

发酵海产品中产蛋白酶菌株多样性及其酶学特性

檀茜倩¹, 王丹¹, 王晓晴¹, 崔方超¹, 吕欣然¹, 李学鹏¹, 李英美², 励建荣^{1*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院/海洋研究院 辽宁锦州 121013)

(²达莲食品(锦州)有限公司 辽宁锦州 121019)

摘要 从自制发酵海产品中筛选分离到 10 株具有产蛋白酶能力的菌株,经分子生物学鉴定分别为贝莱斯芽孢杆菌 S1YBB、S1YB,黏质沙雷氏菌 S2DD、S2DB、C2Y3、M1B、C2J2,藤黄色微球菌 C1Y1,海藻希瓦氏菌 C2J1 和海氏肠球菌 M1R,选择不同种的 5 株分泌蛋白酶活力较高菌株 S1YB、S2DB、C1Y1、C2J1、M1R 进行生物学和酶学特性研究。结果表明,5 株菌生长最适温度 37 ℃、最适 pH 值 6.0、最适盐质量浓度 20 g/L,所产蛋白酶在 50 ℃、pH 6.0~8.0 时活性最高。在 Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺、Cu²⁺ 等不同金属离子和乙二胺四乙酸(EDTA)的影响下相对酶活力呈下降趋势,并与金属离子质量浓度有一定关系。本研究为海产品发酵优良菌株的开发以及发酵过程中杂菌的控制提供理论参考。

关键词 蛋白酶;酶学特性;发酵海产品;多样性

文章编号 1009-7848(2024)02-0062-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.02.006

蛋白酶是一种水解肽键的酶类^[1],其来源广泛,微生物是蛋白酶的一类重要来源。微生物源蛋白酶的利用率高^[2]且稳定性好,在较高温度、极端 pH 值条件、表面活性剂和有机溶剂存在的情况下仍能够保持较高活力^[3-4]。发酵是一种传统的食品加工方式,对于海产品这类营养丰富而容易腐败的食品来说,发酵处理不仅能在一定程度上延长食品货架期,还能获得特殊风味。产蛋白酶菌株在海产品发酵中起到了非常重要的作用。产蛋白酶菌株的存在一方面可加速发酵过程以及改善发酵食品的风味和品质。有研究利用从发酵鱼汤、鱼露厂、盐晶和盐锅中分离的多株产蛋白酶菌株作为发酵剂发酵生产鱼露,相对于未接种发酵剂的天然发酵方式,更能促进鱼露特定香气和风味的形成^[5]。Peinado 等^[6]利用蛋白酶酶解水产品加工副产物生产鱼粉,发现能显著改善鱼粉风味,尤其是使其腥味降低。然而,产蛋白酶菌株在海产品的发酵中也有不利影响。研究发现部分菌株(例如维氏气单胞菌等)蛋白酶的分泌与发酵食品腐败变质密切相关^[7-8]。基于以上 2 个出发点考虑,本研究以自制发酵海产品为研究对象,对其中产蛋白酶菌株

进行了筛选,并对其中部分产蛋白酶菌株的生长特性以及其产生蛋白酶的酶学性质进行了分析,以期在海产品发酵酶解菌种开发和避免发酵海产品变质提供一定借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验原料 自制腌制发酵蛤蜊、虾蛄、海参肠等海产品。

1.1.2 试剂与培养基 细菌 DNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂预混液、细菌通用引物,生工生物工程(上海)股份有限公司;福林酚试剂、碳酸钠、三氯乙酸、氢氧化钠、无水乙醇、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、氯化亚铁、三氯化铁、氯化铜、EDTA 等均为国产分析纯级,上海帝博思生物科技公司;LB 营养琼脂、LB 液体培养基,北京奥博星生物技术有限公司;改良脱脂乳培养基(10.0 g/L,琼脂 20.0 g/L,水 1.0 L,pH 7.2~7.4),115 ℃灭菌 15 min 备用。

1.2 设备与仪器

BagMixer 400 均质器,法国 Interscience 公司;SW-CJ-2FD 超净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;Thermo Sorvall Legend Micro21R 台式微量离心机,美国赛默飞世尔科技公司;LRH-250A 型生化培养箱,上海一恒科技有限公

收稿日期:2023-02-15

基金项目:辽宁省海洋经济发展专项(2021-84)

第一作者:檀茜倩,女,博士,讲师

通信作者:励建荣 E-mail:lijr6491@163.com

司;MS105DU 电子分析天平,瑞士梅特勒-托利多公司;GelDoc XR+全自动凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司;PCR仪,德国Eppendorf公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的初筛和分离纯化 在无菌环境下取各样品 10.0 g,加入无菌生理盐水 90 mL,梯度稀释后,涂布于 LB 固体培养基,每个梯度做 3 个平行,置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h 后挑取不同形态菌株进行纯化培养和革兰氏染色,将分离的菌株冻存于 -80 °C 冰箱。

1.3.2 产蛋白酶菌株的筛选 将保藏在 -80 °C 冰箱的菌株活化后接种于 LB 液体培养基,培养 24 h 后将菌液以 10 000 r/min 离心 10 min,留取上清液。参考耿芳等^[9]的方法适当修改,采用牛津杯法筛选产蛋白酶菌株,具体方法为将灭菌处理后的牛津杯放入平板后将脱脂乳固体培养基倒入平板,待其凝固后,取出牛津杯,在孔内加入 150 μ L 分离菌株上清液,无菌水做阴性对照,在 37 °C 培养箱内培养 24 h 后测量透明圈直径,探究其产蛋白酶情况。

1.3.3 产蛋白酶菌株鉴定 对在平板上形成透明圈的产蛋白酶菌株按照细菌 DNA 提取试剂盒说明完成菌株 DNA 提取。采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGACTTAACCCCAATCGC-3'),以所提取各菌株 DNA 为模板进行 PCR 扩增,对 PCR 产物检测合格后送上海生工生物科技有限公司测序,测序结果与 NCBI 数据库对比,用 MAGE7.0 软件构建系统发育树。

1.3.4 菌株产蛋白酶酶活测定 参照曹慧等^[10]的方法并作适当修改以分离粗蛋白酶。将 37 °C 培养 24 h 后的菌液转移到无菌离心管中,于 4 °C、10 000 r/min 下离心 10 min,所得上清液为胞外蛋白酶粗酶液,保存于 4 °C 冰箱内并于 12 h 内使用。按照国标 GB/T 23527-2009《蛋白酶制剂》中的福林酚显色法测定蛋白酶活力^[11]。吸取 0.5% 的酪蛋白溶液 2 mL,在 40 °C 水浴加热 5 min,加入预热的粗酶液 1 mL,反应 10 min 后加入 10% 三氯乙酸溶液 3 mL,孵育 15 min 终止反应,以无菌水代替粗酶液作为阴性对照。将反应液在 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL 加入 5 mL 碳酸钠溶

液 (0.55 mol/L) 和 1 mL 福林酚试剂,处理 15 min 后在波长 680 nm 处测定样品及对照组样品的吸光度值 (A)。根据公式 (1) 计算粗酶液酶活力。

$$\text{酶活力 (U/mL)} = [(A_{\text{样}} - A_{\text{对}}) \times K \times V] / t \quad (1)$$

式中, $A_{\text{样}}$ ——样品吸光度值; $A_{\text{对}}$ ——对照组样品吸光度值; K ——标准曲线为 1 时对应酪氨酸的含量, μ g; t ——酶促反应时间, 10 min; V ——酶促反应总体积, 6 mL。

1.3.5 产蛋白酶菌株生物学特性分析

1.3.5.1 温度对菌株生长的影响 参照 Shu 等^[12]的方法作适当修改。按照 3% 的接种量将菌株接种于 LB 液体培养基并置于不同温度 (20, 25, 28, 30, 37, 40 °C) 培养 24 h, 在波长 600 nm 处根据测得各温度菌株随时间生长的吸光度值变化判断温度对菌株生长的影响。

1.3.5.2 pH 值对菌株生长的影响 参照 Sun 等^[13]的方法作适当修改。按照 3% 接种量将活化后的菌株接种于 pH 值分别为 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 的 LB 液体培养基中, 置于 37 °C 摇床培养 24 h 后测定波长 600 nm 处菌株生长的吸光度值变化判断 pH 值对菌株生长的影响。

1.3.5.3 盐质量浓度对菌株生长的影响 参考宋梦思等^[14]的方法, 按照 3% 接种量将活化后的菌株接种于盐质量浓度为 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 g/L 的 LB 液体培养基中, 置于 37 °C 摇床培养 24 h 后测定波长 600 nm 处菌株生长的吸光度值变化判断盐质量浓度对菌株生长的影响。

1.3.6 蛋白酶酶学性质分析 选取产蛋白酶活力较高的不同种菌株进行蛋白酶酶学特性分析。

1.3.6.1 温度对酶活力的影响 分别在 10, 20, 30, 40, 50, 60 °C 条件下测定粗酶液酶活力, 判断温度对酶活力的影响。

1.3.6.2 pH 值对酶活力的影响 参考 Sun 等^[15]的方法, 将粗酶液与 pH 值为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 的酪蛋白底物在上述最适温度下反应, 测得相应酶活力, 判断 pH 值对酶活力的影响。

1.3.6.3 金属离子和抑制剂对蛋白酶活力的影响

参照李丹阳等^[16]的方法并作适当修改。分别将粗酶液与添加 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的不同金属离子 (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) 氯化物盐溶液和抑制剂 EDTA 共孵育 30 min, 将没有添加

金属离子和抑制剂的蛋白酶活性定义为 100%，测定在金属离子和抑制剂的作用下粗酶液相对酶活的变化。

1.4 数据处理

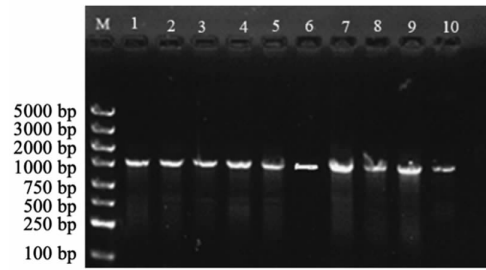
相关研究均进行 3 次独立重复试验，试验结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，使用 SPSS 25.0 进行统计分析 ($P < 0.05$)，Origin 2022 作图。

2 结果与分析

2.1 产蛋白酶菌株的分离培养与鉴定

产蛋白酶微生物种类很多，分布于类杆菌门、变形杆菌门、放线杆菌门、热变形球菌门等多个门中^[7]。本研究从发酵海产品中分离得到多株菌株，经改良脱脂乳平板筛选后发现 10 株菌株具有产蛋白酶能力。以菌株 DNA 为模板利用细菌通用引物对菌株 16S rRNA 基因序列进行扩增，在 1 000 bp 附近均出现明显条带(图 1)。

将 PCR 产物测序结果在 NCBI 数据库对比并经过系统发育树分析后得到的菌株鉴定结果如表



注：泳道 M 为 Marker，泳道 1~10 分别为菌株 S1YBB、S1YB、S2DD、S2DB、C2Y3、M1B、C2J2、C1Y1、C2J1、M1R。

图 1 菌株的 16S rRNA 基因 PCR 扩增电泳图

Fig.1 Electrophoretic of PCR amplification products of 16S rRNA gene of the isolated strains

1 所示，分离培养得到表型不同的菌株分别为革兰氏阳性菌的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) S1YBB、S1YB，藤黄色微球菌 (*Micrococcus luteus*) C1Y1，海氏肠球菌 (*Enterococcus hirae*) M1R；革兰氏阴性菌的黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) S2DD、S2DB、C2Y3、M1B、C2J2，海藻希瓦氏菌 (*Shewanella alga*) C2J1。

表 1 菌株鉴定结果分析

Table 1 Analysis of strain identification results

菌株编号	革兰氏染色	16S rDNA 测序结果	相似度/%
S1YBB	G ⁺	贝莱斯芽孢杆菌	99
S1YB	G ⁺	贝莱斯芽孢杆菌	98
S2DD	G ⁻	黏质沙雷氏菌	100
S2DB	G ⁻	黏质沙雷氏菌	99
C2Y3	G ⁻	黏质沙雷氏菌	98
M1B	G ⁻	黏质沙雷氏菌	99
C2J2	G ⁻	黏质沙雷氏菌	99
C1Y1	G ⁺	藤黄色微球菌	99
C2J1	G ⁻	海藻希瓦氏菌	99
M1R	G ⁺	海氏肠球菌	99

菌株在 LB 平板上的生长形态如图 2a 所示。贝莱斯芽孢杆菌 S1YBB、S1YB 生长状态呈现中间凸起，有孢子形成；黏质沙雷氏菌 S2DD、S2DB、C2Y3、M1B、C2J2 菌落边缘清晰，有黏性；藤黄色微球菌 C1Y1 呈现油状金黄色；海藻希瓦氏菌 C2J1 菌落表面光滑、边缘清晰；海氏肠球菌 M1R 为球状菌落。菌株粗酶提取液在改良脱脂乳平板上水解圈的形成情况如图 2b 所示，10 株菌在改良脱脂乳平板上形成大小不一的水解圈。

2.2 菌株产蛋白酶酶活分析

参照国标 GB/T 23527-2009《蛋白酶制剂》制作酪氨酸标准曲线，得标准曲线线性回归方程式为： $y = 0.0097x + 0.0994$ ，其中 $R^2 = 0.9992$ ，表明线性回归方程线性关系良好。根据福林酚试剂法对 10 株菌株产蛋白酶活性进行测定(表 2)，其中黏质沙雷氏菌产蛋白酶酶活相对较高，均在 20 U/mL 以上，最高的是黏质沙雷氏菌 S2DB 为 (32.44 ± 0.67) U/mL，藤黄色微球菌 C1Y1、海藻希瓦氏菌

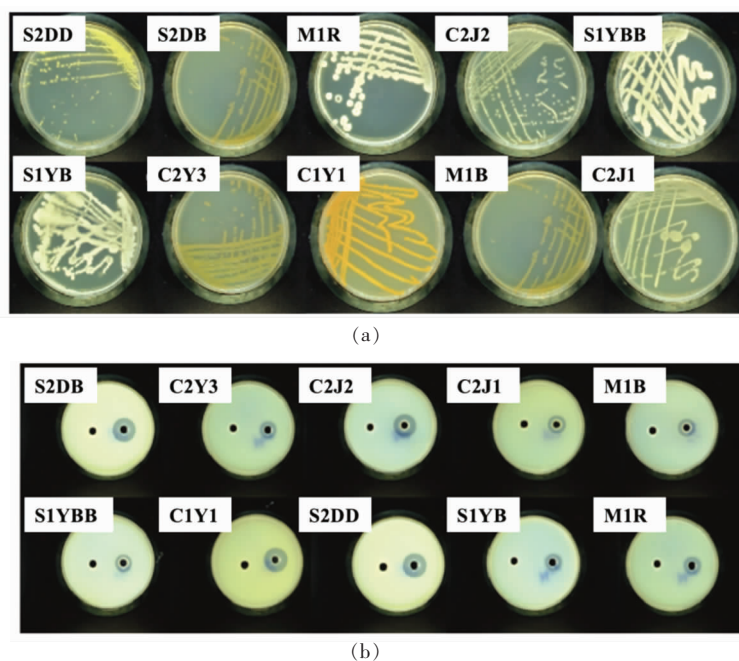


图 2 菌落形态(a)以及菌株粗酶提取物的蛋白水解能力(b)

Fig.2 Colony morphology of the strains (a) and the hydrolytic abilities of their crude enzyme extract (b)

C2J1、海氏肠球菌 MIR 产蛋白酶酶活也可以达到 20 U/mL 以上, 而贝莱斯芽孢杆菌 S1YBB 所产蛋白酶活性最低为 $(8.65 \pm 0.14) \text{U/mL}$, 相对于已报道^[18]芽孢杆菌产蛋白酶的酶活较低, 在后续研究中可考虑对其培养条件进行优化以提高产酶活性。本研究选取 5 株产蛋白酶活力相对较高的不同种菌株(贝莱斯芽孢杆菌 S1YB、黏质沙雷氏菌 S2DB、藤黄色微球菌 C1Y1、海藻希瓦氏菌 C2J1、海氏肠球菌 MIR)进行后续菌株生物学和产蛋白酶的酶学特性分析。

2.3 菌株的生物学特性分析

2.3.1 菌株的最适生长温度 菌株的生长受温度影响, 5 株菌株在不同温度条件下培养 24 h 的生长情况如图 3 所示, 37 °C 左右时 5 株菌在 LB 液体培养基中 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 普遍达到 0.6~0.7, 吸光度值较高, 说明各菌株在此温度下生长情况良好。在 25 °C 时, 菌株藤黄色微球菌 C1Y1、贝莱斯芽孢杆菌 S1YB 的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 出现一定程度升高, 具体原因有待于进一步分析, 可能与其对温度适应性有关。相关研究表明藤黄色微球菌^[19]、芽孢杆菌^[20]以及黏质沙雷氏菌^[21]生长比较适合的温度为 37 °C, 不同株之间可能由于受到分离环境影响而有所差异。

表 2 菌株产蛋白酶活力

菌株	酶活力/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
S1YBB	8.65 ± 0.14^f
S1YB	12.61 ± 1.23^e
S2DD	22.86 ± 0.28^c
S2DB	32.44 ± 0.67^a
C2Y3	22.08 ± 0.23^c
M1B	20.11 ± 0.35^d
C2J2	30.10 ± 0.40^b
C1Y1	30.62 ± 0.72^b
C2J1	21.63 ± 0.40^c
MIR	20.06 ± 1.55^d

注: a、b、c、d 表示差异显著, $P < 0.05$ 。

2.3.2 pH 值对菌株生长的影响 pH 值是影响菌株生长的另一个重要因素, 也会在一定程度上影响其所分泌的蛋白酶活性^[22]。不同 pH 值条件对菌株生长影响如图 4 所示, 5 株菌在 pH 1.5~4.5 范围内 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值较低, 说明在此 pH 值下菌株生长受到抑制; 随着 pH 值升至 4.5 左右时, 菌株 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值有明显上升, pH 5.5 左右时达到最高为 0.7, pH 5.5~6.5 之间菌株生长趋于平缓。其中贝莱斯芽孢杆菌 S1YB 相对于其它菌株生长能力较

弱,其原因可能与菌株本身特性或菌株对营养的不同需求有关;黏质沙雷氏菌 S2DB 在趋近于中性偏碱性条件下生长能力较好,与其它研究发现

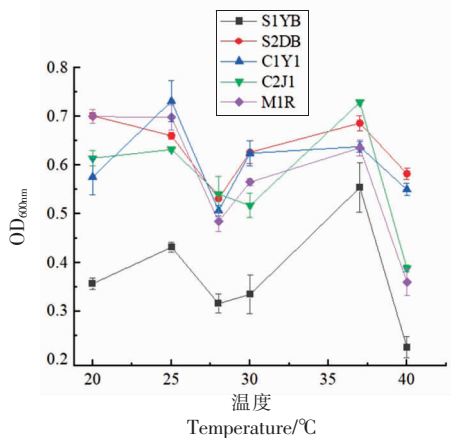


图3 温度对菌株生长的影响

Fig.3 Effects of temperature on bacterial growth

2.3.3 菌株的耐盐能力分析 盐质量浓度的变化会通过改变细胞渗透压影响菌株生长。不同菌株耐盐能力分析结果如图5所示。在10~20 g/L范围,随盐质量浓度升高,菌株能够生长,OD_{600nm}值升高,在20 g/L时达到最大值,随后各菌株 OD_{600nm}值随盐质量浓度增加呈现下降趋势,说明菌株生长受到抑制($P<0.05$)。

2.4 菌株蛋白酶的酶学性质

2.4.1 温度对酶活力的影响 温度会影响蛋白酶活力发挥,温度对粗酶活性影响如图6所示。研究

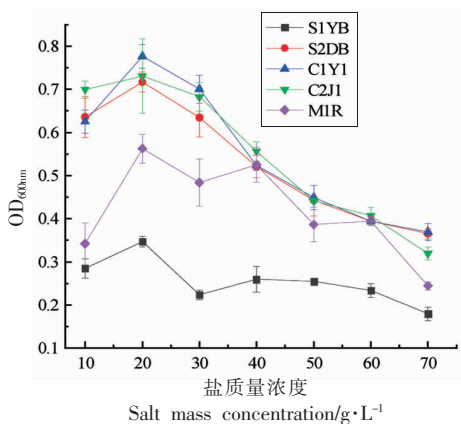


图5 不同盐质量浓度对菌株生长的影响

Fig.5 Effects of different salt mass concentrations on bacterial growth

2.4.2 pH值对酶活力的影响 pH值对酶活力影响如图7所示。贝莱斯芽孢杆菌 S1YB 所分泌的蛋

白酶在一定 pH 值范围内呈现出较高酶活力,且在 pH 值为 7.0 时最为稳定;黏质沙雷氏菌 S2DB

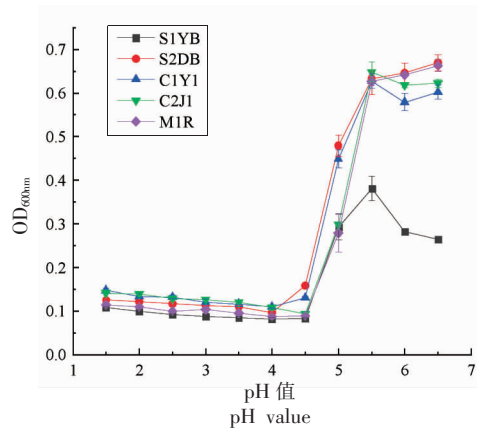


图4 不同 pH 值对菌株生长的影响

Fig.4 Effects of different pH values on bacterial growth

发现,不同菌株提取的粗酶液在不同温度下酶活力大小不同,在10~60 °C内,酶活力随温度升高整体呈现上上的趋势,在40~50 °C左右酶活性相对较高。相对于其它菌株来说,芽孢杆菌所产蛋白酶活力在一定温度范围内都可以保持稳定^[24]。这与本研究所分离所分离贝莱斯芽孢杆菌 S1YB 酶活力变化抑制,S1YB 在试验温度范围内整体酶活相对其它菌株所产酶活较高,且呈现上升趋势,未出现酶活下降的情况。

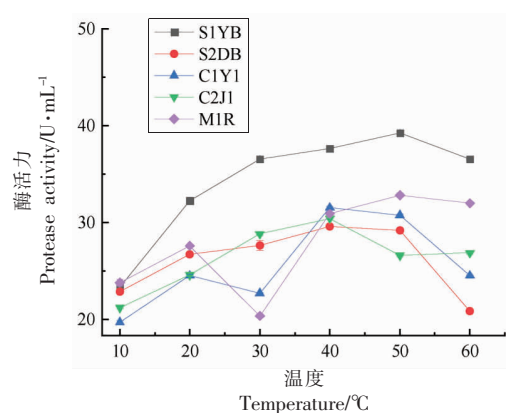


图6 温度对蛋白酶活力的影响

Fig.6 Effects of temperature on protease activity

白酶在一定 pH 值范围内呈现出较高酶活力,且在 pH 值为 7.0 时最为稳定;黏质沙雷氏菌 S2DB

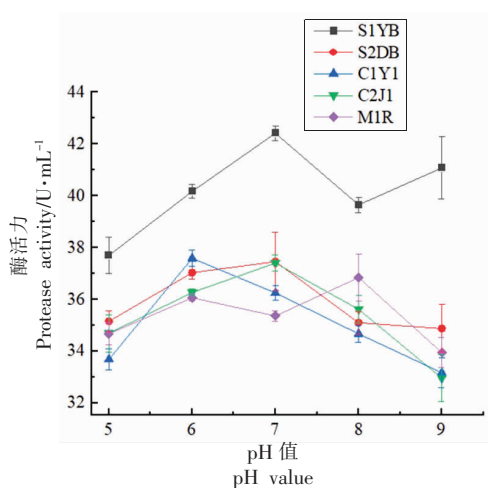


图 7 pH 值对蛋白酶活力的影响

Fig.7 Effects of pH value on protease activity

和海藻希瓦氏菌 C2J1 分泌的蛋白酶也在 pH 7 时最为稳定；藤黄色微球菌 C1Y1 和海氏肠球菌

MIR 分别在 pH 值为 6.0(偏酸性)和 8.0(偏碱性)下较为稳定。其中,芽孢杆菌产蛋白酶对热和 pH 值的稳定性相对较高^[25-26],与本研究分离贝莱斯芽孢杆菌 S1YB 产蛋白酶活力在 pH 值变化下酶活力的变化情况一致,S1YB 所产蛋白酶活力在相同 pH 值下均高于其它菌株所产蛋白酶活力。

2.4.3 金属离子和抑制剂对酶活力的影响 在食品的加工过程中添加的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等金属离子也会在一定程度上影响蛋白酶活力^[27-28]。本研究以不添加金属离子的粗酶液作为对照,研究了 1 mmol/L 和 10 mmol/L 上述金属离子添加对 5 株菌株所分泌蛋白酶相对酶活力影响,结果如表 3 和表 4 所示。研究发现添加金属离子后 5 株菌株所分泌的蛋白酶相对活力产生了不同程度的下降,下降程度与金属离子的类型和金属离子的添加量有关。

表 3 1 mmol/L 金属离子和抑制剂对 5 株菌产蛋白酶相对酶活力的影响

Table 3 Effects of 1 mmol/L metal ions and inhibitors on the relative protease activity produced by five stains

金属离子和抑制剂	相对酶活力变化/%				
	S1YB	S2DB	C1Y1	C2J1	MIR
空白	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
Na^+	55.84 ± 0.33 ^b	45.44 ± 0.03 ^c	37.73 ± 0.14 ^c	56.69 ± 0.06 ^b	58.42 ± 0.17 ^b
K^+	47.52 ± 0.11 ⁱ	28.45 ± 0.09 ^j	17.66 ± 0.06 ⁱ	46.30 ± 0.11 ^d	23.96 ± 0.11 ^h
Ca^{2+}	57.90 ± 0.09 ^d	37.48 ± 0.09 ^f	33.09 ± 0.06 ^b	31.83 ± 0.03 ⁱ	36.21 ± 0.06 ^g
Fe^{2+}	51.40 ± 0.14 ^e	36.69 ± 0.21 ^h	33.69 ± 0.23 ^e	48.43 ± 0.42 ^c	44.29 ± 0.15 ^e
Fe^{3+}	65.66 ± 0.12 ^f	46.92 ± 0.21 ^b	35.41 ± 0.03 ^f	37.68 ± 0.13 ^g	47.50 ± 0.12 ⁱ
Zn^{2+}	58.27 ± 0.11 ^h	39.78 ± 0.11 ^e	38.00 ± 0.09 ^d	36.38 ± 0.06 ^h	40.39 ± 0.11 ^f
Cu^{2+}	60.80 ± 0.09 ^c	43.31 ± 0.06 ^d	41.97 ± 0.06 ^c	43.64 ± 0.03 ^c	43.79 ± 0.06 ^d
EDTA	51.42 ± 0.06 ^g	36.97 ± 0.06 ^g	42.51 ± 0.06 ^b	43.58 ± 0.09 ^f	39.78 ± 0.06 ^e

注:不同小写字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

表 4 10 mmol/L 金属离子和抑制剂对 5 株菌产蛋白酶相对酶活力的影响

Table 4 Effects of 10 mmol/L metal ions and inhibitors on the relative protease activity produced by five stains

金属离子和抑制剂	相对酶活力变化/%				
	S1YB	S2DB	C1Y1	C2J1	MIR
空白	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
Na^+	61.58 ± 0.14 ^c	18.22 ± 0.33 ^c	40.93 ± 0.12 ^b	60.61 ± 0.15 ^b	25.16 ± 0.39 ^j
K^+	29.99 ± 0.12 ^h	43.21 ± 0.12 ^c	20.13 ± 0.17 ^h	50.05 ± 0.09 ^c	42.71 ± 0.14 ^f
Ca^{2+}	62.84 ± 0.10 ^d	43.45 ± 0.10 ^c	37.57 ± 0.06 ^d	41.04 ± 0.03 ^d	41.15 ± 0.09 ^e
Fe^{2+}	35.47 ± 0.16 ^g	19.16 ± 0.10 ^e	33.69 ± 0.12 ^f	28.36 ± 0.10 ^g	36.25 ± 0.06 ^h
Fe^{3+}	38.09 ± 0.14 ⁱ	30.79 ± 0.06 ^d	32.02 ± 0.12 ^g	28.25 ± 0.11 ^g	32.07 ± 0.06 ^d
Zn^{2+}	43.99 ± 0.09 ^f	40.00 ± 0.06 ^c	35.88 ± 0.06 ^c	38.33 ± 0.10 ^c	44.35 ± 0.11 ^b
Cu^{2+}	39.94 ± 0.10 ^b	67.11 ± 14.54 ^b	39.85 ± 0.03 ^c	37.21 ± 0.06 ^f	45.35 ± 0.03 ^g
EDTA	39.94 ± 0.00 ^e	29.75 ± 0.00 ^d	39.85 ± 0.03 ^c	37.21 ± 0.06 ^f	45.35 ± 0.03 ^g

注:不同小写字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

金属离子能提高或者降低蛋白酶的稳定性^[29]。Na⁺的添加可能改变蛋白酶的结构,在10 mmol/L的Na⁺作用下,虽然菌株整体蛋白酶活力有所降低,但贝莱斯芽孢杆菌 S1YB、藤黄色微球菌 C1Y1、海藻希瓦氏菌 C2J1 相对于1 mmol/L的Na⁺作用相对增强;在上述两个浓度的Ca²⁺作用下也发现类似趋势,Ca²⁺在一定温度条件内可稳定蛋白酶结构,提高蛋白酶活力,有研究发现一株从海洋环境中分离出的葡萄球菌 BUU1,在添加Ca²⁺共孵育培养48 h后其产蛋白酶活力提升了44%,很多研究表明Ca²⁺在提高蛋白酶活力和热稳定性中起到了非常重要的作用^[30]。Fe²⁺和Fe³⁺的加入对菌株蛋白酶活性抑制作用明显,可能与铁离子与酶活性中心基团结合而造成蛋白酶活性降低或失活有关^[31]。Cu²⁺的添加也使得包括贝莱斯芽孢杆菌 S1YB、藤黄色微球菌 C1Y1、海藻希瓦氏菌 C2J1 菌株在内的菌株蛋白酶活力大幅降低,可能与Cu²⁺造成蛋白酶活力失效有关。抑制剂EDTA在上述浓度下对蛋白酶活性的降低也十分显著,推测本研究分离菌株所产蛋白酶为半胱氨酸类酶或金属蛋白酶,因为这类酶活性容易受到EDTA的影响。

3 结论

本研究从发酵海产品中分离出10株产蛋白酶菌株,并对其中5株产蛋白酶活力相对较高的菌株贝莱斯芽孢杆菌 S1YB、黏质沙雷氏菌 S2DD、藤黄色微球菌 C1Y1、海藻希瓦氏菌 C2J1、海氏肠球菌 M1R 进行后续生物学和酶学特性分析。研究发现菌株最适生长温度在37℃左右,在低pH值(<4.5)时几乎不生长,最适pH值为6.0~8.0,在盐质量浓度范围10~70 g/L 菌株均呈现一定耐受性,最适盐质量浓度为20 g/L,相比于其它菌株,贝莱斯芽孢杆菌 S1YB 耐盐性较弱。酶学特性研究结果表明菌株蛋白酶活性稳定性为50℃,pH 7.0,不同浓度(1 mmol/L 和 10 mmol/L)金属离子和抑制剂会造成菌株产生的蛋白酶活性降低。

后续可考虑对菌株蛋白酶类型和底物作用的特异性等方面进行深入研究,并在海产品的发酵过程中考虑提高有益微生物例如贝莱斯芽孢杆菌和海氏肠球菌等的比例,控制腐败微生物黏质沙

雷氏菌的数量及控制其蛋白酶的产生,并讨论以有益微生物作为发酵剂发酵海产品对其风味的影响。

参 考 文 献

- [1] LAKSHMI B K M, MUNI KUMAR D, HEMALATHA K P J. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8 [J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, 16(2): 295-304.
- [2] MASI C, GEMECHU G, TAFESSE M. Isolation, screening, characterization, and identification of alkaline protease-producing bacteria from leather industry effluent[J]. *Annals of Microbiology*, 2021, 71(1): 1-11.
- [3] REKIK H, JAOUADI N Z, GARGOURI F, et al. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 1227-1239.
- [4] UTTATREE S, CHAROENPANICH J. Isolation and characterization of a broad pH- and temperature-active, solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus subtilis*[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 8: 32-38.
- [5] DO QUYNH NGUYEN A, SEKAR A, KIM M, et al. Fish sauce fermentation using *Marinococcus halotolerans* SPQ isolate as a starter culture [J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(2): 651-661.
- [6] PEINADO I, KOUTSIDIS G, AMES J. Production of seafood flavour formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 66: 444-452.
- [7] 赵丹丹, 丁玉庭, 陈文烜, 等. 维氏气单胞菌中 AHLs 介导的群体感应现象及大蒜提取物的干扰作用[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(2): 28-36.
ZHAO D D, DING Y T, CHEN W X, et al. AHLs based quorum sensing in *Aeromonas veronii* bv. *veronii* and its interruption from garlic extract[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(2): 28-36.
- [8] YULIANI Y, PUSPITA M, NUR M, et al. Ozone immersion treatment to increase the shelf life of Tu-

- na fish, milk fish, and shrimp in a cold storage system [C]. Bandung: 3rd Annual Applied Science and Engineering Conference (AASEC 2018), 2018, 434: 012021.
- [9] 耿芳, 杨绍青, 闫巧娟, 等. 土壤中高产蛋白酶菌株的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2018, 37(4): 66-71.
- GENG F, YANG S Q, YAN Q J, et al. Screening, identification and fermentation conditions optimization of a high yield protease strain from soil[J]. China Brewing, 2018, 37(4): 66-71.
- [10] 曹慧, 张腾月, 赵龙妹, 等. 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 T Y, ZHAO L M, et al. Identification and characterisation of a high protease-producing strain from soil [J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2072-2081.
- [11] 任佩, 金玉兰, 朴美子. 章鱼肠道产蛋白酶菌的筛选、产酶条件及酶学性质[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 189-193.
- REN P, JIN Y L, PIAO M Z. Screening of protease-producing bacterium from *Octopus vulgaris* intestine, fermentation conditions and enzymatic properties[J]. Food Science, 2013, 34(1): 189-193.
- [12] SHU L, SI X G, YANG X D, et al. Enhancement of acid protease activity of *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room temperature plasma[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1418.
- [13] SUN F D, WANG H P, LIU Q, et al. Effects of temperature and pH on the structure of a protease from *Lactobacillus brevis* R4 isolated from Harbin dry sausage and molecular docking of the protease to the meat proteins[J]. Food Bioscience, 2021, 42: 101099.
- [14] 宋梦思, 潘鲁青, 黄飞, 等. 对虾肠道中产蛋白酶菌株的筛选、鉴定及其产酶特性初步研究[J]. 海洋湖沼通报, 2019(6): 58-67.
- SONG M S, PAN L Q, HUANG F, et al. Screening, identification and enzymatic characterization of protease-producing probiotics from shrimp intestine [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2019 (6): 58-67.
- [15] SUN F D, TAO R, LIU Q, et al. Effects of temperature and pH on the structure of a metalloprotease from *Lactobacillus fermentum* R6 isolated from Harbin dry sausages and molecular docking between protease and meat protein[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101 (12): 5016-5027.
- [16] 李丹阳, 李宇辉, 高云云, 等. 新疆哈萨克族风干肉中产蛋白酶乳酸菌的筛选及酶学特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 57-63.
- LI D Y, LI Y H, GAO Y Y, et al. Screening of protease-producing lactic acid bacteria from Xinjiang Kazakh air-dried meat and their enzymatic characteristics[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(9): 57-63.
- [17] LIU J M, LIU W J, XING S, et al. Diversity of protease-producing bacteria in the soils of the South Shetland Islands, Antarctica[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2021, 114(4): 457-464.
- [18] KALWASINSKA A, JANKIEWICZ U, FELFOLDI T, et al. Alkaline and halophilic protease production by *Bacillus luteus* H11 and its potential industrial applications[J]. Food Technology and Biotechnology, 2018, 56(4): 553-561.
- [19] NWACHUKWU U, GEORGE-OKAFOR U, OZOANI U, et al. Assessment of probiotic potentials of *Lactobacillus plantarum* CS and *Micrococcus luteus* CS from fermented milled corn-soybean waste-meal[J]. Scientific African, 2019, 6: e00183.
- [20] HAMMAMI A, BAYOUDH A, HADRICH B, et al. Response - surface methodology for the production and the purification of a new H₂O₂ - tolerant alkaline protease from *Bacillus invictae* AH1 strain [J]. Biotechnology Progress, 2020, 36(3): e2965.
- [21] RAMANATHAN S, RAVINDRAN D, ARUNNACHALAM K, et al. Inhibition of quorum sensing-dependent biofilm and virulence genes expression in environmental pathogen *Serratia marcescens* by petroselinic acid[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2018, 111(4): 501-515.
- [22] BENMRAD M O, MECHRI S, JAOUADI N Z, et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest[J]. BMC Biotechnology, 2019, 19(1): 1-18.
- [23] RAHMAN M R, HOSSAIN M S, NAHAR A, et al. Scale-up of protease production by *Serratia marcescens* using municipal solid wastes in the

- bioreactor and its partial purification and characterization[J]. International Journal of Biosciences (IJB), 2018, 12(4): 99–109.
- [24] HADJIDJ R, BADIS A, MECHRI S, et al. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 1033–1048.
- [25] ABBAS N, SIDDIQUE H N, MASOOD F, et al. Production of protease enzyme from *Bacillus subtilis* using skimmed milk [J]. Science International (Lahore), 2020, 32(2): 211–214.
- [26] DOAN C T, TRAN T N, NGUYEN V B, et al. Chitin extraction from shrimp waste by liquid fermentation using an alkaline protease-producing strain, *Brevibacillus parabrevis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 706–715.
- [27] ZHOU C, QIN H L, CHEN X J, et al. A novel alkaline protease from alkaliphilic *Idiomarina* sp. C9-1 with potential application for eco-friendly enzymatic dehairing in the leather industry [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1–18.
- [28] ZANUTTO-ELGUI M R, VIEIRA J C S, DO PRADO D Z, et al. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases [J]. Food Chemistry, 2019, 278: 823–831.
- [29] 余茜, 张国丽, 敖晓琳. 金属离子对微生物蛋白酶活性的影响及机理 [J]. 中国食品学报, 2019, 19(4): 287–294.
- YU X, ZHANG G L, AO X L. Effect and mechanism of metal ions on the activity of microbial protease [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(4): 287–294.
- [30] UTTATREE S, CHAROENPANICH J. Purification and characterization of a harsh conditions-resistant protease from a new strain of *Staphylococcus saprophyticus* [J]. Agriculture and Natural Resources, 2018, 52(1): 16–23.
- [31] LAKSHMI B K M, KUMAR D M, HEMALATHA K P J. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8 [J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2018, 16(2): 295–304.

Diversity of Cultivable Protease-producing Strains from Fermented Seafoods and Their Enzymatic Characteristics

Tan Xiqian¹, Wang Dan¹, Wang Xiaoqing¹, Cui Fangchao¹, Lü Xinran¹,
Li Xuepeng¹, Li Yingmei², Li Jianrong^{1*}

¹College of Food Science and Engineering/Institute of Marine Science and Technology, Bohai University,
Jinzhou 121013, Liaoning

²Dalian Food Jinzhou Co. Ltd., Jinzhou 121019, Liaoning

Abstract A total of 10 protease-producing strains were isolated from homemade fermented seafoods, and were identified as *Bacillus velezensis* S1YBB, S1YB, *Serratia marcescens* S2DD, S2DB, C2Y3, M1B, C2J2, *Micrococcus luteus* C1Y1, *Shewanella alga* C2J1, and *Enterococcus hirae* M1R. The biological and enzymatic characteristics of S1YB, S2DB, C1Y1, C2J1, and M1R from different species with relatively higher enzyme activities were evaluated. The optimum growth temperature, pH and salinity of the strains were 37 °C, 6.0, and 20 g/L, respectively. The optimum temperature and pH for the enzyme activities were 50 °C and 6.0–8.0, respectively. Relative enzyme activities of the strains were decreased under the treatment of Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ and ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and in response to their concentrations. The results provided theoretical supports for exploring strains with excellent fermentation performance in seafood fermentation and controlling unexpected protease-producing strains in seafood fermentation processes.

Keywords protease; enzymatic characteristics; fermented seafood; diversity