

角蛋白酶生产菌株的筛选鉴定及酶学性质研究

徐志龙^{1,2}, 尹雅洁¹, 夏 险¹, 梁运祥², 赵述淼², 胡远亮^{1,2*}

(1. 湖北师范大学生命科学学院, 食用野生植物保育与利用湖北省重点实验室, 黄石 435002;

2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘 要: 以羽毛粉为唯一碳氮源, 从家禽厂土壤中筛选获得一株角蛋白酶产生菌, 复筛角蛋白酶活力达 46.89 U·mL⁻¹。经形态特征和 16S rRNA 鉴定, 该菌株被命名为 *Bacillus subtilis* KS12。研究 pH、温度、离子、表面活性剂、氧化剂和有机溶剂对 *B. subtilis* KS12 产角蛋白酶活性的影响。结果表明: 该菌株产角蛋白酶最适反应 pH 7.5, 最适温度 37℃, 在 pH 8.0~9.0 范围内稳定性高, 处理 1 h 相对酶活力仍达 95.7%~97.2%, 60℃和 80℃保温 1 h 相对酶活力分别为 61.4%和 59.5%; 5 mmol·L⁻¹ Ca²⁺和 Mg²⁺对酶活性有促进作用, 其中 Mg²⁺尤为明显, 相对酶活力达 159%, Cu²⁺(5 mmol·L⁻¹)抑制角蛋白酶活性, 相对酶活力仅有 3.7%; 5%的吐温 80 可以提高角蛋白酶活性, 相对酶活力为 140.4%; 有机溶剂异丙醇、甲醛、甲醇、乙醇、异戊醇和二甲苯抑制角蛋白酶活性。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 羽毛角蛋白; 筛选; 角蛋白酶; 酶学性质

中图分类号: S816.48; S939.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2021)04-0620-05

Screening, identifying and enzymatic characterizations of a keratinase-producing strain

XU Zhilong^{1,2}, YIN Yajie¹, XIA Xian¹, LIANG Yunxiang², ZHAO Shumiao², HU Yuanliang^{1,2}

(1. Hubei Key Laboratory of Edible Wild Plants Conservation and Utilization, College of Life Sciences, Hubei Normal University, Huangshi 435002; 2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: A strain with high keratinase activity of 46.89 U·mL⁻¹ was isolated from poultry plant soil samples by using feather powder as the sole carbon source and nitrogen source. The strain was identified as *Bacillus subtilis* KS12 by the morphological characterize, and 16S rRNA sequence analysis. The effects of pH, temperature, ions, surfactants, oxidants and organic solvents on the keratinase activity of *B. subtilis* KS12 were investigated. The result showed that the optimum pH and temperature of the keratinase of the strain were 7.5 and 37℃, respectively. The keratinase was stabile between pH 8.0 and 9.0 with the relative enzyme activity of 95.5%~97.2% for 1 h, and the relative enzyme activity were 61.4% and 59.5%, respectively, at 60 °C and 80 °C for 1 h. The keratinase activity was improved by 5 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ and Mg²⁺, especially Mg²⁺ with the relative enzyme activity of 159%, and inhibited by Cu²⁺ (5 mmol·L⁻¹) with the relative enzyme activity of 3.7%, and 5% of Tween 80 expressed a positive effect on the keratinase activity with 140.4%. Furthermore, the keratinase activity of *B. subtilis* KS12 were inhibited by isopropanol, formaldehyde, methanol, ethanol, isoamyl alcohol and xylene.

Key words: *Bacillus subtilis*; feather keratin; screening; keratinase; enzyme characterization

角蛋白是一种硬质蛋白, 在羊毛、羽毛和指甲等物质中含量丰富^[1], 比如在禽类羽毛中粗蛋白的含量高达 90%, 其中主要为角蛋白^[2]。这些物质通常是农产品加工副产物, 无害化处理需要大量的资金投入。若有适宜的方法水解利用这些废弃蛋白资源, 以代替畜禽日粮中价格昂贵的动物性蛋白原料,

如鱼粉或肉粉等, 将产生巨大的经济效益^[3-5]。

角蛋白分子内和分子间存在大量的二硫键, 其结构稳定, 能抵抗大多数常见蛋白水解酶, 如胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶的降解作用^[6]。采用传统的物理化学方法, 高温、高压、强酸及强碱, 不仅浪费大量的能源, 增加环境负担, 而且破坏氨

收稿日期: 2019-11-17

基金项目: 湖北省教育厅中青年人才项目 (Q20162501) 资助。

作者简介: 徐志龙, 硕士研究生。E-mail: 865798864@qq.com

* 通信作者: 胡远亮, 博士, 副教授。E-mail: yuanlianghu@yeah.net

基酸的生物学活性, 大大降低了羽毛蛋白质资源的利用效率。

因此, 筛选高效角蛋白降解菌, 研究其所产角蛋白酶的性质, 对羽毛粉资源化利用具有重要意义。本研究以羽毛粉为唯一碳氮源, 从土壤环境中筛选高产角蛋白酶菌株, 并对其酶学性质进行研究, 为利用微生物发酵技术开发羽毛角蛋白饲料资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

从富含羽毛质的环境中采集土壤样品, 3 份样品分别采自江西省宜春市张巷镇、湖北省武汉市某家禽厂和咸宁市某家禽厂。

1.2 培养基

Luria-Bertani (LB) 培养基: 胰蛋白胨 10 g·L⁻¹, 酵母提取物 5 g·L⁻¹, 氯化钠 10 g·L⁻¹, pH 7.5, 121 °C 灭菌、30 min。

羽毛粉培养基: 羽毛粉 10 g·L⁻¹, K₂HPO₄ 0.5 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 1.2 g·L⁻¹, NaCl 0.5 g·L⁻¹, MgSO₄ 0.1 g·L⁻¹, CaCl₂ 0.2 g·L⁻¹, pH 7.5, 121 °C 灭菌、30 min^[7]。

1.3 初筛和复筛

称取 10 g 土壤样品, 加入到 90 mL 的无菌水中, 混合均匀并进行梯度稀释, 然后涂布在羽毛粉平板上初筛培养, 37 °C、36 h。挑取生长良好的单菌落, 在 LB 平板上进行分离纯化, 纯化的单菌落继续接种至羽毛粉平板上验证培养, 37 °C、48 h, 挑取生长情况良好的菌落保藏, 同时按 1.4 方法所述测定角蛋白酶活力进行复筛。

1.4 角蛋白酶活力测定

将菌株接种至 LB 液体培养基, 37 °C、180 r·min⁻¹ 培养 24 h, 取 2 mL 培养液接种至羽毛粉液体培养基, 37 °C、180 r·min⁻¹ 培养 36 h, 离心 8 500 r·min⁻¹、5 min, 取上清液 1 mL, 50 mmol·L⁻¹ 的 Tris-HCl 缓冲液 2 mL、羽毛粉 50 mg, 混匀, 37 °C 水浴 10 min, 加入 10% 三氯乙酸 2 mL 作用 15 min 以终止反应。将终止反应液离心, 10 000 r·min⁻¹、5 min, 取上清液于 280 nm 测定光吸收值。对照组首先加入 10% 三氯乙酸溶液 2 mL 抑制酶活性, 然后加入上清液 1 mL, 其他条件保持一致^[8-9]。酶活力单位定义: 在该反应条件下, 使稳定后 280 nm 光吸收值, 每分钟增加 0.01 所需的酶量为 1 个单位^[8-9]。计算公式如下: $U=5n \times \Delta A_{280} / (0.01 \times 10)$

式中: U 为样品角蛋白酶活力 ($U \cdot mL^{-1}$), 5 为终反应体积 (mL), n 为样品稀释倍数, ΔA_{280} 为实验组与对照组的光吸收值的差值, 10 为反应时间

(min)。

1.5 菌株鉴定

将复筛获取的高产角蛋白酶菌株, 在羽毛粉平板上划线培养, 37 °C, 36 h。挑选单菌落, 采用菌落 PCR 法, 以通用引物 27F/1492R 扩增细菌 16S rRNA 基因进行鉴定, PCR 反应程序为: 预变性 94 °C, 4 min; 变性 94 °C, 1 min, 退火 50 °C, 40 s, 延伸 72 °C, 45 s, 循环 30 次; 终延伸 72 °C, 10 min^[10]。将 PCR 产物纯化后送检测序, 利用 Genbank 数据库中进行 DNA 序列 BLAST, 采用软件 MEGA 5.0 构建系统发育树。

1.6 酶学性质研究

pH 值。分别配制不同 pH 值的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (0.2 mol·L⁻¹, pH 4.0~7.0)、Tris-HCl 缓冲液 (0.1 mol·L⁻¹, pH 7.5~8.0) 和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (0.1 mol·L⁻¹, pH 9.0~10.0), 测定不同 pH 值条件下角蛋白酶活力, 研究 pH 值对酶活力的影响。用 pH 4.0~10.0 缓冲液, 以 1:1 稀释酶液, 4 °C 处理 1 h, 最适 pH 条件下测定角蛋白酶活力, 以未处理组的酶活力为 100%, 研究该酶的 pH 稳定性。

温度。保持其他条件不变, 分别于不同温度条件下 (30~65 °C), 测定角蛋白酶活力, 研究温度对酶活性的影响。酶液分别于 60 °C 和 80 °C 下处理 1 h、2 h、4 h 和 8 h, 最适条件下测定酶活力, 以未处理组的酶活力为 100%, 研究该酶的温度稳定性。

离子和 EDTA 对角蛋白酶活力的影响。以终浓度 5 mmol·L⁻¹ 分别向反应体系中加入不同的离子 (NH₄²⁺、Ba²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺) 或 EDTA 溶液, 最适条件 37 °C, pH 7.5 条件下测定酶活力, 以蒸馏水为对照同时实验, 计算相对酶活力。

表面活性剂、氧化剂和有机溶剂对酶活力的影响。反应体系以终浓度 1% 或 5% 的分别添加 SDS, 吐温 80, H₂O₂; 以终浓度 1% 分别添加甲醇、乙醇、二甲苯、异丙醇、异戊醇和甲醛, 最适条件 37 °C, pH 7.5 条件下测定酶活力, 以蒸馏水为对照, 分别计算相对酶活力。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

通过对 3 份土壤样品进行初筛, 挑选生长良好的菌落进行分离纯化、保藏并测定角蛋白酶活力复筛 (表 1), 结果表明编号 KS12 的菌株产角蛋白酶活力最高, 达 46.89 U·mL⁻¹, 选择该菌株进行鉴定并研究其角蛋白酶性质。

表 1 测定角蛋白酶活力复筛结果

Table 1 Result of keratinase activity

菌株	角蛋白酶活力/ (U·mL ⁻¹)	菌株	角蛋白酶活力/ (U·mL ⁻¹)
KS1	12.78	KS16	29.37
KS2	14.91	KS19	5.00
KS3	16.18	KS20	20.90
KS7	8.95	KS21	6.02
KS11	8.95	KS23	27.21
KS12	46.89	KS27	16.75
KS14	13.40	KS28	7.99

2.2 菌株鉴定

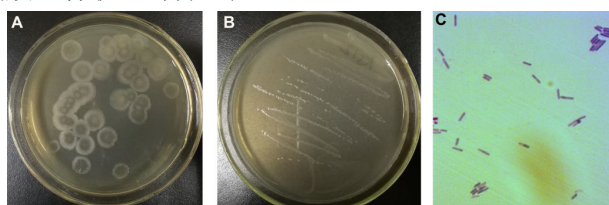
如图 1A 所示, LB 平板上菌株 KS12 的菌落形态为半透明状, 无反光, 中间凹陷, 边缘较厚, 光滑且无规则。革兰氏染色镜检表明, 菌体呈单个或链状排列, 着色均匀, 无荚膜, 杆状, 部分已产生

孢子, 初步认定为革兰氏阳性芽孢杆菌(图 1)。

扩增 16S rRNA 鉴定表明, KS12 菌株与 *Bacillus subtilis* M015 (KP192484.1) 同源性最高, 序列相似度为 100%, 且 KS12 菌株在系统发育树上进化距离与 *B. subtilis* 亲缘关系最近(图 2)。因此, 命名为 *B. subtilis* KS12。

2.3 酶学性质研究

2.3.1 pH、温度对角蛋白酶活力和稳定性影响 如图 3(a) 所示, *B. subtilis* KS12 产角蛋白酶在碱性环境中保持较高活力, 最适 pH 值 7.5; 使用不同 pH 缓冲液处理 1 h 表明, 该酶 pH 8.0 和 9.0 条件下, 相对酶活力分别为 97.2% 和 95.7%, 见图 3(b)。当 pH < 4.0 或 > 9.0 时, 其稳定性快速下降, 相对酶活力低于 50%。



A. LB 平板; B. 羽毛粉平板; C. 显微镜 1 000 倍

图 1 KS12 菌落形态和显微形态

Figure 1 Colony morphologies and microscopic of strain KS12 on LB plate and feather powder plate

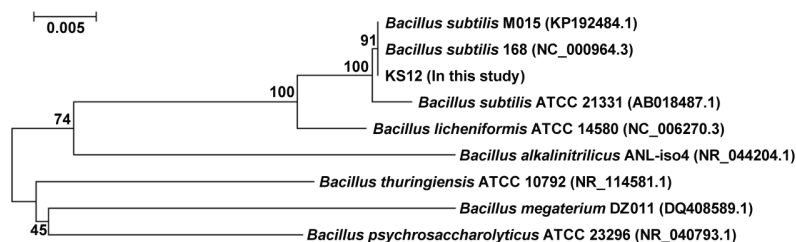
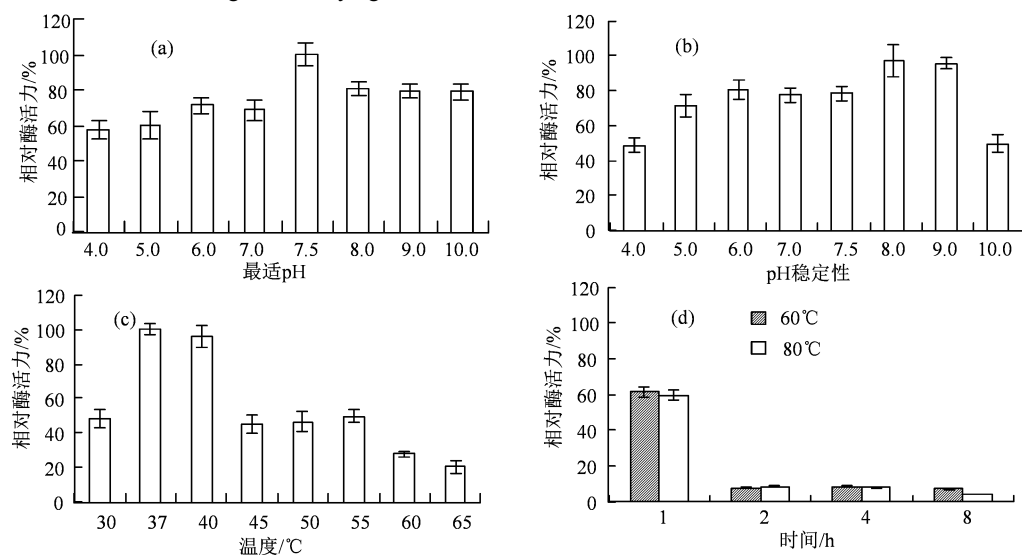


图 2 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain KS12 based on 16S rRNA



(a) 最适 pH 值; (b) pH 稳定性; (c) 最适温度; (d) 温度稳定性。

图 3 pH 和温度对角蛋白酶活力和稳定性的影响

Figure 3 Effect of pH and temperature on activity and stability of the keratinase

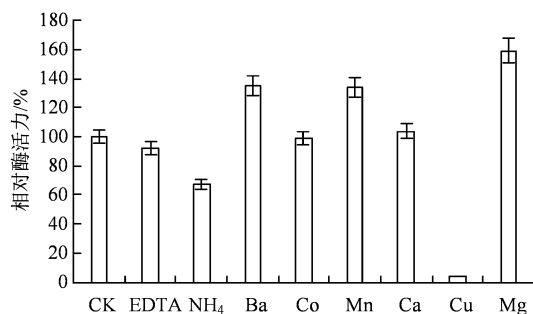


图 4 金属离子对角蛋白酶活性的影响

Figure 4 Effect of metal ions on keratinase activity

表 2 表面活性剂和氧化剂对角蛋白酶活性的影响

Table 2 Effect of various surfactants and oxidizer on keratinase activity

试剂种类	相对酶活力/%
1%SDS	71.4±6.0
5% SDS	60.2±4.8
1%吐温 80	90.3±3.3
5%吐温 80	140.4±4.2
1%H ₂ O ₂	82.7±4.1
5%H ₂ O ₂	70.1±4.6

表 3 有机溶剂对角蛋白酶活性的影响

Table 3 Effect of various organic solvent on keratinase activity

试剂种类	相对酶活力/%
异丙醇	76.8±3.9
甲醛	76.4±4.4
甲醇	73.8±5.0
乙醇	69.6±4.6
异戊醇	56.8±2.4
二甲苯	34.1±2.0

研究发现, 该酶最适反应温度 37 °C, 当温度为 30 °C 时, 相对酶活力 49.3%, 达到 45 °C 时, 相对酶活力 46.8%, 见图 3 (c)。该酶于 60 °C, 80 °C 水浴 1 h, 酶活力分别为 61.4%, 59.5%。随着保温时间的延长, 角蛋白酶活力迅速下降, 2 h 酶活力不足 5%, 见图 3 (d)。这些结果说明, *B. subtilis* KS12 产角蛋白酶对温度较为敏感。

2.3.2 不同离子对角蛋白酶活性的影响 如图 4 所示, 5 mmol·L⁻¹ 的 Ca²⁺、Mg²⁺对 *B. subtilis* KS12 角蛋白酶活力有促进作用, 其中 Mg²⁺对角蛋白酶促进作用较强, 相对酶活力达 159%。EDTA 则对酶活力基本没有影响, 但 Cu²⁺对角蛋白酶活力产生较强的抑制作用, 相对酶活力仅有 3.7%。

2.3.3 表面活性剂和氧化剂对角蛋白酶活性的影响

由表 2 可知, SDS 和 H₂O₂ 抑制角蛋白酶活性。低浓度 1% 的吐温 80 对角蛋白酶激活作用不明显,

但浓度为 5% 时, 具有激活作用, 相对酶活力达 140.4%。

2.3.4 有机溶剂对角蛋白酶活性的影响 体系中以 1% 加入不同有机溶剂, 发现角蛋白酶活力均受到抑制, 说明该酶对有机溶剂的耐受性较差, 其中, 二甲苯的抑制效果最为明显, 相对酶活力仅有 34.1% (表 3)。

3 讨论与结论

以羽毛粉作为唯一的碳、氮源, 筛选得到 1 株角蛋白酶产生菌, 经鉴定并命名为 *B. subtilis* KS12。芽孢杆菌被认为是极具潜力的角蛋白酶产生菌, 研究表明 *Brevibacillus brevis* US575 菌株所产的胞外角蛋白酶 KERUS 相比 NUE 12 MG 和 KOROPON MK EG 角蛋白酶具有更高的水解作用、底物特异性和催化活性, 能够独立完成全部的羽毛降解^[11]; 来自 *B. tequilensis* Q7 的角蛋白酶 KERQ7 相比一些商业酶也具有更强大的角蛋白降解能力^[12]。质谱分析 KERUS 单体分子量为 29.1 KD, KERQ7 为 28.4 KD, 两种酶都能够被 PMSF 和 DFP 完全抑制, 表明属于丝氨酸蛋白酶家族^[11]。

角蛋白酶的理化性质根据微生物的来源有所不同, 大多数最适 pH 范围 7.0~9.5, 最适作用温度 40~70 °C^[13-15]。来源于 *Purpureocillium lilacinum* LPS#876 的角蛋白酶在 pH 4.0~9.0, 37 °C 保温 1 h, 相对酶活力 92% 以上, 65 °C 保温 50 min, 仍保持 15% 的相对酶活性^[16]。少数角蛋白酶可以在极碱和更高温度下保持较高酶活性, 比如来源于细菌 *Streptomyces* 的角蛋白酶, 其最适作用 pH 和温度分别为 11.5 和 75 °C^[17]。本研究中 *B. subtilis* KS12 酶学性质与多数角蛋白酶相似, 在 37 °C 和 pH 7.5~9.0 的碱性条件下较稳定。

金属离子 Ca²⁺和 Mg²⁺对 *B. subtilis* KS12 角蛋白酶活力有一定的促进作用, 但重金属 Co²⁺、Mn²⁺和 Cu²⁺抑制角蛋白酶活力, 通常 Co²⁺^[18]、Cu²⁺^[19]和 Hg²⁺^[11,20]会不同程度的抑制角蛋白酶活力。螯合剂 EDTA 对 *B. subtilis* KS12 角蛋白酶的影响小, 但对 *Bacillus thuringiensis* AD-12 分泌的角蛋白酶 BtKER 产生抑制作用^[21], 该菌分泌的角蛋白酶与金属相关, 因此, 添加 EDTA 使其活性受到影响。

角蛋白酶活力受到表面活性剂 SDS、氧化剂 H₂O₂ 和有机溶剂不同程度的抑制。1% 吐温 80 对 *B. subtilis* KS12 角蛋白酶无激活作用, 但高浓度 5% 吐温 80 提高角蛋白酶活力。研究结果与链霉菌分泌的角蛋白酶性质相似, 当吐温 80 浓度为 0.1% 时, 相

对酶活力仅 98%，但浓度为 0.5% 时，相对酶活力达到 109%^[21]。此外，有机溶剂的存在，均对该角蛋白酶产生抑制作用。

由于角蛋白性质坚硬，在环境中难被降解，因此，从自然界中很难筛选到可以高效分解羽毛角蛋白的微生物。以自然界中筛选的降解微生物为基础，构建基因工程菌，提高角蛋白酶在菌体中的表达量，其应用前景将更为广阔。

参考文献:

- [1] SANGHVI G, PATEL H, VAISHNAV D, et al. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 87: 256-262.
- [2] 侯玉煌, 丁宏标. 角蛋白酶研究进展及其在饲料工业中的应用[J]. *中国畜牧杂志*, 2018, 54(1): 13-18.
- [3] SHARMA R, DEVI S. Versatility and commercial status of microbial keratinases: a review[J]. *Rev Environ Sci Bio/technology*, 2018, 17(1): 19-45.
- [4] 郝鲁江, 卢晓平, 许艳蕊, 等. 角蛋白酶制备羽毛蛋白粉的工艺研究[J]. *中国饲料*, 2016(15): 5-8.
- [5] 杨连, 曹永洪, 杨培龙, 等. 角蛋白酶的研究与应用前景[J]. *生物技术进展*, 2015, 5(1): 29-34.
- [6] BARMAN N C, ZOHORA F T, DAS K C, et al. Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 181.
- [7] 王继勇, 何敏, 陈聪, 等. 羽毛降解菌的筛选及其产酶特性[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2015, 61(2): 183-186.
- [8] CAI C G, LOU B G, ZHENG X D. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9(1): 60-67.
- [9] YAMAMURA S, MORITA Y, HASAN Q, et al. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur[J]. *J Biosci Bioeng*, 2002, 93(6): 595-600.
- [10] 刘晓丽, 刘玉华, 韩生义, 等. 一株产脂肪酶细菌的分离、筛选和鉴定[J]. *甘肃农业大学学报*, 2018, 53(1): 22-28.
- [11] ZARAÏ JAOUADI N, REKIK H, BEN ELHOUL M, et al. A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 79: 952-964.
- [12] JAOUADI N Z, REKIK H, BELHOUL M, et al. The attractive proprieties of the keratinase KERQ7 from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process[C]//Recent Adv Environ Sci From Euro-Mediterr Surround Reg. Tunisia, 2018: 137-139.
- [13] 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.
- [14] BOUACEM K, BOUANANE-DARENFED A, LARIBI-HABCHI H, et al. Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 81: 299-307.
- [15] KUO J M, YANG J I, CHEN W M, et al. Purification and characterization of a thermostable keratinase from *Meiothermus* sp. I40[J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2012, 70: 111-116.
- [16] CAVELLO I A, HOURS R A, ROJAS N L, et al. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876[J]. *Process Biochem*, 2013, 48(5/6): 972-978.
- [17] JAOUADI B, ABDELMALEK B, FODIL D, et al. Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(21): 8361-8369.
- [18] RADHA S, GUNASEKARAN P. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains[J]. *Protein Expr Purif*, 2009, 64(1): 24-31.
- [19] THYS R C, LUCAS F S, RIFFEL A, et al. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39(2): 181-186.
- [20] RIFFEL A, LUCAS F, HEEB P, et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin[J]. *Arch Microbiol*, 2003, 179(4): 258-265.
- [21] TAPIA D M T, SIMÕES M L G. Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater[J]. *Afr J Biotechnol*, 2008, 7(3): 296-300.