

## 角蛋白酶的研究与应用前景

杨 连<sup>1</sup>, 曹永洪<sup>2</sup>, 杨培龙<sup>1</sup>, 黄火清<sup>1\*</sup>

1. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081;

2. 上犹中学, 江西 赣州, 341200

**摘要:** 角蛋白酶(keratinase)是一种可以特异性降解角蛋白的酶类,其来源广泛,多种微生物在羽毛降解过程中均可产生角蛋白酶。不同菌种来源的角蛋白酶,其结构、理化性质、活性和底物也不同。其在饲料行业、制革工业和环境废弃物处理等多个方面具有广泛的应用前景,能够产生巨大的社会效益和经济效益。本文系统总结了角蛋白酶的来源、分类、理化性质、作用机理及其在基因工程研究等方面的一些最新进展,简要介绍了其应用研究现状,并展望了角蛋白酶的应用前景。

**关键词:** 角蛋白;角蛋白酶;羽毛降解;应用领域

DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2015.01.04

## Recent Advances and Application Prospects in Keratinases

YANG Lian<sup>1</sup>, CAO Yong-hong<sup>2</sup>, YANG Pei-long<sup>1</sup>, HUANG Huo-qing<sup>1\*</sup>

1. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Shangyou Middle School, Jiangxi Ganzhou 341200, China

**Abstract:** Keratinase is kind of specific enzyme that can degrade keratin. It derives from a wealth of sources. A variety of microorganisms can produce keratinase in the process of feather degradation. Keratinases from different strains are different in structure, physical and chemical properties, activity and also substrate. Keratinase has broad application prospects in feed industry, leather industry, and environmental waste disposal, etc., which bring enormous social and economic benefits. This paper summarizes research progress on keratinase in physicochemical properties, enzymatic mechanisms, sources and classification, as well as genetic engineering, introduces the status of keratinase application and finally proposes the application prospects.

**Key words:** keratin; keratinase; feather-degrading; application fields

角蛋白酶是一种特殊的蛋白酶类,其能降解硬质且高度交联的蛋白类物质如角蛋白。角蛋白有多种存在形式包括头发、指甲、羊毛、蹄、角和羽毛等。由于角蛋白结构中含有较多的二硫键且高度交联,使其结构非常稳定,不易在环境中降解,成为了固体废物管理的一部分。我国拥有非常丰富的角蛋白资源,年产角蛋白上百万吨<sup>[1]</sup>。近年来,我国畜牧业迅速发展,养殖业不断趋于规模化,羽毛作为家禽饲养和屠宰工业的副产物,羽毛类角质废弃物产量越来越大,而羽毛中蛋白质和

氨基酸含量丰富,是潜在的优良蛋白质资源,其合理开发和利用不仅可以避免环境污染,还可以解决饲料蛋白来源等问题,可谓一举多得。因此,对能将角蛋白转化为可利用蛋白的角蛋白酶开展的研究引起了广大学者们的关注。

角蛋白酶(keratinase)是一种特殊的蛋白酶类,能降解硬质且高度交联的蛋白类物质如角蛋白。由角蛋白酶或角蛋白降解菌处理而得到的羽毛粉中粗蛋白含量为80%~90%,胱氨酸的含量居天然饲料之首,为2.93%,能值居中,含硫量在

收稿日期:2014-12-04; 接受日期:2014-12-11

基金项目:国家科技支撑计划项目(2013BAD10B01)资助。

作者简介:杨 连,硕士研究生,主要从事芽胞杆菌表达系统构建研究。E-mail: yanglianryl@163.com。\* 通信作者:黄火清,副研究员,硕士生导师,博士,主要从事微生物高效表达系统研究。E-mail: huofinghuang@126.com

所有饲料中最高,含硒量较高。据测定缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的含量分别约为 7.23%、6.78% 和 4.21%,高于其他动物性蛋白质饲料。赖氨酸、蛋氨酸和色氨酸的含量相对匮乏。由于胱氨酸在代谢中可代替 50% 的蛋氨酸,所以在饲料配方中添加适量的水解羽毛粉可补充蛋氨酸的不足。同时水解羽毛粉还具有平衡其他氨基酸的功能,应充分合理利用这一资源。此外,水解羽毛粉的过瘤胃蛋白含量大约是 70%,是反刍动物良好的“过瘤胃”蛋白源,营养价值与棉籽饼相当,可部分替代棉籽饼添加到日粮中。因此角蛋白可加工成饲料或饲料添加剂<sup>[2]</sup>。一般每羽成年鸡可得风干羽毛 80~150 g,是体重的 4%~5%,羽毛粉是一种潜力很大的蛋白质饲料<sup>[3]</sup>。角蛋白材料通过改性以后在医药方面也具有很大的应用潜力,如以人发角蛋白复合材料作为药物载体,羊毛角蛋白改性后用作生物移植材料等<sup>[4,5]</sup>。本文概述了角蛋白酶在来源、分类、理化性质、作用机理及基因工程研究等方面的研究进展,为角蛋白酶的应用提供参考。

## 1 角蛋白酶

### 1.1 角蛋白酶的微生物来源

1963 年, Niokerson 等<sup>[6]</sup>最早将具有角蛋白酶能力的酶称为角蛋白酶。角蛋白酶来源广泛,产生角蛋白酶的菌株大部分从家禽养殖加工废弃物中分离获得,种类繁多,包括细菌、真菌和放线菌。微生物来源角蛋白酶由于能水解硬质且高度交联的角蛋白结构而在生物技术研究非常重要。

可降解角蛋白的细菌主要是革兰氏阳性菌,如芽胞杆菌(*Bacillus*)。Lo 等<sup>[7]</sup>从家禽养殖场中分离到了一种新型的羽毛降解菌,经 16S rRNA 序列分析其为蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*),命名为 Wu2。Macedo 等<sup>[8]</sup>从羽毛肉汤培养基中分离到一种枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*),能较好地产生角蛋白酶。本实验室分离到的芽胞杆菌(*Bacillus*)能在 24 h 内完全降解羽毛,并且其酶液也能有效降解羽毛。一些革兰氏阴性菌也能够产生角蛋白酶,包括溶杆菌属(*Lysobacter* spp.)、弧菌(*Vibrio*)和寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)等。如 Sangali 等<sup>[9]</sup>从当地家禽养殖场羽毛中分

离到了一种弧菌 kr2 能够高效降解完整羽毛。

能够降解角蛋白的真菌有金孢子菌属(*Chrysosporium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、链格孢属(*Alternaria*)、弯孢属(*Curvularia*)、枝孢属(*Cladosporium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、地丝菌属(*Geotrichum*)和单格孢属(*Ulocladium*)等。然而,由于这些菌属大部分属于皮肤癣菌,因而没有很大的商业价值。2001 年,曹军等<sup>[10]</sup>从土壤中分离了栖土曲霉(*Aspergillus terricola*),经 UV 突变后,固体发酵产酶活力提高了 80%,达到 1 980 U/g。Cavello 等<sup>[11]</sup>从碱性土壤中分离到了 3 种具有角蛋白降解能力的真菌,其中淡紫青霉(*P. lilacinum*)降解能力最强。

放线菌中可降解角蛋白的菌株多为链霉菌属(*Streptomyces*),如费氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)、密旋链霉菌(*Streptomyces pactum*)和高温链霉菌(*Streptomyces*)等,底物范围广泛,能降解包括羽毛、头发、羊毛在内很多角质底物<sup>[12]</sup>。

### 1.2 角蛋白酶的理化性质

角蛋白酶是在角蛋白诱导条件下由微生物产生的,菌种不同,角蛋白酶的结构、活性、底物特性以及对酶活力的影响因素等也会有差异<sup>[13]</sup>。角蛋白酶与其他蛋白水解酶的最主要区别在于其与底物的结合更紧密。

**1.2.1 角蛋白酶的分类** 角蛋白酶种类较多,分类方式也具有多样性。根据其活性基团,角蛋白酶可分为丝氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、金属蛋白酶;根据亚基组成,可分为单体酶和复合酶;根据温度和酸碱性质,可分为酸性、中性和碱性角蛋白酶;根据分泌情况可将其分为胞内酶和胞外酶。

**1.2.2 分子量和底物特异性** 不同微生物来源的角蛋白酶分子量范围从 18~200 kDa 不等,一般为 30 kDa 左右,有的致病真菌所分泌的角蛋白酶分子量高达 400 kDa。本实验室所研究的由芽胞杆菌分泌的角蛋白酶为单体酶,分子量大小为 27 kDa(未发表数据)。

目前发现的多数角蛋白酶的底物范围相当广泛,能够降解可溶和不可溶的蛋白底物。可溶性底物如牛血清白蛋白、酪蛋白、血红蛋白,不可溶蛋白包括羽毛、羊毛、蚕丝、角质层和指甲。

**1.2.3 温度和 pH 范围** 角蛋白酶的最适反应温度一般在 35~75℃ 之间,大多数集中在 45~55℃,

如本实验室正在研究的角蛋白酶最适温度为 55℃。多数角蛋白酶的最适 pH 范围在中性到碱性之间<sup>[14]</sup>,本实验室正在研究的角蛋白酶最适 pH 为 11(未发表数据)。

**1.2.4 影响角蛋白酶活性的因素** 某些物质可增强角蛋白酶的活性,如二价钙离子、二价镁离子等,在通常情况下对角蛋白酶活均有促进作用,因此在发酵培养基中适量添加,可能会有助于角蛋白酶的产生。磷酸盐、巯基乙醇和维生素 C 等也可增强大多数菌源角蛋白酶活性,可能是由于巯基乙醇有助于打破二硫键从而提高角蛋白酶的酶解能力。Lo 等<sup>[7]</sup>也报道在以羽毛为唯一碳源的培养基中额外添加碳源(葡萄糖、果糖、淀粉、蔗糖和乳糖)可抑制角蛋白酶的分泌或导致角蛋白酶活性降低。大部分角蛋白酶属于丝氨酸或金属蛋白酶,因此,PMSF、EDTA、和 1,10-邻二氮杂菲可强烈抑制酶的活性<sup>[15]</sup>。SDS 对不同微生物来源的角蛋白酶的影响不同,其既可增强角蛋白酶的活性<sup>[16]</sup>,也能抑制酶的活性<sup>[17]</sup>,有些来源的角蛋白酶可在 SDS 存在条件下保持稳定<sup>[15]</sup>。

### 1.3 微生物降解角蛋白的机理

Friedrich 和 Antranikian<sup>[18]</sup>曾报道 pH 范围在 6~9 有助于角蛋白酶的产生和羽毛的降解,而且在水解产物中没有检测到胱氨酸和半胱氨酸,可能是由于碱性 pH 使胱氨酸残基转变成蛋氨酸残基,而这一改变也有助于角蛋白酶的分解作用。在有角蛋白酶产生的发酵过程中,角蛋白会作为诱导物,角蛋白酶的产生通常伴随着角蛋白的降解。然而,角蛋白酶的产生和角蛋白的降解并不是同时发生的,因此角蛋白的降解不能作为角蛋白酶分泌的标志,反之亦然。Thys 等<sup>[19]</sup>曾报道 Kr10 菌株在的天然羽毛培养基中,30℃ 培养 36 h 酶活力达到最高,对应于微生物生长的指数后期。而且,培养 Kr10 0~45 h,可以检测到培养基的 pH 逐渐升高,大部分微生物在角蛋白降解过程中都会伴随溶液碱度和硫醇基的增加,碱度的增加是由于脱氨基作用释放铵盐所致<sup>[14]</sup>,硫醇基的增加是酶或者化学机制对二硫键的还原<sup>[16]</sup>。Ramnani 等<sup>[17]</sup>报道在羽毛培养基发酵 6 h 后细菌开始繁殖,18 h 时能观察到大量的细菌。显微观察发现细菌紧密地附着在羽小枝上生长,羽轴上没有发现细菌细胞。虽然微生物降解角蛋白的机理还不是很明确,但该过程可分为三个彼此相关的步骤:

变性作用、水解作用和转氨基作用。变性作用指维系角蛋白三维结构的二硫键被破坏,角蛋白丧失不溶性和抗酶解能力的过程。在变性作用过程中由于二硫键断裂方式的不同又形成了以下四种理论,即物理压力理论、膜电位理论、复合酶理论和无机变性理论。

## 2 角蛋白酶基因工程研究

Kim 等<sup>[20]</sup>在 2004 年首次报道了角蛋白酶的晶体结构,该酶为一种枯草杆菌蛋白酶,与其他蛋白酶相比,其拥有丝氨酸或金属蛋白酶的催化中心。另一种来源于地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) PDW-1 的角蛋白酶 N-端序列比对表明,其与枯草杆菌角蛋白酶有 98% 的相似性。事实上,PDW-1 来源的角蛋白酶的氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 高度相似,仅仅表现在第 222 位氨基酸的不同,角蛋白酶中是缬氨酸,枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 中是丙氨酸,而且这两种氨基酸均属于非极性疏水氨基酸。

### 2.1 角蛋白酶编码基因

1995 年, Lin 等<sup>[21]</sup>获得了地衣芽胞杆菌 PDW-1 的角蛋白酶编码基因 *kerA*; 2002 年, Kluskens 等<sup>[22]</sup>从嗜热厌氧菌闪光杆菌(*Ferrobacterium pennivorans*)中克隆到 *fls*,它由 2 103 个核苷酸组成,编码 699 个氨基酸,与枯草杆菌蛋白酶有较高的相似性。梁斌等<sup>[23]</sup>根据 *kerA* 的核苷酸序列,设计引物得到了 *kerB* 角蛋白酶基因片段,基因全长 1 434 bp,编码 477 个氨基酸。本实验室从能迅速降解羽毛的芽胞杆菌中克隆得到 *kerk* 全长 1 368 bp,编码区 1 149 bp,编码 382 个氨基酸,前 30 个氨基酸为信号肽,前导肽包括 77 个氨基酸,成熟蛋白由 275 个氨基酸残基组成(未发表数据)。

对角蛋白酶基因研究的较为透彻的还是来源于地衣芽胞杆菌 PWD-1 的 *kerA*, *kerA* 已经在枯草芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)以及毕赤酵母(*Pichia pastoris*)等不同宿主中实现了成功表达<sup>[21]</sup>。为了提高角蛋白酶的胞外表达水平,尽可能会选择整合质粒以及使用淀粉酶和木聚糖酶诱导型的强启动子。在大肠杆菌中对角蛋白酶进行胞外表达时会在胞内空间积累大量的包

涵体,包涵体需要再次折叠才能完成酶的活化。Tiwary 等<sup>[24]</sup>报道了来源于地衣芽胞杆菌的角蛋白酶基因 *kerBL*,其在大肠杆菌中使用 *spa* 的启动子和信号肽实现了胞外功能性表达。

## 2.2 角蛋白酶基因的诱导表达

角蛋白酶是一种诱导酶,当其培养基中存在角蛋白等底物时才能诱导角蛋白酶的表达。角蛋白酶分泌持续的时间和分泌强度也受角蛋白底物的强烈影响。Tiwary 等<sup>[24]</sup>将来源于地衣芽胞杆菌的角蛋白酶基因 *kerBL* 克隆到 pEZZ18 载体上,并在大肠杆菌 HB101 中实现了胞外表达。Jeevana Lakshmi 等<sup>[25]</sup>研究表明将野生型枯草杆菌 BF11 和 BF12 经过物理和化学诱变,其角蛋白酶活力由原来的 10 KU/mL 提高到了 518~520 KU/mL,是原来的 50 倍。Hu 等<sup>[26]</sup>研究表明地衣芽胞杆菌 S90 的角蛋白酶基因通过密码子优化策略实现了在毕赤酵母中的表达,最高的酶活力达到 324 U/mL。Liu 等<sup>[27]</sup>将来自于地衣芽胞杆菌 BBE11-1 的角蛋白酶基因在大肠杆菌、枯草芽胞杆菌和毕赤酵母中分别表达,重组酶的最适 pH 为 10.0,研究发现  $Mn^{2+}$  能够抑制重组酶的活性,其他金属离子则对其活性影响较小,此外,1 mol/L 的过氧化氢处理 5 h,酶活性仍保持 80%。Radha 等<sup>[28]</sup>报道来源于地衣芽胞杆菌 MKU3 的 *ker* 基因在木糖诱导型的启动子下,在巨大芽胞杆菌中实现了重组表达,重组体使用牛奶平板进行筛选,其中降解圈最大的菌株在最适的发酵条件下诱导 6 h,发酵液中就可检测到角蛋白酶活力,诱导 24 h 后即指数生长的后期,酶活力达到最高。本实验室克隆到的 *kerk* 基因,已经在枯草芽胞杆菌中,在以羽毛为唯一碳源和氮源的培养基中实现了成功表达(未发表数据)。

综上所述,芽胞杆菌、大肠杆菌和毕赤酵母表达系统在重组角蛋白酶的表达上已经取得了一定成功,但是表达水平以及重组角蛋白酶的降解活性并不是十分的理想,难以用于工业发酵生产。

## 3 角蛋白酶的应用研究

自然界中,每年都会产生大量角蛋白废弃物,不仅造成了资源浪费,而且严重污染了环境。由微生物产生的角蛋白酶可以降解角蛋白,有着重

大的经济效益和社会效益<sup>[29]</sup>。因此,角蛋白酶的应用研究越来越受到研究学者们的关注,应用涉及饲料生产、医疗卫生和制革等很多行业。

### 3.1 饲料生产

在我国,如今家禽养殖已实现规模化生产,蛋白类饲料短缺问题也日益严重,羽毛类废弃物越来越多,对环境的影响也不容小视。使用角蛋白酶或者角蛋白降解菌将富含角蛋白的材料转化成氨基酸、多肽和可溶性蛋白,是一种提高角质废弃物的营养物质利用率的潜在方法<sup>[30]</sup>,具有重大的经济效益和社会效益。Grazziotin<sup>[31]</sup>曾报道非致病性的羽毛降解菌可提高蛋白饲料的产量,从而减少大豆和鱼粉的使用。张荣飞等<sup>[32]</sup>在试验日粮中添加 0.12% 的角蛋白酶能显著提高断奶仔猪的日增重和饲料转化效率,与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ),推测其可能的作用途径是角蛋白酶提高了仔猪胃肠道中营养物质的消化和吸收率,降解了大豆中抗原蛋白,缓解了其对肠道的过敏损伤作用,从而促进了仔猪的生长性能。

### 3.2 医疗卫生

朊病毒(prion)可引起致命的神经退行性疾病,被称为感染性的海绵状脑病,包括疯牛病、羊瘙痒症和人克雅氏病。Prion 蛋白具有两种构象,PrP<sup>c</sup>和 PrP<sup>sc</sup>,前者无致病性,后者可导致疯牛病和人克雅氏病,而且 PrP<sup>sc</sup>可导致正常的 PrP<sup>c</sup>结构向 PrP<sup>sc</sup>结构转变,其结构与羽毛角蛋白类似,均含有  $\beta$ -片层结构<sup>[33]</sup>,因而尝试使用角蛋白酶来降解 Prion 蛋白,有可能推动医学的重大进步。

### 3.3 制革行业

制革加工技术涉及一系列的操作,其中给环境带来污染最大的是预鞣制过程,其可产生硫化钠、石灰、固体废弃物,增加生化耗氧量(biochemical oxygen demand, BOD)、化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)、溶解性总固体(total dissolved solids, TDS)<sup>[34]</sup>。由于角蛋白酶不能溶解胶原且能温和的促进弹性组织解离而使其被广泛的应用在脱毛过程中<sup>[24]</sup>。Macedo 等<sup>[8]</sup>报道了一种新型的来源于枯草芽胞杆菌的角蛋白酶,其在脱毛过程中不仅不破坏胶原成分,而且不需要额外添加硫化物,可完全替代硫化钠,在制革行业中具有巨大的商业价值。Macedo 等<sup>[8]</sup>报道来源于枯草芽胞杆菌 S14 的角蛋白酶也消除了对

有毒硫化钠的需要,可减少制革过程中的环境污染。

## 4 展望

目前对角蛋白酶的认识还不够深入,尤其是在角蛋白酶的酶活标定方面还不统一,在酶活测定时其底物主要有天青角蛋白,即利用显色基团进行酶活的标定。此外,还有以可溶性角蛋白和羽毛粉为底物测定<sup>[35]</sup>,每种方法都存在一定的弊端。因而,由于底物和酶活标定方法的多样性,导致对不同菌种来源的角蛋白酶产量比较起来存在一定的困难。尽管如此,由于角蛋白酶广泛的应用,很多研究学者正从以下多个方面对其进行深入的研究。已经发现的很多菌株都能够产角蛋白酶,但相对来说产酶效率不是很高,因此还需要进一步筛选高产菌株。同时,通过基因突变的方法改造角蛋白酶基因使其结构和性质更适合于工业应用,是目前的一个重要研究方向。枯草芽胞杆菌的非致病性,无有毒副产品的产生以及安全性,使其成为商业生产胞外酶的首选。因此,构建一个角蛋白酶的枯草芽胞杆菌高效表达系统也是今后研究的重要方面。

## 参 考 文 献

- [1] 李静,井婧,李绍钰,等.角蛋白酶在饲料行业中的应用[J].饲料工业,2008,29(4):11-13.
- [2] 李建国.饲料添加剂应用技术问答[M].北京:中国农业出版社,2002.
- [3] 王成章,王恬.饲料学[M].北京:中国农业出版社,2003,225-226.
- [4] 郭菊花,李涛,赵婷婷,等.蛋白改性材料及其应用研究进展[J].高分子通报,2014,(4):16-22.
- [5] 齐志国,张铁鹰,董杰丽,等.微生物角蛋白酶的研究进展及其在饲料中的应用前景[J].中国饲料,2013,15:31-34.
- [6] Nickerson W J, Noval J J, Robison R S. Keratinase properties of the enzyme conjugated elaborated by streptomyces fradiae[J]. Biochim. Biophys. Acta, 1963, 3(77):73-86.
- [7] Lo W H, Too J R, Wu J Y. Production of keratinolytic enzyme by an indigenous feather-degrading strain *Bacillus cereus* Wu2 [J]. J. Biosci. Bioeng., 2012, 114(6):640-647.
- [8] Macedo A J, da Silva W O, Gava R, et al.. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(1):594-596.
- [9] Sangali S, Brandelli A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2[J]. J. Appl. Microbiol., 2000, 89(5):735-743.
- [10] 曹军,郝林,栖土曲霉生产角蛋白酶研究[J].微生物学杂志,2001,6(21):11-12.
- [11] Cavello I A, Chesini M, Hours R A, et al.. Study of the production of alkaline keratinases in submerged cultures as an alternative for solid waste treatment generated in leather technology[J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2013, 23(7):1004-1014.
- [12] Gousterova A, Braikova D, Goshev I, et al.. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis[J]. Lett. Appl. Microbiol., 2005, 40(5):335-340.
- [13] 李明珠,王雁萍,秦广雍.角蛋白酶的研究现状及发展前景[J].安徽农业科学,2010,38(4):1689-1692.
- [14] Brandelli A, Daroit D J, Riffel A. Biochemical feature of microbial keratinase and application[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010, 85(6):1735-1750.
- [15] Riffel A, Lucas F, Heeb P, et al.. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin[J]. Arch. Microbiol., 2003, 179(4):258-265.
- [16] Habbeche A, Saoudi B, Jaouadi B, et al.. Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost[J]. J. Biosci. Bioeng., 2014, 117(4):413-421.
- [17] Ramnani P, Singh R, Gupta R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: Structural and biochemical mechanism of feather degradation[J]. Can. J. Microbiol., 2005, 51(3):191-196.
- [18] Friedrich A B, Antranikian G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennivorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(8):2875-2882.
- [19] Thys R C, Lucas F S, Riffel A, et al.. Characterization of a protease of a feather-degrading microbacterium species[J]. Lett. Appl. Microbiol., 2004, 39(2):181-186.
- [20] Kim J S, Kluskens L D, de Vos W M, et al.. Crystal structure of fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a keratinolytic enzyme related to *Subtilisin* [J]. J. Mol. Biol., 2004, 335(3):787-797.
- [21] Lin X, Wong S L, Miller E S, et al.. Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis* [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 1997, 19(2):134-138.
- [22] Kluskens L D, Voorhorst W G, Siezen R J, et al.. Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans* [J]. Extremophiles, 2002, 6:185-194.
- [23] 梁斌,邢述,付学奇,等.角蛋白基因 *kerB* 的提取、克隆及表达[J].吉林大学学报:理学版,2003,(3):365-368.
- [24] Tiwary E, Gupta R. Extracellular expression of keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15 in *Escherichia coli* [J]. J. Agric. Food Chem., 2010, 58(14):8380-8385.
- [25] Jeevana Lakshmi P, Kumari Ch M, Lakshmi V. Efficient degradation of feather by keratinase producing *Bacillus* sp. [J]. Int. J. Microbiol., 2013, 5:608321.

- [26] Hu H, Gao J, He J, *et al.*. Codon optimization significantly improves the expression level of a keratinase gene in *Pichia pastoris* [J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): 1–8.
- [27] Liu B, Zhang J, Gu L, *et al.*. Comparative analysis of bacterial expression systems for keratinase production [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2014, 173(5): 1222–1235.
- [28] Radha S, Gunasekaran P. Sustained expression of keratinase gene under *PxylA* and *PamyL* promoters in the recombinant *Bacillus megaterium* MS941 [J]. Bioresour. Technol., 2008, 99(13): 5528–5537.
- [29] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 70(1): 21–33.
- [30] Prakash P, Jayalakshmi S K, Sreeramulu K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2; Partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2010, 160(7): 1909–1920.
- [31] Grazziotin A, Pimentel F A, Sangali S, *et al.*. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2 [J]. Bioresour. Technol., 2007, 98: 3172–3175.
- [32] 张荣飞, 杨久仙, 高克俭. 角蛋白酶对断奶仔猪生长性能的影响 [J]. 饲养技术, 2013, 1(7): 74–75.
- [33] Langeveld J P, Wang J J, van de Wiel D F, *et al.*. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep [J]. J. Infect. Dis., 2003, 188(11): 1782–1789.
- [34] Thanikaivelan P, Rao J R, Nair B U, *et al.*. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing [J]. Trends Biotechnol., 2004, 22(4): 181–188.
- [35] Radha S, Gunasekaran P. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains [J]. Protein Expr. Purif., 2009, 64(1): 24–31.