



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20200195

数字出版日期: 2021-03-31; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20210330.1439.001.html>

理性设计降低碱性蛋白酶的胶原降解活力

李 玉, 李家霖, 朱宝悦, 刘佳萌, 刘逸寒, 路福平
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以克劳氏芽胞杆菌来源的碱性蛋白酶(PRO)为研究对象,运用 HotSpot Wizard 3.0 设计了 PRO 在 Gly97-Gly102 loop 区的突变库,筛选得到了胶原蛋白降解活力显著降低的 G97E 突变体. G97E 突变体的碱性蛋白酶活力和胶原蛋白降解活力分别为野生型 PRO 的 91.97%和 65.84%;最适温度和最适 pH 分别为 60 °C和 pH 10.0;其稳定性相比于野生型 PRO 无显著差异.综上所述,本研究利用理性设计技术,获得了在碱性蛋白酶活力基本保持不变的情况下,胶原蛋白降解活力显著降低的 G97E 突变体,这个新酶品种的开发和工业化生产对于扩大 PRO 在皮革工业中的应用具有重要意义.

关键词: 碱性蛋白酶; 理性设计; 胶原蛋白降解活力; 皮革酶

中图分类号: Q814.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2021)03-0001-05

Reducing Collagen Degradable Activity of Alkaline Protease by Rational Design

LI Yu, LI Jialin, ZHU Baoyue, LIU Jiameng, LIU Yihan, LU Fuping
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The *Bacillus clausii* alkaline protease (PRO) was used as template, the mutant library of PRO in Gly97-Gly102 loop region was designed by HotSpot Wizard 3.0, and the G97E mutant with significantly reduced collagen degradable activity was obtained after screening. The alkaline protease activity and collagen degradable activity of G97E mutant were 91.97% and 65.84% of that in wild-type PRO, respectively. The optimum temperature and pH were 60 °C and pH 10.0, respectively. There was no significant difference in stability compared to wild-type PRO. In conclusion, G97E mutant with basically unchanged alkaline protease activity and significantly reduced collagen degradable activity was obtained by rational design in our study, which is of great significance for expanding the application value of PRO in leather industry with the development and industrial production of this new mutant.

Key words: alkaline protease; rational design; collagen degradable activity; leather enzyme

蛋白酶是一种具有复杂结构与功能的水解酶,能够裂解肽键产生短肽或氨基酸^[1].按照最适 pH 的不同,蛋白酶可分为 3 种类型:酸性蛋白酶,最适 pH 为 2.0~5.0,主要来源于真菌;中性蛋白酶,最适 pH 为 7.0,主要来源于植物;碱性蛋白酶,最适 pH 为 8.0 及以上^[2],主要来源于微生物.蛋白酶作为最重要的工业酶制剂之一,销售额占有酶制剂销售量的 60%以上,在洗涤剂、医药、食品、皮革、丝绸、摄影等领域

有着广泛的应用^[1,3-5].

在皮革工业中,脱毛是皮革加工的主要步骤,即去除皮革上的毛发、表皮、非胶原蛋白和其他黏合物质^[6].传统的脱毛工艺使用的是硫化钠,产生的大量含硫废弃物导致了严重的污染问题^[7-8],此外,在制革鞣前准备中,大量的化工材料添加也造成了严重的环境隐患.目前,使用酶制剂代替化学品进行清洁化生产的相关应用在制革中受到越来越多的关注^[9-10].其

收稿日期: 2020-11-25; 修回日期: 2021-02-01

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2017YFB0308401)

作者简介: 李 玉(1976—),女,河北人,教授, liyut@tust.edu.cn

中,蛋白酶作为脱毛工艺中硫化钠的环境友好型替代品,已在皮革工业中应用. Dayanandan 等^[11]利用塔马里曲霉 (*Aspergillus tamarii*) 来源的蛋白酶在 pH 9~11、温度 30~37 °C、酶质量分数 1%、孵育时间 18~24 h 的条件下对羊皮进行了脱毛,该方法显著降低了脱毛过程中的五日生化需氧量 (BOD₅, 50%)、化学需氧量 (COD, 40%)、溶解性总固体 (TDS, 60%) 和悬浮性总固体 (TSS, 20%)。然而,由于传统蛋白酶中的胶原降解蛋白酶活力较强,在应用过程中对胶原原易造成损伤,导致松面、烂面等现象出现,极大降低了经济效益,造成了蛋白酶在皮革工业中的应用局限性^[12-13]。因此,开发一种适合皮革加工的、具有低胶原水解活性的蛋白酶能够提高其在使用过程中的安全性,具有较高的应用需求与实践价值。

由于克劳氏芽胞杆菌来源的碱性蛋白酶可以水解毛发,因此胶原蛋白水解能力也较高,造成在皮革工业中的应用受限. 本研究以克劳氏芽胞杆菌来源的碱性蛋白酶 (PRO) 为研究对象,通过理性设计工具设计突变库对 PRO 进行改造,以期获得低胶原降解活力的蛋白酶突变体,旨在进一步提高该酶在皮革工业中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) WB600、解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、质粒 pLY2-PRO 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂及培养基

KOD-Plus 点突变试剂盒, TOYOBO 公司; 质粒快速提取试剂盒, Omega 公司; 蛋白胨和酵母浸粉, Oxoid 公司; I 型胶原 (可溶), Solarbio 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

发酵培养基 (g/L): 玉米淀粉 64, 豆类淀粉 40, NaH₂PO₄ 4, K₂HPO₄ 0.3, 高氏淀粉酶 0.7, 90 °C 保温 30 min, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 PRO 突变体的构建及表达

克劳氏芽胞杆菌来源的碱性蛋白酶 (PRO) 的晶体结构已在 1998 年得到了解析 (PDB: 1GCI)^[14]。通过突变设计软件 HotSpot Wizard 3.0^[15]设计突变库。

本实验室前期已经克隆了克劳氏芽胞杆菌碱性蛋白酶基因 *pro*, 并将其插入到 pLY2 载体中, 构建了重组质粒 pLY2-PRO^[16]。设计突变体引物 (表 1), 通过 KOD-Plus 点突变试剂盒, 以 pLY2-PRO 质粒为模板, 经反向 PCR 引入突变位点构建重组质粒, 转入枯草芽胞杆菌 WB600, 涂布于卡那霉素抗性平板, 挑取转化子扩大培养后提取质粒进行测序验证。测序正确的重组质粒参照杨连^[17]的方法转入解淀粉芽胞杆菌中。将重组菌株以 2% 的接种量接种到发酵培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 48 h。取 2 mL 菌液 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液用于聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测及酶活力测定。

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物	序列(5'→3')
G97A-F	GCGGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97C-F	TGTGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97D-F	GATGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97E-F	GAAGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97H-F	CACGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97I-F	ATTGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97K-F	AAAGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97L-F	CTAGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97M-F	ATGGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97N-F	AATGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97Q-F	CAAGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97R-F	CGTGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97V-F	GTCGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97W-F	TGGGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97Y-F	TACGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCT
G97X-R	TAATACTTTAACAGCGTATAGTCCGCGCTCGCGCTACGC
S99A-F	GCGGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99D-F	GATGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99E-F	GAAGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99F-F	TTTGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99G-F	GGAGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99H-F	CACGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99I-F	ATTGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99K-F	AAAGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99L-F	CTAGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99M-F	ATGGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99N-F	AATGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99P-F	CCAGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99Q-F	CAAGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99T-F	ACAGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99V-F	GTCGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99Y-F	TACGGTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAA
S99X-R	CGCCCTAATACTTTAACAGCGTATAGTCCGCGCTCGG

1.2.2 蛋白酶活力测定

碱性蛋白酶活力测定根据 GB/T 23527—2009 方

法,每组以1个试管为对照组,其余3个试管为实验组.在所有试管中,加入1 mL用硼酸缓冲液(pH 10.5)配制的1%的酪素溶液,并将试管在40℃保温2 min.向对照组试管中加0.4 mol/L三氯乙酸2 mL,向实验组试管中加入1 mL适当稀释的酶液,40℃反应10 min.反应后对照组试管加入1 mL酶液,实验组试管加入0.4 mol/L三氯乙酸溶液2 mL终止反应.分别从各试管中取1 mL反应液,12 000 r/min离心1 min,取0.5 mL上清液于新的试管中,加入2.5 mL碳酸钠、0.5 mL福林试剂,40℃显色20 min,在680 nm处测定吸光度.酶活力定义为在40℃下每分钟水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸所需的酶量.

胶原蛋白降解活力测定根据Rosen法,每组以1个试管为对照组,其余3个试管为实验组.在所有试管中,加入1 mL用硼酸缓冲液(pH 10.5)配制的5 mg/mL I型胶原溶液,并将试管在40℃保温2 min.向对照组试管中加0.4 mol/L三氯乙酸2 mL,向实验组试管中加入1 mL适当稀释的酶液,40℃反应10 min.反应后对照组试管加入1 mL酶液,实验组试管加入0.4 mol/L三氯乙酸溶液2 mL终止反应.分别从各试管中取1 mL反应液,12 000 r/min离心1 min,取0.5 mL上清液于新的试管中,加入0.5 mL乙酸-乙酸钠溶液(pH 5.4)、0.5 mL茚三酮溶液,煮沸10 min,冷却后加入4.5 mL 60%乙醇溶液,混匀,在570 nm处测定吸光度.酶活力定义为在40℃下每分钟水解I型胶原产生1 μg甘氨酸所需的酶量.

1.2.3 PRO突变体酶学性质测定

分别使用pH 7~9的磷酸盐缓冲液(50 mmol/L)和pH 10~12的硼酸缓冲液(50 mmol/L)配制酪素溶液,测定40℃时不同pH条件下的酶活力.以最高酶活力为100%,计算不同pH下的相对酶活力,确定最适pH.

将酶液置于40℃的条件下,在7.0、8.0、9.0、10.0和11.0的缓冲液中孵育20 h后,测定残余酶活力.以未孵育的酶活力为100%,计算不同pH孵育后的残余酶活力,测定pH稳定性.

在最适pH环境下,分别测定30、40、50、60、70、80℃条件下的酶活力,以最高酶活力为100%,计算不同温度下的相对酶活力,确定最适温度.

将酶液置于最适pH缓冲液中,在不同温度条件下保温20 h后,测定残余酶活力.以未孵育的酶活力为100%,计算不同温度孵育后的残余酶活力,测定

热稳定性.

2 结果与分析

2.1 PRO突变点的选择及突变库构建

野生型PRO结构中Gly97-Gly102 loop区域在其催化三联体Asp-His-Ser附近(图1),通过分子动力学模拟发现(数据未显示),Gly97-Gly102 loop区域会与底物分子接触并相互作用,从而影响PRO的催化功能.

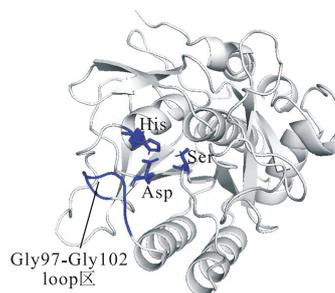


图1 PRO的三维结构

Fig. 1 Three-dimensional structure of PRO

以RCSB数据库PDB:1GCI为输入文件,运用HotSpot Wizard 3.0设计了PRO位于Gly97-Gly102 loop区的突变库.利用突变引物和KOD-Plus点突变试剂盒在pLY2-PRO质粒的pro基因处引入突变,成功构建pLY2-G97E等31个重组质粒(表2).将重组质粒转入枯草芽胞杆菌WB600中进行扩增及甲基化修饰.

表2 重组质粒

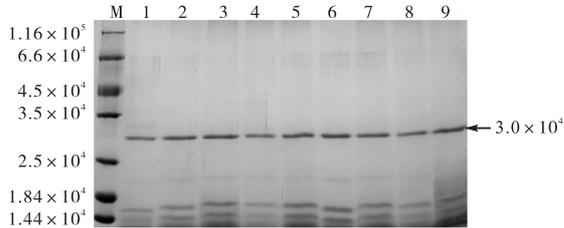
Tab. 2 Recombinant plasmid

PRO 突变库			
pLY2-G97A	pLY2-G97M	pLY2-S99A	pLY2-S99L
pLY2-G97C	pLY2-G97N	pLY2-S99D	pLY2-S99M
pLY2-G97D	pLY2-G97Q	pLY2-S99E	pLY2-S99N
pLY2-G97E	pLY2-G97R	pLY2-S99F	pLY2-S99P
pLY2-G97H	pLY2-G97V	pLY2-S99G	pLY2-S99Q
pLY2-G97I	pLY2-G97W	pLY2-S99H	pLY2-S99T
pLY2-G97K	pLY2-G97Y	pLY2-S99I	pLY2-S99V
pLY2-G97L		pLY2-S99K	pLY2-S99Y

2.2 PRO突变体在解淀粉芽胞杆菌中的表达

将测序正确的重组质粒转入解淀粉芽胞杆菌,对重组菌株进行发酵表达,菌液离心后取上清液为粗酶液.将粗酶液置于截留相对分子质量为 1.0×10^4 的超滤管中,3 800g离心30 min,取浓缩液用于SDS-PAGE检测,结果如图2所示.在相对分子质量为 3.0×10^4 处出现一个明显的单一蛋白条带,与目的蛋

白理论大小相符,证明 PRO 突变体在解淀粉芽胞杆菌中成功分泌表达,且经超滤后纯度较高,可用于后续分析和研究.



M. 蛋白 marker; 1. 野生型 PRO 浓缩液; 2. G97E 浓缩液; 3. G97L 浓缩液; 4. G97R 浓缩液; 5. S99A 浓缩液; 6. S99G 浓缩液; 7. S99L 浓缩液; 8. S99Q 浓缩液; 9. S99Y 浓缩液

图2 部分 PRO 突变体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of partial PRO mutant

2.3 PRO 突变库的筛选

将浓缩液稀释适当倍数后,分别测定 PRO 突变

体的碱性蛋白酶活力及胶原蛋白降解活力. 以野生型 (WT) PRO 的碱性蛋白酶活力和胶原蛋白降解活力为 100%, 计算各突变体的碱性蛋白酶相对活力和胶原蛋白降解相对活力, 结果如图 3 所示.

与野生型 PRO 的碱性蛋白酶活力和胶原蛋白降解活力相比, 大部分突变体碱性蛋白酶活力与胶原蛋白降解活力下降幅度无显著差异, G97M、S99G、S99M 和 S99P 等突变体的胶原蛋白降解活力下降幅度显著低于碱性蛋白酶活力的下降幅度, 仅 G97E 突变体的胶原蛋白降解活力下降幅度显著高于碱性蛋白酶活力的下降幅度. G97E 突变体的碱性蛋白酶活力和胶原蛋白降解活力分别为野生型 PRO 的 91.97% 和 65.84%, 碱性蛋白酶活力损失在 10% 以内, 而胶原蛋白降解活力降低了三分之一以上, 表明 G97E 突变体在几乎不损失蛋白酶活力的情况下, 显著降低了对胶原蛋白的水解能力.

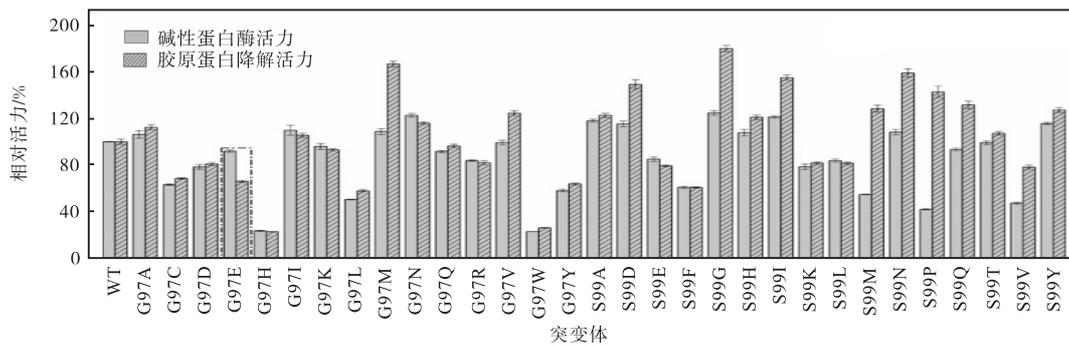


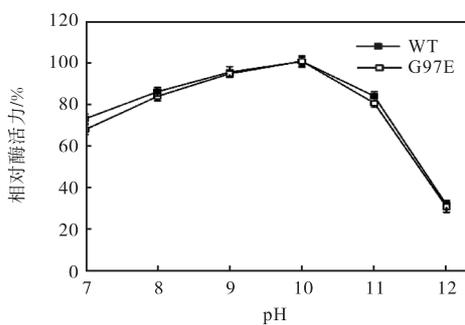
图3 PRO 突变体的碱性蛋白酶相对活力及胶原蛋白降解相对活力

Fig. 3 The alkaline protease relative activity and collagen degradable relative activity of PRO mutant

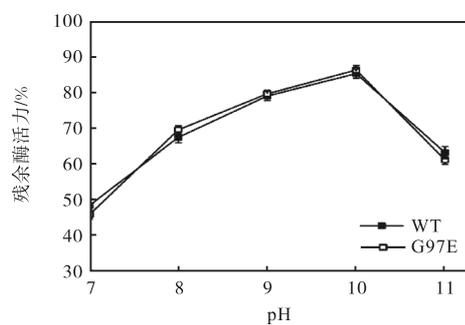
2.4 G97E 突变体的酶学性质

为了探究突变位点 Gly97Glu 对突变体 G97E 酶

学性质的影响, 对 G97E 及野生型 (WT) PRO 的酶学性质进行了测定, 结果如图 4 与图 5 所示.



(a) 最适 pH



(b) pH 稳定性

图4 pH 对野生型 PRO 和 G97E 酶学性质的影响

Fig. 4 Effect of pH on the properties of wild-type PRO and G97E

与野生型 PRO 相似, G97E 突变体最适 pH 为 10.0, 在 pH 7~12 的范围内, G97E 与野生型 PRO 的相对酶活力无明显差异 (图 4(a)). 由图 4(b) 可知,

在 pH 7~11 和 40 °C 条件下保温 20 h 后, G97E 的残余酶活力为初始酶活力的 46%、69%、79%、86% 和 61%, 而野生型 PRO 保留了初始酶活力的 48%、

67%、79%、85%和63%。野生型 PRO 和 G97E 的残余酶活力差异不明显,表明突变位点 Gly97Glu 对于 G97E 的最适 pH 及 pH 稳定性的影响不显著。

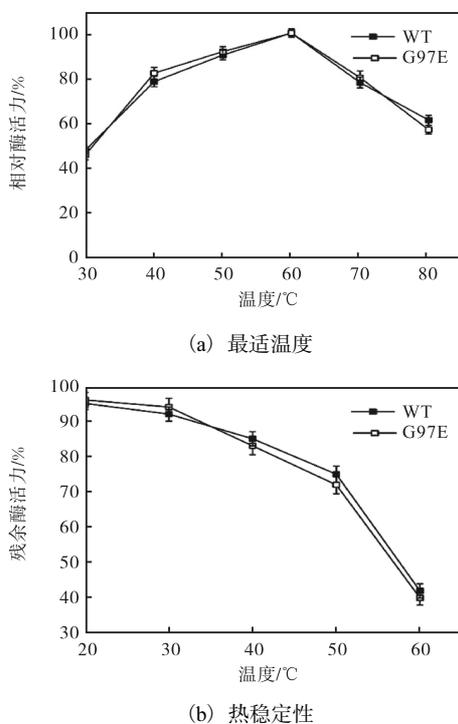


图5 温度对野生型 PRO 和 G97E 酶学性质的影响
Fig. 5 Effect of temperature on the properties of wild-type PRO and G97E

由图 5(a)可知, G97E 和野生型 PRO 的最适温度约为 60 °C, 在 30 ~ 80 °C 范围内, G97E 与野生型 PRO 的相对酶活力无明显差异. 由图 5(b)可知, 在 20、30、40、50 °C 和 60 °C 以及 pH 10.0 条件下保温 20 h 后, G97E 的残余酶活力分别为 96%、94%、83%、72%和 40%, 而野生型 PRO 的残余酶活力分别为 95%、92%、85%、75%和 42%. 野生型 PRO 和 G97E 的残余酶活力差异不明显, 表明突变位点 Gly97Glu 对于 G97E 的最适温度及热稳定性的影响不显著。

3 结论

运用 HotSpot Wizard 3.0 构建了克劳氏芽胞杆菌来源的碱性蛋白酶的突变库, 经筛选得到了碱性蛋白酶活力和胶原蛋白降解活力分别为野生型 PRO 91.97%和 65.84%的 G97E 突变体. G97E 在基本不损失蛋白酶活力的情况下, 胶原蛋白降解活力显著降低, 在应用于皮革脱毛时能够降低皮革中胶原蛋白的损伤, 从而为其在皮革工业的应用奠定了基础. 此外, G97E 突变体的温度稳定性和 pH 稳定性均没有

降低, 使其在工业应用时能够在较长的时间内保持酶活力, 进一步提高了其在皮革工业中的应用价值。

参考文献:

- [1] Gupta R, Beg Q, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(1): 15-32.
- [2] Bukhari D A, Barkat A, Rehman A. Expression, purification, and molecular characterization of a full-length thermostable alkaline protease gene from *Bacillus subtilis* DMA-09[EB/OL]. [2020-11-24]. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00608-6>.
- [3] Pant G, Prakash A, Pavani J V P, et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Taibah University for Science, 2015, 9(1): 50-55.
- [4] Vijayaraghavan P, Lazarus S, Vincent S G P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2014, 21(1): 27-34.
- [5] Decastro R J S, Ohara A, Nishide T G, et al. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015, 4(2): 199-207.
- [6] Sivasubramanian S, Manohar B M, Rajaram A, et al. Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease[J]. Chemosphere, 2008, 70(6): 1015-1024.
- [7] Khambhaty Y. Applications of enzymes in leather processing[J]. Environmental Chemistry Letters, 2020, 18(3): 747-769.
- [8] Wanyonyi W C, Mulaa F J. Alkaliphilic enzymes and their application in novel leather processing technology for next-generation tanneries[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2020, 172: 195-220.
- [9] Huang Q, Peng Y, Li X, et al. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*[J]. Current Microbiology, 2003, 46(3): 169-173.
- [10] Khandelwal H B, More S V, Kalal K M, et al. Ecofriendly enzymatic dehairing of skins and hides by C.

(下转第 52 页)

- strategies in microwave drying[J]. *Journal of Food Engineering*, 2010, 99(3): 263–268.
- [8] Li Z F, Raghavan G S V, Wang N, et al. Drying rate control in the middle stage of microwave drying[J]. *Journal of Food Engineering*, 2011, 104(2): 234–238.
- [9] Song F H, Li Z F, Raghavan G S V. Combined microwave-hot-air drying of burdock slices with feedback temperature control at surface and core[J]. *Drying Technology*, 2017, 35(14): 1781–1790.
- [10] Luo G Y, Song C F, Pu H J, et al. Optimization of the microwave drying process for potato chips based on the measurement of dielectric properties[J]. *Drying Technology*, 2019, 37(11): 1329–1339.
- [11] Chantrey P. Industrial microwave heating[J]. *Electronics & Power*, 1983, 29(9): 659.
- [12] Bingol G, Pan Z L, Roberts J S, et al. Mathematical modeling of microwave-assisted convective heating and drying of grapes[J]. *International Journal of Agricultural & Biological Engineering*, 2008, 1(2): 46–54.
- [13] Davies R M, Elokene A M. Moisture-dependent physical properties of soybeans[J]. *International Agrophysics*, 2009, 23(3): 299–303.
- [14] Hemis M, Raghavan G S V. Effect of convective air attributes with microwave drying of soybean: Model prediction and experimental validation[J]. *Drying Technology*, 2014, 32(5): 543–549.
- [15] Shivhare U, Raghavan G S V, Bosisio R, et al. Microwave drying of soybean at 2.45 GHz[J]. *Journal of Microwave Power*, 1992, 28(1): 1–7.
- [16] Nicolin D J, Neto R M, Paraíso P R, et al. Analytical solution and experimental validation of a model for hydration of soybeans with variable mass transfer coefficient[J]. *Journal of Food Engineering*, 2015, 149: 17–23.
- [17] Romano V, Marra F. A numerical analysis of radio frequency heating of regular shaped foodstuff[J]. *Journal of Food Engineering*, 2008, 84(3): 449–457.

责任编辑: 郎婧

(上接第5页)

- brefeldianus* protease[J]. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 2015, 17(2): 393–405.
- [11] Dayanandan A, Kanagaraj J, Sounderraj L, et al. Application of an alkaline protease in leather processing: An ecofriendly approach[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2003, 11(5): 533–536.
- [12] Paul T, Das A, Mandal A, et al. Effective dehairing properties of keratinase from *Paenibacillus woosongensis* TKB2 obtained under solid state fermentation[J]. *Waste & Biomass Valorization*, 2014, 5(1): 97–107.
- [13] George N, Chauhan P S, Kumar V, et al. Approach to ecofriendly leather: Characterization and application of an alkaline protease for chemical free dehairing of skins and hides at pilot scale[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2014, 79(15): 249–257.
- [14] Kuhn P, Knapp M, Soltis S M, et al. The 0.78 Å structure of a serine protease: *Bacillus lentus* subtilisin[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(39): 13446–13452.
- [15] Lenka S, Jan S, Tomas M, et al. HotSpot Wizard 3.0: Web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W356–W362.
- [16] Liu Y, Shi C, Li D, et al. Engineering a highly efficient expression system to produce BcaPRO protease in *Bacillus subtilis* by an optimized promoter and signal peptide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 903–911.
- [17] 杨连. 解淀粉芽胞杆菌来源角蛋白酶的高效表达及羽毛降解工程菌的构建[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.

责任编辑: 郎婧