

角蛋白酶产生菌的分离鉴定及其 *kerC* 的克隆表达

侯晟琦,王丽华,赖欣,陈惠*,吴琦,韩学易 (四川农业大学生命科学与理学院,四川省生物化学与分子生物学重点实验室,四川雅安 625014)

摘要: 以四川农业大学养鸡场堆砌废弃羽毛处土壤为样品,筛选出一株具有较强降解羽毛能力的细菌 B-3 菌株.经形态学、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析,鉴定其为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),命名为枯草芽孢杆菌 B-3.并成功克隆到该菌株的角蛋白酶基因 *kerC*(GenBank No.:JN021789),在大肠杆菌 BL21(*Escherichia coli* BL21)中获得了高效表达.该基因全长 1146bp,GC 含量 46.5%,编码 381 个氨基酸,与已报道的枯草芽孢杆菌 YYW-1 的 *kerC* 基因(GenBank No.: EU362730)同源性达到 100%.重组菌株经 IPTG 诱导后角蛋白酶活力达 14.8U/mL,经 His-Tag 纯化和 SDS-PAGE 分析表明,重组角蛋白酶分子量约为 60kDa(融合了硫氧还蛋白,Trx).重组角蛋白酶最适反应温度和 pH 值分别为 65℃与 7.0.

关键词: 角蛋白酶; 枯草芽孢杆菌 B-3; 基因克隆; *kerC* 基因; 原核表达; His-Tag

中图分类号: X172,Q89 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2012)10-1845-08

Isolation, identification of B-3 *Bacillus Subtilis* and cloning, expression of *kerC*. HOU Sheng-qi, WANG Li-hua, LAI Xin, CHEN Hui*, WU Qi, HAN Xue-yi (Key laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Sichuan, College of Life and Basic Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China). *China Environmental Science*, 2012,32(10): 1845~1852

Abstract: A feather-degrading bacterium was isolated from a sample of discarded feather in the chicken farmland of Sichuan Agricultural University. Relative experiments about its morphological, physiological and biochemical characteristics and 16SrDNA were conducted. Results showed it possessed typical characterizations of *Bacillus subtilis*. Therefore, it was identified as *Bacillus subtilis* and named *Bacillus subtilis* B-3. Afterwards, the nucleotide sequence of the keratinase gene was successfully amplified by PCR utilizing its genomic DNA as template. The keratinase gene was further cloned into expression vector pET32a(+) and was highly expressed using *Escherichia coli* BL21 (DE3). Sequencing result revealed the *kerC* gene was composed of 1146 bp which encodes 381 amino acids. And the sequence alignment of *kerC* showed it shared a 100% similarity with the *kerC* gene from *Bacillus subtilis* strain YYW-1 submitted in GenBank (No.: EU362730). The activity of this recombinant *kerC* was 14.814U/mL when induced by IPTG. And this recombinant enzyme (fused with *E.coli* thioredoxin) was purified by His-Tag. SDS-PAGE analysis demonstrated that it had a molecular mass of 60.0 kDa. Subsequent tests validated that the optimal temperature and pH of the recombinant enzyme were 65℃ and 7.0 respectively.

Key words: keratinase; *Bacillus subtilis* B-3; gene cloning; *kerC* gene; prokaryotic expression; His-Tag

角蛋白是一种广泛存在于自然界中的硬性蛋白,来源于外胚层细胞,包括皮肤以及皮肤的衍生物:发、毛、鳞、羽、鬃等,是外胚层细胞的结构蛋白质,可以分为 α -角蛋白和 β -角蛋白两类^[1].角蛋白化学结构稳定,是不溶性的纤维状蛋白质,不易被一般的蛋白酶如胰蛋白酶、胃蛋白酶及木瓜蛋白酶所降解.目前,世界各地因这种动物分泌物无法及时得到有效降解,给环境带来了许多负

面的影响和压力^[2].例如,养鸡场就因为羽毛堆砌不能有效降解或者处理产生了很严重问题.目前,全世界羽毛的堆砌良久多达上百万t^[3],对角蛋白的处理主要是运用物理或者化学手段,但是物理方法成本高,且需要提供足够大压力的机器及设备,化学手段则会因各种化学制剂的使用给环

收稿日期: 2011-12-22

* 责任作者, 教授, chen62hui@yahoo.com.cn

境带来毒害和污染。

角蛋白酶是一种主要由真菌、放线菌、细菌等微生物产生,可特异降解角蛋白的蛋白酶。利用自然界中某些微生物能分泌角蛋白酶特性,通过角蛋白酶特异性地消化角蛋白的生物降解法正日益成为研究的热点。目前,该方法已在去垢剂的制造、皮革加工、食品工业和饲料生产中广泛应用^[4-5]。在饲料生产中,世界范围内的家禽生产处理过程中每年都有数百万吨的羽毛废弃物产生,而羽毛的主要成分是角蛋白,富含多种氨基酸,如亮氨酸、缬氨酸及赖氨酸等人体必须氨基酸,还含钙、磷等微量元素,可通过角蛋白酶作用将废弃的羽毛降解后作为动物饲料的添加剂^[6],充分利用这些蛋白资源将会大大改善蛋白质饲料短缺的现象。

目前,国内外关于角蛋白酶基因的研究主要集中在 *kerA*、*kerB* 等家族。其中 *kerA* 类研究报道最为透彻。另外, *kerB* 基因的主要来源是真菌中的发癣菌,由 1434 个核苷酸组成^[7]。成熟的角蛋白酶具有保守的催化三联体活性位点,由 Asp32、His63 和 Ser230 组成。现已报道研究最为透彻的是来自地衣芽孢杆菌 PWD-1 的 *kerA* 基因^[8]。此外,Liang 等^[9]报道克隆了地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)L-25 的角蛋白酶基因 *kerB*,并将 *kerB* 成功转入产角蛋白酶缺陷型谷草芽孢杆菌 DB104 菌株敏感细胞中,实现了 *kerB* 的成功表达。Radha 等^[10]克隆了地衣芽孢杆菌 MKU3 中的角蛋白酶基因,并在大肠杆菌和巨大芽孢杆菌中成功表达。

本研究对可以降解羽毛的微生物进行分离、筛选,得到了具有较高角蛋白酶活力的菌株,进行了角蛋白酶基因 *kerC* 的克隆,并首次实现了 *kerC* 的原核异源表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 雅安市四川农业大学养鸡场堆砌废弃羽毛处土样,大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 为本实验室保存,表达载体 pET32a(+)和菌株 BL21(DE3)购自美国 Novagen 公司;引物由上

海英潍捷基因生物技术有限公司合成。

1.1.2 培养基 在王政等^[11]基础上对 pH 值适当修改。种子培养基 pH7.2~7.4;富集培养基 pH7.5;初筛/发酵培养基 pH7.5;复筛平板 pH7.5; LB 培养基 pH7.0~7.5; LB-Amp(Kan)培养基:终浓度为 100 μ g/mL 的 Amp 或 Kan。

1.1.3 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 、表达宿主细胞大肠杆菌 BL21(DE3)、载体 pET32a (+),载体 pMD-18 T Vector。

1.1.4 工具酶和化学试剂 限制性内切酶、DNA Marker、Protein Marker (Low)、Amp 和 Kan 购自 TaKaRa 公司;Pfu DNA Polymerase、dNTP mixture 购于天根生化科技有限公司;所有试剂盒均购自 Omega 公司;低熔点琼脂糖、IPTG、丙烯酰胺和 N, N-亚甲基双丙烯酰胺均购自 Sigma 公司;蛋白胨和酵母粉均购自 Oxoid 公司;三氯乙酸 (TCA)等其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 羽毛降解菌株的分离纯化及筛选 将所取土样与约 1cm 长的碎羽毛混匀后于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中富集培养 30d。取 1g 富集后土样至 100mL 液体富集培养基中继续富集培养 7d 后,取 1mL 液体富集培养基至 100mL 液体初筛培养基中,培养至培养基中羽毛明显降解后,将初筛培养基稀释(10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 3 个梯度)涂布于复筛平板,培养后分离纯化生长能力较强的菌株并保存于牛肉膏斜面培养基。

将分离出的菌株接种于含有一根完整羽毛和 5mL 发酵培养基的试管(10mL)中,37 $^{\circ}$ C 静置恒温培养,观察羽毛的降解情况。

将菌株接种于 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、200r/min 振荡培养过夜,作为种子液。种子液以 1%接种量接种至发酵培养基,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至羽毛完全降解,测定角蛋白酶酶活力。根据羽毛降解实验和羽毛发酵试验,从所纯化的菌株中筛选出羽毛降解能力最强的菌株。

1.2.2 菌种鉴定 观察菌落生长特点和在光学显微镜下观察菌株特征。依照《常见细菌系统鉴定手册》^[12]对菌株进行初步分类。

设计并合成细菌 16S rRNA 基因通用引物:

P_{up}, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', P_{down}, 5'-TACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3'. PCR 扩增后回收纯化产物, 与 pMD18-T Vector 连接, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在 LB-Amp 平板上培养后挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 上游引物序列 P(M13+): 5'-TCTGGTGAGGATGTTATCATTGGGAA-3', 下游引物序列 P(M13-): 5'-GTTCTTGCAACCTCTGCATTCA-AAAGA-3'. 对 PCR 产物电泳检测, 筛选阳性克隆, 送北京诺赛(SinoGenoMax)基因组研究有限公司进行序列测定.

1.2.3 角蛋白酶酶活测定 角蛋白酶活力的测定方法参考 Gradisar 的方法为基础^[13], 并稍做改动: 将发酵酶液 4000r/min 离心, 取 1mL 上清液, 加入 10mg 羽毛粉、2.0mL 0.05mol/L Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液, 50℃ 恒温振荡水浴锅中反应 (200r/min) 1h, 加入 2.0mL 20% TCA 终止反应, 静置 30min, 10000r/min、4℃ 离心 5min, 取上清液在 280nm 比色测定 A₂₈₀ 值. 反应前即加 20% TCA 的处理作为对照.

角蛋白酶酶活力单位定义: 在上述反应条件下, OD 值每增加 0.100 为 1 个酶活力单位(U). 每个实验设置 3 个重复, 取其平均值.

1.2.4 蛋白质含量测定 采用 Bradford 法^[14], 以牛血清白蛋白(BSA)为标准样品.

1.2.5 目的基因的克隆 根据 GenBank: EU362730 序列, 应用生物信息学软件, 设计引物: P₁-GTGAGAAGCAAAAAATTGTGG, P₂-TTATTGTGCAGCTGCTTGAC. 以 *Bacillus subtilis* B-3 基因组 DNA 为模板, 扩增 *kerC* 基因, 最终构建并筛选目标阳性转化子, 基本方法同 1.2.2.

1.2.6 重组表达载体的构建 设计引物: P₃, 5'-GACTGGTACCGTGAGAAGCAAAAAATTGTGG-3' (下划线部分为 Kpn I 的酶切位点); P₄, 5'-CCGGAATTCTTATTGTGCAGCTGCTTGAC-3' (下划线部分为 EcoR I 的酶切位点). 以 *Bacillus subtilis* B-3 基因组 DNA 为模板, 高保真扩增 *kerC* 序列. 双酶切处理 PCR 产物和 pET32a(+)后, 连接、转化 BL21 后筛选阳性转化

子测序, 同时进行单、双酶切鉴定. 将鉴定正确的转化子命名为 pET-*kerC*.

1.2.7 重组菌株的诱导表达 方法参见 Radha 等^[10]的方法.

1.2.8 His-Tag 亲和层析 用直径为 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤超声波破碎细胞的上清液, 将此样品加入到预先用 binding buffer 平衡的 His-Tag 亲和纯化柱, 适量 1 $\times$ washing buffer (不同浓度梯度咪唑) 洗涤柱床 3 次, 1 $\times$ elution buffer 洗涤柱床 5 次, 试管收集层析液, 测定酶活力, 并用 SDS-PAGE 电泳检测重组角蛋白酶 *kerC* 的表达.

1.2.9 角蛋白酶最适反应温度和温度稳定性测定 将适当稀释的酶液分别在 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90℃ 下与 10mg 羽毛粉底物及 2.0mL 50mmol/L Tris-HCl 混合进行反应, 1h 后加入 2.0mL 20% TCA, 静置 30min, 10000r/min 4℃ 离心 5min, 取上清液在 280nm 处测定光吸收值, 以酶活最高者为 100%, 计算其他温度下的酶活.

将适当稀释的酶液分别在上述环境温度下保温 10min, 再在 50℃ 下测定残余酶活力, 其他步骤同最适温度的测定.

1.2.10 角蛋白酶最适反应 pH 值和 pH 值稳定性测定 以 10mg 羽毛粉为底物, 加 2mL 不同 pH 值的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液和 1mL 适当稀释的酶液, 65℃ 条件下反应 1h 后加入 2.0mL 20% TCA 终止反应, 静置 30min 后, 于 10000r/min 4℃ 离心 5min, 上清液在 280nm 处比色测定光吸收值, 以酶活最高者作为 100%, 计算其他 pH 值条件下酶活.

将适当稀释的酶液置于不同 pH 值的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液中保温 30min 后, 再在 50℃ 下测定残余酶活力, 以最高酶活作为 100%, 计算其他各管残余酶活.

2 结果

2.1 羽毛降解菌株的分离与筛选

土样经富集培养后, 共分离到 7 株具有能明显降解羽毛能力的细菌菌株. 通过羽毛降解实验, 比较 7 株细菌的羽毛降解能力, 其中菌株 B-3 对完整羽毛降解能力最强. 到第 7d, 羽片已明显

降解,羽轴也有被降解的迹象,第 11d,已不可见羽毛的完整形态,第 15d,整片羽毛仅剩下一些尚未完全降解利用的残留物沉淀在试管底部,而阴性对照组的羽毛没有任何降解迹象(图 1).同时测定 7 株细菌发酵液的角蛋白酶活力,菌株 B-3 的角蛋白酶活最高,达到 2.3U/mL,和其他筛选到的能降解羽毛的菌株酶活力相近.这和羽毛降解能力的实验结果一致.选择 B-3 菌株进行深入研究.

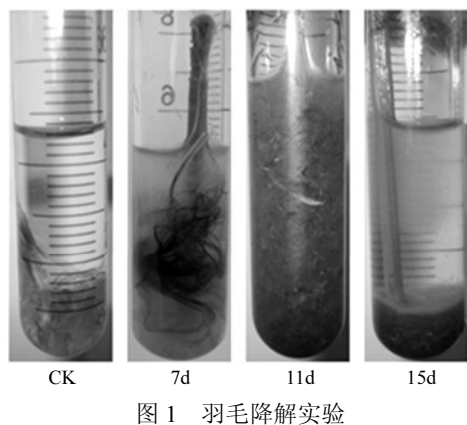


图 1 羽毛降解实验

Fig.1 Analysis of the feather-degrading ability of B-3 after the feathers were incubated at tube for 7, 11, 15d

CK:阴性对照;7d,11d,15d 为接种菌株 B-3 后静置 7d,11d,15d

2.2 羽毛降解菌株 B-3 的菌种鉴定

初筛平板内 B-3 菌落呈圆形,表面干燥,有褶皱,边缘不整齐,乳白色,不透明,无黏性.光学显微镜下观察,该菌为革兰氏阳性菌,大小 1.3~1.4μm×0.9μm,短杆状,两端钝圆,无鞭毛和荚膜,成单或是成短链排列,中生芽孢.菌株 B-3 生理生化培养特性结果如表 1 所示.

根据形态学特征及生理生化特性结果,参考《常见细菌系统鉴定手册》^[12],将菌株 B-3 初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*).

B-3 菌株的 16S rDNA 序列长为 1514 bp,与枯草芽孢杆菌 YYW-1 的 16S rDNA 序列同源性达到 100%,从分子水平上鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌,并命名为 *Bacillus subtilis* B-3.

2.3 目的基因克隆及生物信息学分析

以 *Bacillus subtilis* B-3 基因组 DNA 为模

板,P1/P2 为引物,进行 PCR 扩增获得 *kerC* 基因 (GenBank No.:JN021789).*kerC* 基因全长 1146 bp,GC 含量 46.5%,编码 381 个氨基酸,与 GenBank 数据库比对发现,*kerC* 基因与来自 *Bacillus subtilis* strain YYW-1 的 *kerC* (EU362730.1)基因序列同源性达到 100%.

表 1 菌株 B-3 的生化培养特性鉴定结果

Table 1 The biochemical identification results of strain B-3

鉴定指标	B-3 菌株	鉴定指标	B-3 菌株
形成过氧化氢酶	+	硝酸盐还原作用	+
厌氧生长	+	形成: 吡啶	-
V-P 测定	+	需要 KCl	-
V-P 培养物终 pH: <6	+	营养肉汤培养基 pH: 6.8	+
>7	-	5.7	+
产酸作用:D-葡萄糖	+	生长 NaCl: 2%	+
L-阿拉伯糖	+	5%	+
D-木糖	+	7%	+
D-甘露糖醇	-	生长培养温度: 5℃	-
葡萄糖产气作用	-	10℃	-
水解作用:明胶	+	30℃	+
淀粉	+	40℃	+
酪氨酸	ND	50℃	+
利用:柠檬酸盐	ND	55℃	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	65℃	-

注:“+”表示鉴定结果为阳性;“-”表示鉴定结果为阴性;ND表示未测定;“%”代表生长培养基用NaCl的浓度*W/V*

经 DNAMAN 和 Antheprot 分析,*kerC* 含一个信号肽位点,为第 21 位的丙氨酸.对其进行保守区域分析,发现含 Peptidases S8 Subtilisin subset 和 Inhibitor I9 结构区域,表明它属于 subtilisin 家族.*kerC* 含有 3 个保守位点:分别是丝氨酸蛋白酶的天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸活性位点,与其他丝氨酸角蛋白酶所含保守位点相同.

2.4 重组表达载体的构建

随机挑选 4 颗转化子进行 PCR 鉴定,4 颗转化子通过 PCR 均可扩增出大小为 1146bp 左右目的片段,条带单一、特异.初步确定这 4 株重组菌株均为阳性转化子(图 2);对 1 号阳性转化子(对应图 2 中孔道 3)提取质粒并单、双酶切进一步鉴定,实验证明经 EcoR I 或 Kpn I 酶切后可以得

到大小为 7300bp 左右的条带,经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切后可得到 5900bp 和 1146bp 左右的 2 条条带,此两条条带大小和载体 *Pet32a* 及目的片段 *kerC* 大小一致.从而将 1 号阳性转化子送去测序,测序结果表明重组表达质粒 *pET32a-kerC* 构建成功.

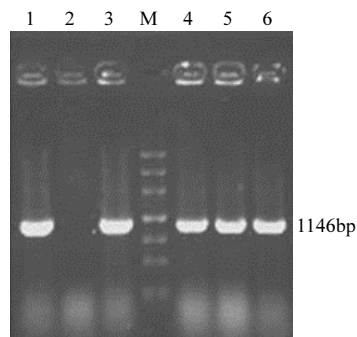


图 2 菌落 PCR 电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of colony PCR products

M:DNA MarkerIII(自上而下:4500,3000,2000,1200,800,500,200bp);

1:阳性对照组;2:阴性对照组;3~6:PCR 产物

2.5 重组菌株的诱导表达

将重组菌株的诱导产物经镍柱亲和纯化后,利用 SDS-PAGE 电泳检测(图 3).结果显示重组菌株诱导产物在 60kDa 出现新生条带,即角蛋白酶融合蛋白(融合了 Trx),除去 Trx 的分子量(约为 20kDa),角蛋白酶分子量在 40kDa 左右,与预测理论值(39.56kDa)相近,也与报道的枯草芽孢杆菌角蛋白酶大小相符(30~50kDa).此外,在含空载体大肠杆菌的细胞裂解物中,不存在大小约 60kDa 的条带,与预期结果相符.重组蛋白经镍柱纯化后,得到单一的角蛋白酶融合蛋白(图 3).

重组菌 *E.coli* BL21-pET-*kerC* 经 IPTG 诱导后,破碎细胞收集上清液测定角蛋白酶酶活力.以羽毛粉为底物,测得的破碎后细胞上清液酶活力可达 14.8 U/mL,比活力为 8.56U/mg,酶活力较原始枯草芽孢杆菌菌株提高了 6.5 倍,成功实现了 *kerC* 基因的异源表达.

2.6 重组角蛋白酶最适反应温度和温度稳定性测定

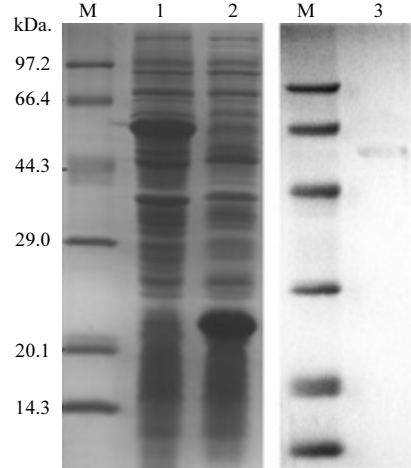


图 3 角蛋白酶基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of *kerC* expressed in *E.coli* BL21

M:低分子量蛋白质标准 maker (Takara); 1:含 *pET32a-kerC* 的实验组菌株蛋白表达; 2:含 *pET32a* (+) 的对照组菌株蛋白表达;

3:组氨酸标签纯化后的 *kerC*

将适当稀释的酶液分别在设定的梯度温度下与底物反应 1h,测定酶活力.如图 4 所示,该酶最适反应温度为 65℃.温度低于 50℃时,酶活力较低,而大于 75℃时,酶活力迅速降低.

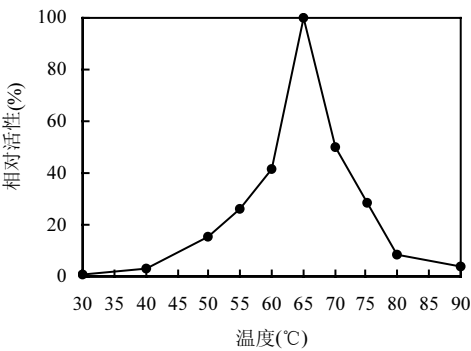


图 4 重组角蛋白酶 *kerC* 的最适反应温度

Fig.4 Optimal temperature of recombinant *kerC*

将酶液分别在设定温度保温 10 min 后,测定酶活力,结果表明重组酶 *kerC* 在 30℃ 处理 10min 后酶活力最高,随着温度升高,酶活力迅速下降,酶对高温的耐受性较差(图 5).

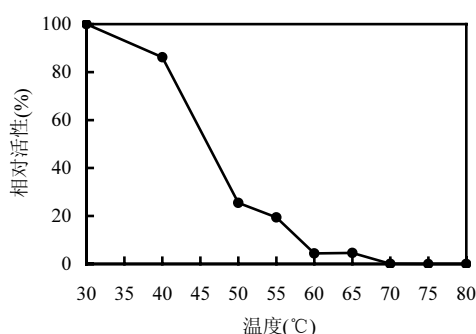


图5 重组角蛋白酶 kerC 热稳定性分析

Fig.5 Effect of temperature on the stability of recombinant kerC

2.7 重组角蛋白酶最适反应 pH 值和 pH 值稳定性测定

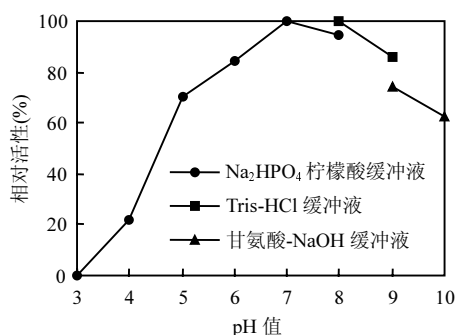


图6 重组角蛋白酶 kerC 的最适反应 pH 值

Fig.6 Optimal pH profile of recombinant kerC

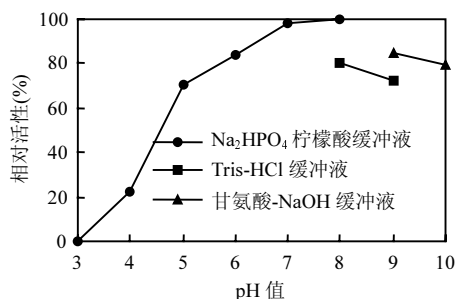


图7 重组角蛋白酶 kerC pH 值稳定性分析

Fig.7 Effect of pH on the stability of recombinant kerC

适当稀释的酶液与底物在设定的 pH 值梯度缓冲液中 65℃ 反应 1h, 测定酶活力结果如图 6 所示, 该酶的最适反应 pH 值为 7.0, 在 6.0~9.0 时酶活可维持最高酶活的 80%。该酶具有较宽的 pH

值适应范围, 在 pH 5.0~10 范围内酶活均可达最高酶活的 60% 以上。

将适当稀释的酶液置不同 pH 值的缓冲液中保温 30min 后测定残余酶活力, 以最高酶活力为 100%。结果表明, 重组酶在 pH 5~10 范围内均保持最高酶活的 70% 以上, 具有较高的 pH 值稳定性 (图 7)。

3 讨论

自然界中产角蛋白酶的微生物来源广泛, 迄今为止已发现的可降解角蛋白的微生物种类已有 30 多种。能降解角蛋白的微生物多为细菌、放线菌以及真菌^[15-17]。已经筛选出来的具有角蛋白降解能力的细菌主要以芽孢杆菌为主, 如 *Bacillus pseudofirmus* AL-89^[18]、*B. licheniformis* PWD-1^[19] 和 *Bacillus* sp. FK 46^[20]。

实验克隆得到的枯草芽孢杆菌 B-3 的 *kerC* 基因, 通过与数据库比对发现其与 GenBank 中来自枯草芽孢杆菌 YYW-1 的 *kerC* 基因 (GenBank No.: EU362730) 同源性达到 100%。2 株来自完全不同的地方的枯草芽孢杆菌编码的角蛋白酶基因完全相同, 表明其进化过程的高度保守性。本研究也对 *kerC* 基因的氨基酸进行了保守位点的分析, 结果表明 *kerC* 含有 3 个保守位点, 分别是 31-Asp、63-His 和 220-Ser, 与已报道的角蛋白酶保守位点结果一致。本研究构建了角蛋白酶 *kerC* 原核表达载体 pET32a-*kerC*, 并实现了在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达。融合角蛋白酶分子量为 60kDa 左右, 除去 Trx 的分子量, 角蛋白酶分子量在 40kDa 左右。这与理论值相近, 也与大部分报道的来自于芽孢杆菌的其他类角蛋白酶的分子量大小相符。

实验室对筛选得到的 *Bacillus subtilis* B-3 表达的融合角蛋白酶的酶学性质进行分析。结果表明粗酶液中角蛋白酶活力较原始菌有了比较大的提高, 从原始 2.3U/mL 上升到重组表达菌株的 14.8U/mL, 体现了优势。同时, 对该酶的最适温度和 pH 值等酶学性质进行试验分析后发现, 该酶的最适反应温度为 65℃, 最适 pH 值为 7.0。尽管如此, 该酶热稳定性较差, 在 50℃ 处理 10min, 残余

酶活只有 20%左右,而在 70℃处理 10min 后酶活完全丧失.重组角蛋白酶对热不稳定.该酶在 65℃下较其他温度有更好的残余酶活力,但是在 50℃对重组酶短时间处理后,其酶活性已经大大降低.这也说明了,酶的最适温度和温度稳定性的温度并不存在一一对应的关系.同时,该酶的最适反应温度与文献报道的大部分角蛋白酶最适作用温度为 40~60℃相一致,但异于文献报道的大部分角蛋白酶具有较好的热稳定性.Li 等^[18]研究中酶的温度稳定性结果与本研究的结果相似,重组酶的最适反应温度为 55℃,但在 60℃保温 10min 后酶活仅为原始酶活的 26%,在酶的最适反应温度范围内稳定性较差.

通过对来自枯草芽孢杆菌 B-3 的角蛋白酶基因 *kerC* 的原核表达做了初步的产酶条件探讨,为快速高效发酵角蛋白酶提供了一定的理论依据.大肠杆菌 BL21 一直因其操作容易而被广泛应用于各种基因的表达,但它也存在一定的局限性,如:表达量太低,容易形成包涵体等.曾有报道,Radha 等^[19]通过用木糖诱导启动子(P_{xylA})和淀粉酶启动子(P_{amyL})在巨大芽孢杆菌 MS941 中实现了角蛋白酶的持续表达,提高了角蛋白酶的表达量.实验室拟将此来自于枯草芽孢杆菌 B-3 的角蛋白酶 *kerC* 在毕赤酵母和巨大芽孢杆菌中做表达,期望也能够获得具有高酶活的工程菌,为国内甚至国外角蛋白酶的工业生产奠定基础.

4 结语

本研究筛选得到了能降解羽毛的枯草芽孢杆菌 B-3,并成功地克隆到了其角蛋白酶基因 *kerC*,首次实现了该基因的原核异源表达,酶活性较原始菌株提高了 6 倍.酶学性质分析结果表明重组角蛋白酶最适反应温度为 65℃,最适 pH 值为 7.0.

参考文献:

- [1] Shih Jason C H. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization: a review [J]. Poultry Science, 1993,72(9): 1617-1620.
- [2] 王 晶,陈 丽,曹张军,等.一株羽毛角蛋白降解菌的分离与鉴定 [J]. 农业环境科学学报, 2007,26(增刊):105-109.
- [3] Freeman S R, Poore M H, Middleton T F, et al. Alternative methods for disposal of spent laying hens: Evaluation of the efficacy of grinding, mechanical deboning, and of keratinase in the rendering process [J]. Bioresource Technology, 2009,100 (19):4515-4520.
- [4] Gushterova A, Vasileva-Tonokova E, Dimova E, et al. Keratinase production by newly isolated Antarctic *actinomyces* strains [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005,21(6/7): 831-834.
- [5] Suntornsuk W, Tongjun J, Onnim P, et al. Purification and characterization of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005,21(6/7):1111-1117.
- [6] Onifade A A, Al-sane N A, Al-Musallam A A, et al. A review: Potentials for biotechnological applications of keratindegrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources [J]. Bioresource Technology, 1998,66(1):1-11.
- [7] 蔡成刚,郑晓东.角蛋白酶的来源、理化性质与生物工程研究进展 [J]. Food and Fermentation Industries, 2006,32(4):111-114.
- [8] Lin X, Kelemen D W, Miller E S, et al. Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1 [J]. Applied and environmental microbiology, 1995,61(4):1469-1474.
- [9] Liang B, Xing S, Fu X Q, et al. Extraction, cloning and expression of keratinase gene *kerB* [J]. Journal of Jilin University (Science Edition), 2003,41(3):365-368.
- [10] Radha S, Gunasekaran P. Cloning and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007,103(4):1301-1310.
- [11] 王 政,郭士兵,姚大伟,等.高效降解角蛋白菌株的分离筛选与鉴定 [J]. 中国农学通报, 2009,25(18):22-24.
- [12] Dong X Z, Cai M Y. The common identification of systematic bacteriology Manual [M]. Beijing: Beijing Science Press, 2001.
- [13] Gradisar H, Kern S, Friedrich J. Keratinase of *doratomyces microsporus* [J]. Applied Microbial Biotechnology, 2000,53(2): 196-200.
- [14] Marion Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976,72: 248-254.
- [15] Ionata E, Canganella F, Bianconi G, et al. A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds [J]. Microbiological Research, 2008,163(1):105-112.

- [16] Chao Y P, Xie F H, Yang J, et al. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007,19(9):1125-1128.
- [17] Periasamy A, Azariah H, Hwal-Won S, et al. Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil [J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2008,62(3):287-292.
- [18] Gessesse A, Hatti-Kaul R, Gashe B A, et al. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003,32(5):519-524.
- [19] Lin X, Lee C G, Casale E S, et al. Purification and Characterization of a keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* Strain [J]. *Applied and Environmental microbiology* [J]. 1992,58(10):3271-3275.
- [20] Suntornsuk W, Suntornsuk L. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation [J]. *Bioresource Technology*, 2003,86(3):239-243.
- [21] Li J, Shi P J, Han X Y, et al. Functional expression of the keratinolytic serine protease gene *sfp2* from *Streptomyces fradiae* var. k11 in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2007,54(1):79-86.
- [22] Radha S, Gunasekaran P. Sustained expression of keratinase gene under *PxylA* and *PamyL* promoters in the recombinant *Bacillus megaterium* MS941 [J]. *Bioresource Technology*, 2008,99(13):5528-5537.

致谢: 本实验的现场采样工作由四川农业大学理学院王丽华和赖欣及四川农业大学养鸡场工作人员等协助完成,在此表示感谢。

作者简介: 侯晟琦(1986-),男,湖南益阳人,四川农业大学博士研究生,主要从事微生物和分子酶学工程研究。

APEC 环境产品清单出炉

亚太经合组织(APEC)第二十次领导人非正式会议 2012 年 9 月 9 日在俄罗斯远东海滨城市符拉迪沃斯托克闭幕。与会各方经过艰苦磋商和谈判,达成了包含 54 个 6 位海关税号的环境产品清单。这意味着 21 位 APEC 成员在 2015 年年底前对这些产品的实施税率将降到 5%或 5%以下。

今年 APEC 会议周的主题是“融合谋发展,创新促繁荣”,会议确定了四大议题,分别是:贸易投资自由化和区域经济一体化;加强粮食安全;建立可靠供应链;推动创新增长合作。

负责经济事务的俄罗斯第一副总理舒瓦洛夫明确表示,本次峰会的主要任务是促进贸易更加自由化,这一任务已顺利完成。据悉,本次会议的重点之一环境产品自由化问题取得了重大成果。

在去年夏威夷 APEC 峰会上,各方提出各经济体在 2012 年要为制定一份 APEC 环境产品清单开展工作,并在 2015 年年底前将这些产品的实施税率降到 5%或 5%以下。

在过去一周的 APEC 领导人非正式会议系列会议上,与会各方经过艰苦磋商和谈判,达成了包含 54 个 6 位海关税号的环境产品清单。在 APEC 峰会上,领导人就在 2015 年将上述清单所列产品如废水处理技术等的应用关税降至 5%或 5%以下达成一致,这些产品还包括测量设备、风电设备、空气和水质量监测系统。

普京在会后举行的新闻发布会上对此成果给予高度评价,称围绕环境产品的谈判在世界贸易组织框架下开展 10 余年但至今未果,而 APEC 率先达成共识,这从一个侧面展现出 APEC 机制的生命力。

APEC 是亚太地区机制最完善、层级最高、影响最大的经济合作论坛。此次会议的举行是增进区域内各方信任、深化相互融合、共创亚太经济美好未来的重要机遇。回顾 20 多年来的发展历程,APEC 为推进本地区贸易和投资自由化、深化区域经济一体化发挥了不可替代的重要作用。

摘自 《中国环境报》

2012-09-11