

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230210

数字出版日期: 2024-06-27; 数字出版网址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240627.1304.001>

基于生物信息学的角蛋白酶分析

王柏涵¹, 任 亮¹, 谢志成³, 李海勇^{4,5}, 刘海娇^{1,2}, 孙 军^{1,2}

(1. 天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457; 2. 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津 300457;

3. 天津市生态环境科学研究院, 天津 300191; 4. 天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457;

5. 天津纯态化学工程技术有限公司, 天津 300457)

摘 要: 通过生物信息学分析预测拟革状芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌 4 种微生物角蛋白酶的结构性质。结果显示, 所有酶都具有稳定性和亲水性, 其二级结构特征相似, 主要由无规则卷曲、 β -折叠和 α -螺旋构成。信号肽分析揭示了潜在的分泌蛋白特征, 其中拟革状芽孢杆菌可能分泌信号肽。此外, 拟革状芽孢杆菌的磷酸化位点最多。这为进一步研究角蛋白酶的降解机制及其推广应用提供了重要基础。

关键词: 微生物降解羽毛; 角蛋白酶; 序列预测; 生物信息学

中图分类号: Q814

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2024)04-0026-06

Bioinformatics-Based Analysis of Keratinase

WANG Baihan¹, REN Liang¹, XIE Zhicheng³, LI Haiyong^{4,5}, LIU Haijiao^{1,2}, SUN Jun^{1,2}

(1. College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, Tianjin 300457, China;

3. Tianjin Academy of Eco-Environmental Sciences, Tianjin 300191, China;

4. College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology,

Tianjin 300457, China; 5. Tianjin Pure Chemical Engineering Technology Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: The structural properties of four microbial keratinases, namely *Bacillus paramycoides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus subtilis*, were predicted through bioinformatics analysis in our current study. The results showed that all enzymes had stability and hydrophilicity, and their secondary structural characteristics were similar, mainly composed of irregular curls β -folding and α -spiral composition. Signal peptide analysis revealed potential secretory protein features, among which *Bacillus subtilis* might secrete signal peptides. Moreover, *Bacillus subtilis* had the most phosphorylation sites. These results have thus provided an important foundation for further studying the degradation mechanism of keratinase and promoting its application.

Key words: microbial degradation of feathers; keratinase; sequence prediction; bioinformatics

引文格式:

王柏涵, 任亮, 谢志成, 等. 基于生物信息学的角蛋白酶分析[J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(4): 26-31.

WANG B H, REN L, XIE Z C, et al. Bioinformatics-based analysis of keratinase[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2024, 39(4): 26-31.

角蛋白是动物表皮和表皮附属物的固有部分, 包括头发、羽毛、指甲等^[1]。农业、工业产生的角质废物对生态系统造成了严重的破坏, 其中最重要的是家禽

和皮革加工业产生的羽毛和毛发的污染问题。为了能够快速降解这些角质废物, 角蛋白酶被人们广泛研究和利用。1963 年, Nikerson 等^[2]提出角蛋白酶这一

收稿日期: 2023-11-06; 修回日期: 2024-04-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(41876134)

作者简介: 王柏涵(2002—), 男, 天津人, 本科生; 通信作者: 刘海娇, 助理研究员, coccolith@126.com

概念。

角蛋白酶的产生与各种微生物的合成有关^[3],对
角蛋白使用角蛋白酶可以实现特异性降解,角蛋白酶
在医药、食品生产等方面应用广泛。现在分离出的微
生物中可分泌角蛋白酶的微生物超过 30 种,它们可
以被细分为三大类别,分别为细菌类、真菌类、放线
菌类。一些革兰氏阳性菌,如芽孢杆菌(*Bacillus*),能
够降解角蛋白。Lo 等^[4]通过实验分离出了养殖场中
存在的一种新的羽毛降解菌,通过研究序列特点,将
其归为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),命名为 Wu2。
Macedo 等^[5]通过分离羽毛肉汤培养基中的细菌,发
现了一类枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[6],该菌的
主要特性是可以促使角蛋白酶的形成,酶液在 24 h
内能完全降解羽毛。目前已报道的羽毛降解菌主要
来源于陆地环境,很少有来自海洋环境的羽毛降解
菌。在海洋环境中,大多数微生物长期处在低温、高
盐、高压等极端环境中,如真菌、藻类、海洋放线菌、
海洋蓝细菌等。这些海洋微生物逐渐形成多种独特
的代谢机制,具有潜在的开发利用价值。目前国内外
对角蛋白酶的研究较少,角蛋白酶对饲料、化妆品工业
等有一定的利用价值^[7]。

本研究利用生物信息学软件对两种来源于海洋
的角蛋白酶(拟蕈状芽孢杆菌、铜绿假单胞菌)和两种
来源于陆地的角蛋白酶(枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆
菌)中氨基酸的理化性质等进行研究^[8],旨在为蛋白
酶的重组等工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源

氨基酸序列均源自美国国家生物信息中心
(NCBI)中已登录的序列即实验中氨基酸序列形成的
源头,分别为拟蕈状芽孢杆菌(*Bacillus paramy-*

coides)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、地
衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌
(*Bacillus subtilis*);前两种微生物来源于海洋,后两种
微生物来源于陆地^[9],其氨基酸序列登录号见表 1。

表 1 4 种微生物角蛋白酶的氨基酸序列登录号

Tab.1 Amino acid sequence accession numbers of four microbial keratinases

菌种	学名	登录号
拟蕈状芽孢杆菌	<i>Bacillus paramycoides</i>	WAL35741.1
铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WBU87517.1
地衣芽孢杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>	AAY82467.1
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	AIY62812.1

1.2 研究方法

利用生物信息学分析工具研究 4 种微生物蛋白
酶的氨基酸序列特征,见表 2。

表 2 生物信息学分析工具

Tab.2 Bioinformatics analysis tools

分析项目	工具及网址
亲疏水性	ExPASy:ProtScale (https://web.expasy.org/ProtScale/)
理化性质	ExPASy:ProtParam (https://web.expasy.org/ProtParam/)
结构查询	http://www.rcsb.org/
磷酸化位点 预测	NetPhos 3.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/s.services/NetPhos)
信号肽预测	SignalP 4.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)
二级结构预测	GOR4 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/) cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)
序列查询	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Protein

2 结果与分析

2.1 微生物角蛋白酶的氨基酸特性

使用 ProtParam 工具分析 4 种微生物角蛋白酶
的氨基酸特性,结果见表 3。单体酶即角蛋白酶,分
子质量为 $4.15 \times 10^{-20} \sim 1.16 \times 10^{-19}$ g。

表 3 4 种微生物角蛋白酶的氨基酸特性

Tab.3 Amino acid characteristics of four microbial keratinases

微生物种类	氨基酸总数	等电点	原子总数	不稳定指数	脂肪指数	亲水性分值	含量前三的氨基酸及含量		
							1	2	3
拟蕈状芽孢杆菌	397	8.28	5 902	17.07	76.86	-0.317	Ala 10.6%	Ser 10.1%	Gly 9.1%
铜绿假单胞菌	475	6.15	7 092	26.57	71.09	-0.346	Ala 10.7%	Gly 10.7%	Val 7.8%
地衣芽孢杆菌	379	8.73	5 453	12.61	83.69	0.032	Ala 14.2%	Gly 10.8%	Val 10.8%
枯草芽孢杆菌	362	8.45	5 196	28.87	77.68	-0.123	Ala 13.3%	Ser 13.3%	Gly 10.2%

注:Ala 表示丙氨酸,Ser 表示丝氨酸,Gly 表示甘氨酸,Val 表示缬氨酸。

当前发现分子质量最小的角蛋白酶是微白黄链
霉菌分泌的角蛋白酶,分子质量相对较大的蛋白酶是

复合酶,有的可以达到 2.65×10^{-17} g。从氨基酸数量
来看,4 种微生物角蛋白酶氨基酸数目均在 350 ~ 500

个之间;所选细菌蛋白酶的理论等电点均在 6.15 ~ 8.73 之间,铜绿假单胞菌最小,地衣芽孢杆菌最大;所选细菌蛋白酶脂肪指数集中在 70 ~ 80。通过分析稳定性可以看出,不稳定指数<40,稳定性好,4 种微生物蛋白酶都是稳定蛋白。在两种海洋来源的角蛋白酶中 Ala 是最多的一类。角蛋白酶空间结构的稳定性与 Ala 含量存在着紧密的关系。

疏水性是指 1 个分子与水互相排斥的物理属性。由 20 种氨基酸构成的蛋白质,在维持蛋白质三级结构中,分离出的角蛋白酶的亲水性/疏水性的相互作用非常显著。本文在研究疏水性时使用了 ProtScale 中的 K-D 预测算法^[10],结果表明它们都有亲水性。以拟蕈状芽孢杆菌为例,其亲水性/疏水性分析和预测如图 1 所示。

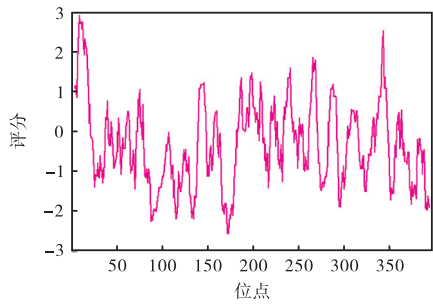


图 1 拟蕈状芽孢杆菌亲水性/疏水性分析和预测

Fig. 1 Analysis and prediction of hydrophilicity/hydrophobicity of *Bacillus paramycoides*

拟蕈状芽孢杆菌多肽链中第 172 位的天冬氨酸

与第 173 位的苏氨酸都有最低分(-2.544),亲水性最强;第 9 位的亮氨酸具有最强疏水性,最高分值可以达到 2.911。总体上看,数量比较多的是亲水性氨基酸。亲水性在整个蛋白酶肽链上呈现出的物理性质中较为突出。

2.2 微生物角蛋白酶的二级结构分析

蛋白质的二级结构,指的是蛋白质多肽链自身的折叠方式、盘绕方式,主要有 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲四类。蛋白质具有较大的相对分子质量,各类二级结构可能存在于一个蛋白质分子的不同肽段。一般情况下,维持二级结构要借助于骨架上的羰基和酰胺基之间形成的氢键,而在二级结构稳定上作用较为突出的是氢键。微生物角蛋白酶一般由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲构成。

在研究和预测蛋白质的二级结构时会选取 4 条微生物蛋白酶氨基酸序列^[11],通过 GOR4 对 4 种微生物角蛋白酶的二级结构进行预测。4 种微生物蛋白酶蛋白的二级结构分析结果见表 4,未发现二级结构中存在 β -转角。以拟蕈状芽孢杆菌为例,其中无规则卷曲所占比例最高(53.90%),其次为 β -折叠(27.71%), α -螺旋(18.39%)所占比例最小。 β -折叠和 α -螺旋可以更好地维持蛋白质结构稳定性,无规则卷曲极易改变蛋白质构象^[12]。对比栗学清等^[13]的海洋来源 *Rheinheimera* sp.QH 胞外角蛋白酶 KerQH2 的生物信息学研究,发现与之结果大致相似,该结构特征有助于角蛋白酶对结构复杂角蛋白的降解。

表 4 4 种微生物蛋白酶蛋白的二级结构分析结果

Tab. 4 Secondary structure analysis results of four microbial protease proteins

序号	二级结构比例/%			二级结构元件分布
	α -螺旋	β -折叠	无规则卷曲	
拟蕈状芽孢杆菌	18.39	27.71	53.90	
铜绿假单胞菌	22.32	23.79	53.89	
地衣芽孢杆菌	27.44	27.70	44.85	
枯草芽孢杆菌	25.41	20.17	54.42	

注:二级结构元件分布中,蓝色代表 α -螺旋,红色代表 β -折叠,紫色代表无规则卷曲。

2.3 微生物角蛋白酶的信号肽分析

分泌蛋白的 N 端是信号肽,通常由氨基酸构成,分为多个区段,如带正电的 N 末端或者是带负电的 C 末端,后者是信号序列切割位点,而信号肽的主功能区为中间疏水序列。在体外重组表达的过程中,一

项核心工作为信号肽分析^[14]。合理的引导信号肽不仅能够对细胞特定区间内分泌外源蛋白进行定位,有助于更好地强化其可溶性,还有利于防止包涵体复性过程中因温度、pH、溶液成分等发生变化,导致其稳定性降低,从而形成沉淀^[15]。借助工具 SignalP 4.1

server 分析信号肽, 拟蕈状芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌 所示。
蛋白酶氨基酸序列信号肽分析结果分别如图 2、图 3

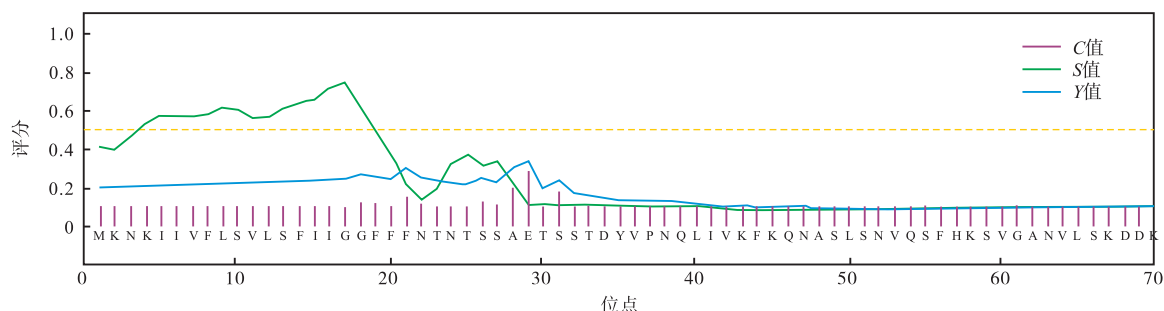


图 2 拟蕈状芽孢杆菌蛋白酶氨基酸序列信号肽分析结果

Fig. 2 Results of amino acid sequence signal peptide analysis in *Bacillus paramycoideis* protease

由图 2 可知, 在第 29 个氨基酸上是拟蕈状芽孢杆菌的角蛋白酶。氨基酸序列原始剪切位点 C 最大值和综合剪切位点 Y 最大值, 分别为 0.286、0.341; 在第 17 个氨基酸上是信号肽 S 最大值, 分值为 0.743; 平均信号肽 S 值在第 1~28 个氨基酸之间, 平均值是 0.476。图中: C 值用以对剪切位点进行有效的区分, 最高分出现在成熟蛋白第一个氨基酸残基即剪切位点后一个氨基酸; S 值用来区分相应位置是否

为信号肽区域; Y 值为 C 值和 S 值的几何平均数, 用于避免多个高分 C 值对结果的影响。综合研究来看, 存在信号肽的可能性较大, 可能为一种分泌性蛋白。继续研究后发现, 地衣芽孢杆菌角蛋白酶具有信号肽, 位点在第 29 或 30 氨基酸的位置; 铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌角蛋白酶氨基酸序列不具有信号肽的特点^[16]。

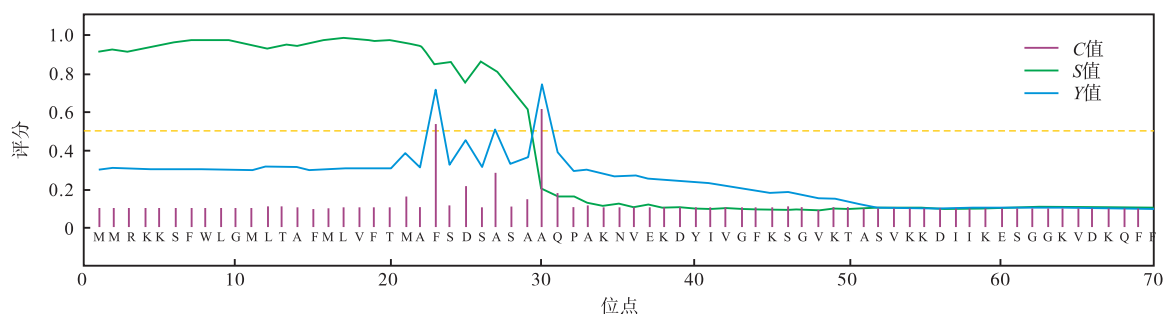


图 3 地衣芽孢杆菌蛋白酶氨基酸序列信号肽分析结果

Fig. 3 Results of amino acid sequence signal peptide analysis in *Bacillus licheniformis* protease

2.4 微生物角蛋白酶的磷酸化位点预测

磷酸化是蛋白质重要的翻译后修饰之一^[17], 是在酶催化的影响下, 向其他化合物转移磷酸基团的过程, 在传导细胞信号时该种调节方式产生的作用较为显著^[18]。通过 NetPhos 3.1 对磷酸化位点进行预测, 获得了丝氨酸等氨基酸的数据信息。以拟蕈状芽孢杆菌为例进行分析, 结果如图 4 所示。

从图 4 可知, 拟蕈状芽孢杆菌一共有 51 个磷酸化位点, 最多的一类是丝氨酸位点。在表 5 中, 通过全面的对比分析发现, 除拟蕈状芽孢杆菌外, 其余 3 个角蛋白酶的磷酸化位点不超过 50 个, 4 个角蛋白酶均为丝氨酸位点最多。

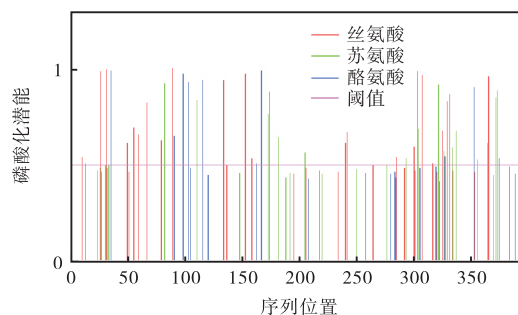


图 4 拟蕈状芽孢杆菌角蛋白酶磷酸化位点分析结果

Fig. 4 Analysis result of keratinase phosphorylation sites in *Bacillus paramycoideis*

表 5 4 种微生物蛋白酶的磷酸化位点统计
Tab. 5 Phosphorylation site statistics for four microbial proteases

微生物种类	磷酸化位点个数			总数
	丝氨酸	苏氨酸	酪氨酸	
拟蕈状芽孢杆菌	26	15	10	51
铜绿假单胞菌	23	11	5	39
地衣芽孢杆菌	24	8	5	37
枯草芽孢杆菌	31	10	6	47

3 讨 论

采用生物信息学的分析方法,研究拟蕈状芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌角蛋白酶的氨基酸序列等特点。理化性质分析结果显示,铜绿假单胞菌的等电点最低,为 6.15,其他 3 种均在 8.5 左右。脂肪指数通常用于描述蛋白质的疏水性,4 种角蛋白酶的脂肪指数都在 70~80 之间,表明它们属于稳定蛋白,不易受到溶解或变性的影响^[19]。根据氨基酸数量可知,在拟蕈状芽孢杆菌中,最丰富的氨基酸为 Ala、Ser 和 Gly。这些氨基酸在蛋白质结构和功能中扮演重要角色,它们相对丰富可能与角蛋白酶的生物活性有关^[20]。4 种角蛋白酶中亲水性氨基酸数量略高于疏水性氨基酸数量,所以 4 种角蛋白酶均属于亲水性蛋白^[21]。

由 4 种角蛋白酶的二级序列预测结果可知,无规则卷曲所占比例最高,其次为 β -折叠和 α -螺旋,4 种角蛋白酶的二级结构元件数量及比例差别不大。对 4 种角蛋白酶进行信号肽位点分析后,发现拟蕈状芽孢杆菌可能存在信号肽,且可能为分泌蛋白。地衣芽孢杆菌在第 29 或 30 个氨基酸的位置存在信号肽位点,铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌没有信号肽的存在。拟蕈状芽孢杆菌的磷酸化位点数最多,共 51 个,其中丝氨酸位点 26 个,苏氨酸位点 15 个,酪氨酸位点 10 个。磷酸化位点通常用于调控蛋白质的活性和功能^[22],因此这些结果可能有助于理解拟蕈状芽孢杆菌的蛋白质翻译后修饰和功能。对比 4 组数据发现,每一组数据中丝氨酸位点数最多。

不同蛋白质结构会影响酶的空间构型,酶分子通常是由氨基酸残基组成的立体网状结构,因此酶在产生折叠后会形成特殊的立体构型。不同的构型会影响酶对底物的结合程度和结合方式,直接影响酶催化反应的速度和效率。在不同蛋白质结构的影响下,酶的活性中心的性质也会有所不同。酶的活性中心是

酶分子中能够与底物结合并触发催化反应的特定部位,是酶催化反应的关键所在。酶的活性中心的空间构型受到蛋白质结构的影响,不同的蛋白质结构会使酶的活性中心的构型和性质发生变化,从而影响酶的催化反应速度和效率。不同的蛋白质结构也会对酶的热稳定性和化学稳定性产生影响。酶催化反应在一定的温度 and 环境中才能进行,而酶的稳定性直接影响其不同环境中的生存能力。如果蛋白质结构不稳定,酶长时间暴露于高温或其他恶劣环境中容易失活或降解,导致酶催化反应的速率和效率降低。

角蛋白酶的特殊结构特征、理化性质等有助于其对角蛋白这种复杂结构蛋白质的降解,陆地来源的两个氨基酸序列与海洋来源的两个氨基酸序列在二级结构方面有些许不同,这可能是海洋菌适应海洋环境的一种特征。当前,基因工程呈现出良好的发展前景,在对蛋白质结构等特点进行研究的过程中,为了对角蛋白酶进行异源表达,通常可以借助于分子生物学手段,但是必须在对蛋白质结构及其属性有所了解的情况下进行。角蛋白酶可以提高饲料利用率,在动物饲料中添加相应角蛋白酶可以把饲料中难分解的蛋白质水解成多肽或氨基酸,提高动物对营养物质的消化率和吸收率,合理利用生物资源而减少羽毛废物的大量堆积。在 21 日龄和 42 日龄时,添加 1% 的角蛋白酶实验组肉鸡的饲料转化系数较空白组有相应提高,角蛋白酶能有效提高肉鸡对饲料的利用率,提高肉鸡的生长速度^[22],因此将角蛋白酶作为饲料添加剂用于提高饲料的利用率具有广阔前景。角蛋白酶可降解羽毛、被毛,蒋彪^[23]以羽毛为唯一碳氮源筛选到一株高产角蛋白酶的菌株 CJPE209,该菌株有降解羽毛的能力,同时产生可溶性氨基氮,可以将其降解产物作为饲料添加剂用于动物饲料。薛敏等^[24]研究角蛋白酶产品对异育银鲫摄食低鱼粉低蛋白饲料时生长性能和体内大豆抗原蛋白的消除作用。这些菌株的发现为畜禽业羽毛废物的处理以及饲料工业提供了良好的技术支撑,为工业发展解决了技术难题。角蛋白酶可以降解饲料中难被分解的大分子蛋白,从而提高饲料的生物学利用率,角蛋白酶越来越多地被应用于降解畜禽饲料成分中的抗营养因子。张荣飞等^[20]在实验日粮中添加 0.12% 的角蛋白酶,断奶仔猪的生长性能显著提高,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,降解了大豆中的抗原蛋白,缓解了其对肠道的过敏损伤作用,从而促进了仔猪的生长。

参考文献:

- [1] NNOLIM N E, UDENIGWE C C, OKOH A I, et al. Microbial keratinase: next generation green catalyst and prospective applications[J]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 580164.
- [2] NICKERSON W J, NOVAL J J, ROBISON R S. Keratinase: I. Properties of the enzyme conjugate elaborated by *Streptomyces fradiae*[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1963, 77: 73–86.
- [3] BACH E, DAROIT D J, CORRÊA A P F, et al. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils[J]. *Biodegradation*, 2011, 22: 1191–1201.
- [4] LO W H, TOO J R, WU J Y. Production of keratinolytic enzyme by an indigenous feather-degrading strain *Bacillus cereus* Wu2[J]. *Journal of bioscience and bio-engineering*, 2012, 114 (6): 640–647.
- [5] MACEDO A J, SILVA W O B D, GAVA R, et al. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71 (1): 594–596.
- [6] CAVELLO I, BEZUS B, CAVALITTO S. The keratinolytic bacteria *Bacillus cytotoxicus* as a source of novel proteases and feather protein hydrolysates with antioxidant activities[J]. *Journal of genetic engineering and biotechnology*, 2021, 19: 1–12.
- [7] 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]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2013, 23 (7): 1004–1014.
- [8] GOUSTEROVA A, BRAIKOVA D, GOSHEV I, et al. 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.
- [9] KANG D R, HERSCHEND J, AL-SOUD W A, et al. Enrichment and characterization of an environmental microbial consortium displaying efficient keratinolytic activity[J]. *Bioresource technology*, 2018, 270: 303–310.
- [10] 黄艳. 厌氧角蛋白降解菌 KD-1 的系统发育分析及其角蛋白酶研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 13–18.
- [11] 关猛猛, 韩玉婷, 鱼红闪. 微生物源蛋白酶筛选及调控技术研究进展[J]. *饲料研究*, 2022, 45 (22): 153–156.
- [12] NIE L, ZHANG R J, ZHANG L F, et al. Mutations in the regulatory regions result in increased streptomycin resistance and keratinase synthesis in *Bacillus thuringiensis*[J]. *Archives of microbiology*, 2021, 203 (9): 5387–5396.
- [13] 栗学清, 庞鑫, 高慧芳, 等. *Rheinheimera* sp. QH 胞外角蛋白酶 KerQH2 的生物信息学分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 43 (9): 125–130.
- [14] PAN J Y, WANG G L, NONG J L, et al. Biodegradation of benzo(a)pyrene by a genetically engineered *Bacillus licheniformis*: degradation, metabolic pathway and toxicity analysis[J]. *Chemical engineering journal*, 2023, 478: 147478.
- [15] 骆东伟, 陈杰, 刘娟. 蛋白质二级结构预测方法初探[J]. *生物技术世界*, 2014 (11): 225.
- [16] 章帅文, 杨勇, 李昆太. 角蛋白酶产生菌及其应用研究进展[J]. *生物灾害科学*, 2019, 42 (3): 179–185.
- [17] ODETALLAH N H, WANG J J, GARLICH J D, et al. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks[J]. *Poultry science*, 2003, 82 (4): 664–670.
- [18] AMUTHAVALLI T, RAVI C. Chicken feather degradation by keratinolytic aspergillus species isolated from feather waste dumping soil[J]. *Asian journal of microbiology biotechnology and environmental sciences*, 2022, 24 (3): 459–467.
- [19] VERMA A, SINGH H, ANWAR S, et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential[J]. *Critical reviews in biotechnology*, 2017, 37 (4): 476–491.
- [20] 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]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013 (2): 74–75.
- [21] 黄曼, 卞科. 蛋白质疏水性测定方法研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2004 (2): 31–32.
- [22] 张雅洁, 徐丽, 程瑛, 等. 使用一种新底物优化角蛋白酶活性检测方法的研究[J]. *饲料工业*, 2018, 39 (12): 54–58.
- [23] 蒋彪. 角蛋白酶产生菌的筛选、发酵优化、酶学特性及应用[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2017: 14–20.
- [24] 薛敏, 王嘉, 陶青燕. 角蛋白酶 DP100 与 HFMR 技术对鲫鱼饲料配方中替代鱼粉效果的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2016, 52 (16): 83–86.

责任编辑: 周建军