

研究报告

一株海洋来源铜绿假单胞菌 Gxun-7 角蛋白酶基因的克隆、表达及重组酶学性质

杨梦莹, 谢晨杰, 李时勇, 张红岩, 王一兵, 申乃坤*, 姜明国

广西民族大学海洋与生物技术学院 广西多糖材料与改性重点实验室 广西高校微生物与植物资源利用重点实验室, 广西 南宁 530006

杨梦莹, 谢晨杰, 李时勇, 张红岩, 王一兵, 申乃坤, 姜明国. 一株海洋来源铜绿假单胞菌 Gxun-7 角蛋白酶基因的克隆、表达及重组酶学性质[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4629-4643

Yang Mengying, Xie Chenjie, Li Shiyong, Zhang Hongyan, Wang Yibing, Shen Naikun, Jiang Mingguo. Cloning and expression of keratinase gene from a marine-derived *Pseudomonas aeruginosa* Gxun-7 and enzymatic properties of the recombinant enzyme[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4629-4643

摘要:【背景】角蛋白酶是一类特异性降解角蛋白的水解酶, 在动物饲料、生物肥料、医学、洗涤、制革及环境治理等方面具有重要的应用潜力。【目的】对前期从海洋环境筛选出的一株铜绿假单胞菌 Gxun-7 的角蛋白酶基因进行克隆、表达, 并探究重组酶学性质, 为角蛋白酶在工业生产中的应用奠定基础。【方法】以铜绿假单胞菌 Gxun-7 基因组推定的角蛋白酶基因为基础, 设计引物克隆获得角蛋白酶基因 *kp2*, 构建重组表达质粒 pET22b-*kp2*, 并转化到 *E. coli* RosettaGamiB (DE3) 中进行诱导表达, 同时对重组表达菌株的表达条件进行优化。利用镍柱分离纯化重组角蛋白酶并研究其酶学性质。【结果】重组角蛋白酶的分子量约为 33 kDa, 最适温度和 pH 值分别为 40 °C 和 8.0, 在温度 30–60 °C 和 pH 6.5–8.0 具有较好的稳定性。金属离子 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 和化学试剂十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfonate, SDS)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)对酶活力有抑制作用, 而 Mg^{2+} 、 K^{+} 、巯基乙醇和二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)对酶活力有促进作用。重组角蛋白酶具有良好的耐盐性, 在 12.5% 的 NaCl

基金项目: 广西壮族自治区科技重点研发计划(AA18242026, AB21196019, AB221220020); 广西壮族自治区自然科学基金(2018GXNSFAA28113, 2019GXNSFAA185003); 国家自然科学基金(31660022, 32060020); 广西壮族自治区研究生教育创新计划(YCSW2021156); 广西民族大学科研基金(2018KJQD17); 广西民族大学研究生教育创新计划(gxun-chxps 202078)

Supported by: Science and Technology Key Research and Development Program of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AA18242026, AB21196019, AB221220020); Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2018GXNSFAA28113, 2019GXNSFAA185003); National Natural Science Foundation of China (31660022, 32060020); Innovation Project of Guangxi Graduate Education (YCSW2021156); Scientific Research Project of Guangxi Minzu University (2018KJQD17); Innovation Project of Guangxi Minzu University for Graduate Education (gxun-chxps202078)

*Corresponding author: E-mail: shennaik05@126.com

Received: 2022-03-17; Accepted: 2022-05-06; Published online: 2022-05-13

作用下相对酶活为 87.55%。以酪蛋白为底物时, 酶的 K_m 值为 60.92 mg/mL、 V_{max} 值为 9.70 U/mL。

【结论】海洋来源铜绿假单胞菌 Gxun-7 的重组角蛋白酶具有良好的温度、碱、盐稳定性, 可应用于工业生产中。

关键词: 铜绿假单胞菌; 角蛋白酶; 异源表达; 酶学性质

Cloning and expression of keratinase gene from a marine-derived *Pseudomonas aeruginosa* Gxun-7 and enzymatic properties of the recombinant enzyme

YANG Mengying, XIE Chenjie, LI Shiyong, ZHANG Hongyan, WANG Yibing, SHEN Naikun*, JIANG Mingguo

Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modifications, Guangxi Key Laboratory of Microbial Plant Resources and Utilization, School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, Guangxi, China

Abstract: [Background] Keratinase is a kind of hydrolase that specifically degrades keratin, and has important application potential in animal feed, biological fertilizer, medicine, washing, tanning, and environmental treatment. [Objective] The keratinase gene of *Pseudomonas aeruginosa* Gxun-7 from marine environment was cloned and expressed, and the enzymatic properties of recombinant enzyme were investigated, which laid a foundation for the application of keratinase in industrial production. [Methods] Based on the putative keratinase gene of *P. aeruginosa* Gxun-7 genome, primers were designed to obtain keratinase gene *kp2*. The recombinant expression plasmid pET22b-*kp2* was constructed, and transformed into *E. coli* RosettaGamiB (DE3) for induced expression. Meanwhile, the expression conditions of the recombinant expression strain were optimized. The recombinant keratinase was isolated and purified by nickel column and its enzymatic properties were studied. [Results] The molecular weight of recombinant keratinase was about 33 kDa, and the optimal temperature was 40 °C at pH 8.0. The recombinant keratinase had good stability at temperature of 30–60 °C and pH 6.5–8.0. Metal ions including Co^{2+} and Cu^{2+} , and chemical reagents including sodium dodecyl sulfonate (SDS), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) inhibited the enzyme activity, whereas Mg^{2+} , K^+ , mercaptoethanol, and dithiothreitol (DTT) promoted the enzyme activity. The recombinant keratinase showed good salt tolerance, and the relative enzyme activity was 87.55% under the action of 12.5% NaCl. When casein was used as substrate, the K_m and V_{max} of the enzyme were 60.92 mg/mL and 9.70 U/mL. [Conclusion] The recombinant keratinase from the marine-derived *P. aeruginosa* Gxun-7 has good stability in temperature, alkali and salt, which can be applied to industrial production in the future.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; keratinase; heterologous expression; enzymatic properties

角蛋白是一类广泛存在于自然界不溶或微溶于水的硬性蛋白, 分子间以大量的二硫键、氢键和疏水相互作用交联形成稳定的 α -螺旋和 β -折叠结构, 难以被常见的蛋白酶(木瓜蛋白

酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶)水解^[1]。羽毛作为家禽加工过程中的副产品之一,其主要成分是角蛋白,如不加以有效利用,不仅会造成资源浪费,还会严重污染环境。因此,将羽毛废弃物转化为可利用的蛋白质资源至关重要。

角蛋白酶可以特异性降解羽毛角蛋白,根据活性中心不同主要分为丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶,在动物饲料^[2]、生物肥料^[3]、医学^[4]、洗涤^[5]、制革^[6]及环境治理^[7]等方面具有重要的应用潜力。利用角蛋白酶对废弃羽毛进行降解,不但条件温和、能耗低、绿色环保,而且降解过程中不会破坏氨基酸,成为目前发展最快、最有前途的羽毛降解方式。角蛋白酶在细菌、真菌和放线菌中均有分布,目前研究较多的角蛋白酶主要来源于细菌,如枯草芽孢杆菌 B-3 来源的角蛋白酶,酶活力为 14.8 U/mL,该酶在 50 °C 处理 10 min 后剩余酶活在 20% 左右^[8];地衣芽孢杆菌 CP-16 来源的角蛋白酶,在 75 °C 处理 5 min 后相对酶活力仅为 30.65%^[9];地衣芽孢杆菌 HK-1 来源的角蛋白酶最适温度为 60 °C,但酶活力会被 NaCl、EDTA 等试剂强烈抑制^[10]。虽然细菌来源的角蛋白酶具有易提取、易纯化和后期处理工艺相对简单等优势,但仍然存在酶活力低、稳定性差、反应条件适用范围窄等系列问题,直接影响角蛋白酶的产业化应用^[11-13]。因此亟须探索稳定性好、酶活力高的角蛋白酶,以满足角蛋白酶降解废弃羽毛的产业化需求。

本实验室前期从广西壮族自治区北部湾海鸭养殖场淤泥分离出一株可高效降解羽毛的铜绿假单胞菌 Gxun-7,该菌株 48 h 内可将 2.5% (质量体积分数)整根羽毛几乎完全降解,而且分泌的粗酶液具有良好的温度、化学试剂及盐的耐受性,因此推测该酶具有工业应用价值^[14]。然而铜绿假单胞菌为条件致病菌,对人类健康

及环境污染存在潜在风险,而且目前国内未见关于对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)角蛋白酶基因异源表达的研究。因此,本研究从该菌株中克隆出角蛋白酶基因,异源表达于大肠杆菌,利用镍柱对重组角蛋白酶进行纯化并探究其酶学特性,以期为将来的大规模应用及酶分子结构改造研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

铜绿假单胞菌 Gxun-7 由本实验室从广西壮族自治区北部湾海鸭养殖场淤泥中筛选获得;质粒 pET-22b(+)由本实验室保存;大肠杆菌 *E. coli* Top10 和 *E. coli* RosettaGamiB (DE3) 感受态细胞购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

2×SuperStar Plus PCR Mix、快速质粒小提试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒,天根生物科技(北京)有限公司;限制性内切酶 *Nco* I、*Bam*H I 及 T4 DNA 连接酶,北京全式金生物技术有限公司。镍柱,宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 角蛋白酶基因的克隆

根据菌株全基因组测序结果、NCBI 已发布的铜绿假单胞菌角蛋白酶基因序列及表达载体 pET-22b(+)的多克隆位点,利用 Vector NTI 软件设计特异性引物 *kp2*-F (5'-CCATGGCCGACC TGATCGACGTGTCCAAACT-3',下划线为 *Nco* I 酶切位点)和 *kp2*-R (5'-GGATCCAACGCGC TCGGGCAGGTCACGCCGACG-3',下划线为 *Bam*H I 酶切位点)。以 *P. aeruginosa* Gxun-7 基因组为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:

2×SuperStar Plus PCR Mix 25 μ L, DNA 2 μ L, *kp2*-F/R 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 4 min;95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳检测后,交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,并与 GenBank 上已发布的序列进行比对。

1.2.2 重组表达载体的构建

将扩增获得的角蛋白酶基因产物用 DNA 纯化试剂盒纯化后,以 *Nco* I 和 *Bam*H I 进行双酶切处理,并连接到经相同双酶切的 pET-22b(+)载体上。将连接产物转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞,挑取转化子,提取质粒用 *Bam*H I 和 *Nco* I 进行双酶切验证,将验证正确的质粒交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达

将测序正确的重组质粒 pET22b-*kp2* 转入 *E. coli* RosettaGamiB (DE3)感受态细胞,获得重组菌株。将重组菌株及对照菌株在 LB 平板上划线分离单菌落,并接种于 20 mL 含有 100 mg/mL 氨苄的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜制备种子液,将种子液以 5% (体积分数)的接种量转接到 50 mL 含有相同抗生素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 3–4 h,当 OD_{600} 约为 0.8 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,然后调整培养温度至 30 $^{\circ}$ C,诱导 4 h,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 后取菌体进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.4 诱导表达条件的优化

以 1.2.3 所述为标准的诱导流程,采取单一变量控制法对 IPTG 浓度、 OD_{600} 、诱导温度、诱导时间进行逐一优化,以提高表达量。其中, IPTG 浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.5、2.0 mmol/L; OD_{600} 分别为 0.2、

0.4、0.6、0.8、1.0、1.2; 诱导温度分别为 20、25、30、37 $^{\circ}$ C; 诱导时间分别为 2、4、6、8、10、12 h。

1.2.5 重组蛋白的纯化

在最佳诱导表达条件下,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,将菌体用预冷的细胞破壁缓冲液重悬,在冰浴条件下超声破碎(工作时间 3 s,间歇时间 5 s,功率 200 W),超声约 20 min 至菌液清亮,再次离心并收集上清液。利用镍柱分离纯化上清液中的重组角蛋白酶,将纯化后的重组角蛋白酶进行 SDS-PAGE 电泳检测。使用改良型 Bradford 法测定蛋白的浓度^[15]。

1.2.6 角蛋白酶活力测定

采用福林酚法对角蛋白酶活力进行测定,具体方法参照文献[14]。

角蛋白酶活力单位定义:在 50 $^{\circ}$ C,每分钟生成 1 μ g 酪氨酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

1.2.7 重组角蛋白酶的酶学性质

(1) 最适温度和温度稳定性

在 pH 7.5 的条件下,分别于 30、40、50、60、70、80 和 90 $^{\circ}$ C 测定酶活力。并将酶液放置在上述温度条件下保温 1 h,测定剩余酶活,以探究其温度稳定性。以测得的最高酶活为 100%,计算不同温度条件下的相对酶活力。

(2) 最适 pH 和 pH 稳定性

在最适温度条件下,分别于 pH 值为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的 Tris-HCl 缓冲液和 pH 值为 8.5、9.0、9.5 的 Gly-NaOH 缓冲液测定酶活力。将酶液保存在上述不同 pH 的缓冲液中 1 h,测定其剩余酶活。将测得的最高酶活定义为 100%,计算不同 pH 条件下的相对酶活力。

(3) 金属离子对酶活力的影响

在最适条件下,向反应体系中添加不同的

金属离子(MnCl_2 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 KCl 、 BaCl_2 、 SiCl_2 、 CoCl_2 、 AlCl_3 、 CuCl_2), 使各金属离子终浓度分别为 0.002 5、0.025 和 0.25 mol/L, 然后测定酶活力。以未添加金属离子测定的酶活力为 100%, 计算不同金属离子条件下的相对酶活力。

(4) 化学试剂对酶活力的影响

在最适条件下, 在反应体系中加入终浓度分别为 2.5、5.0 mmol/L 的 EDTA、PMSF、SDS 及终浓度为 2.5%、5.0% (体积分数) 的异丙醇、巯基乙醇、DTT、DMSO, 测定酶活力。以不添加化学试剂测定的酶活力为 100%, 计算不同化学试剂条件下的相对酶活力。

(5) 底物特异性

在最适条件下, 配制 2% (质量体积分数) 的不同底物溶液(头发、羽毛、羽毛粉、角蛋白、酪蛋白和牛血清白蛋白)测定酶活力。以最高酶活力为 100%, 计算不同底物下的相对酶活力。

(6) NaCl 浓度对酶活力的影响

在最适条件下, 向反应体系中分别加入终浓度为 2.5%、5.0%、7.5%、10.0% 和 12.5% (质量体积分数) 的 NaCl, 于 4 °C 保存 1 h, 测定其剩余酶活力。将不添加 NaCl 测得的酶活力定义为 100%, 计算不同 NaCl 浓度下的相对酶活力。

(7) 酶动力学常数

在最适条件下, 以酪蛋白为底物进行酶动力学检测, 底物浓度分别配制成 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5% 和 4.0% (质量体积分数), 测定酶活力。以不同浓度酪蛋白的倒数为横坐标, 以不同浓度酪蛋白条件下重组角蛋白酶反应速率的倒数为纵坐标, 基于米氏方程进行双倒数作图, 计算出酶的 V_{\max} 和 K_m 值。

1.3 统计分析

采用 Excel 2016 和 SPSS 21 对实验数据进行统计分析, 以 GraphPad Prism 8 制图。

2 结果与分析

2.1 角蛋白酶基因 *kp2* 的克隆

如图 1 所示, 以铜绿假单胞菌 Gxun-7 基因组 DNA 为模板, 以 *kp2*-F、*kp2*-R 为引物, 扩增出一条 1 428 bp 的 DNA 片段, 与预期大小一致。将 *kp2* 序列提交到 NCBI, 获得的 GenBank 登录号为 OM992359。序列比对分析发现, *kp2* 与 NCBI 公布的铜绿假单胞菌 KS-1 来源的角蛋白酶基因 *KP2*^[16] 的相似性为 99.93%, 属于 M4 蛋白家族, 编码 475 个氨基酸。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白质的结构域, 结果表明该角蛋白酶由 FTP、PepSY、Peptidase_M4 和 Peptidase_M4_C 这 4 个保守的蛋白结构域组成, 无信号肽序列。前两者为角蛋白酶的前导肽区域, 包含 169 个氨基酸, 后两者为成熟肽区域, 包含 306 个氨基酸(图 2)。

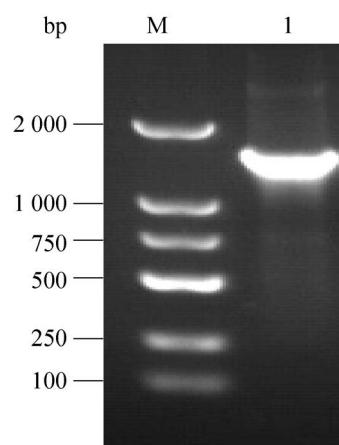


图 1 角蛋白酶基因的扩增 M: DL2000 DNA Marker; 1: *kp2* 基因 PCR 产物

Figure 1 Keratinase gene amplification. M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product of *kp2* gene.

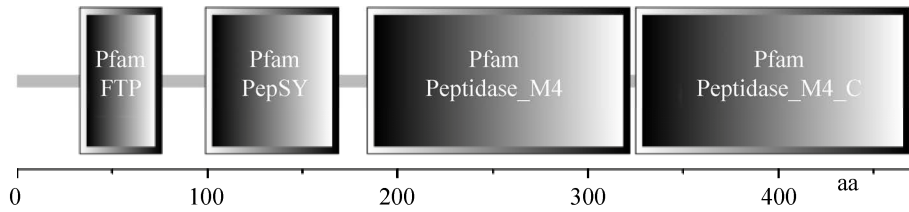


图2 角蛋白酶的结构域分析

Figure 2 Domain analysis of keratinase.

2.2 重组表达载体 pET22b-*kp2* 的构建

将 *kp2* 基因连接到表达载体 pET-22b(+)上获得重组质粒 pET22b-*kp2*, 并用 *Nco* I 和 *Bam*H I 进行双酶切验证, 结果如图 3 所示。重组质粒经双酶切后得到 2 个条带, 一条在 1 500 bp 附近, 与 *kp2* 基因大小一致; 另一条大于 5 000 bp, 与线性的 pET22b(+)质粒大小一致, 同时测序结果也正确, 由此表明重组质粒构建成功。

2.3 重组蛋白的诱导表达

将构建成功的重组质粒 pET22b-*kp2* 转化到 *E. coli* RosettaGamiB (DE3)中, 获得重组菌株。经 IPTG 诱导后, 重组菌具有角蛋白酶活

力(27.92 U/mL), 而对照菌未检测到酶活力。同时, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果见图 4, 相较于诱导后的对照菌, 诱导后的重组菌在 33 kDa 附近出现了非常明显的蛋白条带, 表明重组角蛋白酶成功实现了在大肠杆菌中的异源表达。

2.4 诱导表达条件的优化

为提高重组角蛋白酶在大肠杆菌中的表达量及酶活力, 对 IPTG 浓度、 OD_{600} 、诱导温度和诱导时间进行优化。结果发现, 这 4 个因素对角蛋白酶表达量及酶活力的影响较大, 而且角蛋白酶的表达量与酶活力呈正相关(图 5、

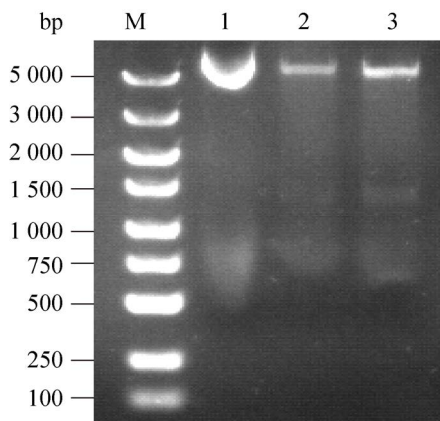


图3 重组质粒的双酶切鉴定 M: DL5000 DNA Marker; 1: pET22b-*kp2* 重组质粒; 2-3: 重组质粒 *Nco* I/*Bam*H I 双酶切

Figure 3 Double digestion identification of recombinant plasmid. M: DL5000 DNA Marker; 1: pET22b-*kp2* recombinant plasmid; 2-3: Double digestion by *Nco* I/*Bam*H I of recombinant plasmid.

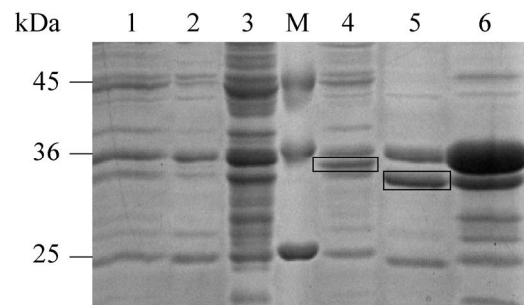


图4 重组角蛋白酶的诱导表达 M: 蛋白 Marker; 1-3: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b 菌液、破胞后上清、破胞后沉淀; 4-6: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* 菌液、破胞后上清、破胞后沉淀
Figure 4 Induced expression of recombinant keratinase. M: Protein Marker; 1-3: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b bacterial liquid, broken supernatant, broken precipitation; 4-6: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* bacterial liquid, broken supernatant, broken precipitation.

图 6)。随着 IPTG 浓度的增加, 重组角蛋白酶活力不断升高, 当 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 时酶活力最高, 为 32.99 U/mL; 当 IPTG 浓度超过 0.3 mmol/L 时酶活力基本稳定, 维持在 31.00 U/mL (图 6A)。OD₆₀₀ 在 0.2–0.8 范围内, 重组角蛋白酶活力变化不明显, 但当 OD₆₀₀ 为 0.8 时重组角蛋白酶活力为 33.26 U/mL, 当 OD₆₀₀ 增加至 1.2 时重组角蛋白酶活力降低为 3.52 U/mL (图 6B)。随着诱导温度的增加, 重

组角蛋白酶活力呈现先升高后降低的趋势, 诱导温度为 30 °C 时最适合菌株的生长, 此时酶活力为 34.09 U/mL (图 6C)。在 30 °C 诱导 8 h 时酶活力最高, 为 45.38 U/mL, 诱导时间的继续增加会影响蛋白的表达, 导致酶活力降低 (图 6D)。因此, 重组角蛋白酶表达的最佳诱导条件为: IPTG 浓度为 0.3 mmol/L, OD₆₀₀ 为 0.8, 诱导温度为 30 °C, 诱导时间为 8 h, 酶活力达 45.38 U/mL。

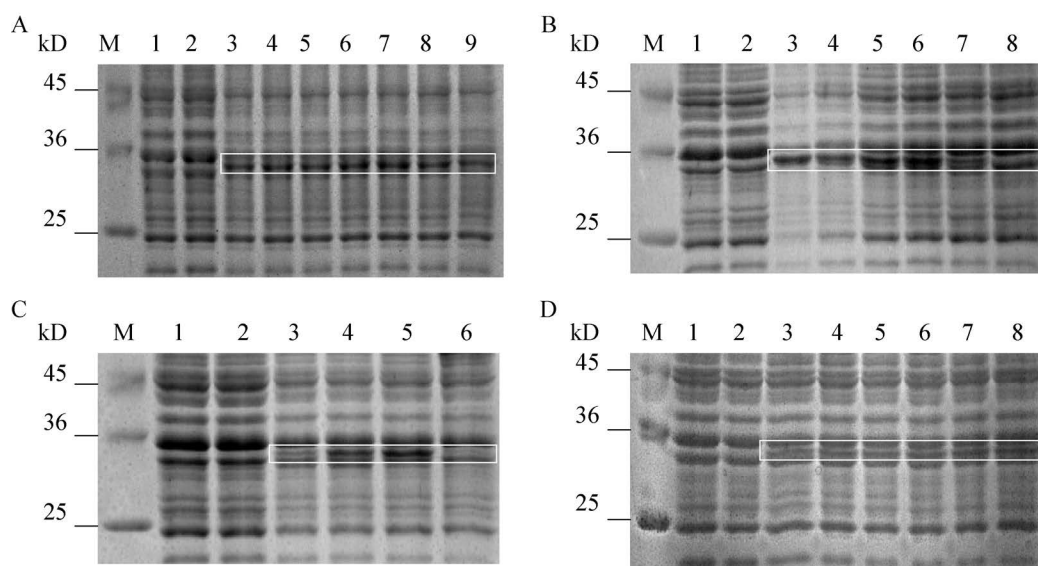


图 5 不同诱导表达条件对重组角蛋白酶表达量的影响 M: 蛋白 Marker; 1: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b 未诱导; 2: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* 未诱导。A: IPTG 浓度对蛋白表达的影响; 3–9: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* 诱导(IPTG 浓度为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L)。B: OD₆₀₀ 对蛋白表达的影响; 3–8: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* 诱导(OD₆₀₀ 为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2)。C: 诱导温度对蛋白表达的影响; 3–6: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* 诱导(诱导温度为 20、25、30 和 37 °C)。D: 诱导时间对蛋白表达的影响; 3–8: *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* 诱导(诱导时间为 2、4、6、8、10 和 12 h)

Figure 5 Effects of different induced expression conditions on the expression yield of recombinant keratinase. M: Protein Marker; 1: Uninduced *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b; 2: Uninduced *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2*. A: Effect of IPTG concentration on protein expression; 3–9: Induced *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* (IPTG concentrations of 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0 mmol/L). B: Effect of OD₆₀₀ on protein expression; 3–8: Induced *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* (OD₆₀₀ of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2). C: Effect of induction temperature on protein expression; 3–6: Induced *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* (induction temperature of 20, 25, 30, 37 °C). D: Effect of induction time on protein expression; 3–8: Induced *E. coli* RosettaGamiB (DE3)/pET22b-*kp2* (induction time of 2, 4, 6, 8, 10, 12 h).

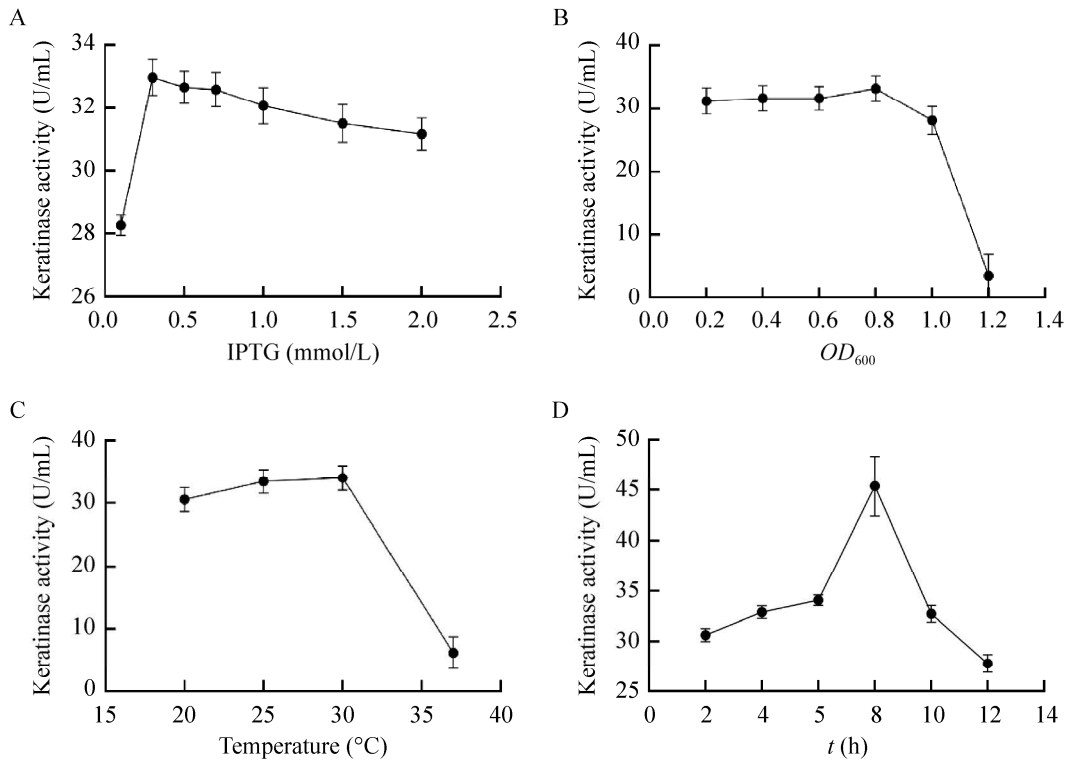


图 6 不同诱导表达条件对重组角蛋白酶活力的影响 A: IPTG 浓度对酶活力的影响; B: OD_{600} 对酶活力的影响; C: 诱导温度对酶活力的影响; D: 诱导时间对酶活力的影响

Figure 6 Effects of different induced expression conditions on the activity of recombinant keratinase. A: Effect of IPTG concentration on enzyme activity; B: Effect of OD_{600} on enzyme activity; C: Effect of induction temperature on enzyme activity; D: Effect of induction time on enzyme activity.

2.5 重组蛋白的纯化

在上述优化得到的最佳条件下诱导重组角蛋白酶的表达, 并利用镍柱进行分离纯化。纯化结果见表 1, 纯化后重组角蛋白酶的比酶活为 427.48 U/mg, 回收率为 35.14%。重组角蛋白酶的 SDS-PAGE 检测结果如图 7 所示, 经镍柱纯化后得到一条单一且清晰的条带, 蛋白分

子量约为 33 kDa。

2.6 重组角蛋白酶的酶学性质

2.6.1 最适温度和温度稳定性

如图 8A 所示, 重组角蛋白酶的最适反应温度为 40 °C, 在 30–70 °C 范围内均能保持较高酶活力(>85%), 说明重组角蛋白酶的温度反应范围较宽。将重组角蛋白酶保温 1 h 后测定

表 1 重组角蛋白酶的纯化结果

Table 1 Purification results of recombinant keratinase

纯化步骤	总酶活	总蛋白	比酶活	回收率	纯化倍数
Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery rate (%)	Purification fold
破胞上清液	34 127.08	636.30	53.63	100.00	1.00
Broken supernatant					
镍柱	11 990.75	18.05	427.48	35.14	7.97
Nickel column					

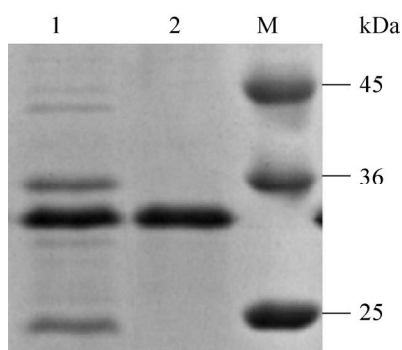


图 7 重组角蛋白酶的纯化 M: 蛋白 Marker; 1: 重组角蛋白酶粗酶液; 2: 纯化的重组角蛋白酶

Figure 7 Purification of recombinant keratinase. M: Protein marker; 1: Recombinant keratinase crude enzyme; 2: Purified recombinant keratinase.

其剩余酶活, 由图 8B 可知, 重组角蛋白酶在 30–60 °C 具有较好的温度稳定性, 相对酶活力超过 70%, 当温度高于 60 °C 时酶活力迅速降低, 在 90 °C 热处理 1 h 后剩余酶活仅为 2.17%。

2.6.2 最适 pH 和 pH 稳定性

如图 8C 所示, 重组角蛋白酶的最适反应 pH 值为 8.0。在 pH 值为 6.5 时, 相对酶活力为 87.95%; pH 值为 9.5 时酶活力降低, 但相对酶活力仍超过 80%, 说明重组角蛋白酶的 pH 反应范围较宽。pH 稳定性实验结果(图 8D)表明, 重组角蛋白酶在 pH 6.5–8.0 处理 1 h 后剩余酶活力高于 85%; 在 pH 超过 8.5 时酶活损失严重, 但相对酶活仍达到 60% 以上, 说明该酶能耐受偏碱性环境。当 pH 为 8.5 时, 该酶在 Tris-HCl 缓冲液的稳定性高于 Gly-NaOH 缓冲液。

2.6.3 底物特异性

以不同的底物测定重组角蛋白酶的活性, 结果见图 8E。重组角蛋白酶对酪蛋白具有较强的水解能力。对角蛋白的水解能力次之, 相对酶活为 50.43%, 超过酪蛋白酶活力的 1/2, 符合角蛋白酶的定义^[17]。此外, 该酶还能水解牛血清蛋白和羽毛粉, 表现出的相对酶活性分

别为 9.23% 和 2.8%, 而以头发和羽毛为底物时未检测到该酶的活性。

2.6.4 NaCl 浓度对酶活力的影响

NaCl 浓度对酶活力的影响如图 8F 所示, 当 NaCl 浓度为 2.5% 时, 重组角蛋白酶的活性最高, 其相对酶活力达到 104.97%; 当 NaCl 浓度超过 2.5% 时酶活力逐渐降低, 在 12.5% NaCl 的条件下该酶的活性最低, 但相对酶活力仍超过 85%。

2.6.5 酶动力学常数

以不同浓度的酪蛋白作为底物探究重组角蛋白酶的酶动力学常数, 结果如图 8G 所示, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 得到拟合曲线的线性方程为 $y=6\ 280x+103.1$ ($R^2=0.994\ 0$), 计算得出米氏常数 K_m 为 60.92 mg/mL、 V_{max} 为 9.70 U/mL。

2.6.6 金属离子对酶活力的影响

不同金属离子对重组角蛋白酶活力的影响结果如表 2 所示, 当反应体系中 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Si^{2+} 浓度达到 0.002 5 mol/L 和 0.025 mol/L 时, 对重组角蛋白酶活力有一定的促进作用, 其中 0.025 mol/L Ca^{2+} 促进效果最明显, 较空白对照提高了 1.58 倍; 而当 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Si^{2+} 的浓度增至 0.25 mol/L 时酶活力降低, 分别为 70.84%、56.24% 和 77.11%。 Mg^{2+} 和 K^+ 对重组角蛋白酶均存在促进作用, 但 K^+ 的促进作用略强。 Co^{2+} 和 Cu^{2+} 对重组角蛋白酶均存在抑制作用且浓度越高, 抑制作用越明显。 Al^{3+} 在浓度为 0.025 mol/L 时对重组角蛋白酶的影响很小, 超过该浓度则具有抑制作用。

2.6.7 化学试剂对酶活力的影响

如表 3 所示, 重组角蛋白酶在不同化学试剂中酶活力差异明显。其中, 异丙醇和 DMSO 对酶活力影响较小, 而 SDS 明显降低酶活力, 5.0 mmol/L 的 SDS 使得酶活力几乎完全丧失。

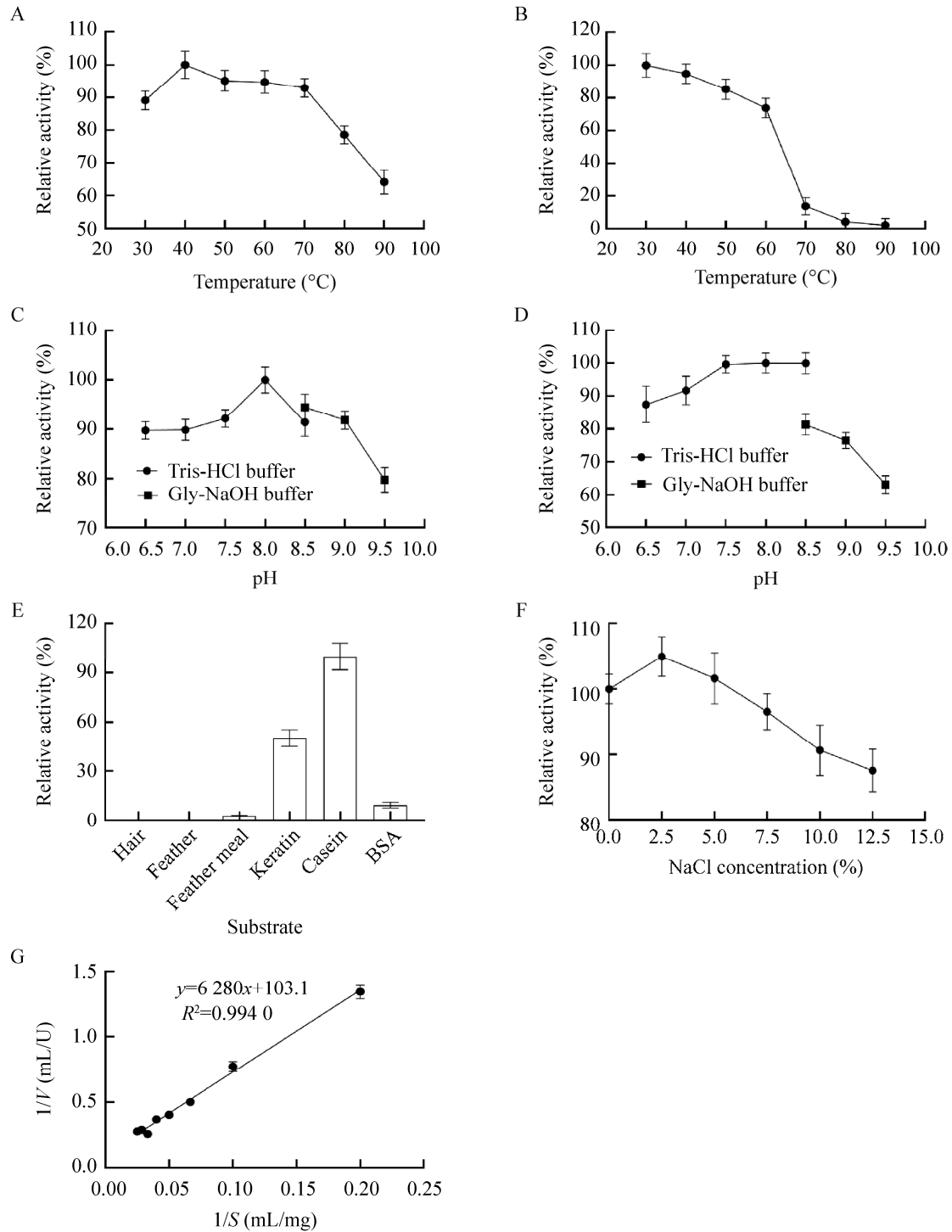


图 8 重组角蛋白酶的酶学性质 A: 最适温度; B: 温度稳定性; C: 最适 pH; D: pH 稳定性; E: 底物特异性; F: NaCl 浓度对酶活力的影响; G: 酶动力学常数

Figure 8 Enzymatic properties of recombinant keratinase. A: Optimal temperature; B: Temperature stability; C: Optimal pH; D: pH stability; E: Substrate specificity; F: The effect of NaCl concentration on enzyme activity; G: Enzyme kinetic constant.

表 2 金属离子对重组角蛋白酶活力的影响(相对活性, %)

Table 2 Effects of metal ions on the activity of recombinant keratinase (residual activity, %)

金属离子 Metal ions	浓度 Concentration (mol/L)		
	0.002 5	0.025	0.25
Control	100.00±2.77	100.00±2.77	100.00±2.77
Mn ²⁺	112.32±3.14	122.74±3.51	70.84±2.32
Mg ²⁺	125.48±2.96	122.58±2.75	101.68±3.06
Ca ²⁺	116.11±3.24	157.53±6.85	56.24±1.96
K ⁺	141.06±2.83	124.48±2.10	122.99±5.68
Si ²⁺	144.27±2.09	104.37±5.02	77.11±2.71
Co ²⁺	96.00±4.42	61.05±3.17	30.23±2.46
Al ³⁺	102.95±3.74	4.73±1.34	5.02±1.71
Cu ²⁺	91.26±3.40	0.33±0.51	0.00±0.30

表 3 化学试剂对重组角蛋白酶活力的影响(相对活性, %)

Table 3 Effects of chemical reagents on the activity of recombinant keratinase (residual activity, %)

化学试剂 Chemical reagents	浓度 Concentration (mmol/L)		化学试剂 Chemical reagents	浓度 Concentration	
	2.5	5		2.5%	5%
Control	100.00±2.77	100.00±2.77	Control	100.00±2.77	100.00±2.77
EDTA	5.97±1.24	8.55±0.29	异丙醇 Isopropyl alcohol	111.30±3.11	118.60±2.05
SDS	53.07±2.72	5.59±0.33	DMSO	110.51±2.40	117.02±0.31
PMSF	15.96±1.75	7.03±2.07	巯基乙醇 Mercaptoethanol	503.65±5.34	511.05±10.25
			DTT	521.91±4.52	545.59±12.32

PMSF 为丝氨酸蛋白酶的抑制剂, 在 2.5 mmol/L 时重组角蛋白酶只能保留 15.96% 的相对酶活。当 PMSF 浓度为 5.0 mmol/L 时剩余酶活为 7.03%。EDTA 是金属蛋白酶的抑制剂, 在 2.5 mmol/L 和 5.0 mmol/L 的 EDTA 作用下, 该酶的相对活性分别为 5.97% 和 8.55%。还原剂巯基乙醇和 DTT 能够提高重组角蛋白酶活力, 而且二者均在浓度为 5% 时表现出的活性最高, 分别为 511.05% 和 545.59%。

3 讨论与结论

角蛋白酶是一类可以降解羽毛等不溶性底物和多种蛋白的蛋白水解酶。已报道的角蛋白酶主要来源于细菌、真菌和放线菌, 大部分来自陆地环境, 而源自海洋微生物角蛋白酶的报道相对较少^[18-20]。随着角蛋白酶多种应用前景的报道, 角蛋白酶越来越受到研究者的关注,

已经有更多产角蛋白酶的海洋微生物被筛选出来^[21]。近年来, 国内外一些学者已经克隆了多个角蛋白酶基因, 并成功实现了部分基因的异源表达^[22-23]。本研究以 pET-22b(+) 为表达质粒, 以 *E. coli* RosettaGamiB (DE3) 为宿主菌, 对海洋来源铜绿假单胞菌 Gxun-7 的角蛋白酶基因 *kp2* 进行异源表达及纯化。最终获得的重组角蛋白酶分子量约为 33 kDa, 与地衣芽孢杆菌 PWD-1 (33 kDa)、假单胞菌 MS21 (30 kDa) 和枯草芽孢杆菌 KD-N2 (30.5 kDa) 来源的角蛋白酶分子量相近^[24-26]。大肠杆菌遗传背景清晰、表达水平高、操作简单、营养要求低, 是重组表达蛋白的首选菌株。pET-22b(+) 质粒自带的 *pel B* 信号肽也是大肠杆菌高效表达的因素之一。角蛋白酶与其他蛋白酶一样, 在达到有催化活性的蛋白之前, 首先在前导肽的作用下正确折叠, 最后通过自动催化去除前

导肽以产生活性成熟酶^[27]。本研究结果显示重组角蛋白酶的分子量约为 33 kDa, 小于理论值, 可能由于该酶的结构域中存在前导肽的酶切位点, 在蛋白表达过程中前导肽被剪切, 导致蛋白分子量变小^[21]。之前的研究也证实了角蛋白酶中存在前导肽结构, 并且前导肽在蛋白表达过程中会自身剪切掉^[28]。Rajput 等^[29]对前导肽进行改造后发现, 地衣芽孢杆菌来源的角蛋白酶热稳定性和底物特异性得到了显著提升。我们也尝试切掉前导肽或缩短前导肽后进行表达, 结果发现获得的重组蛋白彻底失去酶活性, 证明前导肽在蛋白质翻译后的折叠中起到无可替代的作用。前导肽在角蛋白折叠中所起的作用及机制还需进一步深入研究。

优化诱导表达条件对提高重组蛋白表达量尤为重要。本研究选取 IPTG 浓度、 OD_{600} 、诱导温度和诱导时间 4 个因素进行优化。当 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 时重组角蛋白酶活力达到最高, 为 32.99 U/mL, 继续增大 IPTG 浓度, 酶活力不再继续增加, 表明高浓度的 IPTG 对细胞有毒害作用, 抑制蛋白的表达^[30]。菌浓度 OD_{600} 对蛋白表达也具有较大影响。当 OD_{600} 小于 0.8 时诱导, 菌体浓度低, 不利于生长, 导致蛋白表达量少; 当 OD_{600} 大于 0.8 时, 培养基中的营养物质不能满足大肠杆菌的正常代谢, 也导致蛋白的表达量少。因此, 重组角蛋白酶表达的最佳 OD_{600} 为 0.8。Fang 等^[31]利用大肠杆菌表达核酸酶 Y. NSN 时发现, 当 OD_{600} 为 0.8 时核酸酶的表达量最高, 与本研究结果一致。最佳诱导温度实验结果发现, 重组角蛋白酶在 30 °C 诱导时酶活力最高, 为 34.09 U/mL, 说明 30 °C 条件下大肠杆菌处于最佳生长状态, 合成蛋白的速度快, 有利于目的蛋白的正确折叠。在 37 °C 诱导时酶活力及表达量明显降低, 可能原因是高温引起了包涵体的产生,

造成可溶性蛋白表达量下降^[32]。此外, 本研究还发现重组角蛋白酶的最佳诱导时间为 8 h, 继续延长诱导时间, 蛋白质会发生降解, 导致酶活力降低。因此确定了重组角蛋白酶表达的最佳诱导条件: IPTG 浓度为 0.3 mmol/L, OD_{600} 为 0.8, 诱导温度为 30 °C, 诱导时间为 8 h, 重组菌角蛋白酶活力为 45.38 U/mL, 高于大肠杆菌异源表达的枯草芽孢杆菌 B-3 (14.8 U/mL)^[8]和蜡样芽孢杆菌(38.2 U/mL)^[33]来源的角蛋白酶活力。

重组角蛋白酶的最适反应温度为 40 °C, 与嗜麦芽寡养单胞菌 DHHJ 来源的角蛋白酶一致^[34], 并且在 50–70 °C 时活性都比较高, 温度范围较宽。同时该酶在 30–50 °C 条件下稳定性较好, 而且在 60 °C 处理 1 h 后残余活性仍然超过 70%, 高于枯草芽孢杆菌 KS12 来源的角蛋白酶的酶活力(61.4%)^[35]。重组角蛋白酶的最适 pH 值为 8.0, 与多数角蛋白酶相近, 而拟诺卡氏菌 TOA-1 来源的角蛋白酶在强酸性条件下具有最高的催化活性^[36]。该酶具有较好的 pH 稳定性, 在 pH 6.5–8.0 范围内处理 1 h 后残余酶活在 85% 以上, 在 pH 9.5 时残余酶活仍高于 60%, 优于嗜热古细菌的角蛋白酶, 有利于将其开发成商品用酶^[37]。金属离子和化学试剂对重组角蛋白酶的影响较大, 0.025 mol/L 的 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 K^{+} 分别将酶活力提高 22.74%、22.58%、57.53% 和 24.48%, 这 4 个金属离子可能是该酶的辅助因子, 能够稳定酶的立体结构使酶活力增加。 Co^{2+} 和 Cu^{2+} 均对酶活力有抑制作用, 可能是金属离子与酶发生反应, 破坏了酶的空间结构, 这与铜绿假单胞菌 C11 来源的角蛋白酶相似^[38]。EDTA 和 PMSF 抑制了该酶 90% 的活性, 表明该酶属于丝氨酸金属蛋白酶^[39]。重组角蛋白酶在表面活性剂 SDS 存在时酶活力降低, 此结果与链霉菌来源

的角蛋白酶一致, 推测表面活性剂能够与酶形成复合物, 破坏酶的盐键、氢键和疏水键^[40]。5.0%的巯基乙醇和 DTT 能将酶活力分别提高至 511.05%和 545.59%, 说明催化过程中可能有巯基基团的参与。该酶具有较好的 NaCl 耐受性, 经 12.5%的 NaCl 处理后残余酶活力仍超过 85%, 与地衣芽孢杆菌 SWJS333 来源的角蛋白酶相似, 这可能是由于该酶来源于海洋环境, 能够在高盐浓度存在下保持其功能构象^[41]。在最适底物酪蛋白的作用下, 重组角蛋白酶的 K_m 值为 60.92 mg/mL, 而热带芽孢杆菌^[42]和短短芽孢杆菌^[43]来源的角蛋白酶水解酪蛋白的 K_m 值分别为 15.24 和 4.64 mg/mL, 说明不同来源的角蛋白酶对酪蛋白的降解能力不同, 以酪蛋白为底物时测得的 K_m 值也不同。

本研究实现了 *P. aeruginosa* Gxun-7 角蛋白酶基因 *kp2* 在大肠杆菌中的异源表达。重组角蛋白酶分子量约为 33 kDa, 最适温度和 pH 值分别为 40 °C 和 8.0, 在温度 30–60 °C、pH 6.5–8.0 范围内保持相对稳定。该酶能被 EDTA 和 PMSF 抑制, 属于丝氨酸金属蛋白酶, 耐盐性较好, 对酪蛋白和角蛋白具有较好的降解效果。因此, 重组角蛋白酶良好的酶学特性使其在羽毛角蛋白降解工业中具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] Holkar CR, Jain SS, Jadhav AJ, Pinjari DV. Valorization of keratin based waste[J]. Process Safety and Environmental Protection, 2018, 115: 85-98
- [2] Huang Y, Liu X, Ran Y, Cao Q, Zhang A, Li D. Production of feather oligopeptides by a newly isolated bacterium *Pseudomonas otitis* H11[J]. Poultry Science, 2019
- [3] Verma A, Singh H, Anwar S, Chattopadhyay A, Tiwari KK, Kaur S, Dhilon GS. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(4): 476-491
- [4] Mohorčič M, Torkar A, Friedrich J, Kristl J, Murdan S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance unguinal drug delivery[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2007, 332(1/2): 196-201
- [5] Reddy MR, Reddy KS, Chouhan YR, Bee H, Reddy G. Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive[J]. Bioresource Technology, 2017, 243: 254-263
- [6] Akhter M, Wal Marzan L, Akter Y, Shimizu K. Microbial bioremediation of feather waste for keratinase production: an outstanding solution for leather dehairing in tanneries[J]. Microbiology Insights, 2020, 13: 1178636120913280
- [7] Schommer VA, Wenzel BM, Daroit DJ. Anaerobic co-digestion of swine manure and chicken feathers: effects of manure maturation and microbial pretreatment of feathers on methane production[J]. Renewable Energy, 2020, 152: 1284-1291
- [8] 侯晟琦, 王丽华, 赖欣, 陈惠, 吴琦, 韩学易. 角蛋白酶产生菌的分离鉴定及其 *kerC* 的克隆表达[J]. 中国环境科学, 2012, 32(10): 1845-1852
Hou SQ, Wang LH, Lai X, Chen H, Wu Q, Han XY. Isolation, identification of B-3 *Bacillus subtilis* and cloning, expression of *kerC*[J]. China Environmental Science, 2012, 32(10): 1845-1852 (in Chinese)
- [9] 傅岩, 张铁鹰, 孙英霞, 李松育. 通过定向进化技术提高角蛋白酶的热稳定性研究[J]. 动物营养学报, 2021, 33(10): 5887-5894
Fu Y, Zhang TY, Sun YX, Li SY. Enhancing thermostability of keratinase by directed evolution technology[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(10): 5887-5894 (in Chinese)
- [10] Korkmaz H, Hur H, Dincer S. Characterization of alkaline keratinase of *Bacillus licheniformis* strain HK-1 from poultry waste[J]. Annals of Microbiology, 2004, 54(2): 201-211
- [11] Arokiyaraj S, Varghese R, Ahmed BA, Duraipandiyar V, Al-Dhabi NA. Optimizing the fermentation conditions and enhanced production of keratinase from *Bacillus cereus* isolated from halophilic environment[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(2): 378-381
- [12] Bohacz J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(1): 13
- [13] Gousterova A, Braikova D, Goshev I, Christov P, Tishinov K, Vasileva-Tonkova E, Haertlé T, Nedkov P.

- Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 40(5): 335-340
- [14] 杨梦莹, 庞坤容, 潘江欣, 张红岩, 王一兵, 姜明国, 申乃坤. 一株可高效降解羽毛的铜绿假单胞菌的分离、鉴定、产酶条件优化及其酶活研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(3): 968-981
Yang MY, Pang KR, Pan JX, Zhang HY, Wang YB, Jiang MG, Shen NK. Isolation, identification, optimization of enzyme-producing conditions and enzymatic activity of a feather-degradable *Pseudomonas aeruginosa* strain[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 968-981 (in Chinese)
- [15] Bradford MM. 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(1/2): 248-254
- [16] Sharma R, Gupta R. Extracellular expression of keratinase Ker P from *Pseudomonas aeruginosa* in *E. coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(12): 1863-1868
- [17] Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(6): 1735-1750
- [18] Abdel-Fattah AM, El-Gamal MS, Ismail SA, Emran MA, Hashem AM. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, 16(2): 311-318
- [19] Shapourzadeh A, Rahimi-Verki N, Atyabi SM, Shams-Ghahfarokhi M, Jahanshiri Z, Irani S, Razzaghi-Abyaneh M. Inhibitory effects of cold atmospheric plasma on the growth, ergosterol biosynthesis, and keratinase activity in *Trichophyton rubrum*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 608: 27-33
- [20] Nandini A, Madhusudhan DN, Dayanand A. Enhanced production, purification and characterization of alkaline keratinase from *Streptomyces minutiscleroticus* DNA38[J]. *International Letters of Natural Sciences*, 2015, 43: 27-37
- [21] Manivasagan P, Sivakumar K, Gnanam S, Venkatesan J, Kim SK. Production, biochemical characterization and detergents application of keratinase from the marine actinobacterium *Actinoalloteichus* sp. MA-32[J]. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2014, 17(4): 669-682
- [22] Mwanza EP, Van Der Westhuizen WA, Boucher CE, Charimba G, Hugo C. Heterologous expression and characterisation of a keratinase produced by *Chryseobacterium carnipullorum*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2021, 186: 105926
- [23] Hu H, Gao J, He J, Yu B, Zheng P, Huang ZQ, Mao XB, Yu J, Han GQ, Chen DW. Codon optimization significantly improves the expression level of a keratinase gene in *Pichia pastoris*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58393
- [24] Lin X, Lee CG, Casale ES, Shih JC. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10): 3271-3275
- [25] Tork S, Aly MM, Nawar L. Biochemical and molecular characterization of a new local keratinase producing *Pseudomonas* sp., MS21[J]. *Asian Journal of Biotechnology*, 2009, 2(1): 1-13
- [26] Cai CG, Chen JS, Qi JJ, Yin Y, Zheng XD. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, 9(9): 713-720
- [27] 刘柏宏. *Bacillus licheniformis* 角蛋白酶的高效表达、热稳定性及底物特异性改造[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2015
Liu BH. Over expression of *Bacillus licheniformis* keratinase, its molecular modification for enhanced thermostability and substrate specificity[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)
- [28] Sharma R, Murty NAR, Gupta R. Molecular characterization of N-terminal pro-sequence of keratinase Ker P from *Pseudomonas aeruginosa*: identification of region with chaperone activity[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(3/4): 892-901
- [29] Rajput R, Tiwary E, Sharma R, Gupta R. Swapping of pro-sequences between keratinases of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus*: altered substrate specificity and thermostability[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51(3): 131-138
- [30] Fang Z, Sha C, Peng Z, Zhang J, Du GC. Protein engineering to enhance keratinolytic protease activity and excretion in *Escherichia coli* and its scale-up fermentation for high extracellular yield[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 121: 37-44
- [31] Fang XJ, Tang ZX, Li ZH, Zhang ZL, Shi L. Production of a new non-specific nuclease from *Yersinia enterocolitica* subsp. *palaearctica*: optimization of induction conditions using response surface

- methodology[J]. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 2014, 28(3): 559-566
- [32] 张志强, 刘鑫潮, 牛金中, 黄瑜, 王蓓, 简纪常. 尼罗罗非鱼 *Galectin-4* 基因的原核表达及诱导条件优化[J]. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(5): 118-123
Zhang ZQ, Liu XC, Niu JZ, Huang Y, Wang B, Jian JC. Prokaryotic expression and optimization of *Galectin-4* gene from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(5): 118-123 (in Chinese)
- [33] Gurunathan R, Huang B, Ponnusamy VK, Hwang JS, Dahms HU. Novel recombinant keratin degrading subtilisin like serine alkaline protease from *Bacillus cereus* isolated from marine hydrothermal vent crabs[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 12007
- [34] Cao ZJ, Zhang Q, Wei DK, Chen L, Wang J, Zhang XQ, Zhou MH. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, 36(2): 181-188
- [35] 徐志龙, 尹雅洁, 夏险, 梁运祥, 赵述森, 胡远亮. 角蛋白酶生产菌株的筛选鉴定及酶学性质研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2021, 48(4): 620-624
Xu ZL, Yin YJ, Xia X, Liang YX, Zhao SM, Hu YL. Screening, identifying and enzymatic characterizations of a keratinase-producing strain[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2021, 48(4): 620-624 (in Chinese)
- [36] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(1): 21-33
- [37] Parinayawanich S, Sittipol D, Ajingi YS, Rodpan S, Pattanapanyasat K, Jongruja N. Application of recombinant hyperthermostable keratinase for degradation of chicken feather waste[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 36: 102146
- [38] Han MH. Isolation and characterization of a keratinolytic protease from a feather-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* C11[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(9): 2211-2221
- [39] Zhang RX, Gong JS, Su C, Zhang DD, Tian H, Dou WF, Li H, Shi JS, Xu ZH. 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
- [40] Tatineni R, Doddapaneni KK, Potumarthi RC, Vellanki RN, Kandathil MT, Kolli N, Mangamoori LN. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp.[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(6): 1596-1602
- [41] 钟泓波, 郇惠杰, 雷芬芬, 赵强忠, 赵谋明, 崔春. 产蛋白酶深海细菌的筛选及其蛋白酶学性质[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(8): 108-112
Zhong HB, Huan HJ, Lei FF, Zhao QZ, Zhao MM, Cui C. Isolation of producing-proteases marine bacteria and characterization of the proteases in fermented liquid[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(8): 108-112 (in Chinese)
- [42] Shen NK, Yang MY, Xie CJ, Pan JX, Pang KR, Zhang HY, Wang YB, Jiang MG. Isolation and identification of a feather degrading *Bacillus tropicus* strain Gxun-17 from marine environment and its enzyme characteristics[J]. *BMC Biotechnology*, 2022, 22(1): 11
- [43] 许佳惠, 尹雅洁, 李欣悦, 柳凯, 梁运祥, 赵述森, 胡远亮. 产角蛋白酶毕赤酵母工程菌的构建及酶学性质[J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(3): 71-76
Xu JH, Yin YJ, Li XY, Liu K, Liang YX, Zhao SM, Hu YL. Construction and characterization of recombinant *Pichia pastoris* strain with keratinase production[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(3): 71-76 (in Chinese)