

## 研究报告

## 金黄杆菌 ZHDP1 菌株基因组分析及其蛋白酶活性特征与产酶优化

赵焕帅<sup>#</sup>, 王健鑫<sup>#</sup>, 黄嘉茂, 马云程, 陈云飞, 陶晨智, 王定全, 廖智, 石戈, 刘雪珠, 曲武<sup>\*</sup>

浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316022

赵焕帅, 王健鑫, 黄嘉茂, 马云程, 陈云飞, 陶晨智, 王定全, 廖智, 石戈, 刘雪珠, 曲武. 金黄杆菌 ZHDP1 菌株基因组分析及其蛋白酶活性特征与产酶优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3324-3334

Zhao Huanshuai, Wang Jianxin, Huang Jiamao, Ma Yuncheng, Chen Yunfei, Tao Chenzhi, Wang Dingquan, Liao Zhi, Shi Ge, Liu Xuezhu, Qu Wu. Genome analysis, protease characterization, and enzyme production optimization of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3324-3334

**摘要:**【背景】蛋白酶活性研究对于理解金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)菌株的生态角色、工业价值及潜在致病机理十分重要。【目的】分析一株细菌的新型基因组序列, 以此推断其中潜在的蛋白酶基因, 并对其蛋白酶活性进行验证与优化, 为后续研究提供数据支撑。【方法】利用高通量测序技术对菌株基因组序列进行测定与组装, 并利用单因素优化方法对菌株的蛋白酶作用条件与产酶条件进行优化。【结果】分离得到一株蛋白酶活性菌株, 通过分子生物学手段鉴定为金黄杆菌属菌株, 并命名为 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1。该菌株基因组大小为 4 917 748 bp, GC 含量为 35.95%, 平均核苷酸相似性和 DNA-DNA 杂交指数分别为 91.39 和 47.8。该菌株基因组中发现超过 20 条蛋白酶基因, 上清液中也检测到蛋白酶活性, 其最适反应温度和 pH 值分别为 50 °C 和 7.0。Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和 Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>对蛋白酶活性有强烈抑制作用。ZHDP1 菌株在培养温度 35 °C、培养时间 35 h、接种量 4%、碳源和氮源为玉米粉及摇床转速 100 r/min 的条件下产酶量最高。【结论】本研究提供了 ZHDP1 菌株的完整基因组序列, 并确定了该菌株的蛋白酶相关特性, 为该菌株生态功能、致病机制及应用价值的深入研究奠定了基础。

**关键词:** 金黄杆菌; 基因组; 蛋白酶; 酶学性质; 发酵条件优化

基金项目: 浙江省自然科学基金(LQ22D060004); 舟山市科技局项目(2022C13048)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

**Supported by:** Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ22D060004); Project of Zhoushan Science and Technology Bureau (2022C13048)

<sup>#</sup>These authors equally contributed to this work

**\*Corresponding author:** E-mail: quwu2165@zjou.edu.cn

**Received:** 2021-12-12; **Accepted:** 2022-01-17; **Published online:** 2022-02-21

# Genome analysis, protease characterization, and enzyme production optimization of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1

ZHAO Huanshuai<sup>#</sup>, WANG Jianxin<sup>#</sup>, HUANG Jiamao, MA Yuncheng, CHEN Yunfei, TAO Chenzhi, WANG Dingquan, LIAO Zhi, SHI Ge, LIU Xuezhu, QU Wu<sup>\*</sup>

Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China

**Abstract:** [Background] Characterizing the protease activity is essential for revealing the potential ecological roles, industrial values, and pathogenic mechanism of *Chryseobacterium*. [Objective] This paper aims to analyze the genome sequence, characterize the protease, and optimize the enzyme production conditions of a novel *Chryseobacterium* strain, thereby providing the data support for subsequent research. [Methods] The genome sequence of the strain was obtained by high-throughput sequencing technology, and the conditions of protease activity and enzyme production were optimized by single factor tests. [Results] A strain, *Chryseobacterium* sp. ZHDP1, was isolated in this work. The genome of this strain had a length of 4 917 748 bp and the GC content of 35.95%. The average nucleotide identity (ANI) and DNA-DNA hybridization (DDH) indexes of the genome were 91.39 and 47.8, respectively. More than 20 protease genes were identified in the genome, and protease activity was detected in the supernatant of the fermentation broth. The protease had the optimum performance at 50 °C and pH 7.0 and was strongly inhibited by  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ . The optimal conditions for the protease production of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 were as follows: culture temperature of 35 °C, culture time of 35 h, inoculum amount of 4%, carbon source and nitrogen source of corn flour, and shaking speed of 100 r/min. [Conclusion] This study reveals the full-length genome sequence and the protease characteristics of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1, which lays a foundation for the in-depth study of this strain.

**Keywords:** *Chryseobacterium*; genome; protease; enzymatic property; optimization of fermentation conditions

金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)是一类自然界中广泛分布的细菌。近年来,研究人员从临床标本<sup>[1]</sup>、土壤<sup>[2]</sup>、废水<sup>[3]</sup>及植物根系<sup>[4]</sup>中分离得到许多该属的菌株。研究发现,该属菌株具有多种生理特征<sup>[5]</sup>。例如,从北极土壤中分离得到的 *C. antibioticum* RP-3-3 对革兰氏阴性致病菌具有拮抗作用,因此其发酵液可以作为潜在的抗菌物质<sup>[2]</sup>。从土壤中分离得到的 *Chryseobacterium* sp. RBT 具有降解丝绸、人类毛发、羊毛及禽类羽毛的功能<sup>[6]</sup>,可以作为这些废弃物资源化处理的重要生物工具。研究人

员还从 *C. taeanense* TKU001 中分离得到一种新型  $\alpha$  淀粉酶,其在碱性条件下具有较强的稳定性<sup>[7]</sup>。因此,金黄杆菌属菌株具有十分重要的应用潜力与价值。

近年来,金黄杆菌属菌株的蛋白酶活性及其氨基酸代谢能力已经成为研究重点。研究证明,多种金黄杆菌属菌株具有蛋白酶活性,而且可以将水解产生的氨基酸代谢为具有生物活性的次生代谢产物<sup>[8]</sup>。蛋白质降解与代谢能力不仅使得金黄杆菌属具有潜在的工业生产价值,还意味着该菌属在碳、氮元素循环过程中

起到重要作用<sup>[9]</sup>。此外,蛋白酶活性的研究也有助于阐释金黄杆菌属潜在的致病机理<sup>[8]</sup>。由此可见,蛋白酶活性的研究对于理解金黄杆菌属菌株的生态及工业价值十分重要。

随着高通量测序技术的发展与成本的不断降低,基因组序列已成为探究细菌生态价值与工业应用潜力的主要依据之一<sup>[10]</sup>。此外,基因组序列也是进化、分类、新种鉴定等研究的关键性证据<sup>[11-12]</sup>。本研究分离得到一株金黄杆菌属菌株,通过分析发现该菌株具有新型的基因组序列,是一株潜在的新种;进而对该菌株的蛋白酶活性进行验证与优化,以期在提供新金黄杆菌产蛋白酶菌株的同时,为该菌属生态功能、应用价值及潜在致病机理的深入研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

用于菌株分离的土壤样品采集于浙江省舟山市沈家门海鲜市场。使用无菌药勺采集约 10 g 土壤样品,将样品置于无菌的 50 mL 离心管中,放置在冰袋上运回实验室,随后在 4 °C 冰箱中保存土壤样品。所有菌株的分离工作均在 7 d 内完成,以保证样品的新鲜度。

#### 1.1.2 培养基

菌株筛选培养基为酪蛋白琼脂培养基(g/L):酪蛋白 10.0,牛肉膏浸提物 3.0, NaCl 5.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0,溴百里酚蓝 0.05,琼脂 15.0,蒸馏水配制,调节 pH 值为 7.2–7.4, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min 后使用。菌株纯化培养基为 2216E 琼脂培养基(g/L):蛋白胨 5.0,酵母膏 1.0,磷酸高铁 0.01,琼脂 15.0,陈海水配制,调节 pH 值为 7.2–7.4, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min 后使用;菌株发酵基础培养基为 2216E 液体肉汤培养基(g/L):蛋白胨 5.0,酵母膏 1.0,磷酸高铁 0.01,

陈海水配制,调节 pH 值至 7.2–7.4, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min 后使用。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

福林酚、蛋白胨、牛肉膏浸提物、琼脂、酪蛋白、碳酸钠、三氯乙酸、溴百里酚蓝、磷酸高铁、酵母膏、NaCl 和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 国药集团;细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit), 天根生化科技(北京)有限公司。恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司;酶标仪, Bio-Rad 公司;水平电泳仪, 北京六一生物科技有限公司;微量紫外分光光度计(NanoDrop 2000), 赛默飞世尔科技公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 功能菌株筛选与保存

将土壤样品使用无菌生理盐水稀释 10<sup>6</sup> 倍后,取 100 μL 稀释液均匀涂布于酪蛋白琼脂培养基。将平板置于 28 °C 恒温培养箱中静置培养 24 h 后,将周围出现透明圈的单菌落挑出,在 2216E 琼脂培养基上划线纯化 2 次,挑取单菌落接种于 2216E 液体肉汤培养基中,28 °C、150 r/min 培养 24 h 后,将细菌培养液中加入无菌甘油至终浓度为 20%,置于–80 °C 超低温冰箱中长期保存。

#### 1.2.2 菌株鉴定

使用 TIANamp Bacteria DNA Kit 提取菌株基因组 DNA,操作过程严格按照说明书进行。DNA 的质量使用微量紫外分光光度计 NanoDrop 2000 和 1%琼脂糖凝胶电泳进行评估。使用通用引物 27F 和 1492R 对基因组中的 16S rRNA 基因序列进行扩增,引物序列与 PCR 条件参考文献[13-14]。将 PCR 产物送至生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定,并在 EzBioCloud 数据库(<https://www.ezbiocloud.net/>)中通过 BLAST 软件对序列进行比对,最终基于比对结果对菌株进行分类学鉴定。利用 MEGA

5.0 软件使用邻接法(neighbor-joining method)基于 16S rRNA 基因序列构建菌株的系统发育树, bootstrap 值为 1 000。

### 1.2.3 细菌基因组序列测定与分析

将菌株基因组 DNA 送至武汉贝纳科技服务有限公司进行建库与高通量测序。测序平台为 Nanopore 和 Illumina MiSeq。序列组装由 unicycler (V0.4.8)完成。随后, 通过 prodigal、aragorn、barrnap 和 infernal 分别对基因组序列中的编码基因、tRNA 基因、rRNA 和 ncRNA 基因进行预测, 并利用 BLAST 软件通过 COG (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、KEGG (<https://www.kegg.jp/>)、UniProt (<https://sparql.uniprot.org/>)和 RefSeq (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/>)数据库对基因功能进行注释。同时, 利用 PHASTER (<http://phaster.ca/>)和 IslandViewer 4 (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>)分别对细菌基因组中的前噬菌体和基因岛进行预测。菌株基因的平均核苷酸相似性(average nucleotide identity, ANI)和 DNA-DNA 杂交(DNA-DNA hybridization, DDH)这 2 个指数分别通过 <https://www.ezbiocloud.net/tools/ani> 和 [https://tygs.dsmz.de/user\\_requests/new](https://tygs.dsmz.de/user_requests/new) 两个网站进行运算。基因组序列已经提交至 GenBank 数据库, 登录号为 CP075682。

### 1.2.4 菌株发酵液蛋白酶活性测定

通过 Folin-酚法测定菌株发酵上清液中的蛋白酶活性。将培养后的菌液在 4 °C、6 000 r/min 离心 20 min, 随后取出 1 mL 上清液作为粗酶液与 1 mL 的 1%酪蛋白溶液混合, 在一定温度下反应 10 min 后立即加入 2 mL 的 0.4 mol/L 三氯乙酸, 6 000 r/min 离心 10 min 后, 取 1 mL 上清液与 5 mL 0.4 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 1 mL 福林酚试剂混合, 于 40 °C 显色 20 min。利用酶标仪测定反应液在 650 nm 处的吸光值。以先加

入三氯乙酸终止反应的一组为对照组, 蛋白酶活(U)定义为在特定条件下分解 1 μg 酪蛋白所需的酶量。

### 1.2.5 蛋白酶活性与产酶量优化

通过温度、pH 和金属盐离子 3 个方面对上清粗蛋白酶活性进行优化。分别将粗酶液在不同温度(25、30、35、40、45、50、55、60 和 65 °C)、不同 pH 缓冲液(磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液调 pH 2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0, 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液调 pH 9.0 和 10.0)和终浓度 1 mmol/L 的不同金属盐溶液(FeCl<sub>3</sub>、NaCl、KCl、LiCl、ZnSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub> 和 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)中与底物进行反应, 并测定其蛋白酶活。随后, 将菌株通过不同接种量(2%、4%、6%、8%、10%和 12%)、不同碳源(1%葡萄糖、1%麦芽糖、1%蔗糖、1%玉米粉和 1%淀粉)、不同氮源(1%蛋白胨、1%酪蛋白、1%玉米粉、1%牛肉膏提取物和 1%黄豆粉)、不同转速(50、100、150 和 200 r/min)、250 mL 摇瓶不同载液量(25、50、100、150 和 200 mL)、不同培养时间(12、24、36、48、60、72 和 84 h)和不同培养温度(25、30、35、40、45、50 和 55 °C)进行发酵培养, 并测定上清液中的蛋白酶活性, 对菌株的发酵条件进行优化, 以获得最大的产酶量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株分离与鉴定结果

在菌株筛选过程中获得一株菌落周围具有透明圈的蛋白质降解功能菌株。通过平板划线获得该菌株的单菌落。该菌株菌落呈圆形、橘黄色。经过 24 h 培养后, 该菌株菌落直径约为 4 mm, 表面有凸起。经比对, 该菌株的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号为 OL831229)与金黄杆菌(*C. gambrini*) DSM 18014 菌株

(GenBank 登录号为 OL832060)具有最大相似性(99.1%)。基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树同样表明该菌株与 DSM 18014 菌株具有最近的遗传距离(图 1)。此外,该菌株基因组序列的 ANI 和 DDH 指数分别为 91.39 和 47.8 (表 1),均低于新种的阈值(ANI<95%–96%; DDH<70%),因此该菌株具有新型的基因组序列。基于以上结果,将该菌株命名为 ZHDP1,即 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1。

## 2.2 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 的基因组分析结果

通过高通量测序与序列拼接,获得金黄杆菌 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 的完整基因组

序列。其基因组大小为 4 917 748 bp, GC 含量为 35.95% (图 2)。分析结果表明, ZHDP1 菌株基因组中存在 4 478 条蛋白质编码基因、5 条 rRNA 基因、26 条 sRNA 基因和 89 条 tRNA 基因。同时,在 ZHDP1 菌株基因组中共有 9 个基因岛和 1 个前噬菌体。KEGG 数据库注释结果(图 3)表明,共有 235 条基因参与了氨基酸代谢过程(amino acid metabolism)。此外,COG 数据库注释结果(图 4)也表明, *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 基因组中有 138 条基因具有氨基酸转运与代谢功能(amino acid transport and metabolism)。以上结果都证明 ZHDP1 菌株具有丰富的氨基酸代谢基因。

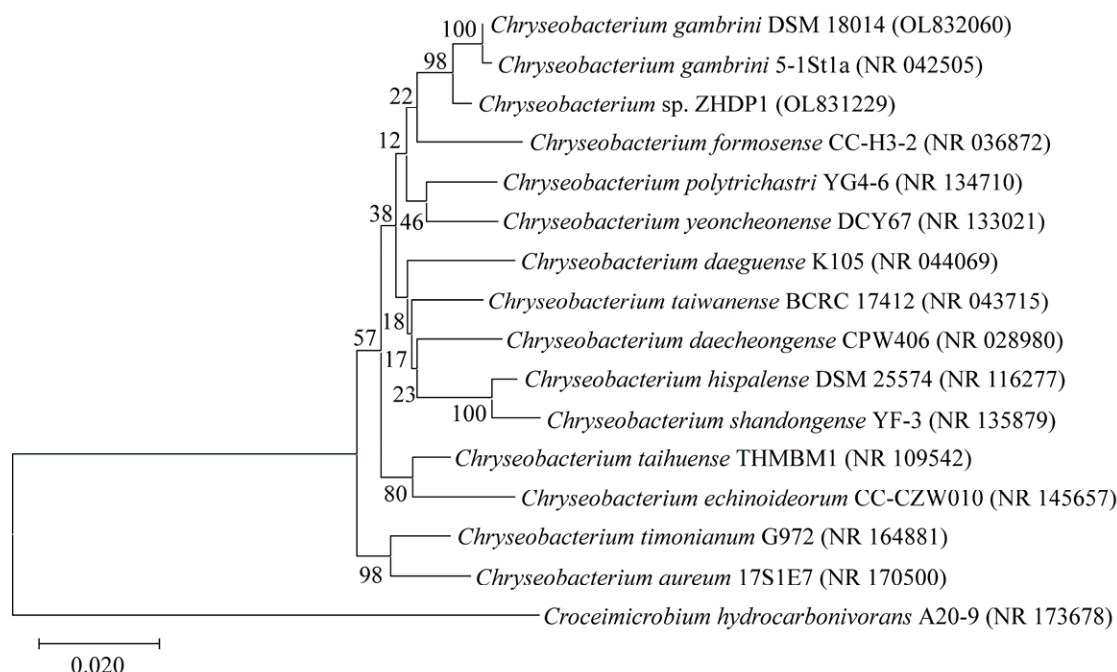


图 1 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析 系统发育树使用邻接法构建而成,分析所使用的 bootstrap 值为 1 000;括号中的序列号表示不同菌株 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号;分支处数字表示该处节点的可信度;标尺数值 0.020 表示进化距离

Figure 1 Phylogenetic analysis of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 by neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequence. The bootstrap value used for constructing the tree was 1 000; The numbers in the brackets were the GenBank accession numbers of the 16S rRNA gene of the strains in the tree; The credibility of the node was indicated by the number at the branch; The evolutionary distance was indicated by the scale data 0.020.

表 1 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 基因组与其他菌株的 ANI 和 DDH 指数计算结果

Table 1 The ANI and DDH values that were calculated based on the genomes of ZHDP1 and other *Chryseobacterium* strains

Strain name	ANI	DDH
<i>C. gambrini</i> DSM 18014	91.39	47.8
<i>C. caeni</i> DSM 17710	74.58	28.9
<i>C. arachidis</i> DSM 27619	81.97	25.8
<i>C. gleum</i> NCTC 11432	80.21	25.6
<i>C. gleum</i> ATCC 35910	80.79	25.5
<i>C. hispalense</i> DSM 25574	80.56	25.5
<i>C. cheonjiense</i> RJ-7-14	80.25	24.7
<i>C. takakiae</i> DSM 26898	80.42	24.4
<i>C. geocarposphaerae</i> DSM 27617	80.33	24.3
<i>C. taichungense</i> DSM 17453	80.74	24.2
<i>C. taihuense</i> CGMCC 1.10941	79.38	23.6
<i>C. limigenitum</i> SUR2	80.09	23.1
<i>C. polytrichastri</i> DSM 26899	77.66	22.7
<i>C. daecheongense</i> DSM 15235	78.72	22.2
<i>C. defluvii</i> DSM 14219	78.51	22.1
<i>C. zeae</i> DSM 27623	73.67	21.4

2.3 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 发酵液的蛋白酶活性优化结果

UniProt、Pfam 和 RefSeq 数据库分别在 ZHDP1 菌株基因组中注释得到 27、22 和 23 条蛋白酶基因，表明 ZHDP1 菌株具有潜在的蛋白质降解功能。酶活测定实验结果也证明了 ZHDP1 菌株上清发酵液中具有蛋白质降解活性(图 5)。此外，通过温度、pH 和金属盐离子对 ZHDP1 菌株蛋白酶作用条件进行优化。结果表明，其粗酶液在 45–60 °C 的温度范围内可以维持较高的蛋白酶活性，最高的酶活性出现在 50 °C (图 5A)。ZHDP1 菌株上清液蛋白酶的最适 pH 值为 7.0，上清粗酶液对碱性环境较敏感，pH 8.0 的环境会使其丧失超过 50% 的酶活性(图 5B)。此外，Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和 Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>对 ZHDP1 菌株上清中的蛋白酶活性具有强烈的抑制作用，尤其是 Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>的存在会完全抑制蛋白酶活性(图 5C)。

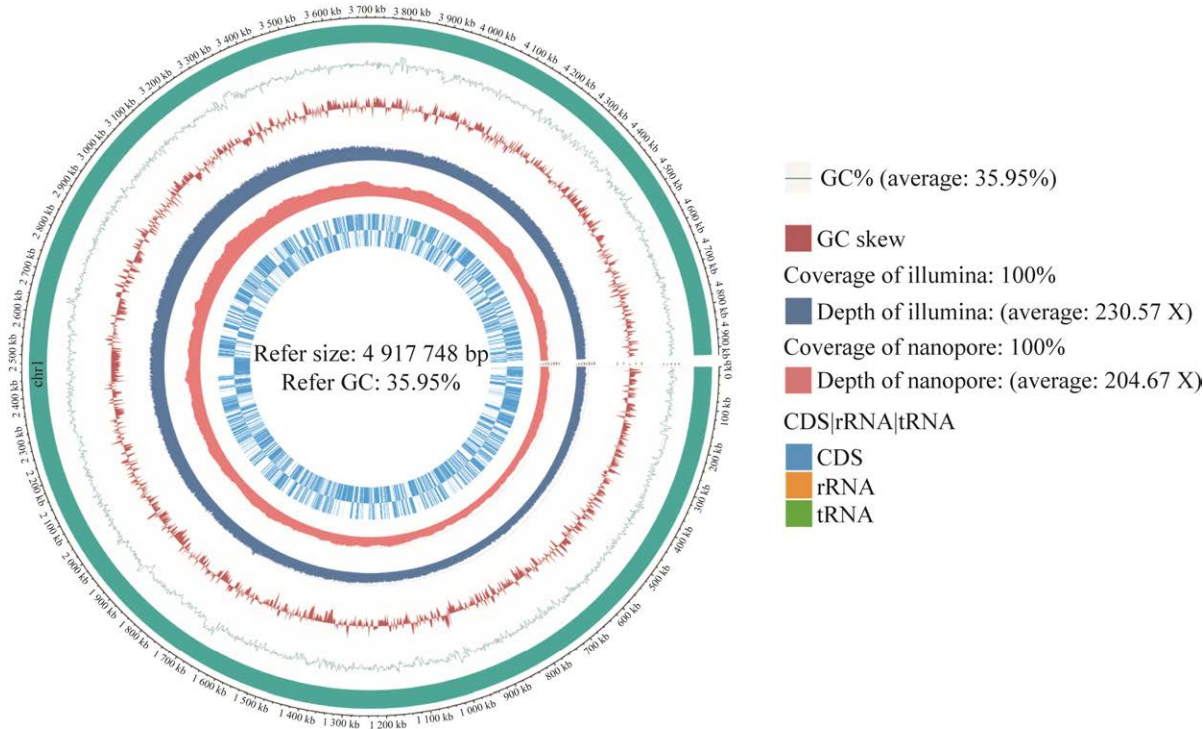


图 2 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 基因组图谱  
Figure 2 The genome map of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1.



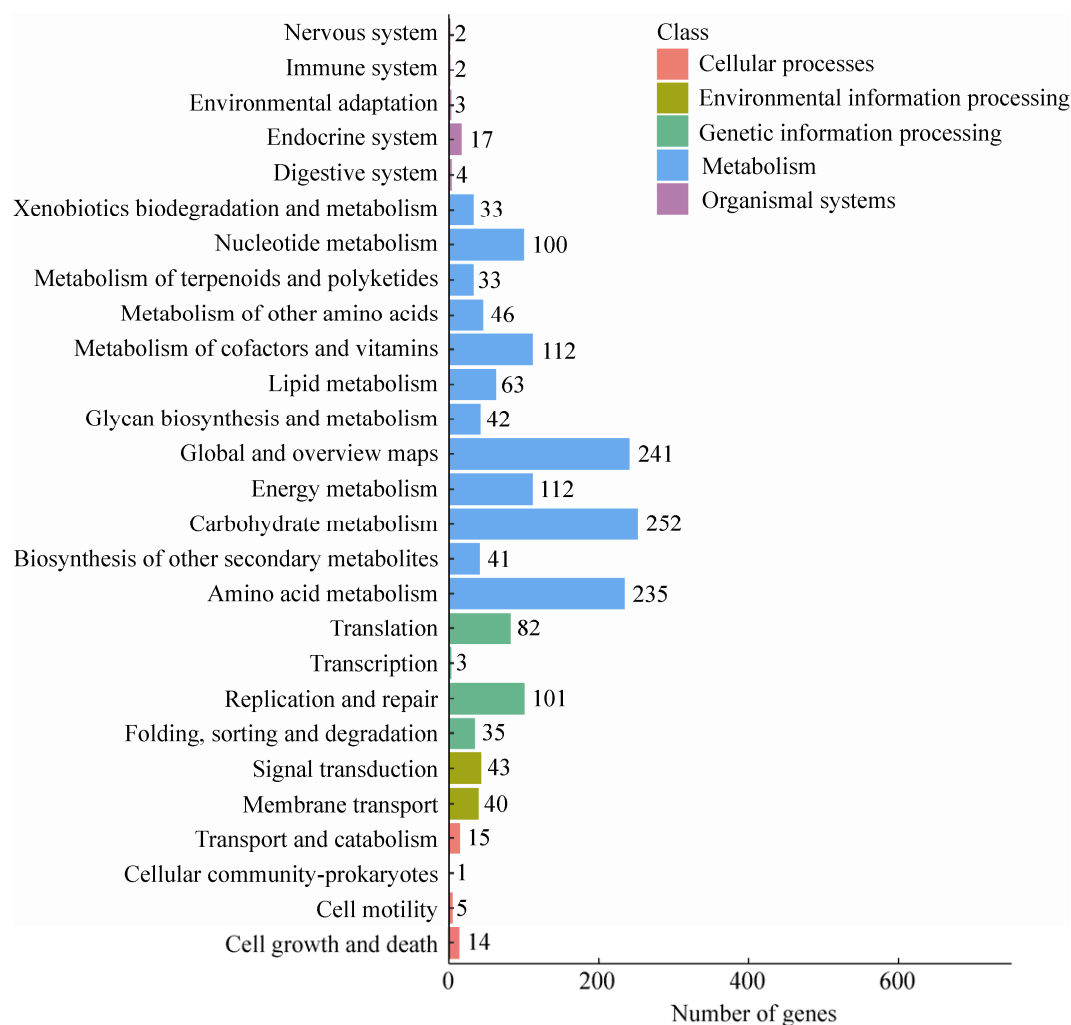


图3 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 基因组 KEGG 数据库注释结果

Figure 3 The annotation result of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 genome against KEGG database.

## 2.4 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 产酶优化结果

优化结果表明,最初随着培养时间的延长,ZHDP1 菌株的上清液蛋白酶活性开始增加,但是当培养时间超过 35 h 时,上清液中的蛋白酶活性开始急剧下降,因此,35 h 是最佳的产酶培养时间(图 5D);适当提高培养温度有利于 ZHDP1 菌株的蛋白酶产酶量,但是过高的培养温度(>40 °C)会明显抑制上清液中的产酶量,而 35 °C 是最佳的产酶培养温度(图 5E);接种量也会影响 ZHDP1 菌株的蛋白酶产酶量,而且

最佳的接种量是 4%,过大的接种量会降低蛋白酶产量,如 12%的接种量导致酶产量降低了约 2/3 (图 5F);培养基营养成分优化结果(图 5G、5H)表明,玉米粉作为额外的添加物可以明显提高 ZHDP1 菌株上清液中的蛋白酶产酶量,这证明了玉米粉既是最佳碳源又是最佳氮源;摇床转速是影响 ZHDP1 菌株上清液中蛋白酶产量的另一个重要因素,而且 100 r/min 有利于获得最大的蛋白酶产量(图 5I),但是 250 mL 摇瓶载液量却对 ZHDP1 菌株蛋白酶产量无明显影响(图 5J)。

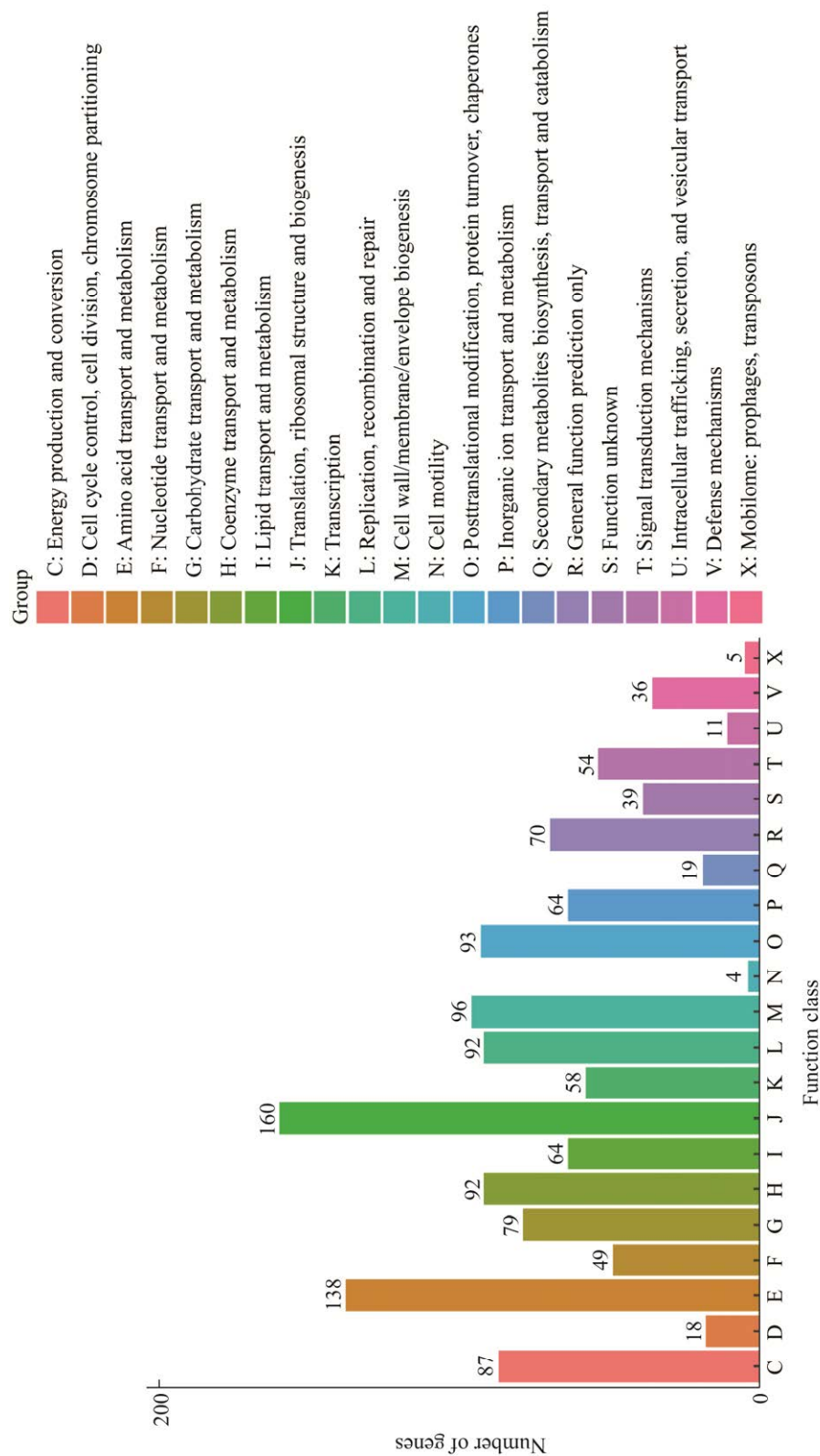


图 4 *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 基因组 COG 数据库注释结果

Figure 4 The annotation result of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1 genome against COG database.



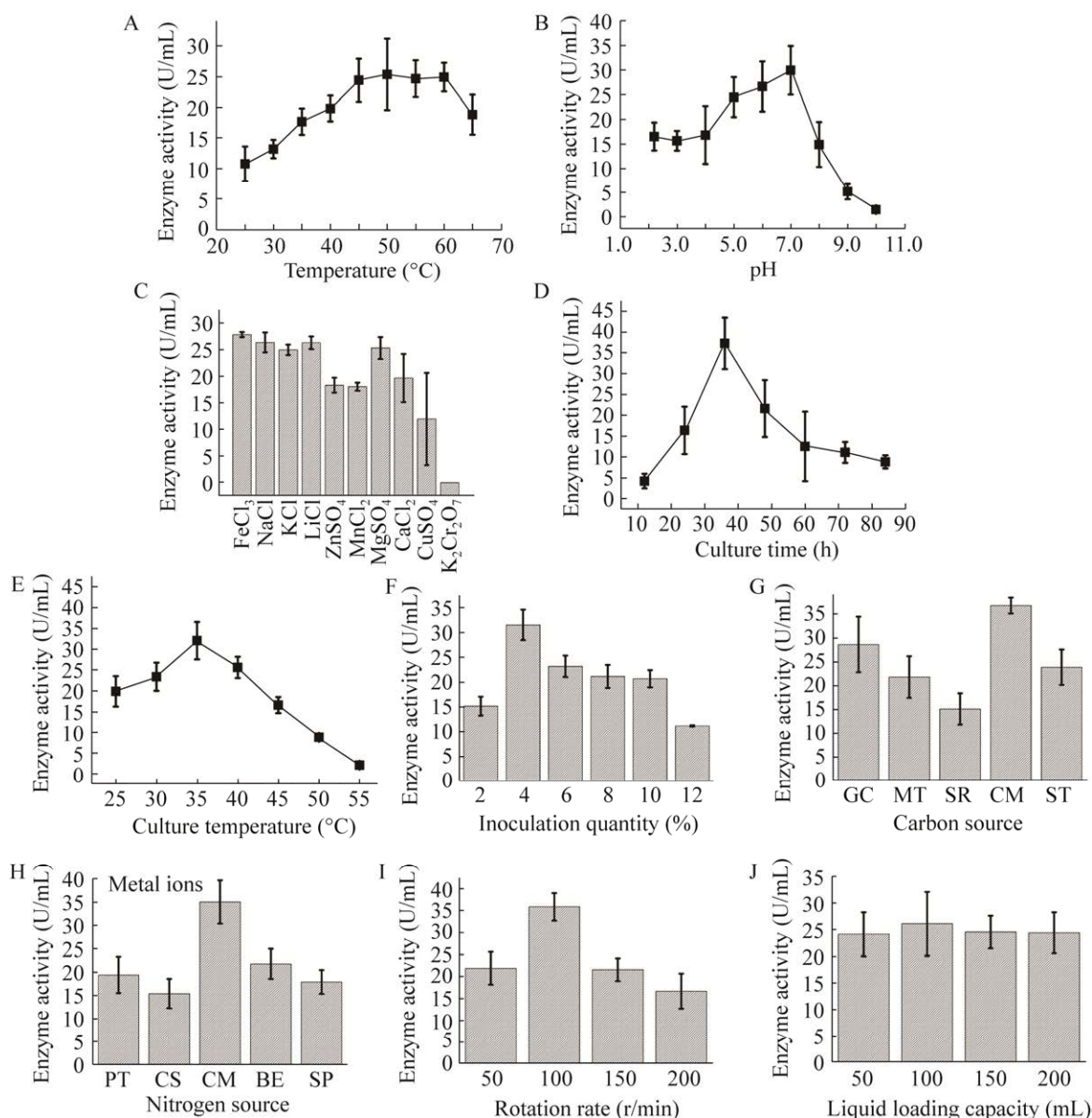


图 5 金黄杆菌 *Chryseobacterium* sp. ZHDPI 蛋白酶活性与产量优化 A: 温度对酶活性的影响; B: pH 对酶活性的影响; C: 金属盐离子对酶活性的影响; D: 培养时间对产酶量的影响; E: 培养温度对产酶量的影响; F: 接种量对产酶量的影响; G: 碳源对产酶量的影响; H: 氮源对产酶量的影响; I: 转速对产酶量的影响; J: 载液量对产酶量的影响。图中 GC、MT、SR、CM、ST、PT、CS、BE 和 SP 分别为葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、玉米粉、淀粉、蛋白胨、酪蛋白、牛肉膏浸提物和黄豆粉的缩写

Figure 5 The optimization of protease activity and production of *Chryseobacterium* sp. ZHDPI. A: The temperature effect on the protease activity; B: The pH effect on the protease activity; C: The metal ion effect on the protease activity; D: The culture time effect on the protease production; E: The culture temperature effect on the protease production; F: The inoculation quantity effect on the protease production; G: The carbon source effect on the protease production; H: The nitrogen source effect on the protease production; I: The rotation rate effect on the protease production; J: The liquid loading capacity effect on the protease production. GC: Glucose; MT: Maltose; SR: Sucrose; CM: Cornmeal; ST: Starch; PT: Peptone; CS: Casein; BE: Beef extract; SP: Soybean powder.

### 3 讨论与结论

本研究报道了一株金黄杆菌属 (*Chryseobacterium* sp.) ZHDP1 的完整基因组序列。基于 ANI 和 DDH 指数的评估, 该菌株的基因组属于新型基因组序列<sup>[12,15]</sup>。尽管 NCBI 基因组数据库中(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)已经存在许多金黄杆菌属菌株的基因组, 但是包括 ZHDP1 菌株近源物种在内的基因组信息仍旧较为缺乏。根据 16S rRNA 基因序列系统发育分析结果, *C. gambrini* 为 ZHDP1 菌株的近源物种, 但是 NCBI genome 数据库中仅有的 2 株 *C. gambrini* 菌株基因组的组装水平均只为“contig”。这种片段化的组装水平不足以完整揭示菌株的功能信息。因此, 本文提供了一种新型、完整的基因组序列信息, 为金黄杆菌属生态功能、生理机制及应用价值的深入研究奠定了基础。

在之前的研究中, 研究人员基于基因组序列对 4 株金黄杆菌属菌株的角蛋白降解与代谢途径进行了研究<sup>[8]</sup>。结果表明, 在包括 *Chryseobacterium* sp. KMC2、*C. camelliae* Dolsongi-HT1、*C. sp.* P1-3 和 *C. gallinarum* DSM 27622 在内的金黄杆菌菌株中均注释到大量氨基酸代谢功能相关的基因, 相对丰度均很高。这些基因可能参与了角蛋白降解产物代谢和相关次生代谢产物合成<sup>[8]</sup>。本研究也揭示了同样的结果, KEGG 和 COG 数据库的注释结果同时说明了在 ZHDP1 菌株基因组中含有丰富的氨基酸代谢基因。该结果表明 ZHDP1 菌株具有较为发达的氨基酸转运与代谢系统, 能够顺利地转化与利用其蛋白酶的降解产物。

本文对 ZHDP1 菌株上清液中蛋白酶活性的优化与产量优化结果表明, 其最适反应温度和 pH 值分别为 50 °C 和 7.0, 而且具有较宽的温度作用范围 45–60 °C。另外, ZHDP1 菌

株产酶的最佳条件为培养温度 35 °C、培养时间 35 h、接种量 4%、玉米粉作为碳源和氮源及摇床转速 100 r/min。经过上述条件优化, ZHDP1 菌株上清液中最高蛋白酶活性可达到 (37.3±6.2) U/mL。该活性已超过若干同属的菌株, 如 *C. taeanense* TKU001 (0.14 U/mL)<sup>[9]</sup>、*C. proteolyticum* 9670 (0.16 U/mL)<sup>[16]</sup>、*C. indologenes* TKU014 (0.47 U/mL)<sup>[17]</sup>、*C. sp.* kr6 (33.2 U/mL)<sup>[18]</sup> 和 *C. cucumeris* SARJS-2 (31.7 U/mL)<sup>[19]</sup>等。此外, ZHDP1 菌株所产蛋白酶在 45–60 °C 和 pH 5.0–7.0 的范围内具有较强的活性, 可以一定程度地适应粗放型工业生产条件。由此可见, ZHDP1 菌株的蛋白酶产酶能力使其在工业生产中具有一定的应用价值。同时, 近年来的研究表明, 蛋白酶不仅可以应用于工业、医药等实际生产领域, 同时还与细菌的致病机理关系密切。例如, 有研究对副结核分枝杆菌蛋白酶 MAP1068 进行表达、活性测定与优化, 结果证明其具有明显的蛋白质大分子降解活性, 并且该蛋白还具有一定的致病性, 能够引起小鼠的病理损伤<sup>[20]</sup>。因此, 除证明 ZHDP1 菌株在蛋白酶相关领域的应用潜力外, 本研究所获得的酶活性作用条件与产酶条件结果还有助于阐释该菌株潜在的致病机理。

### REFERENCES

- [1] Nicholson AC, Gulvik CA, Whitney AM, Humrighouse BW, Bell ME, Holmes B, Steigerwalt AG, Villarma A, Sheth M, Batra D, et al. Division of the genus *Chryseobacterium*: observation of discontinuities in amino acid identity values, a possible consequence of major extinction events, guides transfer of nine species to the genus *Epilithonimonas*, eleven species to the genus *Kaistella*, and three species to the genus *Halpernia* gen. nov., with description of *Kaistella daneshvariae* sp. nov. and *Epilithonimonas vandammei* sp. nov. derived from clinical specimens[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(8): 4432-4450

- [2] Dahal RH, Chaudhary DK, Kim DU, Pandey RP, Kim J. *Chryseobacterium antibioticum* sp. nov. with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, isolated from Arctic soil[J]. The Journal of Antibiotics, 2021, 74(2): 115-123
- [3] Kämpfer P, Dreyer U, Neef A, Dott W, Busse HJ. *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(Pt1): 93-97
- [4] Park MS, Jung SR, Lee KH, Lee MS, Do JO, Kim SB, Bae KS. *Chryseobacterium soldanellicola* sp. nov. and *Chryseobacterium taeanense* sp. nov., isolated from roots of sand-dune plants[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(Pt 2): 433-438
- [5] Lin JN, Lai CH, Yang CH, Huang YH, Lin HF, Lin HH. Comparison of four automated microbiology systems with 16S rRNA gene sequencing for identification of *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia* species[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 13824
- [6] Gurav RG, Jadhav JP. Biodegradation of keratinous waste by *Chryseobacterium* sp. RBT isolated from soil contaminated with poultry waste[J]. Journal of Basic Microbiology, 2013, 53(2): 128-135
- [7] Wang SL, Liang YC, Liang TW. Purification and characterization of a novel alkali-stable  $\alpha$ -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(3): 745-750
- [8] Kang DR, Shoaie S, Jacquiod S, Sørensen SJ, Ledesma-Amaro R. Comparative genomics analysis of keratin-degrading *Chryseobacterium* species reveals their keratinolytic potential for secondary metabolite production[J]. Microorganisms, 2021, 9(5): 1042
- [9] Wang SL, Yang CH, Liang TW, Yen YH. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3700-3707
- [10] Qu W, Hong GL, Zhao J. Degradation of malachite green dye by *Tenacibaculum* sp. HMG1 isolated from Pacific deep-sea sediments[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2018, 37(6): 104-111
- [11] Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Göker M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 352-356
- [12] Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(Pt 1): 81-91
- [13] Hongoh Y, Yuzawa H, Ohkuma M, Kudo T. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 221(2): 299-304
- [14] 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(10): 1035-1041  
Zhu FZ, Chen LY, Chen HC. Identification of pathogenic microorganism by sequencing 16S rRNA gene[J]. Journal of Central South University: Medical Science, 2013, 38(10): 1035-1041 (in Chinese)
- [15] Yoon SH, Ha SM, Lim J, Kwon S, Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(10): 1281-1286
- [16] Yamaguchi S, Yokoe M. A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3337-3343
- [17] Wang SL, Hsu WT, Liang TW, Yen YH, Wang CL. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5679-5686
- [18] Riffel A, Brandelli A, De M Bellato C, Souza GHMF, Eberlin MN, Tavares FCA. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 128(3): 693-703
- [19] Bhavikatti JS, Bodducharl SM, Kamagond RS, Desai SV, Shet AR. Statistical optimisation of protease production using a freshwater bacterium *Chryseobacterium cucumeris* SARJS-2 for multiple industrial applications[J]. 3 Biotech, 2020, 10(6): 1-17
- [20] 王忠星, 党光辉, 刘虹秀, 臧鑫鑫, 崔莹莹, 崔子寅, 宋宁宁, 陈利苹, 刘思国. 副结核分枝杆菌 MAP1068 胞外蛋白酶的特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(5): 505-508  
Wang ZX, Dang GH, Liu HX, Zang XX, Cui YY, Cui ZY, Song NN, Chen LP, Liu SG. The activity of extracellular MAP1068 protease from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(5): 505-508 (in Chinese)