

芽孢杆菌 L₄ 菌株角蛋白酶的酶学性质研究

张 奇¹, 孙 丹², 杨文博³, 刘 茜³, 白 芳¹

(1.南开大学药学院, 天津 300071; 2.南开大学学报编辑部, 天津 300071; 3.南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘 要:采用室内实验方法,对芽孢杆菌 L₄ 菌株产生的角蛋白酶进行了系列的酶学性质研究。结果表明,以角蛋白溶液为底物时该酶的最适酶促反应温度为 40 ℃,最适酶促反应 pH 为 7.0,其 K_m 值为 $1.88 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max}$ 为 $2.72 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。利用不同的蛋白酶抑制剂进行酶活性抑制实验,发现该酶受邻啡罗啉和 EDTA 的抑制,推测该酶可能是一种含 Zn^{2+} 的金属蛋白酶。微量元素对该酶活力的影响显著, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活力有促进作用,高浓度的 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 明显抑制角蛋白活力。

关键词:芽孢杆菌 L₄; 角蛋白酶; 酶学性质; 酶活力

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2009)10-2189-05

Enzymatic Characteristics of Keratinase from *Bacillus* sp. L₄ Strains

ZHANG Qi¹, SUN Dan², YANG Wen-bo³, LIU Qian³, BAI Fang¹

(1.College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2.Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, Tianjin 300071, China; 3.College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Keratin is one fibrous insoluble animal protein, do not dissolve in water and has a strong anti-decomposition. In this study, one keratinase was purified from *Bacillus* sp L₄ strains, and its characterization was clarified. When keratin was regared as substrate, the optimum reaction temperature of keratinase was 40 ℃, the optimum reaction pH was 7.0, the K_m and $V_{\max}$ value were $1.88 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $2.72 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectively. The results indicated the keratinase had high properties and could be used in hydrolyzing feather to solve environmental pollution. At the same time, different protease inhibitors were selected to test the inhibition activity, and the results showed that the activity of keratinase could be inhibited by o-phenanthroline, eathylene diamine tetraacetic acid(EDTA), but phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) hardly. It suggested that this enzyme was a metal protease containing Zn^{2+} , and was difference from the reported keratinase that almost all were serine-type protease. In addition, ten kinds of trace element including Ba^{2+} , Sn^{2+} , Mg^{2+} , Li^{+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} were used to analyze regulatory activity, the results showed that Ca^{2+} and Mg^{2+} could increased the enzyme activity and high concentration of Fe^{2+} and Cu^{2+} could obviously inhibit its activity.

Keywords: *Bacillus* sp. L₄ strains ; keratinase; enzymatic characteristics; enzyme activity

角蛋白是不溶性的纤维状动物蛋白质,不溶于水,并且具有较强抗分解性^[1]。目前,对角蛋白降解的研究和技术开发已成为一项具有显著环境保护效益和经济效益的应用课题^[2]。降解角蛋白的微生物种类繁多,所分泌的角蛋白酶的酶学性质也各不相同。这不但表现在酶的分泌方式上,还体现在酶的结构、组成、稳定性、反应最适温度、pH 值等诸方面。大部分角蛋白酶为胞外丝氨酸型蛋白酶,最适 pH 多数大于

7.5,甚至高达 10,其最适温度的差异也很大,常温型的为 30 ℃,而耐高温型可达到 80 ℃;适宜底物也各不相同,有的酶对各种蛋白底物均有较高的水解能力,而有的则只水解角蛋白,对于酪蛋白、牛血清白蛋白没有任何酶解作用。在我国,对角蛋白降解的研究相当有限,主要是对弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)的研究^[3]。

本研究从腐烂羊毛中筛选得到具有降解角蛋白能力的芽孢杆菌 L₄ 菌株,对该菌株所分泌的角蛋白酶进行系列的酶学性质研究,发现该酶与报道的角蛋白酶在最适反应温度、最适反应 pH 以及受蛋白酶抑制剂和金属离子影响情况等方面均存在一定的差异,

收稿日期:2009-03-06

作者简介:张 奇(1979—),男,大连人,讲师,主要从事微生物与生化药学方面研究。

通讯作者:孙 丹 E-mail:sundan@nankai.edu.cn

并确认该酶是非丝氨酸型蛋白酶,可能是一种含 Zn^{2+} 的金属蛋白酶。本研究将能够为解决目前存在的禽类羽毛污染问题提供一个有效的生物降解途径,同时也能够为羊毛仿羊绒的工艺研究提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

产角蛋白酶的芽孢杆菌 *L4* 为本实验室自行分离并保存,研究中使用的角蛋白酶为本实验室发酵并纯化,底物角蛋白溶液为本实验室采用羊毛还原法化学水解获得,5,5'-二硫二硝基苯甲酸(DTNB)购于 Sigma 公司,苯甲基磺酰氟(PMSF),邻啡罗啉,乙二胺四乙酸(EDTA)购于上海生物工程有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 角蛋白酶活力的测定

二硫键的检测采用 DTNB 法^[4],取待测溶液 100 μL ,加入 100 μL 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 混匀,1 min 后加入 77 μL 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_3PO_4 中和,使 pH 为 7.0,随后加入 123 μL 蒸馏水使总体积为 400 μL 。取 200 μL 混合液于 96 孔板中,加入 15 μL DTNB 试剂,显色 30 min,于 405 nm 处测定其吸光度,根据氧化型谷胱甘肽(GSSG)的标准曲线计算二硫键含量。

角蛋白酶可以降解角蛋白产生可溶性的氨基酸或小肽,故角蛋白酶活力可依据反应体系中非蛋白二硫键的变化测定。以角蛋白溶液为底物,100 μL 底物与 100 μL 酶液混合后于 40 $^{\circ}\text{C}$ 反应时间 15 min,随后加入 500 μL 10% TCA 沉淀可溶性蛋白,然后采用 DTNB 法测定上清液中非蛋白二硫键增加的量。在上述条件下,将每小时分解角蛋白产生 1 μmol 非蛋白二硫键的酶量定义为一个活力单位。

1.3 温度对酶活力的影响^[5]

以 2%角蛋白溶液为底物,分别在不同温度(25、30、35、40、45、50、55、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$)下保温 30 min,随后测定其角蛋白酶活力,并与未经保温的酶的活力进行比较,计算酶活力残存的百分比,以显示酶在某温度下的耐受性。

1.4 pH 对酶活力的影响

取角蛋白溶液分别以不同 pH(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)的 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液进行透析,然后浓缩至原体积制成不同 pH 的角蛋白底物,随后以相同缓冲液稀释酶液,测定其角蛋白酶活力。将稀释的酶液于最适反应温度下保温 30 min,再进行角蛋白酶活力的测定,并与未经保温的酶的活力进行比较,计算

酶活力残存的百分比,以显示该酶的 pH 耐受性。

1.5 酶的 K_m 值及 $V_{\max}$ 测定

以 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH7.0 磷酸缓冲液稀释角蛋白溶液至 7 种不同的浓度(0.82、1.64、3.28、4.92、6.56、8.2 和 9.84 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),然后分别以上述的角蛋白溶液为底物,测定纯化产物的角蛋白酶活力,并用双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法),以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作图,求该酶以角蛋白为底物时的 K_m 值和 $V_{\max}$ 。

1.6 蛋白酶抑制剂对酶活力的影响

按表 1 在纯化的酶液分别加入相应浓度的抑制剂,在最适反应温度下保温 30 min,随后分别向酶液中加入 2%的角蛋白溶液作为酶促反应底物测定角蛋白酶活力,并计算酶活力残存的百分比。

表 1 抑制剂种类及浓度列表

Table 1 The type and concentration of inhibitors

抑制剂	抑制剂的种类	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
PMSF	丝氨酸型蛋白酶抑制剂	1
		5
邻啡罗啉	锌离子特异性螯合剂	0.02
		1
		5
		10
EDTA	金属离子螯合剂	1
		10

1.7 金属离子对酶活力的影响

选取常见的金属离子(Ba^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Li^{+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+})分别以 1、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度添加至纯化的角蛋白酶溶液中,然后进行角蛋白酶活力的测定,对比分析每种金属离子对角蛋白酶活力的影响。

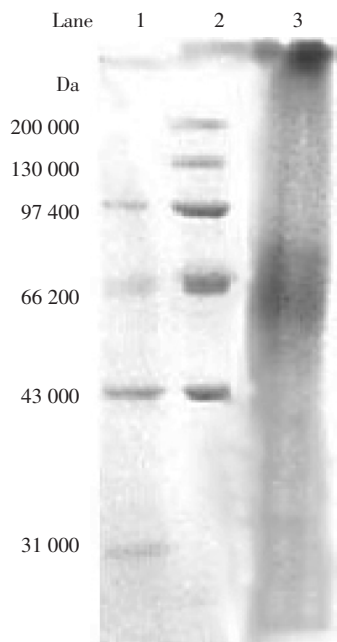
2 结果

2.1 角蛋白溶液的制备

以 β -巯基乙醇还原羊毛的二硫键获得的角蛋白溶液经 Lowry 法测定其浓度为 16.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,收率为 54.67%,该角蛋白溶液完全沉淀需 2.5 倍体积 10% TCA。经 SDS-PAGE 分析检测其分子量主要分布在 52~80 KD 之间,平均分子量为 66 KD(图 1)。

2.2 酶促反应的最适温度及温度耐受性

在以角蛋白溶液为底物时,纯化的角蛋白酶在 30~45 $^{\circ}\text{C}$ 之间具有较高的酶活力,其最适反应温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ (图 2),当温度超过 45 $^{\circ}\text{C}$ 时,以残留的角蛋白酶



Lane 1 低分子量蛋白标准; Lane 2 中高分子量蛋白标准; Lane 3 底物角蛋白溶液

图 1 角蛋白及酪蛋白平均分子量测定

Figure 1 Determination of the M.W. of keratin

的活力与最适温度下酶活性的百分比计算,如图 2 所示。角蛋白酶的活性随温度升高急剧下降,表明该角蛋白酶对高温比较敏感,即对温度的耐受性较低。

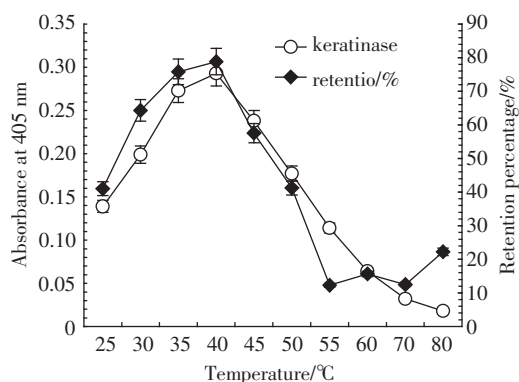


图 2 角蛋白酶最适反应温度及温度耐受性

Figure 2 Optimum temperature and tolerance of keratinase

2.3 角蛋白酶反应的最适 pH 及 pH 耐受性

在以角蛋白溶液为底物时,纯化的角蛋白酶在 pH 6~7 之间具有较高酶活力,其最适 pH 为 7.0 (图 3),当 pH 低于 6 时酶活力体现下降趋势,当高于 7.5 时酶活力迅速下降。以残留角蛋白活性与最适 pH 条件下酶活性的百分比计算,结果表明该酶对碱性环境较为敏感,即耐受性较差。

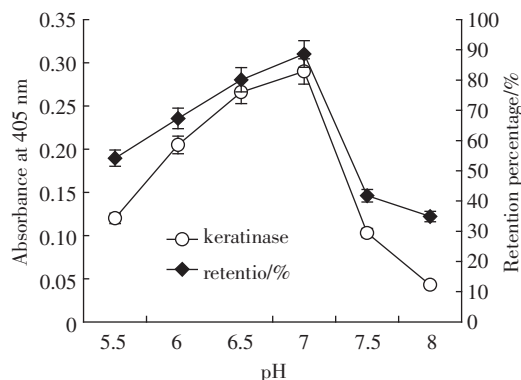


图 3 角蛋白酶反应最适的 pH 及 pH 耐受性

Figure 3 Optimum pH and tolerance of keratinase

2.4 角蛋白酶的 K_m 值及 V_{max}

以角蛋白溶液为底物测定纯化的角蛋白酶的 K_m 值和最大反应速率,采用 Lineweaver-Burk 作图法 (图 4) 求得该角蛋白酶对角蛋白底物的 K_m 值为 $1.88 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, V_{max} 为 $2.72 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

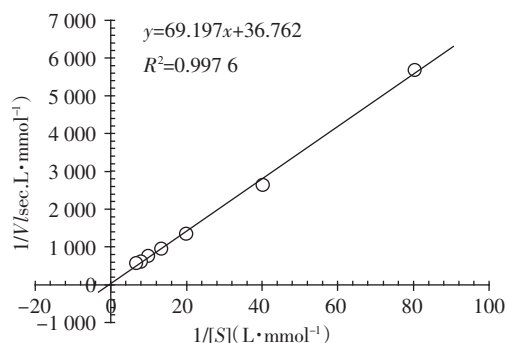


图 4 角蛋白酶的 K_m 值和 V_{max}

Figure 4 K_m and V_{max} of keratinase

2.5 蛋白酶抑制剂对酶活力的影响

3 种蛋白酶抑制剂被选择用于考察蛋白酶抑制剂对该酶活性的影响,以确认该酶可能的种类,结果如图 5 所示。丝氨酸型蛋白酶抑制剂 PMSF 对角蛋白酶的抑制作用相对较弱,锌离子螯合剂邻啡罗啉对于该酶的抑制作用相对明显,金属离子螯合剂 EDTA 则可以全面抑制该酶活性,由此推测该角蛋白酶的活性中心可能含有二价金属离子,可能为含 Zn^{2+} 的金属蛋白酶。

2.6 金属离子对酶活力的影响

本研究考察了 10 种微量元素对纯化的角蛋白酶活力的影响,结果如表 2 所示。 Ca^{2+} 对酶活力有较明显的促进作用, Mg^{2+} 对酶活力有轻微的促进作用,其余的离子对酶活力均有一定的抑制作用,高浓度的 Fe^{2+}

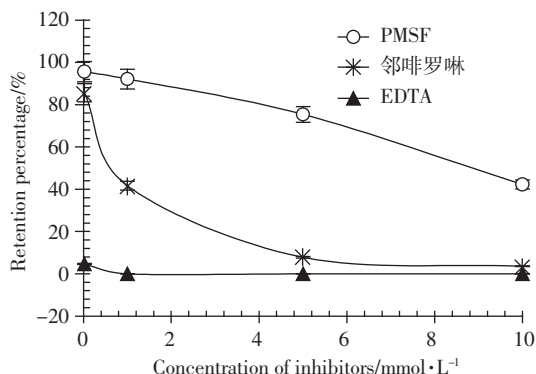


图 5 蛋白酶抑制剂对角蛋白酶活力的抑制

Figure 5 Inhibition of different inhibitors

表 2 金属离子对酶活性的影响

Table 2 Enzyme activity toward different metal ions

无机离子		角蛋白酶活力(A_{405})
Non		0.379±0.025
$Ba^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.287±0.023
	5	0.125±0.015
$Sn^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.184±0.017
	5	0.102±0.013
$Mg^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.512±0.029
	5	0.461±0.032
$Li^{+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.184±0.012
	5	0.214±0.015
$Zn^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.183±0.015
	5	0.208±0.017
$Fe^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.214±0.015
	5	0.035±0.006
$Fe^{3+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.255±0.018
	5	0.183±0.016
$Ca^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.658±0.037
	5	0.594±0.031
$Mn^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.444±0.029
	5	0.345±0.029
$Cu^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	1	0.208±0.017
	5	0.065±0.05

和 Cu^{2+} 抑制角蛋白活力的效果最为明显。

3 讨论

目前,有很多关于角蛋白酶的研究报道,其物种来源也各不相同,如芽孢杆菌属、链霉菌属、寡养单胞菌属等^[6-8]。另外,也有克隆表达角蛋白酶基因的报道, Selvaraj Radha 等分别在毕赤酵母和大肠杆菌属中进行了角蛋白酶的表达、纯化,获得高活力的角蛋

白酶^[9]。

本研究以本实验室制备纯化的角蛋白酶为材料,分别对该酶的酶学性质进行了系列考察。结果表明,该角蛋白酶的最适反应温度 40℃,最适反应 pH 为 7.0,该结果与目前报道的一些角蛋白酶的最适反应温度和 pH 存在一定差异。已报道的多数蛋白酶最适 pH 大于 7.5,甚至高达 10;最适温度差异也很大,从 30℃到 80℃不等^[10-14]。随后,我们对纯化的角蛋白酶进行了蛋白酶抑制剂抑制效果的分析,结果表明该酶的活性受 EDTA 和邻啡罗啉的抑制,故推测该酶可能为含 Zn^{2+} 的金属蛋白酶。在实验中还发现 Ca^{2+} 可以保持酶的活性,这与其他有关金属蛋白酶报道的结果类似^[15]。目前,已报道的角蛋白酶大部分为胞外丝氨酸型蛋白酶^[11],与本研究的金属蛋白酶不同,故在最适反应温度和最适 pH 上也存在显著的差异。

该角蛋白酶的 K_m 值和 V_{max} 的测定结果表明,该酶对角蛋白底物有着较高的亲合性,有可能应用于酶解羽毛进行动物饲料的开发,或用于酶解羊毛脱鳞片制取仿羊绒的新工艺,不仅获得相应的经济效益,还可解决羽毛污染等环境问题。

参考文献:

- [1] 谭盈盈, 郑平. 角蛋白的微生物降解与利用[J]. 中国沼气, 2001, 19(2): 30-34.
TAN Ying-ying, ZHENG Ping. A review of microbial degradation of keratin and its application[J]. *China Biogas*, 2001, 19(2): 30-34.
- [2] 冯景贤. 论羽毛粉蛋白饲料的开发与利用[J]. 饲料工业, 1995, 12(16): 42-43.
FENG Jing-xian. Development and application of feather meal protein [J]. *Feed Industry*, 1995, 12(16): 42-43.
- [3] 姚淑敏, 颜振兰. 羽毛角蛋白酶生产菌的选育及产酶条件研究[J]. 曲阜师范大学学报, 2001, 27: 81-83.
YAO Shu-min, YAN Zhen-lan. Studies on screening of the feather Keratin-degrading microorganisms and the producing of keratinase[J]. *Journal of Qufu Normal University*, 2001, 27: 81-83.
- [4] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82: 70-77.
- [5] 田新玉. 碱性 β -甘露聚糖酶的纯化与性质[J]. 微生物学报, 1993, 33(2): 115-121.
TIAN Xin-yu. Purification and characterization of alkaline β -mannanase[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1993, 33(2): 115-121.
- [6] Cai C G, Chen J S, Qi J J, et al. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain [J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, 9(9): 713-720.
- [7] Dastager G S, Jae C L, Li W J, et al. Dayanand agar production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 1868-1871.

- [8] Cao Z J, Zhang Q, Wei D K, et al. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36: 181–188.
- [9] Selvaraj R, Paramasamy G. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains[J]. *Protein Expression and Purification*, 2009, 64(1): 24–31.
- [10] 狄 瑛, 贺筱蓉, 姚淑敏. 角蛋白酶及其研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13: 79–82.
- DI Ying, HE Xiao-rong, YAO Shu-min. Keratinase and the research progress of keratinase[J]. *Natural Product Research and Development*, 2001, 13: 79–82.
- [11] Onifade A A. 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: 1–11.
- [12] Joseph J Noval, Walter J N. Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1959, 77: 251–263.
- [13] Bockle B, Galunsky B, Muller R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3705–3710.
- [14] Philippe B, Rrancois L, et al. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999(6): 2570–2576.
- [15] Ignalovr Z, Gouslerova A, Spassov G. Isolation and partial characterization of extracellular keatinase from a wool degrading thermo actinomyces candidus[J]. *Can J Microbiol*, 1999, 45(3): 217–222.