



研究报告

芽孢杆菌 N1 碱性蛋白酶的克隆表达及酶学性质

陈秀娟¹ 周成² 龚劲松¹ 史劲松^{*1}

1 江南大学药学院 江苏 无锡 214122

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101

摘要:【背景】蛋白酶广泛应用于制革行业中,酶法脱毛对环境污染较小,但蛋白酶对化学试剂的不稳定性及胶原降解活性限制了其工业应用。【目的】克隆芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) N1 基因组的碱性蛋白酶基因,实现其在大肠杆菌中的异源表达,并对重组酶酶学性质及脱毛作用进行研究。【方法】利用基因组文库法克隆获得蛋白酶基因 *aprG*,构建重组大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3) pLysS/pET-28a-*aprG*。异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达该重组酶,以福林酚显色法对其酶学性质进行研究,并将 AprG 作用于羊皮、兔皮和羽毛。【结果】克隆得到蛋白酶基因 *aprG*,并实现其在大肠杆菌中的表达。重组酶 AprG 最适反应温度为 50 °C,最适反应 pH 为 10.0。各种金属离子对 AprG 活性影响较小,且 AprG 对表面活性剂和氧化剂、还原剂的耐受性较强。底物特异性分析表明,该酶胶原活性较低。AprG 对羊皮和兔皮作用显著,且降解羽毛效果明显。【结论】蛋白酶 AprG 在制革行业中具有良好的应用前景。

关键词: 芽孢杆菌 N1, 克隆, 酶学表征, 低胶原活性, 脱毛作用

Cloning, expression and characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. N1

CHEN Xiu-Juan¹ ZHOU Cheng² GONG Jin-Song¹ SHI Jin-Song^{*1}

1 School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Background] Proteases are widely used in the leather industry because the enzymatic dehairing approaches are environment-friendly. However, the instability to chemical reagents and the collagen degradation activity of proteases limit their industrial applications. [Objective] An alkaline protease gene from genome of *Bacillus* sp. N1 was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The enzymatic properties of the recombinant protease were characterized and its application in dehairing process was discussed. [Methods] Genomic library was constructed to clone the protease gene *aprG*. The recombinant strain *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS/pET-28a-*aprG* was constructed for the protease expression with the induction of isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG). Characterization of

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (21676121)

***Corresponding author:** E-mail: shijs@163.com

Received: 04-04-2018; **Accepted:** 28-05-2018; **Published online:** 21-06-2018

基金项目: 国家自然科学基金(21676121)

*通信作者: E-mail: shijs@163.com

收稿日期: 2018-04-04; 接受日期: 2018-05-28; 网络首发日期: 2018-06-21

the protease was performed through the forint phenol chromogenic method. The dehairing activity to the sheep and rabbit skin as well as feather of the protease was investigated. **[Results]** An alkaline protease gene *aprG* was cloned and expressed in *E. coli* expression system. The characterization of AprG showed that the optimum temperature and pH was 50 °C and 10.0, respectively. The metal ions showed soft influence on the AprG activity. Moreover, the protease AprG exhibited outstanding tolerance to surfactants, oxidants and reducing agents. The investigation on substrate specificity demonstrated that the protease displayed low hydrolysis ability toward collagen. The application study showed that AprG demonstrated effective dehairing on sheep and rabbit skin, and also showed high feather degradation activity. **[Conclusion]** The protease AprG has significant application potential in the leather industry.

Keywords: *Bacillus* sp. N1, Cloning, Enzymatic characterization, Low collagen activity, Dehairing

蛋白酶广泛应用于医药^[1]、皮革^[2-3]、食品^[4-5]、化妆品^[6]等领域。其中,碱性蛋白酶用量占蛋白酶总量的 50%左右。蛋白酶在动物^[7]、植物^[8]、微生物^[9-10]中均存在。

国内外研究的碱性蛋白酶主要来源于芽孢杆菌。目前,大量研究表明,芽孢杆菌来源蛋白酶具有较好的脱毛效果,可以应用在制革工业中^[11]。在制革工业中,利用酶法脱毛比传统灰碱法脱毛的污染更小,而且反应条件温和、水解效率高,可以有效提高制革工业的生产效率和经济效益。但是,酶法脱毛会对皮革中的胶原蛋白产生降解,因此筛选出脱毛效果较好且不会损伤胶原蛋白的蛋白酶具有十分重要的意义^[12]。同时,在工业生产中经常使用大量的化学试剂,因此对表面活性剂耐受性、抗氧化性以及耐碱性等是蛋白酶的重要特性。黄东彦等^[13]对蜡样芽孢杆菌 YSQ08 来源的碱性蛋白酶基因进行研究,并成功在酵母系统进行表达,此蛋白酶最适反应温度为 55 °C,最适 pH 为 8.0,但 Ni²⁺、Hg²⁺等金属离子显著抑制其活性。来源于芽孢杆菌 A21 的丝氨酸蛋白酶分子量为 29 kD,在 pH 7.0-11.0 稳定性较好,当 pH 升至 12.0 时,酶活迅速下降至 20% 以下,且氧化剂 H₂O₂ 对其活性抑制作用明显^[14]。

本实验室前期从内蒙古盐碱湖中筛选得到一株产碱性蛋白酶菌株,其粗酶液对表面活性剂、金属离子、氧化剂和还原剂等耐受性较好。因此本研究中采用基因组文库法克隆其碱性蛋白酶基因,尝试对筛选得到的蛋白酶进行表达及酶学性质研究,

并对此蛋白酶脱毛效果进行评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

芽孢杆菌 N1 从内蒙古盐碱湖中筛选得到;大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3) pLysS 感受态,北京全式金生物技术有限公司;克隆载体 pUC118 *Bam*H I/BAP,宝生物工程(大连)有限公司;表达载体 pET-28a(+),本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器

实验中所用 dNTPs、*rTaq*、 λ -*Hind* III digest、500 bp DNA ladder、DL2000 DNA marker, TaKaRa 公司; *Sau*3A I、Buffer 1.1, Bio-Labs 公司;蛋白胨、酵母粉, OXOID 公司;脱脂奶粉,碧迪医疗器械有限公司。高速冷冻离心机,安徽嘉文仪器有限公司; pH 计,德国赛多利斯(Sartorius)公司。

1.1.3 培养基

野生菌培养基(g/L):酵母膏 1.0,胰蛋白胨 10.0,氯化钠 30.0,硫酸镁 0.2,氯化钙 0.1,磷酸氢二钾 1.0,用 10%碳酸钠调节 pH 至 10.5;

筛选培养基:LB 培养基中添加 10.0 g/L 脱脂牛奶,用 10%碳酸钠调节 pH 至 7.0;

1.2 实验方法

1.2.1 基因组文库构建及功能基因筛选

将已活化的芽孢杆菌 N1 培养液按照 1% 接种量转接于 200 mL 野生菌培养基,培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6,收集菌体。采用酚/氯仿/异戊醇法进行芽孢杆

菌 N1 总 DNA 的提取。*Sau3A I* 酶切芽孢杆菌 N1 基因组, 回收其中的 3–8 kb 酶切片段, 连接至 pUC118 *BamH I*/BAP 载体, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 复苏后涂布至筛选培养基。筛选具有透明圈的菌落, 扩大培养后提取重组质粒, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将所获得的基因序列在 NCBI 上比对分析, 并与相似性最高的几个蛋白酶序列进行比对。

1.2.2 重组菌构建

设计引物 GSF-1 (5'-CATGCCATGGATATGATT GAAGCACCAGCC-3')、GSF (5'-CATGCCATGGAT TTGAGTAAAGTGAGCCTGATTCC-3')和 GSR (5'-CCGCTCGAGTAATTTAGAAGAGCTAGTTGTATAT TCG-3'), 以芽孢杆菌 N1 基因组为模板进行 PCR。PCR 反应体系: 10 \times Buffer 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 引物(20 mmol/L)各 1 μ L, *rTaq* 0.25 μ L, 模板 DNA (100 ng/ μ L) 0.4 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s; 58 $^{\circ}$ C 45 s; 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 *Nco I* 和 *Xho I* 分别双酶切 PCR 产物及载体 pET-28a(+), 切胶回收后进行连接, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS, 挑取转化子, 用 pET-28a(+)-通用引物 T7、T7t 进行 PCR 验证, 并测序验证。

1.2.3 蛋白酶表达

将重组菌按 1% 接种量转接至表达培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 2–3 h, 至 OD_{600} 约为 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 20 $^{\circ}$ C 诱导 20 h, 室温 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 破碎细胞测酶活, 并进行 SDS-PAGE 验证。

1.2.4 酶活测定

采用福林酚法进行蛋白酶活性测定, 将 50 μ L 酶液与 150 μ L 1% 酪蛋白溶液均匀混合, 在一定温度下反应 10 min 后, 以 200 μ L 20% 三氯乙酸溶液终止反应。室温 13 000 \times g 离心 10 min 后, 取 50 μ L 上清液与 250 μ L 0.4 mol/L Na₂CO₃ 溶液混匀后, 加入 50 μ L 福林酚试剂, 混合溶液置于 40 $^{\circ}$ C 显色 20 min, 测定 680 nm 下的吸光度值。酶活力定义: 在一定的反应条件下, 蛋白酶每分钟分解产生 1 μ g 氨基酸

所需的酶量。

1.2.5 酶学性质

(1) 最适温度及温度稳定性

在 pH 10.0 条件下, 分别测定在 20、30、40、45、50、55、60、65、70、80 和 90 $^{\circ}$ C 下 AprG 蛋白酶活性, 以最高酶活为 100%, 确定最适反应温度。将 AprG 酶液分别放置在 40、50 和 60 $^{\circ}$ C 分别处理 10、20、30、40、50 和 60 min, 在 50 $^{\circ}$ C 和 pH 10.0 条件下测定其反应残余酶活, 以未处理的 AprG 活性为 100%。

(2) 最适 pH 及 pH 稳定性

在最适反应温度下, 分别测定在 pH 6.0、7.0、8.0、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0 和 12.0 条件下的 AprG 蛋白酶活性, 以最高酶活为 100%, 确定 AprG 最适反应 pH。将酶液分别放置在 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 和 13.0 处理 60 min, 在最适反应条件下测定 AprG 残余酶活, 以未处理的 AprG 活性为 100%。

(3) 金属离子对酶活的影响

向反应体系中添加不同金属离子溶液(CaCl₂、KCl、MgCl₂、MnCl₂、BaCl₂、CoCl₂、LiCl、FeCl₃、AlCl₃、NaCl、FeCl₂、ZnCl₂), 使反应体系中各金属离子终浓度分别为 1 mmol/L 和 5 mmol/L。在最适反应条件下测定 AprG 酶活, 以未添加金属离子蛋白酶活性为 100%。

(4) 表面活性剂和氧化还原剂对蛋白酶酶活的影响

向反应体系中添加不同化学试剂(吐温-20、40、60、80, Triton X-4、100, DTT 和 H₂O₂), 使反应体系中各种试剂的终浓度为 1%。将 SDS 和 β -巯基乙醇添加至反应体系中, 使其终浓度为 0.25%。在最适反应条件下测定 AprG 酶活, 以未添加任何试剂的蛋白酶活性为 100%。

(5) 底物特异性

配制 1% 不同的底物溶液, 包括天青角蛋白、偶氮酪蛋白、胶原蛋白、牛血清白蛋白、酪蛋白、角蛋白、明胶、羊毛和羽毛, 在最适反应条件下测定 AprG

酶活,以酪蛋白为底物时的 AprG 酶活性为 100%。

(6) 酶学动力学参数测定

以酪蛋白为底物进行 AprG 酶学动力学检测,底物浓度分别配制成 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 mg/mL,按照标准酶活测定方法,在最适反应条件下进行活性检测,用 GraFit 软件作图并进行酶反应动力学参数计算。

1.2.6 应用研究

将羊皮和兔皮切成约 1 cm×1 cm 的小块。将羊皮和兔皮分别放置在 50 mL 的缓冲剂(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)中, AprG 蛋白酶含量为 10 000 U,不添加 AprG 蛋白酶的缓冲液作为空白对照,将含有羊皮和兔皮的混合溶液置于 37 °C、120 r/min 振荡培养 16 h。

向 250 mL 三角瓶添加 0.5 g 羽毛,并分别添加 500 U/mL 的 AprG 酶液及市售碱性蛋白酶各 50 mL,置于 37 °C、220 r/min 条件下降解羽毛,48 h 后对两种蛋白酶降解效果进行比较。

2 结果与分析

2.1 基因组文库构建

按照基因组文库构建法,在大约 4 万个克隆子中,筛选获得一株产透明圈的重组菌,对该重组菌进行分离纯化,提取质粒并测序。

2.2 序列分析

测序结果显示插入片段大小为 2 254 bp,含有完整的开放阅读框 *raprG* 和 *aprG*。*raprG* 起始于 ATG,大小为 894 bp,编码 297 个氨基酸的蛋白(rAprG),rAprG 理论分子量为 31.7 kD,等电点为 4.65。*aprG* 起始于 TTG,大小为 972 bp,编码 323 个氨基酸的蛋白(AprG),AprG 理论分子量为 34.5 kD,等电点为 4.74。AprG 比 rAprG 多出 26 个氨基酸的短肽(NP)。

进一步分析发现, AprG 与肽酶 S8 家族蛋白酶序列相似性最高,活性中心为 Asp (49)、His (86)和 Ser (250)。AprG 氨基酸序列分别与来源于嗜碱芽孢杆菌 (*B. pseudofirmus*) (WP_075681765.1 和

WP_012960798.1)、芽孢杆菌(*B. marmarensis*) DSM 21297 (WP_022629500.1)以及芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) NKS-21 (BAA07142.1)的蛋白酶相似性最高,均高于 98%,序列比对结果如图 1 所示。除此之外, AprG 与来自芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) FJAT-45037 的蛋白酶 (WP_100374256.1)具有 74%的相似性。上述蛋白酶中仅芽孢杆菌 NKS-21 的蛋白酶 ISP-1 有研究报道^[15],但仅限于初步的酶学性质,因而系统开展 AprG 的研究仍有必要。

2.3 重组质粒构建及重组酶表达

分别以 GSF-1/GSR、GSF/GSR 为引物构建重组质粒 pET-28a-*raprG* 和 pET-28a-*aprG*,将重组菌分别涂布于牛奶平板。发现重组大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS/pET-28a-*raprG* 未产生透明圈(图 2A),酶活测定发现无活性。而 AprG 重组蛋白具有蛋白水解活性(图 2B),SDS-PAGE 可见一条大小约为 34 kD 的蛋白条带(图 2C),且该酶对宿主蛋白的降解进一步验证了 AprG 蛋白酶的表达。此结果说明,短肽 NP 对蛋白酶 AprG 的活性具有重要影响。

2.4 酶学性质

2.4.1 最适温度和温度稳定性

图 3A 为 AprG 酶活的最适温度曲线,其最适反应温度为 50 °C,在 20–90 °C 范围内均能保留较高相对酶活,表明 AprG 最适反应温度范围较宽。AprG 温度稳定性结果(图 3B)表明, AprG 在 50 °C 下具有良好的稳定性,即使处理 60 min 残余酶活仍有 50%以上,而在 60 °C 热处理 10 min 后残余酶活为 55%,此后酶活剧烈下降。

2.4.2 最适 pH 及 pH 稳定性

AprG 是十分典型的碱性蛋白酶,最适反应 pH 实验结果(图 4A)表明,当 pH 为 10.0 时 AprG 酶活最大,而在 pH<6.0 时活性基本丧失,当 pH>11.0 后酶活也会急剧下降。稳定性实验结果(图 4B)表明, AprG 蛋白酶在 pH 6.0–11.0 处理 1 h 后残余酶活仍达到 60%以上,而在 pH 5.0 或 pH>12.0 时, AprG 酶活损失较严重。

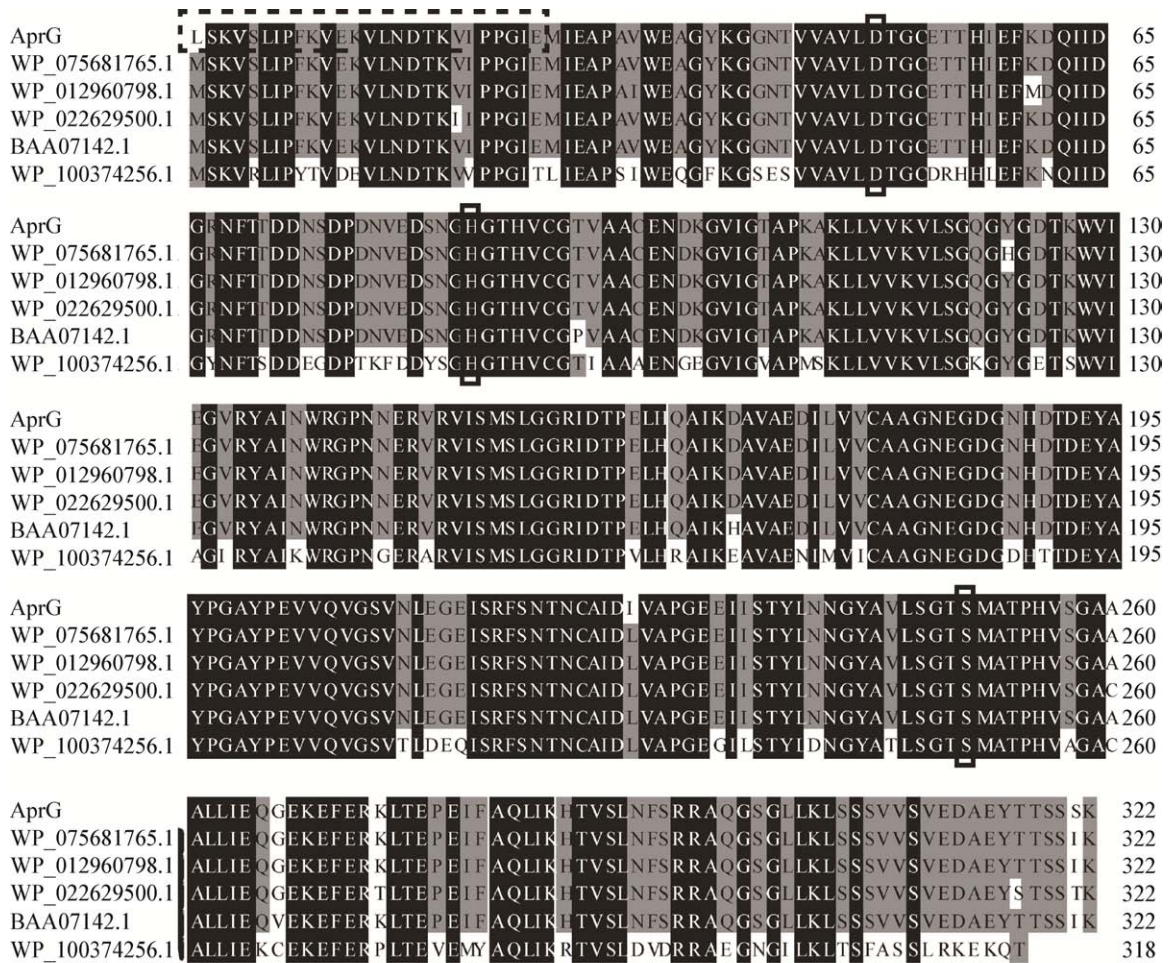


图 1 AprG 序列比对

Figure 1 Multiple sequences alignment of AprG

注: 实线框分别标记蛋白酶活性位点 Asp、His 和 Ser; 虚线框标记 N 端短肽 NP.

Note: The active sites Asp, His and Ser were labeled with solid boxes, respectively; N-terminal peptide was labeled with the dashed box.

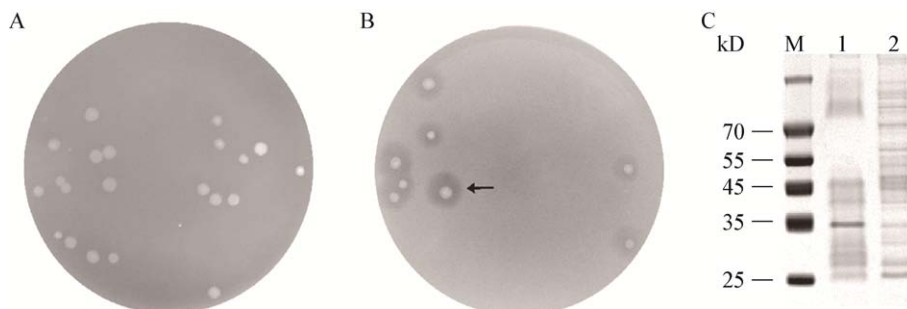


图 2 重组菌水解平板及 SDS-PAGE

Figure 2 Electrophoretic analysis and hydrolysis circle of the recombinant strain

注: A: 重组大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS/pET-28a-raprG; B: 重组大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS/pET-28a-aprG (→: 水解圈); C: AprG 蛋白电泳. M: 蛋白分子标准; 1: AprG 粗酶液; 2: 大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS/pET-28a 破碎液.

Note: A: Recombinant strain *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pET-28a-raprG; B: Recombinant strain *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pET-28a-aprG (→: Hydrolysis circle); C: SDS-PAGE of AprG. M: Protein marker; 1: Crude enzyme of AprG; 2: Fractured fluid of *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pET-28a.

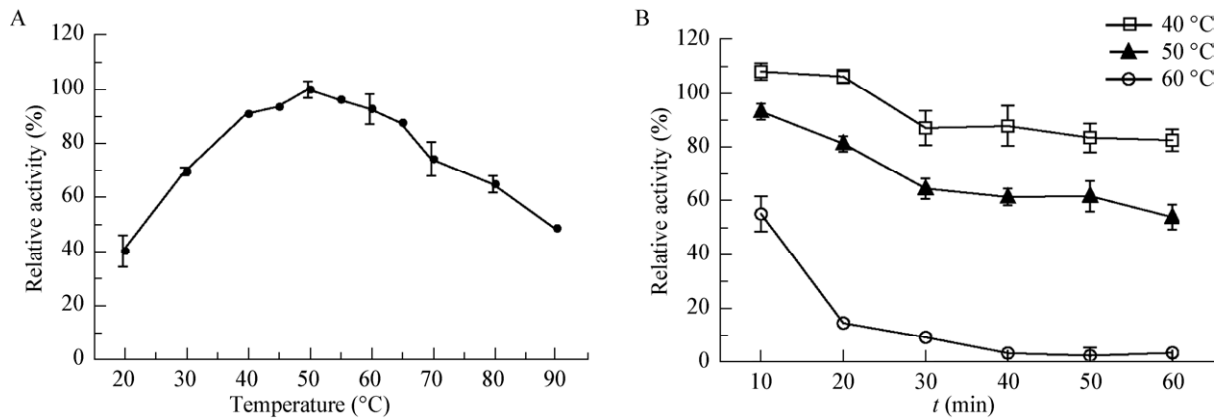


图3 AprG蛋白酶最适反应温度和温度稳定性

Figure 3 Effect of temperature on the activity of AprG protease and its thermo-stability

注: A: AprG最适反应温度; B: AprG温度稳定性.

Note: A: Effect of temperature on the activity of AprG protease; B: The thermo-stability of AprG.

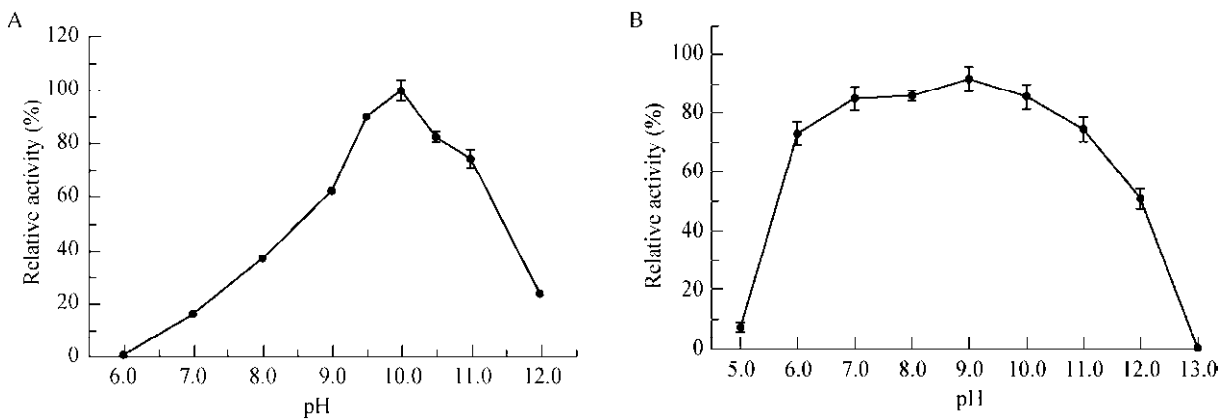


图4 AprG蛋白酶最适反应pH和pH稳定性

Figure 4 Effect of pH on the activity of AprG protease and its pH-stability

注: A: AprG最适反应pH; B: AprG pH稳定性.

Note: A: Effect of pH on the activity of AprG protease; B: The pH-stability of AprG.

2.4.3 金属离子对酶活的影响

测定了不同离子对AprG酶活性的影响,结果如表1所示,1 mmol/L Ba²⁺增强AprG活性达135%,而5 mmol/L Ba²⁺对AprG有轻微抑制作用。其他金属离子在1 mmol/L时对AprG活性的影响都比较小,其中Ca²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺和Co²⁺对活性有促进作用。不同离子浓度为5 mmol/L时均能抑制AprG活性,其中Al³⁺的抑制作用最明显。5 mmol/L Zn²⁺和Fe³⁺对蛋白酶的抑制效果也比较明显,分别为61%和63%。从表1数据可以看出,大部分金属离子对

AprG活性影响较小。

2.4.4 表面活性剂和氧化还原剂对AprG酶活的影响

化学试剂对AprG活性的影响结果如表2所示,表面活性剂吐温-20、40、60、80和Triton X-4、100对AprG活性影响较小,氧化剂H₂O₂存在时AprG活性为87.34%,在强还原剂DTT存在时AprG活性为97.71%,然而0.25%的β-巯基乙醇完全抑制AprG酶活。巯基乙醇能够还原蛋白中的二硫键,破坏蛋白结构的完整性,进而影响蛋白的高级功

表 1 金属离子对 AprG 酶活性的影响

Table 1 Effects of various metal ions on the activity of AprG protease

金属离子 Metal ions	相对活性 Relative activity (%)	
	1 mmol/L	5 mmol/L
K ⁺	102.00±3.58	87.36±2.45
Na ⁺	106.85±1.43	90.61±10.50
Li ⁺	94.644±0.08	90.50±7.40
Ca ²⁺	109.84±2.38	87.66±2.34
Ba ²⁺	134.62±2.91	80.27±3.73
Mn ²⁺	109.00±3.77	80.37±2.98
Mg ²⁺	114.75±5.19	94.40±5.34
Co ²⁺	111.30±1.86	95.88±6.35
Fe ²⁺	100.06±5.17	87.24±4.85
Zn ²⁺	98.59±2.06	60.96±2.54
Fe ³⁺	105.79±1.34	62.61±0.46
Al ³⁺	98.27±1.05	33.27±1.92

表 2 不同化学试剂对 AprG 活性影响

Table 2 Effects of different reagents on the activity of AprG protease

化学试剂 Reagents	浓度 Concentration (%)	相对活性 Relative activity (%)
Tween 20	1.00	93.92±0.14
Tween 40	1.00	94.06±7.70
Tween 60	1.00	100.45±4.43
Tween 80	1.00	107.22±1.63
Triton X-4	1.00	106.57±1.55
Triton X-100	1.00	100.56±2.55
SDS	0.25	51.44±0.84
DTT	1.00	97.71±4.08
H ₂ O ₂	1.00	87.34±1.38
β-Mercaptoethanol	0.25	0±6.46

能。而 AprG 分子中存在 5 个半胱氨酸, 推测这些氨基酸间存在二硫键, 且在维系酶蛋白的催化活性中发挥重要作用。

2.4.5 底物特异性

以不同的底物测定 AprG 的酶活性来评价其对底物的专一性, 结果见图 5。AprG 对角蛋白具有较强的水解活性, 以可溶性角蛋白为底物时相对酶活为 69.92%, 且对羊毛和羽毛这两种不同结构的角蛋白也能够进行水解, 表现出的活性分别为 21.77% 和

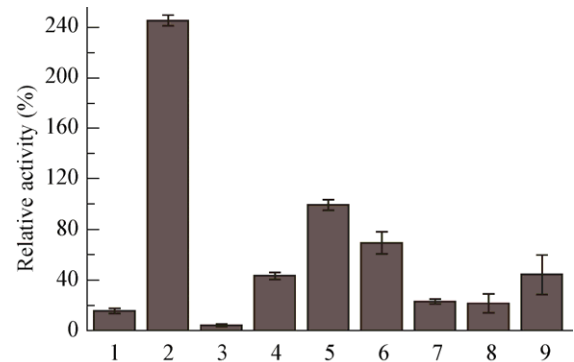


图 5 底物特异性

Figure 5 Substrate specificity of AprG

注: 1: 天青角蛋白; 2: 偶氮酪蛋白; 3: 胶原蛋白; 4: 牛血清白蛋白; 5: 酪蛋白; 6: 可溶性角蛋白; 7: 明胶; 8: 羊毛; 9: 羽毛。

Note: 1: Azure keratin; 2: Azocasein; 3: Collagen; 4: BSA; 5: Casein; 6: Soluble keratin; 7: Gelatin; 8: Wool; 9: Feather.

41.63%。AprG 对胶原活性较低, 其酶活仅为 4.56%, 因而将其作为脱毛蛋白酶使用时理论上对皮革的胶原蛋白层产生的伤害较小。AprG 对其他底物也具有降解作用, 在以偶氮酪蛋白为底物时, AprG 活性高达 246%。

2.4.6 酶学动力学

以酪蛋白为底物探究重组蛋白酶 AprG 的酶学动力学参数中, K_m 和 V_{max} 分别为 12.25 mg/mL 和 56.60 U/(mL·min) (图 6)。

2.5 AprG 蛋白酶的应用

AprG 的脱毛作用在图 7A-D 中显示, 由

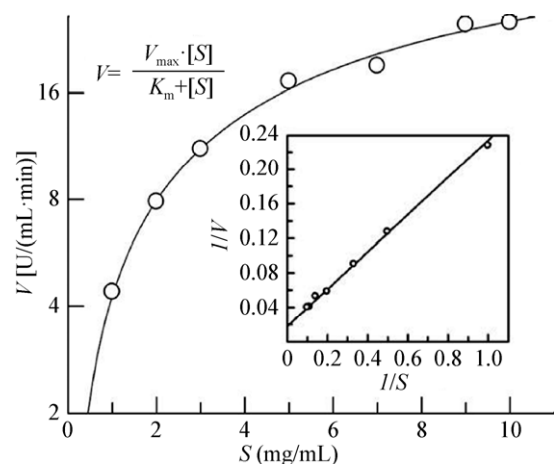


图 6 重组酶的酶反应动力学参数

Figure 6 Kinetic parameters of recombinant protease

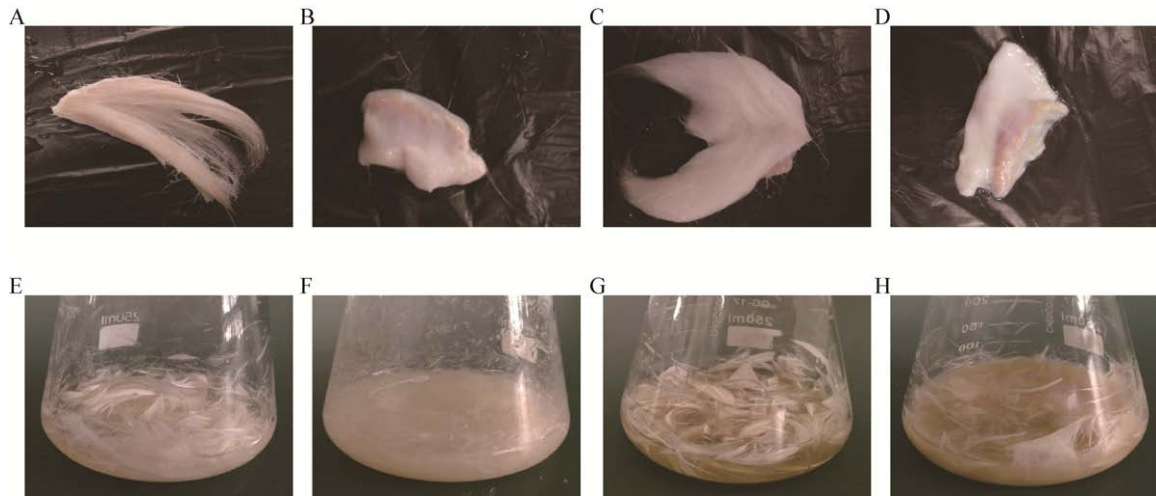


图7 AprG蛋白酶脱毛及羽毛降解效果

Figure 7 Dehairing performance and feather degradation by the AprG protease

注: A: 处理前山羊皮; B: 处理后山羊皮; C: 处理前兔皮; D: 处理后兔皮; E: AprG处理前羽毛; F: AprG处理后羽毛; G: 碱性蛋白酶处理前羽毛; H: 碱性蛋白酶处理后羽毛。

Note: A: The goat skin before dehairing; B: The goat skin after dehairing; C: The rabbit skin before dehairing; D: The rabbit skin after dehairing; E: The feathers before degradation by AprG protease; F: The feathers after degradation by AprG protease; G: The feathers before degradation by alkaline protease; H: The feathers after degradation by alkaline protease.

图7可以看出, AprG对羊皮和兔皮均有显著的脱毛效果。经蛋白酶AprG脱毛后的羊皮和兔皮表面十分光滑,质地比较柔软。与化学法脱毛相比,酶法脱毛更加经济高效,对环境污染较小,适用于绿色制革生产工艺。相比于市售碱性蛋白酶, AprG降解羽毛更彻底,如图7E-H所示。

3 讨论与结论

本文通过基因组文库法从芽孢杆菌N1基因组中克隆得到了蛋白酶基因 $aprG$,构建了重组大肠杆菌BL21(DE3) pLysS/pET-28a- $aprG$,实现了AprG在大肠杆菌中的表达,并对AprG蛋白酶进行了系统的酶学性质及应用研究。

蛋白酶一般由前导肽和C端成熟肽组成,前导肽对蛋白酶的正确折叠至关重要。本文中rAprG蛋白是一个完整的成熟蛋白酶结构域,在大肠杆菌中表达时却无活性,只有在N端同时表达NP短肽时才会展现出蛋白酶活性,因此NP短肽可能是一段前导肽序列,在蛋白表达过程中影响AprG的正确折叠。另外,由于AprG能够降解宿主菌自身蛋白,

会对蛋白表达产生影响,因此AprG表达时应在低温条件下进行,本文选择在20℃下诱导AprG蛋白酶表达。

AprG酶学数据显示,其最适反应温度为50℃,且AprG在40、50和60℃时活性都比较高,最适温度范围较宽。AprG最适反应温度与其他芽孢杆菌来源蛋白酶不同,如来自芽孢杆菌QD-1的蛋白酶最适反应温度为20℃^[9];来自地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) 2709的蛋白酶最适反应温度为50℃^[16];来自枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) I15的高温蛋白酶最适反应温度为65℃^[10]。不同行业需要的蛋白酶反应温度不同,低温蛋白酶可以用于洗涤行业^[9],而高温蛋白酶可用于纺织及食品加工等行业^[17]。蛋白酶ISP-1的最适温度为55℃,但在40℃时其活性仅为60%左右,并且在反应温度为60℃时活性仅为25%左右^[15],本文中的AprG蛋白酶在40–80℃反应时活性均超过60%。同时, AprG在40℃和50℃下稳定性较好,且在60℃处理10 min后残留活性仍然超过50%,而蛋白酶ISP-1 60℃处理10 min后丧失70%活性。AprG最适反应pH

为 10.0, 表明 AprG 属于碱性蛋白酶, 且 AprG 在 pH 6.0–11.0 范围内较稳定, 因此 AprG 可以在工业上应用^[18-19]。

工业生产过程中会用到很多金属离子, 因此要求所用蛋白酶对金属离子有一定的耐受作用^[20], 本文中 AprG 蛋白酶受金属离子影响不大, 符合工业生产要求。而表面活性剂能够与蛋白形成复合物, 破坏蛋白质的盐键、氢键和疏水键, 因此会对蛋白活性产生重大影响, 本文中 AprG 在吐温、Triton 等表面活性剂存在下, 活性保持稳定, 此结果与相似性最高的 ISP-1 蛋白酶一致^[15]。而苍白空气芽孢杆菌(*Aeribacillus pallidus*) C10 来源的碱性蛋白酶同样受金属离子影响较小, 但在 1%吐温-20、80 和 Triton X-100 存在下, 活性均小于 50%^[21]。同时 DTT 和 H₂O₂ 对 AprG 活性影响较小。这些特性表明碱性蛋白酶 AprG 应用于工业生产时具有一定优势。

本文中 AprG 蛋白酶对羊皮和兔皮均具有脱毛作用。AprG 蛋白酶底物谱研究发现, AprG 胶原蛋白活性很低, 而 ISP-1 蛋白酶胶原活性达到以酪蛋白为底物的 20%以上^[15]。动物皮质中含有大量的胶原蛋白, 为了减少对动物皮革中胶原层的损坏, 脱毛过程中需要低胶原活性蛋白酶。本文中碱性蛋白酶 AprG 对羽毛降解作用明显, 羽毛中主要成分为角蛋白, 角蛋白中半胱氨酸含量较高, 易形成二硫键, 使羽毛结构较为稳定, 不容易被降解。而碱性蛋白酶能够作用于侧链为苯环的氨基酸或者疏水氨基酸, 半胱氨酸是疏水氨基酸, 能够被碱性蛋白酶降解, 降解后的羽毛粉可以在皮革填充中得到应用^[22]。另外, 鉴于 AprG 酶学性质方面的优势, 其在制革领域具有潜在的应用价值。本文对 AprG 在制革行业中的应用提供了研究基础。

REFERENCES

- [1] Stenn KS, Link R, Moellmann G, et al. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1989, 93(2): 287-290
- [2] Senthilvelan T, Kanagaraj J, Mandal AB. Application of enzymes for dehairing of skins: cleaner leather processing[J]. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 2012, 14(5): 889-897
- [3] Hu J, Xiao ZB, Zhou RJ, et al. Ecological utilization of leather tannery waste with circular economy model[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2011, 19(2/3): 221-228
- [4] Abdel-Naeem HHS, Mohamed HMH. Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain[J]. *Meat Science*, 2016, 118: 52-60
- [5] Ha M, Bekhit AEA, Carne A, et al. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(1): 95-105
- [6] Seite S, Colige A, Piquemal-Vivenot P, et al. A full-UV spectrum absorbing daily use cream protects human skin against biological changes occurring in photoaging[J]. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 2000, 16(4): 147-155
- [7] Gong C, Zhou AM, Dai JL, et al. Study on the characterization of alkaline proteases from the intestine of Nile tilapia[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(9): 197-200 (in Chinese)
龚翠, 周爱梅, 戴结玲, 等. 尼罗罗非鱼肠道碱性蛋白酶性质的研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(9): 197-200
- [8] Guo DQ, Ji FJ, Gao J, et al. Study on comparison of extraction methods of ficin and enzymatic characterization[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(6): 1258-1260 (in Chinese)
郭冬青, 纪付江, 高健, 等. 无花果蛋白酶的不同提取方法比较及酶学性质研究[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(6): 1258-1260
- [9] Wang FW, Duan SJ, Tong LJ, et al. Identification of producing low-temperature alkaline protease strains from *Undaria pinnatifida* and fermentation conditions and enzymatic properties[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(2): 85-91 (in Chinese)
王凤舞, 段书娟, 仝令君, 等. 产低温碱性蛋白酶菌株 QD-1 的鉴定及产酶条件和酶学性质[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(2): 85-91
- [10] Weng HB, Jing WR, Yang DL, et al. Screening and characterization of an thermophilic alkaline crude protease from an isolated strain of *Bacillus subtilis* I15[J]. *Journal of Zhengzhou University (Engineering Science)*, 2010, 31(1): 70-74 (in Chinese)
翁海波, 敬蔚然, 杨丹丽, 等. 产高温碱性蛋白酶菌株筛选及酶学性质研究[J]. *郑州大学学报: 工学版*, 2010, 31(1): 70-74
- [11] Pan J, Huang Q, Zhang YZ. Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*[J]. *Current Microbiology*, 2004, 49(3): 165-169
- [12] Zhang RX, Gong JS, Su C, et al. Biochemical characterization of a novel surfactant-stable serine keratinase with no collagenase activity from *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93: 843-851

- [13] Huang DY, Mazu S, Zhu H, et al. Recombinant expression of the alkaline protease *aprA* gene from *Bacillus cereus* YSQ08 in *Pichia pastoris*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(12): 105-112 (in Chinese)
黄东彦, Mazu S, 朱辉, 等. 蜡样芽胞杆菌 YSQ08 碱性蛋白酶 *aprA* 基因在毕赤酵母中的表达[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(12): 105-112
- [14] Haddar A, Agrebi R, Bougatef A, et al. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(13): 3366-3373
- [15] Yamagata Y, Ichishima E. A new alkaline serine protease from alkalophilic *Bacillus* sp.: Cloning, sequencing, and characterization of an intracellular protease[J]. *Current Microbiology*, 1995, 30(6): 357-366
- [16] Zhang H, Zhang S, Zhang N, et al. Purification and properties of alkaline protease from *B. licheniformis* 2709[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(2): 129-132,148 (in Chinese)
张浩, 张帅, 张娜, 等. 地衣芽孢杆菌 2709 蛋白酶分离纯化与性质[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(2): 129-132,148
- [17] Zhang L, Sun M, Liu Y, et al. Research on enzyme characteristics and fermentation conditions of the thermophilic neutral protease-producing strain KN1[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(30): 177-181 (in Chinese)
张蕾, 孙萌, 刘岳, 等. 耐高温中性蛋白酶产生菌株 KN1 的部分酶学性质及发酵条件的研究[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(30): 177-181
- [18] Vojcic L, Pitzler C, Körfer G, et al. Advances in protease engineering for laundry detergents[J]. *New Biotechnology*, 2015, 32(6): 629-634
- [19] Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline proteases: a review[J]. *Bioresource Technology*, 1998, 64(3): 175-183
- [20] Haddar A, Bougatef A, Agrebi R, et al. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(1): 29-35
- [21] Yildirim V, Baltaci MO, Ozgencli I, et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017, 32(1): 468-477
- [22] Zhao L, Zhou HL, Hua J. New progress in utilization of feather fibers[J]. *China Leather*, 2011, 40(5): 36-40 (in Chinese)
赵玲, 周华龙, 华坚. 羽毛角蛋白的资源化利用新进展[J]. *中国皮革*, 2011, 40(5): 36-40