

研究报告

解淀粉芽孢杆菌 3-2 发酵羽毛产氨基酸

周莲^{1Δ} 谢小林^{1,2Δ} 顾振红² 陈美标¹ 姚青² 朱红惠^{1*}

- (1. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室
省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东 广州 510070)
(2. 华南农业大学园艺学院 广东 广州 510642)

摘要:【目的】建立废弃羽毛液体发酵工艺,优化发酵条件,提高羽毛降解率及氨基酸产量,研发新型、高效复合氨基酸肥料。【方法】利用解淀粉芽孢杆菌 3-2 发酵羽毛,探究温度、发酵时间、羽毛含量、单一碳源、复合碳氮源、金属离子等对废弃羽毛降解效果以及发酵液中氨基酸种类和含量的影响。【结果】废弃羽毛降解率与氨基酸总产量呈负相关。随着发酵时间延长,羽毛降解率增加,当发酵温度为 37 °C、羽毛添加量为 1%、以乳糖为外加碳源、添加 Mg²⁺ 时,羽毛降解率最高,达到 81.92%。随着羽毛添加量增加,氨基酸总含量也增加(在 20% 范围以内),当发酵温度为 37 °C、降解时间为 108 h、羽毛添加量为 10%、乳糖添加量为 0.5%、不添加复合碳氮源、不添加金属离子时,氨基酸的种类最全(富含 17 种氨基酸),总含量最高,达到 20.861 g/kg。【结论】利用解淀粉芽孢杆菌 3-2 发酵废弃羽毛生产氨基酸复合肥料是一种可靠、环保、经济的方法,获得的氨基酸肥料营养齐全。研究结果为新型复合氨基酸肥料的研发提供技术支撑。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌, 废弃羽毛, 发酵, 氨基酸, 工艺优化

Foundation item: Science and Technology Plan Project of Guangdong Province (No. 2015A020209087, 2017A020224022, 2016B090918090); Guangzhou Sci-technology Project (No. 201502080070); High-tech Industry and Strategically Emerging Industries Sci-technology Project of Zhaoqing High-tech Zone (No. 2015B010102006); The Special Program for Leading Talents of Guangdong Province (No. 2015TX01N036); The Funds for Environment Construction and Capacity Building of GDAS' Research Platform (No. 2016GDASPT-0302)

*Corresponding author: E-mail: zhuhh@gdim.cn

^ΔThese authors equally contributed to this work

Received: January 18, 2017; **Accepted:** April 25, 2017; **Published online** (www.cnki.net): May 25, 2017

基金项目: 广东省省级科技计划项目(No. 2015A020209087, 2017A020224022, 2016B090918090); 广州市科技计划项目(No. 201502080070); 肇庆高新区高新技术产业和战略性新兴产业科技创新项目(No. 2015B010102006); 广东省科技创新领军人才项目(No. 2015TX01N036); 广东省科学院科研平台环境与能力建设专项资金项目(No. 2016GDASPT-0302)

*通讯作者: E-mail: zhuhh@gdim.cn

^Δ对本文贡献相同

收稿日期: 2017-01-18; **接受日期:** 2017-04-25; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-05-25

Amino acid production from waste feather by *Bacillus amyloliquefaciens* 3-2

ZHOU Lian^{1Δ} XIE Xiao-Lin^{1,2Δ} GU Zhen-Hong² CHEN Mei-Biao¹
YAO Qing² ZHU Hong-Hui^{1*}

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou Provincial Open Laboratory of Microbial New Application Technique, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry-Province Joint Development), Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] To develop a novel and efficient amino acid fertilizer, a liquid fermentation of waste feathers was established and optimized aiming at enhancing the degradation of waste feather and yield of amino acid. **[Methods]** *Bacillus amyloliquefaciens* 3-2 was used to ferment feathers. The influences of fermentation temperature, time, feathers content, sole carbon source, carbon-nitrogen complex and metal ions on the degradation of feather as well as the kinds and yield of amino acids were studied. **[Results]** No positive correlation between degradation of waste feathers and yield of amino acid was observed. Increase of fermentation time contributed to the degradation of feathers. The optimal fermentation conditions of degradation of feathers were 37 °C, 1% feather, lactose as external carbon source and Mg²⁺ and the highest degradation of feathers was 81.92%. The increase of feathers content favored the yield of amino acids (less than 20%). The optimal conditions of kinds and yield of amino acids were 37 °C, 108 h, 10% feathers, 0.5% lactose and no carbon-nitrogen complex and metal ions with the kinds of 17 and highest yield of 20.861 g/kg amino acids. **[Conclusion]** The production of nutrient-rich amino acids fertilizer from waste feathers by fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens* 3-2 is a reliable, eco-friendly and economical technology. The results will be a technological support to develop novel amino acids fertilizer.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, Waste feathers, Fermentation, Amino acid, Process optimization

羽毛是家禽处理后剩余的废弃物，在全世界的范围内每年有数百万吨羽毛废弃物产生，而我国每年产生的废弃羽毛将近 70 万 t^[1-2]，固体废弃物的管理问题成了家禽屠宰企业亟待解决的问题。然而羽毛废弃物是一种丰富的天然蛋白质资源，其粗蛋白含量高达 85%–90%，还含有维生素 B₁₂ 和一些未知的生长因子。羽毛蛋白中除赖氨酸、蛋氨酸的含量明显较低外，其它动物必需氨基酸的组成略高于鱼粉^[3]，这意味着利用羽毛蛋白质水解生产氨基酸作为食品添加剂或氨基酸液体肥具有潜在的经济效益。但禽类羽毛中的蛋白质主要由角质蛋白构成，角质蛋白中含有较多的胱氨酸，他们之间形成大量的二硫键，再加上氢键和分子间作用力很难被普通蛋白酶(如胰蛋白酶、

胃蛋白酶、木瓜蛋白酶等)水解^[4]。利用高温高压蒸煮^[5]、酶解法^[6-7]、膨化^[8]、酸碱水解^[9]和利用氧化剂或者还原剂^[10]等传统方法加工处理废弃羽毛，存在氨基酸破坏严重、酶制剂成本高、能耗高、污染大等问题，而利用微生物对角质蛋白进行降解可以提高水解产物的营养价值，降低能耗、成本以及对环境的污染问题，是一种环境友好型的废弃物资源化利用方式。

自然界中有多种微生物可以降解羽毛角质蛋白，迄今为止已发现 30 多种，主要包括细菌类的芽孢杆菌属^[11-12]、真菌类的曲霉属^[13]和放线菌的链霉菌属^[14]，但由于生物安全性问题限制了其应用。解淀粉芽孢杆菌 3-2 是本实验室筛选的一株具有高角质蛋白酶活的生物安全菌株，同时能分泌

多种活性物质。

本研究利用解淀粉芽孢杆菌 3-2 液体发酵纯羽毛, 通过单因素实验探究不同温度、发酵时间、羽毛含量、单一碳源、复合碳氮源、金属离子等对废弃羽毛降解效果以及发酵液中氨基酸种类和含量的影响, 以期提高羽毛降解率及氨基酸产量, 为后续生产新型复合氨基酸肥料提供技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: 羽毛来自广东省广州市华南农业大学三角市菜市场, 经彻底清洗, 烘干粉碎, 过 1 mm 孔径筛备用。

麸皮、玉米粉、豆粕、豆饼均来自广东省肇庆市某饲料加工厂。

1.1.2 主要试剂和仪器: 培养基所用的试剂以及各类碳源均购自广东环凯生物科技有限公司。L-8900 全自动氨基酸分析仪, 日立高新技术公司; HZQ-X300C 恒温振荡器, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.1.3 培养基: 种子培养基采用 NA 培养基^[15]。发酵培养基(g/L): 羽毛 0.5, NaH₂PO₄ 0.4, Na₂HPO₄ 0.3, 0.105 MPa 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 酸解氨基酸含量测定: 按含氨基酸水溶肥料农业行业标准(NY1429-2007)中的方法测定, 使用 L-8900 全自动氨基酸分析仪进行测定。

1.2.2 水溶性游离氨基酸测定: 取 5 mL 原液至 10 mL 比色管中, 加 ddH₂O 定容至 10 mL, 静置过夜。取 2 mL 上清液至 10 mL 离心管中, 加入 2 mL 磺基水杨酸, 混匀, 静置 1 h 使蛋白沉淀。加入 1 mL EDTA 和 1 mL 盐酸后 4 °C、6 000×g 离心 15 min (或用 0.22 μm 微孔滤膜过滤)。取上清液 1 mL 至培养皿中, 蒸干。加入 1 mL 20 mmol/L HCl 溶液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。至少取 500 μL 至进样瓶。上机测定。

1.2.3 羽毛降解率的测定: 发酵液经过滤, 105 °C

烘干至恒重, 计算降解率。

羽毛降解率(%)=(对照样品干重-实验样品干重)/对照样品干重×100。

1.2.4 氨基酸产率的计算: 氨基酸产率(%)=

$$\frac{\text{实际氨基酸含量}}{\text{理论氨基酸产量}} \times 100 = \frac{\text{发酵液氨基酸含量} \times \text{发酵液体积}}{\text{羽毛添加量} \times \text{羽毛降解率}} \times 100。$$

1.2.5 活菌数测定: 采用稀释涂布平板法。

1.2.6 工艺流程: 市场收集羽毛→洗净→0.4 MPa 蒸煮 30 min→烘干→粉碎→过筛→取样→加无机盐溶液→加 5% 种子液→恒温、200 r/min 摇床发酵 96 h→结果测定。

1.2.7 温度对羽毛发酵效果的影响: 发酵培养基含有 1% 羽毛, 初始 pH 7.0, 接种量 5%, 100 mL/250 mL, 200 r/min, 发酵 96 h。分别于 25、30、37、42 °C 设置 4 个实验组, 每个实验组设 5 个平行样, 每隔 24 h 取样测定降解率。

1.2.8 外加碳源对羽毛发酵效果及产物的影响: 为探明碳源对菌株 3-2 发酵羽毛效果及产物的影响, 在发酵培养基含有 1% 羽毛的基础上, 分别添加 1% 的葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉 5 种碳源, 调节 pH 7.0, 接种量 5%, 100 mL/250 mL, 37 °C, 200 r/min 发酵 96 h 后测定其降解率及氨基酸含量, 以不添加外加碳源作为空白组。

1.2.9 复合碳氮源对羽毛发酵效果及产物的影响: 为研究复合碳源对菌株 3-2 发酵羽毛效果及产物的影响, 在发酵培养基含有 1% 羽毛的基础上, 分别添加 1% 的麸皮、玉米粉、豆粕粉、豆饼粉 4 种复合碳源, 调节 pH 7.0, 接种量 5%, 100 mL/250 mL, 37 °C, 200 r/min 发酵 96 h 后测定其降解率及氨基酸含量, 以不添加复合碳源作为空白组。

1.2.10 金属离子对羽毛发酵效果及产物的影响: 参考文献[16], 选取对羽毛发酵可能有促进作用的 MgCl₂、CaCl₂、ZnCl₂, 分别向发酵培养基中添加 0.01%, 调节 pH 7.0, 接种量 5%, 37 °C,

100 mL/250 mL, 200 r/min, 发酵 96 h 后测定其降解率及氨基酸含量, 以不添加金属离子作为空白组。

1.2.11 羽毛底物含量对羽毛发酵效果及产物的影响: 发酵培养基中分别添加 0.5%、1.0%、2.0%、5.0%、10.0%、15.0%、20.0% 的纯羽毛, 初始 pH 7.0, 接种量 5%, 100 mL/250 mL, 37 °C, 200 r/min 发酵 96 h 后测定其降解率及氨基酸含量。

1.2.12 时间对羽毛发酵效果及产物的影响: 考虑羽毛降解生成氨基酸与氨基酸分解消耗是一个动态过程, 为探明其中的关系, 在发酵培养基含有 10% 羽毛的基础上, 添加 1% 的乳糖, 调节 pH 7.0, 接种量 5%, 100 mL/250 mL, 37 °C, 200 r/min, 发酵时间分别为 36、48、60、72、84、96、108、120、132 h, 测定其降解率及氨基酸含量。

1.2.13 数据处理: 数据处理采用 SPSS 和 Origin 8.5 完成。

2 结果与讨论

2.1 羽毛常规理化性质

羽毛的常规理化指标测定结果如表 1 所示。

2.2 羽毛中游离氨基酸及酸水解氨基酸含量

为了给后续复合氨基酸肥料提供技术支持, 测定了羽毛中游离氨基酸和酸水解氨基酸含量。测定结果如图 1 所示, 羽毛的氨基酸含量达到 80% 以上, 并且氨基酸的种类齐全, 作为复合氨基酸肥料的发酵原料有很大的应用潜力。同时, 羽毛中游离的氨基酸含量为 0 (文中未展示), 说明简单的粉碎无法释放羽毛中的氨基酸, 需要进行其他工艺, 如微生物发酵来释放氨基酸。

2.3 温度对羽毛发酵效果的影响

温度是影响微生物生长及分泌代谢产物的重要影响因素。本研究探讨了不同温度和时间下, 角

蛋白降解菌 3-2 对羽毛降解率及氨基酸含量的影响, 结果见图 2。发酵 24 h 后 4 个温度梯度下的羽毛降解率都很低; 随着发酵时间的增加, 4 个温度梯度下的降解率快速增加, 其中 42 °C 和 37 °C 两个温度的增幅最大; 继续随着发酵时间的增加, 42 °C 条件下的降解率基本不再变化, 而 25、30、37 °C 依旧缓慢增加; 在 96 h 后降解率趋于平稳, 以 37 °C 条件下降解率最高, 为 80.19%。分析原因可能是 37 °C 是该菌体的最适生长温度, 有利于产角蛋白酶, 从而分解羽毛^[17]。温度过高或过低均不利于微生物的生长和角蛋白酶的产生, 特别是低温^[16]。据相关研究报道, 解淀粉芽孢杆菌的发酵温度一般控制在 25–42 °C 之间, 极少数嗜热类微生物的发酵温度控制在 70 °C 左右^[18-19]。

2.4 外加碳源对羽毛发酵效果及产物的影响

羽毛含碳量很低, 添加外加碳源作为补充营养物质能促进菌体的快速生长, 也可能替代部分氨基酸, 减少菌体对氨基酸的消耗。实验考察了葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉 5 种外加碳源对羽毛发酵的影响, 其实验结果如图 3 和表 2 所示。由图 3 可知, 葡萄糖、淀粉、蔗糖、麦芽糖对羽毛发酵有抑制作用, 尤其以葡萄糖的抑制作用最为明显(后测定添加葡萄糖的发酵液中活菌数明显高于不添加外加碳源的羽毛发酵液中数目), 乳糖对羽毛发酵有略微的促进作用。相关研究表明^[20], 外加碳源能促进细菌生长, 对产酶影响不大, 但某些碳源, 特别是较高的浓度对产酶有明显的抑制^[21], 本实验结果与其相吻合。由表 2 可知乳糖、蔗糖、麦芽糖对于氨基酸的生产和积累有促进作用, 以乳糖的效果最为显著。其原因可能是对于解淀粉芽孢杆菌 3-2 而言, 乳糖优先于氨基酸被作为碳源利用。

表 1 羽毛常规理化性质

Table 1 Conventional physical and chemical properties of feather

处理 Treatment	水分含量 Water content (%)	粗蛋白含量 CP content (g/kg)	总氮 NT (g/kg)	有机质 OM (%)	总碳 TC (g/kg)	C/N
羽毛 Feather	8.20	871.20	139.00	89.79	520.80	3.75

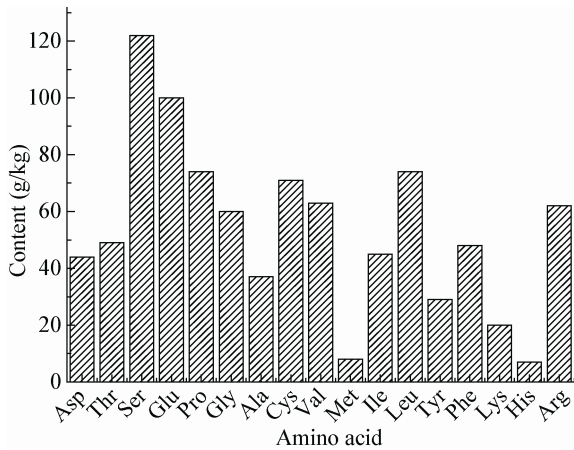


图 1 羽毛酸解氨基酸含量

Figure 1 Hydrolysis of amino acids in feather

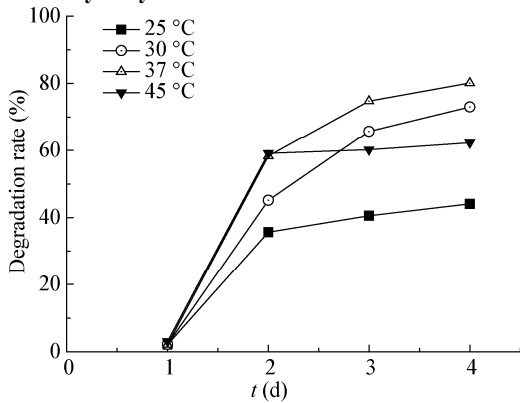


图 2 不同温度下羽毛降解率

Figure 2 Degradation rate of feathers at different temperatures

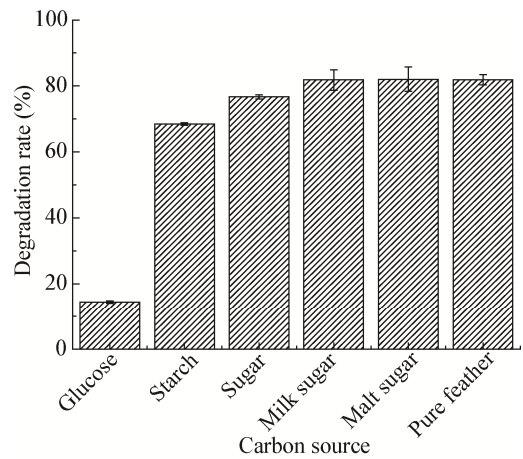


图 3 添加不同碳源的羽毛降解率

Figure 3 Feather degradation rate of different carbon sources

2.5 复合碳氮源对羽毛发酵及产物的影响

为探明复合碳氮源对羽毛发酵及产物的影响, 在含有 1% 的羽毛发酵培养基中, 分别添加 1% 的麸皮、玉米粉、豆粕粉和豆饼粉 4 种复合碳源, 37 °C 接种量 5%, 100 mL/250 mL, 200 r/min, 发酵 96 h, 然后测定有效活菌数和氨基酸含量(因为复合碳源的添加导致羽毛降解率无法测定, 所以用有效活菌数作为辅助指标)。由图 4 和表 3 可知, 麸皮、玉米粉、豆粕粉、豆饼均对菌株的生长有促进作用, 尤其是麸皮和玉米的促进效果明显, 但这两种复合碳

表 2 不同碳源对羽毛发酵液中氨基酸含量的影响

Table 2 Effects of different carbon sources on content of amino acids in fermentation broth (g/kg)

处理 Treatment	葡萄糖 Glucose	淀粉 Starch	蔗糖 Sugar	乳糖 Milk sugar	麦芽糖 Malt sugar	纯羽毛 Pure feather
Asp	0.000	0.000	0.029	0.015	0.000	0.010
Thr	0.000	0.000	0.058	0.035	0.000	0.000
Ser	0.000	0.048	0.140	0.180	0.020	0.045
Glu	0.000	0.110	0.199	0.000	0.035	0.095
Pro	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Gly	0.000	0.011	0.030	0.062	0.008	0.087
Ala	0.000	0.000	0.053	0.038	0.000	0.031
Cys	0.021	0.000	0.242	0.000	0.272	0.000
Val	0.000	0.155	0.066	0.791	0.092	0.251
Met	0.000	0.000	0.000	0.089	0.048	0.000
Ile	0.000	0.000	0.000	0.080	0.000	0.000
Leu	0.000	0.000	0.000	0.093	0.000	0.042
Tyr	0.013	0.087	0.097	0.532	0.112	0.167
Phe	0.052	0.544	0.660	1.153	0.665	0.480
Lys	0.000	0.122	0.115	0.084	0.174	0.080
His	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Arg	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021
总氨基酸 Total AA	0.086	1.076	1.689	3.152	1.427	1.309

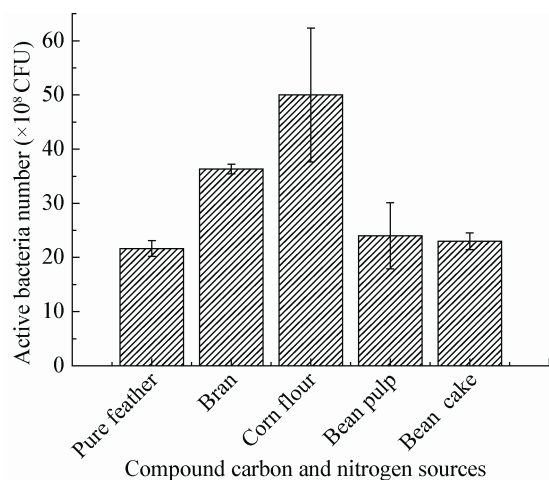


图4 添加不同复合碳氮源中羽毛发酵液中活菌数
Figure 4 The number of viable cells in feathers fermentation broth with different compound carbon and nitrogen sources

氮源对于氨基酸的生成和积累有抑制作用,而豆粕和豆饼有促进作用。这表明外加复合碳氮源只促进菌体细胞生长,对产酶没有效果,甚至还有一定的抑制作用,这与刘晓迪等的研究结果一致^[22]。分析原因可能是外加碳氮源营养丰富,有利于菌体的生长,但菌体所产生的角蛋白酶属于诱导酶^[23],存在其他更容易利用的外加营养物质时,菌体会优先利用外加复合碳氮源,而不会产生角蛋白酶去分解利用羽毛。由表3可知,添加豆粕和豆饼中的发酵液中氨基酸积累量高于纯羽毛发酵液中积累量,分析原因可能是角蛋白酶的底物比较广泛,能分解利用豆粕和豆饼中蛋白质,从而造成氨基酸的少量积累^[24-25]。

表3 不同复合碳氮源对羽毛发酵液中氨基酸含量的影响

Table 3 Effects of different compound carbon and nitrogen sources on content of amino acids in fermentation broth (g/kg)

处理 Treatment	麸皮 Bran	玉米粉 Corn flour	豆粕粉 Bean pulp	豆饼粉 Bean cake	纯羽毛 Pure feather
Asp	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Thr	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ser	0.030	0.000	0.031	0.026	0.000
Glu	0.097	0.000	0.134	0.130	0.030
Pro	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Gly	0.003	0.000	0.004	0.003	0.000
Ala	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Cys	0.196	0.168	0.000	0.219	0.222
Val	0.039	0.015	0.163	0.089	0.047
Met	0.000	0.006	0.000	0.051	0.000
Ile	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Leu	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tyr	0.100	0.064	0.247	0.189	0.136
Phe	0.446	0.414	0.621	0.596	0.524
Lys	0.017	0.023	0.105	0.121	0.037
His	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Arg	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
总氨基酸 Total AA	0.928	0.691	1.305	1.426	0.995

2.6 金属离子对羽毛发酵效果及产物的影响

研究表明, 金属离子对细菌的生长有促进作用^[26-27], 特别是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 。在含有 1% 的羽毛发酵培养基中, 分别添加 0.01% 的 MgCl_2 、 CaCl_2 和 ZnCl_2 , 37 °C, 接种量 5%, 100 mL/250 mL, 200 r/min, 发酵 96 h, 实验结果见表 4 和表 5。结果可知, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对羽毛的降解有抑制作用, 尤其是 Zn^{2+} 具有强烈的抑制作用, 而且 3 种金属离子对氨基酸的产生和积累也有抑制作用, 这与傅伟的研究结果一致^[16]。

表 4 不同金属离子对羽毛降解率的影响
Table 4 Effects of different metal ions on degradation rate of feathers

处理 Treatment	降解率 Degradation rates (%)
MgCl_2	80.72
CaCl_2	76.54
ZnCl_2	66.75
纯羽毛 Pure feather	81.92

表 5 不同金属离子对发酵液中氨基酸含量的影响
Table 5 Effects of different metal ions on content of amino acids in fermentation broth (g/kg)

处理 Treatment	MgCl_2	CaCl_2	ZnCl_2	纯羽毛 Pure feather
Asp	0.000	0.008	0.008	0.010
Thr	0.000	0.000	0.000	0.000
Ser	0.022	0.041	0.000	0.045
Glu	0.082	0.079	0.030	0.095
Pro	0.000	0.000	0.000	0.000
Gly	0.056	0.009	0.013	0.087
Ala	0.000	0.000	0.000	0.031
Cys	0.000	0.000	0.228	0.000
Val	0.252	0.051	0.035	0.251
Met	0.000	0.000	0.000	0.000
Ile	0.000	0.000	0.000	0.000
Leu	0.000	0.000	0.000	0.042
Tyr	0.137	0.113	0.136	0.167
Phe	0.525	0.498	0.524	0.480
Lys	0.060	0.074	0.037	0.080
His	0.000	0.000	0.000	0.000
Arg	0.000	0.000	0.000	0.021
总氨基酸 Total AA	1.133	0.872	0.995	1.309

2.7 羽毛底物含量对羽毛发酵效果及产物的影响

羽毛作为解淀粉芽孢杆菌 3-2 生长的唯一碳源 and 氮源, 也作为产物氨基酸的唯一转化来源, 其含量对整个发酵过程至关重要。实验设置了 7 个不同羽毛底物含量, 结果如图 5 和表 6 所示。从图 5 可知, 在一定的范围内增加羽毛含量, 相当于增加营养物质浓度, 使细菌生长增加, 有利于羽毛的降解。当羽毛含量达到 1% 时, 羽毛降解率最高, 达到 81.92%。随着羽毛含量的增加, 羽毛降解率呈下降趋势, 当羽毛添加量为 20% 时, 降解率只有 45.32%。分析原因可能是底物浓度过高会影响料液比, 使发酵液变得粘稠影响了溶氧, 从而不利于菌体生长。从表 6 可知, 氨基酸含量与羽毛降解率有相反的变化趋势, 随着羽毛含量的增加, 发酵液中氨基酸含量呈上升趋势, 当羽毛添加量为 20% 时, 发酵液中氨基酸含量达到 1.808%。分析其原因可能是, 虽然羽毛降解率降低, 但是菌体生长和代谢消耗的氨基酸增多, 导致羽毛降解的总量增大, 并且其增大的幅度大于氨基酸消耗的幅度, 所以发酵液中氨基酸含量增高。考虑后续大规模工业生产的需求, 需综合考虑氨基酸含量和羽毛降解率这两个指标, 本实验拟采用氨基酸产率为评价指标。通过计算可知, 当羽毛含量为 10% 时, 氨基酸产率最高, 为 22.32%。

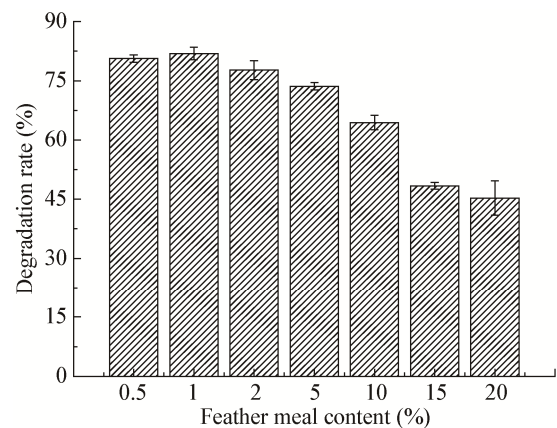


图 5 不同羽毛底物含量下羽毛降解率

Figure 5 Feather degradation rate under different feather meal contents

表 6 添加不同羽毛量的发酵液中氨基酸含量及相关指标

Table 6 The content of amino acids in fermentation broth with different feathers and the related indexes were added (g/kg)

处理 Treatment	Feathers (%)						
	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	15.0	20.0
Asp	0.000	0.010	0.005	0.018	0.135	0.119	0.145
Thr	0.000	0.000	0.007	0.042	0.429	0.505	0.733
Ser	0.000	0.045	0.049	0.137	0.769	0.864	1.207
Glu	0.005	0.095	0.000	0.141	0.773	0.694	0.659
Pro	0.000	0.000	0.000	0.000	0.184	0.190	0.295
Gly	0.000	0.087	0.025	0.394	1.770	1.537	2.092
Ala	0.000	0.031	0.019	0.054	0.430	0.447	0.842
Cys	0.041	0.000	0.000	0.000	0.210	0.197	0.226
Val	0.000	0.251	0.177	0.728	2.448	2.909	3.219
Met	0.000	0.000	0.000	0.000	0.182	0.180	0.172
Ile	0.000	0.000	0.000	0.096	0.945	1.085	1.286
Leu	0.000	0.042	0.000	0.318	2.006	2.510	2.974
Tyr	0.020	0.167	0.410	0.533	0.970	1.044	0.988
Phe	0.099	0.480	1.084	1.018	2.749	3.197	3.540
Lys	0.000	0.080	0.122	0.061	0.160	0.156	0.178
His	0.000	0.000	0.000	0.014	0.061	0.082	0.088
Arg	0.000	0.021	0.000	0.000	0.159	0.183	0.163
总氨基酸 Total amino acid	0.199	1.309	1.899	3.555	14.381	15.901	18.808
氨基酸消耗量 Amino acid consumption	3.833	6.883	13.644	33.258	50.052	56.704	71.839
氨基酸产率 Amino acid yield (%)	4.94	15.98	12.22	9.66	22.32	21.90	20.75

2.8 时间对羽毛发酵效果及产物的影响

时间是影响细菌生长、分泌角蛋白酶、羽毛降解及氨基酸消耗的重要因素，尤其产物氨基酸的积累是由羽毛降解产生氨基酸和细菌生长消耗氨基酸综合影响的动态指标，因此选取一个最佳的发酵终点时间尤为重要。综合以上优化的最佳发酵条件，分别发酵 36、48、60、72、84、96、108、120、132 h，测定其降解率及氨基酸含量。由图 6 和表 7 可知，羽毛降解率随时间一直在升高，在 132 h 达到最大值，为 70.12%；降解速率最快是在 48 h，然后降解速率开始放慢；当达到 120 h 时，降解速度趋于 0。分析原因可能是发酵后期，代谢物积累

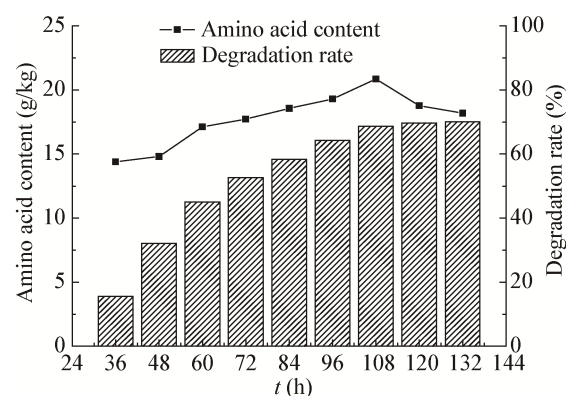


图 6 不同发酵时间羽毛降解率及氨基酸含量
Figure 6 Degradation rate of feather and amino acid content in different fermentation time

表 7 时间对发酵液中氨基酸含量的影响
Table 7 Effects of time on content of amino acids in fermentation broth (g/kg)

处理 Treatment	Time (h)								
	36	48	60	72	84	96	108	120	132
Asp	0.060	0.057	0.128	0.150	0.200	0.232	0.248	0.227	0.124
Thr	0.306	0.237	0.203	0.196	0.231	0.256	0.249	0.258	0.205
Ser	0.782	0.502	0.479	0.461	0.522	0.556	0.534	0.575	0.485
Glu	0.905	1.200	0.884	0.850	0.954	1.006	0.924	0.909	0.593
Pro	0.046	0.055	0.128	0.152	0.201	0.238	0.204	0.190	0.181
Gly	1.629	0.574	0.449	0.406	0.414	0.299	0.679	0.232	0.156
Ala	0.473	0.251	0.174	0.174	0.169	0.180	0.322	0.215	0.139
Cys	0.085	0.112	0.157	0.206	0.252	0.271	0.300	0.261	0.252
Val	2.455	3.389	4.102	4.234	4.380	4.734	4.698	4.220	4.214
Met	0.137	0.034	0.491	0.456	0.423	0.375	0.334	0.526	0.308
Ile	0.628	0.673	0.999	0.903	0.830	0.703	0.677	0.550	0.481
Leu	1.515	1.891	1.937	2.087	2.153	2.215	2.189	1.855	1.894
Tyr	1.369	1.751	1.991	2.028	2.131	2.172	2.407	2.445	2.676
Phe	3.708	3.860	4.468	4.839	5.050	5.304	6.003	5.497	5.491
Lys	0.190	0.089	0.329	0.350	0.372	0.431	0.684	0.528	0.658
His	0.062	0.071	0.091	0.096	0.110	0.121	0.185	0.094	0.149
Arg	0.058	0.063	0.119	0.147	0.178	0.205	0.224	0.205	0.188
总氨基酸 Total amino acid	14.408	14.810	17.129	17.734	18.571	19.299	20.861	18.785	18.194

引起环境改变, 从而影响角蛋白酶活性, 同时角蛋白酶产生自身水解(主要原因)^[28]。总氨基酸含量在 0–108 h 内随着时间一直在升高, 在 108 h 达到最大值, 为 20.861 g/kg; 然后随着时间的增加, 总氨基酸含量呈下降趋势。分析原因可能是细菌先将羽毛角蛋白降解为可溶性的蛋白, 再继续降解成短肽和氨基酸, 最后氨基酸被细菌用于自身的生长代谢所消耗^[29]。在发酵后期羽毛降解产生氨基酸的速率低于细菌对氨基酸分解利用速率。

由表 7 可知, 各种氨基酸的变化趋势与总氨基酸的变化趋势并不相同, 其单独氨基酸含量的最大值并不都在 108 h。为此, 对各种氨基酸含量与发酵时间的回归关系进行初步分析, 建立的回归方程如表 8 所示。利用回归方程, 针对不同种类氨基酸, 可求出最佳的发酵时间结束点。

3 结论

解淀粉芽孢杆菌 3-2 能产生高效角蛋白水解

酶, 利用解淀粉芽孢杆菌 3-2 降解废弃羽毛生产氨基酸复合肥料是一种可靠、环保、经济的方法, 且获得氨基酸肥料营养齐全, 利用高效角蛋白降解菌株来降解羽毛生产氨基酸产品, 将是未来实现废弃羽毛资源化利用的一个重要方向。

通过单因素实验探究不同温度、发酵时间、羽毛含量、单一碳源、复合碳氮源、金属离子等对废弃羽毛降解效果以及发酵液中氨基酸种类和含量的影响, 实验结果表明: 废弃羽毛降解率与氨基酸总产量不呈正相关。随着发酵时间延长, 羽毛降解率增加, 当发酵温度为 37 °C、羽毛添加量为 1%、以乳糖为外加碳源、添加 Mg²⁺ 时, 羽毛降解率最高, 达到 81.92%。随着羽毛添加量增加, 氨基酸总含量也增加(在 20% 范围以内), 当发酵温度为 37 °C、降解时间为 108 h、羽毛添加量为 10%、乳糖添加量为 0.5%、不添加复合碳氮源、不添加金属离子时, 氨基酸的种类最全(富含 17 种氨基酸), 总含量最高, 达到 20.861 g/kg。

表 8 各种氨基酸含量与时间回归分析
Table 8 Regression analysis of various amino acids contents and time

氨基酸 Amino acid	回归方程 Regression equation	R-square	P
Asp	$Y=-0.002X^3+0.026X^2-0.051X+0.086$	0.978 4	1.385E ⁻⁴
Thr	$Y=-0.002X^3+0.036X^2-0.166X+0.439$	0.957 8	0.000 7
Ser	$Y=-0.005X^3+0.087X^2-0.422X+1.097$	0.905 8	0.005 4
Glu	$Y=-0.004X^3+0.045X^2-0.167X+1.141$	0.514 2	>0.05
Pro	$Y=-3.979 81E^{-7}X^3+6.094 68E^{-5}X^2+5.047E^{-4}X-0.043 8$	0.943 2	0.001 5
Gly	$Y=-0.017X^3+0.284X^2-1.472X+2.732$	0.893 0	0.007 4
Ala	$Y=2.091 7-0.071 2X+8.387 3E^{-4}X^2-3.118 57E^{-6}X^3$	0.911 1	0.004 6
Cys	$Y=-9.8E^{-4}X^3+0.009X^2+0.014X+0.058$	0.985 8	<0.000 1
Val	$Y=0.006X^3-0.159X^2+1.299X+1.349$	0.966 3	0.000 4
Met	$Y=0.01X^3-0.035X^2+0.259X-0.153$	0.531 5	>0.05
Ile	$Y=-0.934 4+0.065 3X-7.208 79E^{-4}X^2+2.332 84E^{-6}X^3$	0.856 3	0.015 1
Leu	$Y=0.223 8+0.048 3X-3.456 04E^{-4}X^2+5.504 5E^{-7}X^3$	0.885 5	0.008 7
Tyr	$Y=0.006X^3-0.092X^2+0.567X+0.913$	0.985 1	<0.000 1
Phe	$Y=3.863 9-0.036 2X+1.049 25E^{-3}X^2-5.181 54E^{-6}X^3$	0.954 1	0.000 9
Lys	$Y=0.313 2-0.011 2X+2.232 42E^{-4}X^2-9.084 87E^{-7}X^3$	0.853 7	0.015 8
His	$Y=0.073 4-1.518 1E^{-3}X+4.010 34E^{-5}X^2-1.899 78E^{-7}X^3$	0.601 6	>0.05
Arg	$Y=0.083 6-3.926 63E^{-3}X+1.037 58E^{-4}X^2-5.168 39E^{-7}X^3$	0.986 1	<0.000 1
总氨基酸 Total amino acid	$Y=-0.032X^3+0.303X^2+0.308X+13.613$	0.935 5	0.002 1

要提高废弃羽毛的降解率及氨基酸含量下阶段可从以下三方面入手：(1) 对羽毛进行预处理，通过理化手段处理羽毛，使羽毛破碎，并尽可能破坏羽毛的β折叠及二硫键，使菌株更容易降解羽毛；(2) 从自然界中分离筛选出能够更高效降解且产酶量高的菌株(可考虑霉菌，用于羽毛的固体发酵)；(3) 对已有的高效羽毛降解菌株进行基因改造，比如将角蛋白酶从诱导酶改造成组成酶、增强启动子、增加角蛋白酶基因拷贝数、阻断或减弱菌株对氨基酸的利用途径，用其它碳源代替氨基酸被菌株所利用。

参考文献

- [1] USDA. Poultry slaughter 2014 annual summary[R]. United States: National Agricultural Statistics Service, 2015
- [2] Dou Y, Huang X, Zhang BN, et al. Preparation and characterization of a dialdehyde starch crosslinked feather keratin film for food packaging application[J]. RSC Advances, 2015, 5(34): 27168-27174
- [3] Liu XL, Xie HM. Nutritional value and processing of feather meal[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 1999(6): 31-32 (in Chinese)
- [4] Stein RA. Proteins: structure and function[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2005, 33(12): 1831-1832
- [5] Hydrolysis of feathers[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 1990(2): 40 (in Chinese)
水解羽毛的方法[J]. 国外畜牧科技, 1990(2): 40
- [6] Kim WK, Lorenz ES, Patterson PH. Effect of enzymatic and chemical treatments on feather solubility and digestibility[J]. Poultry Science, 2002, 81(1): 95-98
- [7] Grazziotin A, Pimentel FA, de Jong EV, et al. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase[J]. Animal Feed Science and Technology, 2006, 126(1/2): 135-144
- [8] Xie LH, Zhang XS, Zhang JY, et al. Preparation of protein powder of chicken feathers by combination technique of expansion-enzymolysis[J]. Cereal & Feed Industry, 2012(7): 52-55 (in Chinese)
谢蓝华, 张相生, 张嘉怡, 等. 利用膨化-酶解组合技术制备鸡羽毛蛋白粉[J]. 粮食与饲料工业, 2012(7): 52-55
- [9] Coward-Kelly G, Chang VS, Agbogbo FK, et al. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 1. Chicken feathers[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(11): 1337-1343
- [10] Huang GX, Jiang JR, Li JS, et al. Determination of protein digestion rate by pepsin *in vitro* for peroxide feather[J]. Feed Research, 2011(9): 77-79 (in Chinese)

- 黄国霞, 江金蓉, 李军生, 等. 羽毛过氧化处理后的蛋白质消化率测定[J]. 饲料研究, 2011(9): 77-79
- [11] Jeong EJ, Rhee MS, Kim GP, 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
- [12] Parrado J, Rodriguez-Morgado B, Tejada M, et al. Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 57: 1-7
- [13] Sales MR, Cavalcanti MTH, de Lima Filho JL, et al. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius* the use of poultry feather to produce keratinase by *Aspergillus carbonarius*[J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2008, 43(2): 285-288
- [14] Mabrouk MEM. Feather degradation by a new keratinolytic *Streptomyces* sp. MS-2[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2331-2338
- [15] Liu JZ, Chen GS, Li HB, et al. An improved technique on nutritional GB nutrient agar for counting bacteria and nutrient agar for counting bacteria[J]. Microbiology China, 2001, 28(2): 63-68 (in Chinese)
刘坚真, 陈国寿, 李海波, 等. 国家标准测定食品细菌总数培养基的改进研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 63-68
- [16] Fu W. Research on biodegradation of poultry feather by *Bacillus licheniformis* and its keratinase fermentation[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2007 (in Chinese)
傅伟. 地衣芽孢杆菌降解羽毛角蛋白及其发酵产角蛋白酶的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2007
- [17] Suntornsuk W, Suntornsuk L. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation[J]. Bioresource Technology, 2003, 86(3): 239-243
- [18] Luo JJ, Xiao SH, Zhang B, et al. Research progress of culture technology and application of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Feed Review, 2014(5): 40-42 (in Chinese)
罗佳捷, 肖淑华, 张彬, 等. 解淀粉芽孢杆菌的培养工艺及应用研究进展[J]. 饲料博览, 2014(5): 40-42
- [19] Hu JQ, Hong LF, Wu HL, et al. Studies on the isolation and selection of keratin-decomposing bacteria and the abstraction and application of keratinase[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 1995, 17(3): 340-344 (in Chinese)
胡介卿, 洪玲芳, 吴海龙, 等. 角蛋白分解菌的分离选育、角蛋白酶提取及其应用的研究[J]. 江西农业大学学报, 1995, 17(3): 340-344
- [20] Wang JJ, Shih JCH. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 22(6): 608-616
- [21] El-Naghy MA, El-Ktatny MS, Fadl-Allah EM, et al. Degradation of chicken feathers by *chryso sporium georgiae*[J]. Mycopathologia, 1998, 143(2): 77-84
- [22] Liu XD, Gu ZH, Zhu HH, et al. A primary study on the enzymatic properties of a keratin-degrading bacterium[J]. Current Biotechnology, 2012, 2(6): 423-427 (in Chinese)
刘晓迪, 顾振红, 朱红惠, 等. 一株羽毛降解菌产酶特性的初步研究[J]. 生物技术进展, 2012, 2(6): 423-427
- [23] Yang JQ, Tang GY. The research progress on keratinase[J]. Letters in Biotechnology, 2005, 16(2): 201-203 (in Chinese)
杨建强, 汤国营. 角蛋白酶研究进展[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(2): 201-203
- [24] Jaouadi B, Abdelmalek B, Fodil D, et al. Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(21): 8361-8369
- [25] Wang SL, Hsu WT, Liang TW, 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
- [26] Tan YY. Study on biodegrading technique of keratin wastes[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2003 (in Chinese)
谭盈盈. 角蛋白废物微生物水解技术的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2003
- [27] Onifade AA, Al-Sane NA, Al-Musallam AA, et al. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources[J]. Bioresource Technology, 1998, 66(1): 1-11
- [28] Nam GW, Lee DW, Lee HS, 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] Huang L, Xiong ZQ, Cai HJ, et al. Study on the biochemical mechanism of degrading keratins by *Streptomyces fradiae*[J]. Microbiology China, 2006, 33(4): 36-42 (in Chinese)
黄林, 熊智强, 蔡华静, 等. 链霉菌降解角蛋白的生化机制研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 36-42