

## 鸡毛降解蛋白酶基因的异源表达和性质研究

柯野\*, 植嘉姬, 杨李, 邱小娴, 谷敏, 屈奇奇  
(韶关学院 生物与农业学院, 广东 韶关 512005)

**摘要:**对鸡毛高效降解 *Deinococcus* sp. RM 菌株的基因组, 及其降解鸡毛过程中的转录组进行测序, 筛选出表达量高的蛋白酶基因重组至 *Pichia pastoris* GS115 菌株中进行诱导表达, 对重组蛋白酶分离纯化、酶学性质以及降解鸡毛的效果进行测定。结果表明, RM 菌株共 4 132 个基因, 3 844 个基因表达, 其中 444 个基因表达胞外蛋白, 26 个为胞外蛋白酶。较高表达量的 *sp02200* 基因在 *P. pastoris* GS115 菌株中获得成功表达, 该重组蛋白酶 rSp02200 属于一种新型热应激需求蛋白家族 DegQ 类蛋白酶, 最适反应温度为 37 °C, 在 30 °C 以下保持较好稳定性, 最适 pH 为 7.5, 在 pH 4.0~11.0 能保持 70% 以上蛋白酶活性, 并且能将长、粗的鸡毛羽轴和羽枝降解为细小的羽轴和羽枝。因此, Sp02200 蛋白酶是 RM 菌株降解鸡毛过程中的一种重要酶, 这为探究 RM 菌株降解鸡毛相关基因的研究提供了参考。

**关键词:**鸡毛降解; *Deinococcus* sp. RM 菌株; 转录组; 克隆表达; 酶学性质

**中图分类号:** Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2395(2025)03-0637-10

## Heterologous Expression and Characterization of Chicken Feather-degrading Protease Gene

KE Ye\*, ZHI Jiaji, YANG Li, QIU Xiaoxian, GU Min, QU Qiqi  
(College of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

**Abstract:** The genome of *Deinococcus* sp. RM strain and its transcriptome in the process of chicken feather degradation were sequenced, the protease gene with high expression was selected and recombined in *Pichia pastoris* GS115 strain for induction expression. The purification, enzymatic properties and the effects of chicken feather degradation of the recombinant protease were determined. The results showed that RM strain had 4 132 genes and 3 844 genes expressed, of which 444 genes expressed extracellular proteins and 26 were extracellular proteases. The high expression gene *sp02200* was successfully expressed in the *P. pastoris* GS115 strain. The recombinant protease rSp02200 belonged to a novel DegQ protease of *high-temperature* requirement family, with an optimal reaction temperature of 37 °C, and remained good stability below 30 °C. The optimal pH was 7.5, and maintained more than 70% protease activity at pH 4.0~11.0. The protease can degrade long and thick feather axes and branches into small feather axes and branches. Therefore, Sp02200 protease was an important protease in the chicken feather degradation process of RM strain, which provides a reference for exploring related genes involved in feather degradation of RM strain.

**Key words:** chicken feather degradation; *Deinococcus* sp. RM strain; transcriptome; cloning and expression; enzymatic characteristics

**收稿日期:** 2023-06-09; **接受日期:** 2024-01-27

**基金项目:** 广东省基础与应用基础研究项目(2019A1515011089); 广东省科技创新战略专项资金(大学生科技创新培育)资助项目(pdjh2022a0469); 韶关学院第二十二批教育教学改革研究项目(SYJY20211115); 韶关学院 2022 年度校级“质量工程”建设项目(27)

\* **通信作者:** 柯野(1977-), 男, 四川泸县人, 博士, 教授, 研究方向为微生物学。E-mail: keye518@126.com

**引文格式:** 柯野, 植嘉姬, 杨李, 等. 鸡毛降解蛋白酶基因的异源表达和性质研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2025, 48(3): 637-646. DOI: 10.13451/j.sxu.ns.2024040.

## 0 引言

近年来畜牧养殖业的发展,全球每年有数百万吨的羽毛废弃物产生<sup>[1]</sup>。由于羽毛独特天然结构,自然环境中难被降解,致使病原微生物滋生,释放出NO、H<sub>2</sub>S等污染物成为污染源、危及生活环境<sup>[2]</sup>。羽毛约含有90%角蛋白,角蛋白中高交联二硫键、氢键和疏水性的相互作用,致使成为不溶性蛋白资源,不易被木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶等常见蛋白酶水解<sup>[3]</sup>;目前常采用物理法、机械法和化学法对羽毛进行降解,这些方法存在效率低、副产物多、污染环境等多方面不足。寻求对羽毛高效降解方法成为人们的关注点,利用微生物发酵产生角蛋白酶,特异性水解刚性和高度交联的角蛋白底物,转化为氨基酸或活性肽,实现羽毛废弃物的增值转化<sup>[4-5]</sup>,就成了对羽毛降解的最佳手段之一。

目前,从自然界中分离、筛选出降解羽毛的细菌、放线菌和霉菌有30多种。这些微生物中,多数霉菌对羽毛降解分泌产生的角蛋白酶具有一定致病性<sup>[6]</sup>;因而,对羽毛降解菌株的筛选主要集中于放线菌和细菌,如从自然界中获得放线菌*Streptomyces netropsis*对1.0%浓度羽毛废弃物降解率为(84±2)%<sup>[7]</sup>。降解羽毛报道最多的细菌主要为芽孢杆菌。*Bacillus pumulus*培养6d对含量为0.1%的干羽毛粉降解率为57.0%<sup>[8]</sup>; *B. thuringiensis*培养4d对含量为0.24%的羽毛降解率为78.0%<sup>[9]</sup>; *B. sp. Nno-lim-1*培养4d对含量为1.0%的羽毛降解率为(85.0±1.41)%<sup>[10]</sup>。与报道的大多数菌株相比,本实验室前期分离获得的异常球菌RM菌株(*Deinococcus sp.*)对4.0%鸡毛的降解率高达64.0%,具有潜在的工业应用价值。异常球菌对电离辐射、干燥、紫外线、丝裂霉素和强氧化剂等极端胁迫环境具有极强抗性,这种抗性机理备受关注<sup>[11]</sup>;但有关该属菌株对羽毛降解方面的报道极少,王劲团队以*D. radiodurans*、*D. gobiensis*及*D. geothermalis*为材料,鉴定角蛋白酶基因并在大肠杆菌进行异源表达,并进一步通过理性设计提升了角蛋白酶的热稳定性,但并未对这些菌株降解羽毛的机理进行系统研究<sup>[12-13]</sup>。本研究以前期分离筛选的*Deinococcus*

*sp.* RM菌株为研究对象,对其基因组和转录组测序分析,以期挖掘出鸡毛降解相关表达的蛋白酶基因,并对蛋白酶的性质和羽毛降解效果进行研究,为解析RM菌株高效降解羽毛的机理提供一定参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与主要试剂

pEASY-Blunt质粒购自北京全式金生物技术有限公司; *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、PCR酶[PrimeSTAR<sup>®</sup> HS (Premix)试剂]购自宝日生物技术(北京)有限公司; *Pichia pastoris* GS115菌株、*Deinococcus sp.* RM菌株、pICH表达载体由本实验室保藏提供;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。鸡毛发酵培养基:质量体积百分含量为0.15% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.002 5% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.001 5% FeSO<sub>4</sub>、0.002 5% CaCl<sub>2</sub>、4.0%鸡毛粉和100 mL水。

### 1.2 菌株的全基因组测序

将RM菌株接种在LB(Luria-Bertani)培养基中,28℃、160 r/min振荡培养2 d,12 000 r/min离心2 min,收集菌体。加入100  $\mu$ L十二烷基硫酸钠-三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸-氯化钠(SDS-Tris-EDTA-Sodium chloride buffer, STES)缓冲液重悬菌体,向重悬液中加入100  $\mu$ L酸洗玻璃珠和100  $\mu$ L三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA buffer, TE)缓冲液后,加入120  $\mu$ L酚:氯仿剧烈振荡5 min,12 000 r/min离心5 min,收集上层上清液,依次加入2.5倍体积的无水乙醇和0.1倍体积的乙酸钠,于-20℃放置20 min后,12 000 r/min、4℃离心10 min,弃上清收集核酸沉淀。加入体积百分含量为70%乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min离心5 min收集基因组DNA,自然干燥后,用100  $\mu$ L TE溶液,送至生工生物工程(上海)股份有限公司,采用Illumina HiSeq 2500二代测序平台对该菌株基因组进行高通量测序和组装,将测序获得的全基因组序列提交至GenBank数据库。

### 1.3 菌株的转录组测序

将菌株接种在鸡毛发酵培养基中,28℃、160 r/min培养2 d后,离心收集沉淀物。用无

菌水洗涤沉淀物3次,液氮冻存后,送至上海派诺森生物科技股份有限公司,利用Illumina平台进行测序,测序策略为PE150。

#### 1.4 基因表达分析及蛋白酶基因的筛选

对转录组获得Raw reads去掉接头和低质量的Reads,获得高质量Clean reads。使用Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>)将过滤后的Reads与基因组序列(登录号No. QYCQ00000000.1)进行序列比对分析。为了探究鸡毛降解过程中基因表达情况,采用HTSeq0.6.1p2 (<https://www.huber.embl.de/>)软件统计比较每个基因的Read Count值作为基因原始表达量的参考值;进一步采用FPKM (Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)分析比较基因表达量,基因表达量大于1表明该基因表达,该数值越大表明基因表达量越高;因此,筛选出注释为蛋白酶或者肽酶、含有信号肽的表达基因。

#### 1.5 *sp02200*蛋白酶基因的克隆、工程菌的构建和筛选

参照*sp02200*基因序列(Gene ID: D3W47\_02200),设计引物为P1(5'-CGGAATTC-GCCCCACCAGTCC-3')和P2(5'-CCGTCGAGATTGCTCAGCTTG-3'),下划线分别为EcoR I和Xho I酶切位点,PCR产物不含1-33信号肽编码序列。以基因组DNA为模板,P1和P2引物进行PCR扩增,将PCR产物连接至pEASY-Blunt克隆载体上测序确认。再将测序确认的*sp02200*基因进行EcoR I和Xho I双酶切,连接至pICH载体构建重组表达载体pICH/*sp02200*。对重组表达载体进行Stu I线性化,用基因脉冲Xcell电穿孔系统(Bio-Rad,美国)电击转化至*P. pastoris* GS115菌株中,涂布于基础葡萄糖培养基(Minimal Dextrose Medium, MD)平板上培养2~4 d,挑取单菌落至基础甲醇(Minimal Methanol, MM)牛奶培养基(质量体积百分含量为1.34%酵母氮源基础(Yeast Nitrogen Base, YNB),1.0%甲醇,1.5%脱脂牛奶,1.5%琼脂,100 mL 20 mmol/L pH6.0磷酸缓冲液)培养2~4 d,以重组酵母菌周围产生透明水解圈为筛选标志,筛选出阳性表达子进行基因组PCR,确认*sp02200*基因整合到酵母基因组。

#### 1.6 工程菌在三角瓶中诱导表达

将重组酵母菌接种于装有50 mL缓冲型甘油复合培养基(Buffered Glycerol-complex Medium, BMGY)的250 mL三角瓶中,28 °C振荡培养1 d后,12 000 r/min离心2 min收集菌体,转接(初始接种量OD600约为5.0~6.0)至装有150 mL缓冲型甲醇复合培养基(Buffered Methanol-complex Medium, BMMY)的500 mL三角瓶中振荡培养,每24 h补加1.0%(体积分数)甲醇诱导表达后,12 000 r/min离心10 min收集发酵上清液,即粗酶液。采用Folin-酚法测定蛋白酶活<sup>[14]</sup>,具体操作如下:取100 μL稀释粗酶液和100 μL 2.0%酪蛋白溶液混合,40 °C水浴10 min,加入200 μL 0.4 mol/L三氯乙酸,40 °C水浴20 min后,12 000 r/min离心10 min,取300 μL上清液依次加入1.5 mL 0.4 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和300 μL Folin-酚,摇匀,40 °C水浴20 min,于波长660 nm测定吸光度。酶活单位的定义:40 °C反应下,每分钟水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸为1个酶活力单位。

#### 1.7 重组蛋白酶rSp02200的纯化

粗酶液置于30 kDa透析袋中,20 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.5)透析过夜降低黏度。用10 kDa切向流膜过滤分离系统浓缩,向浓缩液中少量多次添加固体硫酸铵至85.0%饱和度,4 °C过夜盐析,7 000 r/min离心10 min收集沉淀;用适量20 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.5)溶解沉淀后,14 kDa透析袋透析除去硫酸铵;用超滤离心管(Merck Millipore,德国)去杂浓缩后,采用Sephadex G-75(GE Healthcare,美国)层析柱(高约1.5 m、直径15.0 mm),以20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.5)30 mL/h的流速进行洗脱,收集洗脱液,超滤浓缩获得rSp02200。

#### 1.8 rSp02200酶学性质的测定

参考文献[14]测定rSp02200的最适温度、最适pH、热稳定性和pH稳定性,金属离子和化学试剂对活性的影响。测定方法如下:(1)适当稀释的酶与2.0%酪蛋白底物(pH 7.5)混合后,分别于30 °C~60 °C测定酶活,确定最适合反应温度。(2)将酶液分别置于35 °C~60 °C水浴中保温10 min、20 min、40 min、60 min后,测

定残留活性确定热稳定性。(3)将酶液分别置于不同pH缓冲液中透析至对应pH值后,取出适量的酶液与对应pH值的酪蛋白底物进行反应,测定酶活性确定最适反应pH;将前述的酶液继续透析24 h,再快速透析至pH 7.5,测定残余活性确定pH稳定性。(4)酶液中分别添加 $Fe^{3+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 等金属离子至5 mmol/L终浓度,分别添加不同抑制剂,终浓度为0.1%十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)、0.5% SDS、1.0% 曲拉通 X-100(Trion X-100)、1.0 mmol/L 苯甲基磺酰氟(Henylmethanesulfonyl Fluoride, PMSF)、5.0 mmol/L EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)和1.0  $\mu$ mol/L 胃蛋白酶抑制剂(Pepstatin)后,4  $^{\circ}C$ 放置30 min测定残留活性,以确定对活性影响。以未添加任何试剂的酶液作为对照。

### 1.9 rSp02200对鸡毛水解作用

将清洗干净的鸡毛自然风干,121  $^{\circ}C$ 灭菌30 min后,向鸡毛中加入rSp02200酶液(含5 mmol/L二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT))进行酶解反应,过滤收集未降解的鸡毛,采用台式扫描电子显微镜TM3030(HITACHI,日本)观察被酶解情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组的测序分析

RM菌株基因组全长为4 013 254 bp,GC含量67.81%;N50 contig大小为21 827 bp,最长contig 79 609 bp,平均长度12 088.92 bp,含有332个Contig。基因组序列已提交至GenBank(登录号No. QYCQ00000000.1),利用GenBank数据库中原核基因组注释管道(Prokaryotic Genome Annotation Pipeline, PGAP)程序分析可知,RM菌株有4 132个基因,其中3 931个基因编码氨基酸序列。

### 2.2 转录组分析及*sp02200*基因的筛选

转录组测序结果可知,RM菌株表达基因数为3 844个(FPKM>1),占基因总数97.79%;不表达或者低表达的基因数为87个(FPKM<1),占基因总数2.81%;其中胞外表达蛋白质基因444个,利用NR和Swissprot数据库注释这些胞外表达蛋白质,其中有26个为蛋白酶见表1。26个蛋白酶的表达量差异较大,其中Gene ID分别为D3W47\_13255、D3W47\_00370、D3W47\_07110和D3W47\_02200基因的表达量最高,FPKM依次为7 089.0、1 850.5、1 809.8和1 731.5。因此,选择该4个酶基因作为异源表达研究对象。

表1 26个胞外蛋白酶的表达情况

Table 1 Expression effects of the 26 extracellular proteases

序号	基因ID	FPKM	蛋白酶注释
1	D3W47_13255	7 089.03	serine endopeptidase
2	D3W47_00370	1 850.54	peptidase S8/S53 subtilisin
3	D3W47_07110	1 809.78	peptidase S41
4	D3W47_02200	1 731.51	peptidase S1 and S6,serine endoprotease DegQ
5	D3W47_05220	1 524.18	peptidase S8/S53 subtilisin
6	D3W47_05225	1 495.72	peptidase-like protein
7	D3W47_13055	678.93	subtilisin-like serine protease
8	D3W47_05235	669.51	Dipeptidyl peptidase IV-related protein
9	D3W47_03725	553.96	peptidase-M37
10	D3W47_11540	243.41	peptidase S8
11	D3W47_16665	228.31	metallopeptidase
12	D3W47_18630	185.09	peptidase M50
13	D3W47_02940	142.20	peptidase S8
14	D3W47_07075	110.03	alpha/beta hydrolase fold family protein
15	D3W47_05880	104.82	peptidase M23 family
16	D3W47_04185	97.25	Trypsin-like serine protease
17	D3W47_04010	93.01	serine protease
18	D3W47_16405	68.57	Peptidase C39
19	D3W47_17065	58.39	carboxypeptidase A

续表1 26个胞外蛋白酶的表达情况

Continued Table 1 Expression effects of the 26 extracellular proteases

序号	基因ID	FPKM	蛋白酶注释
20	D3W47_09535	45.90	Peptidase S41
21	D3W47_09725	40.30	L-alanine amidase
22	D3W47_18750	31.37	peptidase M23B
23	D3W47_08090	25.04	NLP/P60
24	D3W47_13585	20.26	peptidase S8 and S53 subtilisin
25	D3W47_02590	12.25	Peptidase M23B
26	D3W47_11035	12.25	aminopeptidase

### 2.3 *sp02200*基因克隆及其序列分析

以RM菌株基因组为模板,P1和P2引物PCR扩增出预期PCR产物(1 071 bp),PCR产物的测序结果表明*sp02200*基因克隆成功。*sp02200*基因表达的Sp02200有357个氨基酸残基,为热应激需求蛋白家族DegQ类蛋白酶(GenBank数据库 Conserved Protein Domain Family: COG0265)。Sp02200序列与该类其他成员的序列一致性低,其中序列一致性最高的*E. coli* DegQ(PDB code: 3STJ.1.A)才33.56%<sup>[15]</sup>,其次*Legionella fallonii*的DegQ(PDB code: 3pv4.1.A.1.A)为27.61%<sup>[16]</sup>,*L. pneumophila*的DegQ(PDB code: 4YO1.1.A)为26.94%<sup>[17]</sup>,序列比对见图1。

以*E. coli*的DegQ(PDB code: 3STJ.1.A)为模板同源建模rSp02200的3D结构见图2;rSp02200由6个 $\alpha$ 螺旋、1个 $3_{10}$ 螺旋、17个 $\beta$ -折叠和多个无规则卷曲组成(便于叙述,将第一个氨基酸残基E序号定义为1,以此类推),1-204为催化结构域,H50、D80和S154为保守催化三联体残基;205-322为PDZ结构域,主要为结合底物和控制蛋白酶功能的作用。

### 2.4 rSp02200在毕赤酵母中的诱导表达和纯化

将*P. pastoris* GS115转化子涂布于MD平板培养,挑取单菌落,转接至MM牛奶培养基平板上,培养1~2 d可见多数转化子周围出现凝乳现象,继续培养变为透明水解圈。挑取水解圈/菌落直径最大的菌株进行基因组PCR验

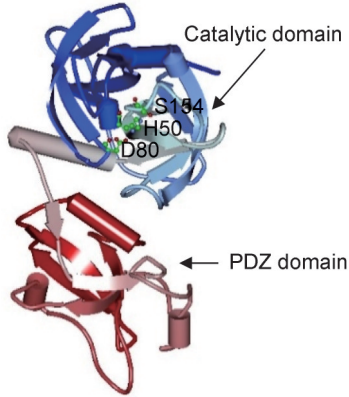


注:表示保守的活性位点残基;框内为 $\beta$ 折叠;框内为 $\alpha$ 螺旋;红色三角表示活性位点残基。

Note:  $\beta$  strands and  $\alpha$  helices of the proteases are in the box and the arrows, respectively; Active-site residues are marked in red solid triangles.

图1 rSp02200与几种DegQ类蛋白酶序列的同源比对

Fig. 1 Homologous alignment of sequences of rSp02200 with several DegQ proteases



注:柱状表示 $\alpha$ 螺旋;条带表示 $\beta$ 折叠;线状表示卷曲;用CPK模型表示催化活性残基S154(上)、H50(中)、D80(下)。  
Note: Columns, bands and lines indicate  $\alpha$  helices,  $\beta$  folding and irregular coil, respectively; catalytic active residues S154 (upper), H50 (middle) and D80 (lower) are marked by CPK model.

图2 rSp02200同源建模的3D结构

Fig. 2 3D structure of rSp02200 with homologous modeling

证,成功扩增出 *sp02200* 基因,这表明 *sp02200* 基因在毕赤酵母中成功表达。将重组酵母菌株在三角瓶中诱导表达时,诱导 120 h 发酵液酶活性最高 (25.4 U/mL)。将发酵液中的 rSp02200 经过一系列纯化后的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 见图 3; 在约 35.0 kDa 处有单一蛋白条带,与 rSp02200 氨基酸残基序列推导的分子量基本一致。由此可见,该条带为纯化的 rSp02200。

2.5 rSp02200的酶学性质

2.5.1 温度和pH对rSp02200活性和稳定性的影响

温度和 pH 值对 rSp02200 活性及稳定性的影响见图 4。rSp02200 最适反应温度为 37 °C;

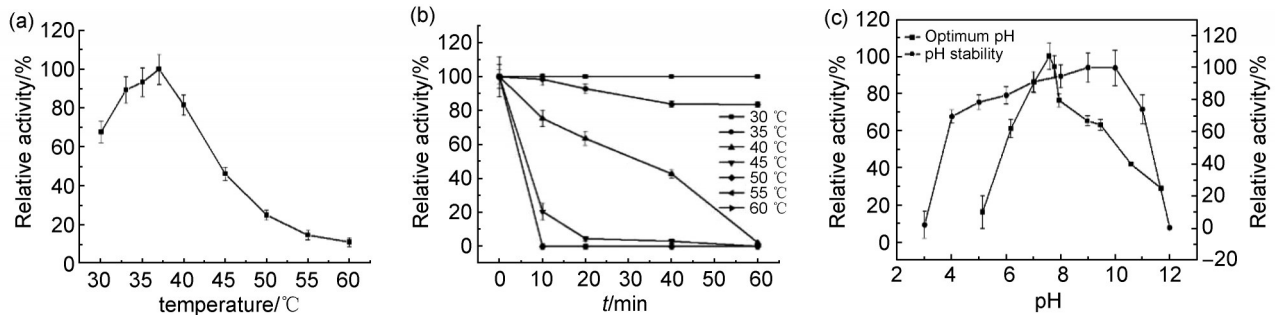
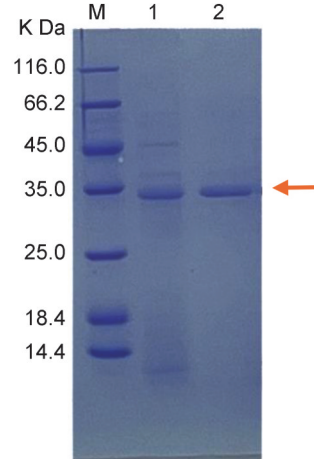


图4 温度和pH对rSp02200活性和稳定性的影响

(a) 温度对rSp02200活性的影响; (b) 温度对rSp02200稳定性的影响; (c) pH对rSp02200的活性及稳定性影响。

Fig. 4 Effects of temperature and pH on activity and stability of rSp02200

(a) Effects of temperature on the activity of rSp02200; (b) Effects of temperature on thermal stability of rSp02200; (c) Effects of pH on the activity and stability of rSp02200.



注:M: 蛋白质分子量标记; 1:盐析; 2:Sephadex G75层析。  
Note: M: Protein molecular weight markers; 1: Salting out; 2: Sephadex G75 chromatography.

图3 纯化rSp02200的SDS-PAGE电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified rSp02200

在 30 °C 以下保持较好稳定性,当超过 35 °C 稳定性逐渐降低,高于 50 °C 时保温 10 min 后,几乎完全丧失活性。rSp02200 最适反应 pH 为 7.5, pH 4.0~11.0 保持较好稳定性, pH 高于 11.0 或者低于 4.0 时,稳定性显著下降,当 pH 为 3.0 或 12.0 时,几乎完全失活。

2.5.2 金属离子与抑制剂对rSp02200活性的影响

不同金属离子和抑制剂对 rSp02200 活性的影响见表 2。Fe<sup>3+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 对 rSp02200 活性具有抑制作用,其中 Fe<sup>3+</sup> 抑制作用最显著 (抑制率 24.29%), Zn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 对 rSp02200 活性具有促进作用, Ca<sup>2+</sup> 影响不显著。Pepstatin、EDTA、表面活性剂 SDS 和表面活性剂 Trion X-100 对 rSp02200 有抑制作用; 0.5% SDS

表2 金属离子及化学试剂对rSp02200活性的影响

Table 2 Effects of metal ions and chemical reagents on the activity of rSp02200

试剂	浓度	相对酶活/%	试剂	浓度	相对酶活/%
None	0.0	100.00	Ni <sup>2+</sup>	5.0 mmol/L	105.60±0.03
Fe <sup>3+</sup>	5.0 mmol/L	75.71±0.08	Cu <sup>2+</sup>	5.0 mmol/L	95.60±0.07
Fe <sup>2+</sup>	5.0 mmol/L	96.83±0.06	EDTA	5.0 mmol/L	91.13±0.07
Mn <sup>2+</sup>	5.0 mmol/L	96.88±0.06	SDS	1 g/L	53.30±0.03
Ca <sup>2+</sup>	5.0 mmol/L	99.58±0.10	SDS	5 g/L	2.28±0.10
Zn <sup>2+</sup>	5.0 mmol/L	104.65±0.03	PMSF	1.0 mmol/L	9.89±0.04
Mg <sup>2+</sup>	5.0 mmol/L	105.07±0.05	Pepstatin	3.0 μmol/L	88.05±0.06
K <sup>+</sup>	5.0 mmol/L	105.49±0.02	Trion X-100	10 g/L	78.85±0.24

或苯甲基磺酰氟(Henylmethanesulfonyl Fluoride, PMFS)几乎能使rSp02200完全失去活性。

### 2.6 rSp02200对鸡毛的酶解作用

rSp02200对鸡毛酶解的结果见图5。鸡毛被酶解后,较大的羽轴断裂,羽枝以及羽小枝被酶解为碎絮状(图5(a))。未被酶解的鸡毛羽小枝表面光滑、结构完整(图5(b).A),酶解后的羽小枝绒毛皱缩软化(图5(b).B)、部分绒毛脱落(图5(b).C)、羽小枝表面起皱、粗糙、绒毛断裂脱落(图5(b).D);由此可见,rSp02200对鸡毛的酶解过程中,将长、粗羽轴(枝)酶解断裂为细小的羽轴和羽枝,而更细小羽枝、羽绒酶解变为氨基酸或者小肽溶解在溶液中;这与其他角蛋白酶对羽毛的酶解变化过程基本一致<sup>[18]</sup>。

## 3 讨论

近年来,从自然界中分离筛选降解羽毛的

微生物菌株越来越受到重视,相关微生物菌株的报道逐渐增多。这些菌株在较低羽毛浓度下才有较高降解效率,这是由于羽毛浓度高于15 g/L,即100 mL鸡毛发酵培养基中鸡毛的量大于1.5 g时,菌株分泌胞外蛋白酶被抑制,致使羽毛不能被高效降解;如*Streptomyces exfoliatus* CFS 1 068菌株对0.5%羽毛发酵降解率为96.6%,而对2.0%羽毛的降解率为72.1%<sup>[19]</sup>。降解羽毛的细菌多数为芽孢杆菌(*Bacillus*),这些菌株对羽毛的降解效率也较低<sup>[8-10]</sup>。本文RM菌株为异常球菌(*Deinococcus*),对4.0%鸡毛降解率高达64.0%;这表明RM菌株对扩大羽毛降解菌株的种属筛选提供了参考,并且该菌株比目前报道的多数菌株具有更强的应用潜力。

微生物降解羽毛是一个多因素协同作用的过程,即微生物自身的机械作用、硫解作用以及胞外蛋白酶的酶解作用<sup>[20-21]</sup>;如*B. amylioliq-*

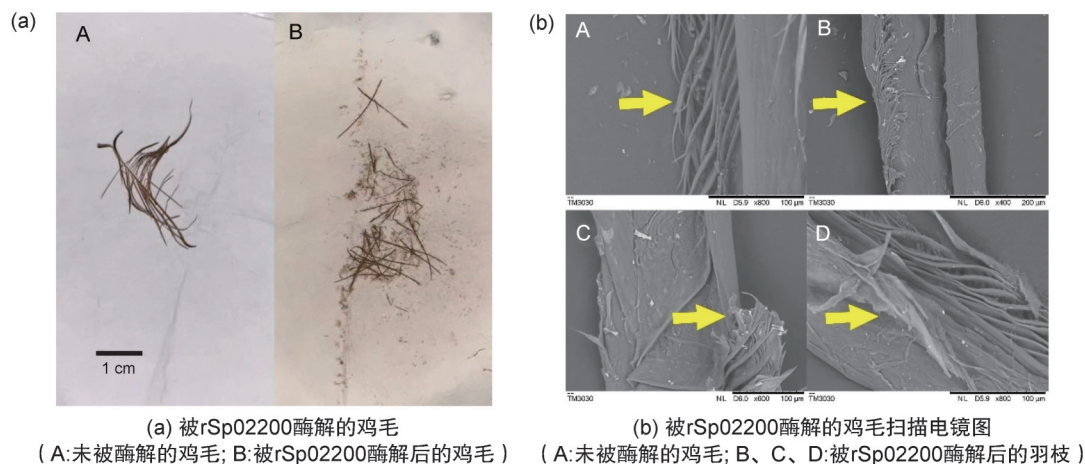


图5 rSp02200对鸡毛的酶解效果

Fig. 5 Degradation effects of rSp02200 on chicken feather

*uefaciens* ACCC19735 菌株分泌氨肽酶、羧肽酶、角蛋白酶和氧化还原酶的共同作用下降解羽毛<sup>[22]</sup>, *Ferrodobacterium islandicum* AW-1 菌株产生多种类型胞外蛋白酶使鸡毛降解<sup>[23]</sup>。本文 RM 菌株对鸡毛降解过程中,共有 3 844 个基因表达,其中丝氨酸蛋白酶基因、金属蛋白酶基因等 26 个胞外蛋白酶基因进行了表达。虽然这些蛋白酶基因表达量具有显著差异性,但是对鸡毛的降解可能是 26 种胞外蛋白酶协同酶解的共同结果。

本文对表达量最高的 4 种胞外蛋白酶基因(Gene ID 分别为 D3W47\_13255、D3W47\_00370、D3W47\_07110 和 D3W47\_02200)采用了多种异源表达系统,即用大肠杆菌 BL21 表达系统(表达载体 pET-22(b))以包涵体形式表达,包涵体溶解无活性;在枯草芽孢杆菌 WB800 表达系统(表达载体 pMA5q)和毕赤酵母 GS115 表达系统(表达载体 pICH)中,只有 *sp02200* 基因(Gene ID: D3W47\_02200)在毕赤酵母中成功表达(酶活最高为 25.4 U/mL),来源于戈壁异常球菌 I-0 菌株表达的蛋白酶 kerDG1 和 kerDG2 基因在枯草芽孢杆菌表达系统中的酶活分别为 3.5 U/mL 和 3.0 U/mL<sup>[12]</sup>;这表明蛋白酶基因的异源表达和表达量等方面受宿主、表达载体、基因自身编码的氨基酸序列等多种因素影响。对于这 3 种高表达量蛋白酶基因可采用更换表达载体、融合蛋白等手段进一步探索其异源表达;另外 22 种蛋白酶基因有待于采用异源表达研究酶学性质、降解鸡毛能力、结构与功能关系。

角蛋白酶是指能水解角蛋白的蛋白酶,该酶在自身作用下或者二硫化物还原酶或还原催化剂协助下打开角蛋白复杂交织的二硫键,释放出角蛋白肽链,对肽链水解为氨基酸或者肽链,实现角蛋白的降解,一般为丝氨酸蛋白酶或者金属蛋白酶<sup>[24-25]</sup>。rSp02200 能将长、粗羽轴(枝)通过酶解作用断裂为细小的羽轴和羽枝,具有降解鸡毛的功能,这表明 rSp02200 具有角蛋白酶功能。DegQ 类蛋白酶一般包含一个肽酶催化域和 2 个 PDZ 结构域,PDZ 结构域相互作用形成具有活性的 DegQ 蛋白酶多聚体,从而监测细菌包膜(周质)中的蛋白质,并切割

错误折叠的蛋白质底物<sup>[15-17]</sup>,然而鲜见该类酶具有角蛋白酶性质报道。Sp02200 为热应激需求蛋白家族 DegQ 类丝氨酸蛋白酶,含有一个肽酶催化域和一个 PDZ 结构域。Sp02200 与家族其他成员的氨基酸残基序列一致性低(最高 33.56%),保守性差。在肽酶催化域序列中,Q26~C27 残基之间至少缺失相差 20 个残基的肽链;然而催化三联体附近的残基相对较保守,特别是丝氨酸催化残基位于丝氨酸水解酶保守的“Gly-X-Ser-X-Gly”Motif 结构中。在 PDZ 结构域序列中, $\alpha$ 螺旋或 $\beta$ 折叠二级结构的起始氨基酸残基 I210、E230、G241A242、S251、D273、G299、K311P312 较保守,其余残基均不保守;并且 F216~C228 和 P260~G272 残基之间分别增加了 10 个残基以上的肽链。这表明 Sp02200 在氨基酸残基的组成(序列中的氨基酸残基有替换、删除、取代或者插入)、二级结构、loop 环和聚合方式(1 个 PDZ 结构域)与该家族其他成员存在显著差异。rSp02200 在 pH 4.0~11.0 都能保持 70% 以上稳定性,比同类酶具有更好的耐碱性,在皮革工业、洗涤工业上具有一定开发应用优势<sup>[26]</sup>。总之,Sp02200 在氨基酸序列、结构和酶学性质等方面与该家族其他成员间具有较大差异,作为一种新蛋白酶,其结构与功能关系、应用潜力等方面有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] VERMA A, SINGH H, ANWAR S, *et al.* Microbial Keratinases: Industrial Enzymes with Waste Management Potential[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, **37**(4): 476-491. DOI: 10.1080/07388551.2016.1185388.
- [2] DE MENEZES C L A, SANTOS R D C, SANTOS M V, *et al.* Industrial Sustainability of Microbial Keratinases: Production and Potential Applications[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, **37**(5): 86. DOI: 10.1007/s11274-021-03052-z.
- [3] RAMAKRISHNA REDDY M, SATHI REDDY K, RANJITA CHOUHAN Y, *et al.* Effective Feather Degradation and Keratinase Production by *Bacillus pumilus* GRK for Its Application as Bio-detergent Additive[J]. *Bioresour Technol*, 2017, **243**: 254-263. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.067.
- [4] WANG Z, CHEN Y Z, YAN M C, *et al.* Research Prog-

- ress on the Degradation Mechanism and Modification of Keratinase[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, **107**(4): 1003–1017. DOI: 10.1007/s00253-023-12360-3.
- [5] PENG S Y, LI H G, ZHANG S W, *et al.* Isolation of a Novel Feather-degrading *Ectobacillus* Sp. JY-23 Strain and Characterization of a New Keratinase in the M4 Metalloprotease Family[J]. *Microbiol Res*, 2023, **274**: 127439. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127439.
- [6] MOUSAVI S, SALOUTI M, SHAPOURY R, *et al.* Optimization of Keratinase Production for Feather Degradation by *Bacillus subtilis*[J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2013, **6**(8): 7160. DOI: 10.5812/jjm.7160.
- [7] ABDELMOTELEB A, GONZALEZ-MENDOZA D, TZINTZUN-CAMACHO O, *et al.* Keratinases from *Streptomyces netropsis* and *Bacillus subtilis* and Their Potential Use in the Chicken Feather Degradation[J]. *Fermentation*, 2023, **9**(2): 96. DOI: 10.3390/fermentation9020096.
- [8] DHIVA S, AKSHARA C, AFNA K, *et al.* Optimization of Keratinase Production and Utilization of *Bacillus pumilus* for Feather Degradation[J]. *J Pure Appl Microbiol*, 2020, **14** (4): 2483–2489. DOI: 10.22207/jpam.14.4.26.
- [9] ELLEBOUDY N S, TRABIK Y A, ABOULWafa M M. Optimization of Feather Degradation by a *Bacillus thuringiensis* Isolate Using Response Surface Methodology and Investigation of the Feather Protein Hydrolysate Structure[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2023, **70**(3): 1258–1269. DOI: 10.1002/bab.2436.
- [10] NNOLIM N E, OKOH A I, NWODO U U. Proteolytic Bacteria Isolated from Agro-waste Dumpsites Produced Keratinolytic Enzymes[J]. *Biotechnol Rep*, 2020, **27**: e00483. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00483.
- [11] 刘梦葭, 杨粟, 程凯莹, 等. 奇球菌属的最新研究进展及其应用[J]. *核农学报*, 2017, **31**(9): 1723–1729. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2017.09.1723.
- LIU M J, YANG S, CHENG K Y, *et al.* Research Progress of *Deinococcus* and Its Application[J]. *J Nucl Agric Sci*, 2017, **31**(9): 1723–1729. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2017.09.1723.
- [12] 耿秀秀. 异常球菌角蛋白酶的异源表达和羽毛降解特性研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2019.
- GENG X X. Heterogenous Expression and Feather Degradation of Keratinases from the Genus of *Deinococcus*[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2019.
- [13] 唐殷. 异常球菌属角蛋白酶的功能鉴定与热稳定性改造[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2021. DOI: 10.27415/d.cnki.gxngc.2021.000362.
- TANG Y. Functional Characterization and Thermostability Modification of *Deinococcus* Keratinases[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2021. DOI: 10.27415/d.cnki.gxngc.2021.000362.
- [14] KE Y, YUAN X M, LI J S, *et al.* High-level Expression, Purification, and Enzymatic Characterization of a Recombinant *Aspergillus sojae* Alkaline Protease in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expr Purif*, 2018, **148**: 24–29. DOI: 10.1016/j.pep.2018.03.009.
- [15] SAWA J, MALET H, KROJER T, *et al.* Molecular Adaptation of the DegQ Protease to Exert Protein Quality Control in the Bacterial Cell Envelope[J]. *J Biol Chem*, 2011, **286**(35): 30680–30690. DOI: 10.1074/jbc.M111.243832.
- [16] WRASE R, SCOTT H, HILGENFELD R, *et al.* The *Legionella* HtrA Homologue DegQ is a Self-compartmentizing Protease that Forms Large 12-meric Assemblies[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(26): 10490–10495. DOI: 10.1073/pnas.1101084108.
- [17] SCHUBERT A, WRASE R, HILGENFELD R, *et al.* Structures of DegQ from *Legionella pneumophila* Define Distinct ON and OFF States[J]. *J Mol Biol*, 2015, **427**(17): 2840–2851. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.06.023.
- [18] HE Z F, SUN R, TANG Z Z, *et al.* Biodegradation of Feather Waste Keratin by the Keratin-degrading Strain *Bacillus subtilis* 8[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, **28** (2): 314–322. DOI: 10.4014/jmb.1708.08077.
- [19] JAIN R, JAIN P C, AGRAWAL S C. Feather Degradation by *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068[J]. *Ann Microbiol*, 2012, **62**(3): 973–978. DOI: 10.1007/s13213-011-0336-0.
- [20] PENG Z, ZHANG J, DU G C, *et al.* Keratin Waste Recycling Based on Microbial Degradation: Mechanisms and Prospects[J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2019, **7**(11): 9727–9736. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01527.
- [21] PARRADO J, RODRIGUEZ-MORGADO B, TEJADA M, *et al.* Proteomic Analysis of Enzyme Production by *Bacillus licheniformis* Using Different Feather Wastes as the Sole Fermentation Media[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2014, **57**: 1–7. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2014.01.001.
- [22] 杜永凯. 解淀粉芽孢杆菌降解角蛋白机制的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- DU Y K. Preliminary Study of Keratin Degradation Mechanism of *Bacillus Amyloliquefaciens*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
- [23] KANG E, JIN H S, LA J W, *et al.* Identification of Keratinases from *Fervidobacterium islandicum* AW-1 Using Dynamic Gene Expression Profiling[J]. *Microb*

- Biotechnol*, 2020, **13**(2): 442–457. DOI: 10.1111/1751-7915.13493.
- [24] LANGE L, HUANG Y H, BUSK P K. Microbial Decomposition of Keratin in Nature: A New Hypothesis of Industrial Relevance[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, **100**(5): 2083–2096. DOI: 10.1007/s00253-015-7262-1.
- [25] GUPTA R, RAMNANI P. Microbial Keratinases and Their Prospective Applications: An Overview[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **70**(1): 21–33. DOI: 10.1007/s00253-005-0239-8.
- [26] MORIDSHAHI R, BAHREINI M, SHARIFMOGHADAM M, *et al.* Biochemical Characterization of an Alkaline Surfactant-stable Keratinase from a New Keratinase Producer, *Bacillus zhangzhouensis*[J]. *Extremophiles*, 2020, **24**(5): 693–704. DOI: 10.1007/s00792-020-01187-9.