

研究报告

一株兼具产淀粉酶活性的产角蛋白酶菌株的筛选及产酶条件的优化

陈涛华¹, 姚吉祥^{1,2}, 张春明^{1,2}, 郭胜豪¹, 孙晓东¹, 吕国忠¹, 杨红^{*1}¹ 大连民族大学 环境与资源学院, 辽宁 大连 116600² 沈阳大学 生命科学与工程学院, 辽宁 沈阳 110044

陈涛华, 姚吉祥, 张春明, 郭胜豪, 孙晓东, 吕国忠, 杨红. 一株兼具产淀粉酶活性的产角蛋白酶菌株的筛选及产酶条件的优化[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2059-2070.

CHEN Taohua, YAO Jixiang, ZHANG Chunming, GUO Shenghao, SUN Xiaodong, LYU Guozhong, YANG Hong. Screening of a keratinase- and amylase-producing strain and optimization of its fermentation conditions for enzyme production[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2059-2070.

摘要:【背景】角蛋白是广泛存在于动物羽毛、毛发及蹄(脚)中的难溶性蛋白质, 在畜牧养殖、畜禽屠宰、肉品加工、皮革加工及羊毛加工等领域会产生大量角蛋白废弃物, 对环境构成威胁, 同时也是重要的蛋白饲料来源。【目的】从鸡羽毛等废弃物中分离出产角蛋白酶的细菌菌株, 研究其对角蛋白的降解能力。【方法】采用脱脂奶粉培养基透明水解圈法进行初筛和鸡羽液体培养基角蛋白酶活测定法进行复筛。另外, 采用淀粉酶筛选培养基和液体发酵培养基初步进行产淀粉酶活性测定。【结果】从36株分离自鸡羽毛的细菌菌株中筛选出一株高产角蛋白酶的菌株CX-2, 经菌落培养观察、革兰氏染色及16S rRNA基因序列分析, 将该菌株鉴定为革状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)。通过单因素试验对发酵条件进行优化, 发现该菌株的最佳产酶条件为: 在含100 mL鸡羽液体培养基的250 mL锥形瓶中培养, 温度30 °C、pH 8.0、接种量3%、转速120 r/min, 培养36 h。在此条件下测得该菌株产角蛋白酶活性最高达274.327 U/mL。另外, 研究发现该菌株产淀粉酶活性达0.807 U/mL。【结论】本研究发现一株高产角蛋白酶并同时产淀粉酶的菌株CX-2, 为进一步研究该菌株的角蛋白酶和淀粉酶及其在角蛋白废弃物降解中的应用奠定了理论基础。

关键词: 角蛋白酶; 革状芽孢杆菌; 菌株筛选; 产酶发酵条件优化

资助项目: 国家自然科学基金(31170020, 31770025)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31170020, 31770025).

*Corresponding author. E-mail: yanghong136@dlnu.edu.cn

Received: 2024-08-26; Accepted: 2024-11-15; Published online: 2024-12-27

Screening of a keratinase- and amylase-producing strain and optimization of its fermentation conditions for enzyme production

CHEN Taohua¹, YAO Jixiang^{1,2}, ZHANG Chunming^{1,2}, GUO Shenghao¹, SUN Xiaodong¹,
LYU Guozhong¹, YANG Hong^{*1}

¹ College of Environment and Resources, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China

² College of Life Science and Bioengineering, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

Abstract: [Background] Keratin is an insoluble protein ubiquitous in animal feathers, hair, and hoofs (feet). In the fields of animal husbandry, livestock and poultry slaughtering, meat processing, leather processing, and wool processing, a large amount of keratin waste is produced, which poses a threat to the environment while being an important source of protein feed. [Objective] To isolate microbial strains producing keratinase from chicken feathers and study their keratin-degrading ability. [Methods] We employed the hydrolysis circle method in skimmed milk powder medium for preliminary screening and determined the keratinase activity of chicken feather in the liquid medium for rescreening. Additionally, we used the amylase screening medium and liquid fermentation medium to investigate the amylase-producing activity of the strain. [Results] Strain CX-2 with a high yield of keratinase was screened from 36 bacterial strains isolated from chicken feathers by flask fermentation. The strain was identified as *Bacillus mycoides* by colony observation, Gram staining, and 16S rRNA gene sequencing. The fermentation conditions were optimized by single factor experiments. The optimal fermentation conditions of the strain for enzyme production were as follows: fermentation in a 250 mL conical flask containing 100 mL chicken feather liquid medium and 3% inoculum at 30 °C, pH 8.0, and 120 r/min for 36 h. Under these conditions, the keratinase activity of the strain was up to 274.327 U/mL. In addition, the strain produced amylase with the activity of 0.807 U/mL. [Conclusion] An active keratinase- and amylase-producing bacterial strain CX-2 was discovered from chicken feather waste. The results of this paper provide a theoretical basis for further studying the keratinase and amylase of this strain and their application in keratin waste degradation.

Keywords: keratinase; *Bacillus mycoides*; strain screening; fermentation condition optimization for enzyme production

角蛋白(keratin)是一类重要的动物蛋白质,广泛存在于人类和动物的皮肤、毛发、蹄脚及羽毛等组织中^[1]。在畜禽养殖和屠宰、肉食品加工、皮革加工,以及羊毛纺织加工等生产过程中,会产生大量的动物皮、毛、脚(蹄)等富含角蛋白的废弃物^[2-8]。由于技术或成本的限制,这些资源并未得到充分的回收和利用。角蛋白的浪费不仅造成了资源的浪费,还会带来环境

问题。未经处理的角蛋白废弃物进入自然环境,可能会对土壤和水体造成污染^[9]。因此,通过筛选、寻找和利用产角蛋白酶的微生物来降解角蛋白将是一种科学、高效的方法。

角蛋白酶是一类专门降解角蛋白的酶,可用于角蛋白废弃物的处理^[10]。众所周知,蛋白酶主要来源于细菌和真菌,特别是芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[11]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[12]及诺

卡氏菌属(*Nocardia*)^[13]等细菌,已从中筛选出较多具有高产角蛋白酶活性的菌株。

角蛋白酶的活性和稳定性受多种环境因素的影响,如 pH 值、温度、金属离子等。研究表明,某些角蛋白酶在碱性条件下表现出的活性最高,并能在高温下保持稳定。例如,来自芽孢杆菌的某些角蛋白酶在 pH 9.0–11.0 和温度 50–70 °C 范围内表现出高活性^[14]。此外, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子对角蛋白酶的稳定性有显著影响,而 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 等重金属离子对其活性有抑制作用。

角蛋白酶因其作用专一性,常被用于处理羽毛、头发等含角蛋白的废弃物,并转化形成可利用的营养物质。如利用角蛋白酶可以将羽毛等废弃物转化为高营养价值的动物饲料。角蛋白酶也常用于制革、洗涤剂等产品生产,展现出优于传统化学方法的性能,同时兼具环境友好与资源高效利用的绿色优势^[15]。

近年来,大连地区禽蛋养殖业呈现快速发展的趋势,涌现了一些知名龙头企业,与之相伴的是禽羽毛等废弃物的增加。为了筛选到可降解禽羽毛角蛋白的微生物资源,本文对分离自禽羽毛的细菌菌株进行了筛选和分析试验。

1 材料与方法

1.1 样品

36 个供试细菌菌株保藏于本实验室。鸡毛粉末来自大连地区养鸡场废弃的鸡羽毛。

1.2 培养基

脱脂奶粉培养基参考文献[16]配制,牛肉膏蛋白胨培养基、鸡羽固体培养基及鸡羽液体培养基均参考文献[17]配制, LB 固体和液体培养基均参考文献[18]配制,淀粉酶筛选固体培养基和液体发酵培养基均参考文献[19]配制。

1.3 主要试剂和仪器

革兰氏染色液试剂盒,青岛海博生物技术有限公司;细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;3,5-二硝基

水杨酸、Tris-HCl 缓冲溶液、三氯乙酸,均购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

紫外分光光度计,翱艺仪器(上海)有限公司;超净工作台,上海精宏实验设备有限公司;智能人工气候箱,宁波江南仪器厂;全自动光学显微镜,卡尔蔡司光学(中国)有限公司;Eppendorf 移液器,艾本德股份公司;Thermal Cycler PCR 仪,赛默飞世尔科技公司;高压蒸汽灭菌锅, Tomy Digital Biology 公司;恒温摇床,北京诺美科技有限公司;恒温水浴锅,上海精密科学仪器有限公司。

1.4 产角蛋白酶菌株的筛选

1.4.1 固体培养基初筛

将供试细菌菌株经活化培养后接种于鸡羽固体培养基上,于 25 °C 培养 48 h,挑选产生明显水解圈的菌株转接至脱脂奶粉培养基上进行纯化培养,备复筛。

1.4.2 液体培养基复筛

将 1.4.1 所筛菌株接种到含有 25 mL 鸡羽液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,25 °C、150 r/min 振荡培养 12 h,制备种子液。随后,将种子液按 1% 的接种量转接到新的含有 25 mL 鸡羽液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,继续 25 °C、150 r/min 培养 24 h。发酵液经 8 000 r/min 离心 15 min 后用圆形定性滤纸过滤制得粗酶液,并于 4 °C 冰箱中保存。

1.5 角蛋白酶活力的测定

酶活力的测定参照冀勇良等^[20]的方法,并进行适当调整。具体步骤如下:取 2 mL Tris-HCl 缓冲溶液,依次加入 20 mg 鸡毛粉末和 1 mL 稀释(10 倍)的粗酶液,于 50 °C 恒温水浴反应 50 min,在此期间,每隔 15 min 振荡 1 次,以确保反应充分进行。反应结束后,加入 2 mL 10% 的三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)溶液以终止反应。以不加鸡毛粉末的为对照组。随后,将反应液在 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,并使用紫外可见分光光度计在 280 nm 处测定吸光度。

一个酶活单位(1 U)定义为:在波长 280 nm 下,试验组比对照组每高出 0.01 吸光值便计为 1 U。重复测量 3 次取平均值,按公式(1)计算角蛋白酶活力:

角蛋白酶活力=

$$5n \times (OD_{\text{试验组}} - OD_{\text{对照组}}) / (0.01 \times 50) \quad (1)$$

其中,样品角蛋白酶活力单位为 U/mL, n 为粗酶液的稀释倍数,5 为终反应体积(mL),50 为反应时间(min)^[14]。

1.6 菌株的鉴定

1.6.1 形态学鉴定

用移菌环挑取经初筛和复筛表现出酶活力最高的菌株 CX-2 接种到 LB 固体培养基上,在 25 °C 条件下进行平板划线培养 24 h 后,观察菌落的形态特征,并通过革兰氏染色法在显微镜下观察细菌的形态结构。

1.6.2 分子生物学鉴定

将菌株 CX-2 接种到 LB 液体培养基中,30 °C、150 r/min 振荡培养 12 h,使用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA,并经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,经稀释获得满足需要的基因组 DNA 工作液。参考文献[21]进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增,引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(25 μ L): 2 $\times$ Accurate Taq Master Mix 12.5 μ L, 引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定的 PCR 扩增产物被送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行后续的纯化和 16S rRNA 基因序列测定。将所得序列数据提交至 NCBI 的 GenBank 数据库,并获得了登录号 PQ680133。利用 BLAST 算法对序列进行比对分析,以确定菌株的分类学地位。

1.7 酶学性质的测定

种子液的制备方法如下:选择产生最高角蛋白酶活性的菌株接种至含有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,30 °C、150 r/min 培养 24 h,以获得种子液^[22]。

1.7.1 培养时间对菌株产酶活性的影响

按照 1% 的接种量将种子液接种至 pH 7.0 的装有 100 mL 鸡羽液体培养基的 250 mL 锥形瓶,30 °C、150 r/min 振荡培养 12、24、36、48、60 h,每个时间点后测量酶活性,进行 3 次重复试验。

1.7.2 转速对菌株产酶的影响

按照 1% 的接种量将种子液接种至 pH 7.0 装有 100 mL 鸡羽液体培养基的 250 mL 锥形瓶,30 °C 培养 24 h。摇床的转速设置为 60、90、120、150、180 和 210 r/min,分别测定每个转速条件下培养结束后的酶活性,设 3 次重复试验。

1.7.3 接种量对菌株产酶的影响

分别以 1%、2%、3%、4% 和 5% 的接种量将种子液接种至 pH 7.0 的装有 100 mL 鸡羽液体培养基的 250 mL 锥形瓶,30 °C、150 r/min 培养 24 h。培养完成后,对每个接种量的处理分别进行酶活性的测定,设 3 次重复试验。

1.7.4 pH 对菌株产酶的影响

用 0.5 mol/L HCl 和 0.5 mol/L NaOH 溶液调节鸡羽液体培养基 pH,分别设 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 及 10.0 共 7 个处理;按照 1% 的接种量将种子液接种至装有 100 mL 鸡羽液体培养基的 250 mL 锥形瓶,30 °C、150 r/min 培养 24 h 后分别进行酶活性的测定,设 3 次重复试验。

1.7.5 温度对菌株产酶的影响

按照 1% 的接种量将种子液接种至 pH 7.0 装有 100 mL 鸡羽液体培养基的 250 mL 锥形瓶,分别于 150 r/min 在 15、20、25、30、35 及 40 °C 的条件下培养 24 h,分别测定酶活,设 3 次重复试验^[22-25]。

1.8 产淀粉酶活力的测定

将 36 个供试细菌菌株经活化培养后接种于淀粉酶筛选固体培养基上, 28 °C 培养 3 d 后, 在平板表面喷洒 0.1% 碘-碘化钾溶液, 并平铺均匀, 待其吸附后, 挑选产生明显透明圈的菌株。淀粉酶活力的检测采用 DNS 法^[26-27]。

淀粉酶活力 DNS 法测定: 取洁净的试管, 加入 1 mL 1% 可溶性淀粉和 1 mL 淀粉酶溶液, 60 °C 水浴 10 min; 加入 2 mL DNS 试剂, 沸水浴 3–5 min; 待冷却至室温, 加入去离子水定容至 25 mL, 上下颠倒混匀后, 于 540 nm 处测溶液吸光度; 以葡萄糖浓度为横坐标, 以 OD_{540} 为纵坐标作图; 酶活计算如公式(2)所示:

$$U = \frac{N \times X}{T} \quad (2)$$

其中: X 为酶-底物反应产生的还原糖质量 (μmol); N 为酶液稀释倍数; T 为反应时间(min)。

1.9 数据处理

运用 SPSS 22 与 graphpad prism 9.5.0 软件进行单因素试验分析, 使用 Microsoft Excel 软件建立非线性回归数学模型, 并对模型进行验证, 该模型考虑了各因素之间的主次效应及因

素之间的二级交互作用。

2 结果与分析

2.1 产角蛋白酶菌株的筛选结果

经初筛, 从供试的 36 个细菌菌株中筛选出 6 个菌株产生透明圈, 表明其具有产角蛋白酶活性。经对 6 个产角蛋白酶菌株在脱脂奶粉培养基上培养 48 h 后的菌落形态观察(图 1)^[28], 将它们分别命名为菌株 CX-1、CX-2、CX-3、CX-4、CX-5 及 CX-6。根据透明圈直径与菌落直径的比例大小比较, 发现产角蛋白酶活力最高的菌株为 CX-2 (表 1)。通过液体发酵试验进行菌株复筛, 进一步证明菌株 CX-2 产角蛋白酶活性最高, 达到 165.400 U/mL。因此, 后续试验以菌株 CX-2 为研究对象。

2.2 菌株的分类地位

2.2.1 菌株形态学观察结果

菌株 CX-2 在脱脂奶粉培养基上形成的菌落呈乳白色, 不透明, 边缘不圆整, 表面不光滑、不隆起。革兰氏染色镜检显示为紫色, 为阳性, 菌体形态呈椭圆形, 大小为长 $(10.32 \pm 1.23) \mu\text{m}$ × 宽 $(1.82 \pm 0.26) \mu\text{m}$ (图 2)。

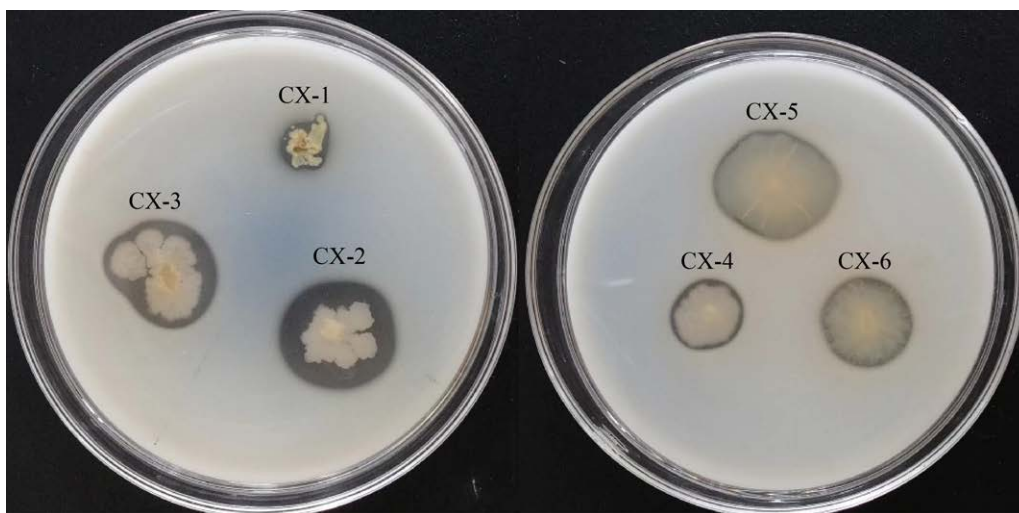


图 1 供试细菌菌株在脱脂奶粉培养基上产生的透明圈

Figure 1 The transparent circles produced by tested bacterial strains on skimmed milk medium.

表 1 透明圈与细菌菌落直径的比值及相对应酶活

Table 1 The ratio of transparent circles to colony diameter and corresponding enzyme activities

Strain screening number	Colony diameter (cm)	Diameter of transparent ring (cm)	Specific value	Protease activity (U/mL)
CX-1	0.62	0.72	1.16	114.760
CX-2	1.23	2.21	2.02	165.400
CX-3	1.42	1.82	1.49	150.820
CX-4	1.04	1.22	1.17	122.830
CX-5	2.36	2.53	1.07	111.630
CX-6	1.61	1.72	1.06	101.760

2.2.2 菌株的分子生物学鉴定结果

菌株 CX-2 经 16S rRNA 基因 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测, 获得长度为 1 500 bp 左右的条带, 经生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测得菌株 CX-2 的 16S rRNA 基因长度为 1 501 bp。通过 GenBank BLAST 搜索比对, 发现菌株 CX-2 与蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoedus*) NR_113990 的相似率达 100% (图 3)。因此, 结合菌株形态学特征, 将菌株 CX-2 鉴定为蕈状芽孢杆菌^[29]。

2.3 环境条件对菌株产角蛋白酶活性的影响

2.3.1 培养时间对菌株产酶活性的影响

菌株 CX-2 的角蛋白酶产生能力受培养时间的显著影响($P<0.05$) (图 4)。该菌株的产酶活性呈

现出随培养时间延长而先增加后减少的模式, 在培养 36 h 时, 酶活性达到峰值, 为 257.002 U/mL。从 48 h 起, 观察到酶活性开始下降。在第 60 h 时达到最低(175.270 U/mL)。分析其原因, 是因为随着培养时间的延长, 培养基内的营养物质被大量消耗以及次级代谢产物增多, 从而导致酶活降低。

2.3.2 转速对菌株产酶活性的影响

在不同摇床转速条件下, 菌株 CX-2 的产酶活性表现出显著性差异($P<0.05$) (图 5)。试验数据揭示, 当摇床转速设定为 120 r/min 时, 该菌株的产酶活性达到峰值, 为 193.337 U/mL。说明, 摇床转速的过高或过低均不利于菌株 CX-2 的角蛋白酶产生。

2.3.3 接种量对菌株产酶活性的影响

菌株 CX-2 的产酶活性受接种量的影响, 呈现出随接种量增加而先增后减的趋势(图 6)。在接种量为 3% 时, 该菌株的产酶活性达到最高, 为 186.426 U/mL。

2.3.4 pH 对菌株产酶活性的影响

不同 pH 值对菌株 CX-2 的酶活性产生了极为显著的影响($P<0.05$), 如图 7 所示。在 pH 8.0 的条件下, 该菌株的酶活性达到最高水平, 为 274.327 U/mL。然而, 当 pH 值低于 5.0 或高于 10.0 时, 菌株的酶活性显著降低, 这表明极端酸性或碱性环境不利于菌株 CX-2 的产酶活性。

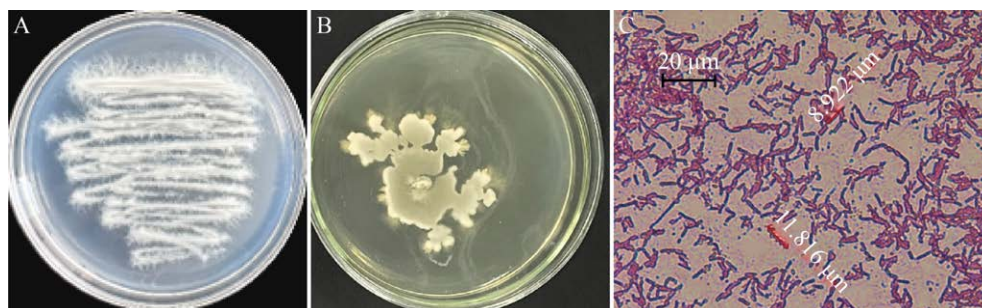


图 2 菌株 CX-2 在脱脂奶粉培养基上的菌落与革兰氏染色观察 A: 划线培养(2 d); B: 培养菌落(6 d); C: 革兰氏染色观察。

Figure 2 Colony of strain CX-2 on skimmed milk powder medium and Gram staining observation. A: Scratch culture (2 d); B: Culture colony (6 d); C: Gram staining observation.

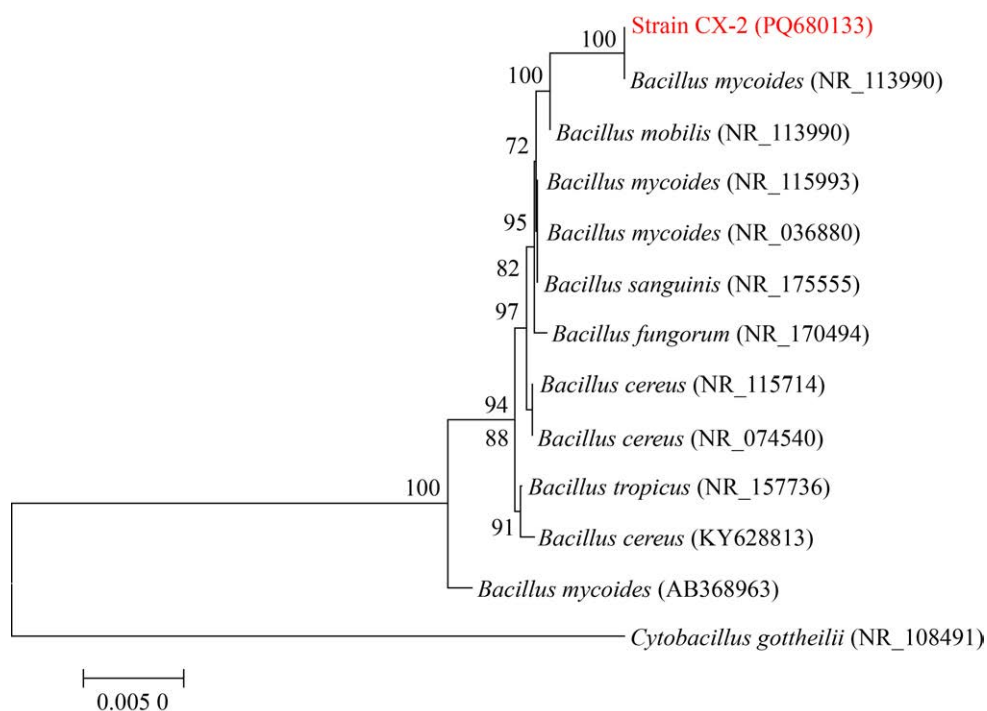


图3 基于16S rRNA基因序列构建的菌株CX-2的系统发育树 分支上的数字表示bootstrap值(1 000次重复); 括号内序号为GenBank登录号; 标尺刻度0.005 0表示序列进化分支差异。

Figure 3 Phylogenetic tree of strain CX-2 constructed based on 16S rRNA gene sequence. The number on each node represents the bootstrap value (1 000 repetitions). The serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers. Scale 0.005 0 represents sequence evolutionary branching differences.

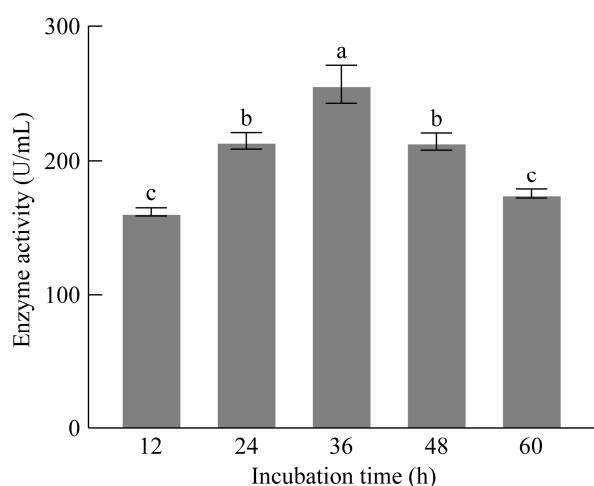


图4 蕈状芽孢杆菌CX-2在不同培养时间的酶活性 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)。下同。
Figure 4 Enzyme activity of *Bacillus mycoides* CX-2 at different incubation times. Different lowercase letters representing significant differences ($P<0.05$). The same as below.

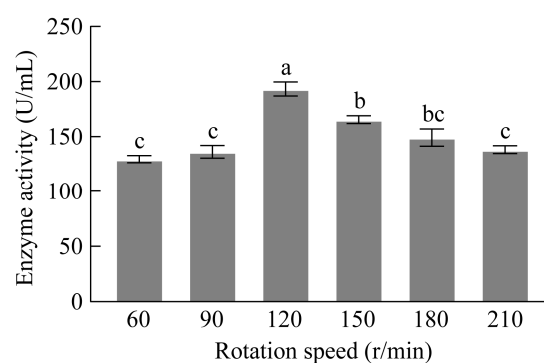


图5 蕈状芽孢杆菌CX-2在不同转速条件下的酶活性

Figure 5 Enzyme activity of *Bacillus mycoides* CX-2 at different shaking velocities.

2.3.5 温度对菌株产酶活性的影响

在不同发酵温度条件下, 菌株CX-2产角蛋白酶活性存在显著差异。在30℃时产角蛋白酶活性达到最高(268.485 U/mL)(图8), 当温度

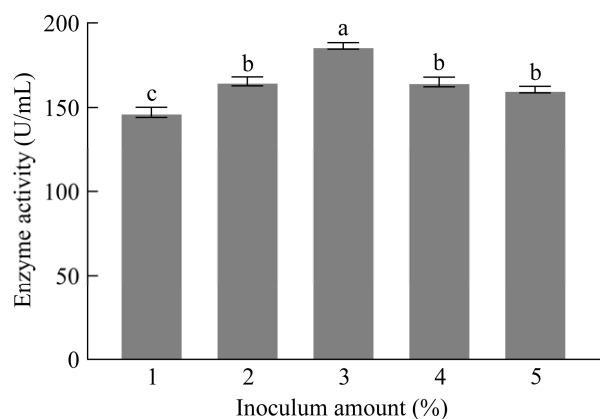


图 6 蕈状芽孢杆菌 CX-2 在不同接种量下的产酶活性

Figure 6 Enzyme activity of *Bacillus mycoides* CX-2 at different inoculum volume.

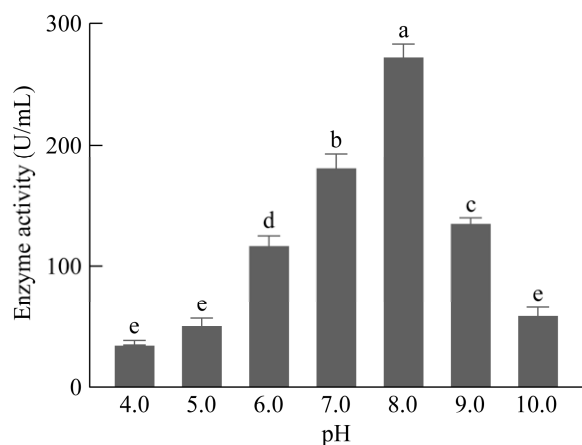


图 7 蕈状芽孢杆菌 CX-2 在不同 pH 条件下的产酶活性

Figure 7 Enzyme activity of *Bacillus mycoides* CX-2 at different pH values.

高于 30 °C 或低于 30 °C 时，产酶活性均下降，如在 15 °C 时产酶活性最低(134.520 U/mL)。该菌株产角蛋白酶活性受发酵温度影响较大。

2.4 产淀粉酶活性

菌株 CX-2 接种在淀粉酶筛选固体培养基上于 28 °C 培养 3 d 后，经 0.1% 碘-碘化钾溶液染色，发现在菌落周围产生透明圈，而其余部分呈现蓝色(图 9)。结果表明菌株 CX-2 能够产生淀粉酶。经液体发酵和 DNS 法测定淀粉酶酶活，检测其淀粉酶活为 0.807 U/mL。

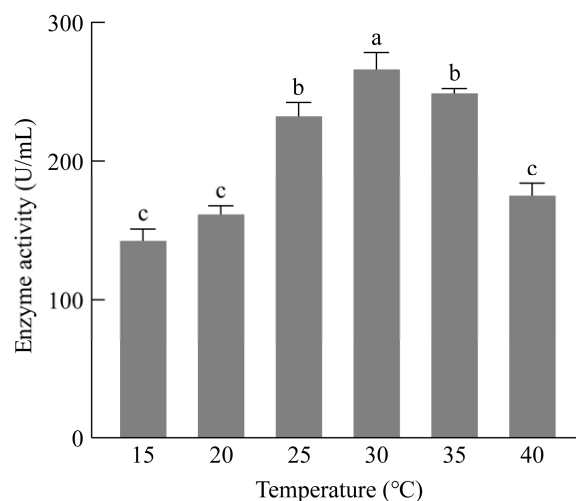


图 8 蕈状芽孢杆菌 CX-2 在不同温度下产酶活性

Figure 8 Enzyme activity of *Bacillus mycoides* CX-2 at different temperatures.

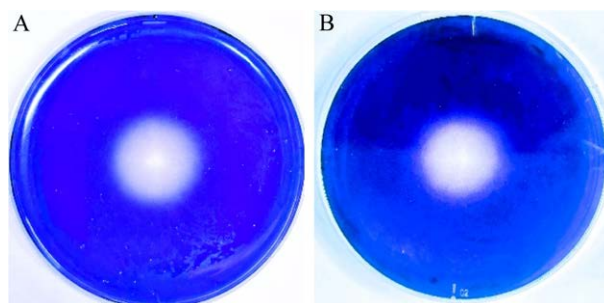


图 9 经 0.1% 碘-碘化钾溶液染色后对菌株 CX-2 产淀粉酶的透明圈观察 A: 正面; B: 反面。

Figure 9 Observation of the amylase transparent circle produced by strain CX-2 after staining with 0.1% iodine-potassium iodide. A: Upper; B: Reverse.

3 讨论

自然界中许多细菌和真菌等微生物均可产生角蛋白酶^[30]。产角蛋白酶的细菌多属于革兰氏阳性菌，包括枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)及蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)等^[29-33]。部分革兰氏阴性菌，包括弧菌属(*Vibrio*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等也能产生角蛋白酶^[34]。其中地衣芽孢杆菌是目前研究较多的产角蛋白酶的菌株^[35]。部分真菌也具有产角蛋白

酶活性,如土壤习居菌金孢子菌(*Chrysosporium articulatum*)可以生产分解天然羽毛的酶^[36],小孢子菌(*Microsporium audouinii*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)及淡紫拟青霉(*Paecilomyces purperaceae*)等也具有产生角蛋白酶的活性^[37-40]。

冀勇良等^[41]从菜市场家禽屠宰点分离到产角蛋白酶的菌株 *B. pumilus* ZW-36,采用单因素结合响应面优化方法对其产酶发酵条件进行了优化,但其产角蛋白酶的酶活仅达 57.14 U/mL。蒋彪等^[42]采用响应面法对菌株 *Bacillus* sp. CJPE209 产角蛋白酶条件进行了优化,其产酶活力达 503.5 U/mL。张红岩等^[43]从广西北海某海鸭养殖场分离的蕈状芽孢杆菌 Gxun-30 菌株,通过多种优化方法对其产角蛋白酶的发酵条件进行了优化,其酶活显著增强,达到 1 810.98 U/mL。对比上述不同菌株的产角蛋白酶活性,本研究从养鸡场废弃的鸡羽毛上获得的蕈状芽孢杆菌 CX-2 的产酶活性还有待于进一步提高。

本研究在菌株复筛时获得的高产菌株 CX-2 的角蛋白酶活性为 165.400 U/mL,但经产酶条件优化后则使角蛋白酶活性提高到 274.327 U/mL,表明通过产酶条件优化可以显著提高菌株 CX-2 的产角蛋白酶活性,同时也表明,该菌株的产角蛋白酶活性还有巨大提高潜力。本文开展了环境条件对蕈状芽孢杆菌 CX-2 产角蛋白酶活性的研究,但对最佳产角蛋白酶的营养条件还有待深入研究。

本文在开展菌株 CX-2 产角蛋白酶活性研究的基础上,对其产淀粉酶活性进行了初步筛选试验,发现该菌株不仅表现产角蛋白酶活性,而且表现产淀粉酶活性。在生物催化领域,高效表达 1 种酶的菌株比较常见,而同时表达 2 种酶的菌株比较少见,这为菌株 CX-2 的多功能应用提供了新的启发。虽然初步研究发现菌株 CX-2 的淀粉酶活性仅 0.807 U/mL,但该菌株具有产 2 种酶的特性应引起关注。刘佳慧等^[44]从

西藏林芝地区分离的蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*)通过发酵条件优化,使淀粉酶的活性从 0.79 U/mL 提升至 13.58 U/mL,显著提高了该菌株的淀粉酶活性。本研究发现的蕈状芽孢杆菌菌株 CX-2 产淀粉酶活性有进一步深挖潜力。

本文从鸡羽毛废弃物上分离获得的蕈状芽孢杆菌菌株 CX-2 既有产角蛋白酶活性,又具有产淀粉酶活性,尤其产角蛋白酶活性较高。本文仅对该菌株的产角蛋白酶活性进行了产酶条件优化,并显著提高了酶活。关于该菌株是否存在产角蛋白酶和淀粉酶的协同增效关系,以及提高产酶活性的营养条件和环境条件优化,还有待于进一步研究。

4 结论

角蛋白是动物生产中常见的蛋白质废弃物,也是具有转化为蛋白质饲料价值的生物资源。利用微生物代谢酶类对角蛋白进行生物降解是一种重要科学有效手段。本研究采用鸡羽固体培养基培养方法,从分离自养殖场鸡羽毛等废弃物样品的细菌菌株中筛选出了高产角蛋白酶活性的菌株 CX-2,经鉴定确定该菌株为蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*)。通过实验室锥形瓶液体发酵试验,证明该菌株产角蛋白酶活性明显受温度、pH、摇床转速及培养时间等环境因子的影响。另外,初步研究发现该菌株还具有产淀粉酶活性。

作者贡献声明

陈涛华: 试验方案设计, 试验具体操作, 试验数据分析, 文章撰写; 姚吉祥: 参加部分试验操作; 张春明: 参加细菌菌株分子生物学鉴定和系统发育树分析; 郭胜豪: 参加部分试验操作; 孙晓东: 仪器和设备调试及应用技术指导; 吕国忠: 项目选题、试验材料收集及试验技术指导, 指导修改论文; 杨红: 指导修正试验方案, 指导试验数据分析, 指导修改文章和帮助定稿。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 朱星潮, 李其昌, 郭君慧, 祁梅芳, 谢浩. 角蛋白酶的结构、功能及应用[J]. 生命的化学, 2023, 43(12): 1818-1825.
ZHU XC, LI QC, GUO JH, QI MF, XIE H. Structure, function and application of keratinase[J]. Chemistry of Life, 2023, 43(12): 1818-1825 (in Chinese).
- [2] 韩聪. 燕山绒山羊绒、毛性状表型分析及绒毛细度关键蛋白的筛选[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院硕士学位论文, 2024.
HAN C. Phenotypic analysis of cashmere and hair traits and screening of key proteins for cashmere fineness in Yanshan cashmere goats[D]. Qinhuangdao: Master's Thesis of Hebei Normal University of Science & Technology, 2024 (in Chinese).
- [3] 夏凤腾, 王征. 禽类羽毛废弃物的生物降解及其应用[J]. 中国家禽, 2024, 46(1): 84-89.
XIA FT, WANG Z. Biodegradation of poultry feather waste and its application[J]. China Poultry, 2024, 46(1): 84-89 (in Chinese).
- [4] 徐永富. 石墨烯改性兔毛纤维的制备及应用研究[D]. 天津: 天津工业大学硕士学位论文, 2020.
XU YF. Preparation and application of graphene modified rabbit hair fiber[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin Polytechnic University, 2020 (in Chinese).
- [5] 王伟. 蛋白质/纤维素纤维的制备及其吸湿发热性能的研究[D]. 太原: 太原理工大学硕士学位论文, 2019.
WANG W. Preparation of protein/cellulose fiber and study on its moisture absorption and heating properties[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [6] 赵鑫. 角蛋白复合阻燃整理的理论与实践[D]. 郑州: 中原工学院硕士学位论文, 2022.
ZHAO X. Theory and practice of keratin composite flame retardant finishing[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhongyuan University of Technology, 2022 (in Chinese).
- [7] 管峰, 胡馨予, 姚逸安, 石国庆, 刘守仁, 万鹏程. 生物角蛋白及其生物医学应用的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(12): 129-138.
GUAN F, HU XY, YAO YA, SHI GQ, LIU SR, WAN PC. Progress in research on biokeratin material and its medical application[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 55(12): 129-138 (in Chinese).
- [8] 冒鑫哲, 彭政, 周冠宇, 堵国成, 张娟. 枯草芽孢杆菌高产角蛋白酶发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(17): 138-144.
MAO XZ, PENG Z, ZHOU GY, DU GC, ZHANG J. Optimized fermentation for improving keratinase production by *Bacillus subtilis* WB600[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(17): 138-144 (in Chinese).
- [9] TIAN JW, XU Z, LONG XF, TIAN YQ, SHI B. High-expression keratinase by *Bacillus subtilis* SCK6 for enzymatic dehairing of goatskins[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 119-126.
- [10] KHAN A, MEHMOOD K, NADHMAN A, KHAN SU, SHAH AA, SHAH Z. Microbial production of keratinase from *Bacillus velezensis* strain MAMA: a novel enzyme for eco-friendly degradation of keratin waste[J]. Heliyon, 2024, 10(12): e32338.
- [11] NNOLIM NE, NWODO UU. *Bacillus* sp. CSK2 produced thermostable alkaline keratinase using agro-wastes: keratinolytic enzyme characterization[J]. BMC Biotechnology, 2020, 20(1): 65.
- [12] PARK G, LEE KM, LEE YS, KIM Y, JEON CM, LEE OM, KIM YJ, SON HJ. Biodegradation and valorization of feather waste using the keratinase-producing bacteria and their application in environmentally hazardous industrial processes[J]. Journal of Environmental Management, 2023, 346: 118986.
- [13] RUI MY, RIEGEL P, CARLOTTI A, BOIRON P, BERNARDIN G, MONTEIL H, WALLACE RJ Jr, CHRISTEN R. *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. nov., a new species of *Nocardia* which groups bacterial strains previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive diseases[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(1): 259-264.
- [14] 王留兄, 郑明德, 梅茹, 李璐璐, 季海波, 龚道清, 谢鹏. 鸽乳中产角蛋白酶菌株分离鉴定及酶学特征研究[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(11): 39-44.
WANG LX, ZHENG MD, MEI R, LI LL, JI HB, GONG DQ, XIE P. Isolation and identification of keratinase-producing microorganisms from pigeon milk and analysis of their enzymatic characteristics[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 55(11): 39-44 (in Chinese).
- [15] 蒋少龙, 蔡俊. 角蛋白酶及其应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 348-354, 360.
JIANG SL, CAI J. Research progress of keratinase and its application[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(6): 348-354, 360 (in Chinese).
- [16] MATIDA S. 拮抗水稻白叶枯病菌链霉菌的筛选、鉴定和防效研究[D]. 金华: 浙江师范大学硕士学位论文, 2020.
MATIDA S. Screening, identification and greenhouse biological control of *Streptomyces* sp. activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[D]. Jinhua: Master's Thesis of Zhejiang Normal University, 2020 (in Chinese).
- [17] 蔡成岗. 角蛋白酶生产菌株选育、发酵与分离纯化研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2007.
CAI CG. Breeding, fermentation, separation and purification of keratinase-producing strain[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2007 (in Chinese).
- [18] 辛皎瑜, 钟雅静, 沈启东, 敖娜, 梁玉文, 付晶, 刘春朋. 鹌鹑源大肠杆菌分离鉴定及茶多酚抑菌效果研究[J]. 东北农业大学学报, 2024, 55(7): 51-59.
XIN JY, ZHONG YJ, SHEN QD, AO N, LIANG YW, FU J, LIU CP. Study on isolation and identification of *Escherichia coli* from partridges and antibacterial effect of tea polyphenols[J]. Journal of Northeast Agricultural

- University, 2024, 55(7): 51-59 (in Chinese).
- [19] 田瑞杰. 中温大曲原核微生物群落解析及高产淀粉酶菌株的筛选与应用探究[D]. 郑州: 郑州轻工业大学硕士学位论文, 2022.
- TIAN RJ. Analysis of prokaryotic microbial community, screening and application of high amylase producing strain in medium-temperature Daqu[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University of Light Industry, 2022 (in Chinese).
- [20] 冀勇良, 刘丽英, 朱传合. 角蛋白酶酶活测定条件的研究[J]. 饲料工业, 2017, 38(6): 47-52.
- JI YL, LIU LY, ZHU CH. Study on determination condition of keratinase activity[J]. Feed Industry, 2017, 38(6): 47-52 (in Chinese).
- [21] ZHANG RX, WU ZW, CUI HY, CHAI YN, HUA CW, WANG P, LI L, YANG TY. Production of surfactant-stable keratinase from *Bacillus cereus* YQ15 and its application as detergent additive[J]. BMC Biotechnology, 2022, 22(1): 26.
- [22] 李娜, 附俊杰, 刘军, 温雪瓶, 李丽. 一株产中性蛋白酶菌株的筛选及其发酵产酶条件优化[J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 189-199.
- LI N, FU JJ, LIU J, WEN XP, LI L. Screening of A neutral protease-producing strain and optimization of fermentation conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(1): 189-199 (in Chinese).
- [23] 罗粤雯, 杨勇, 唐兵. 提高微生物角蛋白酶产量和催化性能的研究进展[J]. 生物资源, 2024, 46(3): 211-219.
- LUO YW, YANG Y, TANG B. Research progress on improving the production and catalytic performance of microbial keratinase[J]. Biotic Resources, 2024, 46(3): 211-219 (in Chinese).
- [24] 利刚慧, 刘俊杰, 彭帅英, 梁颖茵, 鄢陆琪, 李昆太. 重组枯草芽孢杆菌产角蛋白酶的发酵培养基及发酵条件优化[J]. 中国饲料, 2023(19): 29-36.
- LI GH, LIU JJ, PENG SY, LIANG YY, YAN LQ, LI KT. Optimization of fermentation medium and fermentation conditions for keratinase production by recombinant *Bacillus subtilis*[J]. China Feed, 2023(19): 29-36 (in Chinese).
- [25] 范佳钰, 程飞宇, 曹世浩, 朱振昊, 张孟灏, 唐冰钰, 李玉, 曹珊. 角蛋白酶降解菌分离筛选及其脱毛能力研究[J]. 中国皮革, 2022, 51(2): 6-12.
- FAN JY, CHENG FY, CAO SH, ZHU ZH, ZHANG MH, TANG BY, LI Y, CAO S. Isolation, screening and characterization of wool keratin degrading bacteria[J]. China Leather, 2022, 51(2): 6-12 (in Chinese).
- [26] 姚灿, 李国友, 张彬, 郝传发, 杨涛. 中高温大曲中嗜热真菌的分离鉴定及其酶活性测定[J]. 酿酒, 2019, 46(5): 32-35.
- YAO C, LI GY, ZHANG B, HAO CF, YANG T. Isolation and identification of thermophilic fungi from moderate/high-temperature Daqu and determination of enzyme activity[J]. Liquor Making, 2019, 46(5): 32-35 (in Chinese).
- [27] 唐嘉, 陈朝银, 赵声兰, 夏静, 张涛. 一种初筛产胞外淀粉酶菌株的简化方法[J]. 生物加工过程, 2008, 6(1): 37-40.
- TANG J, CHEN CY, ZHAO SL, XIA J, ZHANG T. A simplified method for primary screening of extracellular amylolytic enzyme producing strains[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2008, 6(1): 37-40 (in Chinese).
- [28] BOKVELD A, NNOLIM NE, DIGBAN TO, OKOH AI, NWODO UU. *Chryseobacterium aquifrigidense* keratinase liberated essential and nonessential amino acids from chicken feather degradation[J]. Environmental Technology, 2023, 44(3): 293-303.
- [29] 范集壮, 程依婷, 高玉婷, 余容, 杨晓燕. 一株从云西南部土壤中分离的蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)的抗氧化活性研究[J]. 当代化工研究, 2021(16): 150-153.
- FAN JZ, CHENG YT, GAO YT, SHE R, YANG XY. Antioxidant activity of a *Bacillus mycoides* isolated from the soil of West Yunnan[J]. Modern Chemical Research, 2021(16): 150-153 (in Chinese).
- [30] 侯玉煌, 丁宏标. 角蛋白酶研究进展及其在饲料工业中的应用[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(1): 13-18.
- HOU YH, DING HB. Research progress on keratinase and its applications in feed industry[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2018, 54(1): 13-18 (in Chinese).
- [31] 彭俏丽, 张辉华. 羽毛角蛋白降解的研究进展[J]. 广东饲料, 2020, 29(10): 43-46.
- PENG QL, ZHANG HM. Research progress on feather keratin degradation[J]. Guangdong Feed, 2020, 29(10): 43-46 (in Chinese).
- [32] 韩淑梅, 李欣, 张芝元, 董旋, 韩燕峰, 梁宗琦. 微生物角蛋白酶的特性及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4315-4326.
- HAN SM, LI X, ZHANG ZY, DONG X, HAN YF, LIANG ZQ. Research progress on the characteristics and application of microbial keratinase[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4315-4326 (in Chinese).
- [33] 孙玉凤, 谈家金, 袁裕超, 赵晓佳, 叶建仁. 蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 中蛋白酶 ATP- α 与 ClpX 的杀线虫活性研究[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(4): 84-90.
- SUN YF, TAN JJ, YUAN YC, ZHAO XJ, YE JR. Prokaryotic expression of nematocidal proteases ATP- α and ClpX from *Bacillus cereus* NJSZ-13[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(4): 84-90 (in Chinese).
- [34] HURST CJ. Dirt and disease: the ecology of soil fungi and plant fungi that are infectious for vertebrates[M]//Understanding Terrestrial Microbial Communities. Cham: Springer International Publishing, 2019, 6: 289-405.
- [35] 张宝玉, 彭政, 张娟, 李江华. 地衣芽孢杆菌-角蛋白酶联合降解羽毛体系的优化及产物应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2022, 51(6): 827-834.
- ZHANG BY, PENG Z, ZHANG J, LI JH. Optimization and product application of feather-degrading system in combination of *Bacillus licheniformis* and keratinase[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2022, 51(6): 827-834 (in Chinese).
- [36] BOHACZ J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(1): 13.
- [37] GRADISAR H, KERN S, FRIEDRICH J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(2): 196-200.
- [38] VERMA A, SINGH H, ANWAR S, CHATTOPADHYAY

- A, TIWARI KK, KAUR S, DHILON GS. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(4): 476-491.
- [39] QIU JW, BARRETT K, WILKENS C, MEYER AS. Bioinformatics based discovery of new keratinases in protease family M36[J]. *New Biotechnology*, 2022, 68: 19-27.
- [40] WANG QY, LIAO MD. Biodegradation of feather wastes and the purification and characterization of a concomitant keratinase from *Paecilomyces lilacinus*[J]. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, 2014, 50(3): 311-317.
- [41] 冀勇良, 朱传合, 刘丽英. 短小芽孢杆菌产角蛋白酶液体发酵条件的优化[J]. *食品与发酵科技*, 2014, 50(1): 19-24.
- JI YL, ZHU CH, LIU LY. Optimization of liquid fermentation conditions of keratinase produced by *Bacillus pumilus*[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2014, 50(1): 19-24 (in Chinese).
- [42] 蒋彪, 王常高, 杜馨, 林建国, 蔡俊. 响应面法优化芽孢杆菌 CJPE209 产角蛋白酶发酵培养基的研究[J]. *中国酿造*, 2017, 36(5): 76-80.
- JIANG B, WANG CG, DU X, LIN JG, CAI J. Optimization of fermentation medium for keratinase production from *Bacillus* sp. CJPE209 using response surface methodology[J]. *China Brewing*, 2017, 36(5): 76-80 (in Chinese).
- [43] 张红岩, 张妮, 杨梦莹, 刘聪, 杨立芳, 申乃坤, 姜明国. 拟蕈状芽孢杆菌 Gxun-30 产角蛋白酶液体发酵条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(4): 136-143.
- ZHANG HY, ZHANG N, YANG MY, LIU C, YANG LF, SHEN NK, JIANG MG. Optimization of liquid fermentation conditions of keratinase produced by *Bacillus paramycoides* Gxun-30[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(4): 136-143 (in Chinese).
- [44] 刘佳慧, 吕红, 林娟. 一株产低温碱性淀粉酶蕈状芽孢杆菌的分离筛选和发酵优化[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2023, 60(2): 149-155.
- LIU JH, LÜ H, LIN J. Isolation and screening of psychrophilic and alkaline amylase-producing *Bacillus mycoides* strain 3F1 and the optimum fermentation for enzyme production[J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2023, 60(2): 149-155 (in Chinese).