



基于 DoseResp 模型的角蛋白酶发酵策略研究及其在血栓降解中的应用

刘燕凌¹, 苏畅¹, 龚劲松^{1*}, 陈玉新¹, 李恒¹, 许正宏^{2,3}, 史劲松¹

1 江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学, 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

3 四川大学 轻工科学与工程学院, 四川 成都 610065

刘燕凌, 苏畅, 龚劲松, 陈玉新, 李恒, 许正宏, 史劲松. 基于 DoseResp 模型的角蛋白酶发酵策略研究及其在血栓降解中的应用[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3330-3344.

LIU Yanling, SU Chang, GONG Jinsong, CHEN Yuxin, LI Heng, XU Zhenghong, SHI Jinsong. Keratinase: fermentation optimization based on DoseResp model and application in thrombolysis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3330-3344.

摘要:【目的】角蛋白酶是一类具有高效降解角蛋白纤维特性的丝氨酸蛋白酶, 角蛋白酶的高效工业化生产有利于促进其在制革、纺织、饲料、肥料、日化、医疗等领域的广泛应用。本研究以课题组前期自主构建的重组角蛋白酶工程菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WB600-pMA5-KerBv 为研究对象, 通过系统的发酵优化提升工程菌的产酶能力, 并创新探究角蛋白酶在降解血栓纤维蛋白中的应用潜力。【方法】通过单因素试验确定发酵培养基成分, 随后借助响应面分析方法优化产角蛋白酶的发酵培养基, 确定对菌体生长和产酶具有显著影响的因素及最优浓度。基于 DoseResp 模型通过预测菌种最佳生长点指导其在 5 L 发酵罐水平的扩大产酶。最后通过血栓以及纤维蛋白原降解试验探究角蛋白酶对血栓纤维蛋白的降解能力。【结果】经优化确定重组菌产角蛋白酶的最佳发酵培养基为(g/L): 葡萄糖 25.0, 酵母粉 25.0, 豆粕 15.0, 磷酸氢二钾 14.04, 磷酸二氢钾 2.58, 氯化镁 0.3; 基于 DoseResp 模型通过预测菌种最佳生长点指导 5 L 发酵罐水平扩大生产, 在优化条件下, 细菌浓度 OD_{600} 从摇瓶的 2.45 提高至 77.80, 酶活从摇瓶的 4 471 U/mL 升至 21 301.67 U/mL, 提高约 4.76 倍。该角蛋白酶对纤维蛋白原以及血液凝块均表现出显著的降解能力。【结论】本研究通过系统的发酵优化以及基于模型预测的罐上产酶研究, 有效提高了角蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的发酵产量, 并为该酶在血栓降解领域的应用提供了研究基础, 同时拓展了角蛋白酶的应用价值。

关键词: 角蛋白酶; 培养基; 发酵条件; 优化; 纤维蛋白原降解

资助项目: 国家自然科学基金(32301283, 21978116); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP22047)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32301283, 21978116) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP22047).

*Corresponding author. E-mail: jinsonggong.bio@hotmail.com

Received: 2024-02-27; Accepted: 2024-04-11; Published online: 2024-08-05

Keratinase: fermentation optimization based on DoseResp model and application in thrombolysis

LIU Yanling¹, SU Chang¹, GONG Jinsong^{1*}, CHEN Yuxin¹, LI Heng¹, XU Zhenghong^{2,3}, SHI Jinsong¹

1 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan, China

Abstract: [Objective] Keratinases, a class of serine proteases capable of degrading keratin, have important application potential and research value in the utilization of keratin resources. The efficient industrial production of keratinase is helpful to promoting its application in leather, textiles, feed, chemical fertilizers, daily chemicals, and medicine. In this study, we optimized the fermentation conditions of *Bacillus subtilis* WB600-pMA5-KerBv, a recombinant keratinase-producing strain constructed in our laboratory, to improve the enzyme production. Furthermore, we explored the potential application of keratinase in the degradation of fibrin. [Methods] First, the composition of the fermentation medium was determined by single factor experiments. Then, response surface methodology was employed to optimize the medium formula for producing keratinase, and the factors significantly affecting the growth and enzyme production of bacteria and the optimum concentrations were determined. Subsequently, the DoseResp model was adopted to predict the optimal growth point of the strain and thus guide the expansion of enzyme production in a 5 L fermenter. Finally, the blood clot and fibrinogen degradation experiments were carried out to evaluate the degradation performance of the keratinase. [Results] The formula of the fermentation medium for producing keratinase by the recombinant strain was optimized as follows (g/L): glucose 25.0, yeast powder 25.0, soybean meal 15.0, dipotassium phosphate 14.04, potassium dihydrogen phosphate 2.58, and magnesium chloride 0.3. The optimal growth point of the strain was predicted based on the DoseResp model to guide the expansion of production in a 5 L fermenter. Under the optimized conditions, the OD_{600} (bacterial biomass) increased from 2.45 in a shake flask to 77.80, and the enzyme activity increased by about 4.76 times from 4 471 U/mL in a shake flask to 21 301.67 U/mL. In addition, the keratinase showcased remarkable degradation ability on fibrinogen and blood clots. [Conclusion] The systematic fermentation optimization and model-based prediction of enzyme production in fermenters improved the production of keratinase in *Bacillus subtilis*. The findings provided a research basis for the application of keratinase in thrombolysis.

Keywords: keratinase; medium; fermentation conditions; optimization; fibrinogen degradation

角蛋白酶对结构复杂、硬质难溶的角蛋白具有特异性的降解作用，被认为是具有多种优良催化特性的强效蛋白酶，在不同的工业和生物领域展现出广泛应用潜力^[1]。利用角蛋白酶降解废弃羊毛和鸡毛制备的可溶性短肽是动物饲料、肥料、植物生物刺激剂和营养补充剂中主要添加剂，具有吸收率高、吸收快等优势^[2]；此外，角蛋白酶有助于去除附着在衣物表面的角质污垢，从而提高洗涤效率^[3]；在制革脱毛过程中，使用含角蛋白酶的生物脱毛助剂能大幅度地减少硫化物的用量，有效减少脱毛废液对环境的污染^[4]；角蛋白酶也可用于去除皮肤角质层，增强药物和化妆品中有效成分的渗透与吸收，一些基于角蛋白酶的商用制剂，包括 FixaFungusTM、Kernail-Soft PB 和 Pure100 Keratinase 已被用于治疗指甲疾病^[5]。

目前国内外研究主要致力于产角蛋白酶微生物的筛选以及角蛋白酶的分离纯化等工作，野生菌酶活性普遍在 1 000 U/mL 以内^[6]。一些课题组已实现了角蛋白酶的异源克隆表达与发酵生产优化。利刚慧等^[7]对罐上发酵培养基的 pH、温度以及时间进行单因素优化，重组枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)发酵产角蛋白酶的酶活达到(2 110±15) U/mL，使角蛋白酶产量提高 5.01 倍；蒋彪等^[8]采用响应面法对芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) CJPE209 产角蛋白酶的发酵培养基组分进行优化，最高酶活为 417 U/mL，相较于响应面优化前提提高了 20.74%；廖朝勇等^[9]对产角蛋白酶工程菌进行发酵条件优化，通过培养基组合优化以及正交优化后，角蛋白酶酶活达到 56.9 U/mL，较初始培养条件提高 49.74%。目前，多数角蛋白酶产量仍不足以满足工业生产的要求，导致生产成本较高，阻碍其产业化应用。

发酵动力学能够模拟菌体发酵动态过程，通过改进发酵技术和参数，构建精细的动力学模型，可以反映微生物的生命周期、营养需求和代谢产物，从而在实际发酵过程中被广泛应用^[10]。Zhang 等^[11]通过经典的 DoseResp 等模型对发酵过程中的酵母量、糖分和所得乙醇的动态变化进行检测，使最大减糖率达 99.02%；Wang 等^[12]对小球藻(*Chlorella* sp.) FACHB-8 生长通过动力学 DoseResp 模型预测并优化，在最佳条件下，FACHB-8 的最大产量为 1.26 g/L；Li 等^[13]对大肠杆菌(*Escherichia coli*)依克多因进行分子动力学 DoseResp 模型优化，优化菌株 ECT9-5 通过 0.3 g/L 葡萄糖的补料分批发酵产生得到 67.1 g/L 的依克多因。因此，本研究利用实验室前期构建的枯草芽孢杆菌角蛋白酶生产菌株，在结合单因素与响应面分析系统优化发酵培养基成分的基础上，在 5 L 发酵罐上通过经典的分子动力学 DoseResp 模型预测菌株的生长情况，保证菌株的产酶效率，从而实现角蛋白酶的高效生产，为其工业化推广应用奠定基础。

近年来，越来越多的研究表明除角蛋白外，角蛋白酶对多种难降解的纤维状蛋白，如胶原蛋白、弹性蛋白、致病性病毒纤维蛋白以及引起阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的β-淀粉样纤维蛋白(Amyloid β-protein, Aβ)等均表现出较好的降解效果^[14]。血纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)在凝血酶的催化下可凝结成的血液凝块在血管中沉积会形成血栓，若体内降解血栓的尿激酶无法将其及时清除，则会造成心血管疾病以及各种动静脉血栓等^[15]。本研究创新探索了角蛋白酶在降解血栓纤维蛋白中的应用潜力，为血栓的治疗提供新的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

产角蛋白酶的目标菌株重组枯草芽孢杆菌 WB600-pMA5-KerBv^[16], 由本实验室前期构建并保藏。

1.1.2 主要试剂

胰蛋白胨、酵母粉, OXOIDE 公司; 脱脂奶粉、甘油、氯化钠、琼脂粉、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、碳酸钠、三氯乙酸、葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、乳糖、果糖、尿素、硫酸铵、豆粕、羽毛粉、豆饼粉、玉米粉、氯化镁、福林酚试剂、麦芽糖, 国药集团上海有限公司; 琼脂糖, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 5% 可溶性角蛋白, 北京百灵威科技有限公司。

1.1.3 主要仪器

恒温振荡培养箱, 太仓市实验设备厂; 生化培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; 小型高速离心机、小型低温离心机, Eppendorf 公司; 紫外分光光度计, 尤尼可(上海)仪器有限公司; 酶标仪, Molecular Devices 公司; 电子 pH 计, METTLER TOLEDO 公司; 发酵罐系统、溶氧电极、pH 电极, 迪必尔生物工程(上海)有限公司; 超净台, 上海博讯实业有限公司; PCR 仪、蛋白电泳系统、高温高压灭菌锅, TOMY 公司。

1.2 菌体浓度及角蛋白酶活力测定

1.2.1 菌体浓度测定

用去离子水将菌液稀释到吸光度在 0.2–0.8 范围内, 使用分光光度计测定其在 600 nm 处的吸光值。

1.2.2 2%角蛋白底物的配制

将 5%角蛋白底物与 Tris-HCl (pH 9.0)缓冲液以体积比 2:3 的比例配制 2%的角蛋白底物。

1.2.3 角蛋白酶活力测定方法

0.1 mL 经过 pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释

的角蛋白酶液中加入 0.1 mL 角蛋白底物, 在 50 °C 水浴中孵育 20 min, 加入 0.2 mL 的 4% 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)溶液终止反应, 然后将充分反应后的样品于 12 000 r/min 离心 5 min。在 0.2 mL 的离心上清液中加入 1 mL 的 Na₂CO₃ (0.4 mmol/L)和 0.2 mL 的福林酚试剂, 充分混合后于 40 °C 下水浴加热 20 min, 然后取 0.2 mL 反应后样品放入酶标仪中, 于 660 nm 处检测吸光度。对照组先将角蛋白酶液与 4% 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)溶液进行混合, 在 50 °C 水浴中孵育 20 min, 加入 0.1 mL 的角蛋白底物进行反应, 其余过程与实验组操作一致。角蛋白酶活性的定义: 在上述反应条件下, 酶液水解底物在 660 nm 处产生 0.01 吸光度的差别定义为一个酶活单位 U^[17]。

1.3 发酵培养基成分单因素优化

1.3.1 第一氮源的种类优化

保持 TB 培养基成分不变的情况下, 调整第一氮源的种类, 以探究不同氮源对菌株生长和产酶的影响。添加的蛋白胨质量浓度为 12 g/L, 其他氮源如酵母粉、豆粕、羽毛粉、豆饼粉、尿素、玉米粉、硫酸铵等分别换算为等氮量的质量浓度。37 °C、220 r/min 培养 72 h, 测定菌株的生长和产酶情况。

1.3.2 磷酸盐浓度优化

在上述培养基下, 保持磷酸二氢钾:磷酸氢二钾物质的摩尔比为 1:4.2, 调整磷酸盐的浓度分别为 40、60、80、100、120、140 mmol/L, 37 °C、220 r/min 培养 72 h, 测定菌株生长状况和酶活。

1.3.3 第二氮源的种类优化

在上述培养基的基础上添加第二氮源, 分别为豆粕、硫酸铵、羽毛粉、玉米粉、硫酸铵等, 添加的质量浓度为 12 g/L, 37 °C、220 r/min 培养 72 h, 测定菌株生长状况和酶活。

1.3.4 碳源种类优化

保持其他条件不变, 分别使用葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、果糖、麦芽糖等不同的碳源, 添加的质量浓度为 4 g/L, 37 °C、220 r/min 摇床培养 72 h, 测定菌株的生长和产酶情况。

1.4 响应面试验

以单因素试验结果为基础, 以角蛋白酶活性为响应值, 选取葡萄糖浓度、酵母粉浓度、豆粕浓度以及磷酸盐浓度为自变量, 使用 Design-Expert 8.0 软件中的 Box-Behnken 原理进行 4 因素 3 水平的响应面设计。为保证试验结果的准确性, 以上试验均重复 3 次。

1.5 发酵动力学 DoseResp 模型

1.5.1 枯草芽孢杆菌菌体生长动力学模型拟合

根据试验数据分析, 枯草芽孢杆菌菌体的生长呈“S”型曲线, 结合经验模型, 选取 DoseResp 模型进行线性拟合, 选取拟合 R^2 系数最大的模型对枯草芽孢杆菌菌体的生长规律进行描述。

1.5.2 统计学分析

采用软件 Origin 8.5 统计分析, 统计处理结果用平均值±标准差(Mean±SD)的方式表示, 当统计结果中 $P < 0.05$ 时, 表示数据具有统计学意义。

1.6 罐上发酵策略

1.6.1 分批发酵

在 LB-牛奶固体培养基上选择透明圈较大的枯草芽孢杆菌单菌落, 接种至 10 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 12 h。将 1 mL 上述种子液接种于 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 24 h 作为二级种子。将二级种子转入 5 L 发酵罐中, 接种量为 5%, 分批发酵, 加入 1% 卡那霉素, 进行高密度发酵。发酵罐转速 400 r/min, 温度 37 °C。流加 75% 冰醋酸或 3 mol/L NaOH 调节 pH, 保持 pH 在 8.0 左右, 定期加入消泡剂进行消泡。在发酵过程中,

定期取样检测细菌菌体浓度和角蛋白酶活性。

1.6.2 补料发酵

前期种子液准备以及接种等条件与分批发酵相同, 发酵罐转速 400–700 r/min, 转速与溶氧、补料相关联, 温度 37 °C。流加 75% 冰醋酸或 3 mol/L NaOH 调节 pH, 保持 pH 在 8.0 左右, 定期加入消泡剂进行消泡。通过调节转速来控制溶解氧。在发酵过程中, 定期取样检测细菌浓度, 在细菌浓度降低时, 以 10 mL/h 的流速加入补料培养基, 并定期取样检测角蛋白酶活性。

1.7 纤维蛋白的制备及降解

1.7.1 纤维蛋白平板的制备

按 Astrup 等^[18]的方法制备纤维蛋白平板。利用凝血酶将血浆中原本可水溶的纤维蛋白原凝固成为不溶于水的纤维蛋白, 纤维蛋白扭结其他血细胞成团, 凝固成为血栓, 制造人造血纤维平板。尿激酶是直接作用于纤维蛋白溶解系统从而溶解血块的商品化溶栓酶。因此以尿激酶作为阳性对照, 评价角蛋白酶对纤维蛋白的降解作用。纤维蛋白平板的制作: 0.15 g 琼脂糖溶解于 20 mL 磷酸缓冲液中, 加入 3 mL (50 g/L) 纤维蛋白原、100 mL (200 kU/L) 凝血酶和 200 μ L (60 kU/L) 纤溶酶原, 轻轻晃动混匀, 迅速将该混合液倒入灭菌的塑料培养皿中, 待其冷却凝固后, 4 °C 下储存备用。另外, 制备不加纤溶酶原的平板。测定酶活力时, 加入 4 mL (0.8 μ g) 待测样品, 37 °C 保温 4 h, 测量溶圈的互为垂直的 2 个直径, 以其乘积作为纤溶活性的大小。活力单位 $\text{mm}^2/\mu\text{L}$ 。制备纤维蛋白平板 2 块, 1 块在制备时加 0.5 mL (1 U) 的纤溶酶原, 另一块在 85 °C 加热 30 min 使酶原失活, 测活时, 同样直接加入 4 μ L (0.8 μ g) 待测样品, 37 °C 保温 4 h 后测定溶圈面积, 前者减去后者即为样品的纤溶酶原激活活性。

1.7.2 尿激酶的标准曲线

将 125 μL 的纤维蛋白原(2.4 mg/mL)与 100 μL 尿激酶在 96 孔板上孵育, 在最佳检测波长下每间隔 1 min 记录 60 min 的反应动力学曲线。然后根据最大斜率拟合时间-吸光度曲线与尿激酶线性标准曲线的函数, 计算酶活性, 将每分钟吸光度的变化($\Delta A/\text{min}$)绘制在 y 轴上, 将尿激酶浓度绘制在 x 轴上。

1.8 血栓凝块的制备及降解

取牛全血加入凝血酶静置 10 min 凝固, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱内孵育约 5 h 后取出, 弃血清, 制成血栓。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 12 h 确保血栓回缩完全, 使其更加稳定, 进而减少洗涤和吸附血栓水分时血栓破碎^[19]。将血栓分别浸入 2 000、1 600、1 200、800 U 的角蛋白酶溶液中, 角蛋白酶溶液终体积为 2 mL, 并设置 2 mL 生理盐水作为对照组; 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 12 h 后, 测定角蛋白酶降解后血栓的体积。

2 结果与分析

本研究基于课题组前期构建的产角蛋白酶的重组枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WB600-pMA5-KerBv 为出发菌株, 采用单因素优化、响应面试验以及基于 DoseResp 模型的罐上发酵, 获得最适发酵条件, 提高角蛋白酶的产量; 为了拓展该酶的应用价值, 进一步探究了角蛋白酶对血栓的降解能力, 为角蛋白酶的规模化生产及应用奠定基础。

2.1 发酵培养基组分的单因素优化结果

为了强化重组菌株的生长和角蛋白酶的表达能力, 以 TB 为基础培养基, 探究培养基各组分对重组菌株枯草芽孢杆菌生长和产酶情况的影响。在初始发酵培养基的基础上选取了不同类型的氮源、碳源以及不同磷酸盐浓度, 分别进行单因素试验。结果如图 1 所示, 通过对

发酵上清液的酶活性检测, 发现使用 25 g/L 的酵母粉、140 mmol/L 的磷酸盐、15 g/L 的豆粕以及 15 g/L 的葡萄糖作为培养基组分进行发酵时, 得到的上清液中角蛋白酶的活性最高, 为 3 352.60 U/mL, 是 TB 培养基的 1.24 倍。

2.2 响应面试验

为确定角蛋白酶发酵培养基最优工艺条件, 在单因素试验基础上, 根据响应面试验设计原理, 以酶活为响应值, 选取葡萄糖、酵母粉、豆粕、磷酸盐为因素设计 4 因素试验, 试验设计及结果见表 1, 利用 Design-Expert 8.0 软件^[20], 分析 4 种显著性因素葡萄糖、酵母粉、豆粕、磷酸盐的响应面, 预测得到发酵培养基最佳工艺参数如图 2 所示: 葡萄糖质量浓度为 25.0 g/L, 酵母粉为 25.0 g/L, 豆粕为 15.0 g/L, 磷酸盐为 100 mmol/L, 理论最高酶活力可达 4 802.83 U/mL。为验证模型的准确性及重复性, 利用上述最佳工艺参数进行 3 次平行验证, 测得角蛋白酶的平均酶活力为(4 471.00 \pm 561.00) U/mL。实际值与理论值较为接近, 说明采用响应面优化能够很好地预测枯草芽孢杆菌产角蛋白酶的实际情况。

2.3 罐上放大发酵

2.3.1 生长曲线测定及其模型预测

细菌生长曲线反映了单细胞微生物在一定环境条件下于液体培养时所表现出的群体生长规律, 其分为迟缓期、对数生长期以及稳定期^[11]。检测摇瓶水平枯草芽孢杆菌的细菌浓度变化, 并利用 DoseResp 模型对其生长曲线进行拟合, 可用于计算菌株最佳生长点, 从而指导发酵生产。本研究利用该模型对工程菌的一级种子液和二级种子液进行细菌浓度监测, 并进行生长曲线拟合^[21]。一级种子液最佳生长时间如图 3A 所示, 其在 10.5 h 时菌株生长活力最强, 而二级种子液最佳生长时间如图 3B 所示, 在 24 h 时

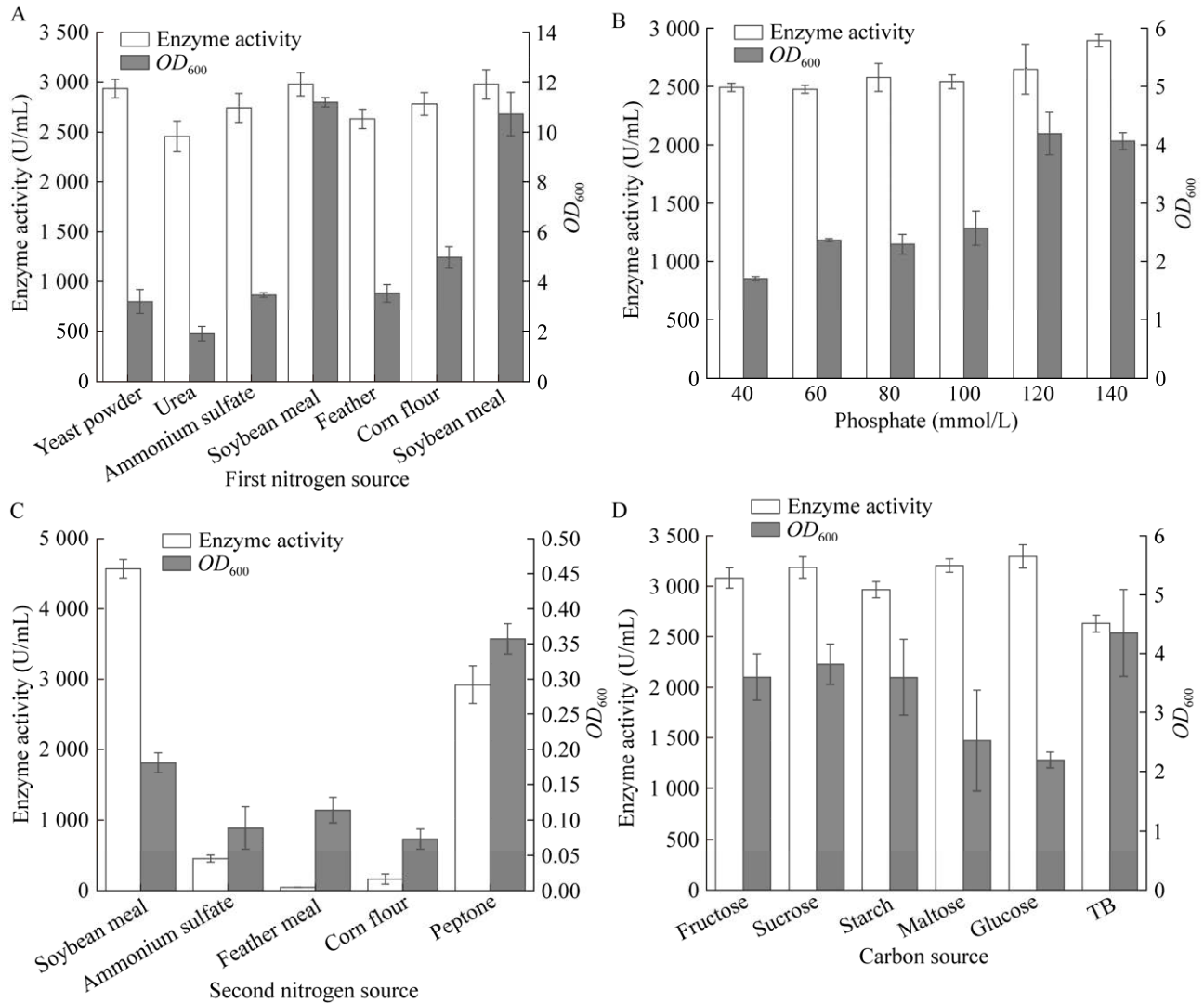


图 1 发酵培养基组分的单因素优化结果

Figure 1 Single factor optimization results of fermentation medium components. A: Optimization of the first nitrogen source. B: Optimization of phosphate concentration. C: Optimization of the second nitrogen source. D: Carbon source optimization.

菌株生长活力最强。因此，分别在一级种子液培养至 10.5 h 时转接二级种子液，并在二级种子液培养 24 h 后用于发酵罐接种。

2.3.2 分批发酵优化

分批发酵是罐上发酵中最常用且最基础的发酵方式之一，具有稳定性高、操作简便以及可以灵活控制时间和发酵产物等优点。同时分批发酵也是蛋白酶罐上发酵的基础发酵方式^[22]。在

前期采用优化培养基和模型预测生长曲线等方法的基础上进行分批发酵，发酵罐中菌的生长情况和酶活变化如图 4A 所示，0–24 h，由于发酵罐中的营养物质及溶氧充足，菌体生长速度较快，并在 24 h 时 OD_{600} 达到最大值 19.40，此后，菌体生长逐渐衰退。然而，在 54 h 时由于菌体在葡萄糖消耗殆尽后，继续利用培养基中多余的酵母粉等进行二次生长， OD_{600} 又再次升

表 1 响应面系列试验结果

Table 1 Results of response surface series experiments

Group	Glucose (g/L)	Yeast powder (g/L)	Soybean meal (g/L)	Phosphate (mmol/L)	Enzyme activity (U/mL)
1	15	15	5	40	3 653.58
2	25	15	15	160	2 625.75
3	5	15	15	40	2 222.67
4	15	15	15	100	2 641.42
5	15	25	15	40	1 859.17
6	5	15	15	160	2 903.92
7	5	15	25	100	2 677.17
8	5	5	15	100	2 871.17
9	15	15	5	160	3 405.42
10	15	5	15	40	3 508.92
11	25	15	25	100	3 107.58
12	15	25	5	100	3 494.33
13	15	15	25	160	3 419.67
14	15	25	15	160	3 266.08
15	15	15	25	40	2 525.50
16	15	15	15	100	3 259.08
17	15	15	15	100	2 542.58
18	15	5	15	160	4 419.08
19	15	5	25	100	4 260.17
20	25	15	5	100	3 726.83
21	15	15	15	100	3 742.08
22	15	25	25	100	2 983.58
23	25	5	15	100	4 541.58
24	15	15	15	100	2 334.58
25	5	25	15	100	3 536.83
26	15	5	5	100	3 943.42
27	25	15	15	40	4 691.17
28	25	25	15	100	4 802.83
29	5	15	5	100	3 577.58

Bold represents the optimal combination of culture media.

高至 11.68, 随后菌体生长持续减少。在罐上分批发酵过程中, 角蛋白酶活性在 36 h 达到最高值, 为 4 961.00 U/mL。

研究发现, 随着发酵的进行, 发酵液的 pH 呈现下降趋势, 最低可达 pH 6.0 左右, 该酸性条件不利于菌体的生长和产酶。因此, 使用前

期试验优化值 pH 8.0 对罐上 pH 进行调控。如图 4B 所示, 0–54 h 由于发酵罐中的营养物质及溶氧充足, 菌体生长速度较快, 并在 54 h 时达到最大细菌浓度 21.88。此后, 菌体生长逐渐衰退。然而, 在 66 h 时由于菌体在葡萄糖消耗殆尽后, 继续利用培养基中多余的酵母粉等营养物质, OD_{600} 又再次升高至 19.24, 随后菌体生长继续减少。在罐上发酵过程中, 角蛋白酶活性在 60 h 达到最高值, 为 8 297.50 U/mL, 较不控 pH 条件下提升了 1.7 倍。研究表明 pH 对菌株生长和产酶影响较大, pH 为 8.0 时菌株生长情况较好。

2.3.3 补料发酵

分批发酵培养为一次性投料和放罐, 培养液初始底物浓度较高, 容易产生底物和代谢产物的抑制作用, 并且不利于氧气的传质, 在进入对数生长期后期容易出现供氧不足的现象。而补料发酵可以解除底物或代谢产物的抑制作用; 与连续发酵相比, 流加补料发酵染菌的可能性小, 也不易产生菌种老化变异等^[23]。

在分批发酵基础上, 将菌株接种在 5 L 的发酵罐中进行补料发酵, 进一步提高角蛋白酶的表达量。补料发酵的细菌浓度变化和酶活变化如图 4C 所示, 0–36 h 菌株处于对数生长期, 角蛋白酶表达较慢。36–54 h 细胞继续生长并趋于稳定, 在此阶段, 角蛋白酶不断积累, 酶活增长较快。此后, 通过流加培养基, 细胞继续保持生长, 并在 114 h 达到最大值 66.48。由于发酵罐中的营养物质及溶氧不足, 补料初期营养物质增多, 菌株迅速增长, 酶活呈小幅下降趋势, 随后立即呈上升趋势。随着补料的持续, 酶活与细菌浓度均持续升高, 在 102 h 时达到最大值, 活性为 16 026.00 U/mL, 约为摇瓶发酵的 3.6 倍。

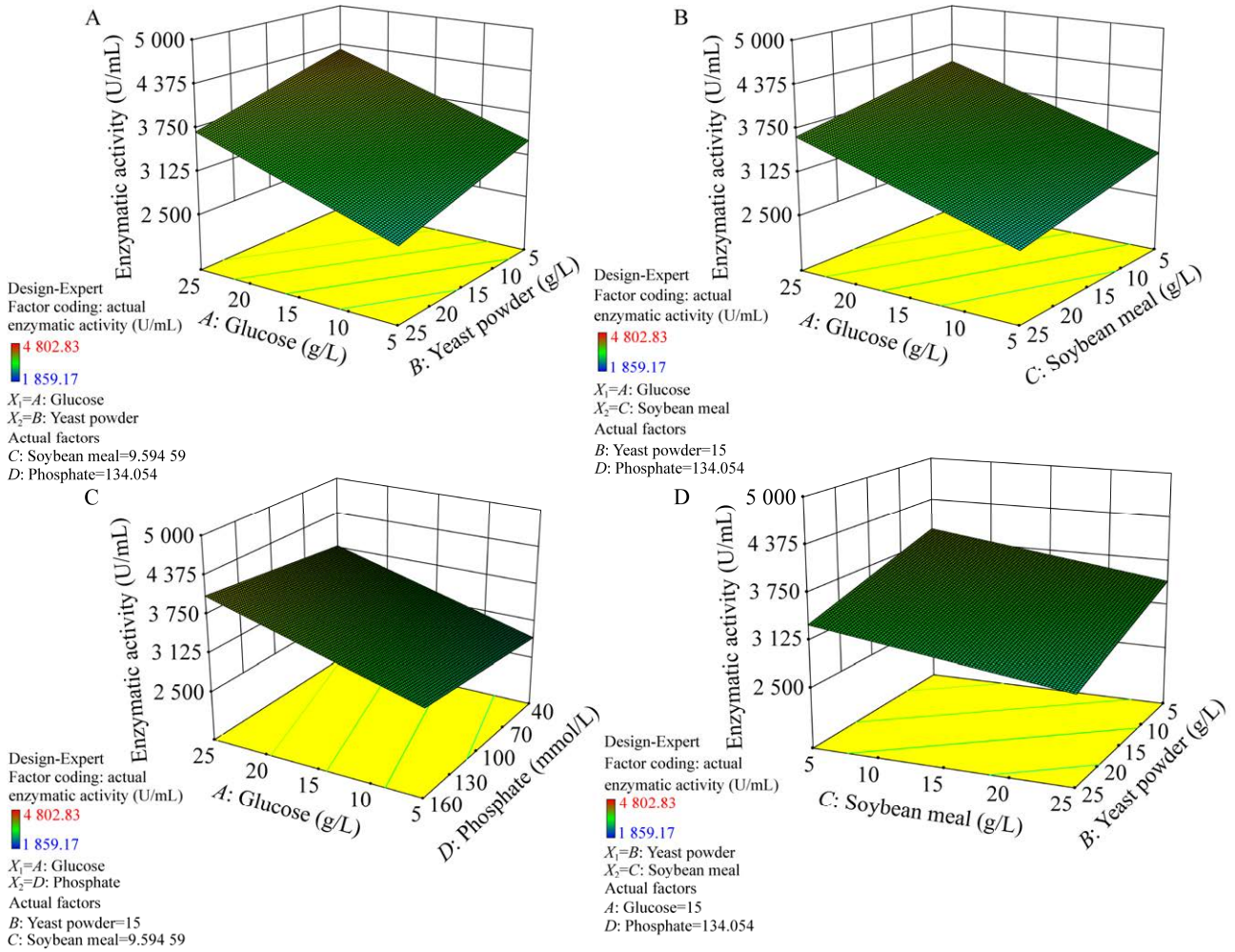


图 2 响应面模型

Figure 2 Response surface model.

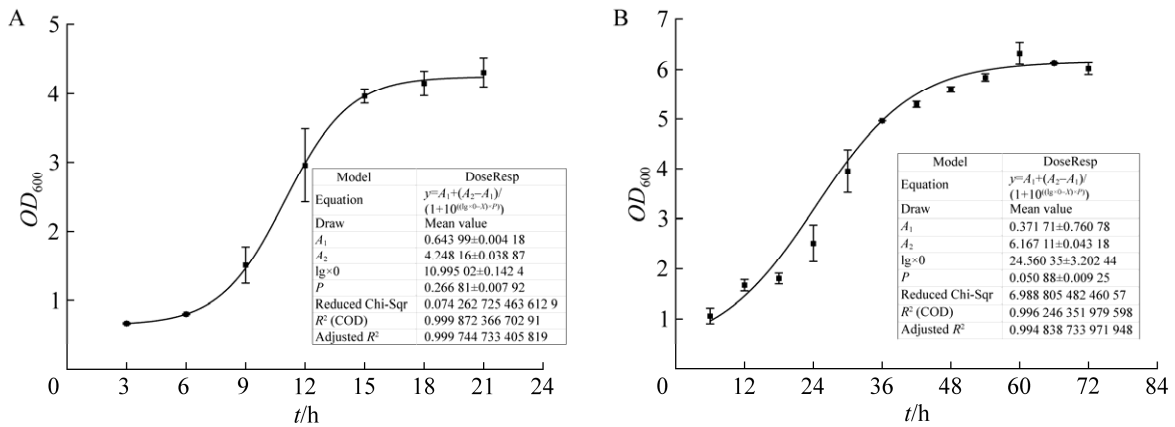


图 3 菌株生长曲线

Figure 3 Growth curves of the strain. A: Growth curve of primary seed solution. B: Growth curve of secondary seed solution.

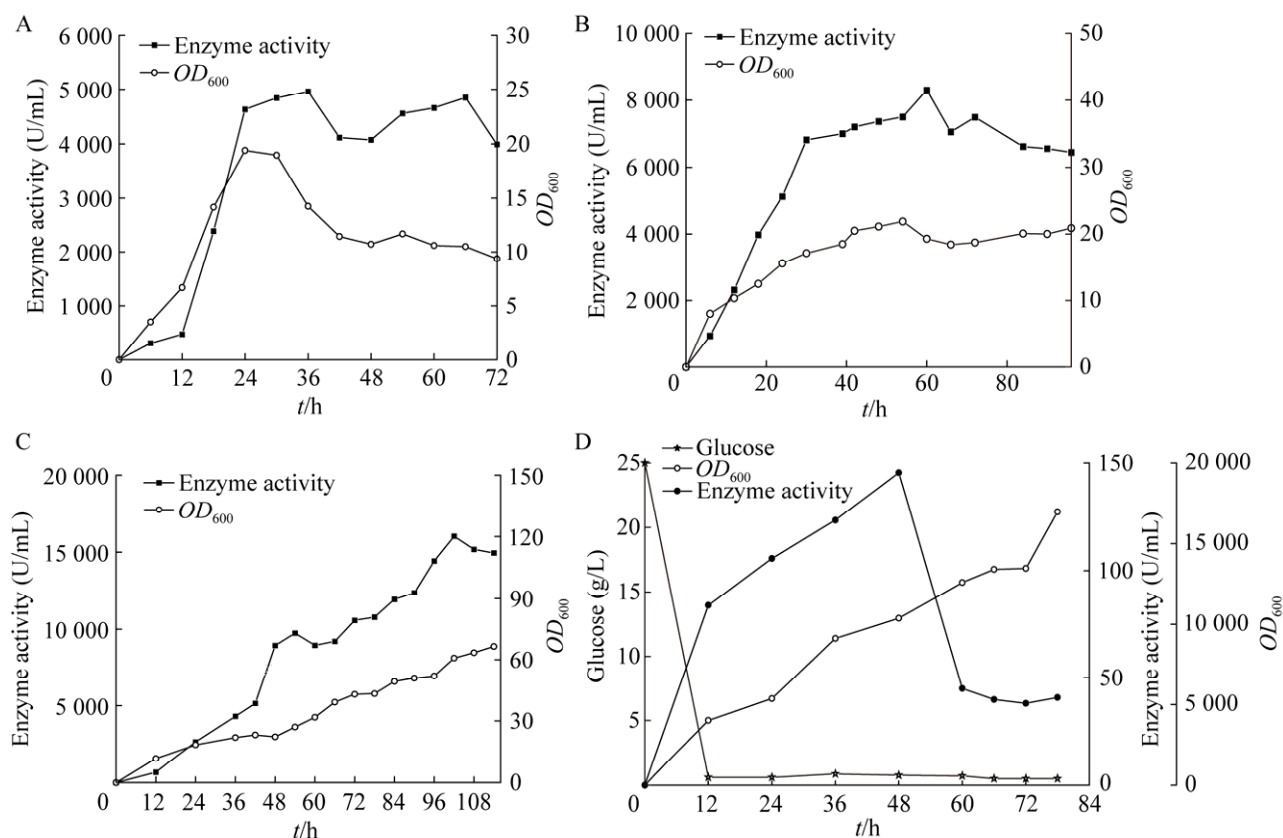


图 4 罐上发酵优化

Figure 4 Fermentation optimization. A: Batch fermentation on tank. B: Batch fermentation with optimized pH. C: Supplementary fermentation. D: Optimization of feeding and post-feeding fermentation.

2.3.4 基于溶氧恒定的反馈控制策略

研究发现, 当发酵液中底物几乎耗尽时, 菌株生长变慢, 氧气消耗速率下降, 溶氧会突然升高。因此, 溶氧的突然变化可以成为底物补料开始以及菌株生长的指示性特征。由于补料分批发酵具有经济上的重要性, 因此对其进行的模型构建以及生产策略的选择对产量具有重要影响。结合氧平衡动力学, 对菌株生长期的长度、最大细胞浓度以及补料模式和发酵时间进行了优化^[24]。

恒流补料发酵结果如图 4D 所示, 在恒流补料发酵中, 0–12 h 时溶解氧(dissolved oxygen, DO) 维持在 15%–25%左右, 而在 12–13 h 时 DO 迅速

升高, 无法通过调整转速使 DO 保持在 15%–25%, 并且发酵液中的碳源含量极低(0.6 g/L), 说明发酵液中的营养物质不足以维持菌体的正常生长, 菌体生长缓慢。因此在此时进行恒流补料发酵, 补充营养物质维持菌株的正常生长。0–48 h 期间细菌浓度和酶活呈现上升趋势, OD_{600} 和酶活在 48 h 分别为 77.80 和 19 399.00 U/mL, 其中酶活力是摇瓶水平的 4.34 倍。

2.3.5 罐上发酵模型建立

为了对罐上发酵菌株生长情况进行检测, 通过生长拟合曲线 DoseResp 模型进行预测, 预测具体数据如图 5 所示, 菌体浓度输入 DoseResp 模型, 得到拟合公式如表 2 所示。

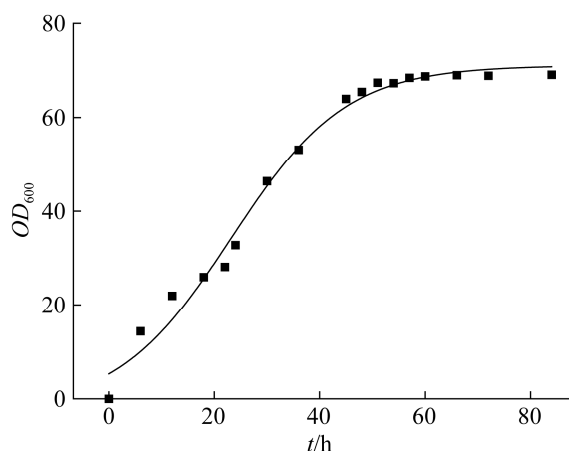


图5 生长拟合曲线 DoseResp 模型预测结果
Figure 5 Prediction results of DoseResp model for growth fitting curve.

$y=A_1+\text{Section1}+\text{Section2}$, 并将菌体生长浓度到达最大浓度一半时的浓度代入公式, 得到最佳生长点为 27 h。

随后按照预测的菌体最佳生长点 27 h 作为接种时间, 罐上发酵参数的设置与上述优化结果相同, 并在 DO 迅速上升的时间点进行恒流补料发酵。结果如图 6 所示, 0–48 h 期间细菌浓度和酶活呈现上升趋势, OD_{600} 和酶活在 60 h

表 2 生长拟合曲线方程

Table 2 Growth fitting curve equation

Model	DoseResp
Equation	Double span= A_2-A_1 Double section1= $\text{span} \times p / (1 + \text{pow}(10, (\log \times 01 - x) \times h1))$; Double section1= $\text{span} \times p(1-p) / (1 + \text{pow}(10, (\log \times 02 - x) \times h2))$; $y=A_1+\text{Section1}+\text{Section2}$
Plotting	Bacterial concentration
A_1	$-135.383 \ 86 \pm 1 \ 500.301 \ 76$
A_2	$118.010 \ 26 \pm 154.883 \ 95$
$\log \times 01$	$-6.239 \ 72 \pm 295.146 \ 8$
$\log \times 02$	$59.207 \ 25 \pm 6 \ 287 \ 188.455 \ 21$
$h1$	$0.014 \ 98 \pm 0.073 \ 72$
$h2$	$1.123 \ 74 \pm 8 \ 912 \ 232.906 \ 3$
P	$0.973 \ 19 \pm 0.384 \ 44$
Reduced	$86.433 \ 36$
Chi-Sqr	
R^2 (COD)	$0.991 \ 05$

分别为 77.80 和 21 301.67 U/mL。相比前期未优化接种时间的发酵结果, 本次发酵角蛋白酶表达量进一步提高, 因此试验验证 DoseResp 模型能够较好的预测菌株的最佳生长时期, 并以此为依据确定接种时间, 从而提高角蛋白酶的发酵产量。

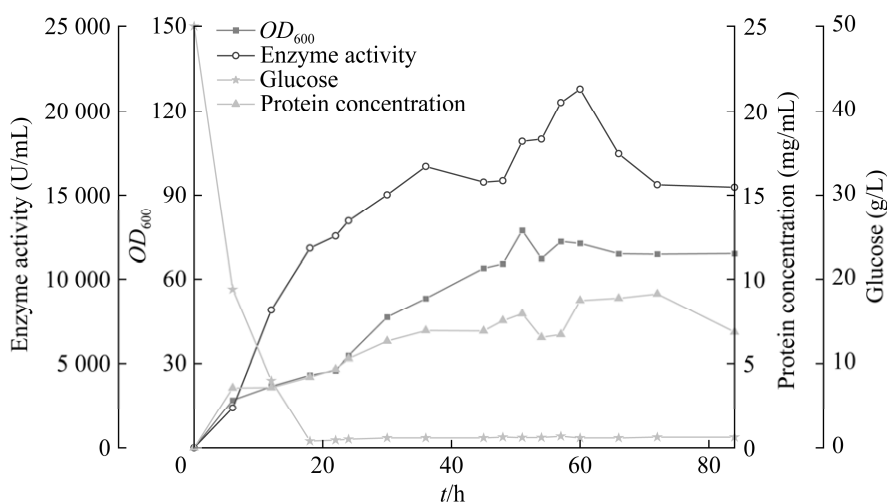


图 6 DO 关联转速后补料发酵菌株生长曲线

Figure 6 Growth curve of the strain in fed-batch fermentation following the correlation of DO with rotational speed.

2.4 角蛋白酶降解血栓的应用探究

研究表明, 角蛋白酶对羊毛、羽毛等纤维状结构蛋白具有较强的水解作用。此外, 角蛋白酶对淀粉样纤维蛋白和朊病毒蛋白等疏水性复杂蛋白的降解作用也已得到试验验证^[25]。纤维蛋白以及纤维蛋白原是生物体内参与凝血和止血过程中的重要蛋白, 其在体内的非正常沉积会导致血栓的形成, 造成缺血性脑血管病、心肌梗塞、肺栓塞等心血管疾^[26]。因此, 推测角蛋白酶对形成血栓的纤维蛋白也具有降解作用, 可用于血栓的降解。

本研究对角蛋白酶降解纤维蛋白原的能力进行了探究。对纤维蛋白平板上透明圈直径进行测量, 得到溶解圈面积并进行分析, 结果如图 7 所示, 计算得出其活性在 $1.54 \text{ mm}^2/\mu\text{L}$, 并与尿激酶对纤维蛋白原的降解进行比对, 发现 1 U 的角蛋白酶与等比的尿激酶对纤维蛋白原的降解能力相近。说明角蛋白酶具有较好的纤维蛋白原降解能力。

为了探究角蛋白酶对血栓的溶解能力, 进

一步在体外验证了角蛋白酶的溶栓活性。将制备好的血栓浸入不同浓度的角蛋白酶或生理盐水中。于室温下放置 12 h 后, 观察各试管血栓溶解程度及颜色变化。结果如图 8 所示, 相比加入生理盐水的对照组, 角蛋白酶量加入越多, 血栓溶解越明显。其中加入浓度 2 000 U 角蛋白酶的试验组血栓降解最为彻底, 血栓凝块几乎被完全降解, 降解液颜色最深。

3 讨论与结论

角蛋白酶是一种具有高效降解角蛋白纤维特性的丝氨酸蛋白酶, 具有广泛的工业应用前景。目前, 角蛋白酶的产量仍具有较大的提升潜力。本研究基于课题组前期研究结果, 围绕重组菌的产酶发酵优化和发酵罐上培养, 以及角蛋白酶在血栓纤维蛋白中的降解等方面展开研究, 为该酶的工业化应用奠定基础。

通过培养基组分优化和响应面设计提高角蛋白酶产量。重点对发酵培养基的碳氮源及磷酸盐种类和浓度进行优化, 使重组枯草芽孢杆

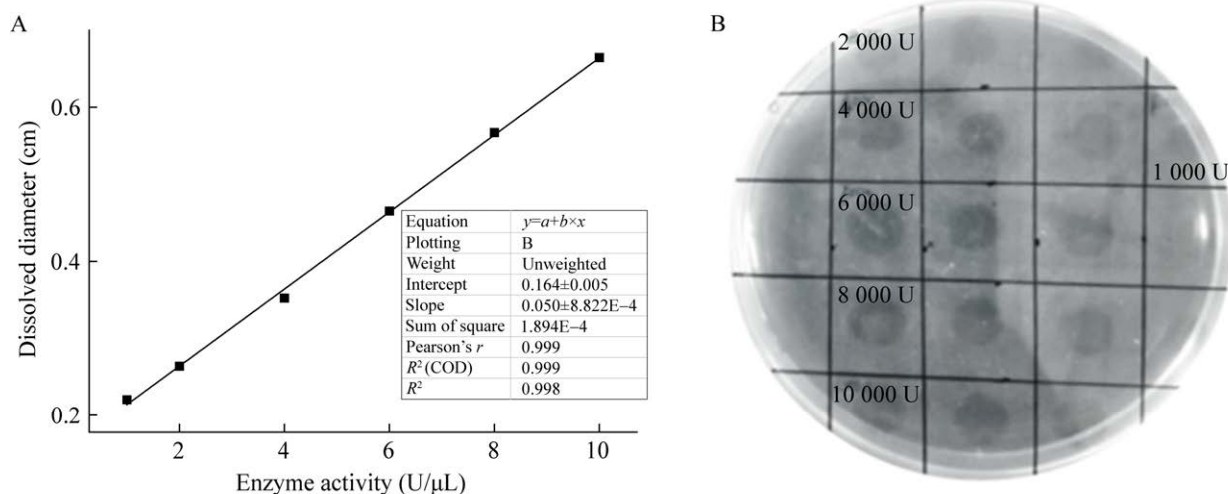


图 7 角蛋白酶降解纤维蛋白原能力

Figure 7 The ability of keratinase to degrade fibrinogen. A: Standard curve of keratinase's fibrinogen degradation activity. B: Keratinase-induced fibrinogen degradation.

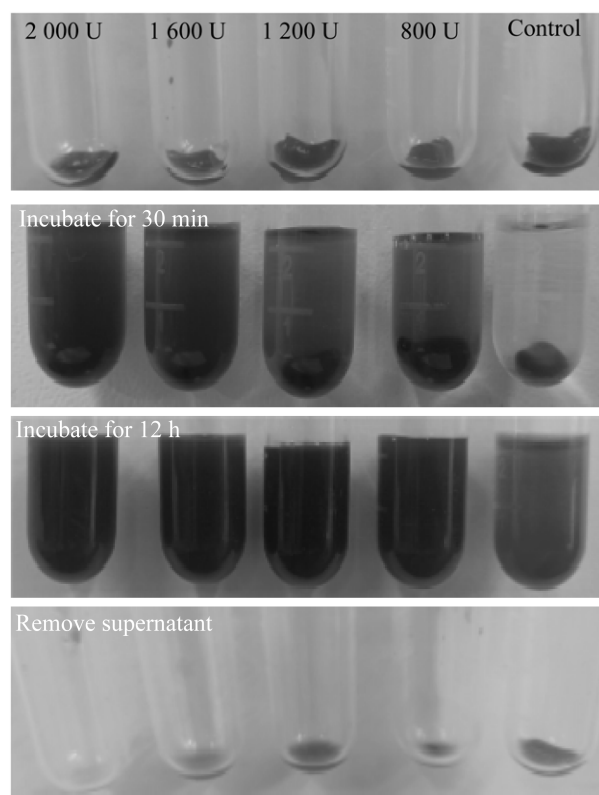


图 8 角蛋白酶的体外溶栓活性

Figure 8 Thrombolytic activity of keratinase *in vitro*.

菌的角蛋白酶活性从 2 126.75 U/mL 提高到 4 471 U/mL。为了继续挖掘重组菌株枯草芽孢杆菌 WB600 的产酶能力,通过 5 L 发酵罐产酶研究提高角蛋白酶产量。运用 DoseResp 预测模型,通过对细菌浓度检测和生长曲线拟合,建立了罐上发酵模型,确定了菌株在发酵罐上的最佳生长点;通过流加补料方式,基于溶氧恒定的反馈控制策略,将细菌浓度从 2.45 提高至 77.80,酶活从 4 471 U/mL 提升至 21 301.67 U/mL,提高了约 4.76 倍。Fang 等^[27]对角蛋白酶菌株嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*) BBE11-1 在 30 L 发酵罐中进行补料发酵,使角蛋白酶酶活提高 117.7% (1 728 U/mL); Liao 等^[28]筛选的淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)

NK11 角蛋白酶,在 3 L 发酵罐优化发酵条件下,角蛋白酶活性达到 2 210.66 U/mL,是原始活性的 56.74 倍; Liu 等^[29]改造的毕赤酵母角蛋白酶 KerP,在 3 L 发酵罐的优化条件下其酶活性为 3 010 U/mL。因此重组枯草芽孢杆菌 WB600-pMA5-KerBv 在优化后的罐上发酵条件下培养的角蛋白酶酶活力在目前已报道的研究中处于较高水平。

目前角蛋白酶主要应用于制革、纺织、饲料、肥料、日化等领域,在医疗领域中,通常应用于痤疮的治疗和阮病毒的降解等,而在血栓降解中的研究较少。因此我们创新性地探究了角蛋白酶降解血栓中纤维蛋白的能力,为开发角蛋白酶类溶栓药物提供了创新思路,并创造性拓展了角蛋白酶的应用价值和应用范围。

参考文献

- [1] 叶金鹏, 龚劲松, 陈霞, 蒋敏, 李恒, 李会, 许正宏, 史劲松. 微生物角蛋白酶在纳米粒子制备中的应用[J]. 化工进展, 2020, 39(11): 4575-4580.
YE JP, GONG JS, CHEN X, JIANG M, LI H, LI H, XU ZH, SHI JS. Application of microbial keratinase in biopreparation of AuNPs[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2020, 39(11): 4575-4580 (in Chinese).
- [2] SU C, GONG JS, WU ZX, LIU YL, LI H, SHI JS, XU ZH. Development of a growth-dependent system to regulate cell growth and keratinase production in *B. subtilis*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(5): 2421-2429.
- [3] NNOLIM N, NWODO U. Abstract 1184: utilization of keratinous chicken feathers for the extracellular production of keratinase by *Bacillus* sp. CSK2: keratinolytic enzyme characterization[J]. Journal of Biological Chemistry, 2023, 299(3): 103686.
- [4] LI QX. Structure, application, and biochemistry of microbial keratinases[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 674345.
- [5] SU C, GONG JS, SUN YX, QIN JF, ZHAI S, LI H, LI H, LU ZM, XU ZH, SHI JS. Combining pro-peptide

- engineering and multisite saturation mutagenesis to improve the catalytic potential of keratinase[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(2): 425-433.
- [6] AKRAM F, AQEEL A, SHOAIB M, HAQ IU, SHAH FI. Multifarious revolutionary aspects of microbial keratinases: an efficient green technology for future generation with prospective applications[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(58): 86913-86932.
- [7] 利刚慧, 刘俊杰, 彭帅英, 梁颖茵, 鄢陆琪, 李昆太. 重组枯草芽孢杆菌产角蛋白酶的发酵培养基及发酵条件优化[J]. *中国饲料*, 2023(19): 29-36.
LI GH, LIU JJ, PENG SY, LIANG YY, YAN LQ, LI KT. Optimization of fermentation medium and fermentation conditions for keratinase production by recombinant *Bacillus subtilis*[J]. *China Feed*, 2023(19): 29-36 (in Chinese).
- [8] 蒋彪, 王常高, 杜馨, 林建国, 蔡俊. 响应面法优化芽孢杆菌 CJPE209 产角蛋白酶发酵培养基的研究[J]. *中国酿造*, 2017, 36(5): 76-80.
JIANG B, WANG CG, DU X, LIN JG, CAI J. Optimization of fermentation medium for keratinase production from *Bacillus* sp. CJPE209 using response surface methodology[J]. *China Brewing*, 2017, 36(5): 76-80 (in Chinese).
- [9] 廖朝勇, 张铁鹰, 刘俊丽, 隋景巍. 枯草芽孢杆菌 WB600 角蛋白酶重组菌发酵条件优化[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(1): 44-52.
LIAO CY, ZHANG TY, LIU JL, SUI JW. Optimization of the fermentation conditions of recombinant *B. subtilis* WB600 produced keratinase[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(1): 44-52 (in Chinese).
- [10] 袁梦婷, 闫志英, 吕青阳, 刘杨, 杜亚玲, 宾石玉. CRISPR/Cas9 介导的芽孢杆菌基因编辑及其在发酵菌种改造中的应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2023, 29(5): 1279-1288.
YUAN MT, YAN ZY, LV QY, LIU Y, DU YL, BIN SY. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Bacillus* and its application in the development of strains for industrial fermentation[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2023, 29(5): 1279-1288 (in Chinese).
- [11] ZHANG JY, YANG YJ, LV RZ, ZHAN KH, CHANG XL, ZHANG CY. Sugar reduction process of purple sweet potato concentrated juice by microbial fermentation for improved performance of natural pigments[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2023, 191: 108781.
- [12] WANG ZJ, WANG ZY, WANG GX, ZHOU Z, HAO SM, WANG LL. Microalgae cultivation using unsterilized cattle farm wastewater filtered through corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 352: 127081.
- [13] LI LH, LI N, WANG XL, GAO S, ZHANG J, ZHOU JW, WU ZM, ZENG WZ. Metabolic engineering combined with enzyme engineering for overproduction of ectoine in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 390: 129862.
- [14] SU C, GONG JS, QIN JF, LI H, LI H, XU ZH, SHI JS. The tale of a versatile enzyme: molecular insights into keratinase for its industrial dissemination[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 45: 107655.
- [15] KELL DB, LAUBSCHER GJ, PRETORIUS E. A central role for amyloid fibrin microclots in long COVID/PASC: origins and therapeutic implications[J]. *The Biochemical Journal*, 2022, 479(4): 537-559.
- [16] TAO LY, GONG JS, SU C, JIANG M, LI H, LI H, LU ZM, XU ZH, SHI JS. Mining and expression of a metagenome-derived keratinase responsible for biosynthesis of silver nanoparticles[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2018, 4(4): 1307-1315.
- [17] ZHANG J, SU C, KONG XL, GONG JS, LIU YL, LI H, QIN JF, XU ZH, SHI JS. Directed evolution driving the generation of an efficient keratinase variant to facilitate the feather degradation[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 38.
- [18] ASTRUP T, MULLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952, 40(2): 346-351.
- [19] SHAO QJ, ZHU LF, LI TX, LI L, LI DJ, ZHANG JQ, REN W, WU LH. New method of thrombus preparation using a fluid model for evaluation of thrombectomy devices in a swine model[J]. *Thrombosis Research*, 2014, 134(5): 1087-1092.
- [20] CZINKÓCZKY R, SAKIYO J, ESZTERBAUER E, NÉMETH Á. Prediction of surfactin fermentation with *Bacillus subtilis* DSM10 by response surface methodology optimized artificial neural network[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2023, 41(2): 234-242.
- [21] MOHAMAD NL, MUSTAPA KAMAL SM,

- MOKHTAR MN, HUSAIN SA, ABDULLAH N. Dynamic mathematical modelling of reaction kinetics for xylitol fermentation using *Candida tropicalis*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 111: 10-17.
- [22] XU H, TIAN YJ, WANG SS, ZHU KF, ZHU L, HE QZ, LI WJ, LIU JJ. Batch fermentation kinetics of acetoin produced by *Bacillus subtilis* HB-32[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(10): 1004-1007.
- [23] SIBLEY M, WARD JM. A cell engineering approach to enzyme-based fed-batch fermentation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 146.
- [24] SAA PA, MOENNE MI, PÉREZ-CORREA JR, AGOSIN E. Modeling oxygen dissolution and biological uptake during pulse oxygen additions in oenological fermentations[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(7): 1167-1178.
- [25] SHARMA R, DEVI S. Versatility and commercial status of microbial keratinases: a review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2018, 17(1): 19-45.
- [26] PAGE MJ, THOMSON GJA, NUNES JM, ENGELBRECHT AM, NELL TA, de VILLIERS WJS, de BEER MC, ENGELBRECHT L, KELL DB, PRETORIUS E. Serum amyloid A binds to fibrin(ogen), promoting fibrin amyloid formation[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 3102.
- [27] FANG Z, ZHANG J, LIU BH, DU GC, CHEN J. Biodegradation of wool waste and keratinase production in scale-up fermenter with different strategies by *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 140: 286-291.
- [28] LIAO YQ, XIONG M, MIAO ZQ, ISHAQ AR, ZHANG M, LI BC, ZHAN YY, CAI DB, YANG ZF, CHEN J, CHEN SW. Modular engineering to enhance keratinase production for biotransformation of discarded feathers[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2023, 195(3): 1752-1769.
- [29] LIU BH, ZHANG J, GU L, DU GC, CHEN J, LIAO XR. Comparative analysis of bacterial expression systems for keratinase production[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 173(5): 1222-1235.