

蜡样芽胞杆菌 YSQ08 碱性蛋白酶 *aprA* 基因在毕赤酵母中的表达

黄东彦¹, Shanti Mazu¹, 朱辉¹, 朱剑锋², 胡文锋¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 生物源生物技术(深圳)股份有限公司, 广东深圳 518055)

摘要: 从蛇消化道内容物分离出一株产角蛋白酶菌株为蜡样芽胞杆菌 YSQ08。通过分析 *Bacillus cereus* ATCC 14579 的基因组和蛋白酶家族, 对比分析蜡样芽胞杆菌 YSQ08 纯化角蛋白酶的酶活特性, 确定碱性蛋白酶 *aprA* 基因 (1194 bp) 为目标角蛋白酶。为深入研究角蛋白酶的潜在能力, 对蜡样芽胞杆菌 YSQ08 碱性蛋白酶 *aprA* 基因在毕赤酵母 X33 上进行克隆、表达和优化重组。结果其 10 倍浓缩的角蛋白酶活达到 122.60 U/mL。经优化后的 *aprA* 基因在表面展示重组酵母中得到高效表达, 并且具有较高的角蛋白酶活性, 酶活最高可达到 295.78 U/g 干细胞重。酶学性质分析结果表明, 表面展示表达的重组 *aprA* 蛋白酶性质与天然型相比具有更高的热稳定性, 最适反应温度为 55 °C, 最适 pH 为 8.0。Fe²⁺ 可显著提高重组蛋白的酶活性, 最高可达 329.08%。表面展示表达的重组角蛋白酶可作为全细胞固定化催化剂, 具有更好的热稳定性并能降低酶的纯化回收成本。

关键词: 角蛋白酶; *aprA*; 蜡样芽胞杆菌; 表面展示; 毕赤酵母

文章编号: 1673-9078(2016)12-105-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.017

Recombinant Expression of the Alkaline Protease *aprA* gene from *Bacillus cereus* YSQ08 in *Pichia pastoris* 8

HUANG Dong-yan¹, Shanti MAZU¹, ZHU Hui¹, ZHU Jian-feng², HU Wen-feng¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Bioforte Biotechnology (Shenzhen) Co., Ltd, Shenzhen 518055, China)

Abstract: A keratinase-producing strain of *Bacillus* isolated from the alimentary tracts of snakes was classified as *Bacillus cereus* YSQ08. The alkaline protease *aprA* gene (1194 bp) of this strain was studied by analyzing the genome and proteinase families of *Bacillus cereus* ATCC 14579, and the purified keratinase from *Bacillus cereus* YSQ08 was characterized. The *aprA* from *Bacillus cereus* YSQ08 was cloned, optimized, and expressed in recombinant *Pichia pastoris* X33 for further studying its potential keratinase abilities. After 10-fold concentration, the keratinolytic activity of the recombinant *Pichia pastoris* X33 was found to be 122.60 U/mL. The *aprA* protein displayed on the cell surface of *Pichia pastoris* X33 showed higher keratinolytic activity of 295.78 U/g. The results of the characterization indicated that the optimum conditions for the enzymatic reaction were pH 8.0 at 55 °C. The presence of Fe²⁺ significantly increased the keratinase activity of the recombinant *aprA* protein by 329.08%. The surface-displayed *aprA* protein was immobilized as a whole-cell catalyst; this had higher thermostability at a lower cost of purification and recycling.

Key words: keratinase; *aprA*; *Bacillus cereus*; surface display; *Pichia pastoris*

家禽的羽毛被认为是低价值的副产品。我国每年大约产生 88 万 t 的羽毛, 由于处理不当造成了严重的环境污染。动物羽毛主要由角蛋白组成, 如果能够利用物理、化学以及生物工程的方法加以分解, 就能变成有价值的蛋白质来源。近年来, 为了充分利用羽毛

收稿日期: 2016-11-03

基金项目: 深圳市战略新兴产业发展专项资金资助项目 (CXZZ20140418101933991)

作者简介: 黄东彦 (1987-), 男, 硕士, 生物工程

通讯作者: 胡文锋 (1964-), 男, 博士, 副教授, 资源化利用

废弃物, 许多基于酶解蛋白的技术得到研究。

角蛋白酶 (EC 3.4.21/24/99.11) 已在多种微生物 (细菌: 地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* PWD-1、球形芽胞杆菌 *Bacillus sphaericus* 和铜绿假单胞菌 *Bacillus pseudofirmus* 等; 真菌: 黄曲霉 *Asporgillus flavus* 和微孢长囊头孢霉菌 *Doratomyces microsporus* 等; 放线菌: 放线菌 ss-1 *Actinomycetes* ss-1 和链霉菌 S.K1-02 *Streptomyces* sp. S.K1-02 等) 中发现, 并有效地分解角蛋白。角蛋白是一种难降解的不溶性蛋白, 广泛存在于羽毛和毛发等^[1]。角蛋白酶被应用于各种

行业,包括清洁剂、食品、饲料、餐厨垃圾处理 and 制药^[2]。然而,生产角蛋白酶需要经过复杂的多步纯化,不仅生产耗时、价格昂贵,而且回收复杂效率低,从而阻碍了角蛋白酶的工业化应用。

角蛋白酶基因的表达系统主要有3种,分别是大肠杆菌、芽孢杆菌和毕赤酵母表达系统。角蛋白酶目标蛋白酶基因主要是 *KerA*、*kerB* 和 *KerC*,也有研究人员发现其他类型,如 Shinji Mitsui 等^[3]从碱性诺卡土壤菌属菌株 TOA-1 中扩增得到角蛋白酶 *napA* 基因(1152 bp)。采用固定化的方法被认为是提高角蛋白酶酶活的有效途径^[4]。细胞表面展示技术是将酶固定化和简化目标蛋白提取的一种方法^[5]。异源基因表达的密码子优化也是一个有效提高产能的方式^[6]。

本研究从蛇的消化道内容物中筛选出具有降解角蛋白能力的微生物。筛选出的蜡样芽孢杆菌 YSQ08 能有效降解鸡毛并能分泌大量的蛋白酶。对蜡样芽孢杆菌 YSQ08 角蛋白酶 *aprA* 基因进行克隆、优化并成功在毕赤酵母 X33 细胞异源表达。将重组碱性蛋白酶作为全细胞催化剂,进行表征和研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与羽毛

蜡样芽孢杆菌 YSQ08 从广东省境内野生蛇消化道内容物中筛选得到。基因克隆菌 *E.coli* DH5 α (基因型为 F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17* (*rk-mk*⁺) *phoA* *supE44* λ -*thi-1* *gyrA96* *relA1*), 由华南农业大学食品学院生物工程系应用微生物实验室提供。-80 °C 冰箱保存备用。表达菌 *Pichia pastoris* X33 (基因型为 wide type: *mut*⁺), -80 °C 冰箱保存。

羽毛,广东清远鸡场提供。

1.1.2 工具酶、试剂盒和试剂

Taq DNA 聚合酶,购于北京全式金 TransGen 生物技术有限公司; PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶、TaKaRa Taq DNA 聚合酶, DNA 限制性内切酶 *E.co*R I、*Kpn* I、*Sac* II、*Pme* I、*Xba* I, 购于 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; T4 DNA 连接酶,购于普洛麦格 Promega (北京)生物技术有限公司; 普通质粒小提试剂盒(离心柱型) DP103-03, 普通 DNA 凝胶回收试剂盒(离心柱型) DP214-03, 购于天根 TIANGEN 生化科技(北京)有限公司; IPTG, X-gal, 氨苄青霉素, 氯霉素, Goldview DNA 染色剂, 购于北京普博欣生物科技有限公司羊毛

角蛋白粉(CAS 69430-36-00), 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; Sephadex G-75 及层析柱, 适马贸易(上海)有限公司。焦碳酸二乙酯(DEPC), 海索莱宝生物科技有限公司; 其余试剂为国产试剂。

所用引物均由 Invitrogen 英韦创津公司合成。

1.1.3 主要仪器

摇床, SPH-200B, 上海世平实验设备有限公司; 离心机, 5804R, 德国 Eppendorf 公司; 凝胶成像系统, BIO-RAD Laboratories-Segrate (Milan) Italy; 梯度 PCR 仪, Takara 公司; JY-SCZ2 型双垂直电泳槽电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司。

1.1.4 培养基

羽毛培养基: 100 mL 培养基中含 1.0 g 鸡毛, 0.05 g NaCl, 0.006 g CaCl₂, 0.01 g MgCl₂, 0.14 g K₂HPO₄, 0.07 g KH₂PO₄。

LB 培养基: 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 10 g NaCl, 蒸馏水定容至 1000 mL。

YPD 培养基: 1.0% 酵母提取物, 2.0% 蛋白胨, 2.0% 葡萄糖。

BMGY 液体培养基: 1.0% 酵母提取物, 2.0% 蛋白胨, 1.34% YNB, 121 °C 灭菌 20 min; 4 \times 10⁻⁵% 生物素(过滤除菌), 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0), 1.0% 甘油。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化

将活蛇解剖, 取胃内容物和肠内容物, 分别按 5.0% (V/V) 接种于 100 mL 羽毛液体培养基中, 37 °C、200 r/min 富集培养 48 h^[7]。分别取胃内容物、肠内容物富集发酵液, 浓度梯度 1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 和 10⁻⁹ 稀释后, 在羽毛琼脂培养基中 37 °C 培养 48 h。从上述的平板中, 选取羽毛有被细菌降解的部分, 挑取单菌落, 于 LB 琼脂培养基和羽毛琼脂培养基中划线, 37 °C 培养 24 h。重复上述步骤两至三次, 直至获得单菌落。测试降解羽毛的能力, 将降解能力明显较强的其中一种目的菌株, 接入 100 mL 羽毛液体培养基中, 于 37 °C 恒温摇床中培养, 观察降解情况。

1.2.2 菌株的培养

种子液在摇床 37 °C、200 r/min 培养 24 h。取 1.0 mL 菌液加入到羽毛培养基, 37 °C、200 r/min 培养 48 h。将培养后的发酵液在 3000 r/min、4 °C 离心 15 min, 上清液用于酶活性测定。

1.2.3 蜡样芽孢杆菌 YSQ08 DNA 的提取

蜡样芽孢杆菌 YSQ08 作为 PCR 扩增的样品通过

饱和酚-氯仿萃取法提取基因组 DNA。

1.2.4 角蛋白酶的纯化

用 LB 培养基在 37 °C、200 r/min 条件下培养蜡样芽孢杆菌 YSQ08 24 h。滤纸过滤后在 4 °C、10000 r/min 离心。在 300 mL 的无菌上清液中加入硫酸铵(饱和度为 80%)，促使蛋白沉淀。将沉淀再溶解在 20 mL 的 Tris-HCl 缓冲液中 (pH 8.0)，然后用透析袋在 4 °C 进行透析处理 3 h^[8]。利用 Sephadex G-75 在层析柱 (2 cm×50 cm) 中层析经过透析处理后的角蛋白酶酶液，使其进一步纯化，再用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 8.0) 以 1 mL/min 流速进行洗脱，每 2 mL 洗脱液收集一次样品，测定角蛋白酶酶活，用 Bradford 法测定总蛋白，对上述纯化后的角蛋白酶酶液进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.5 碱性蛋白酶 aprA 基因的扩增和克隆

基于蛋白酶纯化中的特征对角蛋白酶基因进行选择。通过生物信息软件 ORF Finder (BLASTP) 对 Bacillus cereus ATCC 14579 公布的基因组进行可读框比对分析。蜡样芽孢杆菌 YSQ08 最有可能分泌的蛋白酶为耐碱性蛋白酶 A (序列号: NP_832079.1)。对蜡样芽孢杆菌 YSQ08 中得到 aprA 基因片段的完整序列 (1194 bp) 进行 PCR 扩增。aprA 的引物 E.coR I (5'-CCGGAATTCATGAAGAACAAGATTATCGTTT TCTTG-3') 和 aprA-Kpn I (5'-CGGGGTACCTTAAGAA GCCTTGTTTCTTG-3') 用于克隆 aprA 基因。使用试剂盒对其分离、凝胶提取和结扎。将 aprA 基因 DNA 片段克隆到 TA 载体 PMT19。将重组质粒转化到大肠杆菌 DH5α 并存储在 -20 °C。在原始 aprA 中发现含有宿主毕赤酵母 X33 一些稀有密码子，稀有密码子会影响重组基因的高效表达，因此 aprA 基因的优化委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行，并合成到 pUC57 载体中，获得 pUC57-aprA (op) 用于重组表达。

1.2.6 碱性蛋白酶 aprA 基因在毕赤酵母中的克隆与表达

如图 1 所示，从 pUC57-aprA (op) 中通过双酶切、连接和转化成功的 pPICZαA-aprA (op) 与 pPICZαA-AGα/aprA (op) 重组表达质粒均转化到基因工程菌 E.coli DH5α 中，使用含 100 μg/mL zeocin 的 LB 平板培养基筛选得到阳性克隆。将毕赤酵母 X33 生长在 YPD 培养基中，在电击转化法 1.5 kV，50 μF，186 Ω 条件下将线性化的酶切质粒导入毕赤酵母。

将转化细胞在 1.0 mol/L 山梨醇中 30 °C 培养 2 h。然后接种于含 100 μg/mL Zeocin YPD 山梨醇琼脂培养基中 30 °C 培养 48 h。将重组菌落接种于 BMGY 培养基 (pH 7.5) 中，30 °C、250 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为

2.0~6.0。培养好的菌在 3000 r/min、4 °C 离心 5 min，然后重新悬浮在含 1.0% (V/V) 甲醇 BMMY 培养基 (pH 7.5) 中。连续诱导 AOX1 启动子 96 h，每 24 h 加甲醇至终浓度为 1.0%。

在 3000 r/min、4 °C 离心 10 min 条件下收集毕赤酵母 X33/pPICZαA-AGα/aprA(op) 表面展示表达转化子细胞。用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 重悬细胞至 OD₆₀₀=1.0，在此条件下测定角蛋白酶酶活。含毕赤酵母 X33/pPICZαA-aprA(op) 的上清液在相同情况下离心收集，一并在 10000 r/min、4 °C 超滤浓缩。对粗纯化的酶使用硫酸铵沉淀蛋白质法进行初步纯化，用凝胶色谱法对角蛋白酶二次纯化。

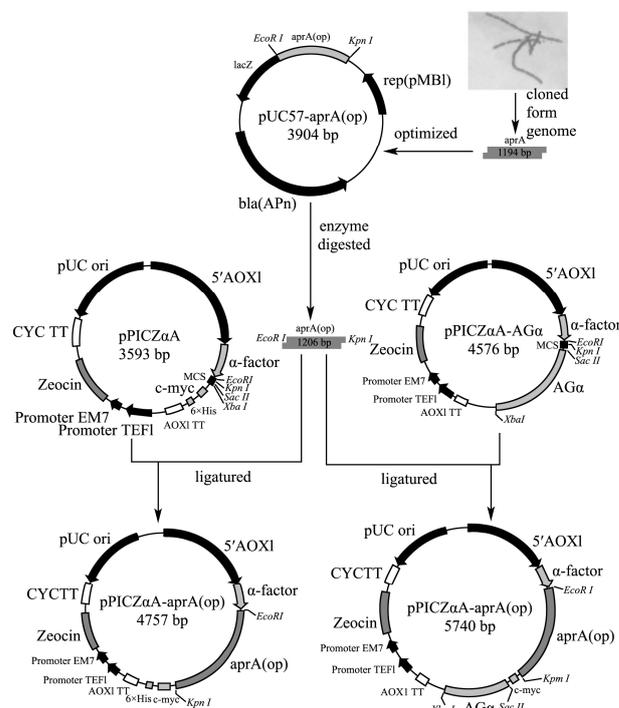


图 1 aprA 重组表达质粒构建流程

Fig.1 Construction of recombinant plasmids for expression of aprA

1.2.7 角蛋白酶酶活测定

羊毛角蛋白粉在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值为 7.5) 中溶解使其浓度为 1.0% (m/V)，并视为空白。2.0 mL 角蛋白溶液与 1.0 mL 的角蛋白酶酶液在 55 °C 水浴震荡 30 min。反应结束后用 2.0 mL、10% (m/V) 三氯乙酸溶液终止反应，3000 r/min、4 °C 离心 10 min。上层清液用 0.45 μm 的过滤膜过滤，过滤液于 OD₂₈₀ 下测定其吸光值。此反应条件下，吸光值每增加 0.01 定义为 1 个角蛋白酶活性单位 U。

1.2.8 aprA 基因编码的角蛋白酶的 SDS-PAGE 分析和 Western blotting 检测

角蛋白酶及 aprA 表达产物活性样品使用

Laemmli^[9]的方法进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(12% (m/V) 丙烯酰胺)。电泳后,重组酶转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,在常温稀释好 1:1000 封闭液中形成抗体基因。用 PBS 溶液(pH 7.4)清洗凝胶。对鼠源单克隆抗体和羊抗鼠 IgG(H+L)进行 Western blotting 检测。

1.2.9 pH 和温度对角蛋白酶活性和稳定性的影响

探究 50 mmol/L 磷酸盐-柠檬酸钠(pH 5.0~7.0)、Tris-HCl 溶液(pH 7.5~8.5)和甘氨酸-NaOH 溶液(pH 9.0~10.0)的不同 pH 值对角蛋白水解活性的影响。40 °C~75 °C(梯度为 5 °C)探究温度对角蛋白酶活性的影响。在 65 °C 下从 6 h 到 24 h 探究热稳定性对酶活的影响。然后在 55 °C, pH 值 7.5 条件下处理 30 min 后测定残余角蛋白酶酶活。未受任何处理的酶活性定为 100%, 各种处理的酶活与之对比, 计算出相对活性。

1.2.10 金属离子和蛋白酶抑制剂对酶活性的影响

一价金属阳离子(Na⁺, K⁺), 二价金属阳离子(Ca²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺和 Ba²⁺)和三价金属阳离子(Fe³⁺)添加到反应体系中探究金属离子对酶活性的影响。加入苯甲基磺酰氟(PMSF), 乙二胺四乙酸(EDTA), 二甲基亚砜(DMSO), β-巯基乙醇(β-Me), 十二烷基硫酸钠(SDS), 吐温 20 和 Triton X-100, 甲醇, 乙醇, 异丙醇, 醋酸乙酯, 十六烷基三甲基溴化铵和乙腈(CTAB)等蛋白酶抑制剂, 30 °C 反应 30 min 探究对角蛋白酶活性的影响。在 55 °C、pH 值 7.5 条件下处理 30 min 测定残余角蛋白酶酶活。

1.2.11 数据统计分析

试验测定的数据和分析的结果采用 Excel 进行处理, 结果采取均值±标准差形式。

2 结果与分析

2.1 产角蛋白酶微生物的筛选鉴定和角蛋白

酶的纯化结果分析

表 1 蜡样芽孢杆菌 YSQ08 产角蛋白酶的纯化结果分析

Table 1 Analysis and purification of the keratinase produced by *B. cereus* YSQ08

纯化步骤	总蛋白/mg	总酶活/U	单位酶活/(U/mg protein)	回收率/%	纯度(倍数)
粗角蛋白酶	896.40	39504.20	44.07	100.00	1.00
硫酸铵处理(80%)	204.10	19027.90	93.23	48.17	2.12
Sephadex G-75	57.30	11831.50	206.48	29.95	4.69

在 37 °C、200 r/min 条件下, 在发酵 48 h 的培养基中筛选出能高效降解鸡毛的菌株 YSQ08(图 2)。通过 16S rDNA 1545 bp 片段验证, 菌株 YSQ08 被鉴定为蜡样芽孢杆菌。结果显示蜡样芽孢杆菌 YSQ08 与 *Bacillus cereus* ATCC 14579 (NCBI Reference Sequence: NR_074540.1) 同源性最高, 序列相似性达 99.8%。32 h 培养后的胞外蛋白酶活性最高, 为 152.20 U/mL。粗角蛋白酶是由 80%硫酸铵溶液沉淀获得, 并对其进行 4 °C 透析 3 h。在 Sephadex G-75 柱上对透析液进行凝胶过滤。Sephadex G-75 柱角蛋白酶洗脱曲线(图 3)表明, 19 和 27 之间的波峰是特定的蛋白酶活性最高(206.48 U/mg)。透析液经纯化后, 角蛋白酶纯度提高 4.69 倍, 回收率提高 29.95%(表 1)。SDS-PAGE 检测显示, 纯化的角蛋白酶显示一个单一的约 45 ku 蛋白条带。

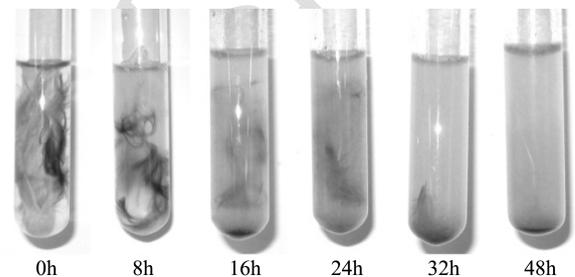


图 2 蜡样芽孢杆菌 YSQ08 降解羽毛效果

Fig.2 Feather degradation of *B. cereus* YSQ08 for 48 h at 37 °C with shaking in feather medium

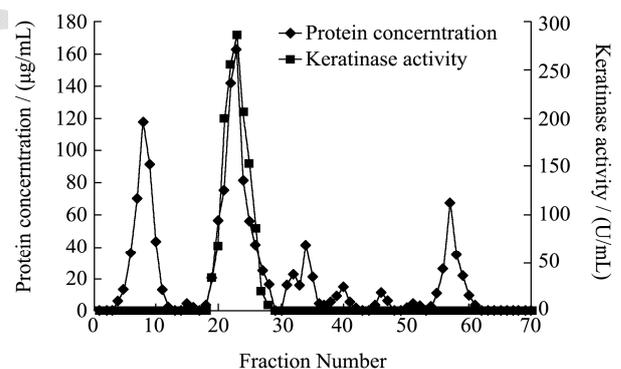


图 3 粗酶液 Sephadex G-75 层析分析

Fig.3 Gel filtration of Sephadex G-75 of crude enzyme fraction precipitated with 80% ammonium sulfate

2.2 蜡样芽孢杆菌 YSQ08 碱性蛋白酶 *aprA* 基因的克隆

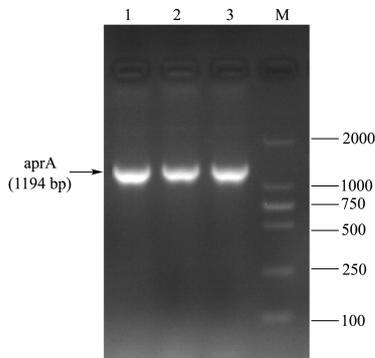


图4 *aprA* PCR 产物的电泳结果

Fig.4 Electrophoresis of *aprA* PCR product

注: M 为 DNA Marker DL2000; Sample 1~3 为 *aprA* 基因的 PCR 产物。

图4为蜡样芽孢杆菌 YSQ08 基因组 DNA 扩增角蛋白酶 *aprA* 编码 1194 bp 片段的电泳结果。序列分析表明,蜡样芽孢杆菌 YSQ08 *aprA* 基因推导的氨基酸序列和蜡样芽孢杆菌 ATCC 14579 (序列号: np_832079.1) 碱性蛋白酶具有 99.8% 同源性。根据宿主毕赤酵母 X33 密码子偏向性,从蜡样芽孢杆菌 YSQ08 碱性蛋白酶获取 *aprA* 基因,经优化后的密码子适应指数 (Codon Adaptation Index, CAI) 提高到 0.83。*aprA*(op) 分别克隆到 pPICZαA 和 pPICZαA-Aga 进行分泌型表达和表面展示型表达。测序结果验证两个表达质粒成功构建。

2.3 重组碱性蛋白酶 *aprA* 基因在毕赤酵母 X33 中的表达

pPICZαA-*aprA*(op) 和 pPICZαA-Aga/*aprA*(op) 转化后均能表达重组角蛋白酶,但分泌型表达和表面展示型表达的量有很大差异。为确切表达,对毕赤酵母 X33/pPICZαA-*aprA*(op) 表达重组酶和毕赤酵母 X33/pPICZαA-Aga/*aprA*(op) 进行 SDS-PAGE 电泳分析。分泌型表达的重组碱性蛋白酶 *aprA* 通过 10 倍浓缩超滤出现一条约 45 ku 蛋白带 (图5)。经 72 h 甲醇诱导后,重组毕赤酵母 X33-pPICZαA-*aprA* (op) 角蛋白酶活性最高达到 122.60 U/mL。

重组毕赤酵母 X33-pPICZαA-Aga/*aprA*(op) 表面展示的碱性蛋白酶比分泌表达的碱性蛋白酶有更高的酶活性。SDS-PAGE 和 western-blotting 显示,表面展示的碱性蛋白酶细胞壁印迹有一个约 93 ku 的蛋白带,

酶活性达到 295.78 U/g 干细胞重,但在上清液中没有检测到活性。结果表明,碱性蛋白酶 *aprA* 成功在酵母细胞表面展示表达 (图5)。细胞表面展示的重组碱性蛋白酶在经过细胞繁殖后有更好的稳定性。

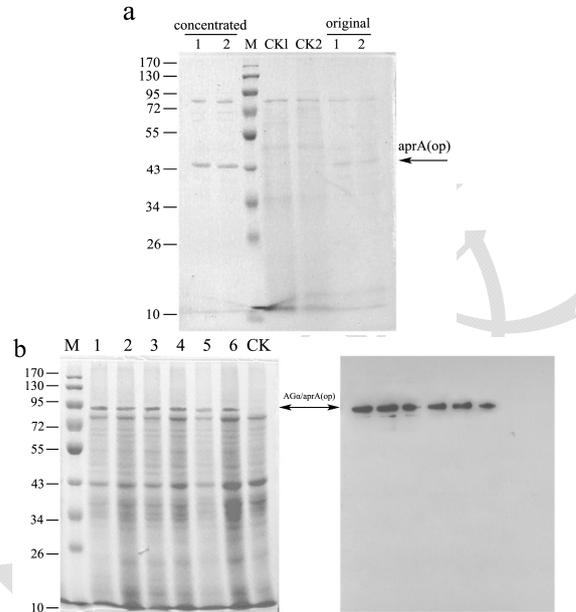


图5 毕赤酵母产重组碱性蛋白酶 *aprA* 的 SDS-PAGE 电泳分析和免疫印迹试验

Fig.5 SDS-PAGE analysis and western blotting of recombinant *aprA* produced by *P. pastoris*

注: 图 a 中, M: 预染蛋白分子量 marker 170 ku~10 ku; CK 1~2: X33/ pPICZαA-*aprA* (op) 空白对照; Original 1~2: X33/ pPICZαA-*aprA* (op) 的诱导表达产物; Concentrated 1~2: 浓缩 10 倍后的 X33/ pPICZαA-*aprA* (op) 的诱导表达产物。图 b 中, M: 预染蛋白分子量 marker 170 ku~10 ku; CK: X33/ pPICZαA-Aga/*aprA* (op) 空白对照; 1~6: X33-pPICZαA-Aga/*aprA* (op) 的诱导表达产物。

2.4 天然角蛋白酶和重组角蛋白酶的特性对比

在 pH 5.0~10.0 测定最适 pH, 然后对天然型角蛋白酶、分泌型角蛋白酶和表面展示型角蛋白酶在 40 °C~75 °C 测定最适温度。如图 6 所示,天然型角蛋白酶和重组角蛋白酶的最适温度为 55 °C,在 60 °C 均具有良好的热稳定性并保持较高的活性 (>90%)。

图 7 表明,天然型 *aprA*、分泌型 *aprA* 和表面展示型 *aprA* 表达的角蛋白酶最适反应 pH 皆为 8.0,酶活分别为 228.33 U/mL、146.28 U/mL 和 257.41 U/mL。从 pH 变化的极值可以看出,表面展示型 *aprA* 表达的角蛋白酶在不同的 pH 环境中酶活稳定性较高;分泌型 *aprA* 表达的角蛋白酶稳定性也相对较高,但酶活较

低；天然型 *aprA* 在碱性环境的稳定性显著高于酸性环境，天然角蛋白酶可以承受较高的 pH 值，从 pH 7.5 到 10 酶活均在 150 U/mL 左右。

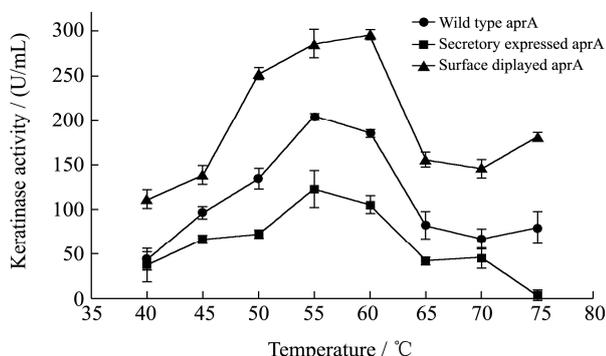


图 6 温度对天然型 *aprA*、分泌型 *aprA* 和表面展示型 *aprA* 三种基因表达的角蛋白酶活的影响

Fig.6 Effect of temperature on the keratinase activity of wild type *aprA*, secreted *aprA*, and surface-displayed *aprA* encoded protein

分别加入苯甲基磺酰氟 (PMSF)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、二甲基亚砜 (DMSO)、 β -巯基乙醇 (β -Me)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、吐温 20、Triton X-100、甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、乙腈和十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 等抑制剂，在 30 °C 下反应 30 min 来研究抑制剂对蛋白酶活性的影响，然后残余酶活的测定是在相同反应条件下进行。表 2 说明金属离子和酶抑制剂对酶活性的影响。 Fe^{2+} 的加入可以显著提高天然型角蛋白酶和重组型角蛋白酶活性，对表面展示的碱性蛋白酶活性可提高 329.08%。这表明， Fe^{2+} 可能对保持酶的活性构象起稳定作用。 Fe^{2+} 可能是角蛋

表 2 金属离子对角蛋白酶活性的影响

Fig.2 Feather degradation of *B. cereus* YSQ08 for 48 h at 37 °C with shaking in feather medium

金属离子	浓度/mM	天然型角蛋白酶残余酶活/%	分泌表达角蛋白酶残余酶活/%	表面展示角蛋白酶残余酶活/%
Fe^{3+}	5	114.90±13.72	40.01±2.39	58.13±3.83
Fe^{2+}	5	256.91±3.52	131.94±18.92	329.08±6.72
Ca^{2+}	5	92.91±2.44	105.79±19.21	93.05±13.29
Zn^{2+}	5	94.32±2.05	99.97±8.09	105.88±2.03
Mg^{2+}	5	98.50±2.41	62.46±9.41	61.01±2.07
Cu^{2+}	5	85.82±1.87	41.62±1.28	54.00±2.42
K^+	5	116.25±3.31	91.91±3.89	89.66±5.15
Na^+	5	102.03±2.42	99.81±3.63	98.86±6.94
Mn^{2+}	5	98.10±2.30	84.58±20.89	95.97±1.96
Co^{2+}	5	79.48±2.56	52.44±13.38	58.36±2.64
Ni^{2+}	5	17.38±2.77	3.09±3.71	0.00±0.00
Ba^{2+}	5	110.16±2.71	33.14±8.00	39.50±3.32
Hg^{2+}	5	13.11±5.96	22.26±6.29	1.97±2.77

白酶的活性中心离子，或者在酶与底物之间形成稳定的离子桥，促进降解反应进行^[10]。进一步的研究表明， Fe^{3+} 没有显著促进作用，对重组表达产生的角蛋白酶有抑制作用。 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Na^+ 和 Mn^{2+} 对角蛋白酶的活性几乎没有影响。 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 K^+ 、 Co^{2+} 和 Ba^{2+} 对重组表达产生的角蛋白酶活性抑制 40%~60%。此外， Ni^{2+} 和 Hg^{2+} 抑制天然型 *aprA* 表达的酶和重组型 *aprA* 表达的酶 90% 的酶活。如表 3 所示，丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 完全抑制三种基因表达的酶的活性。CTAB、乙腈、异丙醇、DMSO、EDTA 和 SDS 对重组表达的酶的活性提高超过 50%。一些有机溶剂如甲醇和乙醇，保留了天然型 *aprA* 和重组型 *aprA* 表达的酶的活性。据此推测，*aprA* 表达的酶可能属于丝氨酸蛋白酶。

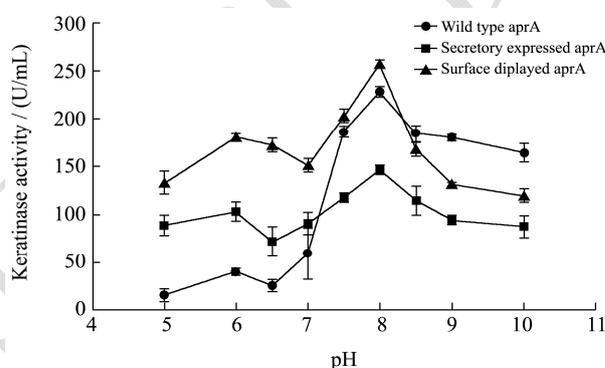


图 7 pH 对天然型 *aprA*、分泌型 *aprA* 和表面展示型 *aprA* 三种基因表达的角蛋白酶活的影响

Fig.7 Effect of pH on the keratinase activity of wild type *aprA*, secreted *aprA*, and surface-displayed *aprA* encoded protein

表3 有机溶剂对角质蛋白酶活性影响

Fig.3 Gel filtration of Sephadex G-75 of crude enzyme fraction precipitated with 80% ammonium sulfate

有机溶剂	浓度	天然型角质蛋白酶残余酶活/%	分泌表达角质蛋白酶残余酶活/%	表面展示角质蛋白酶残余酶活/%
DMSO	50% (V/V)	100.14±3.08	35.08±6.59	37.44±3.84
EDTA	5 mM	18.88±8.86	50.75±2.24	71.31±8.86
EDTA	10 mM	6.83±8.61	38.83±3.26	53.56±8.27
SDS	1% (m/V)	45.95±5.61	38.33±3.32	16.15±5.19
SDS	5% (m/V)	54.02±2.04	36.39±2.40	10.45±4.14
Tween-20	5% (V/V)	171.80±5.66	130.22±30.54	134.84±12.64
β -Me	5 mM	158.81±5.51	167.81±21.58	106.71±4.59
甲醇	50% (V/V)	51.72±6.18	72.61±5.35	62.27±5.18
乙醇	50% (V/V)	87.47±5.49	86.47±6.80	81.79±8.50
异丙醇	50% (V/V)	11.95±2.33	28.97±6.21	38.33±7.13
乙酸乙酯	50% (V/V)	18.67±10.17	111.17±2.16	137.35±6.65
乙腈	50% (V/V)	2.59±5.35	8.06±3.87	2.20±1.51
PMSF	5 mM	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
TritonX100	10% (V/V)	177.67±15.07	200.17±3.50	161.52±3.15
CTAB	25 mM	11.41±2.47	24.17±4.21	33.49±6.48

3 讨论

从蛇消化道内容物中分离出一株产角质蛋白酶菌株命名为蜡样芽孢杆菌 YSQ08, 与 Kim 等^[11]报道称大量羽毛降解菌株属于芽孢杆菌属相吻合。

通过锚定蛋白固定在毕赤酵母细胞表面的重组 *aprA* 基因, 表达的重组蛋白酶表现出更好的热稳定性, 在 65 °C 孵育 24 h 仍能保持 50% 以上的相对酶活, 表明利用表面展示重组技术将重组酶固定化有利于增强重组 *aprA* 表达的酶的稳定性, 可用于制作成全细胞催化剂^[12]。酵母细胞营养丰富, 角质蛋白酶表面展示在酵母上可应用于制作羽毛蛋白饲料添加剂, 或用于生产羽毛饲料或毛发饲料^[13]。

本研究发现蜡样芽孢杆菌 YSQ08 分泌的天然角质蛋白酶、重组分泌型 *aprA* 表达的角质蛋白酶和表面展示型 *aprA* 表达的角质蛋白酶的最适反应 pH 均为 8.0; 碱性反应环境适合多种生产应用, 如制药、美容和医疗等, 尤其是洗涤剂添加剂方面更为有利。

金属离子、蛋白酶抑制剂、螯合剂和表面活性剂等对角质蛋白酶影响程度各异。研究发现, 不论是 *aprA* 编码的天然蛋白酶还是重组蛋白酶, PMSF 都表现出强烈的抑制作用, 表明 *aprA* 编码的角质蛋白酶为丝氨酸蛋白酶。EDTA 对 *aprA* 编码的天然角质蛋白酶和重组角质蛋白酶均有较强的抑制效果, EDTA 浓度越高抑制效果越强, 说明 *aprA* 编码的角质蛋白酶中含有金属离子, 属于金属蛋白酶^[14]。有机溶剂及 SDS 对 *aprA* 编码的角质蛋白酶都有抑制作用, 表明蛋白变性剂 SDS 及

乙醇等均对 *aprA* 编码的角质蛋白酶的应用造成干扰。

4 结论

从蛇的消化道内容物中分离一株蜡样芽孢杆菌 YSQ08, 可以在 48 h 内分解鸡羽毛。将该分离株的角质蛋白基因 *aprA* 首次利用 α 凝集素锚定系统成功在毕赤酵母细胞上表达。表面展示 *aprA* 表达的角质蛋白酶表现出较高的活性和良好的热稳定性。固定化角质蛋白酶能显著提高并延长表面展示表达的角质蛋白酶的半衰期。因此, 表面展示型 *aprA* 表达的角质蛋白酶更适于工业化生产与应用。

参考文献

- [1] Onifade AA, Al-Sane NA, Al-Musallam AA, et al. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources [J]. *Bioresource Technology*, 1998, 66(1): 1-11
- [2] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(1): 21-33
- [3] Shinji M, Mikako T, Masatoshi G et al. Keratinolytic properties of PrPSc-degrading enzyme E77 [J]. *Memoirs of the Faculty of Agriculture Kagoshima University*, 2009, 59: 37-42
- [4] Rajput R, Gupta R. Thermostable keratinase from *Bacillus*

- pumilus* KS12: production, chitin crosslinking and degradation of Sup35NM aggregates [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133(4): 118-126
- [5] Harnpicharnchai P, Champreda V, Somlake W, et al. A thermotolerant beta-glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia Sp.*, with a possible use for biomass conversion to sugars [J]. *Protein Expression and Purification*, 2009, 67(2): 61-69
- [6] Hu H, Gao J, He J, et al. Codon optimization significantly improves the expression level of a keratinase gene in *Pichia Pastoris* [J]. *Plos One*, 2013, 8(3): e58393
- [7] Chandra, Pactus S. Enumeration of some microbial groups in thermophilic poultry waste digester and enrichment of a feather degrading culture [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1990, 67(1): 25-35
- [8] 陈莹,王宇新.角蛋白及其提取[J].材料导报,2002,16(12): 65-67
CHEN Ying, WANG Yu-xin. Keratin and its extraction [J]. *Materials Review*, 2002, 16(12): 65-67
- [9] Laemmli, U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [10] Radha S, Gunasekaran P. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains [J]. *Protein Expression and Purification*, 2009, 64(1): 24-31
- [11] Kim J M, Lim. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste [J]. *Process Biochemistry*, 2001, 37(3): 287-291
- [12] LIU Wen-shan, JIA Bin, ZHAO He-yun, et al. Preparation of a whole-cell biocatalyst of *Aspergillus niger* lipase and its practical properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(19): 10426-10430
- [13] Harnpicharnchai P, Somlake W, Tang K, et al. Cell-surface phytase on *Pichia pastoris* cell wall offers great potential as a feed supplement [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 302(1): 8-14
- [14] Tatineni R, Doddapaneni K, Potumarthi R C, et al. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces sp.* [J]. *Bioresource Technology*, 2008,99(6): 1596-1602