

## 不同培养条件下蜡样芽胞杆菌 AI-2 和蛋白酶的相关性

祁雪鹤, 贾媛, 黄燕, 宋丹靓敏, 秦雪, 张微, 姜毓君, 满朝新, 杨鑫焱\*

(东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

**摘要** 以分离自原料乳的 1 株产蛋白酶高酶活性的蜡样芽胞杆菌 D8 为研究对象,通过外源添加信号分子 AI-2 和改变菌株的培养条件(温度、pH 值、渗透压、营养条件),明确 AI-2 和蛋白酶间的关系,并探究菌株 AI-2 产量和蛋白酶活性的相关性。采用高效液相色谱法和偶氮酪蛋白法检测上清液中信号分子 AI-2 浓度和蛋白酶活性。结果表明,在不同温度、pH 值和渗透压下,信号分子 AI-2 的浓度与蛋白酶活性变化趋势相同,呈正相关关系。在低营养胁迫下可以诱导蜡样芽胞杆菌产生更多的信号分子 AI-2,蜡样芽胞杆菌蛋白酶活性降低,二者呈负相关关系。结论:不同培养条件影响信号分子 AI-2 产量和蛋白酶活性,二者存在相关性。

**关键词** 蜡样芽胞杆菌; 培养条件; AI-2; 蛋白酶活性

**文章编号** 1009-7848(2025)02-0134-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.012

细菌在生长过程中会自身分泌一类特殊的化学物质——信号分子(Autoinducer, AI),细菌之间通过信号分子形成“沟通桥梁”,而信号分子随着细菌的生长被排泄到细胞外环境中,并随着种群密度的增加而积累,当达到阈值后,信号分子与受体结合,通过一系列反应调节相关基因表达和生理活动<sup>[1]</sup>。信号分子 AI-2(Autoinducer-2)最早在哈维式弧菌中发现,之后在革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中都有检出<sup>[2]</sup>。AI-2 调控细菌的多种重要的生理过程,包括生物发光、分泌毒素<sup>[3]</sup>、生物膜的形成<sup>[4]</sup>和胞外酶的产生<sup>[5]</sup>等。AI-2 是活化甲基循环(AMC)的副产物。甲硫氨酸由 S-腺苷甲硫氨酸合成酶催化生成 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)。SAM 作为甲基供体产生中间体 S-腺苷同型半胱氨酸(SAH),SAH 被 S-腺苷同型半胱氨酸核苷酶(Pfs)水解为 S-核糖同型半胱氨酸(SRH)。LuxS 是一种由 *luxS* 基因编码的蛋白质,可催化 SRH 裂解形成 AI-2 前体分子 4,5-二羟基-2,3-戊二酮(DPD),DPD 通过重排生成 AI-2<sup>[6]</sup>。因此,*luxS* 基因在 AI-2 合成过程中起关键作用,通过检测 *luxS* 基因可以初步判断菌株是否产生信号分子 AI-2。

原料乳中的微生物是影响乳及其制品质量的重要因素,其中蜡样芽胞杆菌是原料乳中典型的条件性致病菌<sup>[7]</sup>,为革兰氏阳性菌,其在原料乳中生长繁殖后会产生大量耐高温的胞外蛋白酶,在后续加工过程中会持续存在于乳及乳制品中,导致乳及乳制品出现凝胶化、苦味或酸味以及货架期缩短等品质问题<sup>[8]</sup>。有研究表明,蜡样芽胞杆菌产生的群体感应信号分子为 AI-2<sup>[9]</sup>。目前,关于蜡样芽胞杆菌信号分子 AI-2 的研究主要在其产生生物膜上<sup>[9-10]</sup>,而蜡样芽胞杆菌的蛋白酶活性与 AI-2 间的关系还未深入研究。有研究表明 AI-2 浓度受不同环境因素的影响<sup>[11]</sup>。在较低 pH 值下,化脓性链球菌产生的 AI-2 会减少,浓度降低<sup>[12]</sup>。大肠杆菌在 37 °C 下 AI-2 浓度高于在 30 °C 下的浓度<sup>[13]</sup>。高渗透压会增加大肠杆菌分泌的信号分子 AI-2 量<sup>[14]</sup>。添加葡萄糖会增加爱德华氏菌的信号分子 AI-2 的量<sup>[15]</sup>。此外,有研究表明蛋白酶活性受不同环境条件的影响。苏云金芽胞杆菌在 pH 8,47 °C 时均表现出最高蛋白酶活性<sup>[16]</sup>。也有研究表明副溶血性弧菌 AI-2 的浓度与蛋白酶活性呈正相关关系<sup>[17]</sup>,说明 AI-2 与蛋白酶之间存在相关性。本研究以分离自原料乳、产蛋白酶活力高且耐热性强的菌株为研究对象,分析不同培养条件下信号分子 AI-2 与蛋白酶活性之间的相关性,为后续阐明基于 LuxS/AI-2 QS 系统的蜡样芽胞杆菌产蛋白酶的机制奠定基础。

**收稿日期:** 2024-02-27

**基金项目:** 国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目(U21A20272)

**第一作者:** 祁雪鹤,女,硕士生

**通信作者:** 杨鑫焱 E-mail: 413927466@qq.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 蜡样芽胞杆菌 D8 分离自原料乳中。

1.1.2 培养基和试剂 LB 营养琼脂、LB 肉汤,青岛海博生物;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司;偶氮酪蛋白、三氯乙酸(TCA)、2,3-二氨基萘(DAN),上海阿拉丁生物科技有限公司;Tris-HCl,北京索莱宝科技有限公司;AI-2 标品,上海泷悦生物科技有限公司;甲酸(ACN)色谱级、乙腈(FA)色谱级。

### 1.2 方法

1.2.1 蜡样芽胞杆菌 *luxS* 基因检测 将菌株在 LB 营养琼脂培养基上进行三区划线,挑取单菌落到 LB 肉汤中,在 37 °C、150 r/min 条件下振荡培养过夜后,按照天根生化科技有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。

根据 NCBI 查找蜡样芽胞杆菌 *luxS* 基因(Gene ID=72451455),并设计引物,送去上海生工公司进行引物合成。引物序列为 *luxS*-F:5'-ATGCCATCAGTAGAAAGCTTTGAA-3'和 *luxS*-R:5'-TTATCCAAATACTTTCTCAAGTTC-3'。

聚合酶链式反应(PCR)反应体系(25  $\mu$ L)如下:2 $\times$ Taq Master Mix 12.5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L,DNA 1  $\mu$ L。反应体系如下:94 °C 预变性 10 min;94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增后产物采用琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统检测。

1.2.2 蜡样芽胞杆菌 AI-2 检测 采用 Lee 等<sup>[18]</sup>的方法进行检测。用液相色谱法,对 AI-2 标品进行检测,探究标品特征峰出现时间后对样品进行检测,原理见图 1。具体方法如下:活化后的菌株培养 12 h 后,菌株在 8 000 $\times$ g 下离心 10 min,上清液过 0.25  $\mu$ m 滤膜,取 600  $\mu$ L 上清液与 DAN 溶

液(0.2 mg DAN 溶于 1 mL 0.1 mol/L HCl)等体积混合,混匀 2 min,在 90 °C 下反应 40 min,后在 4 °C 冷却 10 min,后过 0.45  $\mu$ m 滤膜,除去多余杂质。取 50  $\mu$ L 用于液相色谱检测,紫外波长为 268 nm。液相色谱流动相 A:0.1% ACN,流动相 B:乙腈,程序如下: $t=0$  min,70% A,30% B; $t=4$  min,70% A,30% B; $t=12$  min,35% A,65% B; $t=20$  min,35% A,65% B; $t=24$  min,70% A,30% B; $t=27$  min,70% A,30% B。

1.2.3 蜡样芽胞杆菌蛋白酶活性检测 蛋白酶活性检测参照 Elgaml 等<sup>[19]</sup>的方法,进行了一定的修改,具体方法如下:菌液 10 000 r/min 下离心 10 min,上清液过 0.25  $\mu$ m 滤膜,上清液 0.5 mL 与 0.5 mL 0.8% 偶氮酪蛋白溶液 [溶于 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中]混合,在 40 °C 下水浴 2 h,加入 1 mL 10% 冰 TCA 溶液终止反应,并在冰上静置 30 min,后在 4 °C、10 000 r/min 下离心 10 min 除去沉淀,取 600  $\mu$ L 反应物加 700  $\mu$ L NaOH (1 mol/L)测量其在波长 440 nm 处的吸光度。对照组则为先加 TCA 溶液,40 °C 反应 2 h 后再加入上清液。一个蛋白酶单位定义为在 40 °C 下反应 2 h 后,在波长 440 nm 下吸光度发生 0.01 改变称为一个酶活力单位。

1.2.4 外源信号分子 AI-2 对蜡样芽胞杆菌蛋白酶活性的影响 菌株活化后,按 2% 接种量接种到 LB 肉汤中,同时添加 AI-2 信号分子使其终质量浓度分别为 100,300,500,800,1 500,2 000,2 500,3 000 ng/mL,培养 12 h 达到对数后期后,按照 1.2.3 节方法对菌株蛋白酶活力进行测定。

1.2.5 不同培养条件对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性影响

1.2.5.1 培养温度对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响 将活化二代培养 12 h 的蜡样芽胞杆菌 D8 接种到 LB 肉汤中,37 °C 培养过夜,按 2% 接

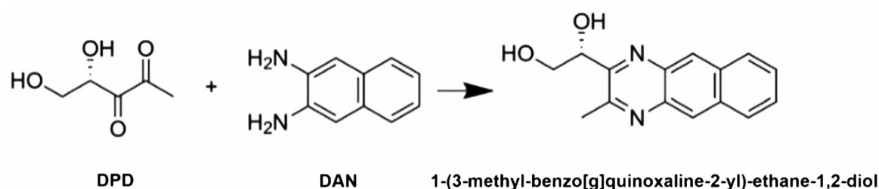


图 1 信号分子 AI-2 前体 DPA 衍生反应<sup>[18]</sup>

Fig.1 DPA derivation reaction of signaling molecule AI-2 precursor<sup>[18]</sup>

种于 LB 肉汤中,分别在 4,25,37 °C 和 45 °C 下 150 r/min 振荡培养 12 h。信号分子的检测参照 1.2.2 节所述方法。蛋白酶活性测定参照 1.2.3 节所述方法。

**1.2.5.2 渗透压对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响** 将菌株按 2% 接种量接种于含 0.5%, 1%, 2% 和 3% NaCl 的 LB 肉汤培养基中,探究渗透压对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响。

**1.2.5.3 pH 值对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响** 将菌株按 2% 接种量接种于 pH 5、pH 5.5、pH 6、pH 7、pH 8 和 pH 9 的 LB 肉汤培养基中,探究 pH 值对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响。

**1.2.5.4 营养条件对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响** 将菌株按 2% 接种量接种于含 20%, 40%, 60% 和 80% 肉汤的 LB 培养基中,探究营养条件对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响。

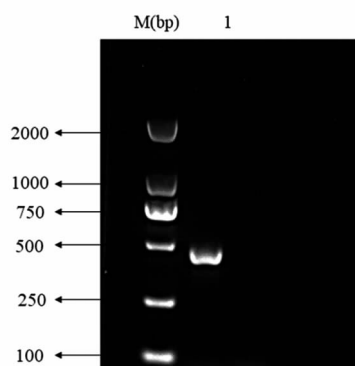
### 1.3 数据处理

所有测试重复进行平行试验 3 次,用 Graphpad Prism 软件进行统计分析并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜡样芽胞杆菌 *luxS* 基因检测

以特异性引物进行扩增的 *luxS* 基因,结果显示,扩增到的条带为 474 bp,与目的条带大小一致(图 2),表明 PCR 扩增到了目的片段。



注:M. 2 000 DNA Marker;1. *luxS* 基因 PCR 产物。

图 2 蜡样芽胞杆菌 *luxS* 基因 PCR 电泳图

Fig.2 PCR electrophoresis of *luxS* gene in *Bacillus cereus*

### 2.2 蜡样芽胞杆菌信号分子 AI-2 检测

DPD 是 AI-2 的前体物,DPD 不能直接检测,可通过与 DAN 反应形成衍生物 1-(3-甲基-苯并[g] 喹啉-2-基)-乙烷-1,2-二醇,常用 HPLC-UV 进行检测<sup>[18]</sup>。因此,本研究通过测定 DPD 衍生产物来间接说明 AI-2 的产量。由图 3 可知,在 HPLC-UV 中,DPD 衍生产物出峰时间在 6~7 min 之间。如图 4 所示,在无菌上清液中检测到一定的衍生物含量,说明蜡样芽胞杆菌 D8 能够产生信号分子 AI-2。根据不同质量浓度的信号分子 AI-2 标品峰面积的不同得到标品的标准曲线公式为  $y = 3 \times 10^6 x + 10^6$ ,如图 5 所示,后续可根据标准曲线计算不同培养条件下信号分子的质量浓度。

### 2.3 外源信号分子 AI-2 对蜡样芽胞杆菌蛋白酶活性的影响

为了探究信号分子 AI-2 对蜡样芽胞杆菌蛋白酶活性的影响,进行了一系列质量浓度梯度试验,选择在对数后期进行蛋白酶活性测定。如图 6 所示,随着外源添加信号分子 AI-2 质量浓度的增加,蜡样芽胞杆菌蛋白酶活性呈现先上升后下降的趋势,当信号分子 AI-2 的质量浓度达到 2 000 ng/mL 时,蛋白酶活性显著高于不添加信号分子时的酶活,且达到最大值。然而,随着信号分子 AI-2 质量浓度的升高,蛋白酶活性逐渐降低,说明信号分子的作用范围受浓度限制,当超出质量浓度范围后不能发挥有效作用<sup>[20]</sup>。由此说明在一定的质量浓度下,信号分子 AI-2 调控着蜡样芽胞杆菌蛋白酶活性。

### 2.4 培养温度对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响

图 7 显示,当培养温度为 25 °C 时,菌株 D8 的 AI-2 的产量最高,为 0.260 ng/mL,而 37 °C(对照组)下,AI-2 的产量为 0.126 ng/mL,有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),在 4 °C 和 45 °C 时,AI-2 的产量显著降低,分别为 0.064 ng/mL 和 0.045 ng/mL,说明过低或过高温度都会影响 AI-2 的产生。已有研究报道,温度的变化会影响粪肠球菌 AI-2 的分泌,在 23 °C 和 30 °C 下培养,信号分子 AI-2 的产量低于对照组 37 °C 下的产量<sup>[21]</sup>。中间链球菌在较低温度下,AI-2 水平会降低<sup>[22]</sup>。爱德华氏菌在 28 °C 下有较高的 AI-2 产量,当温度为 37 °C 时,AI-2 的产

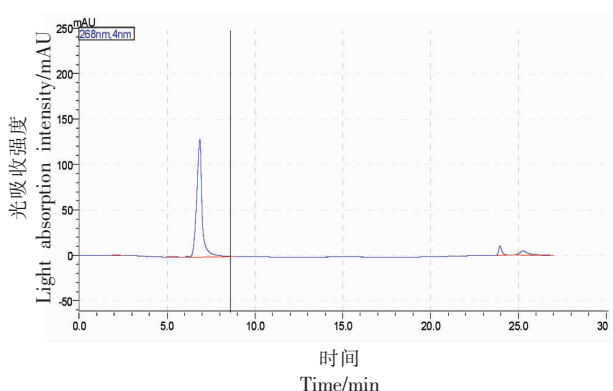


图 3 信号分子 AI-2 标品液相色谱图

Fig.3 Liquid chromatogram of signaling molecule AI-2

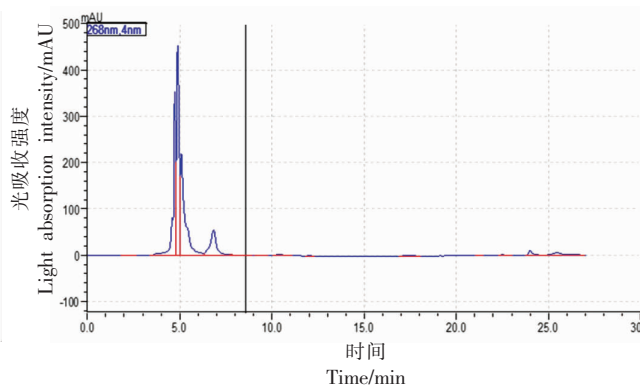


图 4 蜡样芽胞杆菌信号分子 AI-2 液相色谱图

Fig.4 Liquid chromatogram of *Bacillus cereus* signaling molecule AI-2

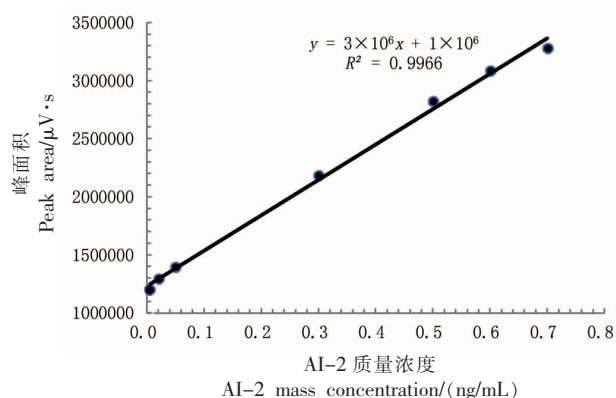
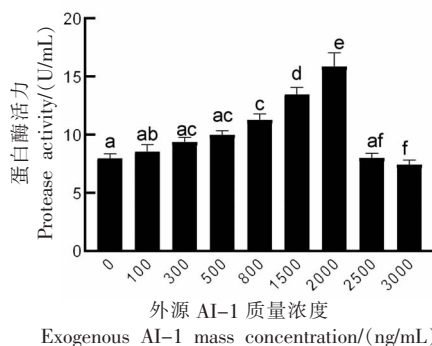


图 5 信号分子 AI-2 标品标准曲线

Fig.5 Standard curve of signaling molecule AI-2 standard

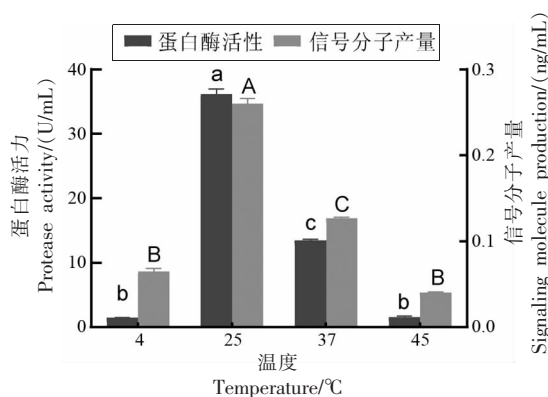


注:不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图 6 外源 AI-1 对蜡样芽胞杆菌蛋白酶活性影响

Fig.6 Effects of exogenous AI-2 on the protease activity of *Bacillus cereus*

量降低<sup>[23]</sup>。上述报道都说明温度对菌株的信号分子 AI-2 的分泌有影响,并且具有菌株特异性。蛋白酶活性在 25 °C 时达到最高,为 36.13 U/mL,在其它温度下蛋白酶活性显著低于 25 °C 下蛋白酶活性,说明蛋白酶最适温度为 25 °C。蛋白酶活性与信号分子 AI-2 的产量均是在 25 °C 下最高,其它温度下显著低于 25 °C,由此可见,随着温度的升高,信号分子 AI-2 的产量和蛋白酶活性均呈现先升高后降低的趋势,二者具有正相关性。有研究报道,温度对副溶血弧菌 AI-2 产量和蛋白酶活性有影响,AI-2 的含量随温度的升高而增加,当温度达到 37 °C 时,AI-2 活性降低,蛋白酶活性的变化规律与其相同<sup>[24]</sup>。本研究与其结果相同,信号分子 AI-2 的产量和蛋白酶活性呈现正相关关系。



注:字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),大写字母代表信号分子产量的差异性,小写字母代表蛋白酶活力的差异性,下同。

图 7 不同培养温度下蛋白酶活性和信号分子产量的变化图

Fig.7 Protease activity and signaling molecule production at different culture temperatures

## 2.5 渗透压对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响

由图 8 可知, 对照组信号分子产量最高, 为 0.157 ng/mL, 随着 NaCl 质量分数的增加, 蜡样芽胞杆菌产信号分子 AI-2 受到抑制。当 NaCl 质量分数为 0.5%, 1%, 2% 和 3% 时, AI-2 的产量分别为 0.146, 0.121, 0.069 ng/mL 和 0.064 ng/mL。对不同渗透压下植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌 AI-2 活性研究发现, 增加 NaCl 质量分数会导致 AI-2 的活性增加<sup>[25]</sup>, 说明植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌具有高耐渗透压耐受性, 高渗透压作用下刺激菌株产生更多的 AI-2, 而本研究中, 由于菌株对高渗透压不耐受, 渗透压升高会抑制信号分子 AI-2 的产生, 导致 AI-2 产量降低。这说明菌株对渗透压耐受性存在差异, 而随着渗透压的变化, 对信号分子 AI-2 产量都会存在一定影响。同时, 对照组蛋白酶活性最高, 而随着渗透压的升高, 蛋白酶活性降低, 并显著低于对照组。上述结果说明随着渗透压的升高, 信号分子 AI-2 产量和蛋白酶活性均呈现不断降低的趋势, 说明二者呈正相关关系。对嗜水气假单胞菌的研究中发现, 随着 NaCl 质量分数的增加, 嗜水气假单胞菌信号分子 AI-2 产量和蛋白酶活性表现出先升高后降低的趋势<sup>[26]</sup>, 该研究中二者的相关性与本研究结果相同。综上所述, 在不同渗透压作用下, D8 信号分子产量和蛋白酶活性呈正相关关系。

## 2.6 pH 值对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响

图 9 显示, pH 值为 6 时, 蜡样芽胞杆菌 D8 的信号分子产量和蛋白酶活性最高, 分别为 0.2889

ng/mL 和 15.87 U/mL, 显著高于 pH 7(对照组)。随着 pH 值不断升高, 蛋白酶活性显著降低, 当 pH 9 时, 蛋白酶活性为 0.833 U/mL, 并且不产信号分子 AI-2, 可能是过碱性条件抑制了信号分子的分泌, 在 pH 5、pH 5.5 时, 信号分子 AI-2 产量和蛋白酶活性显著低于对照组, 说明过酸或过碱的环境下, 都会抑制信号分子 AI-2 的产量和蛋白酶活性。有研究发现, 嗜酸乳杆菌和鼠李糖乳杆菌在酸性条件下, 会分泌更多的 AI-2<sup>[27]</sup>。化脓性链球菌在较低 pH 值下分泌的 AI-2 量减少<sup>[12]</sup>, 这说明了不同菌株 AI-2 的分泌也会受酸碱度的影响。本研究所用蜡样芽胞杆菌 D8 产信号分子 AI-2 的最适 pH 值偏中性, 在 pH 6 时诱导菌株提前进入 AI-2 高峰期, 而菌株生长的最适 pH 值为 7, 说明在偏中性条件下可以促进菌株中信号分子相关基因的表达。有研究表明, 在 pH 7 和 pH 10 时枯草芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌具有蛋白酶活性, 而在 pH 4 时, 无蛋白酶活性<sup>[28]</sup>。荧光假单胞菌产生的蛋白酶在奶酪生产过程中活性极低, 因为奶酪生产过程中的较低 pH 值影响了蛋白酶活性<sup>[29]</sup>。金黄杆菌在不同 pH 值条件下的蛋白酶活性研究发现, 菌株在 pH 5~7 的范围内有较强的活性<sup>[30]</sup>。不同菌株对 pH 值的适应性不同, 导致蛋白酶活性存在差异。本研究中蛋白酶活性的变化规律与信号分子 AI-2 产量一致, 均呈现先升高后降低的趋势, pH 6 时信号分子 AI-2 产量和蛋白酶活性最高。上述结果表明 pH 值影响信号分子 AI-2 的产量, 并对蛋白酶活性产生影响, 二者呈现正相关关系。

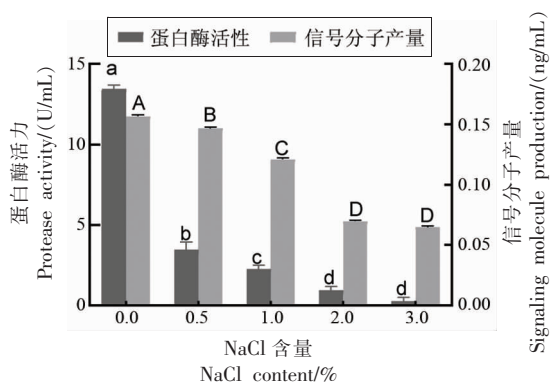


图 8 不同渗透压下蛋白酶活性和信号分子产量的变化图

Fig.8 Changes of protease activity and signal molecule production under different osmotic pressures

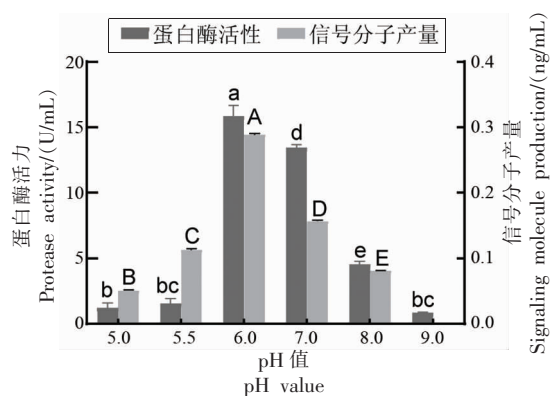


图 9 不同 pH 值下蛋白酶活性和信号分子产量的变化图

Fig.9 Changes of protease activity and signal molecule production at different pH value

## 2.7 营养条件对菌株 AI-2 产量及蛋白酶活性的影响

图 10 可知,随着培养基体积分数增加,蛋白酶活性逐渐升高,培养基体积分数为 20%时,蛋白酶活性仅为 1.267 U/mL,体积分数达到 80%时,蛋白酶活性为 7.867 U/mL,均显著低于培养基体积分数 100%(对照组)的蛋白酶活性。信号分子产量与之相反,呈现不断降低的趋势,当培养基体积分数为 20%时,信号分子 AI-2 的产量为 0.470 ng/mL,培养基体积分数为 80%时,信号分子 AI-2 产量降低至 0.219 ng/mL,均显著高于对照组信号分子 AI-2 产量。有研究对发酵乳杆菌在营养胁迫下信号分子 AI-2 分泌情况分析发现,在培养基体积分数为 20%下生长,菌株的生长虽然会受到抑制,但会分泌更高水平的 AI-2<sup>[31]</sup>。以添加 2%半乳糖的鼠李糖乳杆菌为对照组,不添加半乳糖组的信号分子 AI-2 活性低于对照组,而添加 0.5%半乳糖组 AI-2 活性可恢复与对照组相同,添加 1%半乳糖组信号分子 AI-2 活性显著高于对照组<sup>[25]</sup>,说明在低营养胁迫下,会迫使菌株产生更多的信号分子 AI-2,在低于对照组的条件下,半乳糖添加量越多,其产生信号分子 AI-2 的量越高。本试验的研究结果虽然与文献中鼠李糖乳杆菌的变化规律虽然有差异,但均可说明营养胁迫下会影响菌株产生信号分子 AI-2。

在低营养条件下,菌株信号分子 AI-2 产量升高,而蛋白酶活性降低,二者呈现负相关关系,为进一步了解二者之间关系,对不同营养条件下菌株密度进行分析,图 11 可知,随着营养条件的降低,蜡样芽胞杆菌 D8 的生长受到抑制,菌体密度呈现递减的趋势,培养基体积分数为 20%时,菌株密度为 0.282,当培养基体积分数增加到 80%时,菌株密度达到 0.365,说明营养缺乏会影响菌体的正常生长。随着营养浓度的降低,菌体密度逐渐降低,此时信号分子 AI-2 产量在不断增加,这可能是因为低营养胁迫下会促使菌株分泌更多的信号分子,来应对外界的不良环境,而此时蛋白酶活性受菌株密度的影响较大,随着培养基体积分数的升高,蛋白酶活性呈现升高的趋势。这可能是因为低营养条件下,菌株密度有限,通过菌株受体进入细胞内的信号分子 AI-2 量有限,蛋白酶相关基因

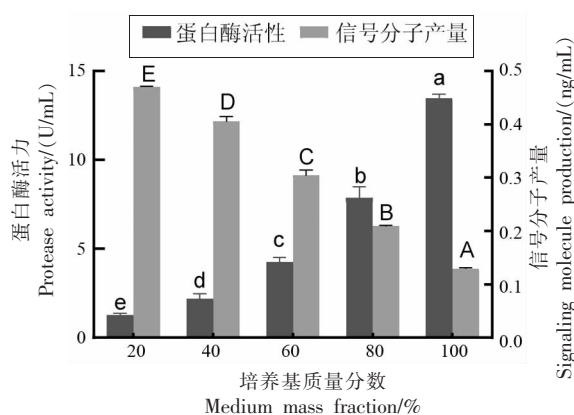


图 10 不同营养条件下蛋白酶活性和信号分子产量的变化图

Fig.10 Changes of protease activity and signal molecule production under different nutritional conditions

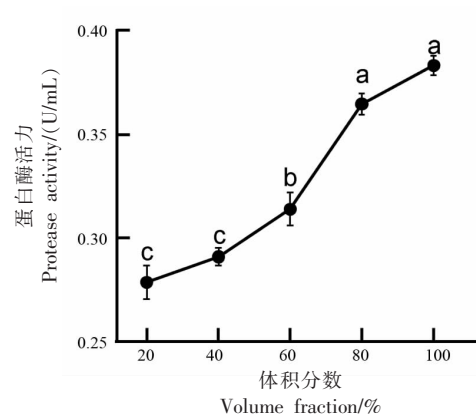


图 11 不同营养条件下菌密度的变化图

Fig.11 Changes in bacterial density under different nutritional conditions

表达量不高,进而导致蛋白酶活性降低,此时菌株密度是影响蛋白酶活性的主要原因。由此说明,不同营养条件下,菌体生长受限,此时信号分子 AI-2 产量与蛋白酶活性呈负相关关系。

## 3 结论

通过对蜡样芽胞杆菌 D8 外源添加不同质量浓度的信号分子 AI-2 发现, AI-2 与蛋白酶活性之间存在一定的关系,并通过改变蜡样芽胞杆菌 D8 的培养条件发现, AI-2 的分泌与蛋白酶活性的改变存在相关性。酸、碱胁迫下,菌体随着 pH 值的升高,产生信号分子 AI-2 的量和蛋白酶活性先升高后降低,信号分子 AI-2 的产量与蛋白酶活性呈

正相关关系。在渗透压胁迫下,蜡样芽胞杆菌 D8 随着渗透压的增强,其分泌的信号分子 AI-2 减少,蛋白酶活性也随之降;低温胁迫下,蜡样芽胞杆菌 D8 菌体信号分子 AI-2 的产量降低,蛋白酶活性也受到抑制,二者呈现正相关的趋势;低营养胁迫下会诱导蜡样芽胞杆菌 D8 产生更多的信号分子 AI-2,以应对不良的环境条件,而低营养胁迫下菌株生长受到抑制,蛋白酶活性降低,此时菌株密度是影响蛋白酶活性的主要因素。通过对不同培养条件下信号分子 AI-2 的产量和蛋白酶活性之间的关系进行分析,明确了 AI-2 与蛋白酶之间的相关性,也为后续探究 LuxS/AI-2 QS 系统对蜡样芽胞杆菌产蛋白酶机制奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] ZENG X Y, ZOU Y M, ZHENG J, et al. Quorum sensing-mediated microbial interactions: Mechanisms, applications, challenges and perspectives[J]. *Microbiol Res*, 2023, 273: 127414.
- [2] KIM S Y, LEE S E, KIM Y R, et al. Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system[J]. *Mol Microbiol*, 2003, 48(6): 1647-1664.
- [3] NOOR N M, DEFOIRDT T, ALIPIAH N, et al. Quorum sensing is required for full virulence of *Vibrio campbellii* towards tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) larvae[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(4): 489-495.
- [4] 刘蕾, 桂萌, 武瑞赞, 等. LuxS/AI-2 型群体感应系统调控细菌生物被膜形成研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(19): 254-262.  
LIU L GUI M, WU R Y, et al. Progress in research on biofilm formation regulated by LuxS/AI-2 quorum sensing[J]. *Food Science*, 2016, 37(19): 254-262.
- [5] 白方方, 张晓华. 哈维氏弧菌密度感应系统对几种胞外酶的活性影响[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2010, 40(6): 91-95.  
BAI F F, ZHANG X H. Studies on the effect of quorum sensing systems of *Vibrio harveyi* on the activities of extracellular enzymes[J]. *Journal of Ocean University of China (Natural Science Edition)*, 2010, 40(6): 91-95.
- [6] SCHAUDER S, SHOKAT K, SURETTE M G, et al. The LuxS family of bacterial autoinducers: Biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 41(2): 463-476.
- [7] LIANG L J, WANG P, QU T M, et al. Detection and quantification of *Bacillus cereus* and its spores in raw milk by qPCR, and distinguish *Bacillus cereus* from other bacteria of the genus *Bacillus*[J]. *Food Quality and Safety*, 2023, 6(3): 386-395.
- [8] YANG X Y, WANG Z H, ZHANG C X, et al. Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of ultra-high temperature-sterilized whole milk[J]. *J Dairy Sci*, 2021, 104(6): 6577-6587.
- [9] LEE N, KIM M D, LIM M C. Autoinducer-2 could affect biofilm formation by food-derived *Bacillus cereus*[J]. *Indian J Microbiol*, 2021, 61(1): 66-73.
- [10] AUGER S, KRIN E, AYMERICH S, et al. Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(1): 937-941.
- [11] ZHAO J, QUAN C S, JIN L M, et al. Production, detection and application perspectives of quorum sensing autoinducer-2 in bacteria[J]. *J Biotechnol*, 2018, 268: 53-60.
- [12] SILLER M, JANAPATLA R P, PIRZADA Z A, et al. Functional analysis of the group A streptococcal luxS/AI-2 system in metabolism, adaptation to stress and interaction with host cells[J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 188.
- [13] LEE J, ZHANG X S, HEGDE M, et al. Indole cell signaling occurs primarily at low temperatures in *Escherichia coli*[J]. *ISME J*, 2008, 2(10): 1007-1023.
- [14] DELISA M P, VALDES J J, BENTLEY W E. Mapping stress-induced changes in autoinducer AI-2 production in chemostat-cultivated *Escherichia coli* K-12[J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(9): 2918-2928.
- [15] ZHANG M, SUN K, SUN L. Regulation of autoinducer 2 production and luxS expression in a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain[J]. *Microbiology (Reading)*, 2008, 154(Pt 7): 2060-2069.
- [16] AGASTHYA A S, SHARMA N, MOHAN A, et al. Isolation and molecular characterisation of alkaline protease producing *Bacillus thuringiensis*[J]. *Cell Bio-*

- chemistry and Biophysics, 2013, 66(1): 45–51.
- [17] MIZAN M F R, JAHID I K, KIM M, et al. Variability in biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and the distribution of the genes involved in biofilm formation[J]. Biofouling, 2016, 32(4): 497–509.
- [18] LEE K, LEE C H, CHOO K H. A facile HPLC–UV–based method for determining the concentration of the bacterial universal signal autoinducer–2 in environmental samples[J]. Applied Sciences, 2021, 11(19): 9116.
- [19] ELGAML A, HIGAKI K, MIYOSHI S I. Regulation system of serine protease production in *Vibrio vulnificus* strain NCIMB 2137, a metalloprotease–gene negative strain isolated from a diseased eel[J]. Aquaculture, 2013, 416–417: 315–321.
- [20] 黎凡. 基于 AI-2/LuxS 群体感应系统金华火腿优势菌群风味形成机制的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.
- LI F. The mechanism of volatile compounds formation associated with predominant microbial community in Jinhua ham based on AI-2/luxS quorum sensing system[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020.
- [21] 顾悦, 李博, 吴荣, 等. 环境胁迫对屎肠球菌 8–3 LuxS/AI-2 群体感应系统的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 75–81.
- GU Y, LI B, WU R, et al. Effects of environmental stress on LuxS/AI-2 quorum sensing system of *Enterococcus faecium* 8–3[J]. Food Science, 2018, 39(6): 75–81.
- [22] AHMED N A A M, PETERSEN F C, SCHEIE A A. Biofilm formation and autoinducer–2 signaling in *Streptococcus intermedius*: Role of thermal and pH factors[J]. Oral Microbiology and Immunology, 2008, 23(6): 492–497.
- [23] ZHANG M, SUN L. *Edwardsiella ictaluri* LuxS: Activity, expression, and involvement in pathogenicity[J]. Polish Journal of Microbiology, 2012, 61(4): 263–271.
- [24] HAN N, MIZAN M F R, JAHID I K, et al. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature[J]. Food Control, 2016, 70: 161–166.
- [25] YEO S, PARK H, JI Y, et al. Influence of gastrointestinal stress on autoinducer–2 activity of two *Lactobacillus* species[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2015, 91(7): fiv065
- [26] JAHID I K, MIZAN M F, HA A J, et al. Effect of salinity and incubation time of planktonic cells on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing of *Aeromonas hydrophila* [J]. Food Microbiol, 2015, 49: 142–51.
- [27] MOSLEHI–JENABIAN S, GORI K, JESPERSEN L. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp.[J]. Int J Food Microbiol, 2009, 135(3): 295–302.
- [28] LINDSAY D, BROZEL V S, MOSTERT J F, et al. Physiology of dairy–associated *Bacillus* spp. over a wide pH range[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 54(1/2): 49–62.
- [29] PALUDETTI L F, O’CALLAGHAN T F, SHEEHAN J J, et al. Effect of *Pseudomonas fluorescens* proteases on the quality of Cheddar cheese[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(9): 7865–7878.
- [30] 赵焕帅, 王健鑫, 黄嘉茂, 等. 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 H S, WANG J X, HUANG J M, et al. Genome analysis, protease characterization, and enzyme production optimization of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3324–3334.
- [31] GU Y, LI B, TIAN J J, et al. The response of LuxS/AI-2 quorum sensing in *Lactobacillus fermentum* 2–1 to changes in environmental growth conditions[J]. Annals of Microbiology, 2018, 68(5): 287–294.



## The Correlation between *Bacillus cereus* AI-2 and Protease at Different Culture Conditions

QI Xuehe, JIA Ai, HUANG Yan, SONG Danliangmin, QIN Xue, ZHANG Wei, JIANG Yujun,  
MAN Chaoxin, YANG Xinyan\*

(College of Food Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

**Abstract** A strain of *Bacillus cereus* D8 isolated from raw milk with high enzyme activity in protease production was taken as the research object. The relationship between AI-2 and protease was clarified by adding signal molecule AI-2 and changing the culture conditions of the strain (temperature, pH, osmotic pressure, nutritional conditions), and the correlation between the production of AI-2 and protease activity of the strain was explored. The concentration of signal molecule AI-2 and the activity of protease in supernatant were detected by HPLC and azo casein method. The results showed that the concentration of AI-2 was positively correlated with the activity of protease at different temperature, pH and osmotic pressure. Under hypotrophic stress, *Bacillus cereus* could induce more signal molecule AI-2, and the protease activity of *Bacillus cereus* decreased, and the two were negatively correlated. Conclusion: Different culture conditions affect the production of signal molecule AI-2 and the activity of protease, and there is correlation between the two.

**Keywords** *Bacillus cereus*; culture condition; AI-2; protease activity