

## 研究报告

## 水貂源高产蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及酶学性质

于德涛, 李纪元, 刘烁, 任建炜, 徐航, 温建新\*

青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109

于德涛, 李纪元, 刘烁, 任建炜, 徐航, 温建新. 水貂源高产蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4078-4089.

YU Detao, LI Jiyuan, LIU Shuo, REN Jianwei, XU Hang, WEN Jianxin. Isolation, identification, and enzymatic characterization of *Bacillus subtilis* from mink[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4078-4089.

**摘要:** 【背景】开发、筛选优良益生菌菌种是当下畜牧业的研究热点, 益生菌的潜在功能也被广为挖掘。【目的】分离、筛选具有良好耐受性且高产胞外蛋白酶的菌株, 研究其生物学特性和酶学性质, 为后续微生物蛋白酶的制备和微生态制剂的开发提供菌种资源。【方法】采集健康水貂新鲜粪便, 配制酪蛋白培养基初筛和优化 Folin-酚法复筛, 对筛选菌进行生物学特性研究, 获得产蛋白酶能力较强、耐受性较优的菌株, 并进行常规鉴定和分子生物学鉴定, 最后对蛋白酶酶学性质进行研究。【结果】筛选得到一株高产蛋白酶、耐受性较优的芽孢杆菌, 经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 编号为 3。在初始发酵培养基条件下, 酶学性质研究结果表明, 该蛋白酶的最适反应温度为 70 °C, 最适反应 pH 值为 9.0, 最佳金属离子激活剂为 K<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>和 Fe<sup>2+</sup>对酶活力有明显的抑制作用, 在 20%浓度的有机溶剂作用时蛋白酶未变性失活。【结论】从水貂粪便中分离获得一株具有良好的生物学特性、酶学性质和碱性蛋白酶活性的枯草芽孢杆菌, 为该菌株在实际生产应用中提供了基础保障。

**关键词:** 蛋白酶; 水貂; 芽孢杆菌; 酶学性质

资助项目: 山东省现代农业产业体系特种经济动物产业体系项目(SDAIT-21-13)

This work was supported by the Modern Agricultural Industrial System Project of Shandong Province Special Economic Animal Industrial System (SDAIT-21-13).

\*Corresponding author. E-mail: wenjianxin@126.com

Received: 2023-04-14; Accepted: 2023-05-22; Published online: 2023-06-16

## Isolation, identification, and enzymatic characterization of *Bacillus subtilis* from mink

YU Detao, LI Jiyuan, LIU Shuo, REN Jianwei, XU Hang, WEN Jianxin\*

College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

**Abstract:** [Background] The development and screening of elite probiotics is the research hotspot of animal husbandry, and the potential function of probiotics has been extensively explored. [Objective] To isolate and screen the strains with good tolerance and high yield of extracellular protease and study their biological and enzymatic properties, so as to provide strain resources for the preparation of microbial protease and the development of microecological preparations. [Methods] Fresh feces samples were collected from healthy minks, from which the target strains were preliminarily screened with casein-containing medium and re-screened with optimized Folin method. The biological characteristics of the strains screened out were studied. The strains with high protease yield and good tolerance were obtained and identified by routine and molecular methods. Finally, the enzymatic properties of the protease were studied. [Results] A *Bacillus* strain with high protease yield and good tolerance was obtained and identified as *B. subtilis* (number 3). In the initial fermentation medium, the protease showed that the optimal reaction performance at 70 °C and pH 9.0, with the activity improved by  $K^+$  and inhibited by  $Cu^{2+}$  and  $Fe^{2+}$ . In addition, 20% organic solvent did not deactivate the protease. [Conclusion] A *B. subtilis* strain with good biological characteristics, enzymatic characterization, and alkaline protease activity was isolated from mink feces. The findings of this study provide a basis for the production and application of this strain.

**Keywords:** protease; mink; *Bacillus* sp.; enzymatic characterization

蛋白酶按来源可划分为微生物蛋白酶、动物蛋白酶和植物蛋白酶, 其中微生物蛋白酶在实际生产、稳定性和特异性等方面具有独特的优越性, 成为商业和工业酶制剂的主要来源<sup>[1-3]</sup>。由于具有高产蛋白酶的芽孢杆菌属细菌对不良环境具有一定抗性, 已成为筛选能够适应特殊环境的微生物酶制剂的优选菌属<sup>[4-6]</sup>。

目前, 研究较多的产酶芽孢杆菌主要有枯草芽孢杆菌<sup>[7]</sup>、贝莱斯芽孢杆菌<sup>[8]</sup>和地衣芽孢杆菌<sup>[9]</sup>, 这类菌株易于分离、发酵工艺相对简单、产酶能力较强, 但在菌株繁殖发酵过程存在酶活

不稳定和受外界环境、温度和 pH 影响较大等难题, 直接影响到酶活力的提升和生产应用<sup>[10-11]</sup>。因此, 菌株筛选不单单要考虑产酶能力, 其对外环境的抗逆性和对机体消化液耐受性也应考虑在内, 以满足蛋白酶生产工业化和商业化的更高要求。

有关从水貂粪便中分离高产蛋白酶菌株的研究相对较少。本试验从水貂粪便中分离筛选生物学特性表现良好、高产蛋白酶的菌株, 并对其酶学性质进行研究, 以期水貂及畜禽养殖业提供菌种资源, 为蛋白酶制剂的开发利用

提供不同来源研究对象。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

粪样采集于青岛胶州某水貂养殖合作社的健康水貂新鲜粪便。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

干酪素、L-tyrosine、三氯乙酸、福林酚, 国药集团化学试剂有限公司。酶标仪, 西安昊兴生物科技有限公司; 紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 冷冻高速离心机, Sigma-Aldrich 公司。引物由青岛蔚来生物科技有限公司合成。

#### 1.1.3 培养基

酪蛋白固体培养基(g/L): 干酪素 1.0, 营养琼脂 3.3。调节 pH 值至 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

淀粉酶筛选培养基(g/L): 可溶性淀粉 1.0, 营养琼脂 3.3。调 pH 值为 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

牛肉膏蛋白胨液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 氯化钠 5.0。

牛肉膏蛋白胨固体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0。

初始发酵培养基同牛肉膏蛋白胨液体培养基。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 水貂粪样处理

无菌操作取新鲜粪样 1.0 g, 置于适量无菌生理盐水中, 37 °C、200 r/min 振荡 20 min 使其充分混匀后, 置于 75 °C 水浴处理 15 min, 杀死非芽孢菌体后 900 r/min 离心 10 min, 使粪样中杂质沉淀。

#### 1.2.2 产蛋白酶芽孢杆菌初筛

粪样处理后原液作 1 000 倍稀释, 无菌吸取上清液 100  $\mu$ L, 无菌均匀涂布于酪蛋白固体培养基, 37 °C 培养 48 h。

经初筛得到水解圈直径/孔径( $H/C$ )比值较大的菌株, 接入初始发酵培养基, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 制作种子培养液。取种子培养液以 10% (体积分数)的接种量接种至装液量为 50 mL/150 mL 的初始发酵培养基中, 37 °C、200 r/min 继续培养 48 h 得到菌株发酵液, 于 4 °C、10 000 r/min 高速离心 10 min 制得粗酶液。

使用无菌 1 000  $\mu$ L 移液枪枪头(直径为 8 mm)在酪蛋白固体培养基中央打孔, 孔内加入粗酶液 100  $\mu$ L。使用打孔法对出发菌株进行产酶能力初步测评, 37 °C 温箱中静置培养 48 h, 观察是否存在乳白色水解环并计算水解环( $H$ )与菌落的直径( $C$ )比值。

#### 1.2.3 产蛋白酶芽孢杆菌复筛

初始条件(40 °C, pH 7.0)下, 取粗酶液检测蛋白酶活力进行复筛。

#### 1.2.4 复筛菌株产蛋白酶能力的定量分析

##### 1) L-酪氨酸标准曲线绘制

参照国标 GB/T 28715—2012<sup>[12]</sup>、GB/T 23527—2009 描述方法<sup>[13]</sup>并加以改良, 建立 L-酪氨酸的标准曲线(表 1)。

每管 3 个平行, 如表 1 加入各溶液, 振荡混匀, 随后在恒温水浴锅中(40.0 $\pm$ 0.2) °C 保温发色 20 min。反应完成后使用 10 mm 比色皿, 以不含酪氨酸的 0  $\mu$ g/mL 为空白管调零, 在波长 680 nm 下测量 L-酪氨酸的吸光值, 测量 3 次, 取平均值。根据分光光度计所得的数据制作线性回归方程, 吸光度为 1 时对应的 L-酪氨酸含量( $\mu$ g)就是所求的吸光常数  $K$  的值。

##### 2) 体外蛋白酶酶活测定(Folin-酚法)

样品管(3 个重复): 粗酶液 1 mL, 40 °C 预热 5 min。1%酪蛋白溶液 1 mL, 同样 40 °C 预热 5 min。二者混合, 40 °C 水浴 10 min, 准确、迅速加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA), 摇匀; 空白管(3 个重复): 先加 2 mL

表 1 L-酪氨酸的标准曲线绘制

Table 1 Standard curve plot of L-tyrosine

No.	Tyrosine standard solution concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Water addition volume (mL)	Final tyrosine concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.4 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (mL)	Folin reagent (mL)
0	0	10	0	5	1
1	1	9	10	5	1
2	2	8	20	5	1
3	3	7	30	5	1
4	4	6	40	5	1
5	5	5	50	5	1

0.4 mol/L TCA, 其他步骤与样品管相同。将样品管和空白管取出后 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL, 先加 0.4 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 5 mL 混匀, 后加 Folin-酚溶液 1 mL 混匀, 40 °C 保温发色 20 min。以去离子水调零, 使用 10 mm 比色皿测定样品管和空白管的吸光度  $OD_{680}$ 。在最适条件下(温度和 pH), 1 min 内粗酶液水解底物酪蛋白能产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸产物所需的酶量即定义为一个酶活力单位(1 U=1  $\mu\text{g}$  酪氨酸/min)。

$$X = \Delta OD_{680} \times K \times V / T \times n$$

式中:  $X$  为酶活力(U/mL);  $\Delta OD_{680}$  为样品管吸光度与空白管吸光度差值;  $K$  为酪氨酸标准曲线吸光常数;  $V$  为反应体积(mL);  $T$  为反应时间(min);  $n$  为稀释倍数。

### 1.2.5 菌株鉴定

#### 1) 菌株形态学观察及生理生化鉴定

将纯化后的单菌落接种牛肉膏蛋白胨固体培养基, 37 °C 静置培养 48 h, 观察菌落特征并进行革兰氏染色镜检, 生理生化鉴定使用 HBI 芽孢杆菌生化鉴定条对菌株进行若干项生化鉴定。

#### 2) 菌株分子生物学鉴定

采用细菌 16S rRNA 基因上游引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和下游引物 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(30  $\mu\text{L}$ ): Mix 酶 15  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , DNA

模板 3  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{L}$ 。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。将条带在 1 500 bp 左右的 PCR 产物进行测序, 并将测序结果于 NCBI-BLAST 进行序列比对, 运用 MEGA 11 构建系统发育树, 并做同源性比较。

#### 3) 生长曲线测定

将原始菌悬液等量接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基, 接种量为 10%, 37 °C、200 r/min 振荡培养。每次无菌吸取 200  $\mu\text{L}$  菌液, 测定 0-24 h 的  $OD_{600}$  值, 绘制菌株生长曲线。

### 1.2.6 菌株生物学特性

#### 1) 耐胆盐试验

将原始菌液以 10% 接种量分别接种至含 0.1%、0.2% 和 0.3% 猪胆盐的牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 振荡培养, 无菌吸取 200  $\mu\text{L}$  菌悬液测定处理 24 h 的  $OD_{600}$  值。设置不含猪胆盐培养组(0%)作为对照组。相对存活率(relative survival rate, RS)计算公式:

$$RS (\%) = (\text{试验组} / \text{对照组}) \times 100$$

式中: 试验组为 0.1%、0.2% 和 0.3% 猪胆盐浓度的  $OD_{600}$  值; 对照组为不含猪胆盐培养组(0%)时的  $OD_{600}$  值。

#### 2) 不同 pH 梯度敏感性试验

将原始菌液以 10% 接种量分别接种至 pH 值为 2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 的牛肉膏蛋白

胨培养基中,于 37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 无菌吸取 200  $\mu$ L 菌悬液测定  $OD_{600}$  值, 计算相对存活率。设置正常 pH 培养组[pH 值(7.00 $\pm$ 0.02)]作为对照组。

### 3) 耐肠液试验

将原始菌液以 10%接种量接种人工模拟肠液中, 于 37 °C、200 r/min 振荡培养, 无菌吸取 200  $\mu$ L 菌悬液测定 1–5 h 和 12 h 时  $OD_{600}$  值。设置不含人工肠液培养组作为对照组。

### 4) 耐热试验

将原始菌液以 10%接种量接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 分别在 80 °C 水浴中处理 5、10 和 15 min, 迅速冷却至室温, 于 37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 无菌吸取 200  $\mu$ L 菌悬液测定  $OD_{600}$  值, 计算相对存活率。设置正常温度培养组(37 °C)作为对照组。

### 5) 打孔法对胞外酶活性初步定性

无菌吸取经初筛获得的菌株培养液, 4 °C、10 000 r/min 高速离心 10 min 后取上清液 100  $\mu$ L 移入淀粉酶筛选培养基, 37 °C 培养 48 h, 观察菌落周围水解圈情况。淀粉酶筛选培养基需滴加碘液观察。

## 1.2.7 酶学性质研究

### 1) 蛋白酶最适反应温度

1%酪蛋白溶液与粗酶液等体积混合, 在不同水浴温度(30、40、50、60、70 和 80 °C)下精确反应 10 min, 预热温度和发色温度 40 °C 保持不变, 测定酶活力。

### 2) 蛋白酶最适反应 pH

配制 pH 值为 7.0、8.0、9.0 和 10.0 的 1% 酪蛋白溶液和粗酶液。此处, 粗酶液作 2 倍稀释后取 1 mL 进行酶促反应。在最适反应温度条件下, 测定粗酶液中蛋白酶的酶活力。缓冲液使用 pH 7.0–8.0 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、pH 9.0–10.0 硼砂-氢氧化

钠缓冲液。

### 3) 金属离子对蛋白酶活力的影响

配制浓度为 1 mmol/L 的 KCl、NaCl、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub> 和 CuSO<sub>4</sub> 溶液, 取上述金属离子溶液 1 mL 与粗酶液等体积混合, 终浓度为 0.5 mmol/L, 设置对照组为等体积无菌去离子水。取 1 mL 粗酶液在最适温度和最适 pH 条件下测定酶活力。

### 4) 有机溶剂对蛋白酶活性的影响

配制浓度为 20%的甲醇(MeOH)、异丙醇(EtOH)、乙醇(IPA)、正辛酸(OA)溶液。取上述有机溶剂 1 mL 与粗酶液等体积混合, 设置对照组为不加有机溶剂。取 1 mL 粗酶液在最适温度和最适 pH 条件下测定酶活力。

## 2 结果与分析

### 2.1 L-酪氨酸标准曲线

参照 1.2.4 所测数据结果可得, L-酪氨酸标准曲线回归方程为  $y=0.01x+0.0049$ , 相关系数  $R^2$  为 0.9989, L-酪氨酸浓度  $C$  和吸光度  $OD_{680}$  之间的线性关系表现良好, 可通过 Folin-酚法来测定菌株蛋白酶酶活(图 1)。

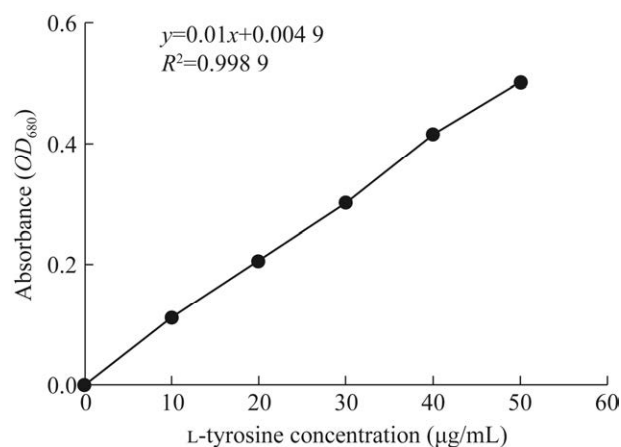


图 1 L-酪氨酸标准曲线

Figure 1 L-tyrosine standard curve.

## 2.2 筛选结果

以干酪素为底物作初筛培养基, 得到  $H/C$  比值为 5.1 (图 2), Folin-酚法测得初始酶活为 24.9 U/mL。

本试验初筛得到 10 株可产生水解圈的菌株, 初筛使用打孔法测评 10 株菌产酶能力, 后通过 Folin-酚法复筛, 结果表明蛋白酶活力的强弱与水解圈大小并不成正比。因此, 打孔法初筛仅可作为一种筛选产蛋白酶菌株的初步定性鉴定方法。

菌株 3 经初筛和复筛多次重复验证结果比较稳定, 水解圈产生明显, 用作后续试验菌株。

## 2.3 菌株鉴定

### 2.3.1 菌株形态学鉴定及生理生化鉴定结果

菌株 3 菌落形态为乳白色、不规则的近圆形, 表面有褶皱、质地黏稠, 革兰氏染色呈阳性短杆菌(图 3)。

生理生化鉴定结果如表 2 所示: V-P 试验阴性, 可利用柠檬酸盐、L-阿拉伯糖, 可使明胶液化、还原硝酸盐、水解淀粉, 说明该菌株具有产蛋白酶和淀粉酶的能力。

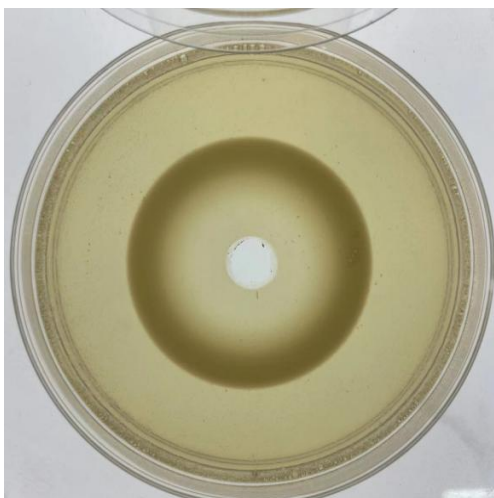


图 2 菌株 3 打孔法初筛结果

Figure 2 Preliminary screening results of strain 3 perforating method.

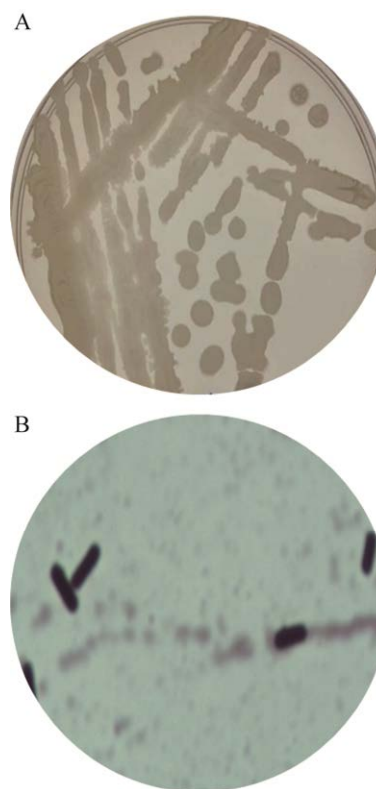


图 3 菌株 3 菌落形态(A)及细胞镜检形态(1 000×)(B)

Figure 3 Colony morphology of strain 3 (A) and cell microscopic morphology (1 000×) (B).

表 2 菌株 3 生化鉴定试验结果

Table 2 Strain 3 biochemical identification test results

Test items	Result
V-P	—
Citrate	+
Propionate	—
D-xylose	+
L-arabinose	+
D-mannitol	+
Gelatin liquefaction	+
7% sodium chloride growth	—
pH 5.7 growth	+
Nitrate reduction	+
Starch hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

### 2.3.2 菌株 3 分子生物学鉴定结果

将测序结果与已知菌株基因序列进行 NCBI-BLAST 比对分析,并使用 MEGA 11 软件构建系统发育树。结果显示菌株 3 的 16S rRNA 基因序列(946 bp)与已知的菌株 *Bacillus subtilis* 处于系统发育树同一分支(图 4), 菌株 3 和 *Bacillus subtilis* strain IM6 (MZ434952)亲缘关系最近, 为 99.58%。结合形态学鉴定及生理生化鉴定结果最终鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

### 2.3.3 生长曲线测定结果

菌株 3 在 2 h 后进入对数期, 活菌数极速增长, 对数期持续约 6 h 进入稳定期, 稳定期约从 8 h 持续至 16 h, 随着稳定期发展, 活菌

数与培养时间成反比, 开始进入衰亡期(图 5)。

## 2.4 生物学特性

### 2.4.1 耐胆盐试验结果

菌株 3 在 0.1%、0.2%和 0.3%胆盐浓度下处理 24 h, 以不添加胆盐(0)处理后的吸光度为对照组, 菌株生长速度受胆盐浓度抑制效果明显; 在 0.1%胆盐浓度中处理 24 h 后, 相对存活率为 86%;而在 0.2%–0.3%胆盐浓度中处理 24 h 后, 相对存活率为 62%和 54% (图 6)。因此, 菌株 3 在胆盐浓度为 0.2%以下时菌活力相对稳定。

### 2.4.2 pH 耐受性试验结果

菌株生长繁殖及发挥自身机能受所处环境的 pH 条件影响很大。菌株 3 在不同 pH 条件下处理 24 h, 以 pH 值 7.0 处理 24 h 后的吸光

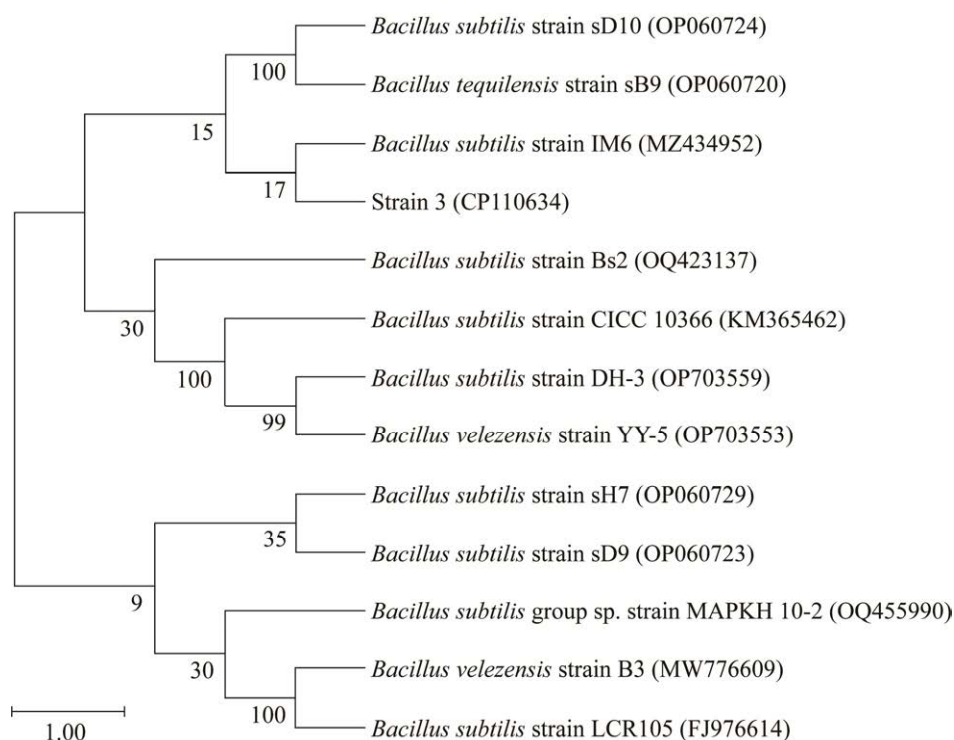


图 4 菌株 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 标尺代表遗传距离; 括号内编号代表菌株 GenBank 登录号; 进化树分支上的数字代表亲缘关系的远近

Figure 4 Phylogenetic tree of strain 3 based on 16S rRNA gene sequence. The scale represents genetic distance; The numbers in brackets represents the strain GenBank accession number; The numbers on the branches of the evolutionary tree represent the proximity of relatives.



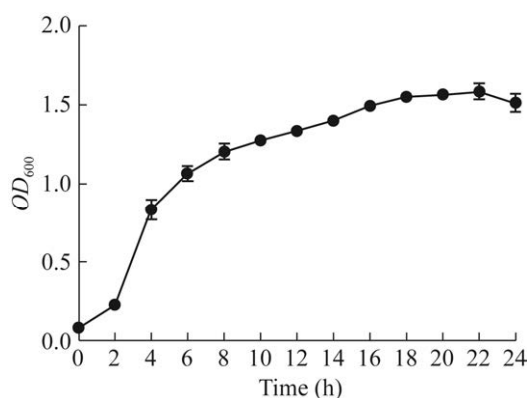


图 5 菌株 3 生长曲线

Figure 5 Growth curve of strain 3.

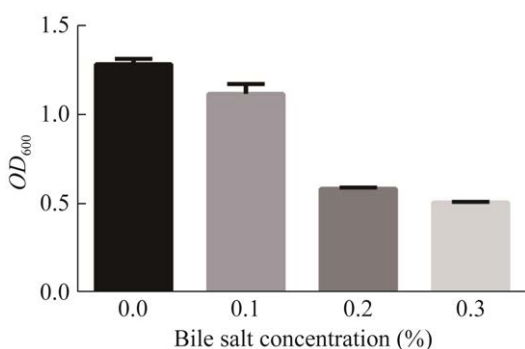


图 6 胆盐耐受性

Figure 6 Bile salt tolerance.

度为对照组, 菌株 3 在 pH 值 6.0 和 pH 8.0 的偏中性环境中生长状态最佳, 处理 24 h 后相对存活率为 93% 和 100%; pH 值 2.0、4.0 和 10.0 处理 24 h 后, 相对存活率分别为 62%、78% 和 59% (图 7)。因此, 菌株 3 适合在中性和偏中性环境下生长, 但对强酸弱碱也具有良好抗性。

#### 2.4.3 耐肠液试验结果

菌株 3 在人工肠液环境中生长状态良好, 生长速度明显优于对照组, 对人工模拟肠液环境完全耐受(图 8)。

#### 2.4.4 耐热试验结果

菌株 3 在同一水浴温度、不同水浴时间条件下处理 24 h, 以 37 °C 正常培养 24 h 后的吸光度为对照组, 菌株 3 在 80 °C 水浴 5、10 和

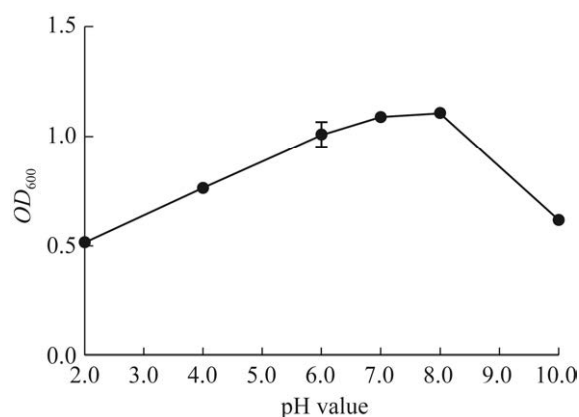


图 7 不同 pH 值耐受性

Figure 7 Different pH value tolerance.

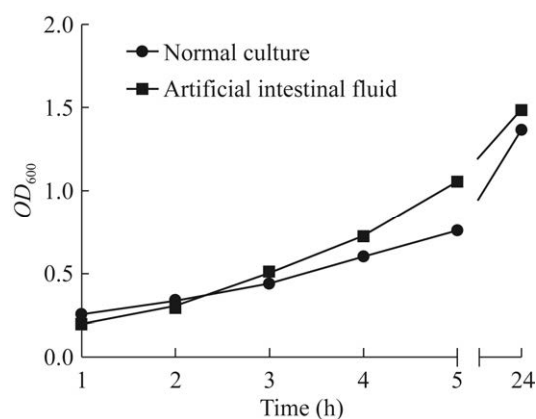


图 8 人工肠液耐受性

Figure 8 Artificial intestinal fluid tolerance.

15 min 处理 24 h 后相对存活率为 100%, 耐热性极强(图 9)。因此, 菌株 3 可在高温环境作业, 有作为饲料益生菌的潜力。

#### 2.4.5 胞外酶初步定性试验结果

培养 48 h 后加入碘液, 可观察到明显的淀粉水解圈, 水解圈直径为 5.8 cm, H/C 比值为 7.2。说明菌株 3 对淀粉也具有一定的水解能力, 但淀粉酶活力还需进一步研究(图 10)。

### 2.5 酶学性质

#### 2.5.1 最适反应温度

该枯草芽孢杆菌蛋白酶在反应温度为 30–80 °C 之间均有活性; 在 70 °C 时, 酶活最高



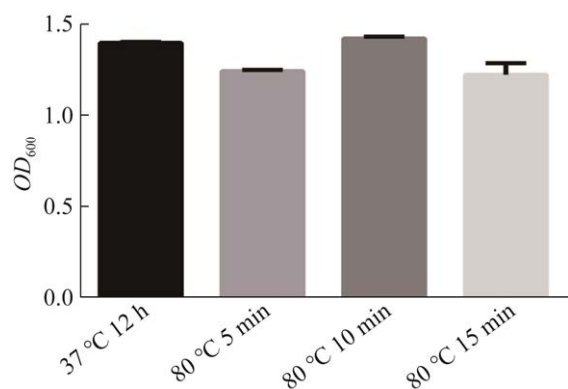


图9 耐热性

Figure 9 Heat resistance.

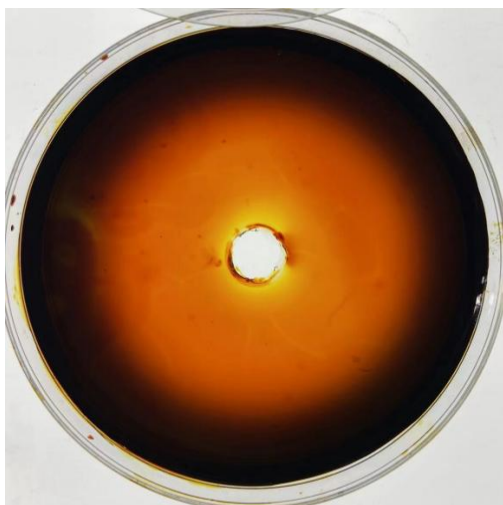


图10 解淀粉水解圈

Figure 10 Hydrolysis circle of starch.

为 39.4 U/mL, 在 50 °C 和 60 °C 时也保持较高活性; 随着温度升高, 蛋白酶活力开始下降(图 11)。由此可见, 该蛋白酶的最适反应温度为 70 °C, 属于耐高温蛋白酶, 该蛋白酶的适用温度范围较广。

### 2.5.2 最适反应 pH

该枯草芽孢杆菌蛋白酶的最适反应 pH 值为 9.0, 酶活性最高为 90.99 U/mL, 属碱性蛋白酶; 在 pH 值大于 9.0 时, 酶活开始出现降低, 但仍保持较高的活性(图 12)。该蛋白酶适应 pH 范围较广, 在 pH 值 7.0–10.0 均有较高活性。

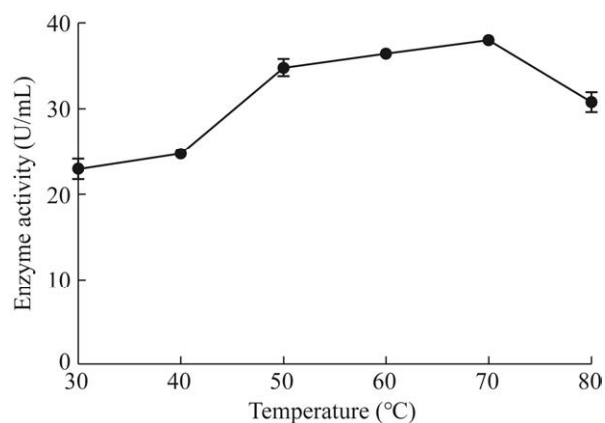


图11 蛋白酶最适反应温度

Figure 11 Protease optimal reaction temperature.

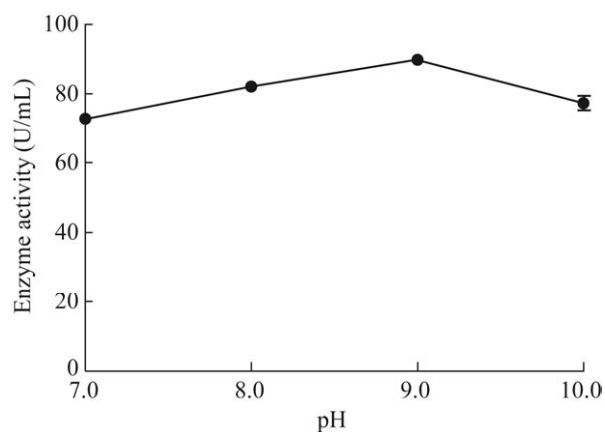


图12 蛋白酶最适反应 pH

Figure 12 Protease optimally reactive pH.

### 2.5.3 金属离子对蛋白酶活力的影响结果

以无菌去离子水为对照组, 添加  $K^+$  为最佳蛋白酶激活剂, 蛋白酶酶活力达到了 101.9 U/mL, 而  $Fe^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  对蛋白酶活性有很强的抑制作用(图 13)。

### 2.5.4 有机溶剂对蛋白酶活性的影响结果

以去离子水为对照组, 有机溶剂对蛋白酶活力的作用不表现出强烈的抑制作用(图 14)。在有机溶剂添加条件下, 蛋白酶并未变性失活, 说明该蛋白酶对低浓度甲醇、乙醇、异丙醇和正辛酸有一定抵抗能力。

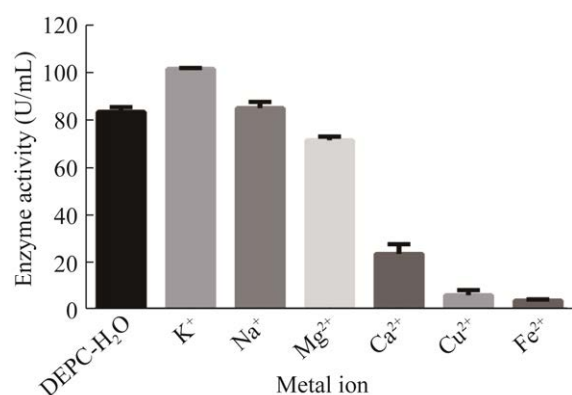


图 13 金属离子对蛋白酶活力的影响

Figure 13 Effect of metal ions on protease activity.

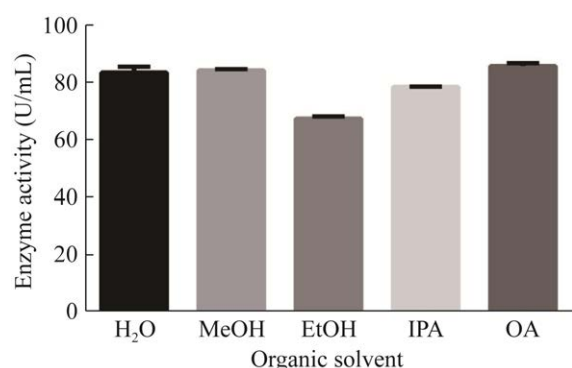


图 14 有机溶剂对蛋白酶活力的影响

Figure 14 Effect of organic solvent on protease activity.

### 3 讨论与结论

目前已分离和筛选的微生物大多来自土壤、水源和少部分的海洋,从水貂粪便中分离优良菌株的研究较少<sup>[14]</sup>。肠道微生物长期处在碱性、富含消化液、营养较为均衡以及与致病细菌斗争的环境中,其菌株对环境的耐受性和适应性更强,菌株显现出可产多种酶系。例如,Gu 等<sup>[15]</sup>从健康仔猪粪便分离到一株凝结芽孢杆菌株 CGMCC 9951,该菌株对强酸环境和高浓度胆盐广泛耐受,点接法测得该菌株对酪蛋白和淀粉均有一定的水解活性,但并未提及水解圈大小;齐鹏飞等<sup>[16]</sup>从健康驴新鲜粪便中分

离到两株枯草芽孢杆菌(LV1 和 LV2),它们都具有良好的抑菌活性和生物学特性,点接法胞外酶活性试验中两株菌在淀粉酶和蛋白酶筛选培养基周围均可产生水解圈,两株菌水解圈大小分别为 1.83 mm、3.5 mm 和 2.25 mm、3.17 mm,该学者并未对酶活力进行测定,其产酶能力强弱需进一步验证,而本试验打孔法测得菌株 3 的淀粉酶和蛋白酶水解圈大小为 72 mm 和 51 mm,菌落直径(孔径)一致,初筛结果更具参考性;Ulucay 等<sup>[17]</sup>从温泉中分离筛选能够产生水解酶能力的菌株,其胞外酶活性定性试验结果表明,分离菌株多数来源于枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌,是温泉中最易分离的菌株且同时具有产生淀粉酶和蛋白酶等多种酶的能力,与本试验从粪样中分离得到枯草芽孢杆菌有着相同的产酶类型。

本研究从健康水貂粪便中分离筛选到一株芽孢杆菌,经形态学和分子生物学鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),初筛即表现出较好的产蛋白酶和淀粉酶的能力,以及对环境较好的耐受性。枯草芽孢杆菌也是食品和药物管理局批准的公认安全微生物,因为其不产生任何有毒成分,为枯草芽孢杆菌的实际应用提供了安全保障<sup>[18]</sup>。

微生物的来源很大程度上决定了蛋白酶的理化性质。曹慧等<sup>[19]</sup>从高原土壤中分离到一株枯草芽孢杆菌 XC2,其蛋白酶最适作业温度为 40–60 °C、最适 pH 值为 8.0–10.0,Fe<sup>2+</sup>和 Cu<sup>2+</sup>对酶活力明显抑制;来源于牛瘤胃液中的一株枯草芽孢杆菌在发酵 48 h 后粗酶液中蛋白酶最适作业温度为 40–50 °C、最适 pH 值为 6.0–7.0<sup>[20]</sup>,该蛋白酶的反应温度和 pH 更接近于瘤胃内环境,也为瘤胃内微生物发酵活动提供了有利条件;余全法等分离诱变得到一株枯草芽孢杆菌,其在发酵 36 h 后粗酶液中蛋白酶最适作业温度

为 40–50 °C、最适 pH 值为 7.0–9.0, 金属离子  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  会明显抑制酶活力<sup>[21]</sup>。

本研究中 *Bacillus subtilis* strain 3 酶学性质与多数蛋白酶相似, 但该蛋白酶适合作业温度和 pH 适用范围更广, 在 50–80 °C 和 pH 值 7.0–10.0 均保持较高活性, 重金属离子  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  会显著抑制蛋白酶活性, 低浓度有机溶剂对酶催化作用影响不显著。与其他学者研究相比, 该蛋白酶表现出产蛋白酶和淀粉酶能力, 具有高温下不易失活和存储中不易变性的酶学优点, 以及在低浓度有机溶剂添加时不易变性失活的抗性。

体积较小的单胃动物以及一些幼龄动物如水貂、家禽和仔猪等, 相较于复胃动物, 其内源性蛋白酶不足、后肠道较短致使微生物消化能力差等因素导致胃肠道消化能力弱, 饲料蛋白质等其他营养成分未经充分消化吸收被排出体外, 容易引起腹泻、消化不良等症状。本研究从健康水貂粪便中分离获得一株抗逆性良好、可产多种酶系的枯草芽孢杆菌, 其所产的碱性蛋白酶酶学性质良好, 因此该菌株在外源性饲料蛋白添加剂、生物除臭、畜禽无害化生物处理和食品保健等产业具有广泛的应用前景。

## REFERENCES

- [1] 韩淑梅, 李欣, 张芝元, 董旋, 韩燕峰, 梁宗琦. 微生物角蛋白酶的特性及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4315-4326.  
HAN SM, LI X, ZHANG ZY, DONG X, HAN YF, LIANG ZQ. Research progress on the characteristics and application of microbial keratinase[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4315-4326 (in Chinese).
- [2] MOHAMADI S, MEHRABI M, SAJADIMAJD S. Purification and characterization of an extracellular alkaline solvent-stable metalloprotease secreted from newly isolated *Bacillus* sp. DEM05: optimization of protease production[J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2021, 19(3): e2866.
- [3] 侯泽林. 从土壤中筛选碱性蛋白酶产生菌及产酶条件优化研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2021.  
HOU ZL. Screening alkaline protease-producing bacteria from soil and optimization of enzyme-producing conditions[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [4] 卢超, 陈景鲜, 王国霞, 李春阁, 林展, 苏芳谊, 张苗. 一株高产中性蛋白酶菌株的筛选与诱变[J]. 中国饲料, 2022(11): 30-35.  
LU C, CHEN JX, WANG GX, LI CG, LIN Z, SU FY, ZHANG M. Screening and mutation of a strain with high-yield neutral protease[J]. China Feed, 2022(11): 30-35 (in Chinese).
- [5] 周魏, 曾嵩玉, 余金凤, 向军, 马忠仁, 丁功涛, 周雪雁, 张福梅. 一株地衣芽孢杆菌产碱性蛋白酶条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2753-2766.  
ZHOU W, ZENG SY, YU JF, XIANG J, MA ZR, DING GT, ZHOU XY, ZHANG FM. Optimization of alkaline protease production by a strain of *Bacillus licheniformis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2753-2766 (in Chinese).
- [6] CONTESINI FJ, de MELO RR, SATO HH. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(3): 321-334.
- [7] HE FM, CHAO J, YANG DD, ZHANG XQ, YANG CL, XU ZP, TIAN JW, TIAN YQ. Optimization of fermentation conditions for production of neutral metalloprotease by *Bacillus subtilis* SCK6 and its application in goatskin-dehairing[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2022, 52(7): 789-799.
- [8] 冯菲, 权淑静, 刘丽, 王秋菊, 胡虹, 解复红. 高产蛋白酶菌株的分离、鉴定及酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 148-152.  
FENG F, QUAN SJ, LIU L, WANG QJ, HU H, XIE FH. Isolation, identification and enzymatic properties of a high-yield protease strain[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 148-152 (in Chinese).
- [9] 令利军, 焦正龙, 王军英, 马稳霞, 李子彬, 赵云花, 张玺, 冯娟娟. 地衣芽孢杆菌 TG116 胞外蛋白酶产酶条件与酶学性质[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2559-2568.  
LING LJ, JIAO ZL, WANG JY, MA WX, LI ZB, ZHAO YH, ZHANG X, FENG JJ. Production and characterization of extracellular protease from biocontrol strain *Bacillus licheniformis* TG116[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2559-2568 (in Chinese).

- [10] KHALID A, YE M, WEI CJ, DAI BH, YANG R, HUANG SJ, WANG ZG. Production of  $\beta$ -glucanase and protease from *Bacillus velezensis* strain isolated from the manure of piglets[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2021, 51(5): 497-510.
- [11] SHEN NK, YANG MY, XIE CJ, PAN JX, PANG KR, ZHANG HY, WANG YB, JIANG MG. Isolation and identification of a feather degrading *Bacillus tropicus* strain Gxun-17 from marine environment and its enzyme characteristics[J]. BMC Biotechnology, 2022, 22: 11.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定分光光度法: GB/T 28715—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. Determination of acidic and neutral protease activity of Feed additives by spectrophotometry: GB/T 28715—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012 (in Chinese).
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 蛋白酶制剂: GB/T 23527—2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. Protease preparation: GB/T 23527—2009[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009.
- [14] dos SANTOS AGUILAR JG, SATO HH. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates[J]. Food Research International, 2018, 103: 253-262.
- [15] GU SB, ZHAO LN, WU Y, LI SC, SUN JR, HUANG JF, LI DD. Potential probiotic attributes of a new strain of *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 isolated from healthy piglet feces[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(6): 851-863.
- [16] 齐鹏飞, 吴艳秋, 岳寿松, 张伟, 李强, 边斐, 于金慧, 王永军, 苏晓轶, 张燕. 驴源枯草芽孢杆菌分离鉴定及生物学特性[J]. 中国饲料, 2022(15): 37-42.
- QI PF, WU YQ, YUE SS, ZHANG W, LI Q, BIAN F, YU JH, WANG YJ, SU XY, ZHANG Y. Isolation, identification and biological characteristics of *Bacillus subtilis* from donkeys[J]. China Feed, 2022(15): 37-42 (in Chinese).
- [17] ULUCAY O, GORMEZ A, OZIC C. Identification, characterization and hydrolase producing performance of thermophilic bacteria: geothermal hot springs in the Eastern and Southeastern Anatolia Regions of Turkey[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2022, 115(2): 253-270.
- [18] YANG HQ, QU JF, ZOU W, SHEN W, CHEN XZ. An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(18): 6607-6626.
- [19] 曹慧, 张腾月, 赵龙妹, 李源, 杨佳萌, 张朋振, 任世威, 张会会. 土壤中高产蛋白酶菌株产酶条件及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2072-2081.
- CAO H, ZHANG TY, ZHAO LM, LI Y, YANG JM, ZHANG PZ, REN SW, ZHANG HH. Identification and characterization of a high protease-producing strain from soil[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2072-2081 (in Chinese).
- [20] 王朋朋, 常娟, 王平, 左瑞雨, 尹清强. 蛋白酶和淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质分析研究[J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(21): 48-51.
- WANG PP, CHANG J, WANG P, ZUO RY, YIN QQ. Screening of protease and amylase producing strains and analysis of enzymatic properties[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2009, 45(21): 48-51 (in Chinese).
- [21] 余全法, 吴劲松, 竺礼斌, 王海霞, 曲道峰, 韩剑众. 枯草芽孢杆菌 JNB001 蛋白酶特性的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(12): 3261-3267.
- YU QF, WU JS, ZHU LB, WANG HX, QU DF, HAN JZ. Study on protease properties of *Bacillus subtilis* JNB001[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(12): 3261-3267 (in Chinese).