF-97 在 LB 培养基上菌落形态为圆形或近圆形, 乳白色不透明, 湿润粘稠, 边缘不平滑, 2 d 后中央有皱褶, 无色素产生,



图 1 菌株 LSF-97 对牛筋的水解作用

Fig. 1 The effect on hydrolyzing beef tendon by LSF-97 strain

表 2 初、复筛结果的检验  
Table 2 Check of the elementary screening and re-screening

菌株 Strain	水解圈与菌落 直径的比值 HC	牛筋分解指数 Beef tendon decomposition index	酶活 Enzyme activity (U/mL)
LSF-113	2.82	***	43.22
LSF-103	3.15	***	52.16
LSF-97	3.42	****	83.41
LSF-90	4.82	*	13.81
LSF-63	3.43	****	81.24
LSF-56	2.41	***	37.45
LSF-42	2.98	***	43.70
LSF-28	3.20	***	54.02
LSF-25	3.06	***	52.64
LSF-14	2.35	**	40.17

注: \*: 牛筋部分水解, 发酵液液体澄清; \*\*: 牛筋大部分分解, 发酵液液浑浊; \*\*\*: 牛筋全部被水解, 瓶底出现白色粘状物, 发酵液呈乳黄色; \*\*\*\*: 牛筋全部被水解, 瓶底无任何杂质, 发酵液呈褐色透明。

Note: \*: The beef tendon was partially hydrolyzed and the fermentation broth was clarified; \*\*: The beef tendon was mostly hydrolyzed and the fermentation broth was turbid; \*\*\*: All of the beef tendon was hydrolyzed and the fermentation broth was turbid and ivory, moreover some white slimy precipitate appeared in the bottom; \*\*\*\*: All of the beef tendon was hydrolyzed and the fermentation broth was transparent and brown, moreover no impurity was found in the bottom.

表 1 产弹性蛋白酶初筛结果  
Table 1 Elementary screening of elastase-producing strains

HC	菌株数 Number of strain
4.0	1
3.0~4.0	13
2.0~3.0	20
1.5~2.0	39
1.0~1.5	27
1.0	14

表 3 菌株 LSF-97 发酵稳定性试验  
Table 3 Fermentation stability test of LSF-97 strain

批次 Serial	1	2	3	4	5
酶活 Enzyme activity (U/mL)	88.3	84.0	87.6	85.8	87.2

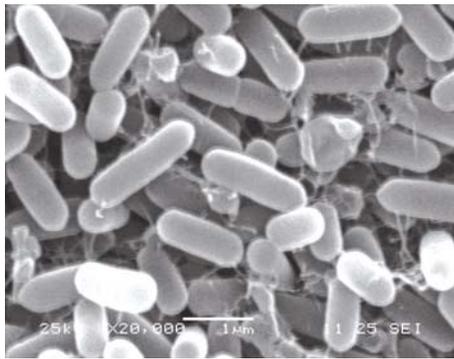


图2 菌株 LSF-97 扫描电镜图

Fig. 2 The SEM photograph of LSF-97 strain

中生或端生芽孢。SEM 观察显示(图 2)菌体大小为  $(0.5\sim 0.6)\ \mu\text{m} \times (1.5\sim 2.0)\ \mu\text{m}$ , 杆状, 表面粗糙无鞭毛, 其两端钝圆, 单个或少见两个排列。

**2.2.2 生理生化特征:** 参照东秀珠《常见细菌系统鉴定手册》及韦革宏《微生物实验指导》中所述实验方法进行生理生化鉴定, 结果见表 4。

**2.2.3 16S rRNA 遗传鉴定:** 以菌株 LSF-97 的总 DNA 为模板, 采用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增, 检验得到一条 1400 bp 的条带(见图 3), 具有典型的 16S rRNA 特征, 切胶回收纯化后送上海生工生物工程公司测序, 得到菌株 LSF-97 的 16S rRNA 序列(GenBank 登录号 FJ561053), 将序列在 NCBI 上进行同源性比较, 结果显示同源性较高的菌株为 *Bacillus* sp., 同源性为 98%~100%。采用 Clustal X 和 Paup 软件以最大简约法(Maximum parsimony, MP)对菌株的 16S rRNA 进行系统发育分析, 结果如图 4 所示。由于细菌分类学家认为当 16S rRNA 序列同源性高于 97%时, 可以认为是属内的同种, 低于 95%则可以认为是属外成员。综合其形态与生理生化特征, 将菌株 LSF-97 鉴定为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。

### 3 讨论

在初筛过程中对脱脂奶粉(酪蛋白)具有极好分解能力的菌株 LSF-90, 在牛筋(弹性蛋白)复筛中却表现为几乎无分解能力, 这可能是菌株分泌的蛋白酶的专一性所致, 因此笔者认为有些学者在筛选弹性蛋白酶过程中, 测酶活时选取酪蛋白为底物的方法并不可取。此外, 对菌株 LSF-97 进行复筛和发酵培养后, 发酵液呈现褐色, 可能是发酵产物中产生过多的氨态氮的缘故。因为笔者在将氮源分别设为

表 4 菌株 LSF-97 的生理生化特征实验结果  
Table 4 Results of the physiological and biochemical characteristics of LSF-97 strain

试验项目	Test items	LSF-97
淀粉水解试验	Starch hydrolysis test	-
分解酪素试验	Casein decomposition test	+
硝酸盐还原	Nitrate reduction	+
明胶液化试验	Gelation liquefaction test	+
10% NaCl 生长试验	Growth on culture medium with 10% NaCl	+
接触酶	Catalase test	+
V-P 测定	V-P test	+
甲基红实验	M.R test	+
革兰氏染色	Gram staining	+
柠檬酸盐利用	Citrate utilization test	+
丙二酸盐利用	Malonate utilization test	-
吲哚反应	Indole test	-
D-葡萄糖	D-glucose	+
L-阿拉伯糖	L-arabinose	+
D-甘露醇	D-mannitol	+

Note: +: Positive, growth or acidogenic; -: Negative, not growth or not acidogenic.

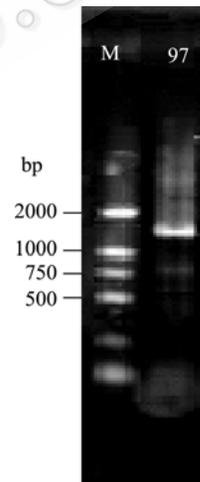


图3 LSF-97 的 16S rRNA 的 PCR 产物电泳图

Fig. 3 LSF-97 PCR electrophoresis production by 16S rRNA

Note: M: Marker; 97: LSF-97.

硝态和氨态进行研究时, 前者色泽未见变化, 而后者则明显呈现浅褐色, 对于其形成机理和调控机制以及与发酵过程的关系则有待进一步研究。

弹性蛋白酶是一种应用价值和经济价值很高的蛋白酶种, 目前在国内该酶主要是从动物脏器中提取, 资源受限制, 且成本高产量少, 限制了该酶的广泛应用。本研究从秸秆中经脱脂奶粉初筛和牛筋复筛得到一株弹性蛋白酶的高产菌株 LSF-97, 并利用传统鉴定方法与现代分子生物学技术相结合, 运用形态与生理生化特征, 以及 16S rRNA 技术手段,

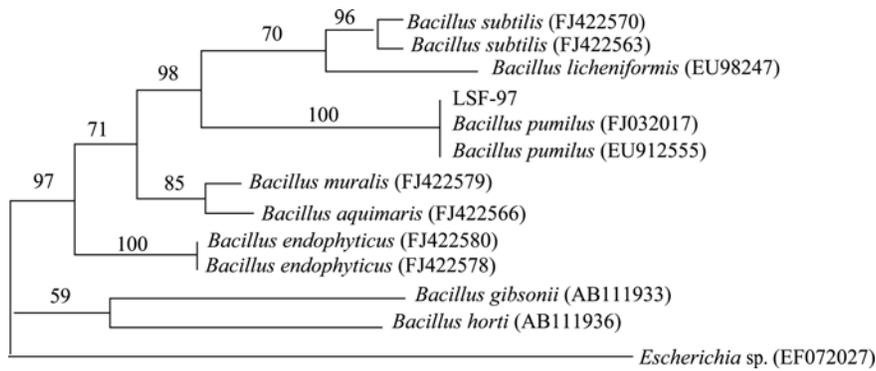


图 4 基于 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence

注: 种属名后括号内的数字为 GenBank 的登录号, 分支上的树值为自举置信水平(BCL)值<sup>[10]</sup>.

Note: The numbers behind the species denote the sequences' accession number in GenBank. The numbers at branch nodes represents the values of bootstrap confidence level (BCL)<sup>[10]</sup>.

对菌株进行了综合鉴定。陈启和<sup>[11]</sup>等从肉联厂和屠宰场附近的土壤和污水中所筛选到的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. EL3), 经 3 次分离后酶活达 100 U/mL, 方尚玲<sup>[12]</sup>从污水河的土壤中筛选到弹性蛋白酶产生菌 (*Bacillus subtilis* B1), 其初酶活达 74 U/mL 左右。李洪军<sup>[13]</sup>从新鲜牛肚中分离出铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas* ssp. SWU), 其初酶活达 10 U/mL 左右。本实验所得菌株 (*Bacillus pumilus* LSF-97) 的初酶活可高达 88 U/mL, 该菌株一定程度上具有作为工程菌的潜能, 下一步我们将通过诱变及基因工程技术对其进行改良, 对其产弹性蛋白酶的分离纯化和发酵条件也会作进一步的探索研究, 为实现弹性蛋白酶的工业化生产提供可能。

## 参 考 文 献

- [1] Banga I. Isolation and crytallization of elastase from the pancreas of cattle. *Acta Physiol Sci Hung*, 1952, **3**: 317-324.
- [2] Takagi H, Kondou M, Hisatsuka, T, *et al*. Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *J Agric Food Chem*, 1992, **40**(12): 2364-2368.
- [3] Considine T, Healy A, Kelly AL, *et al*. Proteolytic specificity of elastase on bovine s1-casein. *Food Chemistry*, 2000, **69**(1): 19-26.
- [4] Considine T, Healy A, Kelly AL, *et al*. Proteolytic specificity of elastase on bovine  $\beta$ -casein. *Food Chemistry*, 1999, **66**(4): 463-470.
- [5] 郭本恒. 功能乳制品. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [6] Rose SD, Kruse F, Swift GH, *et al*. A single element of the elastase I enhancer is sufficient to direct transcription selectively to the pancreas and gut. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, **14**(3): 2048-2057.
- [7] 颜子颖, 吴国雄. 微生物产弹性蛋白酶研究进展. *微生物学通报*, 1991, **6**: 38-41.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.349-398.
- [9] Sachar LA, Wintter KK, Sicher N, *et al*. Photometric method for estimation of elastase activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1955, **90**(2): 323-326.
- [10] 海 萨, 李家乐, 冯建彬, 等. 基于多变量形态度量学和线粒体 Cyt b 序列的鲈属鱼类分类探讨. *动物学研究*, 2008, **29**(2): 113-120.
- [11] 陈启和, 何国庆, 邬应龙. 弹性蛋白酶产生菌的筛选及其发酵条件的初步研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2003, **29**(1): 59-64.
- [12] 方尚玲, 吉 园. 弹性蛋白酶产生菌的分离鉴定及发酵条件研究. *食品科学*, 2007, **28**(11): 306-309.
- [13] 李洪军, 贺稚非, 陈宗道, 等. 假单胞菌 SWU-M 生产弹性蛋白酶发酵条件的研究. *中国食品学报*, 2004, **4**(4): 29-33.