

综述

角蛋白酶的结构、功能及应用

朱星潮, 李其昌, 郭君慧, 祁梅芳, 谢浩*

(武汉理工大学化学化工与生命科学院, 武汉 430070)

摘要: 角蛋白是广泛存在于羽毛及毛发中的难溶性蛋白质。角蛋白酶可以催化角蛋白的降解, 在畜牧、皮革加工、医疗等领域中具有较大的应用价值与潜力。近年来, 研究人员对角蛋白酶的来源、分类、结构、功能优化等方面进行了大量的研究, 并取得了很多成果, 为角蛋白酶的商业化应用提供了很好的基础。本文综述了角蛋白酶结构、功能、应用等方面的研究进展, 并提出了今后的研究方向。

关键词: 角蛋白; 角蛋白酶; 结构/功能优化

Structure, function and application of keratinase

ZHU Xingchao, LI Qichang, GUO Junhui, QI Meifang, XIE Hao*

(School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: Keratin is a insoluble protein widely present in feathers and hair. Keratinase can catalyze the degradation of keratin and has great application value and potential in fields such as animal husbandry, leather processing, and medical treatment. In recent years, researchers have conducted extensive research on the source, classification, structure and function optimization of keratinase, and have achieved many results, providing a good foundation for the commercial application of keratinase. This paper reviews the research progress in the structure, function and application of keratinase, and proposes future research directions.

Key Words: keratin; keratinase; structural/functional optimization

据中国农业农村部的数据显示, 2022年全国家禽出栏161.4亿只, 产生数百万吨羽毛。传统处理羽毛废物的方法为焚烧、粉碎、酸碱水解等物理或化学方法^[1,2], 造成了资源浪费和环境污染。利用酶或微生物对羽毛进行生物处理和降解, 具有能耗低、降解可控、效率高、环境友好等优点, 为羽毛的充分利用提供了新的方向。羽毛的主要成分为角蛋白(keratin), 是一类不溶性纤维状蛋白质, 形成具有一定机械强度的组织, 为生物体提供支撑或保护。根据氨基酸组成和二级结构不同, 角蛋白分为 α -角蛋白和 β -角蛋白两类^[3]。 α -角蛋白存在于哺乳动物毛、发、角、指甲中, β -角蛋白

存在于鸟类羽毛、爪、喙中^[4]。角蛋白的生物降解涉及多种机制, 包括物理压力学说(physical pressure theory)所描述的真菌菌丝作用下的角蛋白降解、生物膜还原学说(biological membrane potential theory)和硫解学说(thiolysis theory)所强调的角蛋白二硫键的断裂, 以及多酶协同学说(complex enzyme theory)所关注的角蛋白酶解^[5,6]。但是无论哪种机制, 都涉及蛋白酶对角蛋白多肽链的降解。

角蛋白酶(keratinase)是将角蛋白水解成多肽和氨基酸的蛋白酶类^[7]。利用角蛋白酶将羽毛角蛋白水解并制备多肽和氨基酸, 在饲料和食品工业、

收稿日期: 2023-08-09

第一作者: E-mail: 15697182656@163.com

*通信作者: E-mail: h.xie@whut.edu.cn

医疗、肥料及农药与环境保护、制革业、化妆品等行业有广泛的应用。本文从角蛋白酶来源、分类、结构、理化性质、功能优化以及应用等方面对相关的进展进行介绍。

1 角蛋白酶来源及分类

自然界中的细菌、真菌、放线菌等微生物均可以产生角蛋白酶^[8]。产角蛋白酶的细菌多属于革兰氏阳性菌, 包括枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌等^[9-13]。部分革兰氏阴性菌, 包括弧菌、假单胞菌等也能产生角蛋白酶^[14-16]。地衣芽孢杆菌是目前研究较多的产角蛋白酶的菌株^[17]。真菌也是能产角蛋白酶的微生物, 如源于土壤的金孢子菌可以产生分解天然羽毛的酶^[18], 小孢子菌的培养基中发现了细胞外角蛋白酶^[19], 黄曲霉菌、尖孢镰刀菌、淡紫拟青霉菌等也都可以产生角蛋白酶^[20-22]。放线菌中能够产角蛋白酶的主要是链霉菌, 如在链霉菌KN23、链霉菌SCUT-3中均发现了角蛋白酶^[23,24]。

不同来源角蛋白酶的相对分子质量在30 000~140 000之间, 除了少数源于真菌的角蛋白酶外, 大多数角蛋白酶都是碱性酶, 在pH7.5~9.0的范围内表现出最佳催化活性, 但是嗜碱菌分泌的角蛋白酶在pH10.0~12.0的范围具有最佳催化活性^[25]。角蛋白酶的最适催化温度因宿主生长环境的不同有较大的差异, 多数角蛋白酶在常见的温度范围内(40 ℃~60 ℃)表现出最佳催化活性, 从温泉中分

离的部分嗜热菌分泌的角蛋白酶最适温度可达80 ℃^[26]。表1列出了部分角蛋白酶的来源菌株、用途及理化性质。

角蛋白分子间或分子内存在大量的二硫键和氢键, 角蛋白降解包括以下环节: (1)在还原酶或还原因子作用下, 角蛋白二硫键断裂并释放角蛋白多肽链; (2)在内切蛋白酶作用下, 角蛋白多肽链断裂成角蛋白寡肽; (3)在外切蛋白酶以及寡肽降解酶作用下, 角蛋白寡肽降解(图1)。角蛋白酶催化角蛋白多肽链肽键的断裂, 在角蛋白组织降解的过程中起重要作用^[38]。根据活性中心催化基团的性质, 角蛋白酶可以分为两类, 即丝氨酸蛋白酶(包含S1、S8、S9、S10、S16五个家族)和金属蛋白酶(包含M3、M4、M14、M16、M28、M32、M36、M38、M55九个家族)。根据催化角蛋白肽键位置和底物的不同, 角蛋白酶又分为内切角蛋白酶(包含S1、S8、S16、M4、M16、M36六个家族)、外切角蛋白酶(包含S9、S10、M14、M28、M38、M55六个家族)和角蛋白寡肽酶(包含M3、M32两个家族)^[39]。图1展示了不同种类角蛋白酶在催化角蛋白降解过程中的作用以及亲缘关系。

2 角蛋白酶的结构

目前对于丝氨酸蛋白酶家族的角蛋白酶结构研究较为深入, 有多个丝氨酸蛋白酶家族的角蛋白酶的结构得到了解析。以丝氨酸蛋白酶S8家族的角蛋白酶MtaKer为例^[40], MtaKer由七个平行β折叠

表1 部分产角蛋白酶菌株、来源及其所产角蛋白酶的性质

菌株	菌株来源	用途	最适温度(℃)	最适pH	参考文献
<i>Bacillus tequilensis</i> Q7	制革厂土壤	皮革加工/羽毛处理	30	7	[27]
<i>Bacillus</i> sp. G51	美利奴羊毛	羊毛加工	60	9	[28]
<i>Arthrobactersp.</i> KFS-1	城市垃圾场	洗涤剂	60	8	[29]
<i>Bacillus subtilis</i> DP1	家禽养殖场	生物脱毛剂	37	10	[30]
<i>Onygena corvina</i>	蹄	猪鬃毛处理	—	—	[31]
<i>Trichophyton rubrum</i>	指甲/头发	皮肤角质处理	50	7	[32]
<i>Brevibacillus sp.</i> strainAS-S10-II	土壤	洗涤剂	45	12.5	[33]
<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	温泉	羽毛处理	80	10	[26]
<i>Bacillus thuringiensis</i> MT1	养牛场	驴毛加工	50	9	[34]
<i>Bacillus tropicus</i> Gun-17	海鸭养殖场	羽毛处理	60	7	[35]
<i>Bacillus licheniformis</i> DCS1	羽毛	羽毛处理	45	7	[36]
<i>Bacillus pacificus</i> RSA27	家禽养殖场	羽毛处理	60	9	[37]

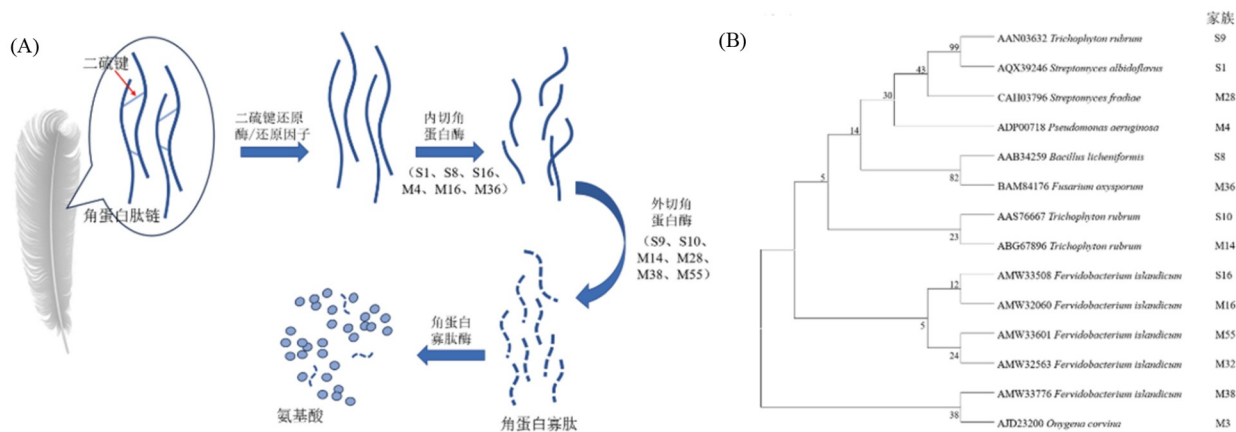


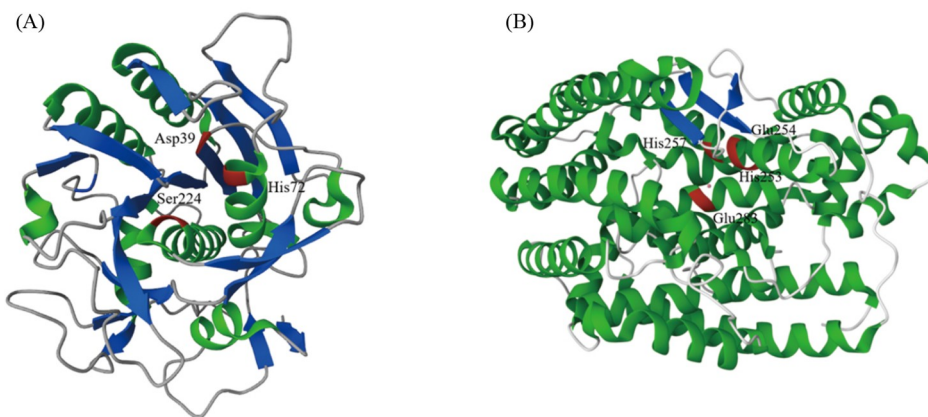
图1 不同种类角蛋白酶在催化角蛋白降解过程中的作用(A)以及亲缘关系(B)

片组成, 两侧是六个 α 螺旋结构和五个 β 折叠结构, 具有保守的催化三联体结构Asp39、His72和Ser224(图2)。在角蛋白酶MtaKer的结构中还有两个钙离子和两个二硫键, 对该蛋白质的正确折叠和结构稳定起着重要作用。角蛋白酶Proteinase K^[41]和角蛋白酶Fervidolysin^[42]与角蛋白酶MtaKer同属丝氨酸蛋白酶S8家族, 二者的催化结构域也是由七个平行的 β 折叠片组成, 且二者的结构中都含有 Asp-His-Ser催化三联体, 但是角蛋白酶Proteinase K两侧是六个 α -螺旋, 角蛋白酶Fervidolysin是九个 α -螺旋。

金属蛋白酶家族的角蛋白酶与丝氨酸蛋白酶家族的角蛋白酶在结构上有所差异, 如金属蛋白酶M32家族的二级结构与丝氨酸蛋白酶S8家族不同。对金属蛋白酶M32家族的角蛋白酶FisCP的结构研

究表明, 该蛋白酶主要由螺旋结构组成, 但在活性位点附近有一个短的 β 片层结构^[43]。在活性位点包含几个氨基酸(His253、Glu254、His257和Glu283)和与底物配位的 Co^{2+} 离子(图2)。

将丝氨酸蛋白酶S8家族的代表性角蛋白酶进行序列比对(图3), 可以发现, 这些酶都具有高度保守的催化结构域, 与它们在催化角蛋白降解方面的功能一致。但是这些角蛋白酶的前导序列存在多样性, 导致了这些酶的特性存在差异。Rajput等^[44]进行了两种角蛋白酶Ker BL和Ker BP的N端前导序列的交换研究, 发现前导序列显著影响角蛋白酶的底物活性、热稳定性以及最适pH。由此, 他们认为, N端前肽序列通过类似于分子伴侣的功能对角蛋白酶的结构折叠和功能活性起到了重要作用。Liu等^[45]和Li等^[46]的研究也表明, 前导序列



A: 丝氨酸蛋白酶家族角蛋白酶MtaKer的晶体结构(PDB: 5WSL); B: 金属蛋白酶家族角蛋白酶FisCP的晶体结构(PDB: 5E3X)

图2 两种角蛋白酶的晶体结构

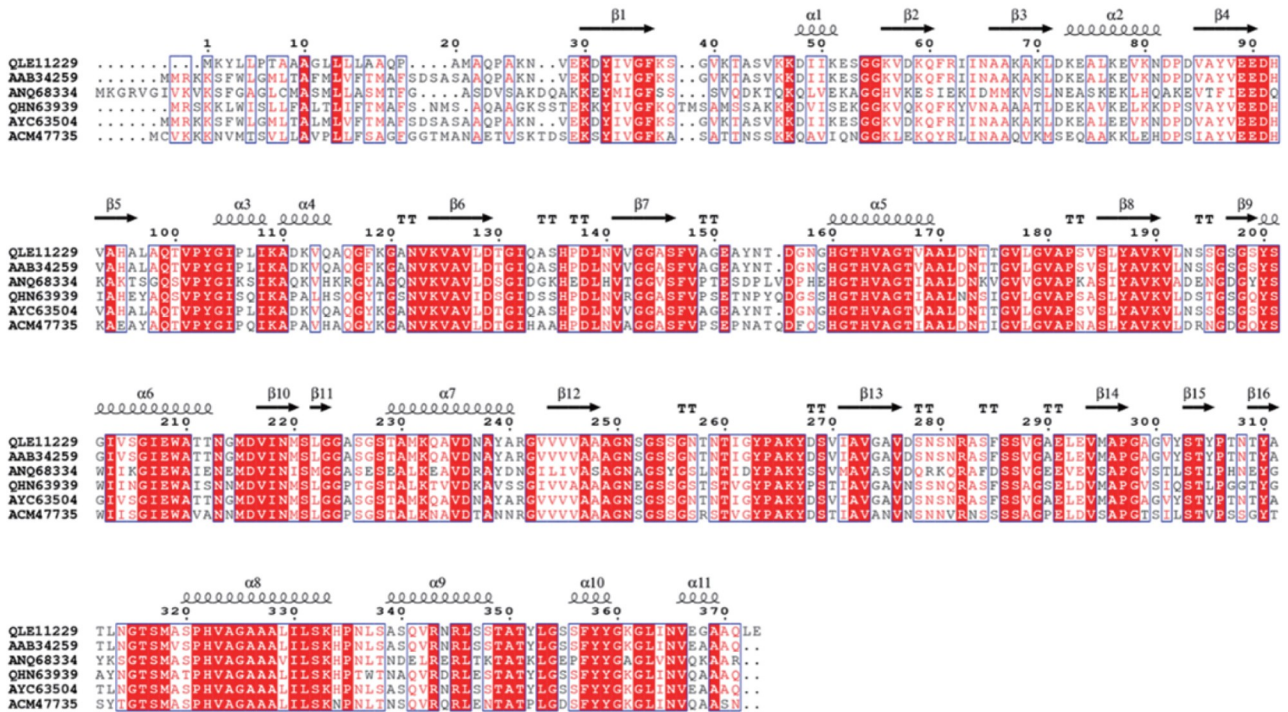


图3 丝氨酸蛋白酶家族部分角蛋白酶同源序列比对

对于角蛋白酶的表达和产量具有重要作用。

3 角蛋白酶的活性和功能优化

角蛋白酶的工业应用环境极其复杂。为了避免pH、温度、有机溶剂、盐、洗涤剂、氧化剂和蛋白酶对角蛋白酶的催化性能和应用能力的影响和干扰,人们利用分子生物学技术和蛋白质工程技术,通过随机突变和理性设计,从而提高角蛋白酶的产量,改善角蛋白酶在其应用环境中的稳定性、活性和特异性。

通过基因突变提高角蛋白酶的功能,是获得结构和性能适于工业应用的角蛋白酶的重要方法。目前多利用非靶向诱变获得随机突变体,然后进行靶向筛选,从而获得高产量、高活性、高抗性的角蛋白酶^[47]。Zeng等^[48]和Cai等^[49]分别利用物理诱变和化学诱变方法获得的突变菌株,将野生型菌株的角蛋白酶活性提高了2.0~2.5倍。Zhang等^[50]利用易错PCR技术将角蛋白酶KerBp的活性提高了2.1倍。Zhao等^[51]通过筛选突变菌株,获得了热稳定性显著提高的角蛋白酶。在未来的研究中,应用高效突变技术如DNA shuffling、核酸交错延伸,结合高通量筛选技术如基于流式细胞仪的荧

光激活细胞分选和基于微流控芯片和分选设备的液滴微流控分选,将会提高角蛋白酶定向改造的效率^[52]。

基于已有的蛋白质信息模拟目标蛋白质结构,结合分子动力学和生物信息学技术预测并进行理性设计来构建突变体,也是高效、快速、精确地设计具有功能优化的蛋白酶的方法。对于角蛋白酶而言,主要是基于序列/结构/功能相关性,对关键氨基酸残基的位置、侧链基团的尺寸、疏水性、带电量进行优化,或者引入二硫键、氢键、盐桥,或者对角蛋白酶的蛋白质表达和分子加工过程进行优化,从而提高酶的稳定性、特异性、活性和产量。Fang等^[53]通过研究角蛋白酶KerSMD及其突变体催化位点氨基酸残基侧链的疏水性和尺寸,发现Tyr215残基能显著影响KerSMD的活性,并构建定点突变,显著提高了酶活性。Su等^[54]基于对角蛋白酶KerBp的结构分析,将残基Gln170突变为Thr,与Asp205形成氢键,在保留酶活性的同时,显著提高了KerBp在60℃的热稳定性。Liu等^[55]通过模拟和预测角蛋白酶结构折叠自由能,构建相应的突变体,也获得了热稳定性显著提高的角蛋白酶突变体。Liang等^[56]则通过突变

角蛋白酶自身的酶切位点,避免角蛋白酶的自我降解,提高了角蛋白酶的稳定性。Tian等^[57]对角蛋白酶的信号肽进行了优化,使用SPLipA信号肽将角蛋白酶的活性提高了近2倍。Li等^[46]对角蛋白酶Sfp2的N端前导序列进行了突变和优化,改善了前肽切割效率,将角蛋白酶的活性和产量提高了9倍。Fang等^[58]对角蛋白酶KerSMD的研究则表明,对KerSMD的C端进行部分截断或融合改造,也能显著提高其催化活性、热稳定性以及对于盐和去垢剂的抗性。

酶的固定化也是提高酶的稳定性和活性的有效途径。Lotfi等^[59]利用纳米载体负载角蛋白酶,相对于未负载的酶而言,其酶活性提高了近8倍,在70℃和80℃孵育3h后的热稳定性也分别提高了3.5倍和5.8倍,在工业应用中具有重要意义。

此外,人工智能技术的普及也会促进对角蛋白酶作用机制的认识和理解。一方面,可以利用人工智能技术对角蛋白生物降解过程进行模拟和优化。如Moussa等^[60]对副萆状芽胞杆菌*Bacillus paramycoides*降解鸡羽角蛋白的过程进行了研究,表明人工神经网络(artificial neural network, ANN)方法比可旋转中心组合设计(rotatable central composite design, RCCD)方法可以更好地模拟角蛋白的生物降解过程。另一方面,人工智能技术在蛋白质结构/功能优化方面得到广泛的应用^[61]。随着角蛋白酶结构/功能数据和信息的增加,人们有可能在人工智能技术的辅助下,设计并获得结构、功能和活性更加优化的角蛋白酶。

4 角蛋白酶的应用

角蛋白酶在饲料和食品工业、医疗、肥料及农药与环境保护、制革业、医疗、化妆品等行业均有广泛的应用和前景。

在牲畜的饲料中常通过添加羽毛粉来补充蛋白质。传统羽毛粉处理方法是加压蒸煮或化学处理,效率低且易造成环境污染。用角蛋白酶处理羽毛,可以利用家畜生产过程中的代谢产物实现再循环。经角蛋白酶处理的羽毛粉富含必需氨基酸,可以作为动物饲料和生物肥料的替代品^[62]。在猪饲料中添加角蛋白酶,可以提高猪的氨基酸消化率,并对猪的体重、免疫反应和腰肌面积有

积极影响^[63]。在鸡饲料中添加角蛋白酶,可以改善肉鸡的生长状况和肉质^[64]。

在皮革加工尤其是脱毛工艺中,常会加入有毒化学品,导致健康风险和环境问题^[65]。利用角蛋白酶代替传统脱毛工艺中使用的硫化物和石灰等,可以实现安全、有效、环保地脱毛。利用大肠杆菌重组表达角蛋白酶KerDZ,不仅可以除去山羊、兔和牛皮上的皮毛,还能保留胶原蛋白结构^[66],比传统的处理方法更加环保,在皮革生产工业中有巨大潜力。

在医疗和美容护理方面,角蛋白酶也有重要的应用前景。Okoroma等^[67]发现,源自地衣芽孢杆菌的角蛋白酶可以在温和条件下降解肌蛋白。Ningthoujam等^[68]则发现,角蛋白酶KerI可以溶解淀粉样蛋白原纤维,为相关疾病的治疗提供了新的思路。Shalaby等^[69]的研究表明,角蛋白酶可以促进药物通过角质层,增强夫西地酸的局部渗透作用以治疗皮肤深部的细菌感染。此外,角蛋白酶能改善皮肤角质,在化妆品领域有着较大的潜在应用价值^[70]。

角蛋白酶作为生物催化剂也可以应用到洗涤剂中。如蜡状芽孢杆菌YQ15产生的角蛋白酶能够在多种表面活性剂中保持稳定,与大多数商业洗涤剂相容,可以有效去除棉布上的血渍,且对纤维没有损伤^[71]。

5 小结与展望

角蛋白酶的微生物来源广泛,催化角蛋白降解的功能明确,具有较大的应用价值与潜力。为了满足角蛋白酶在不同环境下应用的需要,基于角蛋白酶的序列/结构/功能信息,通过随机突变和定向改造等技术,结合高通量筛选、酶固定化、人工智能等技术,可以获得结构、功能、活性优化的角蛋白酶。未来对于角蛋白酶的研究及商业化应用将主要集中在以下方面。

首先是对角蛋白酶作用机制的深入研究,明确在不同条件尤其是极端环境下的作用机制,进行角蛋白酶的结构/功能改造,开发角蛋白酶的合适载体,提高角蛋白酶的活性和对特殊环境条件的抗性和稳定性,并可以利用人工智能技术对其结构、作用条件进行优化^[60,61]。不同的行业对酶特性

的需求不同, 如饲料行业需要耐酸性而洗涤剂行业需要耐碱性, 皮革加工则需要耐高温且无胶原蛋白活性等。

其次是选育角蛋白酶的高效表达菌种, 进行角蛋白酶分离、纯化技术的研发, 提高角蛋白酶的分离纯化效率和产量, 从而能够满足角蛋白酶商业化应用的需求。

最后是在现有应用的基础上, 进一步扩展其应用领域。由于角蛋白酶可以将羽毛废物水解为氨基酸, 可以考虑与其他厌氧微生物共同作用进行生物堆肥和沼气生产等。此外, 由于角蛋白含有多种以半胱氨酸为代表的氨基酸, 用角蛋白酶水解后是一种潜在的生物活性肽的来源, 作为天然的抗氧化肽或抗菌肽在未来有必要对其进行深入研究。

参考文献

- [1] Izydorczyk G, Mikula K, Skrzypczak D, et al. Valorization of poultry slaughterhouse waste for fertilizer purposes as an alternative for thermal utilization methods. *J Hazard Mater*, 2022, 424: 127328
- [2] de Menezes CLA, Santos RC, Santos MV, et al. Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(5): 86
- [3] Yan RR, Gong JS, Su C, et al. Preparation and applications of keratin biomaterials from natural keratin wastes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(7): 2349-2366
- [4] Zhang W, Fan Y. Structure of Keratin. *Methods Mol Biol*, 2021, 2347: 41-53
- [5] Wang Z, Chen Y, Yan M, et al. Research progress on the degradation mechanism and modification of keratinase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107(4): 1003-1017
- [6] Li K, Li G, Peng S, et al. Effective biodegradation on chicken feather by the recombinant KerJY-23 *Bacillus subtilis* WB600: a synergistic process coupled by disulfide reductase and keratinase. *Int J Biol Macromolecules*, 2023, 253: 127194
- [7] Akram F, Aqeel A, Shoaib M, et al. Multifarious revolutionary aspects of microbial keratinases: an efficient green technology for future generation with prospective applications. *Environ Sci Pollut Res*, 2022, 29(58): 86913-86932
- [8] Nnolim NE, Nwodo UU. Microbial keratinase and the bioeconomy: a three-decade meta-analysis of research exploit. *AMB Expr*, 2021, 11(1): 12
- [9] Almahasheer AA, Mahmoud A, El-Komy H, et al. Novel Feather degrading keratinases from *Bacillus cereus* group: biochemical, genetic and bioinformatics analysis. *Microorganisms*, 2022, 10(1): 93
- [10] Rahimnahal S, Meimandipour A, Fayazi J, et al. Biochemical and molecular characterization of novel keratinolytic protease from *Bacillus licheniformis* (KRLr1). *Front Microbiol*, 2023, 14: 1132760
- [11] Ballas P, Gabler C, Wagener K, et al. Characterization of *Bacillus pumilus* strains isolated from bovine uteri. *Animals*, 2023, 13(8): 1297
- [12] Mazotto AM, Cedrola SML, de Souza EP, et al. Enhanced keratinase production by *Bacillus subtilis* amr using experimental optimization tools to obtain feather protein lysate for industrial applications. *3 Biotech*, 2022, 12(4): 90
- [13] Peng S, Li H, Zhang S, et al. Isolation of a novel feather-degrading *Ectobacillus* sp. JY-23 strain and characterization of a new keratinase in the M4 metalloprotease family. *Microbiol Res*, 2023, 274: 127439
- [14] Sangali S, Brandelli A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J Appl Microbiol*, 2000, 89(5): 735-743
- [15] Saba M, Khan A, Ali H, et al. Microbial pretreatment of chicken feather and its co-digestion with rice husk and green grocery waste for enhanced biogas production. *Front Microbiol*, 2022, 13: 792426
- [16] Pei XD, Li F, Yue SY, et al. Production and characterization of novel thermo- and organic solvent-stable keratinase and aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa* 4-3 for effective poultry feather degradation. *Environ Sci Pollut Res*, 2023, 30(2): 2480-2493
- [17] Lin X, Wong SL, Miller ES, et al. Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis*. *J Industrial Microbiol Biotechnol*, 1997, 19(2): 134-138
- [18] Bohacz J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33(1): 13
- [19] Gradišar H, Kern S, Friedrich J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(2): 196-200
- [20] Masood S, Hussain A, Javid A, et al. Fungal decomposition of chicken-feather waste in submerged and solid-state fermentation. *Braz J Biol*, 2021, 83: e246389
- [21] Qiu J, Barrett K, Wilkens C, et al. Bioinformatics based discovery of new keratinases in protease family M36. *New Biotechnol*, 2022, 68: 19-27
- [22] Wang QY, Liao MD. Biodegradation of feather wastes and the purification and characterization of a concomitant keratinase from *Paecilomyces lilacinus*. *Prikl Biokhim*

- Mikrobiol, 2014, 50(3): 311-317
- [23] Abd El-Aziz NM, Khalil BE, Ibrahim HF. Enhancement of feather degrading keratinase of *Streptomyces swerraensis* KN23, applying mutagenesis and statistical optimization to improve keratinase activity. *BMC Microbiol*, 2023, 23(1): 158
- [24] Li ZW, Liang S, Ke Y, et al. The feather degradation mechanisms of a new *Streptomyces* sp. isolate SCUT-3. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 191
- [25] Prakash P, Jayalakshmi SK, 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. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(7): 1909-1920
- [26] Friedrich AB, Antranikian G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order thermotogales. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(8): 2875-2882
- [27] Zarái Jaouadi N, Rekik H, Ben Elhoul M, et al. A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process. *Int J Biol Macromolecules*, 2015, 79: 952-964
- [28] Iglesias MS, Sequeiros C, García S, et al. Newly isolated *Bacillus* sp. G51 from Patagonian wool produces an enzyme combination suitable for felt-resist treatments of organic wool. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2017, 40(6): 833-842
- [29] Nnolim NE, Ntozonke N, Okoh AI, et al. Exoproduction and characterization of a detergent-stable alkaline keratinase from *Arthrobacter* sp. KFS-1. *Biochimie*, 2020, 177: 53-62
- [30] Sanghvi G, Patel H, Vaishnav D, et al. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. *Int J Biol Macromolecules*, 2016, 87: 256-262
- [31] Huang Y, Busk PK, Herbst FA, et al. Genome and secretome analyses provide insights into keratin decomposition by novel proteases from the non-pathogenic fungus *Onygena corvina*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(22): 9635-9649
- [32] Monod M, Léchenne B, Jousson O, et al. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Microbiology*, 2005, 151(1): 145-155
- [33] Rai SK, Mukherjee AK. Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline β -keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. *Biochem Eng J*, 2011, 54(1): 47-56
- [34] Hassan MA, Taha TH, Hamad GM, et al. Biochemical characterisation and application of keratinase from *Bacillus thuringiensis* MT1 to enable valorisation of hair wastes through biosynthesis of vitamin B-complex. *Int J Biol Macromolecules*, 2020, 153: 561-572
- [35] Shen N, Yang M, Xie C, et al. Isolation and identification of a feather degrading *Bacillus tropicus* strain Gxun-17 from marine environment and its enzyme characteristics. *BMC Biotechnol*, 2022, 22(1): 11
- [36] Liaqat I, Ali S, Butt A, et al. Purification and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* dcs1 for poultry waste processing. *J Oleo Sci*, 2022, 71(5): 693-700
- [37] Sharma C, Timorshina S, Osmolovskiy A, et al. Chicken feather waste valorization into nutritive protein hydrolysate: role of novel thermostable keratinase from *Bacillus pacificus* RSA27. *Front Microbiol*, 2022, 13: 882902
- [38] Li Q. Structure, application, and biochemistry of microbial keratinases. *Front Microbiol*, 2021, 12: 674345
- [39] Qiu J, Wilkens C, Barrett K, et al. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: classification, structure, function. *Biotechnol Adv*, 2020, 44: 107607
- [40] Wu WL, Chen MY, Tu IF, et al. The discovery of novel heat-stable keratinases from *Meiothermus taiwanensis* WR-220 and other extremophiles. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4658
- [41] Betzel C, Gourinath S, Kumar P, et al. Structure of a serine protease proteinase K from *Tritirachium album limber* at 0.98 Å resolution. *Biochemistry*, 2001, 40(10): 3080-3088
- [42] Kim JS, Kluskens LD, de Vos WM, et al. Crystal structure of fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a keratinolytic enzyme related to subtilisin. *J Mol Biol*, 2004, 335(3): 787-797
- [43] Lee YJ, Dhanasingh I, Ahn JS, et al. Biochemical and structural characterization of a keratin-degrading M32 carboxypeptidase from *Fervidobacterium islandicum* AW-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4): 927-933
- [44] Rajput R, Tiwary E, Sharma R, et al. Swapping of prosequences between keratinases of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus*: altered substrate specificity and thermostability. *Enzyme Microb Tech*, 2012, 51(3): 131-138
- [45] Liu B, Zhang J, Fang Z, et al. Functional analysis of the C-terminal propeptide of keratinase from *Bacillus licheniformis* BBE11-1 and its effect on the production of keratinase in *Bacillus subtilis*. *Process Biochem*, 2014, 49(9): 1538-1542
- [46] Li J, Chen D, Yu Z, et al. Improvement of expression level of keratinase Sfp2 from *Streptomyces fradiae* by site-directed mutagenesis of its N-terminal pro-sequence.

- Biotechnol Lett*, 2013, 35(5): 743-749
- [47] Tuly JA, Ma H, Zayed HM, et al. Harnessing the keratinolytic activity of *Bacillus licheniformis* through random mutagenesis using ultraviolet and laser irradiations. *Appl Biochem Biotechnol*, 2022, 194(4): 1546-1565
- [48] Zeng YH, Shen FT, Tan CC, et al. The flexibility of UV-inducible mutation in *Deinococcus ficus* as evidenced by the existence of the imuB-dnaE2 gene cassette and generation of superior feather degrading bacteria. *Microbiol Res*, 2011, 167(1): 40-47
- [49] Cai C, Lou B, Zheng X. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9(1): 60-67
- [50] Zhang J, Su C, Kong XL, et al. Directed evolution driving the generation of an efficient keratinase variant to facilitate the feather degradation. *Bioresour Bioprocess*, 2022, 9(1): 38
- [51] Zhao HY, Feng H. Engineering *Bacillus pumilus* alkaline serine protease to increase its low-temperature proteolytic activity by directed evolution. *BMC Biotechnol*, 2018, 18(1): 34
- [52] Zhang G, Chen Y, Li Q, et al. Growth-coupled evolution and high-throughput screening assisted rapid enhancement for amylase-producing *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Tech*, 2021, 337: 125467
- [53] Fang Z, Zhang J, Liu B, et al. Insight into the substrate specificity of keratinase KerSMD from *Stenotrophomonas maltophilia* by site-directed mutagenesis studies in the S1 pocket. *RSC Adv*, 2015, 5(91): 74953-74960
- [54] Su C, Gong JS, Qin A, et al. A combination of bioinformatics analysis and rational design strategies to enhance keratinase thermostability for efficient biodegradation of feathers. *Sci Total Environ*, 2022, 818: 151824
- [55] Liu B, Zhang J, Fang Z, et al. Enhanced thermostability of keratinase by computational design and empirical mutation. *J Industrial Microbiol Biotechnol*, 2013, 40(7): 697-704
- [56] Liang X, Bian Y, Tang XF, et al. Enhancement of keratinolytic activity of a thermophilic subtilase by improving its autolysis resistance and thermostability under reducing conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(3): 999-1006
- [57] Tian J, Long X, Tian Y, et al. Enhanced extracellular recombinant keratinase activity in *Bacillus subtilis* SCK6 through signal peptide optimization and site-directed mutagenesis. *RSC Adv*, 2019, 9(57): 33337-33344
- [58] Fang Z, Zhang J, Du G, et al. Improved catalytic efficiency, thermophilicity, anti-salt and detergent tolerance of keratinase KerSMD by partially truncation of PPC domain. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 27953
- [59] Lotfi F, Badoei-dalfard A, Hassanshahian M. Immobilization and biochemical characterization of keratinase 2S1 onto magnetic cross-linked enzyme aggregates and its application on the hydrolysis of keratin waste. *Catal Lett*, 2022, 152(8): 2507-2523
- [60] Moussa Z, Darwish DB, Alrdahe SS, et al. Innovative artificial-intelligence-based approach for the biodegradation of feather keratin by *Bacillus paramycoides*, and cytotoxicity of the resulting amino acids. *Front Microbiol*, 2021, 12: 731262
- [61] Ming Y, Wang W, Yin R, et al. A review of enzyme design in catalytic stability by artificial intelligence. *Brief BioInf*, 2023, 24(3): bbad065
- [62] Tuly JA, Zayed HM, Nizami AS, et al. Bioconversion of agro-food industrial wastes into value-added peptides by a *Bacillus* sp. mutant through solid-state fermentation. *Bioresource Tech*, 2022, 346: 126513
- [63] Wang D, Zeng Z, Piao X, et al. Effects of keratinase supplementation of corn-soybean meal based diets on apparent ileal amino acid digestibility in growing pigs and serum amino acids, cytokines, immunoglobulin levels and loin muscle area in nursery pigs. *Arch Anim Nutr*, 2011, 65(4): 290-302
- [64] Xu KL, Gong GX, Liu M, et al. Keratinase improves the growth performance, meat quality and redox status of broiler chickens fed a diet containing feather meal. *Poultry Sci*, 2022, 101(6): 101913
- [65] Verma SK, Sharma PC. Current trends in solid tannery waste management. *Crit Rev Biotechnol*, 2023, 43(5): 805-822
- [66] Ben Elhoul M, Zeraï Jaouadi N, Bouacem K, et al. Heterologous expression and purification of keratinase from *Actinomyces viridilutea* DZ50: feather biodegradation and animal hide dehairing bioprocesses. *Environ Sci Pollut Res*, 2021, 28(8): 9921-9934
- [67] Okoroma EA, Purchase D, Garelick H, et al. Enzymatic formulation capable of degrading scrapie prion under mild digestion conditions. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68099
- [68] Ningthoujam DS, Mukherjee S, Devi LJ, et al. In vitro degradation of β -amyloid fibrils by microbial keratinase. *Clin Interv*, 2019, 5(1): 154-163
- [69] Shalaby MM, Samir R, Goma FAZM, et al. Enhanced fusidic acid transdermal delivery achieved by newly isolated and optimized *Bacillus cereus* Keratinase. *Bio-technol Rep*, 2021, 30: e00620
- [70] Trevisol TC, Henriques RO, Souza AJA, et al. An overview of the use of proteolytic enzymes as exfoliating agents. *J Cosmetic Dermatol*, 2022, 21(8): 3300-3307
- [71] Zhang RX, Wu ZW, Cui HY, et al. Production of surfactant-stable keratinase from *Bacillus cereus* YQ15 and its application as detergent additive. *BMC Biotechnol*, 2022, 22(1): 26