

王琳,魏启舜,周影,等. 细菌对废弃羽毛的降解及在可持续农业中应用[J]. 江苏农业科学,2020,48(21):40-45.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.21.007

# 细菌对废弃羽毛的降解及在可持续农业中应用

王琳,魏启舜,周影,张培,郭成宝

(江苏丘陵地区南京农业科学研究所,江苏南京 210046)

**摘要:**羽毛质量约占鸡总质量的 5%~7%,已成为家禽屠宰的主要废弃物。羽毛中 90% 以上的成分为角蛋白,可作多肽、氨基酸类有机肥来源。利用传统理化方法降解羽毛能耗大,且可造成氨基酸结构破坏。相比之下,利用角蛋白降解细菌降解羽毛高效节能、反应条件温和,具有广阔的市场前景。本文着重介绍角蛋白降解细菌种类、产酶特点以及角蛋白降解机制,角蛋白降解产物及降解细菌对植物具有抗病促生作用,废弃羽毛的生物降解及肥料化利用可促进有机农业发展、改善农业生态系统和提高土壤生物活性。

**关键词:**生物肥料;羽毛角蛋白;角蛋白降解菌;有机肥料

**中图分类号:** X172;X713 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)21-0040-06

我国目前已成为世界上第二大家禽生产国,2018 年我国家禽出栏量达到 130 亿只,根据推算产生的干羽毛量约为 130 万 t,其中江苏省家禽出栏量达 6.420 1 亿只,产生的干羽毛量约为 6.4 万 t,为避免禽流感等病害危害人们健康,全国已基本实现家禽的集中屠宰,屠宰产生的以羽毛为主的角蛋白类废弃物产量越来越大,目前只有少量优质的羽毛被服装、工艺品等行业利用,或者经理化方法处理后添加到饲料中,大多数羽毛均被废弃,而角蛋白在自然环境下降解缓慢,有时甚至造成局部的环境污染。角蛋白被认为是一种除了纤维素和几丁质

外第三大蕴藏丰富高分子化合物的资源<sup>[1]</sup>。羽毛角蛋白含量达到 90% 左右,还包含钾、钙、镁、铁、锌、铜等矿物质,是很好的蛋白质与氨基酸来源。

角蛋白有多种存在形式,包括蹄甲、鱼鳞、角、动物皮毛等,由于角蛋白结构中含有较多的二硫键且高度交联,结构非常稳定,不易在环境中降解,成为固体废物管理的一部分。传统的角蛋白处理工艺包括高温、高压和酸碱水解等,这不仅能耗大,成本高,会对环境造成二次污染,而且还会破坏部分氨基酸,从而影响角蛋白的利用率。利用产角蛋白酶的微生物或角蛋白酶对富含角蛋白的有机废弃物进行降解是一种效率高、成本低和环境友好的方式,通过生物转化羽毛废弃物形成的营养均衡易消化物质中含有氨基酸、多肽和铵离子,既可以作为动物饲料又能作为生物肥料原料。细菌产生的角蛋白酶已经在皮革工业中有了一定应用,利用产角蛋白酶的细菌对角蛋白废弃物进行降解在有机肥料产业中具有相当大的应用潜力。

收稿日期:2020-02-21

基金项目:江苏省科技项目现代农业-重点及面上项目(编号:BE2019301);国家自然科学基金青年科学基金(编号:31700099)。

作者简介:王琳(1980—),女,江苏泰州人,博士,副研究员,主要从事农业废弃物资源化利用研究。E-mail: wanglin0421nj@163.com。

通信作者:郭成宝,硕士,研究员,主要从事农业废弃物资源化利用研究。E-mail: gchengbao@163.com。

的研究[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(3):5-7.

[59]李俊仁,陈秀珍,汤小婷,等. 连作对穿心莲生长及药材质量的影响[J]. 中药新药与临床药理,2017,28(6):797-801.

[60]李珍,陈义三,陈荣珠,等. 生物炭对连作穿心莲生长的影响[J]. 福建热作科技,2019,44(4):21-24,27.

[61]雷俊勇. 玉米套种穿心莲栽培管理技术[J]. 现代农业科技,2016(12):40-41.

[62]蒙国洲. 横州镇玉米间套种穿心莲效益分析[J]. 农业与技术,2016,36(10):137-137.

[63]李寿贤. 玉米套种穿心莲高产增效栽培技术[J]. 南方农业,

2015,9(30):22-23.

[64]陆柳英,李灿荣,曾文丹,等. 木薯间作套种穿心莲高效栽培技术[J]. 热带农业科学,2016,36(2):11-13,27.

[65]黄辰昊,薛建平,王振,等. 南药大品种穿心莲无公害栽培技术体系探讨[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2018,20(11):2095-2100.

[66]邓乔华,徐友阳,丘金裕,等. 穿心莲旱地绿色栽培技术的研究[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(6):13-14.

[67]杨期和,杨和生,李姣清. 植物白花授粉的类型及其适应性进化[J]. 嘉应学院学报,2011,29(8):55-64.

## 1 细菌角蛋白酶特点

角蛋白是一种机械强度高、化学性质稳定、不溶性的硬质蛋白,根据二级结构的不同,可分为 $\alpha$ -角蛋白和 $\beta$ -角蛋白。 $\alpha$ -角蛋白是由具有螺旋构象的多肽链构成的纤维状蛋白<sup>[1-2]</sup>,其亚基间的氨基酸序列由富含 $\alpha$ 螺旋的中央棒状区和两侧的非螺旋区构成,亚基之间形成大量的二硫键; $\beta$ -角蛋白由反向平行的 $\beta$ -折叠片以平行的方式堆积而成<sup>[2]</sup>。由于内部具有高度交联的二硫键、氢键,且分子间具有相互疏水作用,角蛋白很难被一般蛋白酶如木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶等所降解<sup>[3]</sup>。

角蛋白酶是一种特殊的蛋白酶,它能够降解羽毛、蹄甲、毛发、羊毛等难溶的硬质角蛋白。这类酶对角蛋白具有较高的底物特异性。很多微生物包括细菌、真菌、放线菌都能产生角蛋白酶。产角蛋白酶的微生物广泛存在于自然界中,目前国内外已经分离筛选到很多能降解角蛋白的菌株,已报道的具有降解角蛋白能力的细菌主要来源于芽孢杆菌属,如地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)和蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)<sup>[4-7]</sup>,还有革兰氏阴性菌如嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)<sup>[8]</sup>;已报道的能降解角蛋白的放线菌主要属于马杜拉放线菌属(*Actinomyces* sp.)、链霉菌属(*Streptomyces* sp.)<sup>[9-10]</sup>。

Lin 等最早从地衣芽孢杆菌中纯化到属于 S8 蛋白酶家族的角蛋白酶<sup>[11]</sup>。早期对角蛋白酶的研究发现,大多数角蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶中的枯草杆菌蛋白酶,主要来源于芽孢杆菌属和放线菌属微生物<sup>[12]</sup>。后来也有一些金属蛋白酶中的角蛋白酶被陆续发现。来源于金黄杆菌(*Chryseobacterium* sp.) kr6 的角蛋白酶 Q1 被鉴定属于 M14 金属蛋白酶家族<sup>[13]</sup>。来源于链霉菌(*Streptomyces* sp.) 594<sup>[14]</sup>、溶杆菌(*Lysobacter* sp.) NCIMB 9497<sup>[15]</sup>、金黄杆菌(*Chryseobacterium* sp.)<sup>[16]</sup>、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) MTCC 9102<sup>[17]</sup>、微杆菌(*Microbacterium* sp.) kr10<sup>[18]</sup>和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)<sup>[19]</sup>的金属蛋白酶也能降解角蛋白,这些金属蛋白酶对金属抑制剂乙二酸四乙酸(EDTA)敏感。

角蛋白酶的特性取决于产酶微生物。大多数角蛋白酶都为胞外酶,一般为碱性或中性酶,最适反应 pH 值为 7.5~9.0,但也有少数角蛋白酶具有

极强的耐碱性<sup>[20]</sup>,部分角蛋白酶在酸性条件下具有酶解活性<sup>[17]</sup>。有些角蛋白酶有着较宽的最适反应 pH 值范围,巨大芽孢杆菌(*Bacillus megatherium*)的角蛋白酶在 pH 值为 7~11 时都具有角蛋白酶活性,但在 pH 值为 7~8 之间活性最高<sup>[21]</sup>。芽孢杆菌比如枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌的角蛋白酶最适反应温度为 40~50℃,最适 pH 值为 5~9<sup>[22]</sup>。嗜麦芽寡养单胞菌的角蛋白酶最适反应温度为 60℃,最适 pH 值为 10<sup>[23]</sup>。不同微生物来源的角蛋白酶最适反应温度差异较大,有些细菌角蛋白酶的耐热性较好,最适反应温度在 40~70℃之间,比如微白黄链霉菌(*Streptomyces albidoflavus*)、热紫链霉菌(*Streptomyces thermoviolaceus*)和 *Streptomyces gulbargensis*<sup>[24-26]</sup>;闪烁杆菌(*Fervidobacterium pennavorans*)的角蛋白酶最适反应温度为 80℃<sup>[27]</sup>;高温菌 *F. islandicum* AW-1 的角蛋白酶最适反应温度达到 100℃<sup>[28]</sup>。

## 2 羽毛角蛋白降解机制

细菌降解角蛋白是一个复杂的过程,角蛋白中含有大量的半胱氨酸残基,半胱氨酸残基中的巯基在蛋白质中属于活泼基团<sup>[29]</sup>,链间二硫键或链内二硫键是由蛋白质中不同肽链或同一肽链上不同半胱氨酸残基中的巯基形成的。二硫键不但是形成一级结构的重要化学键,同时在维持高级结构稳定中也起着重要作用,它能够巩固蛋白质的三维结构,使其正确折叠组装,保持其生物活性<sup>[30]</sup>。二硫键是动态变化的,在还原剂或还原酶等条件下可以被打开形成巯基。试验表明,蛋白质构象随着其二硫键被还原为巯基而变得疏松<sup>[29]</sup>。降解角蛋白的关键在于打开二硫键,破坏其空间结构,使其结构变得疏松,更利于与蛋白酶活性中心结合,进而将变性角蛋白水解为多肽、寡肽和游离氨基酸。

有多种不同的假设和假说试图阐明角蛋白的二硫键被微生物破坏而促进降解的机制,有部分学者认为,二硫键的打开是由于亚硫酸盐的还原作用,如 Grumbt 等认为,角蛋白的降解依赖于半胱氨酸双加氧酶和亚硫酸盐流出泵,半胱氨酸双加氧酶 CdoI 能够氧化半胱氨酸产生亚硫酸盐,亚硫酸盐可通过亚硫酸盐流出泵 SsuI 分泌出来,还原角蛋白中的二硫键,使其断裂,二硫键变性的角蛋白进一步被细胞外蛋白酶降解<sup>[31]</sup>。朱晓飞等在研究链霉菌 B221 降解羽毛角蛋白时,在发酵液中检测到亚硫酸

盐,其含量变化与酶活性、降解率、可溶性蛋白、疏基化合物的变化存在很强的相关性,表明亚硫酸盐在角蛋白降解中可能起到非常关键的作用<sup>[32]</sup>。

更多的学者倾向于复合酶降解理论。他们认为,二硫键还原酶是使角蛋白二硫键断裂的关键酶,如 Yamamura 等从 *Stenotrophomonas* sp. D-1 的胞外蛋白中纯化出 2 种蛋白,一种是蛋白酶,另外一种是具有二硫键还原功能的酶,单独的这 2 种酶不具有角蛋白降解活性,将它们混合起来后,水解角蛋白的活性提高 50 倍,说明这 2 种酶在降解角蛋白过程中具有协同增效的作用<sup>[33]</sup>。后来有文献报道从 *Bacillus* sp. MTS 和 *Bacillus halodurans* PPKS-2 的胞外酶液中分离出具有角蛋白降解功能的二硫键还原酶和丝氨酸蛋白酶,认为角蛋白酶为复合酶<sup>[34-35]</sup>。以上证据表明,二硫键还原酶与蛋白酶在降解角蛋白过程中有相互协同作用。在角蛋白底物作用下诱导产生的胞外角蛋白酶是一种复合蛋白酶,含有二硫键还原酶和多肽水解酶等多种酶活性组分,其中,二硫键还原酶是分解角蛋白的关键酶,它首先作用于角蛋白中的二硫键,使角蛋白高级结构解体形成变性角蛋白,然后变性角蛋白在多肽水解酶的作用下逐步水解成多肽、寡肽和游离氨基酸,使角蛋白彻底分解。Huang 等基于基因组学、分泌组学并结合 MS 技术研究真菌 *Onygena corvina* 蛋白酶在降解角蛋白过程中的作用,发现降解角蛋白的蛋白酶是一个多组分的酶系,共有属于 S8(内切酶)、M28(外切酶)和 M3(寡肽酶/金属蛋白酶)3 个家族的 5 种蛋白酶协同参与了角蛋白降解过程<sup>[36]</sup>。

### 3 在生物肥料中的应用

通过微生物降解羽毛生产的肥料具有有机、环境友好、安全、成本低等特点,利用这种生物肥料部分替代化肥,可减轻化肥过量使用对生态环境、人类健康带来的负面作用,符合 21 世纪可持续农业发展的需要。利用角蛋白降解菌可以将羽毛废弃物转化成养分均衡且含有氨基酸、多肽和铵离子的复合有机肥料,羽毛水解液可显著促进植物生长,提高作物品质<sup>[37-38]</sup>。有些细菌不但能产生角蛋白酶降解羽毛,同时本身也是一种植物促生细菌,能够在代谢过程中产生植物生长激素比如吡啶乙酸<sup>[39]</sup>;有些细菌具有溶磷作用,能进一步促进植物生长。

羽毛在降解过程中产生的色氨酸是植物生长

激素 IAA(生长素)的前体物质。IAA 能够促进细胞分裂、组织伸长、胚胎形成、尖端优势和侧根生长。大部分产角蛋白酶的细菌都能够产生 IAA 前体物质色氨酸。在没有添加色氨酸的羽毛培养基中,角蛋白降解细菌在降解羽毛过程中能够产生 IAA,说明羽毛降解后释放出色氨酸;如果在培养基中额外添加色氨酸,IAA 的产生量会随之增加。例如嗜麦芽窄食单胞菌在不添加色氨酸的培养基中培养时能产生 21.5  $\mu\text{g/mL}$  IAA,但如果培养基中额外添加了 0.1% 的色氨酸,IAA 的产生量能提高至 32.7  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[40]</sup>; *Chryseobacterium sediminis* 在培养基中缺失色氨酸时产生 44.4  $\mu\text{g/mL}$  IAA,而当添加色氨酸后,IAA 产生量提高至 64.26  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[41]</sup>。培养基中羽毛含量提高后,羽毛降解过程中会产生更多的色氨酸,释放到培养基中被细菌利用,从而提高 IAA 的产生量<sup>[40]</sup>。Bhange 等发现,当羽毛含量在 0.5%~2.0% 范围内时,IAA 的产生量与羽毛浓度是呈正相关关系的<sup>[42]</sup>。

尽管土壤中的磷含量很丰富,为 400~1 200 mg/kg,但是能被植物吸收有效磷含量只占总磷含量的 0.1%<sup>[43]</sup>。另外,磷肥施入土壤后会很快被固定化,或者被雨水径流冲走,大概仅有 10%~30% 的磷肥能够被植物利用<sup>[44]</sup>。角蛋白降解菌具有溶磷作用是另外一个重要的促进植物生长的优势,可促进农业的可持续生产。角蛋白降解菌枯草芽孢杆菌在优化的羽毛培养基中也能够降解无机磷,但是当羽毛含量增加到 1% 时溶磷作用显著下降<sup>[42]</sup>。溶磷细菌会产生有机酸使得培养基呈酸性,从而产生溶磷作用<sup>[45-46]</sup>,而在羽毛降解过程中,由于氨的释放,溶液中 pH 值上升,从而抑制溶磷作用。因此为了满足植物对磷元素的需求,在使用羽毛水解液作为生物肥料时要额外施加磷肥。

施用羽毛水解液能够增加土壤的持水性以及 N、C、P、K 和其他一些微量元素的含量,进而促进植物生长<sup>[47-48]</sup>,N、C 元素含量的增加能够提高植物的生物量<sup>[49]</sup>,根表面积和根须数量的增加可进一步促进植物对营养物质的吸收。有报道认为,羽毛水解液能够提高膜的通透性,促进植物从土壤中吸收养分子<sup>[49-50]</sup>。灌根或叶面喷施羽毛水解液能够提高草莓中的可溶性糖、可溶性固形物含量<sup>[38]</sup>。相较于只加羽毛水解液,在土壤中加入有溶磷作用的角蛋白降解菌悬浮液和羽毛,植物的碳氮比和矿质元素含量增加<sup>[42]</sup>。

羽毛水解液可以促进种子发芽率的提高和作物生长。盆栽条件下浇施羽毛生物降解液的处理,小白菜的叶片 SPAD 值、株高、地上部分生物量均显著高于 CK 处理,叶片 SPAD 值显著大于浇施三元素水溶复合肥(FH)的处理,株高、地上部分生物量和氮肥利用率与 FH 处理没有显著差异<sup>[37]</sup>。Paul 等研究表明,羽毛水解液能够促进孟加拉鹰嘴豆的出芽和生长,添加羽毛水解液的处理侧根数与根瘤菌数量是其他处理的 3 倍,主要是由于羽毛水解液的施用增加了土壤中可直接利用的氨基酸或营养物质浓度,促进了根表面积的提高,更有利于固氮菌在根部附着、入侵和生长,从而促进根瘤的形成<sup>[49]</sup>。

施加羽毛水解液可以增加土壤中的有益菌群数量,Paul 等认为,施加羽毛水解液的处理相比空白对照土壤中固氮菌和溶磷细菌的数量分别增加了 1.9 倍和 5.8 倍<sup>[49]</sup>,与 Rai 等的研究结果<sup>[51]</sup>一致。土壤中加入含有角蛋白降解细菌的羽毛水解液后,有益菌群数量显著增加<sup>[42]</sup>,但过量添加则会减少有益菌群的数量,可能是因为高浓度的 NaCl 会对土壤中土著微生物产生毒性<sup>[49-50]</sup>。

#### 4 农业方面其他应用

利用角蛋白降解细菌降解羽毛释放游离氨基酸的工艺在制药、饲料、可生物降解膜制作、制胶行业均可应用<sup>[12,40,52-53]</sup>。羽毛是一种很好的氨基酸来源。不同的菌降解羽毛后获得的氨基酸组分有所差异(表 1)<sup>[54-55]</sup>。羽毛粉经过微生物酶解之后营养特性提高,更利于动物吸收<sup>[56-57]</sup>。羽毛降解后产物中的营养组成类似于大豆蛋白。地衣芽孢杆菌已经在工业中被用于生产商业角蛋白酶。在含有羽毛的堆肥中添加角蛋白降解菌可起到除臭的作用,同时还能产生抗生素,抑制病原菌的产生<sup>[58]</sup>。

#### 5 总结

目前,我国农田尤其是集约化农业区,化肥过量投入现象十分普遍。过量化肥投入并未带来作物产量的同步提升,化肥(尤其是氮肥)过量施用引发了一系列环境问题,如温室气体排放量增加、水体富营养化等。来自家禽业的羽毛废弃物是很好的氮碳来源,利用角蛋白降解细菌将废弃羽毛转化为含氨基酸的肥料,替代化肥提高农作物产量和品质,有利于农业的可持续发展。

表 1 不同微生物降解羽毛培养液中游离氨基酸含量

游离氨基酸	角蛋白降解细菌浓度		
	高温放线菌 (mg/mL) <sup>[55]</sup>	嗜麦芽寡养单 胞菌 (μmol/L) <sup>[40]</sup>	解淀粉芽孢杆菌 3-2(g/kg) <sup>[59]</sup>
天冬氨酸	0.015 8	1.3	0.010
谷氨酸	0.315 3	3.5	0.095
天冬酰胺	0.439 0	1.3	0
丝氨酸	0.066 7	0.7	0.045
谷氨酰胺	0.112 2	85.2	0
组氨酸	0.018 2	270.1	0
甘氨酸	0.564 2	0.9	0.087
苏氨酸	0.078 5	2.0	0
精氨酸	0.268 4	5.7	0.021
丙氨酸	0.12 33	0.3	0.031
酪氨酸	0.182 0	0.8	0.167
半胱氨酸	0.024 5	1.7	0
缬氨酸	0.562 5	1797.7	0.251
甲硫氨酸	0.003 9	125.3	0
色氨酸	0.053 5	28.9	0
苯丙氨酸	0.220 0	0.6	0.480
异亮氨酸	0.087 1	0.9	0
亮氨酸	0.097 7	2.1	0.042
赖氨酸	0.001 7	4.2	0.080
脯氨酸	0.003 5	52.1	0

利用角蛋白降解菌降解羽毛形成一种优质的有机肥料在农业中应用,既能促进植物生长、提高作物品质,还能起到生物防治作用,是一种非常经济、环境友好的有机废弃物利用方式。利用微生物降解羽毛的产物作为肥料,既能提供有利于植物生长的大量元素 C、N 及微量元素,同时还产生促进植物细胞分裂的植物生长激素 IAA。有的角蛋白降解菌不仅具有降解羽毛的作用,同时也是一种植物益生菌,通过分泌蛋白酶抑制病原菌生长,起到生物防治的作用。因此利用角蛋白降解菌降解羽毛废弃物生产的生物有机肥料,对于农田生态、环境保护、人类健康、土壤生物活性维持起着重要作用,有利于有机农业的可持续发展。

#### 参考文献:

- [1] Mckittrick J, Chen P Y, Bodde S G, et al. The structure, functions, and mechanical properties of keratin[J]. JOM, 2012, 64(4): 449-468.
- [2] Meyers M A, Chen P Y, Lin A Y, et al. Biological materials: structure and mechanical properties[J]. Progress in Materials Science, 2008, 53(1): 1-206.

- [3] 贾如琰, 何玉凤, 王荣民, 等. 角蛋白的分子构成、提取及应用[J]. 化学通报, 2008(1): 1–6.
- [4] 刘柏宏, 张 娟, 堵国成, 等. 地衣芽孢杆菌来源角蛋白酶 N 端对活力及其热稳定性的影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1491–1497.
- [5] Rajput R, Tiwary E, Sharma R, et al. Swapping of pro – sequences between keratinases of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus*: altered substrate specificity and thermostability [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(3): 131–138.
- [6] Abdel – Naby M A, El – Refai H A, Mohammad H I. Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of keratinase from *Bacillus pumilus* FH9 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(1): 973–980.
- [7] E Silva L A D, Macedo A J, Termignoni C. Production of keratinase by *Bacillus subtilis* S14 [J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(4): 1–9.
- [8] Zhen F, Juan Z, Liu B H, et al. Cloning, heterologous expression and characterization of two keratinases from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11 – 1 [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(4): 647–654.
- [9] Habbeche A, Saoudi B, Jaouadi B, et al. Purification and biochemical characterization of a detergent – stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinolytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 117(4): 413–421.
- [10] Xie F, Chao Y, Yang X, et al. Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(1): 344–350.
- [11] Lin X, Lee C G, Casale E S, et al. Purification and characterization of a keratinase from a feather – degrading *Bacillus licheniformis* strain [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(10): 3271–3275.
- [12] Brandelli A, Daroit D J, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1735–1750.
- [13] Riffel A, Brandelli A, Bellato C D, et al. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6 [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 128(3): 693–703.
- [14] Azeredo L I, Lima M B, Coelho R R, et al. Thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 in submerged and solid – state fermentations using feather meal [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(4): 641–647.
- [15] Wang S L, Wan – Ting H, Tzu – Wen L, et al. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5679–5686.
- [16] Silveira S T, Gemelli S, Segalin J, et al. Immobilization of keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. strain kr6 on glutaraldehyde – activated chitosan [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(6): 818–825.
- [17] Balaji S, Kumar M S, Karthikeyan R, et al. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal – degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102) [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(11): 2741–2745.
- [18] Thys R S, Brandelli A. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(6): 1259–1268.
- [19] Lin H H, Yin L J, Jiang S T. Expression and purification of *Pseudomonas aeruginosa* keratinase in *Bacillus subtilis* DB104 expression system [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(17): 7779–7784.
- [20] Shinji M, Ichikawa M, Oka T, et al. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. TOA – 1 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(5): 482–489.
- [21] Park G T, Son H J. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7 – 1, a feather – degrading mesophilic bacterium [J]. Microbiological Research, 2009, 164(4): 478–485.
- [22] Kim J M, Lim W J, Suh H J. Feather – degrading *Bacillus* species from poultry waste [J]. Process Biochemistry, 2001, 37(3): 287–291.
- [23] 李光磊, 张 娟, 方 真, 等. 嗜麦芽寡养单胞菌角蛋白酶基因在毕赤酵母中的表达 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 152–160.
- [24] Bressollier P, Letourneau F, Urdaci M, et al. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2570–2576.
- [25] Chitte R R, Nalawade V K, Dey S. Keratinolytic activity from the broth of a feather – degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8 [J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 28(2): 131–136.
- [26] Production K T. Characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis* [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(5): 1868–1871.
- [27] Friedrich A B, Antranikian G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order thermotogales [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(8): 2875–2882.
- [28] Nam G W, Lee D W, Lee H S, et al. Native – feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW – 1, a newly isolated keratinase – producing thermophilic anaerobe [J]. Archives of Microbiology, 2002, 178(6): 538–547.
- [29] 徐国恒. 二硫键与蛋白质的结构 [J]. 生物学通报, 2010, 45(5): 5–7.
- [30] 仇晓燕, 崔 勤, 刘志强, 等. 蛋白质中二硫键的定位及其质谱分析 [J]. 化学进展, 2008, 20(6): 975–983.
- [31] Grumbt M, Monod M, Yamada T, et al. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump [J]. The Journal of Investigative Dermatology, 2013, 133(6): 1550–1555.

- [32] 朱晓飞, 张玲, 赵平芝, 等. 链霉菌 B221 的角蛋白降解机制初探[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 18–22.
- [33] Yamamura S, Morita Y, Hasan Q, et al. Keratin degradation; a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 294(5): 1138–1143.
- [34] Rahayu S, Syah D, Suhartono M T. Degradation of keratin by keratinase and disulfide reductase from *Bacillus* sp. MTS of Indonesian origin[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2012, 1(2): 152–158.
- [35] Prakash P J S, Characterization of extreme alkaline. Thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS – 2 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 625–633.
- [36] Huang Y H, Busk P K, Lange L. Production and characterization of keratinolytic proteases produced by *Onygena corvina* [J]. Fungal Genomics & Biology, 2015, 05(1): 119.
- [37] 魏启舜, 赵荷娟, 周影, 等. 施用羽毛生物降解液对白菜生长和基质养分的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(20): 156–159.
- [38] 魏启舜, 赵荷娟, 郭成宝, 等. 羽毛生物降解氨基酸肥对草莓生长和果实品质的影响[J]. 中国农学通报, 2019, 35(32): 46–52.
- [39] Nagarajan S, Eswaran P, Masilamani R P, et al. Chicken feather compost to promote the plant growth activity by using keratinolytic bacteria[J]. Waste and Biomass Valorization, 2018, 9(4): 531–538.
- [40] Jin – Ha J, Lee O M, Young – Dong J, et al. Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather – degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth – promoting activity [J]. Process Biochemistry, 2010, 45(10): 1738–1745.
- [41] Kshetri P, Roy S S, Sharma S K, et al. Transforming chicken feather waste into feather protein hydrolysate using a newly isolated multifaceted keratinolytic bacterium *Chryseobacterium sediminis* RCM – SSR – 7 [J]. Waste and Biomass Valorization, 2019, 10(1): 1–11.
- [42] Bhange K, Chaturvedi V, Bhatt R. Ameliorating effects of chicken feathers in plant growth promotion activity by a keratinolytic strain of *Bacillus subtilis* PF1 [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2016, 3(1): 13.
- [43] Khan M S, Zaidi A, Wani P A. Role of phosphate – solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2007, 27(1): 29–43.
- [44] 张艾明. 磷在农田土壤中的迁移转化规律及其对农业环境的影响[C]//组学大数据整合生物信息学研讨会论文集, 2017.
- [45] Rodríguez H, Gonzalez T, Goire I, et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth – promoting bacterium *Azospirillum* spp [J]. Die Naturwissenschaften, 2004, 91(11): 552–555.
- [46] Kaur G, Reddy M S. Influence of P – solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites[J]. European Journal of Soil Biology, 2014, 61: 35–40.
- [47] Sudhir K R, Mukherjee A K. Optimization for production of liquid nitrogen fertilizer from the degradation of chicken feather by iron – oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) magnetic nanoparticles coupled  $\beta$  – keratinase [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015, 4(4): 632–644.
- [48] Teale W D, Paponov I A, Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(11): 847–859.
- [49] Paul T, Halder S K, Das A, et al. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2 [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, 2(1): 50–57.
- [50] Asik B B, Turan M A, Celik H, et al. Effects of humic substances on plant growth and mineral nutrients uptake of wheat (*Triticum durum* cv. Salihli) under conditions of salinity [J]. Asian Journal of Crop Science, 2009, 1(2): 87–95.
- [51] Rai S K, Mukherjee A K. Optimization of production of an oxidant and detergent – stable alkaline  $\beta$  – keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS – S10 – II; application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry [J]. Biochemical Engineering Journal, 2011, 54(1): 47–56.
- [52] 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.
- [53] Gupta R, Sharma R, Beg Q K. Revisiting microbial keratinases; next generation proteases for sustainable biotechnology [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2013, 33(2): 216–228.
- [54] 王琳, 钱玉婷, 周影, 等. 高温放线菌 YT06 降解羽毛的研究[J]. 生物加工过程, 2018, 16(4): 49–56.
- [55] Wang L, Qian Y T, Cao Y, et al. Production and characterization of keratinolytic proteases by a chicken feather – degrading thermophilic strain, *Thermoactinomyces* sp. YT06 [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(12): 2190–2198.
- [56] Adriano B, Sala L, Kalil S J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added – value products [J]. Food Research International, 2015, 73: 3–12.
- [57] 孙旭, 刘臣炜, 张龙江, 等. 农业废弃物制备生物有机肥及其在小白菜栽培上的应用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1333–1341.
- [58] Lmpdi K. Development of an environmentally friendly biofertilizer with keratin degrading and antibiotic producing actinomycetes [J]. Actinomycetologica, 2004, 18(2): 34–42.
- [59] 周莲, 谢小林, 顾振红, 等. 解淀粉芽孢杆菌 3 – 2 发酵羽毛产氨基酸[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2511–2521.