环境昆虫学报 2022，44（1）：212－220
Journal of Environmental Entomology
http：//hjkcxb. alljournals. net
doi：10. 3969/j. issn. 1674－0858. 2022. 01. 24

王宁，李小波，刘文彬，唐彬，汪洁，朱家勇，金小宝. 美洲大蠊肠道耐热碱性蛋白酶产生菌筛选及其酶特性[J]. 环境昆虫学报，2022，44（1）：212－220.

美洲大蠊肠道耐热碱性蛋白酶产生菌筛选及其酶特性

王　宁，李小波，刘文彬，唐　彬，汪　洁，朱家勇，金小宝*
（广东药科大学生命科学与生物制药学院，广东省生物活性药物研究重点实验室，广州 510006）

摘要： 昆虫肠道菌是重要的微生物资源。为拓展微生物酶资源菌种来源，本研究以含 Na_2CO_3 和脱脂奶粉的培养基从美洲大蠊 *Periplaneta americana*（L.）肠道中筛选产碱性蛋白酶的嗜碱细菌，进行形态学和 16S rDNA 序列鉴定，并分析温度、pH 和 Na_2CO_3 对菌株生长的影响；采用福林－酚法和 SDS-PAGE 酶谱法测定温度、pH 对菌株所产蛋白酶活性和稳定性的影响。结果显示，从美洲大蠊肠道分离到一株嗜碱细菌 PaGA523-1，革兰氏阳性，具芽孢，经鉴定为列城芽孢杆菌 *Bacillus lehensis*，其最适生长 pH 范围为 9～11，最适生长温度为 37℃，可在含 0. 03～0. 09 mol/L Na_2CO_3 的肉汤蛋白胨液体培养基中生长。在含 Na_2CO_3 的玉米粉－黄豆饼粉发酵培养基中，菌株 PaGA523-1 可产生蛋白酶。该蛋白酶的最适反应温度为 62℃，最适反应 pH 范围为 9～11。蛋白酶在不同 pH 缓冲液（7～11）和热处理（40～60℃）后仍具有一定活性，在 60℃ 处理 1 h 后，仍保留其初始活性的 62. 68%。SDS-PAGE 酶谱法检测结果也定性说明菌株可产生具有一定程度热稳定性的碱性蛋白酶。本研究获得了一株嗜碱性的昆虫肠道芽孢杆菌，该菌可分泌热稳定碱性蛋白酶，在蛋白质水解方面具有潜在应用价值。

关键词： 美洲大蠊；昆虫肠道菌；嗜碱性芽孢杆菌；碱性蛋白酶；耐热酶
中图分类号： Q968. 1；S433　　**文献标识码：** A　　**文章编号：** 1674－0858（2022）01－0212－09

Screening and identification of thermostable alkaline protease-producing bacteria from the gut of *Periplaneta americana* and its enzyme characteristics

WANG Ning，LI Xiao-Bo，LIU Wen-Bin，TANG Bin，WANG Jie，ZHU Jia-Yong，JIN Xiao-Bao*
（College of Life Science and Biopharmaceutical，Guangdong Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances，Guangdong Pharmaceutical University，Guangzhou 510006，China）

Abstract: Insect gut microbes are important microbial resources. In order to expand the enzyme-producing microbial resources，in this study，the medium containing Na_2CO_3 and skimmed milk was used to screen alkaline protease-producing alkaliphilic bacteria from the gut of American cockroach，*Periplaneta americana*. Then the isolated strain was identified based on colony morphology and 16S rDNA sequence analysis，and the effects of temperature，pH and Na_2CO_3 on the growth of the strain were analyzed，too. The effects of temperature and pH on the activity and stability of alkaline protease which produced by the strain was detected by Folin-phenol method and SDS polyacrylamide gel electrophoresis（SDS-PAGE）zymography analysis. As results，the alkaliphilic bacteria strain PaGA523-1，isolated from the American

基金项目： 广东省公益研究与能力建设项目（2017A020211008）；广东省普通高校基础研究与应用基础项目（2018KZDXM041）；广东省自然科学基金（2020A1515011097）
作者简介： 王宁，女，1995 年生，山东潍坊人，硕士研究生，主要研究方向为昆虫微生物活性物质研究，E－mail：951499188@qq. com
* **通讯作者** Author for correspondence：金小宝，男，博士，教授，主要研究方向为昆虫微生物活性物质研究，E－mail：jinxf2001@163. com
收稿日期 Received：2021－08－06；**接受日期** Accepted：2021－10－21

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

cockroach gut, was found short rod shaped, gram-positive, formed spores, and identified as *Bacillus lehensis*. Its optimal growth pH range and temperature were 9 ~ 11 and 37℃, respectively. The strain could grow well in liquid broth peptone medium which containing 0.03 ~ 0.09 mol/L Na_2CO_3. The strain PaGA523-1 could produce thermostable alkaline protease in the corn flour-soybean meal flour fermentation medium. The optimum reaction temperature of the protease was 62℃, and the optimum reaction pH range was 9 ~ 11. The protease still remained a certain extent activity after treated with different pH buffers (7 ~ 11) and heat (40 ~ 60℃), and that it even remained 62.68% of its initial activity after treated for 1 h at 60℃. Results of the SDS-PAGE zymography test also showed qualitatively that the strain could produce alkaline protease which had a certain degree of thermal stability. In this study, an alkaliphilic *Bacillus* strain which could secrete thermostable alkaline protease was obtained from insect gut. The alkaline protease showed great potential for application in protein hydrolysis.

Key words: *Periplaneta americana*; insect gut microbes; alkaliphilic *Bacillus*; alkaline protease; thermostable enzyme

碱性蛋白酶是一类最适反应 pH 为碱性范围的蛋白水解酶，在轻工业（洗涤剂、皮革鞣制等）、食品加工业（蛋白质水解物生产、肉类加工等）、医药工业（例如，在制药业中催化某些合成反应）中具有广泛应用价值（Kouhdasht *et al.*，2018；谢宗波等，2019）。微生物来源的碱性蛋白酶通常为胞外酶，其产酶量高，适合大规模生产（袁媛等，2021），目前大部分工业酶制剂是利用微生物生产的。因此，产碱性蛋白酶菌种的分离和选育一直被关注。

人们一直尝试从自然界丰富的微生物种群中筛选有应用价值的产酶菌种。生长于动物体内的一些共存微生物，尤其是各种肠道微生物，在其宿主的消化、营养吸收、抗菌和免疫等生理过程中发挥重要作用，构成了发现新型天然代谢产物和生物活性酶的特殊生境微生物资源库（Akbar *et al.*，2019；江宇航等，2020）。目前昆虫共生菌在生物医药、农业和生态等方面已展现出重要的研究和应用价值（魏舸等，2018）。

美洲大蠊是已知最古老的昆虫之一，有很强的生理和环境适应能力，已在地球上生存了约 3.5 亿年（Liu *et al.*，2020）。美洲大蠊为杂食性昆虫，食物来源多样（包括腐烂的植物和动物肉类等），且通常生活在温暖、湿润、微生物丰富的环境中，其体内或体表可携带多种微生物。这些微生物，部分作为人类和动物病原体（细菌、病毒、寄生虫等），已得到了广泛研究（Abbas，2019）。另一方面，这些昆虫的共生菌，其组成具有丰富的多样性，可作为有益微生物资源（Guzman and Vilcinskas，2020）。但已有的对蜚蠊共生菌的研究多采用常规 pH 培养基（中性或弱酸碱性）进行分离和筛选，对这类昆虫肠道中嗜酸性、嗜碱性或嗜盐性微生物及其代谢产物和酶的研究有限。事实上，一些研究表明，某些具有生物技术重要性的嗜极微生物，也可在普通的非极端环境中分离到（Low-Décarie *et al.*，2016；Baselga-Cervera *et al.*，2020）。本课题组前期曾以常规高氏 I 号琼脂培养基分离到 284 株美洲大蠊肠道菌（放线菌 159 株，其它细菌 125 株）（陈至里等，2016；蒋诗林等，2021），并对相关菌株的次级代谢产物进行了研究。为更充分地挖掘和利用昆虫肠道菌资源，本研究拟采用含碱性介质（Na_2CO_3）的蛋白酶筛选培养基从美洲大蠊肠道中筛选嗜碱细菌，并对其所产碱性蛋白酶的酶学性质进行研究。

1　材料与方法

1.1　材料

实验用美洲大蠊捕捉自广州市黄沙轮渡码头和黄沙水产交易市场之间桥梁的洞穴中。

支持嗜（耐）碱微生物生长的筛选培养基采用 Horikoshi I 培养基（Liu *et al.*，2018），并作适当改动（葡萄糖 1 g/L、蛋白胨 5 g/L、酵母提取物 5 g/L、K_2HPO_4 1 g/L、$Mg_2SO_4·7H_2O$ 0.2 g/L、Na_2CO_3 0.15 mol/L、琼脂粉 20 g/L、脱脂奶粉 20 g/L），主要的改动是提高了培养基中的碱性介质 Na_2CO_3 浓度，以及添加脱脂奶粉作为蛋白酶作用底物。Na_2CO_3 和脱脂奶粉均溶于适量水中单独灭菌。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

发酵培养基采用适宜于芽孢杆菌属细菌发酵的玉米粉 - 黄豆饼粉培养基，按沈萍和陈向东（2018）的配方稍加改变：玉米粉 40 g/L，黄豆饼粉 30 g/L，Na_2CO_3 0.04 mol/L，$CaCO_3$ 10 g/L。基础的肉汤蛋白胨培养基（牛肉膏 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L）按常规配制，根据测试目的向其中加入不同 pH 缓冲液或不同浓度的 Na_2CO_3。

1.2 方法

1.2.1 产碱性蛋白酶细菌的分离和纯化

以 75% 乙醇和无菌水充分清洗美洲大蠊虫体表面，然后用无菌手术剪剪开虫体腹部，取肠道及其内容物混合放入 0.15 mol/L Na_2CO_3 溶液中，在匀浆器中充分研磨。取匀浆液涂布于含 Na_2CO_3 的筛选培养基平板，置 28℃倒置培养 5 ~ 7 d，观察菌落出现及牛奶蛋白的水解情况，挑取产生明显水解圈的菌落，进一步以平板划线分离法进行菌种纯化。取上述具明显水解圈的菌株的纯化物，再次接种于含 Na_2CO_3 筛选培养基和普通肉汤蛋白胨培养基（不含 Na_2CO_3）平板上，置 37℃倒置培养 4 ~ 5 d，取在普通肉汤蛋白胨培养平板上未见明显生长、而在含 Na_2CO_3 筛选培养平板上能形成牛奶蛋白水解圈的菌株进行下一步测试。

1.2.2 产碱性蛋白酶细菌的鉴定

形态学鉴定：取菌株纯培养物划线接种于含 Na_2CO_3 的平板培养基，于 37℃培养，观察菌落特征。取适当阶段的培养物涂片、固定，分别作革兰氏染色（结晶紫初染、碘液媒染、乙醇脱色和沙黄复染）及芽孢染色（孔雀绿初染、沙黄复染）后用油镜观察。

分子生物学鉴定：取新鲜细菌培养物，应用细菌核糖体 16S rDNA 序列引物 27F（5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′）和 1492R（5′-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′）进行 PCR 扩增，PCR 产物经琼脂糖电泳鉴定后送华大基因公司测序。将菌株的 16S rDNA 序列与 NCBI 核酸数据库已有核酸序列进行 BLAST 比对，采用 NCBI-BLAST Tree View 程序构建进化树（www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi）（Cardoso *et al.*，2021），通过和高度相似序列的比对确定该菌株分类地位（采用 Neighbor Joining 法构建，最大序列差异 = 0.75）。

1.2.3 温度、pH 和 Na_2CO_3 对菌株生长的影响

菌株在含适量 Na_2CO_3 的肉汤蛋白胨液体培养基中振荡培养 48 h，取该新鲜培养物，制成 OD_{600} = 1.0 的均匀细菌悬液，用于如下测定：（1）温度对菌株生长的影响：上述细菌悬液按 0.5% 接种量接种于 5 mL 含 Na_2CO_3（0.04 mol/L）的肉汤蛋白胨培养基中，分别在 25℃、28℃、31℃、34℃、37℃、40℃的摇床中振荡培养 24 h，观察培养液是否浑浊，并测定培养液的 OD_{600} 值，考察温度对菌株生长的影响。每个样品设 3 个重复，结果取平均值。（2）pH 和 Na_2CO_3 浓度对菌株生长的影响：上述细菌悬液按 0.5% 接种量接种于 5 mL pH 分别为 7、8、9、10、11、12（以及 Na_2CO_3 浓度分别为 0、0.03、0.06、0.09、0.12、0.15 mol/L）的肉汤蛋白胨培养基中，在前述确定的最适生长温度条件下振荡培养 24 h，观察培养液是否浑浊，并测定培养液的 OD_{600} 值，分别考察 pH 和 Na_2CO_3 对菌株生长的影响。每个样品设 3 个重复，结果取平均值。

1.2.4 菌株发酵和粗酶液制备

将菌株接种到玉米粉 - 黄豆饼粉发酵培养基中，37℃振荡培养 144 h，其间每隔 12 h 取发酵液离心，取上清（粗酶液）测定其在 60℃、pH11 条件下的蛋白酶活性，以确定发酵时间对菌株产蛋白酶活性的影响。后续 SDS-PAGE 酶谱法定性检测及酶学性质测试所用粗酶液，均按上述确定的产酶最佳发酵时间培养后的发酵液离心制备。

1.2.5 碱性蛋白酶活性的 SDS-PAGE 酶谱法定性检测

参考 Tarrahimofrad *et al.*（2020）的方法略作改动，以酪蛋白为底物进行蛋白酶活性的 SDS-PAGE 酶谱法检测：将上清与 5 × 上样缓冲液混合，进行 SDS-PAGE 电泳，分离胶中含 0.1% 酪蛋白，于冰水浴中低温电泳，电泳结束后，凝胶浸入含 1% Triton X100 的硼酸钠 - 氢氧化钠缓冲液（pH = 11）中，60℃孵育 2 h，漂洗后用考马斯亮蓝染色，脱色后观察蛋白质降解区域显现状况。

1.2.6 酶学性质测试

以菌株发酵液离心上清作为粗酶液，进行如下测定：（1）反应温度对酶活性的影响：反应温度设定为两组：首先在 20 ~ 100℃范围内（间隔 10℃）进行测试，可初步判断酶最适反应温度的大致范围。然后，在一个较小温度范围内（50 ~ 70℃，间隔 2℃）测试，可较精确地确定酶的最适反应温度。（2）反应 pH 对酶活性的影响：用相应 pH 的缓冲液配制的 1% 酪蛋白为底物，分别测定在 pH 7、8、9、10、11、12、13 条件下碱性蛋白酶的活性，确定碱性蛋白酶的最适反应 pH，反应

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在最适反应温度条件下进行。(3) 酶热稳定性的定量测定：将粗酶液分别在 40℃、60℃、80℃、100℃条件下水浴，所有温度处理后的粗酶液均分别在 1 h、2 h、3 h、4 h 取出，置于冰上。待所有粗酶液取出后，在最适反应温度和 pH 条件下测定酶活力，计算其相对于未进行热处理的残留酶活性（相对酶活性），确定酶的热稳定性。(4) 酶热稳定性的 SDS-PAGE 酶谱法检测：将粗酶液分别于 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃条件下水浴 10 min，然后进行 SDS-PAGE 电泳（分离胶中含 0.1% 酪蛋白），电泳后照前述方法反应并染色，观察蛋白质降解区域显现状况。(5) 酶在不同 pH 条件下的稳定性测试：将粗酶液分别和 pH 为 7、8、9、10、11、12 的缓冲液等体积混合，4℃静置 24 h，然后测定酶活力，计算其残留酶活性（相对酶活性），确定在不同 pH 条件下酶的稳定性。

碱性蛋白酶活力的定量测定采用福林－酚试剂法进行，操作主要参考沈萍和陈向东（2018）和现行蛋白酶制剂国家标准（GB/T23527-2009）中的方法进行，简述如下：粗酶液和酪蛋白混合后水浴反应 10 min，加三氯醋酸以终止反应，离心后取上清加入 Na_2CO_3 和福林－酚试剂，测定其 OD_{680} 值。空白对照组为粗酶液中首先加三氯醋酸以使酶灭活，然后加酪蛋白，其它条件保持一致。每个样品设 3 个重复，结果取平均值。酶活力单位定义：1 mL 粗酶液在一定温度和 pH 条件下，1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸，即为 1 个活力单位，以 U/mL 表示。计算公式：酶活力(U/mL) = $K \times A \times N \times (5/10)$。式中：$K$ 为比色常数，A 为样品 OD 值与空白对照 OD 值之差，N 为酶样品稀释倍数，5 为测定 OD 值时终止反应液的稀释倍数，10 为酶反应时间（min）。

2　结果与分析

2.1　产碱性蛋白酶细菌的初步筛选结果

美洲大蠊肠道及其内容物匀浆液在初筛平板上培养 5～7 d 后，共得到 3 个可产生明显牛奶水解圈的菌株。经划线分离、纯化后，重新接种进行复筛，仅一株生长良好且可形成牛奶水解圈（图 1-A，B），而在不含 Na_2CO_3 的肉汤蛋白胨培养基平板上培养未见明显生长，初步说明该菌株具有嗜碱性，并可分泌碱性蛋白酶，将其命名为 PaGA523-1。

2.2　菌株的鉴定

2.2.1　形态学鉴定

在含 Na_2CO_3 的肉汤蛋白胨培养基平板上，菌株 PaGA523-1 的菌落呈圆形，凸起、光滑，乳白色－乳黄色（图 1-A）。经革兰氏染色，油镜下观察见革兰氏染色阳性短杆状菌（图 1-C）。经芽孢染色，细胞中可见绿色芽孢（图 1-D）。

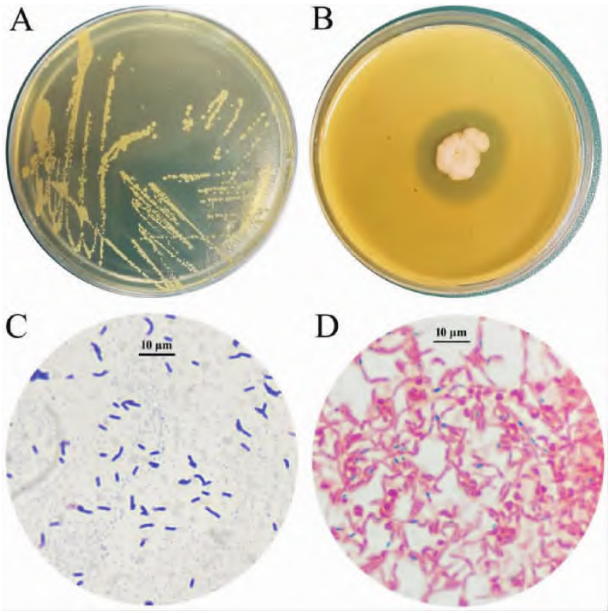


图 1　菌株 PaGA523-1 菌落和染色特征

Fig. 1　The colony and staining characteristics of strain PaGA523-1

注：A，菌落；B，形成的牛奶蛋白水解圈；C，革兰氏染色；D，芽孢染色。Note: A, Colony characteristics; B, Milk protein hydrolysis zone of strain PaGA523-1 on agar plate; C, Gram staining characteristics; D, Spore staining characteristics.

2.2.2　菌株 16S rDNA 基因序列分析

以 PaGA523-1 基因组为底物，用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增菌株 16S rDNA 序列，经琼脂糖凝胶电泳鉴定，PCR 产物约为 1 500 bp（图 2-A）。

菌株 16S rDNA 序列进行 NCBI-BLAST 比对后构建的进化树分析显示（图 2-B），PaGA523-1 和芽孢杆菌属各种细菌的 16S rDNA 序列形成一个大的分支，且和其中的 *Bacillus lehensis* G1 株（GenBank No. CP003923.1）距离最近，其相似率为 99.24%。结合菌落形态和细胞形态特征、16S rDNA 基因序列分析，菌株 PaGA523-1 可被确定为 *B. lehensis*。将菌株 PaGA523-1 的 16S rDNA 序列在 NCBI-GenBank 进行注册，获得注册号 MZ448243。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

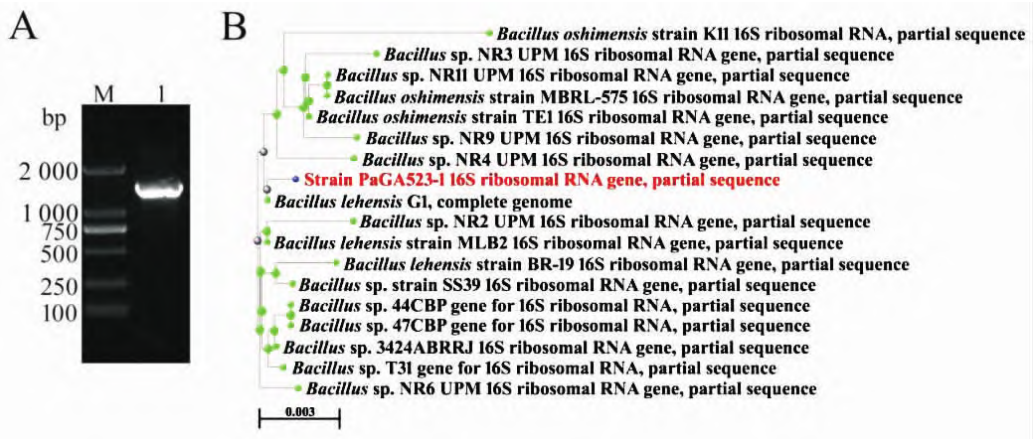


图 2 菌株 PaGA523-1 16S rDNA 基因 PCR 产物琼脂糖电泳和进化树分析

Fig. 2 PCR product of 16S rDNA of strain PaGA523-1 and its phylogenetic tree analysis

注： A，琼脂糖电泳。Lane M，DNA marker；Lane 1，PCR product。B，进化树分析。Note: A, Agarose gel electrophoresis. Lane M, DNA marker; Lane 1, PCR product. B, Phylogenetic tree analysis.

2.3 温度、pH 和 Na_2CO_3 对菌株生长的影响

以肉汤蛋白胨培养基为基础，分别考察了温度、pH 对菌株生长的影响，结果显示，其最适生长温度为 37℃（图 3-A），最适生长 pH 范围为 9～11（图 3-B），可在含 0.03～0.09 mol/L Na_2CO_3 的肉汤蛋白胨液体培养基中良好生长，其最适浓度范围为 0.03～0.06 mol/L（图 3-C）。

2.4 发酵时间对酶活性的影响

菌株在玉米粉－黄豆饼粉发酵培养基中 37℃ 连续振荡培养 144 h，每隔 12 h 取发酵上清检测碱性蛋白酶活性。结果显示，发酵时间 96 h 碱性蛋白酶活性达最高值，并在 96～120 h 趋于稳定，120 h 后酶活性开始呈下降趋势（图 4）。

2.5 碱性蛋白酶活性的 SDS-PAGE 酶谱法检测

未经煮沸变性的发酵上清经电泳后在硼酸钠-氢氧化钠缓冲液（pH = 11）中孵育 2 h，可在含酪蛋白的 SDS-PAGE 凝胶中形成一条明显的降解条带，定性说明菌株可产生碱性蛋白酶（图 5）。

2.6 酶学性质测定

2.6.1 反应温度对酶活性的影响

在较宽范围内（20～100℃）测试温度对酶活性的影响，发现在 50～70℃ 范围内酶均有一定酪蛋白降解活性，初步估计最适反应温度在 60℃ 左右（图 6-A）。然后，在 50～70℃ 范围内进行测试，确定其最适反应温度为 62℃（图 6-B）。

2.6.2 酶的热稳定性

热稳定性测试表明，60℃（接近其最适反应温度）孵育 1 h 后，粗酶液仍保留其初始活性的 62.68%，说明酶具有一定程度的热稳定性（图 6-C）。

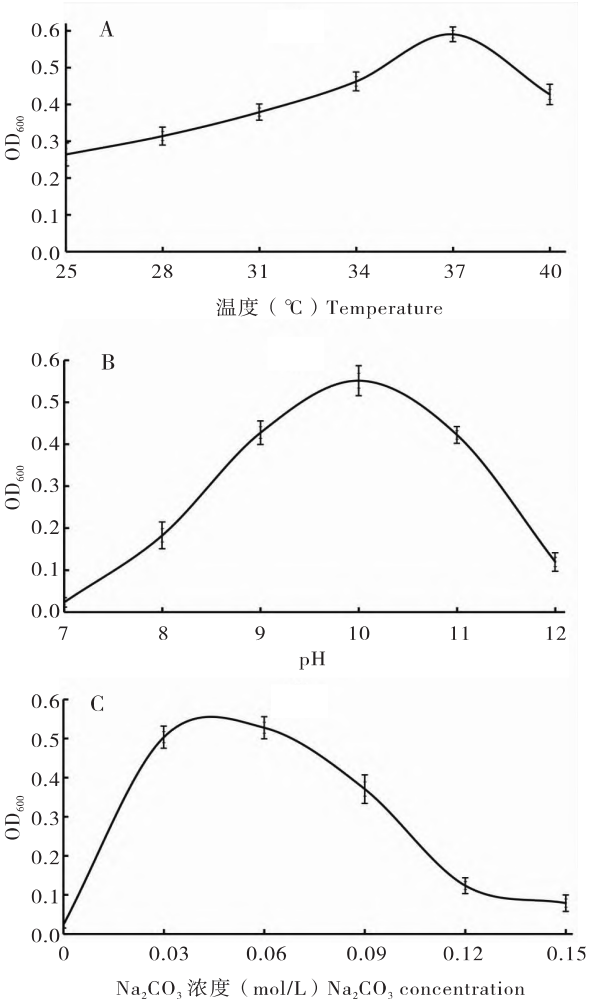


图 3 温度、pH 和 Na_2CO_3 对菌株 PaGA523-1 生长的影响

Fig. 3 Effect of temperature, pH and Na_2CO_3 on the growth of strain PaGA523-1

注： A，温度；B，pH；C，Na_2CO_3。Note: A, Temperature; B, pH; C, Na_2CO_3.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

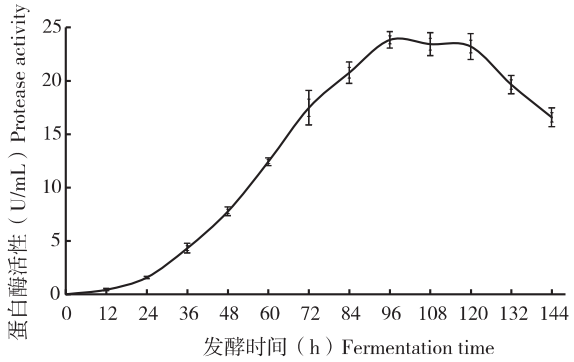


图 4　发酵时间对蛋白酶活力的影响

Fig. 4　Effect of fermentation time on the protease activity

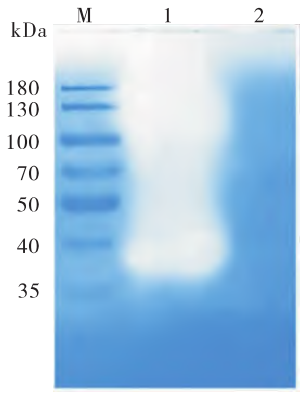


图 5　碱性蛋白酶活性的 SDS-PAGE 酶谱法检测

Fig. 5　Alkaline protease activity assay using SDS-PAGE zymography

注： Lane M，**蛋白质分子量标记；** Lane 1，**酶经煮沸变性；** Lane 2，**酶不经煮沸变性。** Note: Lane M, Protein molecular weight marker; Lane 1, Boiled enzymes; Lane 2, Non-boiled enzymes.

SDS-PAGE **酶谱检测结果也表明，酶经** 40℃、50℃、60℃ **处理** 10 min **后，仍然能在** SDS-PAGE **凝胶上呈现明显降解条带。随着处理温度的升高，其降解强度减弱，**90℃ **处理后仅能表现微弱降解条带（图** 7）。

2.6.3　反应 pH 对酶活性的影响

在中性和碱性环境中测试 pH **对酶活性的影响，发现在** pH 7 ~ 12 **范围内酶均显示一定程度的酪蛋白降解活性，其最适反应** pH **范围是** 9 ~ 11（**图** 8-A）。

2.6.4　酶在不同 pH 条件下的稳定性

酶分别在 pH **为** 7、8、9、10、11、12 **的缓冲液中** 4℃ **保存** 24 h **后，仍然保留大部分活性，结合其最适反应** pH **为碱性的结果，说明其在碱性条件下具有一定稳定性（图** 8-B）。

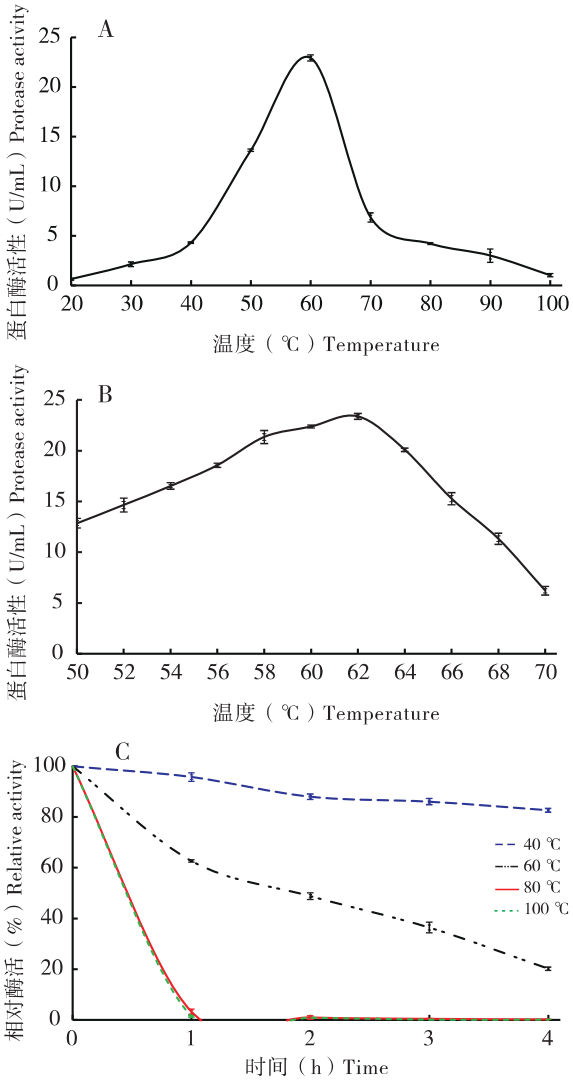


图 6　温度对蛋白酶活性和稳定性的影响

Fig. 6　Effect of temperature on the protease activity and stability

注： A，**反应温度对酶活性的影响（**20 ~ 100℃）；B，**反应温度对酶活性的影响（**50 ~ 70℃）；C，**酶在不同温度下的热稳定性。** Note: A, Effect of reaction temperature on the protease activity (20 ~ 100℃); B, Effect of reaction temperature on the protease activity (50 ~ 70℃); C, Thermal stability of protease at different temperature.

3　结论与讨论

昆虫构成了最丰富和最多样化的动物类群，其体内有种类繁多的共生菌，可为宿主提供有益的次级代谢物、酶和营养物质，它们在宿主生长发育过程中发挥重要作用（刘润进和王琳，

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

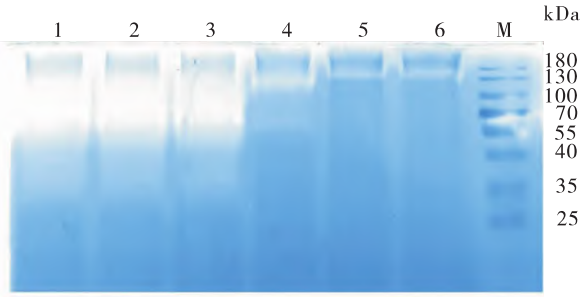


图 7　热稳定性的 SDS-PAGE 酶谱检测

Fig. 7　Thermal stability of protease at different temperature (SDS-PAGE zymography)

注： Lane M，**蛋白质分子量标记；** Lane 1 ~ 6，**蛋白酶经** 40，50，60，70，80，90℃ **热处理** 10 min。

Note: Lane M, protein molecular weight marker; Lane 1 ~ 6, protease was heat treated at 40, 50, 60, 70, 80 and 90℃ for 10 min.

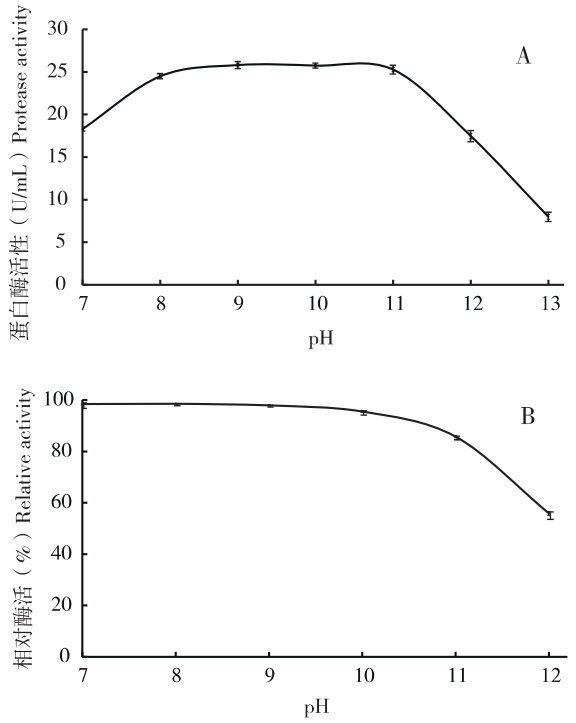


图 8　pH 对酶活性和稳定性的影响

Fig. 8　Effect of pH on the protease activity and stability

注： A，**反应** pH **对酶活性的影响；** B，**酶在不同** pH **条件下的稳定性。** Note: A, Effect of reaction pH on enzyme activity; B, Stability of the enzyme under different pH conditions.

2018）。**作为生境独特的一类微生物，昆虫肠道细菌和真菌所产生的一些水解酶，如蛋白酶、脂肪酶、多糖降解酶（木聚糖酶、纤维素酶、淀粉酶等），被认为可为工业酶的筛选和利用提供新的来源而得到广泛研究**（Liang *et al.*，2018）。**本研究从美洲大蠊肠道内分离到一株嗜碱性的芽孢杆菌，其分泌的蛋白酶是一种耐碱耐高温酶，在食品和饲料加工、生物活性肽生产及疾病治疗等方面具有潜在应用价值。**

嗜碱微生物可从多种环境中分离到，除盐碱湖等外，还可从昆虫肠道、动物粪便、植物体及其根际土壤等非碱性环境中分离得到（Borkar，2015；Banerjee *et al.*，2017；Yue *et al.*，2017；Sandesh *et al.*，2019；Shin *et al.*，2020）。**本研究从杂食性昆虫美洲大蠊肠道中分离得到嗜碱性的芽孢杆菌** *B. lehensis* PaGA523-1 **菌株，并测试其所产蛋白酶性质。菌种** *B. lehensis* **来源和应用范围比较广范，有研究者从多种环境中分离到其它** *B. lehensis* **菌株，如沙漠盐渍土**（Bhatt and Singh，2020）、**木薯厂废水**（Amorim *et al.*，2020）、**橡胶园土壤**（Abd Rahman *et al.*，2020；Jaafar *et al.*，2020；Nawawi *et al.*，2020），**分别进行了蛋白酶、环糊精糖基转移酶、果聚糖酶、内切-β-1，3-葡聚糖酶、麦芽糖淀粉酶等研究。**

热稳定性是影响酶的工业应用的关键因素之一。在工业应用中，较常温酶而言，热稳定酶具有一些优势，如在较高反应温度下具有更高的活性水平、稳定性和更快的反应速度（Li *et al.*，2014）。Joshi and Satyanarayana（2013）**利用大肠埃希菌表达系统表达了从印度土壤分离到的** *B. lehensis* MTCC7633 **菌株的一种碱性蛋白酶** BLAP（**编码基因** ORF **全长为** 1 140 bp），**其最适反应温度为** 50℃；Sulaiman *et al.*（2019）**从马来西亚橡胶园土壤来源的嗜碱性** *B. lehensis* G1 **菌株发酵上清液中得到的碱性蛋白酶的最适反应温度** 40℃；Bhatt and Singh（2020）**利用大肠埃希菌表达系统表达了分离自盐碱地的** *B. lehensis* JO-26 **菌株的一种碱性蛋白酶** APrBL（**编码基因** ORF **全长为** 1 014 bp），**其最适反应温度为** 50℃。**本研究中所分离到的嗜碱性菌株** *B. lehensis* PaGA523-1 **所分泌的碱性蛋白酶，在** 50 ~ 70℃ **内可发挥良好的蛋白质水解活性，其最适反应温度为** 62℃，**均高于上述研究者所得到的结果，具有进一步研究价值。热稳定性试验表明，该蛋白酶在** 60°C（**接近最适反应温度**）**处理** 1 h **后仍具有** 62.68% **的活性，另一方面，**SDS-PAGE **酶谱法检测结果也定性说明该碱性蛋白酶具有一定程度的热稳定性，表明其可以视作一种良好的热稳定酶。在饲料和食品加工**

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

业中，通常会使用高温发酵等工艺，该蛋白酶的热稳定特性可使其在这类生产过程中发挥较好水解作用。此外，这种耐热酶的最适反应 pH 值范围为 9 ~ 11，且在碱性条件下表现一定的稳定性，与 Joshi & Satyanarayana (2013) 的研究结果相近。独特的耐高温和耐碱的酶学特性，使其在蛋白质的生物转化方面具有很大的应用优势。

综上所述，本研究从美洲大蠊肠道分离出一株嗜碱性的芽孢杆菌 *B. lehensis* PaGA523-1，其最适生长 pH 范围为 9 ~ 11，最适生长温度为 37℃。该菌株所分泌的碱性蛋白酶最适反应温度为 62℃，最适反应 pH 范围为 9 ~ 11，且具有一定的热稳定性和耐碱性。该蛋白酶的耐热耐碱特性表明其有潜在工业应用价值，值得进一步深入研究。

参考文献 (References)

Abbas MS. Isolation of non-tuberculous *Mycobacteria* from *Periplaneta americana* in Baghdad [J]. *Plant Archives*, 2019, 19 (2): 3390 - 3392.

Abd Rahman NH, Jaafar NR, Murad AMA, *et al*. Novel cross-linked enzyme aggregates of levanase from *Bacillus lehensis* G1 for short-chain fructooligosaccharides synthesis: Developmental, physicochemical, kinetic and thermodynamic properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 159: 577 - 589.

Akbar N, Siddiqui R, Sagathevan KA, *et al*. Gut bacteria of animals/pests living in polluted environments are a potential source of antibacterials [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103 (10): 3955 - 3964.

Amorim CA, Blanco KC, Costa IM, *et al*. Active-electrode biosensor of SnO_2 nanowire for cyclodextrin detection from microbial enzyme [J]. *Nanotechnology*, 2020, 31 (16): 165501.

Banerjee S, Maiti TK, Roy RN. Protease production by thermo-alkaliphilic novel gut isolate*Kitasatospora cheerisanensis* GAP 12.4 from *Gryllotalpa africana* [J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2017, 35 (3): 168 - 176.

Baselga-Cervera B, García-Balboa C, Díaz-Alejo HM, *et al*. Rapid colonization of uranium mining-impacted waters, the biodiversity of successful lineages of phytoplankton extremophiles [J]. *Microbial Ecology*, 2020, 79 (3): 576 - 587.

Bhatt HB, Singh SP. Cloning, expression, and structural elucidation of a biotechnologically potential alkaline serine protease from a newly isolated Haloalkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 941.

Borkar S. Alkaliphilic bacteria: Diversity, physiology and industrial applications. In: Borkar S, ed. Bioprospects of Coastal Eubacteria [C]. Cham: Springer, 2015: 59 - 83.

Cardoso GVF, Oliveira ACS, Silva AS, *et al*. Protocol optimization for the detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in açai (*Euterpe oleraceae*) pulp [J]. *Acta Amazonica*, 2021, 51: 79 - 84.

Chen ZL, Shen J, Wang YJ, *et al*. Isolation of *Periplaneta americana* gut bacteria and its antibacterial activity study [J]. *Bulletin of Biology*, 2016, 51 (11): 54 - 57. [陈至里，沈娟，王影姣，等. 美洲大蠊肠道内生细菌的分离及其初步抑菌活性研究 [J]. 生物学通报，2016，51 (11)：54 - 57]

General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, China National Standardization Administration. GB/T 23527 - 2009 ProteasePreparations [S]. Beijing: China Standard Press, 2009. [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. GB/T 23527 - 2009 蛋白酶制剂 [S]. 北京：中国标准出版社，2009]

Guzman J, Vilcinskas A. Bacteria associated with cockroaches: Health risk or biotechnological opportunity? [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104 (24): 10369 - 10387.

Jaafar NR, Khoiri NM, Ismail NF, *et al*. Functional characterisation and product specificity of Endo-β-1, 3-glucanase from alkalophilic bacterium, *Bacillus lehensis* G1 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 140: 109625.

Jiang SL, Ye YX, Shen J, *et al*. Anti-*Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity analysis of actinomycetes from the guts of *Periplaneta americana* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (2): 453 - 461. [蒋诗林，叶宇歆，沈娟，等. 美洲大蠊肠道内生放线菌抗金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性分析 [J]. 环境昆虫学报，2021，43 (2)：453 - 461]

Jiang YH, Cai SB, Li HW, *et al*. Isolation and identification of intestinal fungus and screening of cellulolytic fungus in *Dendrolimus houi* (Lepidoptera: Lasiocampidae) [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020, 26 (6): 1437 - 1442. [江宇航，蔡赛波，李宏伟，等. 云南松毛虫肠道真菌的分离鉴定及降解纤维素真菌的筛选 [J]. 应用与环境生物学报，2020，26 (6)：1437 - 1442]

Joshi S, Satyanarayana T. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis* [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 131: 76 - 85.

Kouhdasht AM, Moosavi-Nasab M, Aminlari M. Gelatin production using fish wastes by extracted alkaline protease from *Bacillus licheniformis* [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55 (12): 5175 - 5180.

Li XB, Jin XB, Lu XM, *et al*. Construction and characterization of a thermostable whole-cell chitinolytic enzyme using yeast surface display [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30 (10): 2577 - 2585.

Liang XL, Sun C, Chen BS, *et al*. Insect symbionts as valuable grist for the biotechnological mill: an alkaliphilic silkworm gut bacterium for efficient lactic acid production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102 (11): 4951 - 4962.

Liu B, Liu GH, Wang XY, *et al*. *Bacillus populi* sp. nov. isolated from *Populus euphratica* rhizosphere soil of the Taklamakan desert [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68 (1): 155 - 159.

Liu RJ, Wang L. Biological Symbiotics [M]. Beijing: Science Press,

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2018: 49 – 82. [刘润进，王琳. 生物共生学 [M]. 北京: 科学出版社，2018: 49 – 82]

Liu WB, Wu LR, Wang J, *et al.* Activity of Vip3Aa1 against *Periplaneta americana* [J]. *Open Life Sciences*, 2020, 15 (1): 133 – 144.

Low-Décarie E, Fussmann GF, Dumbrell AJ, *et al.* Communities that thrive in extreme conditions captured from a freshwater lake [J]. *Biology Letters*, 2016, 12 (9): 20160562.

Nawawi NN, Hashim Z, Rahman RA, *et al.* Entrapment of porous cross-linked enzyme aggregates of maltogenic amylase from *Bacillus lehensis* G1 into calcium alginate for maltooligosaccharides synthesis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 80 – 89.

Sandesh K, Kumar G, Chidananda B, *et al.* Optimization of direct blue-14 dye degradation by *Bacillus fermus* (KX898362) an alkaliphilic plant endophyte and assessment of degraded metabolite toxicity [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 364: 742 – 751.

Shen P, Chen XD. Experimental Microbiology (5th edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2018: 213 – 217. [沈萍，陈向东. 微生物学实验 (第5版) [M]. 北京: 高等教育出版社，2018: 213 – 217]

Shin B, Park C, Lee BH, *et al.* *Bacillus miscanthi* sp. nov., an alkaliphilic bacterium from the rhizosphere of *Miscanthus sacchariflorus* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70 (3): 1843 – 1849.

Sulaiman NA, Mahadi NM, Ramly NZ. Biochemical properties and potential application of proteases from Alkalophilic *Bacillus lehensis* G1 [J]. *Tropical Life Sciences Research*, 2019, 30 (2): 25 – 37.

Tarrahimofrad H, Meimandipour A, Arjmand S, *et al.* Structural and biochemical characterization of a novel thermophilic Coh01147 protease [J]. *PLoS ONE*, 2020, 15 (6): e0234958.

Wei G, Bai L, Qu S, *et al.* Insect microbiome and their potential application in the insect pest and vector-borne disease control [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58 (6): 1090 – 1102. [魏舸，白亮，曲爽，等. 昆虫共生微生物在病虫害和疾病控制上的应用前景 [J]. 微生物学报，2018, 58 (6): 1090 – 1102]

Xie ZB, Le CG, Jiang GF. The Application of Protease in Organic Synthesis [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2019: 119 – 128. [谢宗波，乐长高，姜国芳. 蛋白酶在有机合成中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社，2019: 119 – 128]

Yuan Y, Wang L, Shi YW. Research advances in strategies for improving the activity of microbial-derived alkaline proteases [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37 (5): 231 – 236. [袁媛，王蕾，石亚伟. 微生物来源碱性蛋白酶活性提高策略的研究进展 [J]. 生物技术通报，2021, 37 (5): 231 – 236]

Yue XY, Zhang B, Zou J, *et al.* Characterization of a new bacterium with high alkaline keratinase activity from *Calotes versicolor* feces [J]. *Journal of Biotech Research*, 2017, 8: 83.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net