

羽毛降解菌株 *Streptomyces* sp. DJ 产生的蛋白酶学性质*

柯野, 朱艳媚, 余国兴, 叶杰洲, 刘玉萍, 刘圆圆, 朱永丽
(韶关学院英东生命科学院, 广东 韶关 512005)

摘要: 从羽毛废弃物堆的土壤中采集样品, 通过富集培养、初筛和复筛分离出一株高效降解羽毛的 DJ 菌株; 对该菌株的形态学观察和基于 16S rDNA 序列的系统进化分析, 初步鉴定为链霉菌 *Streptomyces* sp. DJ。该菌株在 32 °C 摇床培养 10 d 后, 对天然羽毛的降解率高达 50%, 且羽毛水解产物中含有多种自由氨基酸。该菌株产生的蛋白酶最适反应温度为 45 °C, 最适反应 pH 为 10.0; 对羽毛的降解能力高于商品化的碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶, 对疏水性或亲水性的自然底物也具有较强的水解能力。以上结果表明: DJ 菌株及其产生的蛋白酶具有良好的应用潜力。

关键词: 羽毛降解菌株; 分离鉴定; 酶学性质

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2017) 06-0147-06

Characteristics of Proteinases Produced by a feather-degrading *Streptomyces* sp. DJ Strain

KE Ye, ZHU Yanmei, YU Guoxing, YE Jiezhou, LIU Yuping, LIU Yuanyuan, ZHU Yongli
(Henry Fok College of Life Sciences, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

Abstract: A DJ strain with a high efficiency of feather-degrading capability was isolated from the soil of feather waste by the enrichment culture and the screening process. The strain was identified as *Streptomyces* sp. according to morphologic observation, 16S rDNA sequence alignment, and phylogenetic trees analysis. After fermenting at 32 °C for 10 days, the feather degradation rate reached 50%, and the feather hydrolysate was found to contain amino acids. The protease produced by the DJ strain had a maximal activity at 45 °C, and the optimum reactive pH at 10.0. The protease displayed a higher hydrolysis activity to feather than Alcalase and Papain, and had a strong hydrolysis ability to the hydrophobic or hydrophilic natural substrates. The results indicated that the DJ strain and its protease was of potential application prospects.

Key words: feather-degrading *Streptomyces* sp. DJ strain; isolation and identification; characteristics of proteinases

近年来, 随着畜牧业的迅速发展, 每年都有上百万吨的废弃羽毛产生^[1]。对于废弃羽毛的处理方式通常为填埋、焚烧或掩埋等简单的处理方

式^[2], 废弃羽毛常导致各种类型疾病(如萎黄、支原体病和禽霍乱等)相互传染^[3]; 这造成蛋白质浪费和严重的环境污染。羽毛以角蛋白为主的 *w*

* 收稿日期: 2016-11-14

基金项目: 广东省教育厅特色创新项目(2015KTSCX126); 韶关学院大学生创新创业训练计划省级项目(201710576032); 韶关学院大学生科技创新培育项目(pdjh2017b0460); 广东省科技计划项目(2016A010105024)

作者简介: 柯野(1977年生), 男; **研究方向:** 微生物学和酶工程; E-mail: keye518@163.com

(粗蛋白) 占 90% 以上, w (氨基酸) 在 70% 以上, 包括动物所需的多种必需氨基酸; 角蛋白富含 α -螺旋和 β -螺旋, 是由二硫键、氢键和疏水键等交联而成的不溶性纤维蛋白。一般不易被木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶等蛋白酶水解; 因此, 较难被动物直接消化利用^[4-6]。常采用物理、机械和化学方法对羽毛降解, 这易使必需氨基酸受到破坏, 降低了降解产物的质量和效率^[7]。利用微生物酶降解羽毛, 避免以上的不足, 高效地生产稀有氨基酸、肽等产品, 应用于皮革工业、医药、化妆品等多种行业; 这促进羽毛的深加工发展, 并且还具具有保护环境、变废为宝的作用^[8]。

从自然界分离获得 30 多种可降解羽毛的微生物, 这些微生物包括细菌、放线菌和真菌^[6,9]。多数真菌产生的角蛋白酶具有致病性^[3], 因此, 多数研究集中在放线菌和细菌。目前获得的羽毛降解菌多数对羽毛的降解效率低, 需对羽毛进行前处理等不足; 因此, 筛选出对羽毛降解效率高, 羽毛前处理简单的微生物菌株更具有实用性。本文旨在筛选获得高效降解羽毛的菌株, 提高羽毛降解效率, 为酶法生产获得系列羽毛降解产品、促进羽毛深加工的高值化提供理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 羽毛与菌株来源 羽毛粉: 采购于韶关市三鸟市场的天然羽毛, 剪碎备用。菌株来源: 韶关市养鸡场的土壤、三鸟市场废弃羽毛堆的土壤、三鸟市场废水沟的土壤。

1.1.2 培养基 富集培养基: NH_4Cl 0.5 g/L, NaCl 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.3 g/L, KH_2PO_4 0.4 g/L, MgCl_2 0.1 g/L, 酵母提取物 1.0 g/L, 羽毛粉 10.0 g/L, 未剪碎的羽毛少量, pH 7.5。羽毛粉平板: K_2HPO_4 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g/L, 无水 CaCl_2 0.025 g/L, FeSO_4 0.015 g/L, 羽毛粉 10.0 g/L, 琼脂粉 20.0 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.5。发酵培养基: NaCl 0.15 g/L, KH_2PO_4 0.54 g/L, K_2HPO_4 0.09 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L, 无水 CaCl_2 0.005 g/L, 未处理羽毛 50.0 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。LB 培养基: NaCl $w = 1.0\%$, 蛋白胨 $w = 1.0\%$, 酵母提取物 $w = 0.5\%$, pH 7.0。

1.1.3 生化与化学试剂等 PCR 反应的酶与引物购自上海生工公司; 半胱氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、缬氨酸、脯氨酸购自广州普博欣生物科技有限

公司; 甘氨酸、酪氨酸、谷氨酸购自上海展云化工有限公司; 高效薄层层析硅胶板 HSGF254 (5 × 10) 购自烟台江支硅胶开发有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 羽毛降解菌的分离筛选

1) 羽毛降解菌的平板分离。

分别取 5.0 g 土壤样品接种于富集培养液中, 37 °C、160 r/min 摇床培养 3 d; 取少量培养液, 稀释液涂布于羽毛粉平板上, 37 °C 培养 7 d, 挑取生长势强的菌株划线接种于羽毛粉平板上, 37 °C 培养; 反复划线至挑取到单菌落为止。

2) 羽毛降解菌的发酵筛选。

将菌株接种于 LB 培养液中, 37 °C、160 r/min 培养 48 h, 将菌液接种于装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 接种量为 1% (V/V), 37 °C、160 r/min 培养 8 d, 用 Whatman 滤纸过滤发酵液, 50 °C 烘干, 称量残留羽毛质量。无菌水代替菌液作为对照。羽毛降解率 = [(制备发酵培养基的羽毛干质量 - 发酵后残留羽毛的干质量) / 制备发酵培养基的羽毛干质量] × 100%。

1.2.2 菌株的鉴定

1) 菌体的形态观察。

对 DJ 菌株的菌落形态进行观察; 并通过单染色, 镜检观察其菌体结构形态。

2) 16S rDNA 分子鉴定。

将 DJ 菌株接种于 LB 培养液中, 培养 24 h, 收集菌体。参考酵母 DNA 的快速分离方法^[10], 提取其基因组 DNA。以提取的基因组为模板, 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 反应体系: DNA 模板 1 μL , 上游引物 2 μL (8-27F: 5' - AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG - 3'), 下游引物 2 μL (1523-1504R: 5' - AAGG AGGTGATCCAGCCGCA - 3')^[11], 水 20 μL , 2 × HiFi-PCR Master 25 μL , 总体积 50 μL 。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 29 个循环; 72 °C 恒温 5 min。对 PCR 产物电泳鉴定, 纯化回收测序分析。

1.2.3 发酵时间对羽毛降解的影响 将 DJ 菌株接种于 LB 液体培养基中, 32 °C、160 r/min、培养 48 h, 以 1.0% (V/V) 的接种量接种菌液于装有 80 mL 发酵培养基的 250 mL 的三角瓶中, 32 °C、160 r/min 摇床培养, 取不同培养时间的发酵液, 测其 pH、蛋白酶酶活, 以及残留羽毛的重量来计算羽毛的降解率。

1.2.4 羽毛水解产物中的氨基酸分析 利用 TLC 法, 取培养 8 d 后发酵培养液进行过滤, 收集滤液, 60 °C 恒温干燥浓缩后, 向浓缩液中加入 2.5 倍的无水乙醇, 20 °C 放置 30 min, 12 000 r/min 离心, 收集澄清的上清液, 采用正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4: 1: 2 的混合液作为展开剂进行 TLC 薄膜层析, 采用茚三酮法显色。

1.2.5 发酵液中蛋白酶的酶学性质研究

1) 粗酶液的制备。

对发酵液过滤, 收集滤液, 11 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液; 添加硫酸铵使其饱和度达到 80% 以上进行盐析后, 11 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 用蒸馏水溶解, 透析获得粗酶液, 4 °C 保存备用。测定粗酶液中蛋白酶的活性参考文献 [12] 略有改动, 即具体的方法为: 取适当稀释后的 100 μ L 粗酶液和 100 μ L 2.0% 酪蛋白 (pH 10.0), 40 °C 中水浴 10 min, 然后加入 200 μ L 三氯乙酸, 水浴 20 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 300 μ L 上清依次加入 1.5 mL Na_2CO_3 和 300 μ L 福林酚试剂, 摇匀, 40 °C 保温发色 20 min 后在 660 nm 测其吸光度。以先加三氯乙酸灭酶活性的方式作为对照。酶活单位定义为: 40 °C 反应温度下, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸为 1 个酶活力单位。

2) 最适反应温度和最适反应 pH。

测定酶液在 30、35、40、45、50、55 和 60 °C 反应温度下的活性, 以确定最适反应温度; 测定反应 pH 为 3.0、6.0、8.0、10.0 和 11.0 的活性, 以确定最适合反应 pH。

3) 金属离子与抑制剂对活性的影响。

分别向粗酶液中添加 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、PMSF、EDTA 和 SDS, 室温下放置 30 min 后, 测定其活性。以未添加试剂的酶液作为对照。

4) 3 种蛋白酶对羽毛降解的比较。

称取 5.0 g 洁净羽毛装入三角瓶中, 然后加 70 mL 蒸馏水润湿羽毛, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却后分别加入粗酶液 (反应 pH 10.0, 温度 45 °C)、木瓜蛋白酶 (反应 pH 7.2, 温度 45 °C) 和碱性蛋白酶 (反应 pH 10.0, 温度 45 °C) 各 30 mL 酶液 (酶活力为 160 U/mL), 水解 2 d, 测其对羽毛的降解率。

5) 对不同自然底物的水解。

按蛋白酶活性的测定方法, 分别以酪蛋白、BSA、明胶和大豆分离蛋白为底物, 测定酶液的活

性, 探究对不同底物的水解活性。为了直观地观察, 将水解产物置于沸水中 5 min 使酶失活, 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 进行 $w = 12\%$ SDS-PAGE 凝胶电泳, 染色观察。

2 结 果

2.1 羽毛降解菌的筛选分离

将土壤样品中的羽毛降解菌株进行富集培养后, 把富集培养液稀释涂布于羽毛粉平板上培养; 进一步反复划线分离, 筛选出 27 株长势较强的菌株。分别将 27 株菌株液体发酵培养后, 测定比较菌株间对羽毛的降解率, 从中筛选出长势强、降解羽毛效率最高的 DJ 菌株。

2.2 DJ 菌株的鉴定

DJ 菌株在羽毛粉平板生长 1 d 为白色小菌落, 菌落边缘为浅白色; 培养 2 d 菌落变为灰绿色, 菌落表面干燥, 有土腥味, 该菌株的菌落形态见图 1。镜检可见丝状菌丝体, 弯曲的孢子丝和球状的孢子 (见图 2)。对 DJ 菌株提取基因组 DNA, 以其为模板扩增 16S rDNA 基因, PCR 产物约 1 500 bp, 对 PCR 产物测序; 据测序结果利用 GenBank 数据中 Blastx 程序比对, 进一步利用 Mega 5.0 软件构建进化树。综合 DJ 菌株的菌落特征、菌丝体形态、以及 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定 DJ 菌株为 *Streptomyces* sp. DJ。

2.3 发酵时间对羽毛降解的影响结果

发酵培养 DJ 菌株 1 d 后, 培养液逐渐浑浊, 羽毛有降解迹象; 培养 6~7 d, 羽片明显被降解; 培养 8 d 后, 羽片和羽枝几乎完全降解, 仅余几支最粗大的羽轴, 发酵液变为黄褐色, 具有明显刺鼻的氨味。发酵 4 d 的羽毛降解效果见图 3, 由图 3 可见, 处理的羽毛明显地被降解, 对照的羽毛未出现明显的降解迹象。

不同发酵时间对羽毛降解效果见表 1。由表 1 可知, 当 DJ 菌株在羽毛发酵培养基中培养 10 d, 羽毛的降解率几乎达到最高, 10 d 后降解率趋向稳定 (约 50%); 发酵液的 pH 值逐渐升高, 当达到 8 d 时发酵液 pH 达到最高 9.1, 而后 pH 逐渐降低趋于稳定。发酵液中胞外碱性蛋白酶的活性逐渐增加, 后期逐渐降低。

2.4 羽毛水解产物的氨基酸分析结果

将羽毛发酵液通过浓缩, 去掉大分子蛋白后进行薄层层析 (TLC), 层析结果见图 4。由图 4 可知, 羽毛水解产物中可能含有半胱氨酸、酪氨酸、脯氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和谷氨酸等自由氨基酸。

表 1 不同发酵时间对羽毛的降解率

Table 1 Effects of incubation period on feather degradation by DJ strain grown in shake culture

| 培养时间/d | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 |
|---------------------------------|-------|------|------|------|------|-------|-------|------|
| 降解率/% | — — — | 17.5 | 25.5 | 31.3 | 43.8 | 48.9 | 49.4 | 51.2 |
| pH | 6.7 | 8.0 | 8.5 | 9.0 | 9.1 | 8.9 | 8.4 | 8.4 |
| 碱性蛋白酶活/ (U · mL ⁻¹) | — — — | 29.5 | 39.3 | 69.3 | 87.8 | 109.1 | 216.4 | 74.8 |

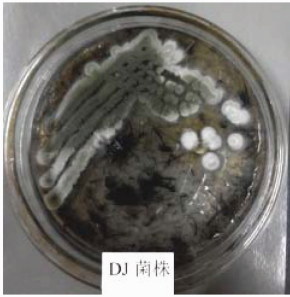


图 1 DJ 菌株在羽毛粉平板上的菌落图

Fig. 1 Colonies of DJ strain growing on feather meal plate

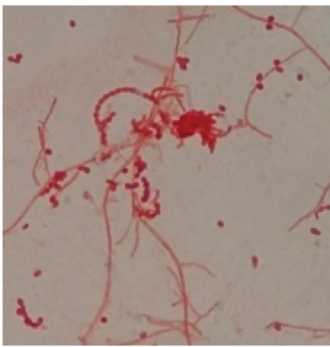


图 2 沟 DJ 菌株的显微图

Fig. 2 Cell morphology of DJ strain

(a) 接种 DJ 菌株前的羽毛状况图



(b) 发酵培养 4 d 的羽毛降解图

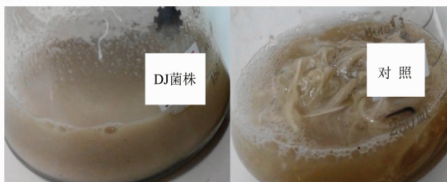


图 3 发酵培养中羽毛的降解图

Fig. 3 Degradation of feathers by DJ strain

(a, b: 左边三角瓶为处理, 右边三角瓶为对照)

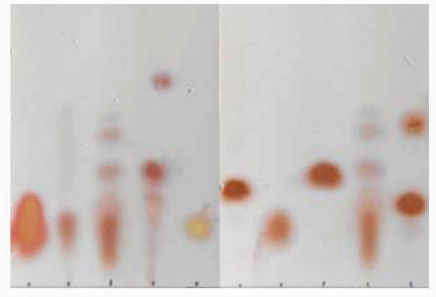


图 4 羽毛水解产物中的氨基酸 TLC 图

Fig. 4 Thin layer chromatography (TLC) plate showing amino acids composition of feather hydrolysate

样: 发酵液样品; Gly: 甘氨酸; C: 半胱氨酸;
T: 酪氨酸; P: 脯氨酸; V: 缬氨酸; S: 丝氨酸;
M: 甲硫氨酸; Glu: 谷氨酸

2.5 粗酶液的酶学性质结果

2.5.1 最适反应温度和最适反应 pH 结果 反应温度 and 反应 pH 对蛋白酶活性的影响分别见图 5 和图 6。图 5 可见, 蛋白酶最适反应温度为 45 °C; 当温度低于 40 °C 或高于 55 °C, 活性显著下降, 不到最适反应温度活性的 80%, 这表明反应温度对酶活性影响极显著。由图 6 可见, 随着反应 pH 升高, 酶活性逐渐提高, 最适 pH 为 10.0; 当反应 pH 高于 10.0 时, 活性降低。

2.5.2 金属离子与抑制剂对活性的影响结果 不同金属离子和抑制剂对活性的影响结果见表 2。由表 2 可知, K⁺、Ca²⁺、Na⁺ 和 Mg²⁺ 对活性具有一定的促进作用; Mn²⁺ 对活性有显著地促进作用, 能提高活性 60%。螯合剂 EDTA 和抑制剂 PMSF 能显著地抑制活性, 分别使活性仅保留 28.9% 和 55.0%。

2.5.3 3 种蛋白酶对羽毛降解的比较结果 3 种蛋白酶对羽毛降解结果见表 3。由表 3 可见, 粗酶液对羽毛降解率达到 20.9%, 碱性蛋白酶的降解率为 8.8%, 而木瓜蛋白酶几乎不能降解羽毛; 该结果表明粗酶液对羽毛的降解效果明显高于商品化木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶, 具有较强的应用价值。

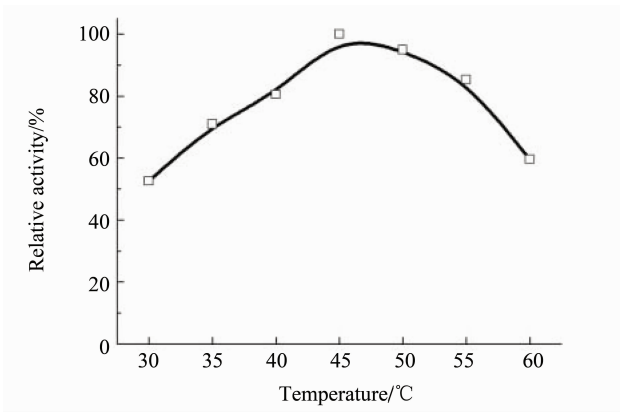


图 5 反应温度对酶活的影响

Fig. 5 Effects of temperature on the protease activity

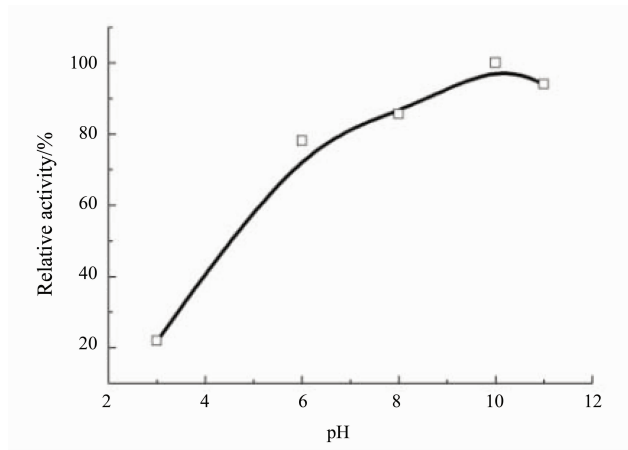


图 6 反应 pH 对酶活的影响

Fig. 6 Effects of pH on the protease activity

表 2 金属离子和抑制剂对活性的影响结果

Table 2 Effects of metal cations and protease inhibitors on protease activity

| 试剂 | 浓度/mmole | 相对酶活/% | 试剂 | 浓度/mmole | 相对酶活/% |
|------------------|----------|--------|------------------|----------|--------|
| 无试剂 | 0.0 | 100.0 | Mg ²⁺ | 1.0 | 110.3 |
| K ⁺ | 1.0 | 103.1 | Mn ²⁺ | 1.0 | 160.0 |
| Ca ²⁺ | 1.0 | 106.8 | EDTA | 1.0 | 28.9 |
| Na ⁺ | 1.0 | 107.9 | PMSF | 1.0 | 55.0 |

表 3 3 种蛋白酶对羽毛降解效果

Table 3 Effects of 3 kinds of proteases on feather degradation

| 酶种类 | 粗酶液 | 碱性蛋白酶 | 木瓜蛋白酶 |
|---------|------|-------|-------|
| 羽毛降解率/% | 20.9 | 8.8 | 0.5 |

2.5.4 对不同自然底物的水解结果 对不同底物的水解结果见表 4。由表 4 可知，蛋白酶对酪蛋白的水解能力最强，次之是大豆分离蛋白（48.5%）、较差为明胶（26.9%），最差是 BSA（15.7%）。蛋白酶对 4 种底物的水解产物 SDS-PAGE 电泳图（见图 7）。由图 7 可见，蛋白酶对酪蛋白和大豆分离蛋白的水解效果较好，水解产物中的蛋白条带不明显；而对 BSA 的水解效果较差，水解产物中有大量的不同分子量的蛋白条带，该电泳图与测定水解活性结果一致。

表 4 不同自然底物的水解结果

Table 4 Hydrolysis effects of different natural substrates

| 底物 | 酪蛋白 | 大豆分离蛋白(SPI) | BSA | 明胶 |
|--------|-----|-------------|-------|-------|
| 相对酶活/% | 100 | 48.58 | 15.74 | 26.87 |

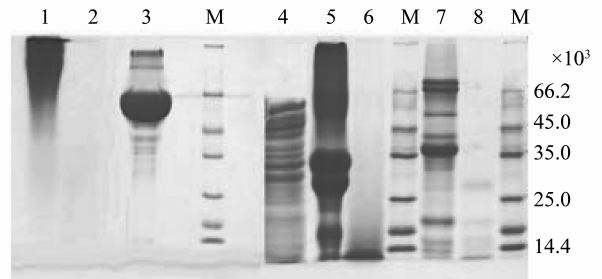


图 7 4 种底物的水解产物的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the hydrolysates of 4 natural substrates

1: 明胶 (-); 2: 明胶 (+); 3: BSA (-);
4: BSA (+); 5: 酪蛋白 (-);
6: 酪蛋白 (+); 7: SPI (-); 8: SPI (+);
M: 蛋白 Marker

3 讨论

目前，从自然界中分离获得对羽毛有降解作用的微生物已有报道，但是很少应用于工业；主要是这些微生物对羽毛的降解能力有限。究其原因是当 w (羽毛粉) 高于 1.5% 时，菌株产生的胞外蛋白酶被抑制，导致羽毛粉的降解效率降低^[13]；这正如 JAIN R 等报道的 *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 菌

株对 $w = 0.5\%$ 的羽毛降解率为 96.6%，对 $w = 2.0\%$ 羽毛粉的降解率仅为 72.1%^[14]；王继勇等分离的羽毛降解菌株对 $w = 1.0\%$ 羽毛粉的最高降解率仅为 71.3%^[2]。本文分离的 DJ 菌株对 $w = 5.0\%$ 的羽毛粉仍有 51.2% 的降解率，这表明该菌株比目前报道的多数菌株都具有较强的应用潜力。

DJ 菌株产生的胞外酶能分别被 EDTA 和 PMSF 显著地抑制活性，这表明 DJ 菌株分泌的胞外蛋白酶的活性中心与金属离子和丝氨酸有关，且最适反应 pH 为 10.0；该结果与朱友峰等报道的角蛋白酶可能是一种丝氨酸金属蛋白酶，最适 pH 为 9.0 的结果相一致^[1]。该酶与一般的内肽酶（碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶）相比，对羽毛具有极强的水解能力，羽毛水解产物中含有多种自由氨基酸；并且对内肽酶几乎不能水解的亲水性自然底物（如明胶和 BSA）都具有较强的水解效果，这表明该酶具有广泛的肽键选择性，具有良好的开发价值和应用前景。今后将对该酶基因进行克隆表达、纯酶的性质、结构与功能，以及对羽毛的降解机理等方面进行深入的研究。

参考文献：

- [1] 朱友峰, 岳寿松, 宋爱荣, 等. 降解羽毛的嗜麦芽窄食单胞菌 YHYJ-1 角蛋白酶纯化及酶学性质研究[J]. 西南农业学报, 2013, 26(3): 982-986.
ZHU Y F, YUE S S, SONG A R, et al. Purification and characterization of a novel keratinase from feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain YHYJ-1 [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(3): 982-986.
- [2] 王继勇, 何敏, 陈聪, 等. 羽毛降解菌的筛选及其产酶特性[J]. 武汉大学学报(理学版), 2015, 61(2): 183-186.
WANG J Y, HE Min, CHEN C, et al. Isolation and characteristics of enzyme production of feather-degrading bacteria[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 2015, 61(2): 183-186.
- [3] MOUSAVI S, SALOUTI M, SHAPOURY R, et al. Optimization of Keratinase Production for Feather Degradation by *Bacillus subtilis* [J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2013, 6(8): 1-5.
- [4] MAZOOTTO A M, COELHO R R R, CEDROLA S M, et al. Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged fermentation[J]. Enzyme Research, 2011, 2011: 1-7.
- [5] ONIFADE A A, AI-SANE N A, AI-MUSALLAM A A, 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.
- [6] LIN Xiang, 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.
- [7] 李金婷, 路福平, 李玉, 等. 高效降解羽毛角蛋白菌株的筛选与鉴定[J]. 天津科技大学学报, 2010, 25(6): 14-17, 29.
LI J T, LU F P, LI Yu, et al. Screening and identification of a high efficient keratin-degrading strain [J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 1992, 58(10): 3271-3275.
- [8] BRANDELLI A, SALA L, KALIL S J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products [J]. Food Research International, 2015, 73(SI): 3-12.
- [9] CAI Chenggang, LOU Bing-gan, ZHENG Xiaodong. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 2008, 9(1): 60-67.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2005: 485-487.
SAMBROOK J, RUSSELL D W, HUANG P T, et al. Molecular cloning a laboratory manual [M]. 3th ed. Beijing: Science Press, 2005: 485-487.
- [11] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA [J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.
XU P, LI W J, XU L H, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes [J]. Journal of Microbiology China, 2003, 30(4): 82-84.
- [12] SB/T 10317-1999. 中华人民共和国专业标准蛋白酶活力测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
SB/T 10317-1999. The professional standards of the People's Republic of China, measurement of proteinase activity [S]. Beijing: Standards Press of China, 1999.
- [13] KANCHANA R, MESTA D. Native feather degradation by a *Keratinophilic* fungus [J]. International Journal of Chem Tech Research, 2013, 5(6): 2947-2954.
- [14] JAIN R, PRAKASH C J, AGRAWALS C. Feather degradation by *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 [J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(3): 973-978.