

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16142

紫外诱变选育高活性蛋白酶枯草芽孢杆菌及其降解饲料能力评价

王晓云, 王慧, 赵燕, 陈红菊, 季相山

山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018

摘要: 以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖池塘底泥中分离的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BC2 为出发菌株, 利用紫外诱变的方法培育蛋白酶活性高的枯草芽孢杆菌菌株, 并评价其降解饲料的能力。结果表明: (1) 经 6 次紫外诱变, 突变菌株 B38 的透明圈直径(H)与菌落直径(C)之比(H/C 值)达到 6.42, 提高了 2.13 倍; (2) 福林酚法测得 B38 的蛋白酶活性为 86.82 U/mL, 是出发菌株 BC2 的 3.14 倍, 但紫外诱变对 B38 纤维素酶活性影响不显著; (3) 连续传代培养 10 代后发现 B38 产蛋白酶和纤维素酶能力保持稳定, 证明诱变菌株具有较好的遗传稳定性; (4) 利用凯氏定氮法评价 B38 降解饲料蛋白的能力, 发现与 BC2 相比, B38 降解饲料中可溶性蛋白的能力提高了 2.57 倍, 而降解不溶性蛋白的能力变化不大。本研究诱变选育的枯草芽孢杆菌 B38 为开发优良的水产微生态制剂产品提供了重要的前提和基础。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 蛋白酶; 紫外诱变; 蛋白降解率; 虾池底泥

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)06-1351-07

在水产养殖池塘中, 大量投饵会导致池底残饵、粪便等含氮有机物难以完全被天然的微生物氧化分解, 剩余的有机物在池底日积月累, 污染了池塘的底质和水质。因此, 人为地施加能大量降解残饵、粪便等的微生物菌种来加速池底和水体中有机质的分解是非常必要的^[1]。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是美国食品药品监督管理局(FDA)公布的安全菌种^[2], 也是当今工业酶的主要生产菌种之一。该菌能够分泌各种酶类, 尤其具有较强的蛋白酶活性^[3]。利用其分泌各种酶的能力, 在水产养殖中可应用于降解水产养殖池塘中的残饵、粪便等有机污染物, 同时还可以提高水产动物机体消化酶活性。该菌已被广泛用来制备改水、营养类的微生态制剂^[4-5]。例如, 添加适当的枯草芽孢杆菌能够有效改善刺参养殖水体水质, 提高机体消化酶和非特异性免疫活性, 从而促进刺参生长^[6]。因此, 筛选和培育产酶活性

高的枯草芽孢杆菌具有十分重要的意义。在自然条件下, 微生物菌种发生突变的概率较低, 且突变幅度不大, 单纯依赖微生物群体的自然突变来选育高产蛋白酶菌株远不能满足生产和研究需要。有研究表明, 紫外诱变选育具有操作安全简便、诱变效率高等特点, 是提高菌株产酶活性的常用方法^[7-9]。近些年来, 关于这方面的研究已经有很多, 如王静等^[10]对枯草芽孢杆菌进行连续 2 次紫外诱变, 选育出了对西瓜枯萎病病菌具更强抑制作用的新菌株; 郭晓军等^[11]利用紫外诱变有效提高了枯草芽孢杆菌产脂肪酶的能力, 诱变后酶活力较原菌株提高了 40%; 蔡婉玲等^[12]利用紫外诱变使菌株的蛋白酶活提高了 15.6%。但目前得到的诱变菌株的起始菌株多是从土壤中分离的, 对水产养殖池塘中分离的菌株进行诱变选育的报道很少, 这限制了优良水产微生态制剂产品的开发。

本研究以从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)

收稿日期: 2016-01-14; 修订日期: 2016-02-29.

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系虾蟹类创新团队(SDAIT-15-011-02, SDAIT-15-011-09); 山东省农业良种工程项目.

作者简介: 王晓云, 硕士研究生, 从事养殖水环境调控研究.

通信作者: 季相山, 副教授, 博士, 从事养殖水环境调控和遗传育种研究. E-mail: xsji@sdau.edu.cn

养殖池塘底泥中分离的枯草芽孢杆菌 BC2 为出发菌株, 通过紫外诱变的方法对其进行连续诱变, 探讨了紫外诱变的最佳诱变次数和诱变剂量, 以期获得能稳定遗传的高蛋白酶活性的突变株, 为水产微生物制剂的研制和开发提供优良菌株。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及培养基

出发菌株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BC2 为本实验室从凡纳滨对虾养殖池塘底泥中分离的菌株, 经测定, BC2 的蛋白酶活性为 24.8 U/mL。试验用虾饲料为广西粤海饲料有限公司出品的凡纳滨对虾饲料。2% 虾饲料培养基: 普通虾饲料 2 g, 磷酸二氢钾 4.5 g, 氯化钠 5 g, 硫酸镁 0.2 g, 加水定容至 100 mL 后调节 pH 至 6.0, 121℃ 灭菌 20 min。

1.2 紫外诱变条件的筛选

将划线培养的单菌落在发酵培养基中过夜培养, 选择培养 18 h 处于对数生长期的菌悬液进行诱变实验。取 10 mL 浓度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液移入直径为 9 cm 的无菌培养皿中, 培养皿置于磁力搅拌器上, 培养皿与 30 W 紫外灯的距离调整为 30 cm; 启动磁力搅拌器(200 r/min)30 s 后, 打开皿盖, 立即计时, 于紫外灯下分别照射 0 s、15 s、30 s、45 s、60 s、75 s。取未照射和照射过的菌悬液各 0.1 mL, 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度梯度稀释后, 取 0.1 mL 稀释液涂布于固体酪素培养基上, 于 25℃ 避光恒温培养箱中培养 48 h, 对菌落计数并计算致死率。致死率计算公式为: $1 - (\text{处理后菌液中的活菌数} / \text{对照原菌液中的活菌数}) \times 100\%$ 。以致死率为纵坐标, 以照射时间为横坐标, 绘制致死率曲线。对致死率曲线进行指数拟合, 选择 75%~80% 致死率所对应的诱变时间为最佳诱变时间。

1.3 筛选蛋白酶活性高的诱变菌株

根据筛选出的最佳诱变条件对 BC2 进行连续 6 次诱变, 每次诱变结束后, 将菌悬液适当稀释取 0.1 mL 涂布于固体酪素培养基中, 25℃ 避光培养 48 h 后记录水解圈直径 H (mm) 和菌落直径 C (mm), 选取 H/C 值最高的 20 株菌株继续进行诱变。

1.4 酶活性测定

将菌液 OD_{600} 值达到 1.0 的 BC2 和 B38 菌悬

液, 以体积比 5% 的接种量接种到 100 mL 发酵培养基中, 25℃, 200 r/min 振荡培养, 取 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 各时间点的培养液各 1 mL, 离心后取上清测其酶活。蛋白酶活性用福林酚法测定, 纤维素酶活性用羧甲基纤维素 CMC 法测定。

1.5 酶活遗传稳定性分析

将选出的蛋白酶活性高的菌株 B38 接种于 LB 斜面培养基上连续传代培养 10 代后, 采用福林酚法测定其蛋白酶活性, 评价连续传代对其蛋白酶活性的影响。

1.6 降解饲料蛋白能力测定

将菌液 OD_{600} 值达到 1.0 的 BC2 和 B38 菌悬液, 以体积比 2% 的接种量接种到 300 mL 2% 虾饲料培养基中, 37℃, 200 r/min 连续振荡培养 5 d, 将所有培养物 5000 r/min 离心 10 min, 用凯氏定氮仪分别测定上清和冷冻干燥后沉淀中的含氮量。空白组不接种菌悬液, 其他操作与试验组完全相同。蛋白质含量的计算公式为:

$$N = (V_1 - V_2) \times C \times 0.0140 \times 6.25 / m$$

式中, V_1 为试验组滴定时消耗盐酸的量(mL); V_2 为空白组滴定时消耗盐酸的量(mL); C 为盐酸标准液浓度(mol/L); 6.25 为氮换算为蛋白质的平均系数; m 为样品质量(g)。

1.7 数据分析方法

数据均用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)的形式表示, 用 Excel 2016 和 SPSS 21.0 软件进行统计分析和显著性检验($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变条件的筛选

以紫外照射时间为横坐标, 菌体死亡率为纵坐标, 绘制的诱变致死率曲线显示, 在致死率都为 75% 的情况下, 出发菌株 BC2 需要的照射时间仅为 20 s。随着诱变次数的增加, 在相同致死率的情况下需要的紫外照射时间逐渐延长, 第 5 次诱变菌株需要的照射时间达到 75 s, 说明紫外诱变使得菌株耐受紫外照射的能力逐渐增强(图 1)。根据绘制的诱变致死率曲线, 首次诱变时选择的最佳诱变时间为 25 s, 第 2~6 次诱变时, 最佳诱变时间分别是 25 s、39 s、45 s、60 s、75 s。

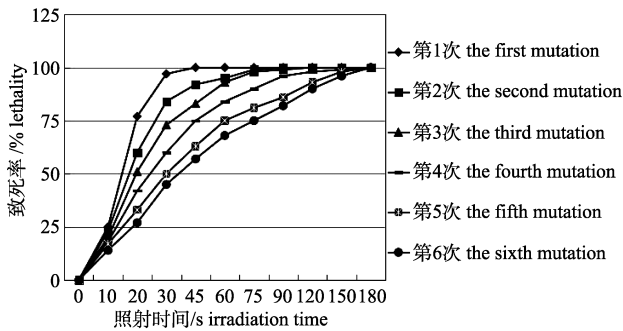


图 1 紫外照射下枯草芽孢杆菌出发菌株 BC2 及各次诱变菌株的诱变致死率曲线

Fig. 1 Lethal rate curve of strain BC2 and several mutated strains under UV radiation

2.2 筛选蛋白酶活性高的诱变菌株

每次诱变后选取 H/C 值最高的前 20 株菌株计算其 H/C 的平均值(表 1), 第 1 次诱变后 H/C 平均值为(3.567±0.11) mm, 以后逐渐增加, 至第 5 次诱变后 H/C 平均值增加到(4.849±0.19) mm, 但第 5 次和第 6 次诱变后 H/C 平均值几乎没有差异, 说明诱变效果已达到了峰值。

表 1 6 次诱变后 H/C 值最高的前 20 株菌株的 H/C 平均值

Tab. 1 Average value of H/C of the highest 20 strains after each UV mutation

诱变次数 mutation frequency	H/C 平均值 average value of H/C
第 1 次 the first mutation	3.567±0.11
第 2 次 the second mutation	3.779±0.21
第 3 次 the third mutation	4.057±0.18
第 4 次 the fourth mutation	4.376±0.14
第 5 次 the fifth mutation	4.849±0.19
第 6 次 the sixth mutation	4.850±0.17

$n=20; \bar{x} \pm SD$

第 6 次诱变后, 测定 H/C 值最高的前 9 株菌株, 分别命名为 B2、B3、B12、B14、B15、B25、B27、B38、B54(表 2)。从表中可知, 这 9 株突变菌株的 H/C 值都明显高于出发菌株 BC2。尽管这 9 株菌株间 H/C 值已较接近, 但 B38 的 H/C 值仍高于其他菌株, 达到 6.42。同时, 在第 6 次诱变后, 我们也发现了一些菌株的 H/C 值与出发菌株 BC2 相比没有明显差异, 如菌株 B44。

表 2 第 6 次诱变后较好的 9 株枯草芽孢杆菌菌株的 H/C 值

Tab. 2 H/C value of 9 normal strains after 6 UV mutations

菌株 strain	B2	B3	B12	B14	B15	B25	B27	B38	B54	B44	BC2
H/C	5.20	5.15	5.02	5.71	5.44	5.17	5.32	6.42	5.08	3.29	3.01

2.3 B38 蛋白酶和纤维素酶活性分析

利用福林酚法分析了 B38 在不同发酵时间段下的蛋白酶活性。结果显示, 在各个时间段下 B38 的蛋白酶活性都大于 BC2, 在 96 h 时两者差异最大。至 120 h 时, B38 蛋白酶活性仍高于出发菌株 BC2, 但差异程度变小(图 2A)。

采用羧甲基纤维素 CMC 法分析了 B38 在不同发酵时间段下的纤维素酶活性。结果显示, 在各个时间段下 B38 的纤维素酶活性与 BC2 的差异都不显著(图 2B)。48 h 时, 出发菌株 BC2 和突变菌株 B38 的纤维素活性均达到最高值, 分别为 0.85 U/mL、0.97 U/mL, 差异也不显著。说明通过 H/C 值作为标准选育蛋白酶活性高的菌株, 尽管显著提高了其蛋白酶活性, 但对其纤维素酶活性没有显著影响。

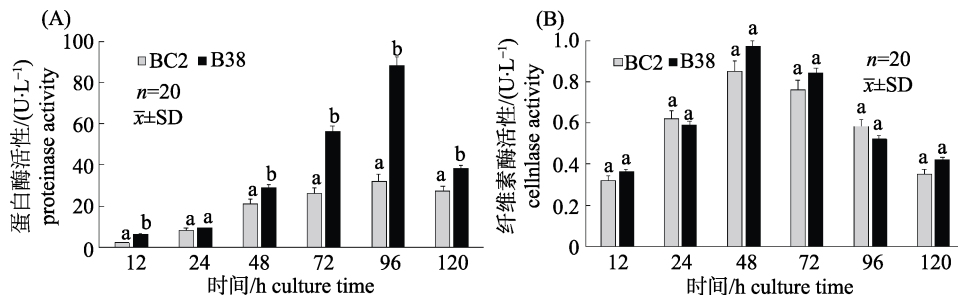


图 2 枯草芽孢杆菌菌株 B38 和 BC2 蛋白酶(A)和纤维素酶(B)活性比较

柱上标不同字母者表示两实验组在同一时间点差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 Comparison of protease (A) and cellulase (B) activity between strains B38 and BC2

Different small letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) at the same time of different treated groups.

2.4 B38 遗传稳定性分析

将 B38 连续传代发酵培养 10 代后, 测定其蛋白酶和纤维素酶活性。结果显示, 其蛋白酶活性为 77.01 U/mL, 纤维素酶活性为 0.91 U/mL, 分别是连续传代前的 88.70% 和 93.81%, 证明连续传代后 B38 蛋白酶和纤维素酶活性都有所降低, 但降低不显著, 每代的降低水平控制在 1.2% 以内, 说明 B38 遗传稳定性较好, 为其应用开发提供了前提和基础。

2.5 B38 降解饲料蛋白能力评定

将菌种接种到饲料培养基中培养 5 d, 采用凯氏定氮法评定 B38 和 BC2 对饲料蛋白的降解能力, 结果发现, B38 和 BC2 发酵物中可溶性的蛋白含量分别为 0.42 g、1.08 g (图 3), B38 发酵培养物中可溶性的蛋白含量明显低于 BC2, B38 对可溶性蛋白的降解率为 BC2 的 2.57 倍, 说明紫外诱变显著提高了 B38 对可溶性蛋白的降解能力。B38 和 BC2 发酵物中固体蛋白的量差异不大, 说明饲料中的蛋白如果不溶解的话, B38 和 BC2 都很难将其降解掉。

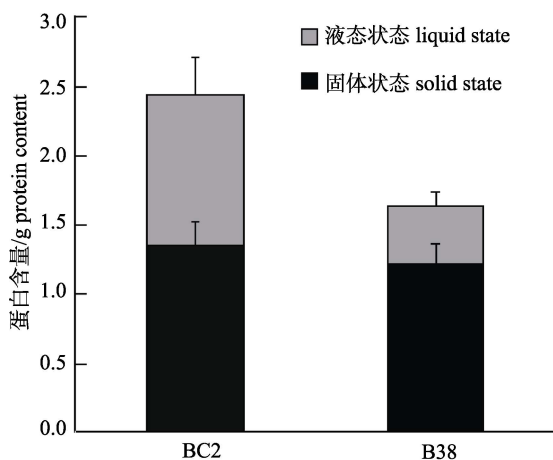


图 3 枯草芽孢杆菌菌株 BC2 和 B38 降解饲料蛋白能力比较

Fig. 3 The comparison of the feed protein degradation ability between strains B38 and BC2

3 讨论

3.1 最佳诱变时间的确定

由于紫外诱变时菌株可发生正、负两个方向的突变^[13], 合适的诱变剂量能提高菌株的正突变

率, 因此选择适宜诱变剂量(时间)是非常重要的。一般情况下当致死率为 70%~80% 时菌株正向突变率较高^[14-16]。本研究对枯草芽孢杆菌 BC2 进行了 6 次诱变, 首次诱变致死率为 80% 时的紫外照射时间为 25 s, 第 2~6 次诱变致死率为 80% 时的紫外照射时间分别变为 25 s、39 s、4 s 5、60 s、75 s, 说明随着诱变次数的增加, 在相同的致死率下需要的紫外照射时间越来越长, 这与其他研究结果也基本一致, 如许向华等^[17]采用紫外诱变的方式提高菌株产葡萄糖-1-磷酸的能力, 诱变时间确定为 12 s, 此时致死率为 79.17%。Afsharmanesh 等^[18]用 γ 射线对枯草芽孢杆菌进行诱变研究时也发现, 致死率在 90% 时正向突变率最高。

3.2 紫外诱变效果

本研究中获得的突变菌株 B38, 相对于出发菌株, 蛋白酶活性由 27.68 U/mL 提高到 86.82 U/mL, 提高了 3.14 倍, 诱变效果较好, 这与他人的研究结果基本一致。如张智等^[19]利用紫外诱变技术筛选出 1 株枯草芽孢杆菌, 其蛋白酶活性比出发菌株提高了 10% 左右; 郑鸿飞等^[20]利用紫外诱变技术获得了 1 株高产酯酶且性状稳定的菌株, 其产酶活力由原来的 22.8 U/mL 提高到了 77.6 U/mL; 顾瑾麟等^[21]经初筛和复筛从开菲尔粒中筛选到 1 株蛋白酶活性高的菌株, 其酶活提高到了初始菌株的 2 倍。

水产精养模式以人工投饵为主, 养殖密度高, 投饵量大, 在养殖过程中会产生大量的残饵、粪便, 粪便和残饵中的蛋白等有机物逐渐溶解到水中, 是造成池塘水质污染的主要原因, 将这些溶解到水体中的有机物降解为藻类可利用的营养物质如氨基酸、铵态氮等, 是改善池塘水质、防治水产养殖动物病害发生的有效方法^[22]。因蛋白酶能催化蛋白质和多肽水解^[23], 那么提高菌株的蛋白酶活性是否能提高其降解水中可溶性蛋白、残饵、粪便等的的能力呢? 在本研究中, 我们发现突变菌株 B38 不仅蛋白酶活性得到提高, 其降解可溶性蛋白(饲料)的能力也显著提高, 降解率达到出发菌株的 2.57 倍, 这说明通过诱变选育提高其蛋白酶活性是可以增强其分解水体中残饵、粪便等的的能力的, 这也为水产微生态优良菌株的开发

提供了新的途径。关于为何 BC2 和 B38 都只能降解可溶性蛋白, 无法降解不溶性蛋白, 这可能与 BC2 和 B38 所产蛋白酶的性质和饲料蛋白的来源都有关。目前发现的蛋白酶种类繁多, 蛋白酶分类的方法也有很多种, 如根据催化中心参与催化的氨基酸不同, 可将蛋白酶分为丝氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶等 9 类^[24]。下一步应对 B38 所产蛋白酶的性质进行进一步研究, 同时如果利用定点突变的方式对 B38 部分蛋白酶基因进行改造^[25], 将其改造成具有分解更多类型蛋白质(如饲料中的不溶性蛋白质)的能力, 会使其具有更广阔的应用前景。

3.3 诱变菌株遗传稳定性问题

在微生物遗传育种中, 传统的理化因子对微生物的诱发突变作用强烈, 但诱变株的遗传稳定性较差, 且易发生回复突变^[26]。将 B38 连续传代培养 10 代后其产蛋白酶和纤维素酶能力保持稳定, 分别是传代前的 88.70%和 93.81%, 这与他人的研究结果相似, 如宋霖霞等^[27]研究发现连续传代 5 次后, 菌株产蛋白酶活性基本不变; 艾冰花等^[28]发现菌株连续传代 8 次后酶活力变化范围不超过 9.4%。诱变菌株 B38 较强的遗传稳定性为其下一步的应用开发提供了保障。

参考文献:

- [1] Ji X S, Ding L, Wang H, et al. Manual for Aquatic Probiotics and Disinfectants[M]. Beijing: Jindun Publishing House, 2015: 1-2. [季相山, 丁雷, 王慧, 等. 水产微生态制剂与消毒剂使用手册[M]. 北京: 金盾出版社, 2015: 1-2.]
- [2] Mei C F, Jiang X L, Mu H J, et al. Screening of alkaline protease-producing bacterial strains isolated from a soda lake and their fermentation conditions[J]. Periodical of Ocean University of China, 2005, 35(4): 613-617. [梅承芳, 江晓路, 牟海津, 等. 碱湖高产碱性蛋白酶菌的选育和产酶条件研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(4): 613-617.]
- [3] Wang T, Liang Y F, Wu M B, et al. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties[J]. Chinese Journal of China Engineering, 2015, 23(4): 744-754. [王涛, 梁亚飞, 吴绵斌, 等. 枯草芽孢杆菌产天然产物及其抗菌性[J]. 中国化学工程学报, 2015, 23(4): 744-754.]
- [4] Li S D, Ding K, Luo W G, et al. Isolation and identification of high proteinase-producing from pig feces[J]. Feed Review, 2013(9): 34-37. [李三栋, 丁轲, 罗伟光, 等. 猪源高产蛋白酶芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 饲料博览, 2013(9): 34-37.]
- [5] Hu X Z, Wang J. Advances in protease production and its applications[J]. Industrial Microbiology, 2008, 38(4): 49-61. [胡学智, 王俊. 蛋白酶生产和应用的进展[J]. 工业微生物, 2008, 38(4): 49-61.]
- [6] Dong C G, Yang A G, Sun X J, et al. The health-promoting effects of *Bacillus subtilis* in the culture of sea cucumber[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 109-115. [董春光, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 在刺参养殖中的益生作用[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 109-115.]
- [7] Zhong J W. Studies on mutation breeding of aerobic denitrifiers by UV-irradiation[D]. Xiamen: Jimei University, 2011. [钟君伟. 好氧反硝化菌的紫外诱变育种研究[D]. 厦门: 集美大学, 2011.]
- [8] Liu Y. Study on UV mutagenesis and isolation of aerobic denitrifiers for treatment of nitrate wastewater[D]. Changchun: Jilin University, 2009. [刘懿. 好氧反硝化菌的诱变分离及其对硝酸盐废水处理的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009.]
- [9] Huang L. Studies on mutation of *Bdellovibrio* sp.[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010. [黄亮. 蛭弧菌的诱导突变研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.]
- [10] Wang J, Zhu J H, Lin W, et al. Screening for the strain highly producing antagonistic substance from *Bacillus subtilis* B47 by UV mutagenesis[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4): 68-72. [王静, 朱建华, 林伟, 等. 枯草芽孢杆菌 B47 高产拮抗物质菌株的紫外诱变选育[J]. 农业科学与技术, 2008, 9(4): 68-72.]
- [11] Guo X J, Guo W, Yuan H S, et al. Screening and UV mutagenesis of one *Bacillus* strain producing lipase[J]. China Feed, 2015(12): 27-29. [郭晓军, 郭威, 袁洪水, 等. 一株饲用产脂肪酶芽孢杆菌的筛选及其紫外诱变育种[J]. 中国饲料, 2015(12): 27-29.]
- [12] Cai W L, Tian B Y, Guo J, et al. Screening and UV mutagenesis of protease producing strains[J]. Biotechnology, 2011, 21(1): 73-76. [蔡婉玲, 田宝玉, 郭菁, 等. 蛋白酶产生菌的筛选和紫外诱变育种[J]. 生物技术, 2011, 21(1): 73-76.]
- [13] Gui F, Wang H, Wang P, et al. The mutation breeding and mutagenic effect of air plasma on *Penicillium chrysogenum*[J]. Plasma Sci Technol, 2012, 14(4): 297-302.
- [14] Ye C J. Induced breeding and enzyme properties of *Bacillus* probiotics[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2009. [叶崇军. 益生芽孢杆菌的诱变选育及酶学特性[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.]
- [15] Zhang K P, Liu Y L, Ma B, et al. Mutation breeding of

- thermostable acid lipase-producing strain A-16 and optimizing of its lipase-producing condition[J]. *Bioprocess*, 2015, 5(2): 15–24. [张开平, 刘燕丽, 马博, 等. 产耐高温酸性脂肪酶菌株 A-16 的诱变选育及其发酵条件优化[J]. *生物过程*, 2015, 5(2): 15–24.]
- [16] Shen X J, Zhang P, Shi Y P. A mutant with high erythromycin yield obtained by using novel atmospheric and room temperature plasmas and UV mutation[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2015, 49(1): 19–23. [沈小静, 张萍, 石彦鹏. 常压室温等离子体结合紫外诱变筛选红霉素高产菌株[J]. *中国兽药杂志*, 2015, 49(1): 19–23.]
- [17] Xu X H, Shi J H, Zhao G G, et al. UV mutation of *Bacillus subtilis* for breeding of glucose-1-phosphate high-producing strain[J]. *China Dairy Industry*, 2011, 39(9): 21–23. [许向华, 史军花, 赵国罡, 等. 紫外诱变枯草芽孢杆菌选育葡萄糖-1-磷酸高产菌株[J]. *中国乳品工业*, 2011, 39(9): 21–23.]
- [18] Afsharmanesh H, Ahmadzadeh M, Javan-Nikkhah M, et al. Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation[J]. *Crop Protection*, 2014, 60: 83–92.
- [19] Zhang Z, Zhu H L, Li H J, et al. Study on screening high producing bacterial strains of proteinase enzyme in hydrolyze corn protein and its enzyme properties with UV-induced[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, 30(2): 170–173. [张智, 朱宏亮, 李宏菊, 等. 紫外选育水解玉米蛋白的高产蛋白酶菌株及酶性质的研究[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(2): 170–173.]
- [20] Zheng H F, Sun M, Wang Y J, et al. Breeding of high yield esterase strains from protoplast of marine micro organism[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2008, 29(8): 64–66. [郑鸿飞, 孙溢, 王跃军, 等. 海洋微生物酯酶高产菌株的诱变选育研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(8): 64–66.]
- [21] Gu J L, Xia Y J, Zhang H F, et al. Screening of high protease-producing bacteria of kefir grains and optimization of fermentation media[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(3): 558–562. [顾瑾麟, 夏永军, 张红发, 等. 开菲尔粒中高产蛋白酶菌株的筛选及培养基优化[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(3): 558–562.]
- [22] Gao S S. Isolation, identification and characteristics of aerobic denitrifying bacteria[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2007. [高珊珊. 好氧反硝化菌的筛选及反硝化性能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.]
- [23] Zhang S J, Song X L, Zhao X J, et al. Effects of adding probiotics to the feed on anti-infection and five kinds of immune gene expression of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 899–907. [张盛静, 宋晓玲, 赵小金, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾抗感染和 5 种免疫基因表达的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(6): 899–907.]
- [24] Ran L Y. Mechanisms for degradation of deep sea organic nitrogen by extracellular enzymes from sediment bacteria *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 and *Myroides profundus* D25[D]. Ji'nan: Shandong University, 2014. [冉丽媛. 深海沉积物细菌 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 和 *Myroides profundus* D25 胞外蛋白酶对有机氮降解的作用机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.]
- [25] Xu M J, Zhang R Z, Liu X Y, et al. Improving the acidic stability of a β -mannanase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis[J]. *Process Biochem*, 2013, 48(8): 1166–1173.
- [26] Chen W L, Luo H F, Zhang X L. Analysis of the hereditary stability of the mutants of *lentis edodes* mutated by He-Ne laser[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2000, 29(4): 380–384. [陈五岭, 罗海峰, 张小里. He-Ne 激光诱变的香菇变异株遗传稳定性分析[J]. *光子学报*, 2000, 29(4): 380–384.]
- [27] Song L X, Wang S Y. Mutation and optimization of culture conditions of ammonia-degrading bacteria in mariculture affluent[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(3): 148–151. [宋霖霞, 王素英. 海水养殖废水中氨氮降解菌的诱变及培养条件[J]. *水产科学*, 2011, 30(3): 148–151.]
- [28] Ai B H, Li B J, Feng J R. Preliminary study on the ultraviolet mutagenesis of a protease producing strain *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Fishery Modernization*, 2015, 42(4): 39–43. [艾冰花, 李秉钧, 冯俊荣. 一株产蛋白酶芽孢杆菌紫外诱变育种的初步研究[J]. *渔业现代化*, 2015, 42(4): 39–43.]

UV-mutated breeding of *Bacillus subtilis* strain with high protease activity and evaluation of its substrate degradation ability

WANG Xiaoyun, WANG Hui, ZHAO Yan, CHEN Hongju, JI Xiangshan

College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

Abstract: Modern high-intensity aquaculture has seen a rapid increase in annual cultured production over recent decades, and it is essential to deal with the amount of waste produced. Aquaculture effluent is typically characterized by increased nitrogen species (ammonia, nitrites and nitrates), organic carbon, phosphates, suspended solids, and high biological oxygen demand and chemical oxygen demand. Probiotics are defined as live microbial or cultured product feed supplements that beneficially affect water quality or the host. For example, some *Bacillus subtilis* strains can degrade ammonia, nitrites or nitrates and are important for water manipulation in intensive aquaculture. As a result, the use of probiotics in aquaculture is gaining increasing scientific and commercial interest worldwide. A strain with high protease activity, which can degrade protein or nitrogen, is key to its commercial application in probiotics production. To breed a *B. subtilis* strain with high protease activity, an original strain (*B. subtilis* BC2) was mutated using different doses of ultraviolet (UV) radiation, and a preliminary study determined the optimal UV radiation conditions. The value of flat transparent circle to colony diameter (H/C) was used to estimate the UV mutation effect on *B. subtilis*. The results showed that the H/C value of mutated strain B38 increased from 3.01 to 6.42. A spectrophotometry method with Forint phenol (Lowry) was used to measure the protease activity of the mutated strain. The protease activity of B38 was 86.82 U/mL, which was increased by 3.14 times compared with the original strain. After ten successive generations, the protease activity of B38 was 77.01 U/mL and did not change significantly, showing its good genetic stability. Cellulase activity analysis was used to determine whether the UV mutagenesis also affected other enzyme activity. The result showed that the cellulase activity of B38 was not significantly different from BC2. Subsequently, we evaluated the ability of mutated strain B38 to degrade feed protein. Protein content in the feed medium was assayed by the Kjeldahl method. The liquid protein degradation ability of B38 was an increase of 2.57 times compared with original strain BC2. However, the ability of B38 to degrade solid protein did not increase significantly. The UV-mutated high protease-producing B38 strain provides an important foundation for the development and application of aquatic probiotics.

Key words: *Bacillus subtilis*; protease; ultraviolet radiation; degradation; shrimp pond mud

Corresponding author: JI Xiangshan. E-mail: xsji@sdau.edu.cn