

刘 标,陈 薇,吴迎春,等.嗜热角蛋白降解菌的分离筛选及降解特性[J].江苏农业科学,2022,50(13):226-231.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.13.034

嗜热角蛋白降解菌的分离筛选及降解特性

刘 标,陈 薇,吴迎春,喻孟元,郭照辉,刘惠知,尹红梅

(湖南省微生物研究院,湖南长沙 410009)

摘要:为获得高效降解羽毛角蛋白的嗜热微生物,提高微生物降解角蛋白的效率,利用以羽毛角蛋白为唯一碳氮源的培养基从堆肥样品中分离降解菌,并对其菌种分类、粗酶液的酶学性质及降解角蛋白机理进行研究。通过选择培养基共筛选到 5 株高温降解菌,其中,菌株 K-7 降解性能和生物安全性能最佳。结合菌株形态特征、生理生化特征及 16S rDNA 系统进化树分析,鉴定该菌株为副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*)。在含角蛋白底物培养基中,K-7 的发酵上清液可检测到较强的角蛋白酶活,但未检测到明显的二硫键还原酶活;同时,在降解过程中,产生了大量的亚硫酸盐和巯基化合物,表明亚硫酸盐裂解是角蛋白二硫键断裂的主要方式。酶学特性结果显示,粗酶液的最适反应温度为 50~70 ℃,最适反应 pH 值为 7.0~8.0,粗酶液在 80 ℃ 以下时热稳定性较好,SDS、PMSF 和 EDTA 等化学试剂对酶活有较强的抑制作用,而 DTT、 β -巯基乙醇对酶活性有显著的增强作用。研究结果扩展了副地衣芽孢杆菌的应用领域,丰富了嗜热角蛋白降解菌的菌种资源库。

关键词:嗜热角蛋白降解菌;副地衣芽孢杆菌;角蛋白酶;二硫键还原酶;亚硫酸盐

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)13-0226-06

随着畜禽养殖业快速发展,全球每年产生了数量巨大的角蛋白废弃物^[1],如动物毛发、羽毛、蹄角等,如何合理处理这些废弃物引起了人们极大关注。将角蛋白废弃物进行降解回收利用,不仅解决了生态环境污染的问题,其降解产物可广泛用于饲料工业、肥料工业、化妆品行业等领域^[2]。角蛋白中含有较多的半胱氨酸,相互之间形成大量的二硫键,性质稳定,很难被普通的蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等)水解,给资源化利用带来了不便^[3-4]。传统的降解方法包括:化学法(碱性水解法)、物理法(高温高压法、膨化法),但这些方法能耗高,可能带来二次污染,且在加工过程中会导致部分必需氨基酸损失,降低其营养价值^[5-6]。利用微生物或角蛋白酶降解角蛋白可提高降解产物的营养价值,降低能耗,是一种环境友好型的废弃

物资源化转化方式^[7-8]。目前,科研工作者已筛选获得较多角蛋白降解微生物菌株及其分泌的角蛋白酶,但绝大部分微生物来源于常温环境,热稳定性不佳。适当提高处理温度能加速角蛋白降解,嗜热菌产生的酶具有较高的热稳定性,因此在生物催化降解领域具有广阔应用前景^[9-11]。

笔者所在实验室在前期研究中从高温环境中分离到 1 株嗜热菌,以羽毛为唯一的碳氮源生长。本研究对该菌株的菌种分类、粗酶液的酶学性质及降解机理进行了初步研究,以为将来工业应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 菌株 试验菌株分离自鸡粪高温堆肥样品。
- 1.1.2 角蛋白材料 收集屠宰市场废弃的鸡毛,采用蒸馏水冲洗干净,60 ℃ 烘干至恒质量备用。羽毛粉制备:将烘干后的鸡毛粉碎,过 80 目筛后即制成羽毛粉。
- 1.1.3 培养基 (1)羽毛(粉)无机盐培养基(g/L):羽毛(粉) 10 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, NaCl 0.5 g, MgCl_2 0.1 g, pH 值 7.0。(2)牛肉膏蛋白胨培养基(g/L):牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, pH 值 7.0。(3)脱脂牛奶培养基:牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g,脱脂牛奶 10.0 g,

收稿日期:2021-08-24

基金项目:湖南省自然科学基金(编号:2020JJ5321);湖南省生猪产业技术体系规模养殖与环境控制岗位项目(编号:2020—2022);湖南省农用微生物应用工程技术研究中心建设项目。

作者简介:刘 标(1986—),男,湖南浏阳人,硕士研究生,高级工程师,主要从事农业环境微生物基础与应用研究, E-mail: 280795307@qq.com。

通信作者:尹红梅,硕士,副研究员,主要从事农业环境微生物基础研究。 E-mail: 66998902@qq.com。

pH 值 7.0。(4) 血琼脂平板, 购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 高温角蛋白降解菌的分离及筛选 (1) 初筛: 称取 10.0 g 鸡粪堆肥高温期样品置于内含 90 mL 无菌水的三角瓶中, 充分振荡混匀, 80 ℃ 水浴处理 1 h 后取 5 mL 悬液置于 100 mL 羽毛无机盐培养基中, 60 ℃ (堆肥高温期平均温度)、180 r/min 振荡培养。将培养 5 d 的菌液梯度稀释后, 涂布在羽毛粉无机盐培养基平板上培养 3~5 d, 选择能利用羽毛角蛋白为碳氮源生长的菌株, 利用四分区划线法进一步纯化出单菌落。(2) 复筛: 将初筛菌株接种至牛肉膏蛋白胨培养基中培养 24 h 制备种子液, 调节各菌株种子液的活菌数约为 2.0×10^8 CFU/mL。将各种子液以 2% 接种量分别接种到羽毛无机盐培养基中, 60 ℃、180 r/min 培养 5 d, 接种等量无菌水作为对照, 采用失质量法^[12]测定鸡羽毛的降解率。羽毛降解率 = (对照羽毛干质量 - 试验组剩余羽毛干质量) / 对照羽毛干质量 $\times 100\%$ 。(3) 菌株生物安全性初步判断: 将各降解菌株接种在血平板上培养, 观察是否有溶血圈出现, 挑选羽毛降解率较高且溶血圈为阴性的菌株作为后续试验研究对象。

1.2.2 高效降解菌株 K-7 菌种鉴定 (1) 菌株形态及生理生化特征检测: 在牛肉膏蛋白胨培养基上培养 72 h 后观察菌落形态特征, 挑取少量菌体进行显微镜观察和革兰氏染色观察。菌株生理生化试验参照《微生物学实验教程》(第 2 版) 进行^[13]。(2) 菌株分子进化树分析: 利用试剂盒提取菌株 K-7 的基因组 DNA, 采用 16S rDNA 序列通用扩增引物 27F: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3', 1492R: 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3' 进行 PCR 扩增。反应条件: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 45 s, 56 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 终止。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用胶回收试剂盒回收目的片段, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

使用 NCBI 中的 Blast 软件对测序所得序列进行同源性分析, 选取同源性较高的 16S rDNA 序列, 利用 Mega 5.0 软件中 Neighbor - Joining 法构建系统发育树, 重复取样 1 000 次进行 BootStrap 检验。

1.2.3 菌株 K-7 降解羽毛角蛋白机理初步研究

(1) 菌株 K-7 胞外酶活性分析。按照“1.2.1”节方法制备 K-7 种子液, 以 2% 接种量接种到羽毛无

机盐培养基中, 60 ℃、180 r/min 培养, 发酵液经 10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液, 即为粗酶液。分别在 1、2、3、4、5、6 d 测定角蛋白的降解率、粗酶液的胞外角蛋白酶活和胞外二硫键还原酶活性, 酶活性测定参照文献[14]中的方法进行, 酶活反应温度设为 60 ℃, pH 值为 7.0。(2) 菌株 K-7 降解羽毛角蛋白过程中含硫化合物变化。根据文献报道, 除降解酶外, 各种含硫化合物在角蛋白降解中也起到非常关键的作用^[11], 本研究对不同时期发酵上清液中的硫酸盐、亚硫酸盐和巯基化合物含量进行测定, 操作步骤参照笔者所在实验室之前报道的方法^[12]进行。

1.2.4 角蛋白酶的酶学性质研究 (1) 粗酶液最适反应温度测定。将反应温度设为 30、40、50、60、70、80 ℃, 分析不同温度对角蛋白酶活性的影响, 确定酶活性的最适反应温度。(2) pH 值对角蛋白酶活性的影响。配制 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的 Tris - HCl 缓冲液, 分析 pH 值对角蛋白酶活性的影响, 确定酶活性的最适反应 pH 值。(3) 粗酶液的热稳定性分析。将粗酶液分别置于不同温度 (60、70、80、90、100 ℃) 水浴中处理 1 h 后, 测定残余酶活性。以未经处理的初始酶液为对照, 活性设为 100%, 计算其他温度处理后相对酶活性。(4) 化学试剂对角蛋白酶活性的影响。向粗酶液中分别加入 10 mmol/L 的苯甲基磺酰氟 (PMSF)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、十二烷基磺酸钠 (SDS)、二巯基苏糖醇 (DTT)、 β - 巯基乙醇, 以未添加的反应管为对照, 酶活性设为 100%, 计算各处理组的相对酶活性。

1.3 数据分析

利用 Microsoft Excel 2003 对试验数据进行计算绘图; 利用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计学分析, 不同处理间差异显著性分析采用 One - way ANOVA 方法进行。

2 结果与分析

2.1 高温角蛋白降解菌株的分离筛选

本试验初筛获得 5 株能够以鸡羽毛为唯一碳氮源生长的耐高温菌株, 复筛结果显示, 菌株 LY-3、K-7 对羽毛的降解率分别为 92.6%、90.6%, 显著高于其他 3 株菌株 ($P < 0.05$)。血平板培养结果显示, 菌株 LY-3 菌落周围出现明显溶血圈, 而 K-7 菌落周围未出现溶血圈。结合菌株的降解能力和安全性能, 选取菌株 K-7 进行深入研究。

由图 1 可知,在以鸡羽毛为唯一碳氮源的培养基中发酵培养 48 h 后,培养基由清亮逐渐变浑浊,羽毛中的羽枝和羽轴被 K-7 完全降解,而对照组的羽毛基本未变化。利用扫描电镜对羽毛的微观结构变化进行观察,由图 2-a 可知,未接菌对照组中羽毛具有完整的羽轴、羽枝结构;接种菌株 K-7 发酵 24 h 后,羽毛表面结构变得松散,羽枝被大量降解,形成碎片(图 2-b)。

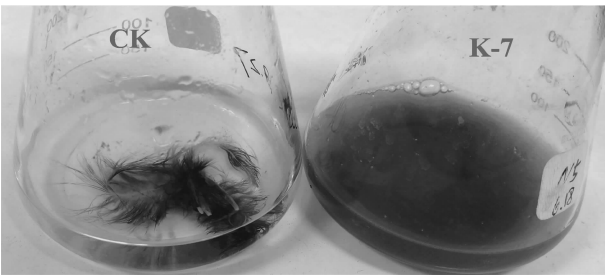


图1 菌株 K-7 的羽毛降解效果

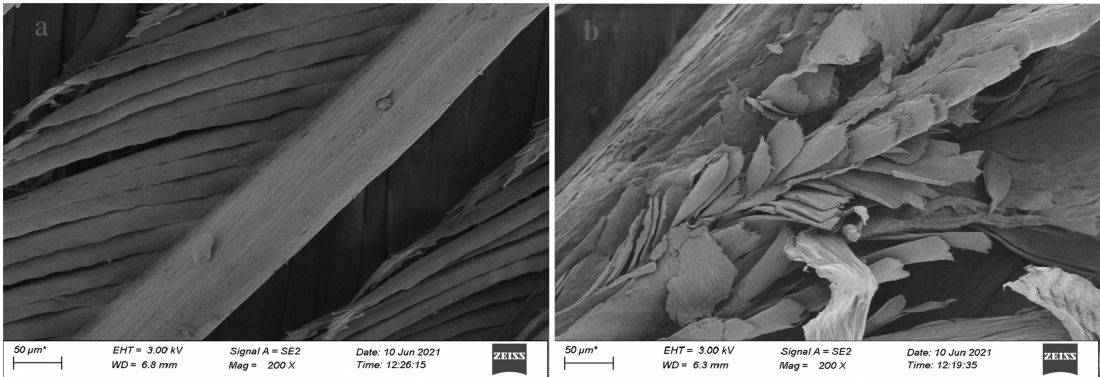


图2 菌株 K-7 降解羽毛扫描电镜观察

2.2 高效降解菌 K-7 菌种鉴定

2.2.1 形态学、生理生化特征 菌株在牛肉膏蛋白胨平板上 60 ℃ 培养 72 h 后,形成白色菌落,表面干燥,边缘不整齐。在油镜下观察,菌体呈杆状、单个

排列、有芽孢形成(图 3)。菌株 K-7 为革兰氏阳性菌,其他生理生化特征见表 1,与已报道的副地衣芽孢杆菌的生化特征相符合。

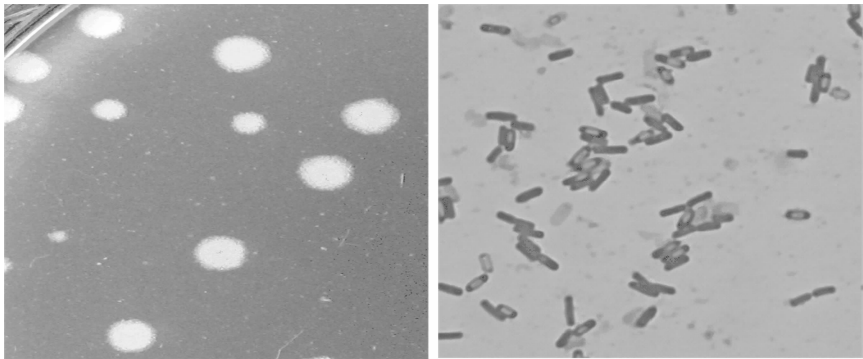


图3 菌株 K-7 菌落及显微(1 000 ×)形态特征

表 1 菌株 K-7 的生理生化特征

试验项目	结果	试验项目	结果
革兰氏染色	+	明胶液化	-
淀粉水解	+	柠檬酸盐	-
V-P 试验	+	脲酶试验	+
甲基红试验	+	蔗糖	+
4% NaCl 生长	+	葡萄糖	+
过氧化氢酶	+	麦芽糖	+
吡啉试验	-	乳糖	+

注: + 表示反应呈阳性; - 表示反应呈阴性。

2.2.2 菌株 16S rDNA 序列分析 将测序获得的

1 370 bp 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 分析,根据同源性比对结果,利用 Mega 5.0 软件构建基于 16S rDNA 序列系统进化树,由图 4 可知,菌株与 *Bacillus paralicheniformis* KJ-16 聚为一群。结合菌株形态学、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析的结果,初步将菌株 K-7 鉴定为副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*)。

2.3 *B. paralicheniformis* K-7 降解猪毛角蛋白的机理初探

根据文献报道^[11],微生物降解羽毛角蛋白主要

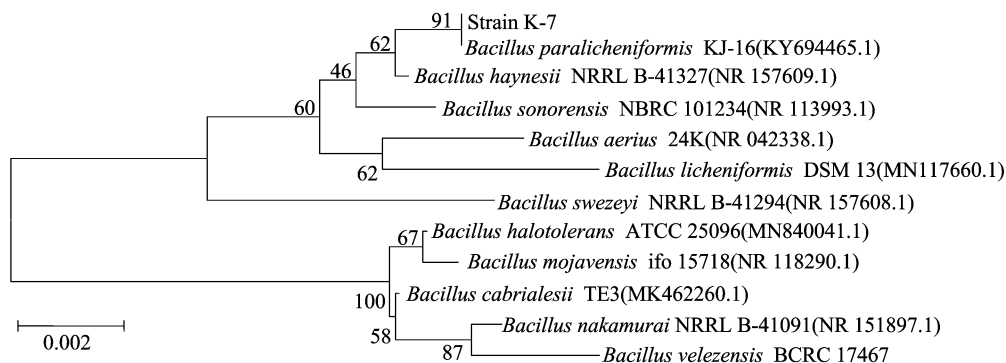


图4 菌株 K-7 基于16S rDNA 序列的系统发育树

包括 2 个步骤:二硫键断裂、变性角蛋白水解。首先,微生物主要通过分泌二硫键还原酶、分泌亚硫酸盐、菌丝体的机械作用等方式破坏二硫键;然后,变性的羽毛角蛋白可在角蛋白酶或其他蛋白酶的作用下被彻底水解。因此,本研究通过分析菌株 K-7 产酶和含硫化合物的情况,对其降解机理进行初步研究。

2.3.1 发酵液的角蛋白酶活性、二硫键还原酶活性变化 由图 5-A 可知,接种 K-7 到以羽毛角蛋白为唯一碳氮源的培养基中,羽毛角蛋白的降解率和角蛋白酶活性随着培养时间的延长而逐渐增加。角蛋白降解在前 3 d 最为迅速,这一时期,角蛋白酶活也显著增加。但是在整个发酵周期中,并未在发

酵液中检测到显著的二硫键还原酶活性,说明羽毛降解过程中二硫键的断裂是由其他途径提供的还原力。

2.3.2 菌株 K-7 降解角蛋白二硫键方式的探究

由图 5-B 可知,菌株 K-7 在降解羽毛过程中,产生了大量的巯基化合物,表明羽毛角蛋白中大量交联的二硫键被打开。巯基化合物的含量呈现出先增加后稍降低的趋势,4 d 时达最大值 $105.3 \mu\text{g/mL}$ 。羽毛降解过程中产生了大量的亚硫酸盐,同样呈现出先增加后下降趋势,5 d 时达最大值 $124.4 \mu\text{g/mL}$,且其含量变化与羽毛降解率存在极强线性相关性(相关系数为 0.916 2),表明亚硫酸盐在羽毛角蛋白降解中起着非常关键的作用。

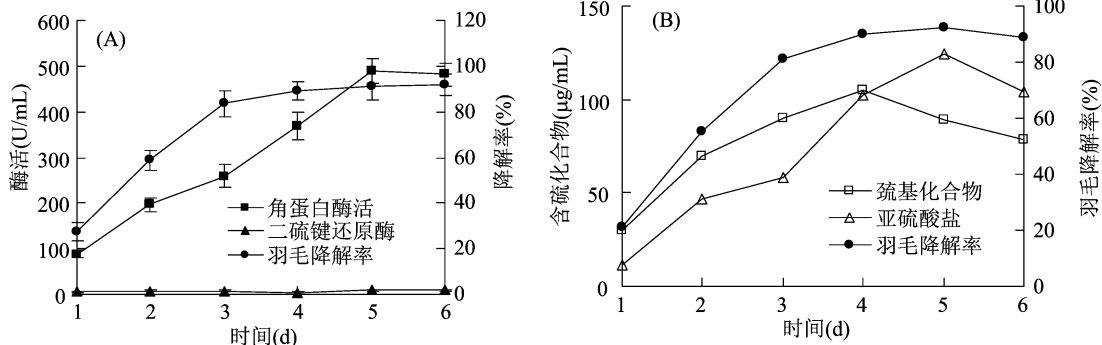


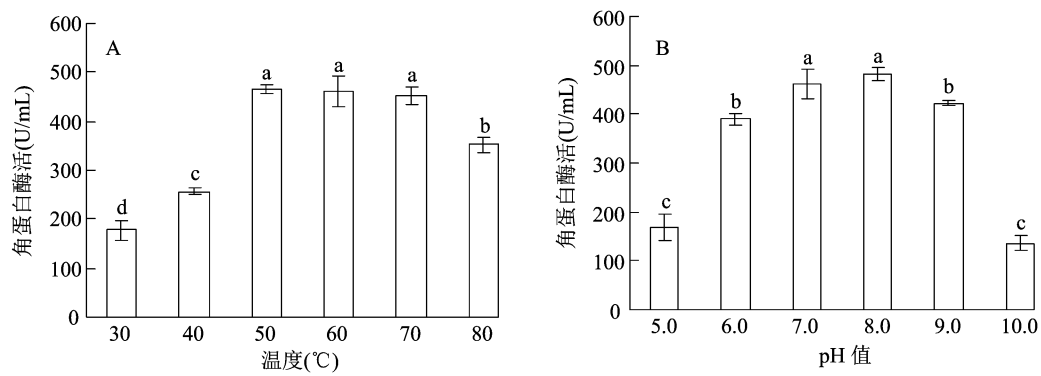
图5 菌株 K-7 降解羽毛过程中角蛋白酶、二硫键还原酶活性及含硫化合物含量的变化

2.4 B. paralicheniformis K-7 所产角蛋白酶粗酶液的酶学性质

2.4.1 粗酶液的最适反应温度和 pH 值 由图 6-A 可知,反应温度为 30、40 ℃时,粗酶液的角蛋白酶活性较低;当温度升高至 50 ℃时,酶活性显著增加,在 50~70 ℃范围内时,酶活性均可达最大值;但当反应温度设为 80 ℃时,酶活性有所降低,表明粗酶液催化角蛋白降解的最适反应温度为 50~70 ℃。由图 6-B 可知,当反应体系 pH 值在 5.0~10.0 时,粗酶液均有明显的催化活性,表明该酶能耐受

的 pH 值范围较广。当 pH 值在 7.0~8.0 时,酶活性达最大值,说明粗酶液在中性和微碱性环境中能发挥最大活力。

2.4.2 粗酶液的热稳定性 由图 7 可知,当处理温度低于 80 ℃时,对酶活性破坏较弱,相对酶活均在 80% 以上;但在 90 ℃条件下处理 1 h 后,相对酶活性降低至 56.5%。结果表明, *Bacillus paralicheniformis* K-7 所产粗酶液的热稳定性较好,可应用于羽毛等角蛋白废弃物资源化利用的高温工艺流程中。



柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)
图6 菌株 K-7 粗酶液的最适反应温度(A)及最适 pH 值(B)

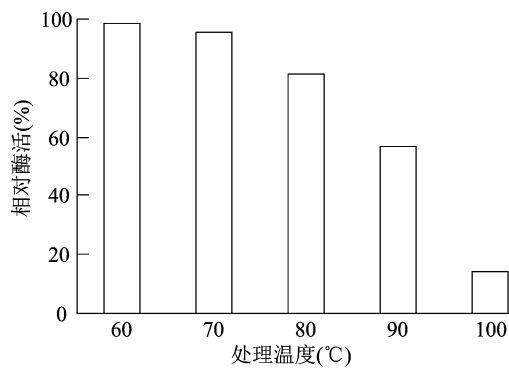


图7 粗酶液的热稳定性

2.4.3 化学试剂对粗酶液的酶活影响 由表 2 可知,SDS 可强烈抑制粗酶液的酶活力,相对酶活力仅为 11.4%,而添加蛋白酶抑制剂 PMSF 和 EDTA 也对粗酶液有不同程度的抑制作用。添加 DTT 和 β -巯基乙醇则对酶活性具有显著增强作用,相对酶活力分别达 268.4%、317.8%。

表 2 化学试剂对粗酶液酶活性影响

化学试剂	相对酶活力 (%)
PMSF	57.4 ± 4.8
EDTA	40.4 ± 3.7
SDS	11.4 ± 1.9
DTT	268.4 ± 17.5
β -巯基乙醇	317.8 ± 21.3

3 讨论

羽毛角蛋白在高温条件下结构趋于松散,更易降解,且存在生物催化降解过程中能降低致病菌污染的可能性。目前,已报道的角蛋白降解菌株大部分为常温型^[15],因此发掘新的嗜热降解菌可促进生物降解技术在角蛋白废弃物资源化利用方面的应用。鸡粪堆肥过程中,高温期可达 60~70℃,且堆

体中富含羽毛角蛋白原料,因此选择堆肥高温期样品作为分离源能有效分离到嗜热的角蛋白降解菌。据报道,副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*)可分泌高活性的胞外水解酶,如蛋白酶、脂肪酶、多糖水解酶,有助于降解植物性饲料中的复杂碳水化合物,提高植物性饲料的吸收利用率^[16],但尚未见该菌种用于角蛋白降解方面的报道。因此,本研究筛选到 *Bacillus paralicheniformis* K-7 丰富了高温角蛋白降解菌种资源库,在废弃角蛋白的资源化利用工程中应用前景较好。

羽毛角蛋白降解的关键步骤是断裂二硫键使角蛋白变性。基于已有报道,微生物破坏二硫键的方式主要有 3 种:机械穿透裂解、二硫键还原酶裂解、亚硫酸盐裂解^[17-20]。机械穿透力破坏二硫键的现象发生在可产生菌丝体的微生物中,菌株 K-7 是细菌,不具有类似的途径;菌株 K-7 发酵液中产生了大量的巯基化合物,表明角蛋白中的二硫键确实被大量破坏,但发酵液中并未检测到高活性的二硫键还原酶,说明该菌株是通过其他方式断裂二硫键;发酵液中检测到大量的亚硫酸盐,且其含量的变化与角蛋白的降解率呈较强的正相关性,因此,初步判断亚硫酸盐裂解是菌株 K-7 断裂二硫键的主要方式。微生物可将羽毛中的半胱氨酸代谢成亚硫酸盐,这个转化过程需要半胱氨酸双加氧酶(Cdo1)和天冬氨酸转氨酶(Ast1)的参与^[21],下一步试验拟构建 Cdo1、Ast1 编码基因缺失的突变菌株,分析突变株降解羽毛角蛋白的能力变化,从而进一步明确菌株 K-7 的角蛋白降解机制。

在未经优化的发酵培养条件下, *Bacillus paralicheniformis* K-7 的粗酶液酶活可达 500 U/mL,高于绝大部分已报道的角蛋白降解菌株^[9-10]。酶学性质分析结果显示,粗酶液的最适反应 pH 值为

7.0~8.0,这主要是由于亚硫酸盐在中性至微碱性环境中还原二硫键的能力最强^[22]。PMSF 是常见的丝氨酸蛋白酶抑制剂,菌株 K-7 的酶活可被抑制,说明其产生的蛋白水解酶可能属于丝氨酸蛋白酶类;在不同的微生物菌株种,SDS 对酶活性的影响完全不同,本研究中 SDS 可显著抑制酶活,这与 *Bacillus subtilis* GZD-23 报道一致^[23];DTT、 β -巯基乙醇是常见的还原剂,能够催化断裂二硫键,因此对酶活性有显著的增强作用。

4 结论

本研究利用选择培养基从鸡粪高温堆肥期样品中分离获得 1 株嗜高温的高效角蛋白降解菌株 K-7,对羽毛角蛋白的降解率可达 90% 以上。结合菌株形态学、生理生化特征及 16S rDNA 系统进化分析结果,初步鉴定该菌株为副地衣芽孢杆菌 (*Bacillus paralicheniformis*)。

在含羽毛角蛋白的培养基中发酵,该菌株产生的粗酶液显示出较高的角蛋白酶活性,粗酶液的最适反应温度为 50~70℃,最适反应 pH 值为 7.0~8.0;粗酶液热稳定较好,在 80℃ 以下时酶活较为稳定;SDS、PMSF 和 EDTA 等化学试剂对酶活有较强的抑制作用,而 DTT、 β -巯基乙醇对酶活性有显著的增强作用。

结合发酵上清液中角蛋白酶活、二硫键还原酶活、亚硫酸盐含量、巯基化合物含量分析结果,初步分析其降解机制为:菌株 K-7 分泌的亚硫酸盐提供还原力破坏羽毛角蛋白中的二硫键,变性后的角蛋白在胞外蛋白酶作用下进一步被彻底分解。

参考文献:

- [1] Li Z L, Reimer C, Picard M, et al. Characterization of chicken feather biocarbon for use in sustainable biocomposites [J]. *Frontiers in Materials*, 2020, 7:3.
- [2] Callegaro K, Brandelli A, Daroit D J. Beyond plucking: feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates [J]. *Waste Management*, 2019, 95:399–415.
- [3] Ferraro V, Anton M, Santé - Lhoutellier V. The “sisters” α - helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by - products: Functionality, bioactivity and trends of application [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 51:65–75.
- [4] Gupta R, Rajput R, Sharma R, et al. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23):9931–9940.
- [5] Shavandi A, Silva T H, Bekhit A A, et al. Keratin: dissolution,

- extraction and biomedical application [J]. *Biomaterials Science*, 2017, 5(9):1699–1735.
- [6] Sharma R, Devi S. Versatility and commercial status of microbial keratinases: a review [J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2018, 17(1):19–45.
- [7] 杜东霞,孔利华,刘惠知,等. 高效降解猪毛角蛋白菌群构建及其降解效果研究[J]. *农业资源与环境学报*, 2020, 37(6):1009–1015.
- [8] 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.
- [9] Vidmar B, Vodovnik M. Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological applications [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2018, 56(3):312–328.
- [10] Li Q X. Progress in microbial degradation of feather waste [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10:2717.
- [11] Qiu J W, Wilkens C, Barrett K, et al. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function [J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 44:107607.
- [12] 刘 标,尹红梅,刘惠知. 猪毛角蛋白降解菌的分离筛选及其降解特性研究[J]. *农业工程学报*, 2019, 35(7):311–316.
- [13] 赵斌,何绍江. *微生物学实验* [M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [14] 齐志国,张铁鹰,董杰丽,等. 角蛋白降解菌分离、鉴定及其降解机制研究[J]. *饲料工业*, 2012, 33(17):19–24.
- [15] Tamreihao K, Mukherjee S, Khunjamayum R, et al. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2019, 59(1):4–13.
- [16] Dunlap C A, Kwon S W, Rooney A P, et al. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(10):3487–3492.
- [17] Rashid A, Hodgins M B, Richardson M D. An *in vitro* model of dermatophyte invasion of the human hair follicle [J]. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 1996, 34(1):37–42.
- [18] 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.
- [19] Huang Y H, Busk P K, Herbst F A, et al. Genome and secretome analyses provide insights into keratin decomposition by novel proteases from the non - pathogenic fungus *Onygena corvina* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22):9635–9649.
- [20] 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.
- [21] Takumi K, Nonaka G. Bacterial cysteine - inducible cysteine resistance systems [J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(9):1384–1392.
- [22] Kunert J. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporum gypseum*: a comparison [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1989, 29(9):597–604.
- [23] 何熙璞,周礼玮,刘 婕,等. 一株羽毛角蛋白降解菌的分离鉴定及特性研究[J]. *环境科学与技术*, 2014, 37(7):49–54.