

文冰洁,李晓霞,柯欣,等. 家禽羽毛降解菌 WYM39 的分离鉴定及其产酶特性[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):333-337.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.083

家禽羽毛降解菌 WYM39 的分离鉴定及其产酶特性

文冰洁,李晓霞,柯欣,兰新慧,贾良辉,颜华

(西北农林科技大学生命科学学院,陕西杨凌 712100)

摘要:为了丰富角蛋白降解的菌株资源,获得生长快速、产酶量高、具应用潜力的菌株,以鸡羽毛角蛋白为唯一碳氮源配制分离培养基,从 1 处鸡圈采集土样,经过初筛和复筛获得 1 株能高效降解羽毛的优势菌株,经形态观察、生理生化试验及 16S rDNA 分析,确定该菌株属于链霉菌属(*Streptomyces*)。菌株粗酶液的酶学特性试验结果表明,当反应体系中的 Ca^{2+} 浓度达到 50 $\mu\text{mol/mL}$ 或蛋白酶抑制剂 PMSF (pheylmethylsulfonyl fluoride) 为 1 mmol/mL 时,粗酶液的活性被明显抑制,表明该酶属于丝氨酸蛋白酶。该酶的最适反应温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,且经 60 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 后仍有 89% 的残留活性,表明其有在高温下应用的潜力。

关键词:家禽;羽毛;降解菌;链霉菌;分离鉴定;产酶角蛋白酶;残留活性

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0333-05

随着现代社会家禽消费量的不断增加,家禽加工厂的副产品——羽毛也在快速积累^[1]。羽毛占成熟家禽活体质量的 5%~7%^[2]。一般家禽羽毛会被倾倒,被填埋或焚烧,造成土壤、水和空气的巨大污染,羽毛的积累不仅导致环境污染,也是羽毛资源的浪费^[3]。羽毛的主要成分是角蛋白^[4],角蛋白富含二硫键^[5]和疏水侧链,使羽毛坚韧而耐化学腐

蚀^[6]。传统的降解羽毛的方法,如碱水解法和蒸汽高温高压水解法,不仅会破坏产物中的氨基酸^[7],同时消耗大量能量、造成成本高等问题^[8]。由于环保意识的增强,生物降解羽毛的方法越来越受到人们的关注^[9]。角蛋白不能被常见的蛋白水解酶如胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶等降解,但很容易被微生物产生的角蛋白酶水解^[10]。细菌、放线菌、真菌等都可以产生角蛋白酶^[11],以丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶为主,在较宽的温度范围和 pH 值范围内具有活性^[12]。角蛋白酶作为特殊的酶,不仅可以用于饲料和肥料产业,还可扩展到洗涤剂产业、皮革工业和医药行业^[4]。此外,角蛋白酶能灭活朊病毒,在此方面有应用潜力^[13]。为了丰富角蛋白降解的菌株资源,提供生长快速、产酶量高、具应用潜力的菌株,同时拓展角蛋白酶的获得来源,为发现更高效的角蛋白酶奠定基

收稿日期:2018-03-16

基金项目:陕西省农业科技创新与攻关项目(编号:2015NY066)。

作者简介:文冰洁(1994—),女,湖南桑植人,硕士,主要从事微生物分离鉴定及微生物分子遗传研究。E-mail:wbjxfsh@foxmail.com。

通信作者:颜华,博士,副教授,主要从事微生物资源开发与利用方面的研究。E-mail:yanh99@gmail.com。

18714-18718.

[16] Crossnoe C R, Germanas J P, Lemagueres P, et al. The crystal structure of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin provides insight into metronidazole activation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 318 (2): 503-518.

[17] Lockerby D L, Rabin H R, Bryan L E, et al. Ferredoxin-linked reduction of metronidazole in *Clostridium pasteurianum* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984, 26(5): 665-669.

[18] Thauer R K, Kaster A K, Seedorf H A, et al. *Methanogenic archaea*: ecologically relevant differences in energy conservation[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 579-591.

[19] Kaster A K, Moll J, Parey K, et al. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(7): 2981-2986.

[20] Costa K C, Wong P M, Wang T S, et al. Protein complexing in a methanogen suggests electron bifurcation and electron delivery from formate to heterodisulfide reductase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (24): 11050-11055.

[21] Li X H, Telser J, Kunz R C, et al. Observation of organometallic and radical intermediates formed during the reaction of methyl-coenzyme M reductase with bromoethanesulfonate[J]. *Biochemistry*, 2010, 49 (32): 6866-6876.

[22] Rospert S, Bocher R, Albracht S P, et al. Methyl-coenzyme M reductase preparations with high specific activity from H_2 -preincubated cells of *Methanobacterium thermoautotrophicum* [J]. *FEBS Letters*, 1991, 291(2): 371-375.

[23] Gunsalus R P, Wolfe R S. Stimulation of CO_2 reduction to methane by methylcoenzyme M in extracts *Methanobacterium* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1977, 76(3): 790-795.

[24] Rouviere P E, Wolfe R S. Novel biochemistry of methanogenesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(17): 7913-7916.

[25] Herrmann G, Jayamani E, Mai G, et al. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(3): 784-791.

[26] Li F L, Hinderberger J, Seedorf H, et al. Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(3): 843-850.

础,笔者采用以鸡羽毛为唯一碳氮源的分离培养基,对从 1 处鸡圈采集的土样,经初筛和复筛,选择降解效果最为突出的 1 株菌(编号为 WYM39),并对其进行 16S rDNA 分析及产酶条件和酶学特性的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 2016 年 8 月采集湖南省桑植竹林养鸡场羽毛堆积处地表 5 cm 的土壤,室内风干后储存于 4 ℃。试验于 2016 年 9 月至 2017 年 12 月在西北农林科技大学生命科学院放线菌分子生物学实验室进行。

1.1.2 培养基 羽毛粉培养基:羽毛粉 10.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, NaCl 0.5 g, KH_2PO_4 0.4 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121 ℃ 灭菌 25 min; 牛奶培养基:脱脂奶粉 5.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 115 ℃ 灭菌 20 min; 液体羽毛培养基:整根的羽毛 10.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, NaCl 0.5 g, KH_2PO_4 0.4 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121 ℃ 灭菌 25 min。

1.2 羽毛降解放线菌的分离

1.2.1 土壤样品的处理 称取 (1.0 ± 0.001) g 土样置于 80 ℃ 干热消毒箱中处理 2 h 后,将其加入处理液[酵母膏 0.6 g, 十二烷基硫酸钠(SDS) 0.005 g, 生理盐水 10 mL, 121 ℃ 灭菌 25 min], 30 ℃, 150 r/min 培养 30 min。

1.2.2 使用羽毛粉培养基进行分离及牛奶培养基初筛 将“1.2.1”节中的处理液稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 4 个梯度,取稀释后的处理液 100 μ L 分别涂布于羽毛粉培养基平板上,每个梯度设 3 个重复。将样品于 28 ℃ 倒置培养,每天观察 1 次,挑取单菌落于牛奶培养基上,通过观察有无水解圈进行初筛。

1.2.3 使用液体羽毛培养基进行复筛 将初筛的菌株进行传代、纯化,纯化后接种于具有整根羽毛的液体羽毛培养基,将具有显著降解作用的菌株保藏于 50% 甘油中。综合其生长情况,挑选 1 株生长快、降解效果好的菌株(编号为 WYM39)进行后续试验。

1.3 羽毛降解菌 WYM39 的鉴定

1.3.1 菌株形态特征扫描电镜观察 挑取菌株 WYM39 的孢子在羽毛粉培养基上划线接种,在划线处斜插入经过无菌处理的盖玻片,28 ℃ 恒温倒置培养,培养数天后用扫描电镜观察。

1.3.2 菌株 16S rDNA 测定 使用 Kirby Mix 法^[14]提取菌株 WYM39 的总 DNA,使用通用引物 F27/R1522(引物 F27 序列 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′,引物 R1522 序列 5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′)进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,简称 PCR)扩增,回收 PCR 产物连接 pMD-18T 载体,并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,选择阳性克隆,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。将菌株 WYM39 的 16S rDNA 序列在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称 NCBI)网站中进行局部对比基本检索工具(basic local alignment search tool,简称 BLAST)分析,通过 Mega 5.0,以 Neighbour-Joining 方法构建系统发育树。

1.3.3 菌株生理生化特征 菌株生长温度、最适 pH 值、

NaCl 耐受性、唯一碳源、唯一氮源、明胶液化、脲酶、淀粉水解、牛奶凝固与胨化、产 H_2S 和纤维素分解试验参照文献[15]。

1.4 羽毛降解菌 WYM39 产酶条件研究

1.4.1 酶活的测定 本试验使用酪蛋白[casein(Sigma)]作为底物进行菌株 WYM39 粗酶液的酶活测定,参照文献[16]进行酶活测定和酪氨酸标准曲线测定。定义 40 ℃ 下 1 min 每释放 1 μ g 酪氨酸,升高 1 个酶活单位。

1.4.2 培养时间对菌株 WYM39 产酶的影响 将菌株 WYM39 接种于液体羽毛培养基中,于 30 ℃、150 r/min 条件下分别培养 12、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h,以菌液上清为粗酶液测定酶活。

1.4.3 培养温度对菌株 WYM39 产酶的影响 菌株 WYM39 接种于液体羽毛培养基中,培养温度分别为 20、25、30、35、40 ℃,150 r/min 条件下培养 96 h,取粗酶液测定酶活。

1.4.4 初始 pH 值对菌株 WYM39 产酶的影响 将菌株 WYM39 接种于初始 pH 值分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的液体羽毛培养基中,于 30 ℃、150 r/min 条件下培养 96 h,取粗酶液测定酶活。

1.4.5 初始 NaCl 浓度对菌株 WYM39 产酶的影响 将菌株 WYM39 接种于初始 pH 值为 7.0,初始 NaCl 浓度分别为 0、10、20、30、40、50、60、70 mg/mL 的液体羽毛培养基中,于 30 ℃、150 r/min 条件下培养 96 h,取粗酶液测定酶活。

1.5 对菌株 WYM39 酶学特性的初步研究

1.5.1 反应温度对酶活的影响 粗酶液与底物反应时,分别设置温度为 30、40、50、60、70 ℃,测定并记录不同反应温度下的酶活。

1.5.2 反应 pH 值对酶活的影响 使用几种不同 pH 值的缓冲液配制 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的反应底物,与粗酶液混合后于最适温度下反应,测定并记录不同 pH 值对酶活的影响^[16]。

1.5.3 WYM39 粗酶液的温度稳定性 将粗酶液于 30、40、50、60、70 ℃ 条件下处理 30 min 后,在最适温度及最适 pH 值条件下测定酶活。

1.5.4 金属离子对酶活的影响 在 1 mL 粗酶液中分别加入 5、50、500、5 000 μ mol 的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ,混合后在 30 ℃ 放置 30 min 后测定酶活。

1.5.5 化学试剂对酶活的影响 在 1 mL 粗酶液中分别加入 1 mmol 苯甲基磺酰氟(PMSF)、1 mmol 乙二胺四乙酸(EDTA)、10 μ L β -巯基乙醇、10 μ g 十二烷基硫酸钠(SDS)、10 μ L 异丙醇、10 μ g 二硫苏糖醇(DTT)、10 μ L 二甲基亚砜(DMSO),混合后在 30 ℃ 放置 30 min 后测定蛋白酶活。

1.5.6 测定底物特异性 分别以可溶底物偶氮酪蛋白、酪蛋白;不可溶底物天青角蛋白、羽毛粉测定菌株 WYM39 粗酶液的酶活,不同底物的酶活测量方法参照文献[16]。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选及菌株 WYM39 角蛋白降解效果观察

将采自鸡圈地表的土样处理后稀释浓度为 10^{-4} 倍涂布于羽毛粉培养基平板上,挑取能在其上生长的单菌落接种在牛奶培养基平板上,将能够在牛奶培养基上产生明显降解圈

的菌株传代、纯化,接种于整根羽毛配制的液体羽毛培养基中,选择 1 株具有生长快、降解效果好等特点的菌株进行后续研究,将其编号为 WYM39。菌株 WYM39 在接种量为 1%、30 ℃、150 r/min 培养 4 d 时,能将 100 mL 液体羽毛培养基中的 1 g 完整羽毛完全降解(图 1)。

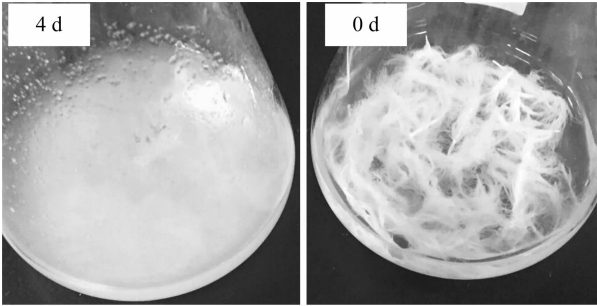


图1 菌株 WYM39 对整根羽毛的降解效果

2.2 菌株 WYM39 的形态特征

菌株 WYM39 在羽毛粉培养基上 28 ℃ 恒温培养 96 h,扫描电镜观察结果如图 2 所示,基丝无隔不断裂,直径 0.3 ~ 0.6 μm;孢子短杆状,大小 0.7 ~ 1.2 μm。在牛奶培养基上 28 ℃ 恒温培养 72 h,能观察到明显降解圈,菌落呈圆形,有白色孢子气丝,基丝黄褐色。

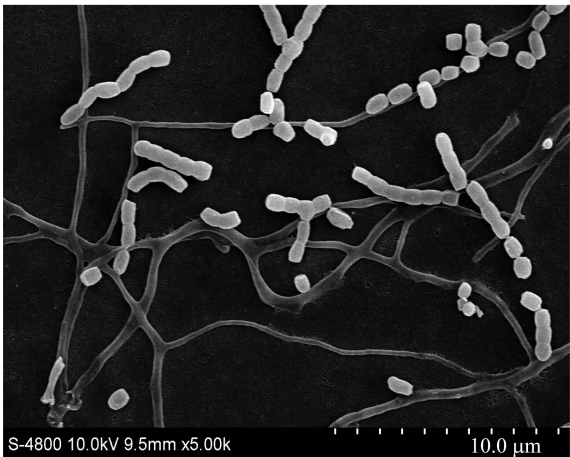


图2 菌株 WYM39 形态的电子显微镜

2.3 菌株 WYM39 的 16S rDNA 序列测定及系统发育树构建

提取菌株 WYM39 基因组 DNA 后,使用通用引物 F27/R1522 扩增得到菌株 WYM39 的 16S rDNA,进行序列测定。菌株 WYM39 的 16S rDNA 序列大小为 1 517 bp,将其在 NCBI 网站中进行 BLAST 分析,通过 Mega 5.0,以 Neighbour - Joining 方法构建系统发育树(图 3)。该菌株与中间型链霉菌 (*Streptomyces intermedius*) 的相似度最高,为 99%。

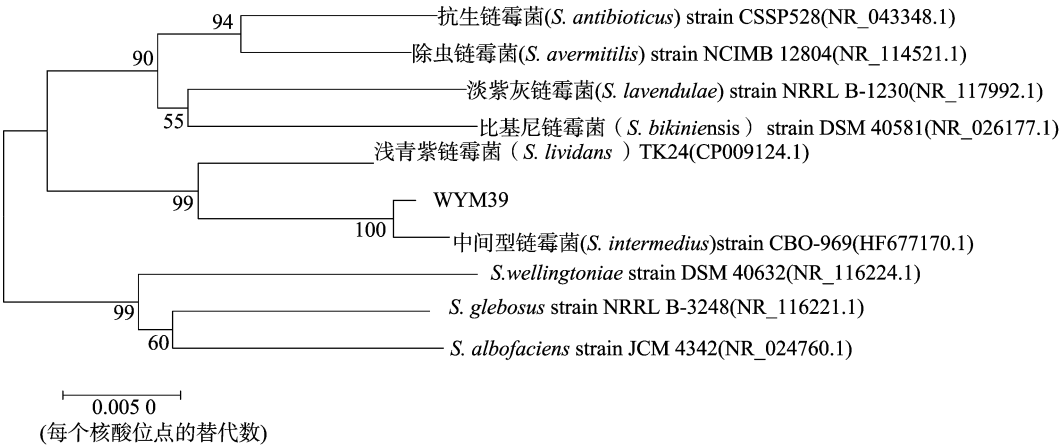


图3 菌株 WYM39 的 16S rDNA 基因系统发育树

2.4 菌株 WYM39 的生理生化特征

菌株 WYM39 不仅能利用葡萄糖等多种碳源,还能利用亮氨酸、甲硫氨酸等氮源,但不能利用天冬氨酸、谷氨酸。菌株 WYM39 可在含有 150 mg/mL NaCl 的培养基中生长,且能分解明胶、淀粉,还能使牛奶酪化,但不能降解纤维素,也不能产生脲酶和 H₂S。其具体生理生化特征见表 1。

2.5 菌株 WYM39 的产酶条件研究

2.5.1 培养时间对菌株 WYM39 产酶的影响 如图 4 所示,在培养时间为 96 h 时,酶活性出现峰值。发酵前期是菌体生长的时间,后期由于营养物质(羽毛)被耗尽,酶活性降低,因此 96 h 是研究菌株 WYM39 产酶条件合适的培养时长。

2.5.2 培养温度对菌株 WYM39 产酶的影响 如图 5 所示,在培养温度为 30 ℃ 时酶活性最高,培养温度低于 25 ℃ 或高于 35 ℃ 时,酶活性很低,说明 30 ℃ 是研究菌株 WYM39 产酶条件合适的培养温度。

表 1 菌株 WYM39 的生理生化特征

碳源	结果	氮源	结果	生理特征	结果
葡萄糖	+++	甲硫氨酸	++	H ₂ S 产生	-
蔗糖	+	酪氨酸	++	明胶分解	+
木糖	++	色氨酸	+	牛奶酪化	+
甘油	++	精氨酸	+	淀粉分解	+
纤维二糖	+	亮氨酸	+++	纤维素分解	-
乳糖	++	苯丙氨酸	+++	37 ℃	+
肌醇	+	脯氨酸	+	28 ℃	+
乙酸钠	+	赖氨酸	+	4 ℃	-
甘露醇	+++	丝氨酸	+	最适 pH 值	8
柠檬酸钠	+	缬氨酸	+	NaCl 浓度 (mg/mL)	0 ~ 150
草酸钠	+	天冬氨酸	-	尿素分解	-
阿拉伯糖	++	谷氨酸	-		
鼠李糖	+				
海藻糖	+++				

注:“-”表示阴性;“+”表示阳性。

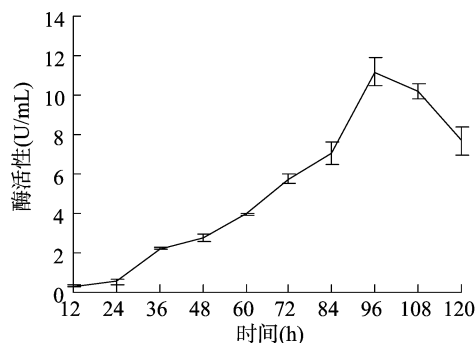


图4 培养时间对菌株 WYM39 产酶的影响

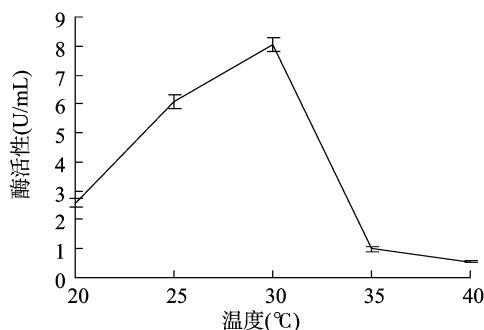


图5 培养温度对菌株 WYM39 产酶的影响

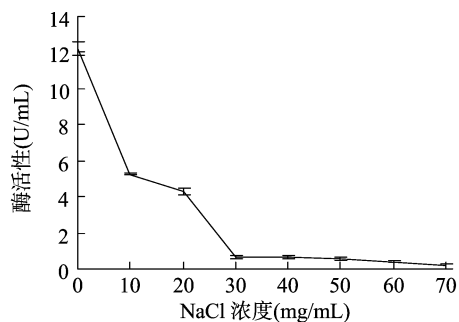


图7 初始 NaCl 浓度对菌株 WYM39 产酶的影响

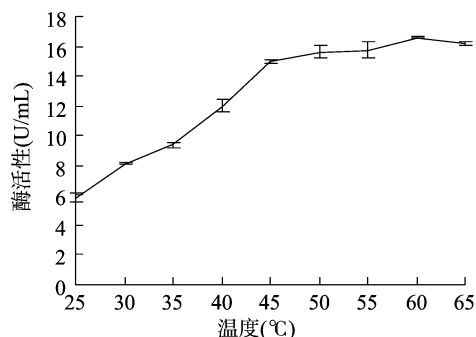


图8 反应温度对酶活的影响

2.5.3 初始 pH 值对菌株 WYM39 产酶的影响 如图 6 所示,初始 pH 值在 5.5 ~ 7.0 时,酶活性在较高水平,在初始 pH 值为 7.0 时,酶活出现峰值,因此 pH 值为 7.0 是菌株 WYM39 产酶条件研究的合适初始 pH 值。

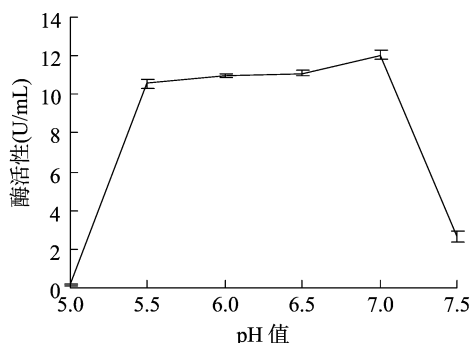


图6 初始 pH 值对菌株 WYM39 产酶的影响

2.5.4 初始 NaCl 浓度对菌株 WYM39 产酶的影响 如图 7 所示,初始 NaCl 浓度为 0 时酶活性最高,随着初始 NaCl 浓度的升高,酶活逐渐降低,当 NaCl 浓度高于 30 mg/mL 后酶活降至极低水平,结合生理生化试验结果可知,菌株 WYM39 可在含有 0 ~ 150 mg/mL NaCl 的培养基中生长,但初始 NaCl 浓度为 0 是菌株 WYM39 产酶条件研究的合适初始 NaCl 浓度。

2.6 菌株 WYM39 粗酶液酶学特性研究

2.6.1 菌株 WYM39 粗酶液最佳反应温度和温度稳定性测定 如图 8 所示,该酶最适反应温度为 60℃;温度稳定性测定试验结果如图 9 所示,该酶在 60℃ 下 30 min 后仍保存 89% 的酶活性。

2.6.2 菌株 WYM39 粗酶液最佳反应 pH 值 如图 10 所示,粗酶液在反应 pH 值为 8.0 时酶活性最高,在 pH 值为 7.5 ~ 9.0 范围内能保持 93% 的酶活性。

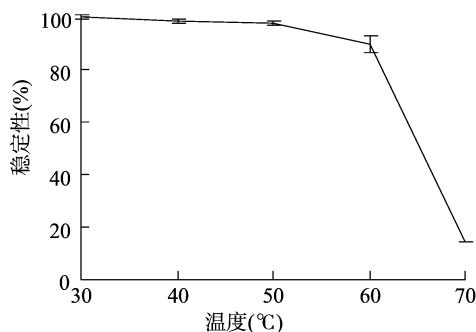


图9 粗酶液的温度稳定性

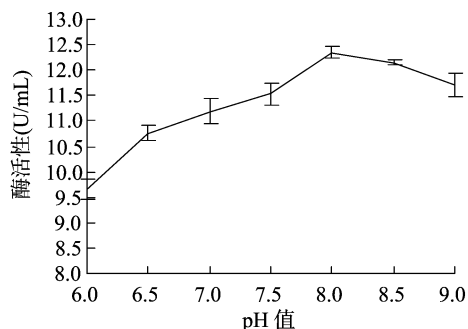


图10 反应 pH 值对酶活的影响

2.6.3 化学试剂和金属离子对菌株 WYM39 粗酶液酶活的影响 如表 2 所示,和粗酶液的酶活性相比,PMSF、EDTA 对粗酶液的酶活性具有抑制作用,而 DTT、β-巯基乙醇、异丙醇、SDS、DMSO 能够提高该酶的催化活性。

金属离子对菌株 WYM39 粗酶液影响试验结果如图 11 所示, K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 在低浓度 (5 μmol/mL) 时对粗酶液的酶活性几乎没有影响,但在高浓度 (5 000 μmol/mL) 时

表 2 化学试剂对粗酶液酶活力的影响

化学试剂	浓度	相对活性(%)
异丙醇	10 $\mu\text{L/mL}$	173 \pm 3.2
十二烷基硫酸钠	10 $\mu\text{g/mL}$	180 \pm 1.0
β -巯基乙醇	10 $\mu\text{L/mL}$	404 \pm 4.1
二甲基亚砷	10 $\mu\text{L/mL}$	176 \pm 3.7
二硫苏糖醇	10 $\mu\text{g/mL}$	395 \pm 2.7
苯甲基磺酰氟	1 mmol/mL	21 \pm 0.7
乙二胺四乙酸	1 mmol/mL	64 \pm 2.2

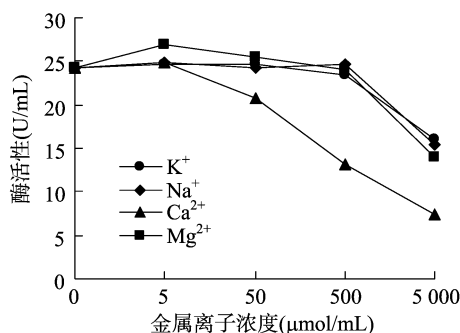


图 11 金属离子对粗酶液酶活的影响

对酶活有抑制作用,其中 Ca^{2+} 的抑制作用最强。

2.6.4 菌株 WYM39 粗酶液的底物特异性 如表 3 所示,粗酶液可以降解可溶的偶氮酪蛋白、酪蛋白,也可降解不可溶的羽毛和天青角蛋白。

表 3 不同底物对粗酶液酶活的影响

蛋白底物	酶活 (U/mL)	相对活性 (%)
酪蛋白	57.95 \pm 0.671	100
偶氮酪蛋白	116.77 \pm 0.802	201
羽毛粉	4.97 \pm 0.208	9
天青角蛋白	2.57 \pm 0.305	4

3 讨论与结论

在接种量为 1%、30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下培养时,菌株 WYM39 能在 4 d 将 100 mL 以整根羽毛为唯一碳氮源的培养基中的 1 g 羽毛完全降解,对鸡羽毛有较强的降解能力。结合形态观察、生理生化特征、16S rDNA 基因序列分析、基于 16S rDNA 基因序列构建的进化树,初步确定菌株 WYM39 为链霉菌属 (*Streptomyces*) 的 1 个菌株。当反应体系中的 Ca^{2+} 达到 50 $\mu\text{mol/mL}$ 或 PMSF 为 1 mmol/mL 时,粗酶液的活性被抑制,表明该酶属于丝氨酸蛋白酶。菌株 WYM39 的粗酶液在反应温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活最高,并在经 60 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 后仍能保存 89% 的酶活,有在高温下应用的潜力。在底物特异性试验的补充试验中发现,反应体系添加 10 $\mu\text{L/mL}$ 的 β -巯基乙醇后,降解羽毛粉和天青角蛋白时酶活分别从 4.97 和 2.57 U/mL 提升到 12.6 和 7.2 U/mL,分别提高了 1.5 和 1.8 倍,说明还原剂的存在对角质蛋白降解有重要作用。此外,本试验仅采用以羽毛为唯一碳氮源的液体培养基为发酵培养基,培养基配方单一,有通过优化培养基配方提高产酶能力的潜力。

参考文献:

- [1] Sahoo D K, Das A, Thatoi H, et al. Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167 (5): 1040 - 1051.
- [2] Nagal S, Jain P C. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers [J]. Brazilian journal of microbiology, 2010, 41 (1): 196 - 200.
- [3] Mazotto A M, de Melo A C, Macrae A, et al. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp. [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27 (6): 1355 - 1365.
- [4] Vidal L, Christen P, Coello M N. Feather degradation by *Kocuria rosea* in submerged culture [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16 (6): 551 - 554.
- [5] Bach E, Daroit D J, Correa A P, et al. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel gramnegative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils [J]. Biodegradation, 2011, 22 (6): 1191 - 1201.
- [6] Wallenberger F T, Weston N E. Natural fibers, plastics and composites [M]. Boston: Springer US, 2004: 51 - 66.
- [7] Riffel A, Brandelli A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2006, 37 (3): 395 - 399.
- [8] Jeong E J, Rhee M S, Kim G P, et al. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading bacterium, *Bacillus* sp. SH-517 [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010, 53 (1): 43 - 49.
- [9] Suntornsuk W, Suntornsuk L. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation [J]. Bioresource Technology, 2003, 86 (3): 239 - 243.
- [10] Cai C G, Chen J S, Qi J J, et al. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain [J]. Journal of Zhejiang University (Science B), 2008, 9 (9): 713 - 720.
- [11] Tork S E, Shahein Y E, El - Hakim A E, et al. Purification and partial characterization of serine - metallokeratinase from a newly isolated *Bacillus pumilus* NRC21 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 86 (42): 189 - 196.
- [12] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70 (1): 21 - 33.
- [13] 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]. Journal of Infectious Diseases, 2003, 188 (11): 1782 - 1789.
- [14] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. Practical *Streptomyces* Genetics [M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000: 161 - 210.
- [15] 安晓英. 缬草内生及根际土壤放线菌的分离鉴定及次级代谢产物生物合成基因的克隆 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015: 18 - 22.
- [16] 马怡茗. 高效降解羽毛的微白黄链霉菌 Fea-10 的分离鉴定及其角质蛋白酶基因的异源表达 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017: 69 - 70.