

青海牧区产凝乳酶细菌多样性分析

朱艳¹, 罗俏俏¹, 马江¹, 杨敏², 文鹏程¹, 张忠明¹, 朱建宁³, 贺晓玲¹, 张卫兵^{1,*}

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070;

2. 甘肃农业大学理学院, 甘肃兰州 730070;

3. 甘肃省食品药品监督管理局, 甘肃兰州 730000)

摘要:为发掘性能优良的产凝乳酶细菌菌株, 开发新型细菌凝乳酶。本文采用酪蛋白培养基从采自青海牧区土壤样品分离筛选产凝乳酶细菌, 利用菌株 16S rDNA 基因序列对菌株进行鉴定并分析其多样性。结果表明, 36 个样品中分离得到 21 株产凝乳酶细菌, 沉淀圈与菌落直径比值为 1.41~5.5; 分离菌株在不同培养基上凝乳酶和蛋白水解活性有明显差异, 麸皮汁培养基中凝乳酶活性为 11.3~1215.6 SU/mL, 蛋白水解活力为 14.6~59.5 U/mL; 21 株菌中有 14 株菌属芽孢杆菌属(*Bacillus*), 是产凝乳酶细菌的优势属; 多样性指数分析表明, 该地区产凝乳酶细菌具有丰富多样性。

关键词:细菌, 凝乳酶, 多样性

Diversity of Bacteria Producing Milk-clotting Enzymes in Qinghai Pastoral Area

ZHU Yan¹, LUO Qiao-qiao¹, MA Jiang¹, YANG Min², WEN Peng-cheng¹,
ZHANG Zhong-ming¹, ZHU Jian-ning³, HE Xiao-ling¹, ZHANG Wei-bing^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. Gansu Food and Drug Administration, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To excavate fine milk-clotting enzyme producing strains and develop new type of milk-clotting enzyme from bacterial sources. Microorganisms with high milk-clotting activity from soil samples collecting from Qinghai pastoral area in Tibetan Plateau of China was isolated and screened. Strains isolated were identified by the 16S rRNA sequence similarity and the diversity was analyzed by the phylogenetic tree. Results showed that a total of 21 bacterial strains producing milk-clotting enzymes were isolated from 36 soil samples. The ratio of deposition zone to the colony diameter among the isolated strains in the casein plate medium ranged from 1.41 to 5.5. Media affected the milk-clotting activity and proteolysis activity of bacteria obviously. Milk-clotting activity among the isolated strains ranged from 11.3 to 1215.6 SU/mL in wheat bran juice medium, and proteolysis activity was between 14.6 and 59.5 SU/mL. Out of 21 strains, there were 14 strains found to be in the genus of *Bacillus*, implying that *Bacillus* was the most dominant genus of bacteria producing milk-clotting enzymes. The analysis indicated that the diversity of bacteria producing milk-clotting enzymes in Qinghai pastoral area was high.

Key words: bacteria; milk-clotting enzymes; diversity

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)16-0087-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.16.016

引文格式: 朱艳, 罗俏俏, 马江, 等. 青海牧区产凝乳酶细菌多样性分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(16): 87-91, 97.

凝乳酶是奶酪生产中的关键酶, 奶酪加工工程中凝乳酶具有切断 κ -酪蛋白特定肽键的功能, 能使牛乳中的酪蛋白凝结^[1]; 奶酪成熟过程中, 凝乳酶可将酪蛋白分解为大分子多肽, 并进一步降解成氨基酸、胺、含硫化合物等风味物质^[2]。根据来源不同, 凝乳酶可分为动物凝乳酶、植物凝乳酶和微生物凝乳

酶。不同来源的凝乳酶性质不同, 动物凝乳酶在干酪生产中应用最早, 但由于原料缺乏, 导致其价格昂贵^[3]。植物凝乳酶由于蛋白水解力强, 制成的干酪有一定苦味, 限制了其应用^[2]。微生物凝乳酶主要来源于细菌、真菌和少数放线菌, 由于微生物资源丰富、种类多, 因而可以用其生产出多种性能不

收稿日期: 2017-10-30

作者简介: 朱艳(1977-), 女, 博士, 讲师, 主要从事食品微生物方面的研究, E-mail: 45330301@qq.com。

*通讯作者: 张卫兵(1974-), 男, 博士, 教授, 主要从事乳品微生物和乳品加工方面的研究, E-mail: zwb126@qq.com。

基金项目: 甘肃农业大学青年导师扶持基金项目(GAU-QNDS-201502); 甘肃农业大学伏羲人才项目(FXRC20130110); 国家自然科学基金项目(31560442, 31760466); 甘肃省自然科学基金项目(1606RJZA079); 十二五"农村领域国家科技计划项目(2011AA100903)。

同的凝乳酶。目前缺乏微生物凝乳酶的生产技术和菌种,因此产凝乳酶微生物的研究成为凝乳酶研究的热点^[3-5]。

细菌是产凝乳酶微生物的重要种类,目前国内外已发现了多种产凝乳酶的细菌,但大多酶活不高^[6-8]。青藏高原地区海拔高、空气稀薄、昼夜温差大、辐射强度大,特殊的地理、气候条件造就了丰富、独特的微生物种质资源^[9]。近年来人们对于该地区微生物资源进行了大量研究,获得了产纤维素酶、木聚糖和纤溶酶的微生物^[10-13],但关于该地区产凝乳酶微生物的系统性报道较少。

本研究拟从青海牧区广泛采集样品,研究产凝乳酶细菌资源和细菌凝乳酶的多样性,以揭示该地区产凝乳酶细菌的特异性,为青藏高原地区微生物多样性及种质资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

土壤样品 36 个,于 2016 年 7 月至 9 月,从青海海南、海西、海北等地牧区牧场、牦牛饮水区和挤奶区在离地面 5~10 cm 左右采集土样,放入灭菌的纸袋中于 4 ℃ 保存备用;牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、葡萄糖、氯化钠、氯化钙、琼脂粉、福林 兰州嘉特星化学试剂公司;麸皮 兰州市安宁区桃海市场;脱脂奶粉 黑龙江完达山乳业股份公司;细菌总基因组 DNA 提取试剂盒 美国 Omega 公司;DL2000 DNA Marker 大连 Takara 公司;试验所用引物 上海派森诺生物科技股份有限公司;酪蛋白固体培养基:蛋白胨 2.5 g/L,葡萄糖 10 g/L,酵母膏 1 g/L,干酪素 10 g/L,脱脂牛乳 50 g/L,琼脂 20 g/L,pH7.0;酪蛋白液体培养基不加琼脂;斜面培养基:牛肉膏 3 g/L,蛋白胨 10 g/L,NaCl 5 g/L,琼脂 20 g/L,pH7.0;麸皮汁培养基:将 10 g 麸皮加入 100 mL 自来水,煮沸 10 min,四层纱布过滤后用补足 100 mL,pH 自然;脱脂乳培养基:脱脂乳与水以 1:8 的比例配制,115 ℃ 灭菌 10~15 min。

SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司;YX-280A 型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司;DHG-9033BS-Ⅲ型电热恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司;H1650R 型冷冻高速离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种初筛 称取 1 g 的土壤样品于 99 mL 无菌生理盐水,分别稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 五个稀释度,取 1 mL 涂布于酪蛋白固体培养基上,37 ℃ 培养 48 h,选择沉淀圈与菌落直径比值大的菌落进一步划线分离,分离纯化后接入新鲜斜面培养基保藏,以备菌种复筛。

1.2.2 菌种复筛 将菌种分别接种于麸皮汁培养基、牛肉膏蛋白胨培养基和酪蛋白培养基,37 ℃、160 r/min 转速摇床培养 48 h,取培养液于 4000 r/min,4 ℃ 下离心 10 min,取上清液测凝乳酶活力和蛋白水解活力。

1.2.3 酶活测定 凝乳酶活力的测定采用 Arima 法^[14];蛋白酶活力测定方法采用福林法^[15]。

1.2.4 基因组 DNA 提取 将复筛后分离菌株分别接种于 LB 培养基培养,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组总 DNA,具体操作流程按操作说明进行。

1.2.5 16S rDNA 扩增 采用细菌通用引物 27f: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 和 1492r: TACGGC TACCTTGTTACGACTT,使用 16S rDNA Bacterial Identification PCR 仪,进行 PCR 扩增目的片段。反应体系共 50 μ L,94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1.5 min,30 个循环,72 ℃ 保温 5 min。取反应产物 5 μ L 上样,1% 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统下观察并拍照。

1.2.6 16S rDNA 序列系统发育分析 切胶回收目的片断由上海派森诺生物科技股份有限公司完成 DNA 测序,将测定的 16S rDNA 序列在 NCBI 使用 Blast 与 GenBank 中核酸序列数据库进行比对,选择与其相似度高的菌株的序列,使用 ClustalX 1.8 对齐后利用软件 MEGA4.0 构建系统发育树。

1.2.7 产凝乳酶细菌的种群多样性分析 参考兰晓君等^[16]的方法。定义 16S rRNA 基因序列同源性大于 97% 作为同一分类单元,分别计算 Shannon 指数(D)、Simpson 指数(H)、Shannon-Wiener 均匀度指数(E)和 Margalef 丰富度指数(Ma)。

$$\text{Shannon}(H) = -\sum P_i \times \log_2 P_i \quad \text{式(1)}$$

$$\text{Simpson 指数} = 1 - \sum P_i^2 \quad \text{式(2)}$$

$$\text{Shannon-Wiener 均匀度指数} = H/\log_2 S \quad \text{式(3)}$$

$$\text{Margalef 丰富度指数} Ma = (S-1)/\ln N \quad \text{式(4)}$$

式中, n_i 表示第 i 种的菌株数; N 表示所有菌株数; S 为菌种数; $P_i = n_i/N$,表示第 i 种的相对多度。

1.3 数据处理

试验中各组数据均为 3 次实验的平均值,以平均值 $\pm$ 标准差表示;数据采用 SPSS 18.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 菌种初筛

36 个样品中共分离得到 21 株有明显沉淀圈的细菌菌株,划线分离纯化后编号分别为 HN1、HN2、HN3、HN4、GL1、GL2、GL3、GL4、HB1、HB2、HB3、HB4、HX1、HX2、HX3、HX4、HM1、HM2、HM3、HM4、HM5。21 个菌株菌落直径、水解圈直径及沉淀圈直径结果如表 1 所示。

沉淀圈和水解圈直径是产凝乳酶细菌初筛时常用的检测指标,水解圈直径的大小与菌株蛋白水解活力有一定的关系,水解圈直径越大,蛋白水解活力越大;沉淀圈直径的大小与菌株凝乳酶活力有一定的关系,沉淀圈直径越大,凝乳酶活力越大;但由于固体平板和液体培养的条件不同,菌株在液体发酵的产酶情况不一致^[15]。由表 1 可以看出,不同菌株的菌落直径、水解圈直径及沉淀圈直径有一定差异,说明这些菌株的凝乳酶活和蛋白水解力有一定的差异;菌株 HN1 菌落直径最小,为 2.0 mm,而沉淀圈直

表1 不同菌株在酪蛋白平板上水解圈和沉淀圈直径(mm)
Table 1 Diameter of hydrolyze and deposition
circles on the solid casein medium of different strains

菌株编号	菌落直径 (mm)	水解圈直径 (mm)	沉淀圈直径 (mm)
HN1	2.0 ± 0.1	3.0 ± 0.2	11.0 ± 0.2
HN2	3.1 ± 0.2	4.6 ± 0.2	8.3 ± 0.1
HN3	3.5 ± 0.2	4.7 ± 0.2	7.3 ± 0.2
HN4	2.6 ± 0.2	3.6 ± 0.2	7.8 ± 0.2
GL1	3.3 ± 0.2	3.7 ± 0.2	7.5 ± 0.2
GL2	5.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2	8.5 ± 0.1
GL3	2.5 ± 0.2	3.0 ± 0.2	9.0 ± 0.2
GL4	3.1 ± 0.1	4.3 ± 0.1	7.2 ± 0.2
HB1	3.6 ± 0.1	4.4 ± 0.2	8.1 ± 0.1
HB2	2.2 ± 0.2	3.6 ± 0.1	4.5 ± 0.1
HB3	3.3 ± 0.1	3.7 ± 0.1	7.5 ± 0.2
HB4	4.5 ± 0.2	2.5 ± 0.2	6.5 ± 0.1
HX1	2.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	8.0 ± 0.2
HX2	3.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	7.2 ± 0.2
HX3	3.1 ± 0.1	4.2 ± 0.2	7.2 ± 0.1
HX4	2.2 ± 0.2	3.2 ± 0.1	5.5 ± 0.1
HM1	3.6 ± 0.1	3.4 ± 0.1	6.5 ± 0.2
HM2	5.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	7.5 ± 0.1
HM3	3.2 ± 0.2	3.1 ± 0.2	8.8 ± 0.2
HM4	3.4 ± 0.1	4.1 ± 0.1	7.1 ± 0.2
HM5	3.5 ± 0.1	4.2 ± 0.2	8.0 ± 0.1

径达到 11.0 mm,沉淀圈与菌落直径比值达到 5.5,说明其凝乳酶活力可能较高;该菌株的水解圈直径为 3.0 mm,沉淀圈与水解圈直径比值达到 3.6,说明其凝乳酶活力与蛋白水解力的比值可能较高。菌株 HM2 菌落直径最大,达到 5.3 mm,而沉淀圈直径为 7.5 mm,沉淀圈与菌落直径比值仅为 1.41,说明其凝乳酶活力可能较低;该菌株的水解圈直径为 1.3 mm,沉淀圈与水解圈直径比值达到 5.7,说明其凝乳酶活力与蛋白水解力的比值可能较高。其余菌株的菌落都介于这两株菌之间,其沉淀圈与菌落直径比值也介于 1.41~5.5 之间。

2.2 菌种复筛

21 株菌株在不同培养基中的两种酶活性见表 2。

表 2 可以看出不同菌株在不同培养基中凝乳酶活力和蛋白水解力极大差异,显示营养成分对产酶特性有一定影响。在 21 株菌在脱脂乳培养基中的凝乳酶活力介于 8.9~29.5 SU/mL,蛋白水解力介于 6.9~61.8 U/mL 之间;在酪蛋白培养基中的凝乳酶活力在 6.1~30.5 SU/mL 之间,蛋白水解力在 4.1~56.7 U/mL 之间;在麸皮汁培养基中的凝乳酶活力在 11.3~1215.6 SU/mL 之间,蛋白水解力介于 14.6~59.5 U/mL 之间;菌株 HN 1 在麸皮汁培养基中发酵时,凝乳活力最高,可以达到 1215.6 SU/mL,对应的蛋白水解活力为 14.6U/mL,凝乳活力与蛋白水解力比值达到 83.26,说明其发酵液中凝乳酶活力高,有利于干酪的制作^[15]。

表2 不同菌株在不同培养基中的产酶活力
Table 2 Enzyme activities of different strains in different fermentation medium

菌株编号	凝乳酶活力(SU/mL)			蛋白水解活力(U/mL)		
	麸皮汁培养基	脱脂乳培养基	酪蛋白培养基	麸皮汁培养基	脱脂乳培养基	酪蛋白培养基
HN1	1215.6 ± 3.0	21.2 ± 2.1	16.3 ± 1.1	14.6 ± 0.5	6.9 ± 0.8	6.8 ± 1.8
HN2	21.1 ± 4.2	11.9 ± 0.8	26.1 ± 4.1	38.3 ± 0.8	18.1 ± 1.5	9.1 ± 1.8
HN3	11.3 ± 1.9	8.9 ± 0.1	16.1 ± 3.1	59.5 ± 2.8	11.8 ± 1.0	31.7 ± 1.6
HN4	26.4 ± 3.1	9.4 ± 0.7	6.9 ± 0.6	46.6 ± 3.1	11.1 ± 0.5	9.5 ± 1.9
GL1	16.1 ± 0.6	11.1 ± 1.4	9.5 ± 2.1	21.9 ± 1.2	12.1 ± 0.9	8.4 ± 2.1
GL2	81.2 ± 2.1	11.1 ± 1.4	11.6 ± 1.1	17.5 ± 2.1	29.4 ± 0.7	11.2 ± 1.1
GL3	111.6 ± 5.0	26.9 ± 2.7	16.4 ± 2.4	14.6 ± 0.6	15.9 ± 1.7	14.4 ± 0.9
GL4	126.7 ± 4.2	15.2 ± 0.8	21.7 ± 4.3	28.3 ± 0.7	18.1 ± 1.5	18.1 ± 0.7
HB1	18.3 ± 1.9	25.8 ± 1.1	10.5 ± 2.0	39.5 ± 2.3	61.8 ± 2.0	56.7 ± 1.6
HB2	22.4 ± 3.5	9.4 ± 0.9	6.1 ± 0.9	36.6 ± 1.1	9.4 ± 0.9	6.1 ± 1.1
HB3	16.5 ± 0.9	15.7 ± 1.4	10.5 ± 2.0	31.9 ± 1.5	11.4 ± 0.7	9.1 ± 0.9
HB4	51.5 ± 2.2	19.1 ± 1.4	8.6 ± 1.4	17.5 ± 1.3	19.4 ± 0.7	9.1 ± 0.9
HX1	62.4 ± 3.5	26.6 ± 2.7	16.4 ± 2.4	36.6 ± 2.3	12.4 ± 0.6	8.1 ± 0.9
HX2	116.5 ± 0.9	25.2 ± 1.1	10.5 ± 2.0	31.9 ± 2.5	13.4 ± 0.7	4.1 ± 0.9
HX3	39.5 ± 2.2	29.1 ± 1.5	8.6 ± 1.4	15.5 ± 1.3	12.4 ± 0.2	9.1 ± 0.9
HX4	311.6 ± 5.0	26.1 ± 2.7	16.4 ± 2.4	14.8 ± 0.6	15.9 ± 0.7	16.4 ± 0.8
HM1	26.7 ± 4.2	25.2 ± 1.8	26.7 ± 4.3	28.3 ± 0.7	18.1 ± 0.5	8.1 ± 0.8
HM2	78.3 ± 1.1	21.9 ± 2.7	16.4 ± 2.4	39.5 ± 2.1	31.8 ± 1.0	51.7 ± 1.6
HM3	72.4 ± 3.5	25.2 ± 1.5	26.7 ± 4.3	36.6 ± 1.0	9.4 ± 0.7	6.1 ± 0.9
HM4	26.5 ± 0.9	25.8 ± 1.5	30.5 ± 2.0	31.9 ± 1.5	19.4 ± 0.7	6.1 ± 0.8
HM5	59.5 ± 2.2	29.5 ± 1.8	18.6 ± 1.4	17.5 ± 1.3	9.4 ± 0.7	6.1 ± 0.9

2.3 16S rDNA 序列相似性分析

不同菌株 PCR 扩增产物电泳图见图 1。

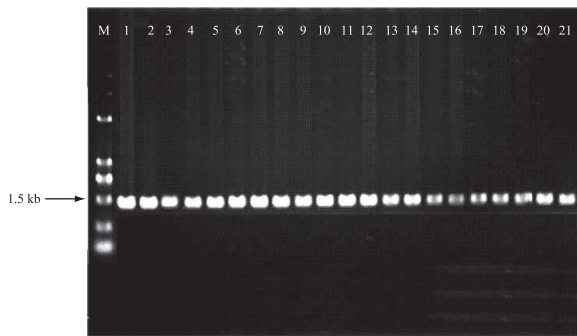


图 1 不同菌株的 16S rDNA 序列的琼脂糖电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis pattern of RCR amplification product of 16s rDNA of different stains
注:1~21;菌株编号,依次与表 2 中的菌株对应。

图 1 为不同菌株 16S rRNA PCR 扩增产物电泳图,结果与表 3 吻合。由表 3 可以看出,14 株杆菌中,菌株 HN3 与 *Bacillus cereus* LAM 30 的 16S rDNA 序列相似性在 98% 以上,其余菌株与其最相近的典型菌株的相似性均在 99% 以上,根据分子生物学鉴定的依据,这 14 株杆菌都属于芽孢杆菌属。其中菌株 HN2 鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),菌株 HX1 和 GL1 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),菌株 HN4 鉴定为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),菌株 GL3 和 GL4 鉴定为坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*),菌株 HB1 和 HB2 鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*);菌株 HN1 和

HB3 鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),菌株 HM2 鉴定为韦氏芽孢杆菌(*Bacillus weihenstephanensis*),菌株 HM1 鉴定为蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*),菌株 HX4 鉴定为简单芽孢杆菌(*Bacillus simplex*);7 株球菌中菌株 HM3、HX3 和 HX2 鉴定为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*),菌株 HB4 和 GL2 鉴定为黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*),菌株 HM4 鉴定为乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*),菌株 HM5 鉴定为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus strain*)。

同时,由表 3 还可以看出,21 株菌分别属于 3 个门,其中厚壁菌门(*Firmicutes*)有 18 株,占到 85.7%,变形菌门(*Proteobacteria*)有 2 株,占到 9.5%,放线菌门(*Actinobacteria*)1 株,占到 4.7%。从属水平上看,21 株菌中有 14 株菌属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),占到总菌株的 66.67%,说明芽孢杆菌是产凝乳酶细菌中的优势属;肠球菌属(*Enterococcus*)有 3 株菌,占到 14.2%,为第二优势属;黏球菌属(*Myxococcus*)有 2 株菌,占到 9.5%;乳球菌属(*Lactococcus*)和微球菌属(*Micrococcus*)均只有 1 株菌,仅占 4.5%。

由图 2 可以看出,相同属的菌株聚集在一个分支上,不同属的菌株遗传距离较远;14 株杆菌的亲缘关系较近,7 株球菌的亲缘关系较近,球菌和杆菌的亲缘关系较远,与表 3 的分析结果一致。

2.4 产凝乳酶细菌的多样性分析

辛普森多样性指数(D)、Shannon-Wiener 指数(H)、Shannon-Wiener 均匀度指数(E)和 Margalef 丰富度指数(Ma)用于表示群落中物种的多样性和丰

表 3 不同菌株的 16S rDNA 序列相似性分析

Table 3 Similarity analysis of partial 16S rDNA sequences of different strains

编号	最相近的典型菌株	登录号	相似度	属	门
HX1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 14141	AB325582.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
GL1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LCEP-1	GQ199589.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HN2	<i>Bacillus cereus</i> HB59	FJ040807.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HN3	<i>Bacillus cereus</i> LAM 30	EU019990.1	98	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HN4	<i>Bacillus thuringiensis</i> FR1_3	EU373518.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
GL3	<i>Bacillus firmus</i> strain RKS468	CX830826.2	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
GL4	<i>Bacillus firmus</i> strain RKS468	CX830826.2	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HB1	<i>Bacillus megaterium</i> strain VITSN02	GQ406847.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HB2	<i>Bacillus megaterium</i> strain 2EJ4	GQ383911.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HB3	<i>Bacillus licheniformis</i> D3.11	GQ918134.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HN1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain HNL09	EU373344.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HX4	<i>Bacillus simplex</i> strain 817	FJ544334.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HM1	<i>Bacillus mycoides</i> strain 1P04SB	EU977772.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HM2	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> CCM16B	FN433021.1	99	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
HM4	<i>Lactococcus lactis</i> strain VP1	KR604712.1	98	<i>Lactococcus</i>	Firmicutes
HM3	<i>Enterococcus faecalis</i> strain OS65	JX536120.1	99	<i>Enterococcus</i>	Firmicutes
HX3	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 4205	KU936078.1	99	<i>Enterococcus</i>	Firmicutes
HX2	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 4205	KU936078.1	99	<i>Enterococcus</i>	Firmicutes
HB4	<i>Myxococcus xanthus</i> strain Mxx132	KF304790.1	99	<i>Myxococcus</i>	Proteobacteria
GL2	<i>Myxococcus xanthus</i> strain A17	DQ411235.1	99	<i>Myxococcus</i>	Proteobacteria
HM5	<i>Micrococcus luteus</i> strain TUTXS-12	KY818672.1	98	<i>Micrococcus</i>	Actinobacteria

表 4 产凝乳酶细菌多样性指数
Table 4 Diversity of bacteria producing milk-clotting enzymes

Simpson 指数 D	Shannon-Wiener 指数 H	Shannon-Wiener 均匀度指数 E	Margalef 丰富度指数 Ma
0.916	3.053	0.802	4.269

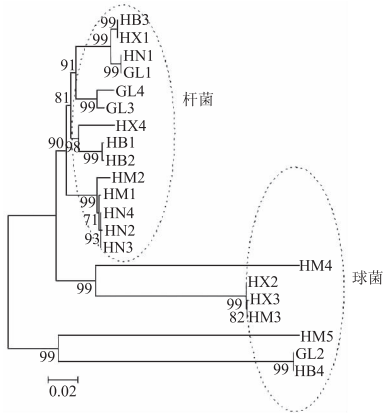


图 2 产凝乳酶细菌菌株的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree based on
16S rDNA sequence of homology

富度。本试验中产凝乳酶细菌的多样性和丰富度指数的结果见表 4, 4 个指数分别为 0.916、3.053、0.802、4.269, 辛普森多样性指数 (D)、Shannon-Wiener 指数 (H) 和 Shannon-Wiener 均匀度指数 (E) 均大于兰晓君等对金川镍矿可培养细菌的多样性的对应指数^[16], 说明该地区的产凝乳酶细菌种类的多样性和丰富度较高。与文献中报道的土壤细菌多样性相比^[17], 本试验中的多样性较低, 这是因为产凝乳酶的细菌只是样品中所有细菌的一部分。

3 结论与讨论

国外细菌凝乳酶研究 19 世纪初就开始, 最早报道的产凝乳酶细菌为多粘芽孢杆菌^[3]。此后先后报道地衣芽孢杆菌^[4]、枯草芽孢杆菌^[5-7]、球形芽孢杆菌^[8,18]、纳豆芽孢杆菌^[19]、黄色粘球菌^[20]、粪肠球菌^[21]等产凝乳酶。国内凝乳酶研究起步较晚, 从 20 世纪 80 年代末才开始凝乳酶的研究工作, 郭光远^[22]等首先从 160 株细菌中筛选到 14 个产凝乳酶菌株; 此后, 周俊清等研究者分别报道了产凝乳酶的蜡状芽孢杆菌^[23]、枯草芽孢杆菌^[24-25]和地衣芽孢杆菌^[15]。本试验从青海牧区采集的土壤样品中分离筛选到 21 株产凝乳酶细菌, 其中有 14 株菌属于芽孢杆菌属 (Bacillus), 说明芽孢杆菌是产凝乳酶细菌中的优势属, 这一结果与国内外已有的报道基本一致。

从已有的文献来看, 由于筛选时采用选择性培养基和产酶培养基不同, 因而筛选得到菌株种类和性能有所差异; 来自乳制品及其加工环境中的样品中分离到的菌株较多, 不同来源的样品中可能会有不同种类的菌株^[4-8]。青藏高原地区放牧历史悠久, 当地牧民长期利用牦牛奶、马奶和羊奶加工酸奶、曲拉、酥油等乳制品, 因而该地区富集了大量的乳品微生物资源。本试验的结果证明了该地区的乳品加工环境中存在丰富的产凝乳酶微生物。另外, 本试验

中发现的产凝乳酶的 *Bacillus thuringiensis*、*Bacillus firmus*、*Bacillus weihenstephanensis*、*Bacillus mycoides*、*Lactococcus lactis*、*Micrococcus luteus* 等以前均未报道, 说明了青海牧区土壤中的产凝乳酶细菌有一定的特异性。在后续试验中, 如果加大样品的采集量, 可能会分离筛选出更多种类, 并且性能优良的产凝乳酶细菌。

本文得到的 21 株菌在脱脂乳培养基中的凝乳酶活力介于 8.9~29.5 SU/mL, 在酪蛋白培养基中的凝乳酶活力介于 6.1~30.5 SU/mL, 在麸皮汁培养基中的凝乳酶活力介于 11.3~1215.6 SU/mL, 说明菌种的种类和营养成分对其产酶特性都有一定的影响, 这与本试验室以前的结果一致^[15,27-28]。这一结果也表明菌株筛选时尽可能选用多种培养基, 以免漏掉一些产酶能力较高的菌株。本试验中得到的菌株 HN1 在麸皮汁培养基中发酵时, 凝乳活力最高, 可以达到 1215.6 SU/mL, 比以往报道的细菌菌株的凝乳酶活力都高, 说该菌株有应用于工业化生产的潜力。

参考文献

[1] Moni K and Anurag S. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa* [J]. Food Chemistry, 2012, 131 (4): 1295-1303.

[2] Moharib S A. Proteolytic activity of proteases produced from white rot fungus [J]. Advances in Food Sciences, 2007, 29: 6-11.

[3] Mandy J, Doris J, Harald R. Recent advances in milk clotting enzymes [J]. Society of Dairy Technology, 2012, 64 (1): 14-33.

[4] Ageitos J M, Vallejo J A, Sestelo A B, et al. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103: 2205-2213.

[5] Dutt K, Gupta P, Saran S, et al. Production of milk-clotting protease from *Bacillus subtilis* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 158: 761-772.

[6] Dutt K, Meghwanshi G K, Gupta P, et al. Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 46: 513-518.

[7] Xiaoling He, Fazheng Ren, Huiyuan Guo, et al. Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4 [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2011, 28 (1): 203-208.

[8] Magda A E. Formation and properties of serine protease enzyme with milk-clotting activity from *Bacillus sphaericus* [J]. Egyptian Journal of Applied Science, 2004, 19: 68-91.

[9] 田春杰, 陈家宽, 钟扬. 微生物系统发育多样性及其保护生物学意义 [J]. 应用生态学报, 2003, 31 (4): 91-94.

China[J].Annals of Microbiology.,2013,63(4):1417-1421.

[19] Hong U H. Kimchi. 伟大的遗产(韩文)[M]. 韩国:首尔, Hanul Publishing Company, 2006.

[20] Nam Y D, Lee S Y, Lim S I. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(1-2): 36-42.

[21] 李文斌, 宋敏丽, 高荣琨. 肠膜明串珠菌的研究和应用进展[J]. 食品工程, 2006(4): 3-4.

[22] 武俊瑞, 张苗, 岳喜庆, 等. 黑龙江传统发酵豆酱中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 83-86.

[23] Tanasupawat S, Thongsanit J, Okada S, et al. Lactic acid bacteria isolated from soy sauce mash in Thailand[J]. Journal of General & Applied Microbiology, 2002, 48(4): 201-209.

[24] Wang K, Wei L, Xin R, et al. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 63: 133-139.

[25] Cockburn A, Brambilla G, Fernández M L, et al. Nitrite in feed: from animal health to human health [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2013, 270(3): 209-217.

[26] Jeong D W, Kim H R, Jung G, et al. Bacterial community migration in the ripening of doenjang, a traditional Korean fermented soybean food [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(5): 648-660.

[27] Yoon M Y, Kim Y J, Hwang H J. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product [J]. LWT- Food Science

and Technology, 2008, 41(5): 925-933.

[28] Lee S S. Meju fermentation for a raw material of Korean traditional soy products [J]. Korean Journal of Mycology, 1995, 23(2).

[29] Hong S B, Kim D H, Lee M, et al. Taxonomy of Eurotium species isolated from meju [J]. The Journal of Microbiol, 2011, 49(5): 669-674.

[30] Jung J Y, Lee S H, Jeon C O. Microbial community dynamics during fermentation of doenjang - meju, traditional Korean fermented soybean [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 185: 112-120.

[31] 范玛莉, 邢捷, 李震宇, 等. 基于 NMR 代谢组学技术的白芍与赤芍化学成分比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3230-3237.

[32] 张颖, 乌日娜, 孙慧君, 等. 豆酱不同发酵阶段细菌群落多样性及动态变化分析 [J]. 食品科学, 2017, 38(14): 30-35.

[33] Kim M J, Kwak H S, Jung H Y, et al. Microbial communities related to sensory attributes in Korean fermented soy bean paste (doenjang) [J]. Food Research International, 2016, 89(1): 724-732.

[34] Kim Y S, Kim M C, Kwon S W, et al. Analyses of bacterial communities in Meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods [J]. Journal of Microbiology, 2011, 49(3): 340-348.

[35] Hong S B, Kim D H, Lee M, et al. Zygomycota associated with traditional meju, a fermented soybean starting material for soy sauce and soybean paste [J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(3): 386-393.

(上接第 91 页)

[10] 谢占玲, 李秀萍, 杨家华. 青海高原降解纤维素微生物的调查、分离、鉴定 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 91-94.

[11] 陈杰. 产木聚糖酶放线菌的分离、筛选与多相分类研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2010.

[12] Gaoxue Wang, Haihong Huang, Ming Zhang. Isolation and identification of a fibrinolytic *bacterium* strain from frozen soil in the Tibetan Plateau [J]. Acta Microbiological Sinica, 2010, 50(2): 148-154.

[13] Heping Zhang, Jie Xu, Junguo Wang, et al. A survey on chemical and microbiological composition of kurut, naturally fermented yak milk from Qinghai in China [J]. Food Control, 2008, 19(6): 578-586.

[14] Arima K, Yu J, Iwasaki S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt [J]. Methods Enzymol, 1970, 19: 446-459.

[15] 宋曦, 甘伯中, 贺晓玲, 等. 天祝放牧牦牛生活环境土壤中一株产凝乳酶细菌 [J]. 食品科学, 2009, 30(11): 158-162.

[16] 兰晓君, 肖婷, 邝海菊, 等. 金川镍矿可培养细菌的多样性及耐镍菌株筛选 [J]. 生物技术, 2009, 19(4): 22-26.

[17] 王佩雯, 朱金峰, 陈征, 等. 高通量测序技术下连作植烟土壤细菌群落与土壤环境因子的耦合分析 [J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(11): 1754-1763.

[18] Magda A E, Maysa E M and Thana H A. Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Bacillus sphaericus* [J]. Journal of Applied Sciences Research, 2007, 3(8): 695-699.

[19] Shieh C J, Phan T L, Shih I L. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 43: 85-91.

[20] Poza M, Sieiro C, Carreira L et al. Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422 [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2003, 30: 691-698.

[21] Sato S, Tokuda H, Koizumi T, et al. Purification and characterization of an extracellular protease having milk-clotting activity from *Enterococcus faecalis* TUA2495L [J]. Food Science and Technology Research, 2004, 10: 44-50.

[22] 郭光远, 姜成林, 马俊. 微生物凝乳酶的研究 I. 菌株的筛选、发酵、制备及毒性 [J]. 微生物学通报, 1988, 15(5): 207-210.

[23] 周俊清. 凝乳酶优良菌株的选育及其酶活特性的研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2005.

[24] 胡永金, 石振兴, 朱仁俊, 等. 一株产凝乳酶细菌的分离与鉴定 [J]. 中国酿造, 2010(5): 81-84.

[25] 刘和涛. 一株产凝乳酶枯草芽孢杆菌的筛选、鉴定及其酶活性质的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2008.

[27] 张卫兵, 宋曦, 贺晓玲, 等. *Bacillus licheniformis* 产凝乳酶培养基的优化 [J]. 中国酿造, 2011(2): 70-73.

[28] 张卫兵, 甘伯中, 梁琪, 等. 一株产凝乳酶解淀粉芽孢杆菌的筛选、鉴定及酶学性质 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 172-176.