

鸡源蛋白酶产生菌 P-98 菌株的筛选与鉴定

李卓伟 袁洪水 李 佳 许净净 朱宝成

(河北农业大学 生命科学学院 河北 保定 071001)

摘要: 通过初筛从健康青年鸡肠道内容物中分离到 67 株产蛋白酶菌株,采用酪蛋白平板法进行复筛,并对 P-98 菌株进行形态特征观察、生理生化试验和 16S rDNA 基因的序列分析。将该菌株的形态特征和生理生化特性鉴定结果与相应种、属模式菌的性状比对,菌株 P-98 与芽孢杆菌的相应性状相近。根据 16S rDNA 基因序列相似性分析,此菌株与 *Bacillus methylotrophicus* 标准菌株 FZ42 相似度达 99.78%,因此鉴定该菌株 P-98 为 *Bacillus methylotrophicus*。

关键词: 蛋白酶; 筛选; 16S rDNA; 鉴定; *Bacillus methylotrophicus*

中图分类号: S816.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)06-0199-05

Screening and Identification of a Protease Producing Bacteria Strain P-98 from the Broiler

LI Zhuo-wei, YUAN Hong-shui, LI Jia, XU Jing-jing, ZHU Bao-cheng

(College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: This experiment was conducted to get a strong vitality of the bacterium strain producing protease. Through screening from healthy young chicken intestinal contents were isolated from 67 strains of protease producing strain, and complex sieve used casein plate method. Then the strain P-98 was characterized by morphological and culture features observation, physiological and biochemical experiments, and 16S rDNA gene sequence analysis. As the morphology characteristics and physiological and biochemical of the stain were similar to *Bacillus* and the similarity of the 16S rDNA gene sequences between strain P-98 and the type strain was up to 99.78%, the strain P-98 was initially identified as *Bacillus methylotrophicus*.

Key words: Protease; Screening; 16S rDNA; Identification; *Bacillus methylotrophicus*

蛋白酶是一类重要的水解酶,其在饲料生产等众多领域中得到了广泛的应用。与动植物来源的蛋白酶相比,微生物来源的蛋白酶具有生产成本低、具有动植物蛋白酶所具有的所有特性。微生物蛋白酶多为胞外酶并且纯化制备相对容易,降低了规模化生产的成本,是现今最重要的三大工业用酶之一^[1]。

在家畜养殖过程中,部分蛋白饲料未能充分利用而直接被排出体外,其原因可能是由于其自身内源酶分泌不足与饲料中含大量抗营养因子从而影响其蛋白质等营养物质的消化吸收^[2]。为改善这一状况,提高饲料中成分的充分利用,蛋白酶制品添加剂在饲料工业中的应用及研究也越来越多,其作为一种新型高效饲料添加剂,为开辟新的饲料资源和降低饲料生产成本提供了行之有效的途径^[3]。

随着不断地研究及应用证明,在饲料中添加了以蛋白酶为主要成分的酶制剂后,对动物的消化功能、饲料利用率、生长、生产性能等均具有显著的促进功效^[4-5]。张春扬等^[6]通过饲喂肉鸡产蛋白酶的微生态饲料添加剂,使肉鸡肠道内容物中蛋白酶的活力提高了约 21.76%,并且提高了饲料利用率,增强了肉鸡的消化功能,表现出了良好的应用效果。张芹^[7]通过在饲料中添加复合酶制剂促进了肉鸡生长和机体蛋白质及能量的代谢。生产及试验数据表明,肉仔鸡基础日粮添加复合酶制剂,饲喂期内平均日增重可提高 5%~19%,料肉比降低 1%~10%^[8]。

我国饲用酶制剂的研究应用起步晚,推广使用落后,因而发展空间更大^[9]。益生菌作为天然饲料添加剂对动物饲养和环境改善所起的显著作用,已经越来越引起人们的重视^[10]。随着生物技术的发

收稿日期: 2013-07-12

基金项目: 肉鸡饲料产酶复合芽孢菌添加剂的研发及应用项目(12236606)

作者简介: 李卓伟(1988-),男,河北元氏人,硕士,主要从事农业微生物研究。

通讯作者: 朱宝成(1962-),男,河北献县人,教授,博士生导师,主要从事农微生物研究。

展和发酵工艺的进步,许多优良菌种的发现和应用,使得饲用酶种类、活力和稳定性均有所提高^[11]。筛选和开发蛋白酶高产及蛋白酶高活性的微生物资源具有非常重要的科研应用和商业价值。本试验以鸡空肠黏膜为菌源,进行了产酶芽孢杆菌的筛选分离工作,经过初筛与复筛,筛选出具有高产蛋白酶活性的菌株,并通过生物学特性及生理生化试验和基因组 16S rDNA 的序列分析的方法对其中筛选活性相对较高的菌株 P-98 进行了菌种分类鉴定。旨在为饲料工业中产蛋白酶的微生物饲料添加剂在生产应用中提供高产优良微生物菌株。

1 材料和方法

1.1 试验材料

28 日龄健康肉鸡的空肠黏膜。

含胆酸盐 LB 琼脂培养基:胰蛋白胨 10.0 g,酵母提取物 5.0 g,NaCl 10.0 g,胆酸盐 3.0 g,琼脂 20.0 g,蒸馏水 1 000 mL,调 pH 值 7.0。用于筛选耐胆酸盐芽孢杆菌。

酪蛋白培养基:酪蛋白 10.0 g,酵母浸粉 5.0 g,NaCl 40.0 g,琼脂 20.0 g,蒸馏水 1 000 mL,调 pH 值 7.2。用于耐胆酸盐产蛋白酶芽孢杆菌初筛。

产蛋白酶发酵培养基:干酪素 1~4 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,KCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g,蔗糖 30 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 值 7.0~7.4。用于蛋白酶粗酶液制备。

16S rDNA 扩增所用试剂参照论文《大丽轮枝菌拮抗细菌 8-52 菌株的筛选与鉴定》^[12]。

生理生化鉴定试剂及培养基按照《常见细菌系统鉴定手册》^[13]进行配制。

1.2 试验方法

1.2.1 耐受胆酸盐芽孢杆菌的分离 在无菌条件下剪下屠宰后肉鸡的空肠,挤出肠道内容物后纵向剖开,用无菌药匙刮取肠道黏膜黏液,涂抹在无菌滤纸条上盛于无菌烧杯内在 37℃ 培养箱内风干 72 h,然后加入盛有无菌生理盐水的三角瓶中充分振摇,80℃ 水浴 15 min,取 1.0 mL 进行梯度稀释,分别取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释度的样品液 0.5 mL 加入到灭菌平板内,然后加入融化并降温至 50℃、含 0.3% 胆酸盐的 LB 琼脂培养基 20 mL,迅速混匀放于平处待凝固。

将凝固平板上置 37℃ 恒温箱培养 24~48 h,从中挑取不同形态的单菌落转接到 NA 琼脂培养基试管斜面上(每个单菌落接 2 支试管斜面),编号,于 37℃ 恒温培养 48 h,置 4℃ 冰箱中保存备用。

此培养可获得兼性厌氧、耐 0.3% 含量胆酸盐的芽孢菌株。

1.2.2 产酶菌株的初筛 将 1.2.1 得到的耐胆酸盐菌株点种于酪蛋白培养基平板上,37℃ 培养 24 h。

培养后在酪蛋白平板上产蛋白酶菌落周围出现水解圈,如不明显可在平板上加上适量的 0.1 mol/L TCA 溶液,在平板上挑选水解圈直径与菌落直径比(Hc 值)较大的 20 个菌株作为进一步复筛蛋白酶产生菌的出发菌株。

1.2.3 产酶菌株的复筛 将初筛所得各产酶菌株接种于装有 50 mL NB 培养基的三角瓶中(容量 250 mL),37℃、200 r/min 摇床培养 12 h 制成种子液。

将培养好的液体菌种按体积分数 10% 的接种量接种于装有发酵培养基的摇瓶中,摇瓶容量 250 mL,装量 50 mL,培养温度 37℃,摇床转速 180 r/min,培养 24 h。

将发酵液离心(10 000 r/min,4℃)10 min 去菌体,留取离心液,作为粗酶液,测定发酵液中各种酶活性,用以作为复筛标准。从中分别选出产酶活性高的菌株各 2~3 株。

蛋白酶活性测定:按照国家标准 SB/T 10317-1999,对各菌株发酵液中蛋白酶活力进行测定。

蛋白酶活力单位定义为:1 mL 酶液在 40℃ 下 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为 1 个蛋白酶活力单位(U/mL)。

1.2.4 菌株形态学特性 将菌株涂布在 NA 培养基,37℃ 培养 24 h,观察菌落形态,革兰氏染色观察菌体形态和芽孢形态。

1.2.5 菌株分子生物学鉴定 16S rDNA 的扩增纯化利用菌落 PCR 方法扩增 16S rDNA^[14]。

PCR 反应体系:ddH₂O 36 μL,10× Buffer(含 Mg^{2+}) 5 μL,dNTP 3.5 μL,1495R 1.5 μL,27F 1.5 μL,TaqDNA 聚合酶 0.5 μL,DNA 模板 2 μL。

PCR 条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 90 s,共进行 32 个循环。待循环结束,72℃ 延伸 10 min。经试剂盒纯化 PCR 产物后,送宝锐通生物技术有限公司进行测序。

菌株 16S rDNA 序列分析及系统发育树的构建:将测得的序列与从标准菌库中可查到的及在 GenBank 中获得的 15 株标准菌株的相关序列进行多重比对,然后用 Clustal X 和 Treecon W 软件分析,构建出以供试菌为基础 16S rDNA 序列系统发育树,并使用 BioEdit 软件计算菌株间 16S rDNA 序列的相似性^[15]。

1.2.6 菌株生理生化鉴定 根据《常见细菌系统

鉴定手册》中相应种属间的鉴定有关的内容选择所需试验进行,主要选择了淀粉水解试验、5% 耐盐试验、7% 耐盐试验、硝酸盐还原试验、H₂S 试验、V-P 试验、柠檬酸盐利用试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、丙二酸盐试验、过氧化氢酶(接触酶)试验等 20 项试验进行,具体试验方法参照《常见细菌系统鉴定手册》。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌的分离

按照 1.2.1 方法,肉鸡肠道壁刮取物在含 0.3% 胆酸盐 LA 平板上培养,共分离出 202 株兼性厌氧、耐 0.3% 含量胆酸盐的芽孢杆菌。

2.2 蛋白酶产生菌的筛选

在酪蛋白培养基平板上出现蛋白水解圈的有 67 株菌,依据水解圈直径与菌落直径比(Hc 值)挑选出菌落形态有差异的 10 个菌株,按 1.2.3 方法进行二级摇瓶发酵,根据粗酶液酶活测定结果(表 1、图 1)选择酶活力较高的 P-98、P-52 和 P-46 作为进一步研究的对象。

对初筛分离纯化后的 3 株菌株在产酶发酵培养基中进行摇瓶发酵培养 48 h,制备粗酶液,测定蛋白酶活力,结果见表 1。

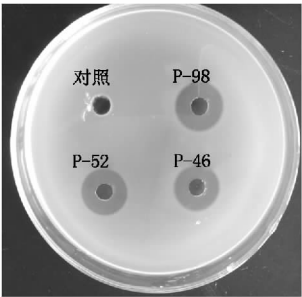


图 1 复筛时细菌对酪蛋白的水解作用

Fig. 1 Secondary screening of bacteria to casein hydrolysis

表 1 菌株 P-46、P-52、P-98 蛋白酶活力测定结果

Tab. 1 Protease activity of strains P-46 P-52 and P-98

菌株编号 Strains number	OD _{680nm}	酶活力/(U/mL) Protease activity
P-46	0.772	307.8
P-52	0.795	317.1
P-98	0.847	338.2

2.3 菌株鉴定

在各种产酶菌株中,以产酶活性为标准,保留产酶活性最高的一株菌 P-98。鉴定结果如下:

菌落、菌体及芽孢形态观察:菌落呈近圆形,边缘整齐,表面干燥、有皱褶,微黄色,透明。革兰氏染色呈阳性,长约 1.8 μm,宽约 0.7 μm,菌体呈杆状。芽孢长约 1.1 μm,宽约 0.8 μm,呈椭圆形、稍膨大(图 2)。

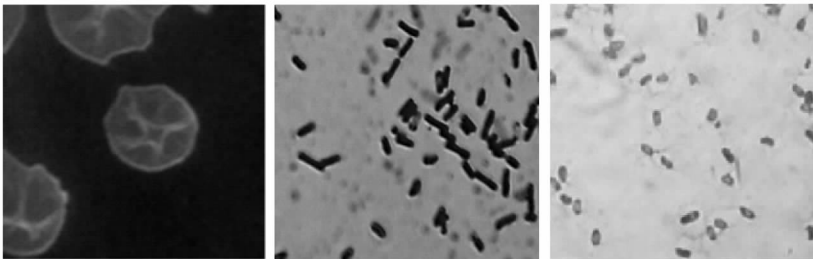


图 2 P-98 菌株的菌落形态(左)、菌体形态(中)、芽孢形态(右)

Fig. 2 Colony morphology(left) mycelial morphology(middle) and spore morphology(right) of the strain P-98

表 2 蛋白酶产生菌 P-98 菌株 16S rDNA 基因序列相似性分析

Tab. 2 Similarity analysis of the sequences of 16S rDNA gene of the protease producing strain P-98

序列号 Serial number	种名 Species	菌株号 Strains	相似性/% Similarity
NR_042339	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K	97.57
NR_042337	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	97.57
HQ223107	<i>Bacillus tequilensis</i>	10b	99.49
NR_027552	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	DSM 10	99.49
DQ993671	<i>Bacillus axarquiensis</i>	LMG 22476	99.20
DQ993673	<i>Bacillus malacitensis</i>	LMG 22477	99.20
AB363735	<i>Bacillus Mojavensis</i>	NBRC 15718	99.20
NR_024931	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049	99.35
AB681417	<i>Bacillus vallismortis</i>	NBRC 101236	99.71
GQ281299	<i>Bacillus siamensis</i>	PD-A10	99.13
NR_041455	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NBRC 15535	99.49
EU194897	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	CBMB205	99.78
EF188847	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 51189	99.28
NR_042338	<i>Bacillus aerius</i>	24K	97.57
AB681416	<i>Bacillus sonorensis</i>	NBRC 101234	97.73
AJ496807	<i>Amphibacillus xylanus</i>	DSM 6626	89.66

菌株系统发育树的构建: 将测定的 P-98 菌株的 16S rDNA 序列与 15 株标准菌株 16S rDNA 序列进行比对, 相似性比较结果见表 2, 并构建菌株的系统发育树(图 3)。

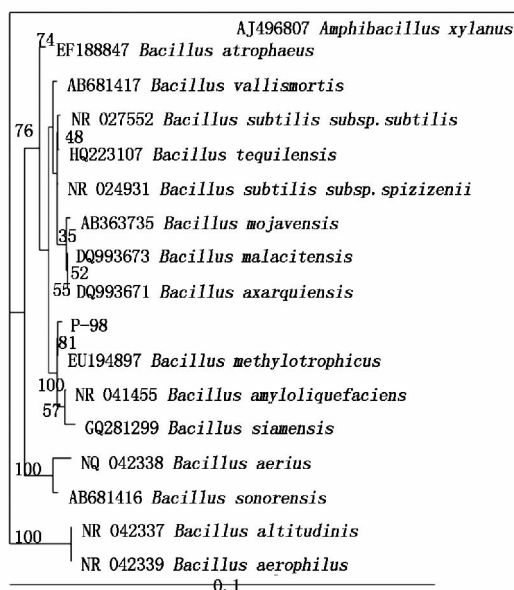


图 3 蛋白酶产生菌 P-98 菌株的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic trees of protease producing bacteria P-98 strain

菌株的生理生化试验: 对 P-98 菌株进行了生理生化鉴定, 试验结果见表 3。

从生理生化试验结果初步鉴定供试菌属于芽孢杆菌属。

由分析可知, P-98 菌株的 16S rDNA 基因组序列与 GenBank 中的芽孢杆菌属所查标准菌株同源相似性均在 89% 以上, 同时, 由于 P-98 菌株与 *Bacillus methylotrophicus* 的标准菌株 EU194897 16S rDNA 序列的同源相似性最高, 达到了 99.78%, 由此, 鉴定 P-98 菌株为 *Bacillus methylotrophicus*。

表 3 P-98 菌株生理生化鉴定

Tab. 3 Physiological and biochemical appraisal of P-98 strain

试验项目 Item	试验结果 Results	试验项目 Item	试验结果 Results
硫化氢试验	-	淀粉水解试验	-
脓青素产生试验	-	纤维素水解试验	-
丙二酸利用试验	-	脲酶试验	+
柠檬酸盐试验	+	3-酮基乳糖试验	+
苯丙氨酸脱氨酶试验	-	硝酸盐还原试验	+
接触酶	+	亚硝酸盐还原试验	-
糖醇发酵试验	-	反硝化试验	-
甲基红试验	-	产氨试验	-
V. P. 试验	+	吡啶试验	-
色氨酸脱氨酶试验	-	耐盐和需盐性测定试验	+

3 讨论与结论

研究表明, 选择作为益生菌的菌株应当具有生长速度快, 且能够吸附于上皮细胞的优良特性, 还要对胃肠道内的各种抑制因素具有较强的抵抗力, 能够产生抗菌物质等特点。还有许多学者认为, 益生菌的黏附定植作用要具有一定的宿主特异性, 理想的益生菌菌种最好是要来自于同种动物肠道。

益生菌可作为天然的饲料添加剂, 对动物饲养的成本和环境的改善均起到了显著的积极作用, 已经越发引起人们的重视。鸡消化道内益生菌种类具有复杂性, 本试验采用 28 日龄成年肉鸡的空肠黏膜作为菌源, 进行了产蛋白酶芽孢杆菌的分离筛选工作, 而未采用嗦囊和盲肠的内容物或黏膜为菌源, 主要是考虑到空肠中的有益菌已经接受过较低的酸性环境和胆盐环境的作用, 相对于其他消化部位的有益菌可能具有对酸和胆盐更高的耐受性, 并且这些菌株本身分离自空肠黏膜上, 因而较外源菌具有更强的体内定植能力。

由于芽孢杆菌能产生耐热抗逆性很强的芽孢, 有利于工业上菌剂的生产, 而且其具有批量生产工艺简单, 成本较低等突出特征, 被认为是一种较理想的酶制剂产生菌, 所以本研究旨在筛选出一株产蛋白酶活性较高的芽孢杆菌, 以供后期试验研究。

在本试验中, 所分离的芽孢杆菌为兼性厌氧菌, 并且其生长速度明显高于其他筛选所得菌株, 因此当其进入动物肠道后, 更易成长为优势菌群, 也为进一步对芽孢杆菌进行深入试验及菌株的安全性提供了理论依据。

随着分子生物学、仪器分析技术的发展和计算机广泛应用, 人们开发了众多 DNA 分析技术和以仪器为依托进行分析的微生物鉴定系统, 如 MIDI 系统、VITEK 系统等, 其中, DNA 序列分析的 16S rDNA 基因序列分析技术已经成为国际上细菌分类鉴定常用的技术手段, 与传统方法相比, 该技术操作快捷、标准, 鉴定范围广, 自动化程度和准确率也很高, 适合于多种细菌的鉴定工作^[16]。本试验通过对菌株 P-98 的 16S rDNA 基因序列进行分析, 并结合其形态及生理生化试验结果, 鉴定该菌株的归属。通过对目标菌形态、生理生化试验以及 16S rDNA 基因序列进行系统地分析, 鉴定该株菌为 *Bacillus methylotrophicus* P-98 菌株。然而, 在生理生化试验结果中也存在着个别的与最后分析结果不相符的现象, 这就表明单一以形态特征、生理生化试验结果或是 16S rDNA 基因序列分析为依据的分类鉴定具有

一定的局限性,菌株种属鉴定需要进行多项分析。

本试验以鸡肠道空肠黏膜为菌源,进行了产蛋白酶芽孢杆菌的分离筛选,获得了 1 株产蛋白酶能力较强的 P-98 芽孢杆菌,通过对其 16S rDNA 序列分析以及菌落形态、生理生化试验的观察,最后鉴定该菌株为 *Bacillus methylotrophicus* 菌株。因为该菌是以鸡空肠黏膜为源菌筛选得到,因而在其进入肠道后会更易于在肠道内环境生存和生长。

参考文献:

- [1] 马桂珍,暴增海,王淑芳,等.高产蛋白酶细菌的分离筛选及其种类鉴定[J].食品科学,2011(21):183-187.
- [2] 闻治国,张铁鹰,谢明,等.不同酶制剂水平对北京填鸭生长性能、血浆生化指标和肝脏组织学的影响[J].华北农学报,2012,27(6):78-83.
- [3] 冯定远,左建军.酶制剂的相关概念及饲料酶制剂的划代[J].饲料研究,2012(01):3-6.
- [4] 黄金明,吕东海,周镇锋.低能量日粮中添加复合酶对肉鸭生长性能的影响[J].饲料研究,2007(5):46-49.
- [5] 侯文福,董乐津.饲料添加酶制剂可显著提高饲料的消化率和利用率[J].养禽与禽病防治,2004(7):16-17.
- [6] 张春扬,牛钟相,常维山,等.益生菌对肉用仔鸡的营养、免疫促进作用[J].中国预防兽医学报,2002,24(1):51-54.
- [7] 张芹.复合酶制剂对肉鸡生产性能及血液生化指标的影响[J].安徽农业科学,2012,40(17):9285-9287.
- [8] 张胜引.浅谈饲用酶制剂在畜禽业中的应用[J].中国畜禽种业,2012(10):29.
- [9] 林谦,宾石玉,戴求仲,等.饲用酶制剂及其在肉鸡养殖中的应用[J].饲料博览,2012(7):28-32.
- [10] 郭云霞,郝庆红,朱宝成.羊源芽孢益生菌的筛选与 Y5-39 菌株的鉴定及其耐受性试验[J].华北农学报,2010,25(5):206-210.
- [11] 徐学文,刘正亚,田雯,等.不同的复合酶制剂对奶牛生产性能和营养物质消化率的影响[J].粮食与饲料工业,2012(11):51-54.
- [12] 吴国江,王占利,李术娜,等.大丽轮枝菌拮抗细菌 8-52 菌株的筛选与鉴定[J].河北农业大学学报,2009,32(4):66-70.
- [13] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:349-388.
- [14] 潘渠,杨维华,王颖.设计乳杆菌特异性引物并运用菌落 PCR 技术快速检出和鉴定四川泡菜中的乳杆菌[J].微生物学通报,2011,38(8):1300-1305.
- [15] 樊连梅,李哲斐,韦革宏.一株抗铜根瘤菌的分离鉴定及其 16S rDNA 序列分析[J].华北农学报,2011,26(2):7-12.
- [16] 许艳丽,刘海龙,李春杰,等.拮抗大豆根腐病细菌的 Biolog 鉴定[J].华北农学报,2012,27(2):234-238.