文章编号:1673-1689(2007)06-0074-07

一株产低温碱性蛋白酶海洋细菌 *Pseudoalteromonas flavipulchra* HH407 的筛选与生长特性

李 丹[1,2]， 陈 丽[3]， 李富超[4]， 王淑军[3]， 李华钟[1,2]

(1. 江南大学 医药学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 3. 淮海工学院 海洋学院,江苏 连云港 222005; 4. 中国科学院 海洋研究所,山东 青岛 266071)

摘 要: 对从连云港海域筛选的一株产低温碱性蛋白酶的海洋适冷菌 HH407 进行的鉴定和生长特性研究结果表明,该菌为革兰氏阴性杆菌,好氧,端生鞭毛,无芽孢及荚膜,大小为 0.4～0.7 μm ×1.0－1.8 μm,在酪蛋白培养基的菌落特征为椭圆金黄色、光滑、半透明、四周隆起。根据其生理生化性质、16S rDNA 同源性和系统进化树分析初步鉴定该菌属于 *Pseudoalteromonas flavipulchra*。该菌的生长温度范围为 0～40 ℃,最适生长温度为 20 ℃;pH 范围为 5.5～11.0,最适生长 pH 值为 8.5;NaCl 质量浓度范围为 0.5～13 g/dL,最适生长 NaCl 质量浓度为 4 g/dL,无 NaCl 时不能生长。该菌能较好利用胰蛋白胨、酵母膏和蛋白胨等蛋白质物质,对糖的利用较差。该菌株所产蛋白酶在 pH 10.0 和 35 ℃时表现最高酶活。

关键词: *Pseudoalteromonas flavipulchra*; 低温碱性蛋白酶; 海洋细菌; 筛选

中图分类号:Q 93 **文献标识码**: A

Isolation and Physiological Characterization of a Marine Psychrotroph *Pseudoalteromonas flavipulchra* HH407 Producing Cold-active Alkaline Protease

LI Dan[1,2], CHEN Li[3], LI Fu-chao[4], WANG Shu-Jun[3], LI Hua-zhong[1,2]

(1. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Marine, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 4. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: A strain HH407 which could production cold-active alkaline protease, was isolated from the sea area of Lianyungang. Then, the identification and physiological characterization of the strain HH407 were studied. The results showed that the strain HH407 was gram negative, rod shaped, aerobic, with a single polar flagellum, neither endospore nor capsule formed, about 0.4

收稿日期:2007-06-01.

基金项目:国家 863 计划项目(2006AA02Z153).

作者简介: 李丹(1981-),男,江苏无锡人,微生物学硕士研究生.

通讯作者: 李华钟(1958-),男,山东龙口人,教授,博导,主要从事生物制药和微生物遗传育种研究. Email: hzhli@jiangnan.edu.cn

万方数据

~0.7 μm×1.0~1.8 μm in size. The colony on screening medium were circular, yellow color, smooth, translucent, convex with regular edges. Based on the 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis, as well as the physiological and biochemical tests, the isolate as classified to *Pseudoalteromonas flavipulchra* HH407. The strain was facultative psychrotrophs by the growth condition test with the optimum growth about 20 ℃ and grow at 0~40 ℃. The optimal pH for growth was 8.5 with pH range for growth between pH 5.5 and pH 11. It can grow at a wide range of NaCl concentration of 0.5 ~13 g/dL with the optimal at 4 g/dL, no growth without NaCl. The protease produced by HH407 exhibited the high activity at pH10.0 and 35 ℃, respectively.

Key words: *Pseudoalteromonas flavipulchra*; cold-active alkaline protease; marine bacterium; isolation

目前,深海微生物多样性研究和海洋生物资源开发利用正成为一个热点。深海独特的环境使其产生了适应低温环境的特殊结构与代谢机制,所产的低温酶在应用上比中温酶、高温酶有更大的优势,其有低温下酶活高、催化效率高等特点。低温酶中,蛋白酶具有很大的潜力,特别是在食品加工(啤酒、奶制品)、添加剂(饲料、皮革)和环保(污水处理)等方面,有着广泛的应用前景[1]。

国内外对低温碱性蛋白酶的研究报道较多,其产酶菌株主要为假单胞菌属(*Pseudomonas*)[2]、黄杆菌属(*Flavobacterium*)[3]、气单胞菌属(*Aeromonas*)[4]、希瓦氏菌属(*Shewanella*)[5]、弧菌属(Vibrio)[6]。作者从连云港海域中分离到一株产低温碱性蛋白酶的海洋细菌 HH407,通过其生理生化特性和 16S rDNA 分析,初步鉴定该菌株为 *Pseudoalteromonas flavipulchra*。*Pseudoalteromonas* 为交替假单胞菌属,是一个新分类的海洋细菌属,国内研究才刚刚起步,而 *P. flavipulchra* 是 2002 年报道新分类的种[7],目前尚未见该菌产低温碱性蛋白酶的文献报道。

1　材料与方法

1.1　样品采集

样品来自黄海海域、连云港港口及远洋捕捞船采集的各类海鱼、贝类、海水和海泥。

1.2　培养基

2216E 培养基(g/L):蛋白胨 5,酵母粉 1,海水配制,pH 8.5。

富集培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,牛肉膏 5,海水配制,pH 8.5。

酪蛋白培养基(g/L):干酪素 10,海水配制,pH 10.0。

基本培养基(g/L):蛋白胨 0.5,葡萄糖 0.5,海水配制,pH 8.5。

产酶发酵培养基(g/L):蛋白胨 5,酵母粉 3,葡萄糖 5,海水配制,pH 8.5。

1.3　菌株筛选

1) 海泥直接取 1 g 放入 50 mL 富集培养基,海鱼、贝类将内脏剪碎后放入无菌海水浸泡过夜,过滤后取 1 mL 上清放入富集培养基,20 ℃、180 r/min 培养 2~5 d。

2) 初筛 1:富集培养液选取合适的稀释液涂布酪蛋白平板,20 ℃培养 3~4 d,挑取有透明圈的单菌落,划线分纯后于 2216E 培养基保藏。[8]

3) 初筛 2:将保藏的菌株接入产酶发酵培养基,20 ℃、180 r/min 培养 2 d,12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液 50 μL 于直径 6 mm 的无菌滤纸片,置酪蛋白平板上,于 20 ℃,48 h 后测定水解圈大小。

4) 复筛:选取菌落透明圈和水解圈直径均较大的菌株接入发酵培养基,20 ℃、180 r/min,振荡培养 48 h,进行蛋白酶酶活测定。

1.4　菌株 HH407 的生理生化反应

按照 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(second edition),进行各种生理生化反应[9]。

1.5　菌株 HH407 的分子生物学鉴定

1.5.1　16S rDNA PCR 扩增和序列分析　采用 Takara 试剂盒提取高纯度细菌的基因组 DNA,电泳检测并用凝胶成像系统拍照记录,DNA 模板于 −20 ℃ 保存。正向引物 P1: 5′-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′,反向引物 P2: 5′-CGGCTACCTTGTTACGAC-3′。反应体系 50 μL,Taq 酶 2 U。反应条件为 94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1 min,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 90 s,循环 35 次,

万方数据

72 ℃延伸 10 min。PCR 产物的纯化、克隆、测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成，所测序列提交 GenBank 进行同源性比较。

1.5.2 菌株 HH407 的系统发育树构建 选取同源性为 95%～99%的相关序列，采用 MEGA3.1 软件的邻接法构建出进化树，并用自举分析法进行置信度检测，自举数据集 1 000 次。

1.6 菌株 HH407 的生长特性研究

1.6.1 种子液的制备 将保藏在 2216E 培养基的斜面菌株接种到发酵培养基中，转速 180 r/min，装液量 20%，培养 16 h。

1.6.2 温度对生长的影响 种子液按体积分数 2%接种于发酵培养基，pH 自然，转速 180 r/min，装液量 20%，分别在不同温度(0～40 ℃)下培养，每隔 2 h 测定细胞浓度。

1.6.3 pH 值对生长的影响 在发酵培养基中加入下列不同的缓冲液(终浓度为 10 mmol/L)，再分别调节发酵培养基的 pH 值 pH 5.0～6.0 (MES)，pH 7.0(PIPES)，pH 7.5～8.5(HEPES)，pH 9.0～11.0，其他条件同 1.6.2，20℃培养，每隔 2 h 测定细胞浓度。

1.6.4 NaCl 对生长的影响 在发酵培养基中加入 NaCl(海水改用微量矿物盐溶液代替，每升培养基加入 10 ml)，使之质量分数为 0～13 g/dL 的 NaCl，20 ℃、pH 8.5 培养，其他条件同 1.6.2，每隔 2 h 测定细胞浓度。

1.6.5 对碳氮源的利用 在基本培养基中加入不同的终质量浓度为 0.5 g/dL 的碳源物质(糖类、有机酸类、醇类及氨基酸类)代替葡萄糖进行碳源实验；在基本培养基中加入不同的终质量浓度为 0.2 g/dL 的氮源物(酵母膏等)代替蛋白胨进行氮源实验。对照为基本培养基，20 ℃、180 r/min 振荡培养，每隔 12 h 测定细胞浓度，直至测定细胞浓度下降为止。

1.7 菌的观察和细胞浓度测定

菌体电镜形态图片由南京农业大学电镜实验室拍摄，细胞浓度测定采用细菌计数板(HB Bacteria Kinecon，LLC，USA)和相差显微镜计数(Olympus BX51，Japan)。采用生长速率常数 R 绘图，$R=3.322(\lg x_2-\lg x_1)/(t_2-t_1)$($x_2$、$x_1$ 为对数生长期的菌数)。

1.8 粗酶液的制备和酶活测定

在装有 100 mL 产酶发酵培养基的 500 mL 三角瓶中接种后于 20 ℃振荡(180 r/min)培养 36 h。10 000 r/min、4 ℃、10 min 离心收集上清液作为粗酶进行酶活性分析。

蛋白酶活性采用 Folin 法测定[10]：50 μL 酶解反应物的组成为 40 μL 含有质量分数 2%酪蛋白的 100 mmol/L，Glycine-NaOH 缓冲液(pH10.0)加 10 μL 稀释粗酶液，于 35 ℃恒温水浴反应 10 min 后加 100 μL 三氯乙酸终止酶解反应。将反应物经 10 000 r/min 离心 10 min 分离上清液。显色反应混合物的组成为：酶解上清液 50 μL，0.4 mol/L 碳酸钠溶液 250 μL，1 mol/L Folin-Ciocalteu's phenol 试剂 50 μL，混匀后于 35 ℃恒温显色 2 min。最后用酶标仪(BioTek，USA)测定 A_{680}，对照酪氨酸标准曲线换算出酪氨酸的量。

酶活力定义为在 35 ℃、pH 10.0 的条件下，每分钟催化酪蛋白水解生成 1 μg 酪氨酸所需的酶量为 1 个单位。

2 结 果

2.1 产酶菌株的筛选

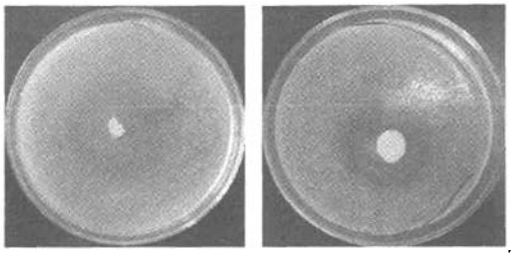
经过初筛得到 106 株有酪蛋白水解圈的菌株，水解圈直径在 25～30 mm 之间的有 10 株，20～25 mm 之间的有 26 株，15～20 mm 之间的有 54 株(部分结果见表 1)。通过酶活测定，菌株 HH407 的蛋白酶活最高，选择该菌做进一步的研究。菌株 HH407 在酪蛋白平板点种菌落透明圈和其发酵液水解透明圈见图 1(a)、(b)。

表 1 产蛋白酶菌株部分筛选结果

Tab. 1 Screening of protease produced strain from Marine microorganism

菌株	菌落透明圈直径/mm	蛋白酶活性/(U/mL)
HH407	28.5	27.2
HH213	18.4	9.5
HH419	16.3	14.7
HH503	26.0	20.6
HH114	19.7	14.0
HH359	14.2	10.9
HH137	16.6	14.4
HH251	14.1	16.1
HH508	16.8	11.8
HH41	21.5	9.9
HH274	25.3	13.2
HH328	19.4	9.5
HH710	20.9	19.7

万方数据



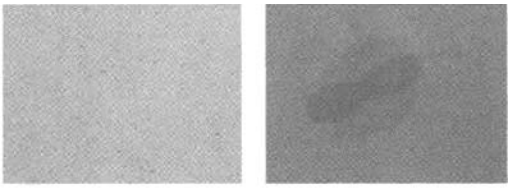
(a)　(b)

图 1　菌株 HH407 酪蛋白平板透明圈

Fig. 1　Proteolytic zone on casein-containing plate

2.2　菌株 HH407 的形态特征

菌株 HH407 为革兰氏阴性杆菌见图 2(a)，无芽孢，无荚膜，端生单鞭毛，大小为 0.4～0.7 μm×1.0～1.8 μm。电镜图见图 2(b)，在酪蛋白平板的菌落特征：直径 3～4 mm，椭圆金黄色、湿润、边缘光滑、中间凹陷、四周隆起、半透明、易挑取，能产生明显的透明圈。



(a)　(b)

图 2　菌株 HH407 形态照片

Fig. 2　Photograph of Strain HH407

2.3　菌株 HH407 的生理生化特性

由表 2 生理生化特性的测定结果可以发现，菌株 HH407 氧化酶、接触酶均为阳性，不能发酵葡萄糖，不积累聚-β-羟基丁酸盐，甲基红、VP、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、色氨酸脱氨酶均为阴性，不产生吲哚。此外，HH407 能利用蔗糖、半乳糖、麦芽糖、柠檬酸盐、酪氨酸、丙酮酸，而不能利用蜜二糖。通过 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition)[9] 分析比较，初步鉴定该菌株为 *Pseudoalteromonas* 属。由于该菌能产生黄色色素，为此，比较了该菌与属内其它产黄色色素种间的主要特性(见表 3)，结果显示菌株 HH407 同 *Pseudoalteromonas flavipulchra* 的特征基本一致。

表 2　菌株 HH407 的生理生化特性

Tab. 2　Biochemical and physiological characteristics of strain HH407

特征	结果	特征	结果
Oxidase	+	accumulate poly-β-hydroxybutyrate	−
Catalase	+	require Na+ for growth	+
VP	−	Lysine decarboxylase	−
Indole	−	Tryptophan deaminase	−
Methyl red	−	Ornithine decarboxylase	−
Gram staining	−	fermentation of D−glucose	−

注：+：positive；　−：negative.

表 3　菌株 HH407 同交替假单胞菌属菌落为黄色色素的其它种的特性比较

Tab. 3　Phenotypic features of HH407 and other yellow-pigmented species of the genus *Pseudoalteromonas*[a]

特征	HH407	*P. flavipulchra*	*P. piscicida*	*P. citrea*	*P. aurantia*	*P. peptidolytica.*
Requirement for organic growth factors	−	−	ND	+	+	−
Pigmentation	+	+	+	+	+	+
Growth at:						
4 ℃	+	−	−	−	+	−
37 ℃	+	+	+	−	−	+
NaCl						
12 g/dL	+	+	−	−	−	−
15 g/dL	−	−	−	−	−	−
Production of:						
Chitinase	+	+	−	−	−	+
Caseinase	+	+	ND	+	−	−
Alginase	ND	ND	ND	ND	−	+
Utilization of:						
Maltose	+	+	−	−	−	+

万方数据

续表3

特征	HH407	*P. flavipulchra*	*P. piscicida*	*P. citrea*	*P. aurantia*	*P. peptidolytica.*
D-Galactose	+	+	+	−	−	−
Sucrose	+	+	−	−	−	−
Melibiose	−	−	−	−	−	ND
Citrate	+	+	+	−	−	−
Pyruvate	+	+	+	−	ND	ND
L−Arginine	−	−	ND	−	+	ND
L−Tyrosine	+	+	ND	+	−	ND

注：+：positive；−：negative；ND：Not determined.

2.4 菌株 HH407 的 16S rDNA 系统进化树分析

将菌株 HH407 的 16 S rDNA 序列(GenBank 的注册号为 EF136462)同 NCBI 数据库中的序列进行同源性比较。Blast 分析显示该菌属于交替假单胞菌属，同源性在 99%以上，进化树分析与 *Pseudoalteromonas flavipulchra* 有 99.9%的同源性且处在同一分支上(图 3)。

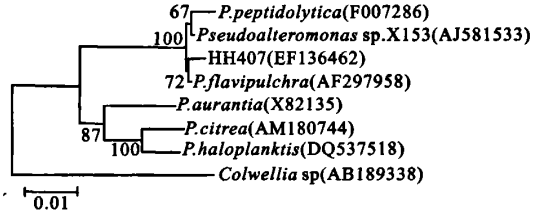


图 3 HH407 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of HH407

综合形态特征、生理生化特性、16S rDNA 序列以及系统进化树的结果，可以认为菌株 HH407 与 *Pseudoalteromonas flavipulchra* 为同种，因此将该菌株命名为 *Pseudoalteromonas flavipulchra* HH407。

2.5 菌株 HH407 的生长条件

该菌生长温度范围为 0～40 ℃，能在 0 ℃下缓慢生长，15～25 ℃范围内快速生长，最适生长温度为 20 ℃，表明它是一株耐冷菌。生长 pH 范围为 5.5～11，最适生长 pH 为 8.5。生长的 NaCl 浓度为 0.5～13%，最适生长的 NaCl 质量分数为 4%(图 4)，无 NaCl 不生长，属于典型中度嗜盐海洋微生物。

菌株 HH407 对碳、氮源物质的利用见表 4，HH407 能很好的利用复杂蛋白质如胰蛋白胨、酵母膏，蛋白胨，其次是纤维二糖、淀粉、明胶，能利用有机酸盐类(乙酸钠、柠檬酸钠和丙酮酸钠)和醇类(甲醇、乙醇)，但对糖和氨基酸的利用能力较差，这与其所处海洋的贫瘠环境有关，说明该菌来源于海洋。

2.6 菌株 HH407 所产蛋白酶的特性

从图 5(a)～(c)的结果可以发现，菌株 HH407 所产的蛋白酶在 0～70 ℃范围内均呈现活性，其中最适酶活温度为 35 ℃，在 0 ℃时仍具有接近 22%的活性，但在 70℃则仅有约 10%的活性。同样，在 pH5-12 较宽的范围内也呈现活性，最适酶活为 pH10。由此可见，菌株 HH407 所产的蛋白酶为低温碱性蛋白酶。

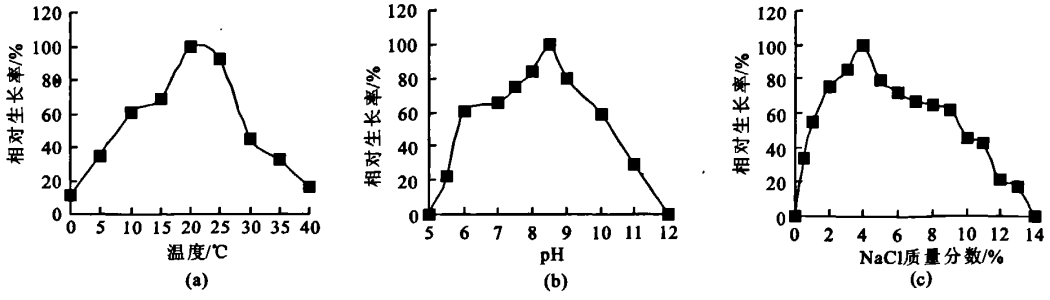


图 4 温度(a)、pH(b)、NaCl(c)对菌 HH407 的生长影响

Fig. 4 Effects of temperature(a), pH(b) and NaCl(c) on the growth of strain HH407

万方数据

表 4　各种碳、氮源物质对菌株 HH407 的生长影响

Tab. 4　Effects of various carbon sources on growth of strain HH407

碳/氮源	细胞密度(×10^7)	碳/氮源	细胞密度(×10^7)	碳/氮源	细胞密度(×10^7)
Control	1.20	tryptone	140	yeast extract	120
peptone	99.5	cellobiose	75.0	starch	72.0
gelatin	53.5	sucrose	15.0	glucose	12.8
casein	5.00	fructose	11.25	maltose	1.20
glycogen	10.0	melibiose	1.30	arabinose	6.75
lactose	1.20	cellulose	5.20	rhamnose	1.20
mannose	4.15	Mannitol	1.10	galactose	3.20
xylose	1.30	methanol	24.0	sodium acetate	22.0
ethanol	6.80	sodium citrate	11.20	glycerol	1.40
sodium lactate	9.50	sorbitol	1.35	sodium pyruvate	6.75
inositol	1.25	L−Glycine	8.50	L−Alanine	7.80
L−Lysine	1.10	L−Arginine	5.20	L−tryptophan	1.15

Initial concentration(起始细胞密度)=1.0×10^7

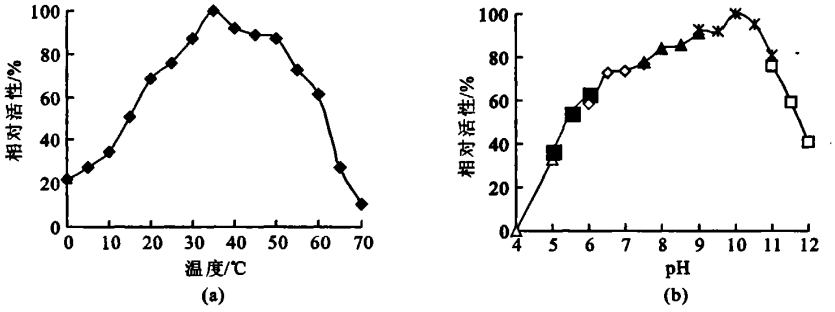


图 5　温度(a)和 pH(b)对菌株 HH407 蛋白酶酶活的影响

Fig. 5　Effects of temperature(a) and pH(b) on the enzyme activity of HH407

3　结　语

从连云港海域中分离到一株海洋细菌 HH407,经形态特征、生理生化特性鉴定,16S rDNA 序列比对以及系统进化树分析,可以认为菌株 HH407 与 *Pseudoalteromonas flavipulchra* 为同种,将该菌株命名为 *Pseudoalteromonas flavipulchra* HH407。

该菌生长温度范围为 0～40 ℃,能在 0 ℃下缓慢生长,最适生长温度为 20 ℃,高于 41 ℃不生长。生长 pH 值范围为 5.5～11.0,最适生长 pH 值为 8.5。生长的 NaCl 质量浓度为 0.5～13 g/dL,最适生长的 NaCl 质量浓度为 4 g/dL,表明该菌是一株耐冷海洋菌。

该菌所产的蛋白酶在 0～70 ℃范围内均呈现活性,其中最适酶活温度为 35 ℃;在 pH 5～12 较宽的范围内呈现活性,最适酶活 pH 值为 10。由此可见,菌株 HH407 所产的蛋白酶为低温碱性蛋白酶。

万方数据

参考文献(References):

[1] Marx J C, Blaise V, Collins T, et al. A perspective on cold enzymes: current knowledge and frequently asked questions [J]. **Cell Mol Biol**, 2004, 50(5):643-655.

[2] Rahman R N, Geok L P, Basri M, et al. An organic solvent-stable alkaline protease from Pseudomonas aeruginosa strain K: Enzyme purification and characterization[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 39:1484－1491.

[3] 王跃军，孙谧，洪义国. 黄海黄杆菌 YS-9412-130 低温碱性蛋白酶的制备工艺研究[J]. 水产研究，2001，22(2):11－19.

Wang Y J, Sun M, Hong Y G, et al. The study of preparation technology of low-temperature alkaline protease from Flavobacterium YS-9412-130[J]. **Marine Fisheries Research**, 2001, 22(2):11－19.

[4] Nakasone N, Toma C, Song T, et al. Purification and characterization of a novel metalloprotease isolated from Aeromonas caviae[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2004, 207(1):127－132.

[5] Kulakova L, Galkin A, Nakayama T, et al. Improvement of thermostability of cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium Shewanella sp. strain Ac10 by rational mutagenesis[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2003, 22:113－117.

[6] Venugopal M, Saramma A V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive[J]. **Process Biochemistry**, 2006, 41:1239－1243.

[7] Ivanova E P, Shevchenko L S, Sawabe T, et al. *Pseudoalteromonas maricaloris* sp. nov., isolated from an Australian sponge, and reclassification of [*Pseudoalteromonas aurantia*] NCIMB 2033 as *Pseudoalteromonas flavipulchra* sp. nov [J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2002, 52: 263－271.

[8] 诸葛健，李华钟. 微生物学[M]. 北京：科学出版社，2004.

[9] Garrity G M, Bell J, Liibum G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(second edition)[M]. New York: Berlin Heidelberg, 2004.

[10] Balch W E, Fox G E, Magrum L J, et al. Methanogens: reevaluation of a unique biological group[J]. **Microbiol Rev**, 1979, 43:260－296.

(责任编辑：朱 明)

万方数据