贝莱斯芽孢杆菌角蛋白酶的克隆表达、纯化及酶学性质

殷方荣[1,2]，翟李欣[1,2]，田乔鹏[1,2]，管政兵[1,2]，蔡宇杰[1,2]，廖祥儒[*1,2]
（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 教育部工业生物技术重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：为了获得更好的羽毛粉降解酶，作者从贝莱斯芽孢杆菌基因组中筛选到一个角蛋白酶基因（*baker1*），对其克隆并在大肠杆菌 BL21（DE3）中异源表达，最后对重组角蛋白酶（BaKer1）进行了分离纯化、表征及应用研究。结果表明，BaKer1 的最适反应 pH 为 9.5，最适反应温度为 55 ℃，在中温和碱性条件下具有较好的稳定性。1 mmol/L Ca^{2+}对 BaKer1 有显著促进作用，5 mmol/L Mn^{2+}对 BaKer1 有轻微抑制作用，其他金属离子对 BaKer1 影响不大。PMSF 对 BaKer1 的活性具有显著抑制作用，表明 BaKer1 是典型的丝氨酸蛋白酶。分别以羽毛粉、偶氮酪蛋白、酪蛋白为底物测定了 BaKer1 的动力学参数，K_m 值分别为 5.06、1.09、1.39 mmol/L，k_{cat}/K_m 值分别为 1 058.24、2 536.54、3 733.79 s·mmol/L。BaKer1 处理羽毛粉，能达到酸水解效果的 33.51%，说明它在羽毛粉降解过程中具有潜在的应用价值。

关键词：角蛋白酶；克隆表达；酶学性质；羽毛粉；贝莱斯芽孢杆菌
中图分类号：Q556　**文章编号：**1673-1689(2023)06-0057-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.06.008

Gene Cloning, Expression, Purification, and Enzymatic Properties Study of Keratinase from *Bacillus velezensis*

YIN Fangrong[1,2], *ZHAI Lixin*[1,2], *TIAN Qiaopeng*[1,2], *GUAN Zhengbing*[1,2], *CAI Yujie*[1,2], *LIAO Xiangru*[*1,2]
（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: In order to obtain a better feather meal degrading enzyme, a keratinase gene (*baker1*) was screened from the genome of *Bacillus velezensis* SYBC H47. Subsequently, *baker1* was cloned and its heterologous expression was achieved in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Finally, the recombinant keratinase (BaKer1) was isolated and purified, characterized, and was studied for its practical application. The results showed that the optimal pH and temperature for BaKer1 were 9.5 and 55 ℃, respectively, and it exhibited good stability under moderately-temperature and alkaline conditions. BaKer1 was significantly activated by 1 mmol/L Ca^{2+} ion, slightly inhibited by 5 mmol/L Mn^{2+} ion, and insignificantly affected by other metal ions. BaKer1 had significant inhibitory effect on the

收稿日期：2021-04-13
基金项目：江苏省产学研合作创新基金项目（BY2014023-28）；无锡市农业科技发展支持项目（CLE01N1310）；台州市科技攻关项目基金（1801gy24）
*** 通信作者：**廖祥儒（1964—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶工程与技术方面的研究。
E-mail：13771104596@163.com

activity of PMSF, indicating that BaKer1 is a typical serine protease. The kinetic parameters of BaKer1 were determined using feather meal, azocasein and casein as substrates. The K_m values were 5.06, 1.09, 1.39 mmol/L, respectively, and their k_{cat}/K_m values were 1 058.24, 2 536.54, 3 733.79 s·mmol/L, respectively. An acid hydrolysis efficiency of 33.51% could be achieved during the degradation of feather meal by BaKer1, indicating its potential application value in the degradation of feather meal.

Keywords: keratinase, cloning and expression, enzymatic property, feather meal, *Bacillus velezensis*

随着人口的增长,人们对食品和饲料行业中蛋白质的需求也在同步增长。据估计,到 2050 年,全球仅对动物源性的蛋白质的需求就可能翻一番[1]。而在 2019 年,仅鸡毛就产生了 470 多万 t[2]。羽毛被归为第三类动物副产品, 是低风险的动物材料,所以能作为新的可循环的蛋白质或氨基酸的来源[3-4]。然而, 羽毛中蛋白质资源的 90%左右都为角蛋白,角蛋白由多个氢键和疏水残基的相互作用[5-6]以及二硫键交联的肽链结构组成[7],使其难以被降解,所以即便羽毛有着丰富的蛋白质资源,每年仍有数百万公斤的羽毛会被丢弃到环境中。

丢弃的羽毛一般会被填埋或焚烧处理,但是填埋会侵占宝贵的土地资源,焚化羽毛也会产生有毒气体,从而导致环境的污染[7-8]。目前一般采用高温高压或化学处理羽毛,直接将羽毛转化为羽毛粉作为动物饲料,但是这种做法会破坏氨基酸,造成资源浪费,消化率和利用率很低,并且容易造成环境污染,成本也较为高昂[9-11]。因此,如何经济环保地提高羽毛粉的利用率,是一个非常有价值的研究方向。

使用酶和微生物从可再生资源中获得有价值的产品已成为一个快速发展的领域[12-14]。角蛋白很难被降解, 但是角蛋白酶(Keratinase,EC3.4.99.11)可以破坏角蛋白中的二硫键,降解角蛋白,这也是它区别于其他蛋白酶的特质[15-16]。利用角蛋白酶处理羽毛粉,提高羽毛粉利用率也是羽毛资源利用的主要途径之一。相比于其他蛋白酶,角蛋白酶具有更广的利用范围,所以其应用价值较高[17-18]。

从自然界中直接分离筛选菌种是开发新酶的途径,然而用野生菌表达角蛋白酶,其纯化分离困难,不利于角蛋白酶的应用。现在微生物基因组信息资源则提供了一种更快捷的方式——基因挖掘[20]。利用基因工程克隆表达角蛋白酶有利于酶的分离纯化,也便于后续对酶的酶活性质及应用的探究。目前用分子生物学手段挖掘潜在的角蛋白酶基因进行表达的研究还不多,因此,筛选降解羽毛粉水平高的菌种,对其角蛋白酶基因进行挖掘并进行酶学性质的探究,可以为表达优良的角蛋白酶提供尽可能多的基因材料,也能为羽毛粉降解提供新的有价值的角蛋白酶。

芽孢杆菌是角蛋白酶的主要来源[19],在芽孢杆菌中发掘新型角蛋白酶对食品饲料行业有潜在的应用价值。近年来,国内外已经报道了多种微生物来源的角蛋白酶,在这些微生物中,芽孢杆菌仍然是主要的产酶微生物,说明在芽孢杆菌中挖掘潜在的角蛋白酶基因是可行的[21-26]。

先前已有研究人员通过基因挖掘从 *Bacillus velezensis* SYBC H47 中克隆表达了优良的磷酸酯酶、转氨酶、羧酸酯酶等基因,显示出菌株 *B. velezensis* SYBC H47 有着极大的基因挖掘价值和工业应用价值[27-30]。根据角蛋白酶氨基酸序列同源性分析,其编码基因与枯草杆菌蛋白酶的编码基因有着较高的序列同源性[31]。作者通过对 *B. velezensis* SYBC H47 的全基因组筛选,获得新的角蛋白酶基因(*baker1*),对其进行了生物信息学分析、克隆表达、纯化和酶学性质研究, 探究了其在羽毛粉降解中的应用,并通过高效液相色谱仪进行验证。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株、质粒和培养条件

E. coli DH5a 及 BL21 (DE3)\ 质粒 pCold Ⅱ:均购自 Takara(大连)。在重组菌株的活化和构建过程中,菌株均在 Luria-Bertani 肉汤培养基(10 g/L 胰蛋白胨,5 g/L 酵母提取物,10 g/LNaCl)中培养,必要时将氨苄青霉素(100 mg/mL)加入该培养基中。

1.2 生化材料和分子生物学工具

氨苄青霉素、偶氮酪蛋白和酪蛋白：购自上海Sigma-Aldrich；分子生物学工具(DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、纯化试剂盒、Bradford 蛋白质测定试剂盒、DNA 及标准蛋白质 Marker、DNA 聚合酶、限制性内切核酸酶、T4 DNA 连接酶和 IPTG 等)：购自 Takara；其他化学药品：均为国产分析纯。

1.3 角蛋白酶活性的检测

参考 Yang 等人的方法检测角蛋白酶的活性[38]。

1.4 生物信息学分析

根据 *B. velezensis* SYBC H47 的全基因组信息注释(GenBank No：CP017747)，共有 23 条基因被推定为蛋白酶基因。对其开放阅读框、信号肽预测、保守结构域等分析参照 Huang 等人的方法[34]。

1.5 PCR 扩增和重组菌株的构建

B. velezensis SYBC H47 的基因组 DNA 通过 DNA 提取试剂盒获得。根据之前筛选获得的基因序列，使用 Primer Premier 5.0 设计引物，并按照预设方法进行 PCR 扩增。核酸凝胶检测并纯化 PCR 产物，之后用设定的限制性核酸内切酶消化，并与相同的内切酶消化后的质粒 pCold Ⅱ进行连接。将连接的产物转化到 *E. coli* DH5a 中，并通过质粒 DNA 测序(无锡天霖)来验证。测序成功后，将正确的重组质粒提取出来，再转化到 *E. coli* BL21(DE3)中进行蛋白质的诱导表达[32]。

1.6 重组角蛋白酶的富集和纯化

低温诱导表达后，离心收获重组菌株，经过超声波破碎并离心，使得角蛋白酶释放到上清液中。由于重组角蛋白酶还有组氨酸标签，可用镍柱亲和层析来纯化重组角蛋白酶[33]。将得到的粗酶液用 0.22 μm 纤维素滤膜过滤，采用 AKTA avant 蛋白纯化系统进行纯化。最后通过 5 mL HitrKeTM 脱盐柱(上海 GE Healthcare)将纯化的酶脱盐，并使用超滤管(10 000 截留值)浓缩。

通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析纯化后的蛋白质相对分子质量[34]。Bradford 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质质量浓度，标准蛋白质为牛血清白蛋白(BSA)。

1.7 纯化角蛋白酶的生化特性

1.7.1 最佳 pH 和 pH 稳定性的确定 使用偶氮酪蛋白作为底物，将等量酶液加入 5.0~13.0 的不同 pH 缓冲液中测定最佳 pH，55 ℃下反应 20 min。另外，在 55 ℃下将酶在不同 pH 的缓冲液中温育 1 h，之后测酶的残余活性，用来研究 pH 的稳定性。缓冲液的浓度为 50 mmol/L，分别为 pH 5.0~7.0 的 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4、pH 7.0~9.0 的 Tris-HCl、pH 9.0~12.0 的甘氨酸-NaOH 以及 pH 12.0~13.0 的 KCl-NaOH。

1.7.2 最佳温度和热稳定性的确定 在保证最佳 pH 时，以偶氮酪蛋白作为底物，在 10~85 ℃的设定梯度测定最佳温度。另外，为了研究热稳定性，在最佳 pH 条件下，将酶在 10~80 ℃设定梯度，分别温育 1 h 后测酶的残余活性。

1.7.3 金属离子对酶活性的影响 用氯化物盐测定金属离子对酶活性的影响，包括 NaCl、KCl、$CaCl_2$、$MgCl_2$、$FeCl_2$、$ZnCl_2$、$NiCl_2$、$MnCl_2$、$CoCl_2$ 和 $CuCl_2$，金属离子浓度设 2 种，分别为 1 mmol/L 和 5 mmol/L。将含有酶的缓冲液(最适 pH)与不同浓度的不同金属离子混合，在最适温度下反应 1 h 后，以偶氮酪蛋白为底物测酶残余活性，不含金属离子的酶活性为 100%。

1.7.4 抑制剂、表面活性剂和有机溶剂对酶活性的影响 将含有酶的缓冲液(最适 pH)与 5 mmol/L 的 PMSF、EDTA、DTT 和尿素混合，体积分数 0.5%的 DMSO 和吐温 80，甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、乙腈、二氯甲烷、正己烷和乙酸乙酯等有机溶剂配成体积分数 5%的溶液再与反应体系混合。以偶氮酪蛋白为底物测酶残余活性，不含添加剂的酶活性为100%。

1.7.5 底物特异性和动力学性质 用偶氮酪蛋白和天然蛋白质为底物测定底物特异性，天然蛋白质包括酪蛋白、羽毛粉、红虫粉、血红蛋白、丝肽和明胶。采用 1.4 中所述方法测定酶活性。用偶氮酪蛋白、酪蛋白和羽毛粉在最佳条件下研究动力学参数。通过使用 Origin Pro 9.0 来计算动力学常数 K_m 和 V_{max} 值，并且通过计算公式 $K_{cat}=V_{max}/[E]$ 获得 k_{cat}(t 为 60 s)。

1.8 蛋白酶水解羽毛粉分析

为了检测羽毛粉的降解效果，将 5 mL 酶液分别与 0.2 g 羽毛粉混合，在最佳条件下反应 6 h。取 2 mL 反应产物，加入相同体积的 TCA（体积分数 10%）终止反应。室温下静置 30 min，8 000 g 离心 10 min 得上清液，过 0.22 μm 的滤膜。通过高效液相色谱仪测定水解产物中的各种氨基酸含量。同时为了对比角蛋白酶降解效果，对羽毛粉进行酸水解。具体方法为：配置体积分数 35%的硫酸在 100 ℃

水解羽毛粉 6 h,用 $BaCO_3$ 中和除酸,静置,取适量上清液加入等量 TCA 终止反应,过 0.22 μm 的滤膜,用高效液相色谱仪测定产物中的各种氨基酸含量。羽毛粉的降解效果用酪氨酸的释放量来表示。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

根据 *B. velezensis* SYBC H47 的全基因组信息注释,共有 23 条基因被推定为蛋白酶基因。

为了筛选潜在的角蛋白酶基因,作者选择了 3 种典型的角蛋白酶氨基酸序列作为模板,分别来自地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和短小芽孢杆菌。根据它们的保守结构域,分析出它们都属于肽酶 S8A 超家族并且均属于丝氨酸蛋白酶家族中的枯草杆菌蛋白酶类蛋白酶,这与大多数属于丝氨酸蛋白酶类的角蛋白酶是一致的。因此,将属于肽酶 S8A 超家族的基因 1、2、3、4 推测为编码角蛋白酶的基因,分别命名为 *baker1*、*baker2*、*baker3*、*baker4*。对它们的功能注释以及理化性质分析见表 1。同时,预测了4 种角蛋白酶的氨基酸数目和信号肽,*baker1* 和 *baker2* 具有信号肽,但 *baker3* 和 *baker4* 没有信号肽。

表 1 4 种推测的角蛋白酶的功能注释和理化性质

Table 1 Function annotations and physicochemical properties of the four-putative keratinase

基因名称	长度/bp	蛋白质名称	同源蛋白簇(COD)[a]	保守结构域数据库(CDD)[b]	氨基酸/个	信号肽裂解位点
baker1	1 149	BaKer1	Keratinase	Peptidases_S8_Subtilisin_subset, Peptidase S8 family domain in Subtilisin proteins. S8 family peptidase	383	29/30
baker2	1 827	BaKer2	Subtilisin-like serine protease	Peptidases_S8_Subtilisin_subset, Peptidase S8 family domain in Subtilisin proteins. S8 family peptidase	609	52/53
baker3	960	BaKer3	Subtilisin-like serine protease	Peptidases_S8_Subtilisin_subset, Peptidase S8 family domain in Subtilisin proteins. S8 family peptidase	320	–
baker4	1 329	BaKer4	Subtilisin-like serine protease	Peptidases_S8_Subtilisin_subset, Peptidase S8 family domain in Subtilisin proteins. S8 family peptidase	443	–

a. 同源蛋白簇:预测蛋白质的功能特征;b. 保守结构域数据库:揭示蛋白质的保守结构域。

将 BaKer1 氨基酸序列在 NCBI 网站中进行 BLAST 分析,显示 BaKer1 (GenBank accession number:MZ147000)与属于 S8 家族肽酶的蛋白酶的同源性最高,是一种丝氨酸蛋白酶。发现其与来源于 *Bacillus subtilis* S1-4 基因组中编码角蛋白酶 BsKER71 的氨基酸序列 (GenBank 登录号:MN256128)有 85.6%的相似性,说明该基因编码的氨基酸序列与已知的角蛋白酶序列有着较高的同源性,是一种值得探究的角蛋白酶基因,对此基因的挖掘将会丰富角蛋白酶基因库。对 BaKer1 与部分相似性高于 60%的来源于芽孢杆菌的角蛋白酶进行聚类分析,可发现 BaKer1 与来源于枯草芽孢杆菌的角蛋白酶遗传距离最近,见图 1。

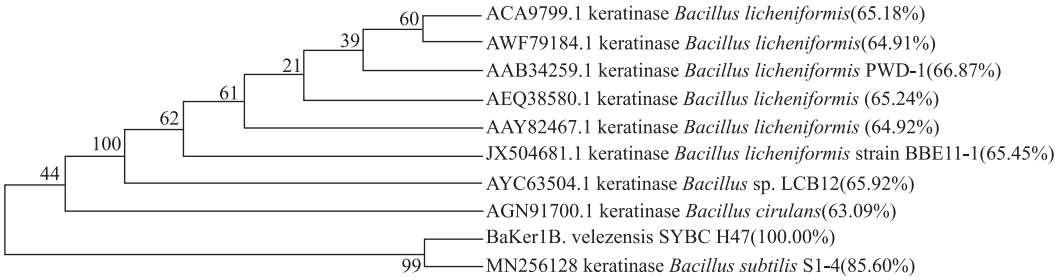


图 1 BaKer1 与部分来源于芽孢杆菌的角蛋白酶进行聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of BaKer1 with some reported keratinases from *Bacillus*

2.2 角蛋白酶的表达与纯化

将正确的重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中，得到重组表达菌株。只有含有 *baker1* 基因的重组菌株显示出角蛋白酶活性，能有效降解羽毛粉。因此，后续研究集中在这个酶上，命名为 BaKer1。值得注意的是，我们在诱导目的蛋白质表达时加入分子伴侣 pGro7 后，目的蛋白质才成功进行了表达，推测分子伴侣能够帮助重组酶进行成功的折叠与组装，使其能够发挥活性。在大肠杆菌诱导角蛋白酶中尝试加入分子伴侣是先前没有报道过的，此前研究以大肠杆菌为表达宿主时，有的酶可以成功表达，多数酶易形成包涵体，需复杂的变性才能进行活性研究。推测形成包涵体的重组酶在表达时不能成功折叠与组装，若加入分子伴侣，很可能提供帮助。重组的细胞内蛋白酶活性在 15 ℃和 200 r/min 下培养 24 h 可以达到最高。

BaKer1 的纯化过程见表 2。通过镍柱亲和层析纯化 Baker1，纯化倍数为 5.91 倍，回收率为12.80%。基因工程菌发酵液粗酶活为 34.59±0.23 U/mL，对于角蛋白酶工程菌而言并不是很高。与以大肠杆菌作为表达宿主的其他角蛋白酶重组菌的粗酶液相比差别不大，如来源于 *Bacillus licheniformis* BBE11-1 的角蛋白酶在 *E. coli* BL21(DE3)中克隆表达后，其发酵液粗酶活为 47.8 U/mL[39]。但是以大肠杆菌为宿主进行角蛋白酶的表达，其发酵液粗酶活普遍低于以枯草芽孢杆菌或毕赤酵母为宿主进行表达的重组菌的粗酶活，推测这与角蛋白酶作用底物广泛有关。重组菌产生的角蛋白酶可能会对重组菌产生一定的毒害作用，角蛋白酶表达量的增加伴随着重组菌的生长减缓。因此，不同的角蛋白酶对于表达载体及宿主菌的选择也不同，可根据前人研究进行选择并尝试不同表达宿主及载体。

表 2 BaKer1 的分离纯化

Table 2 Isolation and purifications of BaKer1

纯化步骤	总酶活/U	总蛋白质质量/mg	比酶活/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶	5 189.00±133.83	16.02±0.08	323.91±8.35	100.00	1.00
亲和层析	743.49±24.42	0.24±0.01	3 097.88±101.75	14.32	15.11
脱盐	739.70±6.71	0.23±0.01	3 216.09±29.17	14.26	15.38

SDS-PAGE 显示均匀的蛋白质条带，相对分子质量约为 28 000，与推测相对分子质量大小不一致，见图2。这是由于基因序列中含有信号肽和前肽，并且在前肽会自动加工和降解，之后才形成成熟的角蛋白酶。

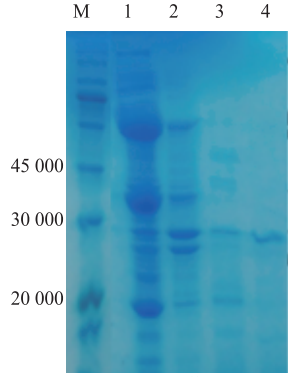
2.3 序列比对

选取部分芽孢杆菌角蛋白酶序列与 BaKer1 序列比对发现，属于丝氨酸蛋白酶的角蛋白酶在多个区域高度保守，保守区域中分布着三联催化体 Asp-His-Ser，这对于角蛋白酶发挥活性十分重要。通过比对发现 BaKer1 保守基序与 S8A 亚家族一致，见图 3。

2.4 pH 和温度对角蛋白酶活性和稳定性的影响

Baker1 的最适 pH 和稳定性见图 4。BaKer1 反应最适 pH 为 9.5，且该酶在 pH 6.5~10.5 依然能够保留 60%以上的酶活，这与之前有过的大部分文献报道的角蛋白酶的最适 pH 是碱性保持一致。然而，当 pH>10.5 或者 pH<6.5 时，酶活都会大幅度降低。

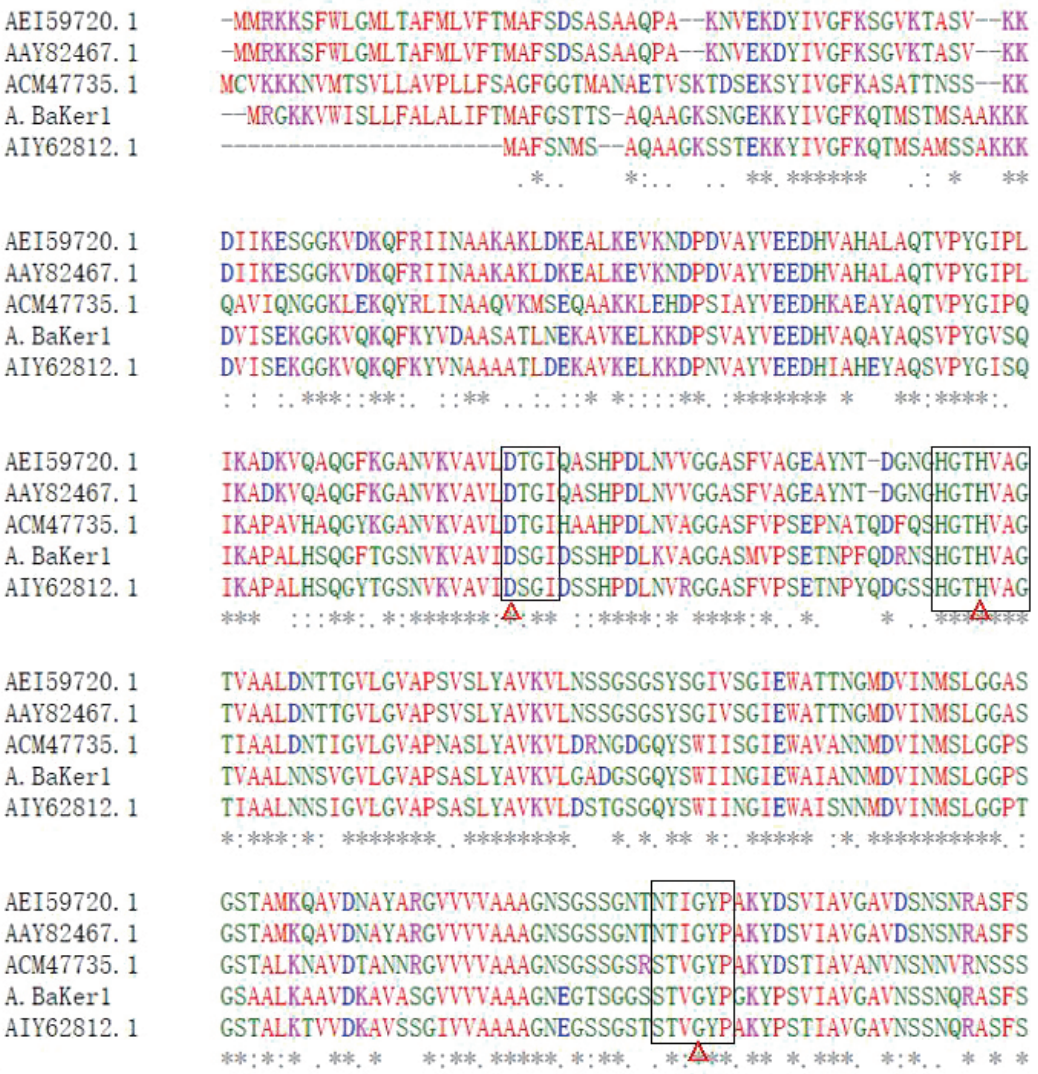
BaKer1 的 pH 稳定性较好，能在一定的 pH 范围内保留着较高的活性。实际上，对于在碱性环境中的各种应用，角蛋白酶都表现出极好的应用潜力，目前，许多研究人员也都在开发在碱性条件下稳定性较好的角蛋白酶。



M：标准蛋白 Marker；1：空载菌株（*E.coli* BL21-pCold II-pGro7)诱导后破碎上清液；2：含目的基因的重组菌株不加诱导剂的破碎上清液；3：含目的基因的重组菌株诱导表达后破碎上清液；4：纯化后的目的蛋白质，目的蛋白质相对分子质量大小为 285 000。

图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

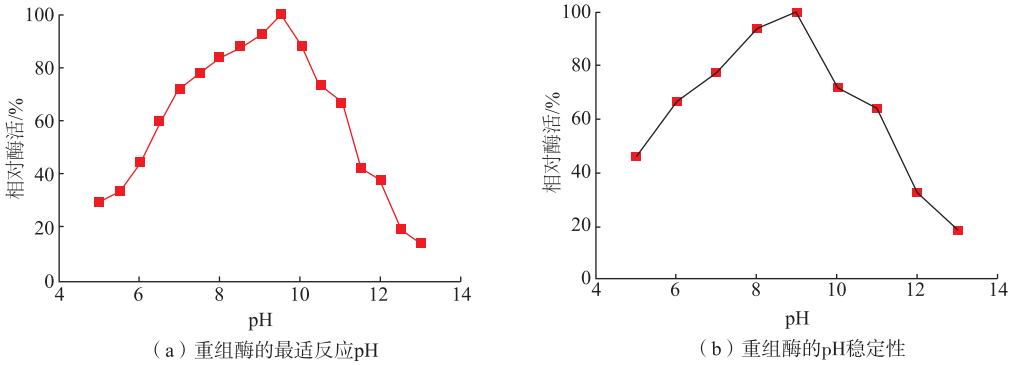
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed products



S8A 亚家族蛋白酶的保守基序用黑色大方框标出;“△”表示催化位点。

图 3　*baker1* 多序列比对分析

Fig. 3　Multiple sequence alignment analysis of *baker1*

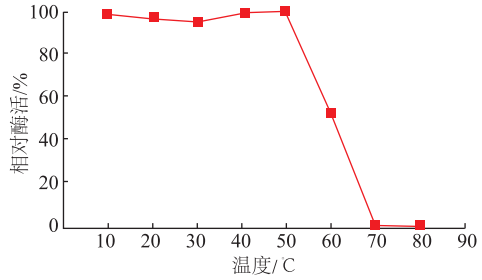


（a）重组酶的最适反应pH　　（b）重组酶的pH稳定性

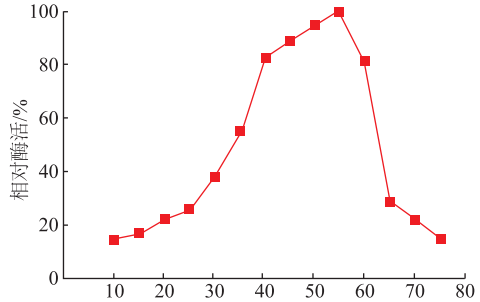
图 4　BaKer1 最适反应 pH 及 pH 稳定性

Fig. 4　Optimal pH and pH stability of BaKer1

BaKer1 的最适温度和热稳定性见图 5。BaKer1 最适反应温度为 55 ℃；温度在 10~50 ℃时，BaKer1 可以保留 80%以上的酶活；在高于 65 ℃的高温环境下时，酶活极低甚至直接失活。推测是由于高温致使角蛋白酶变性，从而不能发挥作用。以上结果表明，BaKer1 为中温蛋白酶。



（a）重组酶的最适反应温度



（b）重组酶的热稳定性

图 5　BaKer1 的最适温度和热稳定性

Fig. 5　Optimal temperatures and thermal stability of BaKer1

2.5　不同添加剂对角蛋白酶活性的影响

以标准反应组的酶活作为对照组，金属离子对 BaKer1 活性的影响见表 3。Ca^{2+}对 BaKer1 的酶活有显著促进作用，能将酶活增加到原来的 1.45 倍，然而之后随着 Ca^{2+}浓度的增高，Ca^{2+}对 BaKer1 的促进作用反而减弱。由于 BaKer1 属于丝氨酸蛋白酶，这一类蛋白酶能够被 Ca^{2+}显著激活[31]，这与实验结果一致。原因可能是由于 Ca^{2+}的存在使酶分子有稳定的活性构象，酶活性受到影响[35]。而 Mg^{2+}也表现出一定的激活效果，并且随着浓度的升高，激活作用变强。推测 Mg^{2+}和 Ca^{2+}的核外电子排列有相似性，从而 Mg^{2+}与弱的 Ca^{2+}位点可以结合。有关 Mg^{2+}的激活作用原理还需要对角蛋白酶的结构做进一步研究。

另外，1 mmol/L 的 Zn^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}都对 BaKer1 有轻微促进作用，除了 Mn^{2+}在 5 mmol/L 时有较明显抑制作用以外，其他离子随着浓度的升高其促进作用更明显；Na^{+}、K^{+}、NH^{+}对 BaKer1 影响不大。

表 3　金属离子对 BaKer1 活性的影响

Table 3　Effect of metal ions on the activity of BaKer1

金属离子/抑制剂	BaKer1 相对酶活/%	
	离子浓度 1 mmol/L	离子浓度 5 mmol/L
对照	100.00±2.09	100.00±2.09
Na^{+}	103.59±2.78	108.45±2.37
K^{+}	107.39±3.56	113.29±3.34
Mg^{2+}	119.71±4.44	131.34±4.24
Mn^{2+}	108.33±2.67	84.82±2.35
Cu^{2+}	107.17±2.99	111.17±2.86
Zn^{2+}	105.51±2.57	109.13±2.89
Co^{2+}	112.87±2.14	121.25±3.23
Ca^{2+}	145.10±2.23	122.56±2.19
Fe^{2+}	102.51±2.87	120.24±2.55
NH_4^{+}	96.60±3.46	101.58±2.63

另外，EDTA 显著抑制 BaKer1 的酶活性，表明金属离子对酶活性的重要性，也解释了 Ca^{2+}对 BaKer1 酶活的影响。PMSF 也有非常强烈的抑制作用，而 PMSF 与丝氨酸蛋白酶活性位点的丝氨酸残基能够共价结合[36]，说明 BaKer1 是典型的丝氨酸蛋白酶。DTT 对 BaKer1 抑制作用不强，表明结构中不存在二硫键。除了正己烷以外，其他有机溶剂对 BaKer1 均有抑制作用。表面活性剂对其略有促进效果，说明 BaKer1 在洗涤剂行业有一定的应用价值，见表 4。

2.6　Baker1 的底物特异性和动力学性质

BaKer1 的底物特异性见表 5。BaKer1 对羽毛粉的水解活力很高，说明该酶在羽毛粉再加工利用方面有着极大的潜力。对于大多数天然蛋白质底物，BaKer1 对它们的水解活性相似，没有特别的差异，这也符合角蛋白酶底物广泛的特性，说明 BaKer1 在许多天然蛋白质的水解中也能发挥一定的作用。另外，BaKer1 不能水解明胶，而明胶的主要来源是胶原蛋白，说明在动物的脱毛处理中 BaKer1 对皮革中的胶原蛋白不会造成损失，有着潜在的应用价值。

进一步研究了 BaKer1 的催化能力，根据所测的底物浓度以及反应速率的数据，计算得到了 K_m 和 V_{max} 值，由此也计算出 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m。其中，K_m 值表示了 BaKer1 与底物的亲和力关系，而 k_{cat}/K_m 可以说明 BaKer1 对底物的整体催化能力。如表 6 所示，

表 4　抑制剂、表面活性剂和有机溶剂对重组酶 BaKer1 活性的影响

Table 4　Effect of inhibitors, surfactants and organic solvents on the activity of recombinant BaKer1

抑制剂/表面活性剂/有机溶剂(浓度为 1 mmol/L)	BaKer1 相对酶活/%
对照	100.00±2.09
EDTA	65.59±2.78
EGTA	20.39±3.56
PMSF	13.71±4.44
DTT	70.33±2.67
尿素	103.17±2.99
吐温 80	108.76±2.85
二甲基亚砜	106.87±2.14
甲醇	77.10±2.23
乙醇	73.51±2.87
异丙醇	85.60±3.46
乙腈	74.84±2.43
二氯甲烷	54.56±2.18
乙酸乙酯	65.13±2.35
正己烷	106.51±2.57
丙酮	90.34±2.54

表 5　BaKer1 的底物特异性

Table 5　Substrate specificity of BaKer1

底物	酶活/(U/mg)
羽毛粉	10 790.69±127.70
酪蛋白	8 973.23±104.13
偶氮酪蛋白	3 597.78±15.62
赤虫粉	4 172.26±49.77
脱脂奶粉	3 685.04±55.34
丝肽	4 961.35±57.66
血红蛋白	4 591.07±52.18
明胶	0.00±30.77

BaKer1 分别以羽毛粉、偶氮酪蛋白、酪蛋白为底物时，其动力学参数如下：K_m 值分别是 5.06、1.09、1.39 mmol/L；k_{cat}/K_m 值分别为 1 058.24、2 536.54、3 733.79 s·mmol/L。

2.7　羽毛粉降解产物分析

羽毛粉的降解部分产物见表 7。羽毛粉中游离氨基酸质量浓度较低，大部分氨基酸质量浓度低于 40 μg/mL。经 BaKer1 处理后释放大量氨基酸，其中半胱氨酸释放量最大，其余几种氨基酸的释放量也较高，说明 BaKer1 对提高羽毛粉的营养利用价值有着良好的应用前景。在相同条件下，BaKer1 处理羽毛粉可达到酸水解效果的 33.51%。虽然效果不如酸水解，但是，酶更加绿色环保，并且反应条件温和，成本廉价，对后期产物的再利用也更加安全，说明酶处理法对于羽毛粉的二次绿色加工有着比较高的应用价值[37]。

表 6　BaKer1 的动力学参数

Table 6　Kinetic parameters of BaKer1

底物	K_m/(mmol/L)	V_{max}/(μmol/(min·mg))	k_{cat}/s^{-1}	(k_{cat}/K_m)/(s·mmol/L)
羽毛粉	5.16±1.09	9 351.32±186.6	5 460.53	1 058.24
偶氮酪蛋白	1.09±0.11	3 859.71±68.66	2 764.83	2 536.54
酪蛋白	1.39±0.17	8 714.82±92.48	5 189.97	3 733.79

表 7　经过发酵和未经过发酵的羽毛粉(FM)中几种氨基酸的质量分数

Table 7　Mass fraction of several amino acids in fermented and unfermented feather powder (FM)　mg/g

氨基酸种类	用水处理 6 h 的 FM(对照)	用体积分数 35%硫酸处理 6 h 的 FM	用 BaKer1 处理 6 h 的 FM
甲硫氨酸	0.44	8.55	2.87
酪氨酸	4.33	29.66	9.94
赖氨酸	1.97	37.28	12.90
组氨酸	0.34	25.09	8.70
半胱氨酸	5.10	42.18	14.98

3 结 语

对 *B.velezensis* SYBC H47 基因组中的所有蛋白酶基因进行生物信息学分析和分类,为进一步研究蛋白酶的功能提供了理论依据。筛选得到 1 个角蛋白酶基因,该基因编码的氨基酸序列含有丝氨酸催化三联体 Ser-Asp-His,通过分析其属于丝氨酸蛋白酶 S8A 家族。将该基因与 pCold II 质粒连接,并加入分子伴侣 pGro7,成功构建重组表达载体并导入宿主细胞得到表达。该酶的最适反应 pH 为 9.5,最适反应温度为 55 ℃,在中温及碱性条件下稳定性和耐受性较好。Ca^{2+}对 BaKer1 有显著促进作用。EDTA 显著抑制 BaKer1 的酶活性,表明酶活性需要金属离子。PMSF 显著抑制 BaKer1 的酶活性,表明它是典型的丝氨酸蛋白酶。DTT 对 BaKer1 抑制作用不强,这表明它们的结构中不存在二硫键。除正己烷以外,其他有机溶剂对 BaKer1 有明显抑制作用。分别以羽毛粉、偶氮酪蛋白、酪蛋白为底物研究动力学参数,BaKer1 的 K_m 值分别是 5.06、1.09、1.39 mmol/L,k_{cat}/K_m 值分别为 1 058.24、2 536.54、3 733.79 s·mmol/L。BaKer1 处理羽毛粉,可释放大量氨基酸,其中半胱氨酸释放量最大。BaKer1 处理羽毛粉效果达到酸水解的 33.51%。虽然效果不如酸水解,但更加绿色环保,并且反应条件温和,成本廉价,后期产物安全,有利于产物的再利用,说明 BaKer1 对于羽毛粉的二次绿色加工提高营养价值有良好的应用前景。

参考文献:

[1] KSHETRI P, ROY S S, CHANU S B, et al. Valorization of chicken feather waste into bioactive keratin hydrolysate by a newly purified keratinase from *Bacillus* sp. RCM-SSR-102[J]. **Journal of Environmental Management**, 2020, 273: 111195.

[2] CAO Z J, SONG X X, ZHU Q, et al. Dynamic action of keratinase on wool fibre tracked by FITC-labelled enzyme [J]. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2021, 39(3): 214-220.

[3] QIU J, WILKENS C, BARRETT K, et al. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: classification, structure, function[J]. **Biotechnology Advances**, 2020, 44: 107607.

[4] GOPINATH S C B, ANBU P, LAKSHMIPRIYA T, et al. Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production[J]. **BioMed Research International**, 2015, 35(9):79-87.

[5] LANGE L, HUANG Y, BUSK P K. Microbial decomposition of keratin in nature—a new hypothesis of industrial relevance[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016, 100(5): 2083-2096.

[6] LI Z W, LIANG S, KE Y, et al. The feather degradation mechanisms of a new *Streptomyces* sp. isolate SCUT-3 [J]. **Communications Biology**, 2020, 3(1): 191.

[7] MINI K D, MATHEW J. Purification of keratinase from *Aspergillusflavus* S125[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, 2016, 6(2):1121-1129.

[8] SHARMA R, DEVI S. Versatility and commercial status of microbial keratinases: a review[J]. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, 2018, 17(1): 19-45.

[9] SHARMA S, GUPTA A. Sustainable management of keratin waste biomass: applications and future perspectives[J]. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2016, 59:e16150684.

[10] KORNILLOWICZ-KOWALSKA T, BOHACZ J. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects[J]. **Waste Management**, 2011, 31(8): 1689-1701.

[11] NNOLIM N E, OKOH A I, NWODO U U. Elucidation of coding gene and characterization of alkaline metallo-keratinase produced by acidophilic *Bacillus* sp. Okoh-K1 grown on chicken feather[J]. **Environmental Technology & Innovation**, 2021, 21: 101285.

[12] 陈盈霖, 李佳凝, 刘洋, 等. 羽毛粉加工及应用的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017 (10): 78-82.

[13] 龙宏燕, 梁文英, 陈风蔚, 等. 羊毛角蛋白降解菌的筛选鉴定及液体发酵条件优化[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(4): 200-204.

[14] NNOLIM N E, OKOH A I, NWODO U U. Elucidation of coding gene and characterization of alkaline metallo-keratinase produced by acidophilic *Bacillus* sp. Okoh-K1 grown on chicken feather[J]. **Environmental Technology & Innovation**, 2021, 21: 101285.

[15] 王秋影, 廖美德. 角蛋白酶的应用研究进展[J]. 饲料广角, 2013(10):30-32.

[16] KAEWSALUD T, YAKUL K, JANTANASAKULWONG K, et al. Biochemical characterization and application of thermostable-alkaline keratinase from *Bacillus halodurans* SW-X to valorize chicken feather wastes[J]. **Waste and Biomass Valorization**, 2021, 12: 3951-3964.

[17] KEE P E, LAN J C W, YIM H S, et al. Efficiency of polymer/salt aqueous two-phase electrophoresis system for recovery of extracellular *Kytococcus sedentarius* TWHKC01 keratinase[J]. **Process Biochemistry**, 2021, 100: 199-206.

[18] 张荣, 凌晓宁, 李昆太. 微生物降解角蛋白机制及角蛋白酶应用研究进展[J]. 生物灾害科学, 2020, 43(4): 331-337.

[19] CONTESINI F J, MELO R R, SATO H H. An overview of *Bacillus proteases*: from production to application[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2018, 38(3): 321-334.

[20] 齐志国, 张铁鹰, 董杰丽, 等. 角蛋白降解菌分离、鉴定及其降解机制研究[J]. 饲料工业, 2012, 33(17): 19-24

[21] 冒鑫哲, 彭政, 周冠宇, 等. 枯草芽孢杆菌高产角蛋白酶发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(17): 138-144.

[23] 蒋少龙, 郭依依, 蔡俊. 多序列比对在克隆表达一株未知芽孢杆菌角蛋白酶基因中的应用[J].食品工业科技, 2019,40(24):74-81.

[24] WANG T, LIANG C, XIAO S, et al. A thermostable aluminum-tolerant protease produced by feather-degrading *Bacillus thuringiensis* isolated from tea plantation[J]. **Protein and Peptide Letters**, 2021, 28(5): 563-572.

[25] JAGADEESAN Y, MEENAKSHISUNDARAM S, SARAVANAN V, et al. Sustainable production, biochemical and molecular characterization of thermo-and-solvent stable alkaline serine keratinase from novel *Bacillus pumilus* AR57 for promising poultry solid waste management[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 163: 135-146.

[26] SUN Z, LI X, LIU K, et al. Optimization for production of a plant growth promoting agent from the degradation of chicken feather using keratinase producing novel isolate *Bacillus pumilus* JYL[J]. **Waste and Biomass Valorization**, 2021, 12: 1943-1954.

[27] CHAUDHRY G R, MATEEN A, KASKAR B, et al. Purification and biochemical characterization of the carbamate hydrolase from *Pseudomonas* sp. 50432[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2002, 36(1): 63-70.

[28] SHAFER T J, MEYER D A, CROFTON K M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs[J]. **Environmental Health Perspectives**, 2005, 113(2): 123-136.

[29] 谢振荣. 脂环酸芽孢杆菌 D1 全基因组测序分析及其羧酸酯酶的研究[D]. 昆明: 云南师范大学, 2014.

[30] ZHAI Y, LI K, SONG J, et al. Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Ochrobactrum anthropi* YZ-1[J]. **Journal of Hazardous Materials**, 2012, 221: 206-212.

[31] GUPTA R, RAMNANI P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, 70: 21-33.

[32] 王琦,崔阳,刘进宝,等. 壳聚糖酶的基因克隆表达及酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(1):147-155.

[33] 胡兴,张涛,沐万孟,等. *D*- 甘露糖异构酶的克隆表达及酶法制备 *D*- 甘露糖[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(4):58-63.

[34] HUANG L, MENG D, TIAN Q, et al. Characterization of a novel carboxylesterase from *Bacillus velezensis* SYBC H47 and its application in degradation of phthalate esters[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2020, 129(5): 588-594.

[35] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. **Nature**, 1970, 227 (5259): 680-685.

[36] SMITH C A, TOOGOOD H S, BAKER H M, et al. Calcium-mediated thermostability in the subtilisin superfamily: the crystal structure of *Bacillus* Ak. 1 protease at 1.8 Å resolution[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1999, 294(4): 1027-1040.

[37] JAMES G T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers[J]. **Analytical Biochemistry**, 1978, 86 (2): 574-579.

[38]YANG S, ZHAI L, HUANG L, et al. Mining of alkaline proteases from *Bacillus altitudinis* W3 for desensitization of milk proteins: their heterologous expression, purification, and characterization[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 153: 1220-1230.

[39] 刘柏宏,张娟,方真,等. 来源于地衣芽孢杆菌的角蛋白酶在大肠杆菌中的表达、理化性质及其发酵优化[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(6): 997-1002.