



# 一株可高效降解羽毛的铜绿假单胞菌的分离、鉴定、产酶条件优化及其酶活研究

杨梦莹, 庞坤容, 潘江欣, 张红岩\*, 王一兵, 姜明国, 申乃坤\*

广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西多糖材料与改性重点实验室, 广西高效微生物与植物资源利用重点实验室, 广西 南宁 530006

杨梦莹, 庞坤容, 潘江欣, 张红岩, 王一兵, 姜明国, 申乃坤. 一株可高效降解羽毛的铜绿假单胞菌的分离、鉴定、产酶条件优化及其酶活研究. 微生物学报, 2022, 62(3): 968–981.

Yang Mengying, Pang Kunrong, Pan Jiangxin, Zhang Hongyan, Wang Yibing, Jiang Mingguo, Shen Naikun. Isolation, identification, optimization of enzyme-producing conditions and enzymatic activity of a feather-degradable *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 968–981.

**摘要:**【目的】筛选海洋环境产角蛋白酶菌株, 研究其发酵条件及酶学性质, 为后续开发和利用海洋微生物降解废弃羽毛提供菌种资源和理论依据。【方法】采集广西北部湾某海鸭养殖场淤泥, 用酪蛋白平板初筛和角蛋白酶活复筛获得羽毛降解效果好的菌株, 并进行形态学和分子生物学鉴定; 利用单因素和正交试验对菌株产酶条件进行优化, 最后对酶学性质及羽毛降解产物的游离氨基酸组成进行研究。【结果】筛选到 1 株可高效降解羽毛的菌株, 经鉴定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* Gxun-7)。最佳产酶条件为: 羽毛 25 g/L,  $Zn^{2+}$  0.10 g/L、初始 pH 8.0、发酵温度 32.5 °C、发酵时间 48 h, 酶活力达 124.03 U/mL, 较优化前提高了 2.3 倍; 酶学性质分析表明, 该角蛋白酶最适作用温度和 pH 分别为 70 °C 和 8.0, 化学试剂巯基乙醇可使酶活提高 6.16 倍。

**基金项目:** 国家自然科学基金(31660022, 32060020); 广西科技重点研发计划(AA18242026); 广西自然科学基金(2018GXNSFAA28113, 2019GXNSFAA185003); 广西研究生教育创新计划(YCSW2021156); 广西民族大学相思湖青年学者创新团队; 广西民族大学科研基金(2018KJQD17); 广西民族大学研究生创新计划(gxun-chxps202078)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31660022, 32060020), by the Science and Technology Major Project of Guangxi (AA18242026), by the Natural Science Foundation of Guangxi Province (2018GXNSFAA28113, 2019GXNSFAA185003), by the Guangxi Graduate Education Innovation Plan Project (YCSW2021156), by the Xiangsihu Young Scholars Innovative Research Team of Guangxi University for Nationalities, by the Scientific Research Project of Guangxi University for Nationalities (2018KJQD17) and by the Graduate Student Innovation Project of Guangxi University for Nationalities (gxun-chxps202078)

\*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Hongyan, hongyanzhang@163.com; SHEN Naikun, shennaik05@126.com

Received: 10 June 2021; Revised: 23 August 2021; Published online: 26 September 2021

而苯甲基磺酰氟(PMSF)使相对酶活降至 15.00%，该酶耐盐性较好(20% NaCl 中相对酶活为 74.29%)；羽毛降解产物中检测到 16 种氨基酸，7 种为必需氨基酸，总的游离氨基酸含量高达 2 329.80 mg/L，其中缬氨酸含量最高为 575.89 mg/L。【结论】海洋来源的 *P. aeruginosa* Gxun-7 具有高效降解羽毛角蛋白能力，所产碱性角蛋白酶具有耐温、耐盐等特性，具有潜在的应用价值。

**关键词：**羽毛降解；角蛋白酶；铜绿假单胞菌；酶活

## Isolation, identification, optimization of enzyme-producing conditions and enzymatic activity of a feather-degradable *Pseudomonas aeruginosa* strain

YANG Mengying, PANG Kunrong, PAN Jiangxin, ZHANG Hongyan\*, WANG Yibing, JIANG Mingguo, SHEN Naikun\*

Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modifications, Guangxi Key Laboratory of Microbial Plant Resources and Utilization, School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, Guangxi, China

**Abstract: [Objective]** The aim of this study was to screen keratinase-producing strains from marine environment, investigate fermentation conditions and enzymatic properties, so as to provide strain resources and theoretical basis for the subsequent development and utilization of marine microbes to degrade feather waste. **[Methods]** The sludge from a marine duck farm in Beibu Gulf, Guangxi was used for bacterial isolation, and the strain with efficiently feather degradation ability was obtained by casein plate preliminary screening and keratinase activity re-screening. The strain was identified by morphology and molecular biology, and the enzyme-producing conditions were optimized by single-factor and orthogonal experiment. Finally, amino acid composition of feather degradation products and enzymatic properties were also studied. **[Results]** A strain of efficiently degrading feather was selected and identified as *Pseudomonas aeruginosa* Gxun-7. The optimum enzyme-producing conditions: feather 25 g/L,  $Zn^{2+}$  0.10 g/L, initial pH 8.0, fermentation temperature 32.5 °C, fermentation time 48 h, and the keratinase activity was 124.03 U/mL which was 2.3 times as high as before optimization. The analysis of enzyme properties showed that the optimum temperature was 70 °C and the optimum pH was 8.0. In the chemical reagent, mercaptoethanol could enhance enzymatic activity by 6.16 times, while phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) decreased its relative activity to 15.00%. And it had excellent salt resistance (the relative activity in 20% NaCl retained 74.29%). There were 16 kinds of amino acids in the feather degradation products, including 7 kinds of essential amino acids. The total free amino acids content was as high as 2 329.80 mg/L, and the highest valine content was 575.89 mg/L. **[Conclusion]** *P. aeruginosa* Gxun-7 from marine environment had the ability to degrade feather keratin efficiently. The alkaline keratinase had excellent temperature and salt resistances, which had potential application value.

**Keywords:** feather degradation; keratinase; *Pseudomonas aeruginosa*; enzymatic activity

家禽产业作为我国畜牧业领域中增长较快的领域,年增速可达 8%–10%。随之,每年产生的羽毛量也超过了 100 万 t<sup>[1]</sup>。除少量羽毛被服装、体育等行业利用外,大部分羽毛均被丢弃或填埋,不但会引发健康问题,加剧环境污染<sup>[2]</sup>,而且会造成蛋白质资源的浪费。羽毛蛋白质含量丰富,主要以角蛋白为主,占羽毛总蛋白的 90%<sup>[3]</sup>。由于角蛋白是一类不溶或微溶于水的硬性蛋白,分子间通过大量的二硫键、氢键和疏水作用形成稳定的三维结构,很难被常见的蛋白酶水解<sup>[4]</sup>。传统羽毛处理方法是采用高温、强酸强碱等进行降解,存在耗能高、污染大、氨基酸破坏严重、释放有毒气体等问题<sup>[5]</sup>。目前最有前途的替代方式是利用微生物进行降解,具有成本低、处理条件温和、不会破坏氨基酸等优点,是一种环境友好型的废弃物资源利用方式。

自然环境中存在着多种能够降解羽毛的微生物。1899 年, Ward 等<sup>[6]</sup>最早发现,真菌中 *Onygena equina* 能够降解羽毛,近年来分离到的 *Chrysosporium*<sup>[7]</sup>、*Aspergillus niger*<sup>[8]</sup>、*Trichophyton rubrum*<sup>[9]</sup>等真菌对羽毛具有较好降解能力,但大多为皮肤致病菌,不宜投入实际生产使用。而 *Streptomyces minutiscleroticus*<sup>[10]</sup>、*S. albidoflavus*<sup>[11]</sup>、*Thermoactinomyces*<sup>[12]</sup>等可降解羽毛的放线菌,培养周期过长,也不适宜应用。因此,细菌成为羽毛降解菌的研究热点之一,革兰氏阳性菌中 *Bacillus licheniformis*<sup>[13]</sup>、*B. subtilis*<sup>[14]</sup>和 *B. cereus*<sup>[15]</sup>等芽孢杆菌对羽毛具有较好降解能力;革兰氏阴性菌中 *Vibrio*<sup>[16]</sup>、*Pseudomonas*<sup>[17]</sup>和 *Stenotrophomonas* 属<sup>[18]</sup>等也具有较好降解能力,如 Grazziotin 等<sup>[16]</sup>从养鸡场鸡毛中分离到一株具有生产高角蛋白酶活性的 *Vibrio* sp. kr2; Chaturvedi 等从被污染的池塘中筛选到 *P. aeruginosa* SDS3,经 5 d 的发酵,

角蛋白酶活为 15.4 U/mL<sup>[17]</sup>; Wu 等筛选到的 *S. maltophilia* DHHJ 在 40 °C 培养 5 d 后酶活为 10.0 U/mL<sup>[18]</sup>。总之,尽管目前已筛选出大量可降解羽毛菌株,但仍存在降解周期长、酶活低等系列问题,导致目前废弃羽毛工业化生产受到影响。菌株是发酵工业的灵魂,筛选羽毛降解效果好、抗逆性强的优良菌株是废弃羽毛工业化应用的当务之急。

与陆地微生物相比,海洋微生物适应了高盐、寡营养等特殊环境,具有活性高、抗逆性强等优点;产生的蛋白酶往往耐受温度、pH 范围广,且具有一定的耐盐性。然而,有关从海洋环境分离羽毛降解菌的研究较少。广西北部湾蕴含丰富的微生物资源,是我国生物多样性最为丰富的区域之一,也是研究海洋微生物的热点区域之一<sup>[19]</sup>。本研究旨在从广西北部湾海鸭养殖场淤泥筛选出高效降解羽毛的菌株,并对菌株产酶条件、酶学性质及降解产物氨基酸组成进行研究,以期寻找新的角蛋白酶资源,为今后废弃羽毛的降解及相关饲料、肥料产品的开发奠定基础,并为海洋环境菌种资源利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

样品采自广西北部湾某海鸭养殖场淤泥,羽毛来自屠宰场鸡、鸭羽毛,蒸馏水清洗干净,烘箱烘干,剪成 2 cm 左右片段备用。

### 1.2 培养基

LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, pH 7.0。

初筛培养基(g/L)<sup>[20]</sup>: 酪蛋白 30.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7, NaCl 5.0, MgSO<sub>4</sub> 0.1, 琼脂 20.0, pH 7.0。

复筛培养基(g/L)<sup>[20]</sup>: 羽毛 10.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.7,  $\text{NaCl}$  5.0,  $\text{MgSO}_4$  0.1, pH 7.0。

### 1.3 主要试剂和仪器

干酪素, 购自上海源叶生物科技有限公司; 其他均为国产分析纯。

Multiskan Go 全波长酶标仪, 美国 Thermo Scientific 公司; HNYC-1102 智能恒温培养振荡器, 天津欧诺仪器股份有限公司; L-8900 全自动氨基酸分析仪, 日立高新技术公司; Regulus 8100 场发射扫描电子显微镜, 日立高新技术公司。

### 1.4 菌株的筛选

#### 1.4.1 初筛

称取 10 g 样品加入 50 mL 无菌水, 30 °C、200 r/min 培养 30 min, 充分混匀, 涂布于初筛培养基进行培养。挑选透明圈大的菌株进行纯化, 同时甘油保藏菌株。

#### 1.4.2 复筛

将上述单菌落接种到 LB 培养基, 30 °C、200 r/min 过夜培养, 按照 1% (V/V) 的接种量接种到复筛培养基, 35 °C、200 r/min 发酵 48 h, 根据羽毛降解情况及酶活大小进行复筛。

### 1.5 菌株 Gxun-7 的鉴定

#### 1.5.1 形态与生理生化特征的鉴定

挑取单菌落划线于初筛培养基, 观察菌落的形态特征。采用革兰氏染色法, 在光学显微镜下观察菌体结构。通过扫描电子显微镜观察菌体形态及大小。部分生理生化鉴定方法参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[21]</sup>。

#### 1.5.2 16S rRNA 基因鉴定

以细菌基因组提取试剂盒提取的 DNA 为模板, 利用 16S rRNA 基因的通用引物(27F 和 1492R)进行 PCR 扩增。利用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测, 并送往上海生工生物工程股份有限公司测序。测得的基因序列提交至 NCBI 进行 BLAST 比对, 利用 MEGA 5.0 软件的 N-J

法构建菌株系统发育树, 确定菌株的分类地位。

### 1.6 菌株 Gxun-7 的产酶条件

#### 1.6.1 角蛋白酶活测定

测定方法参考文献[20]的方法进行。在 50 °C 下 1 min 催化酪蛋白产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸所需要的酶量, 定义为 1 个酶活性单位。

#### 1.6.2 单因素试验优化产酶条件

初始发酵培养基及培养条件为羽毛 10 g/L,  $\text{NaCl}$  5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.4 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.7 g/L, 初始 pH 7.0, 35 °C, 200 r/min, 接种量 1%, 装液量 50/250 mL, 发酵 48 h。改变以下单一条件, 研究不同单因素对菌株产角蛋白酶的影响。每组设 3 个平行, 结果取平均值(下同)。

(1) 羽毛浓度(g/L): 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0;

(2) 发酵温度(°C): 30.0、32.5、35.0、37.5、40.0;

(3) 初始 pH: 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0;

(4) 碳源: 分别添加浓度为 10 g/L 的葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、玉米粉、淀粉, 根据酶活大小确定最适碳源;

(5) 氮源: 分别添加浓度为 2 g/L 的酪蛋白、酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、玉米浆、硝酸铵、硫酸铵, 根据酶活大小确定最适氮源;

(6) 金属离子及浓度: 先分别添加浓度为 0.10 g/L 的  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ , 根据酶活大小确定最适金属离子种类, 进一步考察金属离子浓度(0.00、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 g/L)对酶活的影响。

#### 1.6.3 正交试验确定最佳产酶条件

根据单因素试验结果, 选择对菌株 Gxun-7 产酶影响大的 4 个因素, 进行四因素、三水平  $L_9(3^4)$  的正交试验优化, 从而确定最优的产酶条件。

## 1.7 粗酶液的酶学性质

粗酶液的制备: 按 1.6.3 方法获得的最佳产酶条件制备发酵液, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶液。

(1) 最适作用温度: 分别在不同温度(30、40、50、60、70、80、90、100 °C)反应, 测定角蛋白酶活性。以最高酶活为 100%, 计算不同温度下的相对酶活。每组试验设置 3 个平行, 结果取平均值(下同)。

(2) 最适作用 pH: 分别用不同 pH (6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0)的缓冲液配制角蛋白底物, 测定角蛋白酶活性。以最高酶活为 100%, 计算不同 pH 下的相对酶活。

(3) NaCl 浓度对酶活的影响: 分别添加不同浓度(1%、5%、10%、15%、20%)的 NaCl, 测定角蛋白酶活性。以未添加 NaCl 的酶活为 100%, 计算各浓度 NaCl 处理下的相对酶活。

(4) 化学试剂对酶活的影响: 分别添加相同浓度的化学试剂(乙二胺四乙酸(EDTA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、PMSF、巯基乙醇、二甲亚砜(DMSO)、异丙醇, 测定角蛋白酶活性。以未添加化学试剂的酶活为 100%, 计算各化学试剂处理下的相对酶活。

## 1.8 羽毛降解产物的游离氨基酸分析

羽毛降解液以 1:5 的比例用 5% 的磺基水杨酸沉淀 2 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液并通过 0.2 μm 的膜滤器, 采用 L-8900 全自动氨基酸分析仪进行检测。

## 1.9 数据处理与分析

试验数据用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行处理, 运用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

# 2 结果与分析

## 2.1 菌株的筛选

经过初筛及复筛, 编号为 7 的菌株透明圈最大(图 1A), 经过 48 h 的发酵, 可将培养基中 1% (*M/V*) 的羽毛几乎降解完全, 降解率大于 80% (图 1B), 酶活达 53.88 U/mL, 命名为 Gxun-7。

## 2.2 菌株 Gxun-7 的鉴定

### 2.2.1 形态及生理生化特征

菌株 Gxun-7 在酪蛋白平板上呈现微微的黄绿色, 菌落凸起, 表面光滑, 可渗入培养基生长, 能够溶解琼脂; 革兰氏染色为阴性, 扫描电子显微镜显示菌体呈杆状, 大小约为 1.5 μm×0.5 μm, 无芽孢(图 2)。菌株 Gxun-7 可以利用葡萄糖和

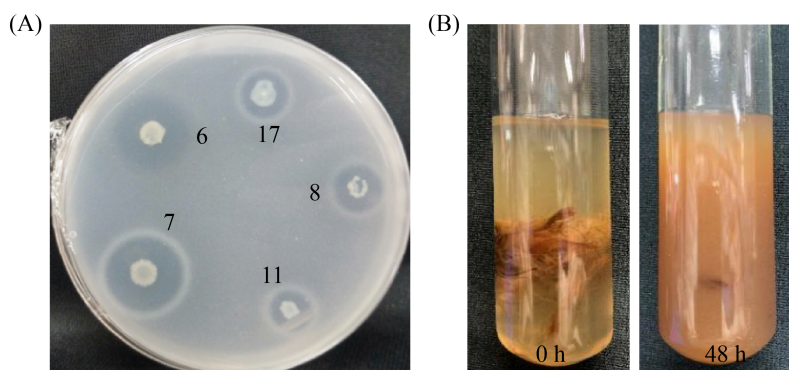


图 1 菌株的筛选

Figure 1 Screening of strains. A: transparent hydrolytic zones of different strains on the casein plate; B: degradation of feather by strain Gxun-7.

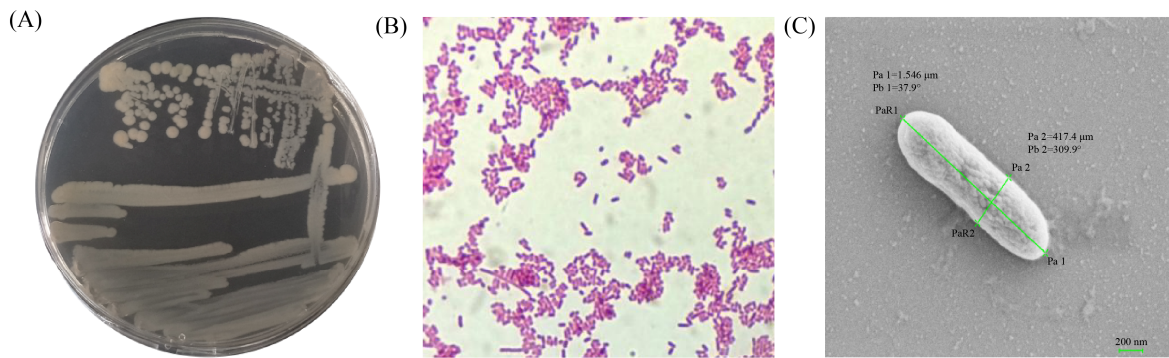


图 2 菌株 Gxun-7 的形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of strain Gxun-7. A: colony morphology; B: optical microscope image (100 $\times$ ); C: electron microscope image ( $3.0\times 10^4\times$ ).

果糖,但不能利用甘露醇、木糖、鼠李糖、麦芽糖和七叶苷等碳源。氧化酶、明胶和硝酸盐还原试验结果呈阳性,其他试验结果均为阴性(表 1)。

### 2.2.2 16S rRNA 基因序列分析

将测序所得序列进行 BLAST 比对发现,菌株 Gxun-7 与铜绿假单胞菌的 16S rRNA 基因序列同源性最高,为 99.8%。利用 MEGA 5.0 软件的 N-J 法构建系统发育树(图 3),得知菌株 Gxun-7

(MW579860.1) 和铜绿假单胞菌 JCM5962<sup>T</sup> (BAMA01000316) 亲缘关系最近。综合菌株 Gxun-7 的形态特征、革兰氏染色、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列,最终鉴定为铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)。

## 2.3 菌株 *P. aeruginosa* Gxun-7 的产酶条件

### 2.3.1 羽毛浓度对菌株产酶的影响

由图 4A 可知,在 5–20 g/L 的羽毛浓度之间,角蛋白酶活不断增加;羽毛浓度超过 20 g/L,酶活随浓度升高而降低。因此,菌株产酶的最佳羽毛浓度为 20 g/L。

### 2.3.2 发酵温度和初始 pH 对菌株产酶的影响

如图 4B、4C 所示,菌株产酶的最佳发酵温度为 32.5 °C,酶活为 69.69 U/mL;最佳初始 pH 为 8.0,酶活为 80.69 U/mL。

### 2.3.3 碳源对菌株产酶的影响

如图 4D 所示,添加淀粉、玉米粉、麦芽糖和蔗糖为碳源时,对菌株产酶影响较小,且差异不显著;但当添加葡萄糖和果糖为碳源时,酶活显著性降低。因此,菌株产酶发酵培养基中无需外源添加碳源。

### 2.3.4 氮源对菌株产酶的影响

由图 4E 可知,在有机氮中,酪蛋白和酵母粉对菌株产酶影响较小,且差异不显著,而牛

表 1 菌株 Gxun-7 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain Gxun-7

Test items	Results
Glucose	+
Fructose	+
Mannitol	-
Xylose	-
Rhamnose	-
Maltose	-
Aesculin	-
Tween-80	-
VP	-
Methyl red	-
Gelatin	+
Nitrate reduction	+
Urease	-
Oxidase	+
Benzazole	-

+ : positive; - : negative.



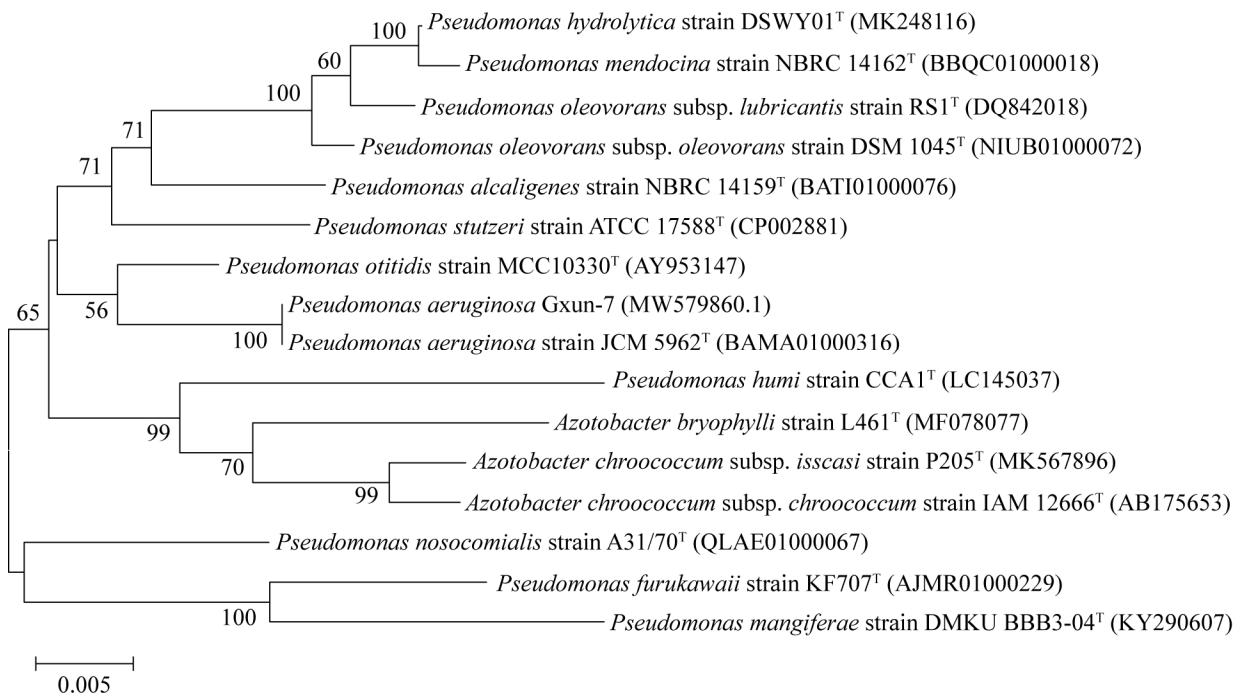


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 Gxun-7 系统发育树

Figure 3 Strain Gxun-7 phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA gene sequence. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank; numbers at the nodes indicate the bootstrap values on N-J analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.005 represent sequence divergence.

肉膏、蛋白胨和玉米浆对产酶起不同程度的抑制作用；在无机氮中，硝酸铵和硫酸铵均对菌株产酶有抑制作用。因此，该菌株产酶发酵培养基中无需外源添加氮源。

### 2.3.5 金属离子对菌株产酶的影响

图 4F 显示，与对照组相比， $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 对菌株产酶起抑制作用， $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 对产酶起促进作用，特别是  $\text{Zn}^{2+}$ 对菌株产酶促进作用最大。进一步对  $\text{Zn}^{2+}$ 的浓度优化结果如图 4G 所示， $\text{Zn}^{2+}$ 的最佳添加浓度为 0.05 g/L，角蛋白酶活最高为 64.08 U/mL。

### 2.3.6 正交试验优化 *P. aeruginosa* Gxun-7 的最佳产酶条件

根据单因素试验结果，选择对菌株产酶影响大的发酵温度(A)、羽毛浓度(B)、初始 pH(C)及  $\text{Zn}^{2+}$ 浓度(D)这 4 个因素进行正交试验优化

(表 2)，进一步确定各因素的最佳条件。

由正交试验和方差分析的结果(表 3、表 4)可知，发酵温度和  $\text{Zn}^{2+}$ 浓度对菌株产酶具有极显著影响( $P < 0.01$ )，而羽毛浓度和 pH 对菌株产酶的影响不显著( $P > 0.05$ )，4 个因素对菌株产酶的影响为： $\text{Zn}^{2+}$ 浓度>温度>pH>羽毛浓度，且最优组合为  $A_1B_3C_1D_3$ ，即温度 32.5 °C、羽毛 25 g/L、pH 8.0、 $\text{Zn}^{2+}$  0.10 g/L。由于最优组合没有出现在正交试验表中，需要进行 3 组平行验证试验酶活为(124.03±2.65) U/mL，较优化前提高了 2.3 倍。

## 2.4 粗酶液的酶学性质

### 2.4.1 最适作用温度

如图 5A 所示，该酶在 30–80 °C 之间，能够保持较高的酶活性；70 °C 时，酶活最高为 64.75 U/mL；反应温度超过 80 °C，酶活有所降

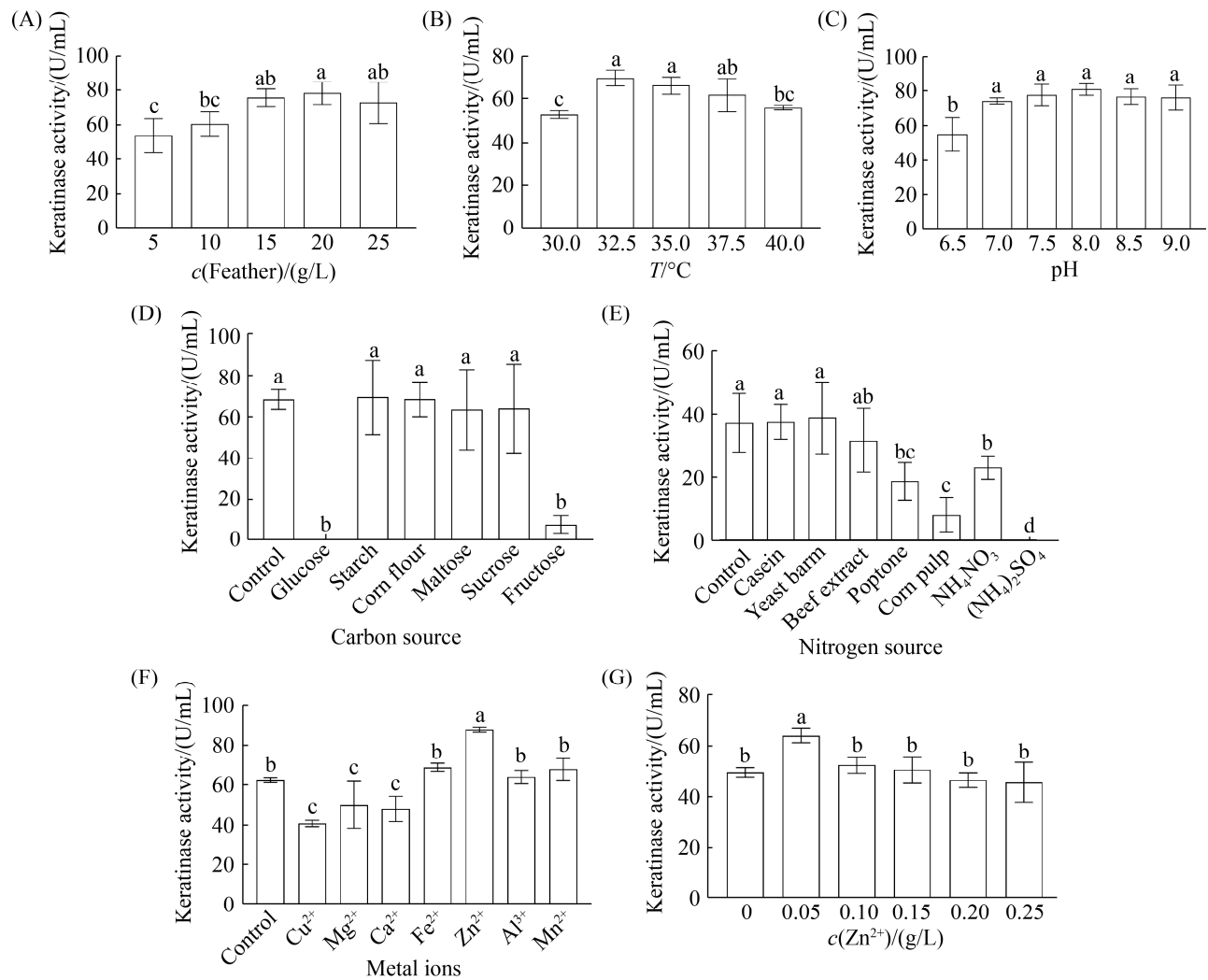


图 4 *P. aeruginosa* Gxun-7 产酶条件的优化

Figure 4 Optimization of enzyme-producing conditions of *P. aeruginosa* Gxun-7. A: effect of feather concentration on enzyme production; B: effect of temperature on enzyme production; C: effect of initial pH on enzyme production; D: effect of carbon source on enzyme production; E: effect of nitrogen source on enzyme production; F: effect of metal ions on enzyme production; G: effect of  $Zn^{2+}$  concentration on enzyme production. Error bars in figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

表 2 正交试验因素水平设计

Table 2 Factor and level table designed of orthogonal experiment

Levels	Factors			
	A	B	C	D
	$T/^\circ C$	Feather/(g/L)	pH	$Zn^{2+}$ /(g/L)
1	32.5	20	8.0	0.05
2	35.0	15	8.5	0.00
3	37.5	25	9.0	0.10

低, 但相对酶活仍维持在 60% 以上。由此可见, 该酶作用温度范围较广, 最适作用温度为  $70^\circ C$ 。

### 2.4.2 最适作用 pH

如图 5B 所示, 该酶在 pH 等于 8.0 时, 角蛋白酶活性最高为  $77.63 U/mL$ ; pH 大于或低于 8.0, 酶活均降低; 当 pH 为 8.5 时, 粗酶液



表 3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal experiment

Number	A	B	C	D	Keratinase activity/(U/mL)
1	1	1	1	1	119.60±1.70
2	1	2	2	2	97.85±4.06
3	1	3	3	3	118.57±8.87
4	2	1	2	3	113.36±15.14
5	2	2	3	1	111.20±3.14
6	2	3	1	2	98.11±13.75
7	3	1	3	2	64.56±11.28
8	3	2	1	3	105.89±10.46
9	3	3	2	1	101.20±8.35
k <sub>1</sub>	112.00±12.26	99.17±30.14	107.87±10.88	110.67±9.21	
k <sub>2</sub>	107.56±8.25	104.98±6.72	104.14±8.16	86.84±19.29	
k <sub>3</sub>	90.55±22.63	105.96±11.03	98.11±29.29	112.61±6.37	
R	21.45±12.26	6.79±11.03	9.76±10.88	25.77±6.37	
Primary and secondary orders	D>A>C>B				
Optimal combination	A <sub>1</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	

表 4 正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment

Source of variation	Square sum	Degree of freedom	Average of variance	F-value	P-value
Calibration model	6 692.29 <sup>a</sup>	8	836.54	9.04	0.00
Intercept	245 744.49	1	245 744.49	2 656.81	0.00
A	1 925.39	2	962.70	10.41	0.00 <sup>**</sup>
B	189.84	2	94.92	1.03	0.38
C	428.53	2	214.26	2.32	0.13
D	3 705.95	2	1 852.97	20.03	0.00 <sup>**</sup>
Error	1 664.93	18	92.50		
Total	296 862.13	27			
Corrected total	8 357.21	26			

\*\*：extremely significant level of 1% ( $P<0.01$ ).

在 Tris-HCl 中的酶活性高于 Gly-NaOH；当 pH 为 10.0 时，仍保持 82.74% 的酶活性。由此可见，该酶的最适作用 pH 为 8.0。

#### 2.4.3 NaCl 浓度对酶活的影响

如图 5C 所示，当 NaCl 浓度为 1% 时，该酶的酶活最高为 77.90 U/mL；NaCl 浓度大于 1%，酶活逐渐下降；粗酶液在 20% 的 NaCl 浓度中，相对酶活仍达到 74.29%。由此可见，该

酶的耐盐性较好。

#### 2.4.4 化学试剂对酶活的影响

如图 5D 所示，该酶对 DMSO 和异丙醇不敏感，对巯基乙醇极其敏感，酶活性能提高 6.16 倍，达到 360.09 U/mL。SDS 对酶活的影响不显著，EDTA 有显著的激活作用，相对酶活达到 137.33%。而 PMSF 有显著的抑制作用，相对酶活仅为 15.00%。

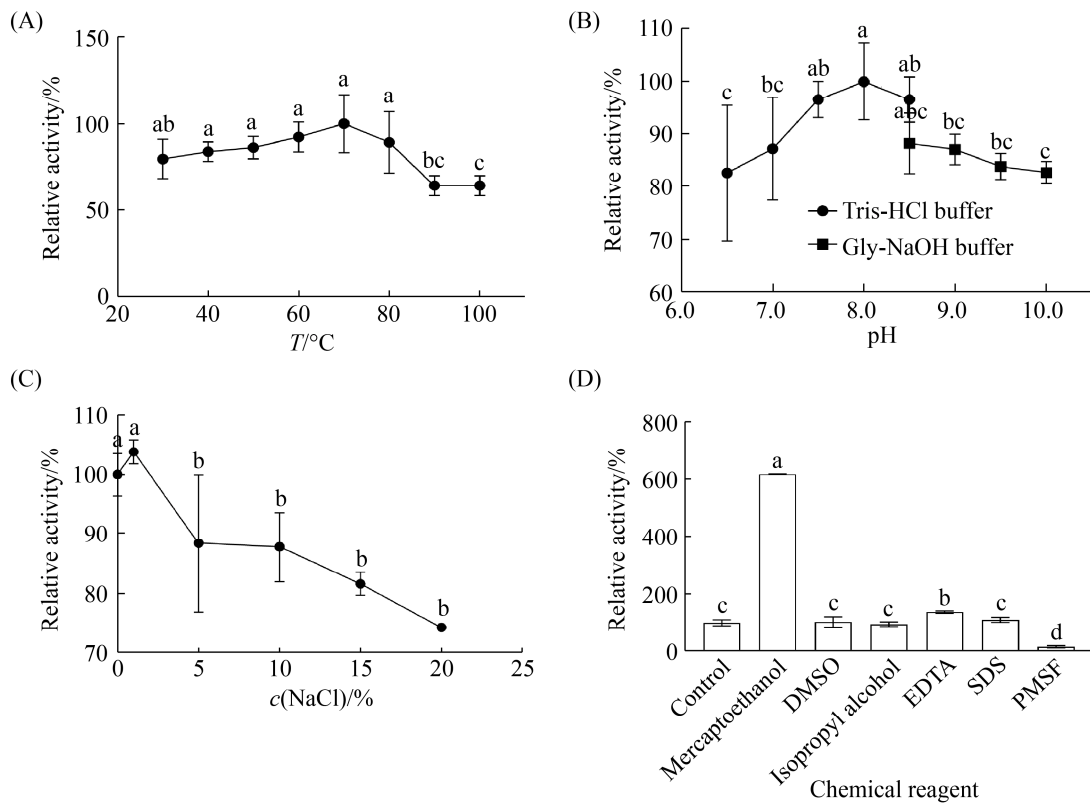


图 5 粗酶液的酶学性质

Figure 5 The enzymatic properties of crude enzyme. A: optimal temperature; B: optimal pH; C: effect of NaCl concentration on the enzyme activity; D: effect of chemical reagent on the enzyme activity. Error bars in figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 2.5 羽毛降解产物的游离氨基酸分析

由表 5 结果可以看出, *P. aeruginosa* Gxun-7 羽毛降解液中共检测到 16 种游离氨基酸, 总含量达到 2 329.80 mg/L, 远高于目前文献报道<sup>[22-23]</sup>。而对照组总游离氨基酸含量仅有 16.56 mg/L。16 种氨基酸中有 7 种为必需氨基酸(缬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸和赖氨酸), 含量占总的游离氨基酸含量的 67.88%, 其中缬氨酸含量最高为 575.89 mg/L。因此, 菌株 *P. aeruginosa* Gxun-7 羽毛降解液氨基酸含量丰富, 且多为必需氨基酸, 在氨基酸有机肥和动物饲料蛋白产品开发方面有巨大潜力。

### 3 讨论

目前文献报道降解羽毛的菌株主要为真菌、放线菌及细菌, 真菌主要为黄曲霉、环孢菌等人类致病菌, 放线菌主要是链霉菌类, 由于真菌和放线菌不易实现大规模培养, 使其在生产中受到一定限制。而细菌具有易培养、代谢繁殖较快等优点, 受到研究者广泛关注。但目前已研究和鉴定的微生物大多来源于陆地环境, 海洋微生物还不到总量的 5%<sup>[24]</sup>。海洋微生物长期处在极端环境, 逐渐形成了多种独特的代谢机制, 其产物更加新颖, 生产的蛋白酶对环境适应性更强, 如 Chellappan 等从海洋环境

表 5 羽毛降解产物游离氨基酸成分  
Table 5 Free amino acid composition of feather degradation products

Free amino acid	Not inoculated with bacteria	Content (mg/L)		
		<i>P. aeruginosa</i> Gxun-7 (48 h)	<i>B. licheniformis</i> BBE11-1 <i>S. maltophilia</i> BBE11-1 (48 h) <sup>[22]</sup>	<i>B. pumilus</i> GRK (48 h) <sup>[23]</sup>
Val	0.98	575.89	207.51	2.31
Phe	0.45	361.37	183.73	0.00
Leu	0.00	257.93	126.61	0.00
Ile	0.00	232.88	72.96	15.00
Ser	1.04	134.43	14.61	9.84
Gly	0.59	114.36	14.34	7.61
Asp	0.40	107.13	15.55	1.46
Glu	1.50	88.01	20.19	2.23
Hypro	8.50	87.57	0.00	0.00
Thr	0.00	78.58	15.74	0.00
Cys	0.00	67.46	0.00	0.00
Arg	0.00	66.53	22.13	3.55
Ala	1.12	61.50	10.05	0.69
Met	0.00	54.07	0.00	7.24
His	0.00	21.30	0.00	0.00
Lys	0.00	20.79	20.94	10.81
Tyr	0.00	0.00	171.53	0.00
Pro	0.52	0.00	0.00	0.00
Total	16.56	2 329.80	895.89	60.74

中分离到 *Engyodontium album* BTMFS10, 该菌株产生的丝氨酸蛋白酶具有广泛的温度和 pH 耐受性<sup>[25]</sup>。本研究从海洋环境分离到一株高效降解羽毛的 *P. aeruginosa* Gxun-7, 经过对发酵条件优化发现, 羽毛降解过程中无需外源添加碳源及氮源, 可大大节约发酵成本, 优化后酶活可达 124.03 U/mL, 比优化前提高了 2.3 倍。*P. aeruginosa* 广泛存在自然界的各种环境, 如土壤、水体和植物体内。但由于铜绿假单胞菌是动物和人类的条件性致病菌, 常会引起肺部及尿道感染, 具有固有和获得性的多重耐药性<sup>[26]</sup>, 因此对该菌的研究主要集中在条件致病性和耐药机制<sup>[27]</sup>, 其中分离自医院环境的铜绿假单胞

菌株 PAO1、LESB58 和 UCBPP-PA14 研究得较为深入<sup>[28]</sup>。近年来, 铜绿假单胞菌生防及降解活性引起了研究者们极大的关注, 一系列具有良好生防潜力<sup>[29]</sup>、石油降解<sup>[30]</sup>、羽毛降解<sup>[3]</sup>等活性的铜绿假单胞菌陆续被分离和鉴定。黄妙容等从鸡毛土壤中分离到一株 *P. aeruginosa* B1-2, 菌株降解 48 h 后角蛋白酶活性为 60.3 U/mL, 羽毛降解率为 85.7%<sup>[31]</sup>; Chaturvedi 等对 *P. aeruginosa* SDS3 的碳源、氮源及羽毛浓度进行优化, 优化后角蛋白酶活为 15.40 U/mL<sup>[17]</sup>。本研究获得的铜绿假单胞菌酶活远高于目前文献关于该菌株的报道, 但考虑到其潜在的致病性, 今后还应注意使用活菌对环境安全性的影响。可通过比较基因组学及代谢工程的方法, 对该菌株中的致病相关基因进行敲除, 降低其致病性和细胞毒性; 或通过基因工程手段异源表达其角蛋白酶的基因或基因簇, 通过酶分子改造进一步提高角蛋白降解能力, 为废弃羽毛产业化降解提供安全保障。

目前报道角蛋白酶的最适温度为 40–70 °C, 最适 pH 为 7.0–9.0<sup>[5,13,32]</sup>, 本研究 *P. aeruginosa* Gxun-7 所产角蛋白酶最适温度为 70 °C, 最适 pH 为 8.0, 与目前文献报道类似。但该角蛋白酶具有较好的耐盐性, 在 20% 的 NaCl 中相对酶活仍保持 74.29%, 高于钟泓波等报道的 SWJS33 产生的角蛋白酶(47.53%)<sup>[24]</sup>, 可能由于该菌株来源海洋环境, 所分泌的角蛋白酶在长期进化过程中适应了海洋的高盐环境。化学试剂 PMSF 为丝氨酸蛋白酶类抑制剂, 该角蛋白酶可被其强烈抑制, 相对酶活仅剩 15.00%, 说明该酶属于丝氨酸蛋白酶, 这和 Tatineni 等的研究结果<sup>[33]</sup>一致。大多数角蛋白酶可被 EDTA 抑制, 如 Zhang 等报道的 *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798 角蛋白酶几乎不耐受 EDTA<sup>[34]</sup>, 而本研究结果正与之相反, EDTA 对酶活有激活作用,

相对酶活提高至 137.33%，说明该酶的活性中心可能无金属离子，具体原因需要进一步研究。还原剂  $\beta$ -巯基乙醇对该角蛋白酶活性具有明显促进作用，可使酶活性提高 6.16 倍，这与大多数的报道相似，因为  $\beta$ -巯基乙醇能够破坏角蛋白酶的二硫键，帮助亚硫酸盐分解，从而增强酶的水解活性<sup>[35]</sup>。此外，该角蛋白酶在阴离子表面活性剂 SDS 存在下具有较好的稳定性，酶活可提高至 110.02%，这表现出了该酶在洗涤剂领域具有良好的应用前景。

羽毛被微生物降解后的产物中含有大量游离的氨基酸。彭政报道，利用 *B. licheniformis* BBE11-1 和 *S. maltophilia* BBE11-1 混合发酵降解羽毛，降解产物中总氨基酸含量为 895.89 mg/L，主要氨基酸为缬氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸<sup>[22]</sup>。Ramakrishna 等利用 *B. pumilus* GRK 降解羽毛，其产物中氨基酸含量为 60.74 mg/L，主要氨基酸为赖氨酸、甲硫氨酸和丝氨酸<sup>[23]</sup>。本研究 *P. aeruginosa* Gxun-7 羽毛降解产物中总游离氨基酸含量为 2329.80 mg/L，高于目前文献报道，降解产物中共检测到 16 种游离氨基酸，包括 7 种必需氨基酸，主要氨基酸为缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和异亮氨酸，与文献报道结果大不相同，这说明不同的微生物产生的角蛋白酶性质不同，对底物作用位点不同，从而导致游离氨基酸的组成和含量不同<sup>[36]</sup>。因此，*P. aeruginosa* Gxun-7 羽毛降解产物氨基酸种类丰富、含量高，在开发饲料添加剂和氨基酸生产方面具有巨大潜力。

## 4 结论

本研究从广西北部湾某海鸭养殖场淤泥筛选出一株高效羽毛降解菌，经形态、生理生化及分子生物学鉴定为 *P. aeruginosa* Gxun-7。该菌株的最佳产酶条件为：羽毛 25 g/L、 $Zn^{2+}$  0.10 g/L、

初始 pH 8.0、发酵温度 32.5 °C、发酵时间 48 h，角蛋白酶活高达 124.03 U/mL，较优化前提高了 2.3 倍；所产角蛋白酶为丝氨酸蛋白酶，具有耐温、耐盐、耐碱等特性；该菌株的羽毛降解产物氨基酸种类丰富，含量高。本研究为今后废弃羽毛的降解及相关饲料、肥料产品的开发奠定基础，并为海洋环境菌种资源利用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] Sharma I, Kango N. Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 166: 1046–1056.
- [2] Peng Z, Mao XZ, Zhang J, Du GC, Chen J. Effective biodegradation of chicken feather waste by co-cultivation of keratinase producing strains. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 84.
- [3] Jeevana Lakshmi P, Kumari Chitturi CM, Lakshmi VV. Efficient degradation of feather by keratinase producing *Bacillus* sp.. *International Journal of Microbiology*, 2013, 2013: 608321.
- [4] Holkar CR, Jain SS, Jadhav AJ, Pinjari DV. Valorization of keratin based waste. *Process Safety and Environmental Protection*, 2018, 115: 85–98.
- [5] Li QX. Progress in microbial degradation of feather waste. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2717.
- [6] Ward HM. VIII. *Onygena equina*, willd., a horn-destroying fungus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 1899, 191: 269–291.
- [7] Bohacz J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 33(1): 1–16.
- [8] Mazotto AM, Couri S, Damaso MCT, Vermelho AB. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: comparison of submerged and solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 85: 189–195.
- [9] Shapourzadeh A, Rahimi-Verki N, Atyabi SM, Shams-Ghahfarokhi M, Jahanshahi Z, Irani S, Razzaghi-Abyaneh M. Inhibitory effects of cold

- atmospheric plasma on the growth, ergosterol biosynthesis, and keratinase activity in *Trichophyton rubrum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 608: 27–33.
- [10] Nandini A, Madhusudhan DN, Dayanand A. Enhanced production, purification and characterization of alkaline keratinase from *Streptomyces minutiscleroticus* DNA38. *International Letters of Natural Sciences*, 2015, 43: 27–37.
- [11] 颜华, 柯欣, 吴佳, 杨文翰, 刘亚勇, 贾良辉, 马怡著. 角蛋白高效降解菌 Fea-10 的筛选与鉴定. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2017, 36(2): 30–34. Yan H, Ke X, Wu J, Yang WH, Liu YY, Jia LH, Ma YM. Isolation and identification of a high efficient feather-degrading strain Fea-10. *Journal of South-Central University for Nationalities: Natural Science Edition*, 2017, 36(2): 30–34. (in Chinese)
- [12] Gousterova A, Braikova D, Goshev I, Christov P, Tishinov K, Vasileva-Tonkova E, Haertlé T, Nedkov P. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 40(5): 335–340.
- [13] Abdel-Fattah AM, El-Gamal MS, Ismail SA, Emran MA, Hashem AM. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, 16(2): 311–318.
- [14] 闫志宇, 李术娜, 李红亚, 徐丽娜, 朱宝成. 产角蛋白酶菌株 *Bacillus subtilis* A1-2 液体发酵产酶条件的优化. 饲料工业, 2015, 36(15): 18–23. Yan ZY, Li SN, Li HY, Xu LN, Zhu BC. Liquid fermentation enzyme producing conditions optimization of keratinase production strain *Bacillus subtilis* A1-2. *Feed Industry*, 2015, 36(15): 18–23. (in Chinese)
- [15] Arokiyaraj S, Varghese R, Ali Ahmed B, Duraipandiyan V, Al-Dhabi NA. Optimizing the fermentation conditions and enhanced production of keratinase from *Bacillus cereus* isolated from halophilic environment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, 26(2): 378–381.
- [16] Grazziotin A, Pimentel FA, Sangali S, de Jong EV, Brandelli A. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. *Bioresource Technology*, 2007, 98(16): 3172–3175.
- [17] Chaturvedi V, Verma P. Metabolism of chicken feathers and concomitant electricity generation by *Pseudomonas aeruginosa* by employing microbial fuel cell (MFC). *Journal of Waste Management*, 2014, 2014: 1–9.
- [18] Wu XQ, Chen L, Cao ZJ, Zhou MH. Feather degradation and keratinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* DHHJ. *Advanced Materials Research*, 2012, 550/551/552/553: 1400–1403.
- [19] 徐新亚, 杨宏, 宁小清, 易湘茜, 刘永宏, 高程海. 北部湾海洋微生物物种多样性与化学多样性研究进展. 广西科学, 2020, 27(5): 433–450, 461. Xu XY, Yang H, Ning XQ, Yi XX, Liu YH, Gao CH. Research progress of marine microbial diversity and chemical diversity in Beibu Gulf. *Guangxi Sciences*, 2020, 27(5): 433–450, 461. (in Chinese)
- [20] 张妮, 张红岩, 杨梦莹, 刘聪, 杨立芳, 申乃坤, 姜明国. 一株海洋来源高效产角蛋白酶菌株的筛选、鉴定及其酶学性质研究. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 98–104. Zhang N, Zhang HY, Yang MY, Liu C, Yang LF, Shen NK, Jiang MG. Isolation and identification of a highly efficient keratinase producing strain from marine environment and its enzymatic properties. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(18): 98–104. (in Chinese)
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [22] 彭政. 芽孢杆菌降解羽毛角蛋白关键步骤解析及角蛋白酶的高效表达. 江南大学博士学位论文, 2020.
- [23] Ramakrishna Reddy M, Sathi Reddy K, Ranjita Chouhan Y, Bee H, Reddy G. Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 254–263.
- [24] 钟泓波, 郇惠杰, 雷芬芬, 赵强忠, 赵谋明, 崔春. 产蛋白酶深海细菌的筛选及其蛋白酶学性质. 食品与发酵工业, 2013, 39(8): 108–112. Zhong HB, Huan HJ, Lei FF, Zhao QZ, Zhao MM, Cui C. Isolation of producing-proteases marine bacteria and characterization of the proteases in fermented liquid. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(8): 108–112. (in Chinese)
- [25] Chellappan S, Jasmin C, Basheer SM, Kishore A, Elyas KK, Bhat SG, Chandrasekaran M. Characterization of an extracellular alkaline serine protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(6): 743–752.
- [26] Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to

- resistance. *Trends in Microbiology*, 2011, 19(8): 419–426.
- [27] Skariyachan S, Ravishankar R, Gopal D, Muddebihalkar AG, Uttarkar A, Praveen PKU, Niranjana V. Response regulator GacA and transcriptional activator RhIR proteins involved in biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* are prospective targets for natural lead molecules: computational modelling, molecular docking and dynamic simulation studies. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 85: 104448.
- [28] 蒋海霞, 周莲, 何亚文. 铜绿假单胞菌生防菌株抑菌代谢产物及其生防应用研究进展. *微生物学通报*, 2015, 42(7): 1338–1349.
- Jiang HX, Zhou L, He YW. Research progress in biocontrol strain *Pseudomonas aeruginosa*: antifungal metabolites and their applications in biocontrol. *Microbiology China*, 2015, 42(7): 1338–1349. (in Chinese)
- [29] Sulochana MB, Jayachandra SY, Kumar SKA, Dayanand A. Antifungal attributes of siderophore produced by the *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(5): 418–424.
- [30] Mehrdad S, Saeb K, Taghavi L, Ghane M. Evaluation of the biodegradation of petroleum contaminants by *Pseudomonas aeruginosa* in the caspian sea coastline waters. *Iranian Journal of Toxicology*, 2019, 13(3): 21–26.
- [31] 黄妙容, 钟楚红, 任广彩, 刘传高, 叶俊贤, 陈瑞爱. 一株产角蛋白酶的铜绿假单胞菌的分离鉴定. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(3): 920–927.
- Huang MR, Zhong CH, Ren GC, Liu CG, Ye JX, Chen RA. Isolation and identification of a keratinase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* B1-2. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(3): 920–927. (in Chinese)
- [32] 章帅文, 杨勇, 李昆太. 角蛋白酶产生菌及其应用研究进展. *生物灾害科学*, 2019, 42(3): 179–185.
- Zhang SW, Yang Y, Li KT. Research progress of keratinase production strain and its application. *Biological Disaster Science*, 2019, 42(3): 179–185. (in Chinese)
- [33] Tatineni R, Doddapaneni KK, Potumarthi RC, Vellanki RN, Kandathil MT, Kolli N, Mangamoori LN. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp.. *Bioresource Technology*, 2008, 99(6): 1596–1602.
- [34] Zhang RX, Gong JS, Su C, Zhang DD, Tian H, Dou WF, Li H, Shi JS, Xu ZH. Biochemical characterization of a novel surfactant-stable serine keratinase with no collagenase activity from *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93: 843–851.
- [35] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(1): 21–33.
- [36] Liang S, Deng JJ, Zhang MS, Luo ZY, Lu WJ, Lu DL, Mao HH, Li ZW, Li JZ, Luo XC. Promotion of feather waste recycling by enhancing the reducing power and keratinase activity of *Streptomyces* sp. SCUT-3. *Green Chemistry*, 2021, 23(14): 5166–5178.

(本文责编 李磊)