203_

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2024.23.027

产角蛋白酶芽孢杆菌 50-3 的分离与 初步鉴定

岳晓禹¹,常惟丹¹,崔丽伟¹,刘安琪¹,李长滨¹,许文涛²

(1.河南牧业经济学院食品与生物工程学院,河南郑州450046;2.中国农业大学营养与健康系, 北京100091)

摘 要:为获得产角蛋白酶活性较高的菌株,以1942 株动物粪便源芽孢杆菌为对象,在角蛋白酶筛选培养基中进行初筛,以菌株生长的透明圈与菌落直径比值较大的菌株在种子培养基中进行复筛,并进行菌株鉴定。结果表明: 复筛得到的菌株 50-3 在鸡毛粉作为角蛋白酶诱导底物的培养基上,37 ℃发酵 36 h,角蛋白酶活力可以达到(694± 15) U/mL。通过形态观察、生理生化分析、全细胞蛋白电泳和 16S rDNA 序列分析,初步鉴定菌株 50-3 为枯草芽孢杆 菌进化分支中的一个种,命名为 Bacillus sp. 50-3。 关键词:角蛋白酶;芽孢杆菌;分离;鉴定;角蛋白

Isolation and Identification of Bacillus sp. 50-3 with a High Yield of Keratinase

YUE Xiaoyu¹, CHANG Weidan¹, CUI Liwei¹, LIU Anqi¹, LI Changbin¹, XU Wentao² (1. College of Food and Biotechnology Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, Henan, China; 2. Department of Nutrition and Health, China Agricultural University, Beijing 100091, China)

Abstract: A total of 1 942 strains of *Bacillus* from animal feces were cultured for the preliminary screening of the strains with high keratinase activity. The strains with large ratios of hydrolysis zone diameter to colony diameter were re-screened in seed media and identified. The results showed that strain 50-3 fermented at 37 °C for 36 h in the medium with only chicken hair powder for inducing keratinase production reached the keratinase activity of (694 ± 15) U/mL. According to morphological characteristics, physiological and biochemical properties, whole-cell protein electrophoresis, and 16S rDNA sequencing, strain 50-3 was preliminarily identified as a species in the clade of *Bacillus subtilis* in the phylogenetic tree and named *Bacillus* sp. 50-3. **Key words**: keratinase; *Bacillus*; isolation; identification; keratin

引文格式:

岳晓禹,常惟丹,崔丽伟,等.产角蛋白酶芽孢杆菌 50-3 的分离与初步鉴定[J]. 食品研究与开发,2024,45(23):203-208. YUE Xiaoyu, CHANG Weidan, CUI Liwei, et al. Isolation and Identification of *Bacillus* sp. 50-3 with a High Yield of Keratinase[J]. Food Research and Development,2024,45(23):203-208.

角蛋白(keratin)是一种具有极强抗性、难生物降 解的硬蛋白,主要来自动物的羽毛、羊毛和指甲中,具 有不溶于水和抗分解的性质,其结构稳定,不易降解。 我国家禽养殖规模化会产生大量角蛋白类废物,如不 及时处理,将造成局部环境的严重污染和较大的蛋白 质资源浪费^[1-2]。自然界中某些微生物可利用自身分 泌的角蛋白酶(keratinase)将角蛋白特异性地分解利 用,转化为一种良好的饲料蛋白来源,从而使角蛋白酶 在饲料工业、医药工业、食品工业及环境治理等方面具 有广阔的应用前景,因此,角蛋白的微生物降解与利用 引起了人们的广泛关注^[3-4]。

国内外报道中大多数能降解角蛋白的真菌是具有 致病性的皮肤性真菌,如 Sharif 等^[5]和 Mini 等^[6]在鸡羽 毛粉培养基中分离出的黄曲霉可分泌角蛋白水解酶。

基金项目:河南省科技发展计划项目(232102111068);河南省高等学校重点科研项目(22A550012) 作者简介:岳晓禹(1974—),男(汉),教授,博士,研究方向:食品安全。

许多放线菌也可以降解角蛋白,主要见于链霉菌属 (Streptomyces)。权金盼等印发现链霉菌 B221 可产角 蛋白酶,发酵降解羊毛中的角蛋白。Gong 等^[8]以羊毛 作为唯一碳源,分离出的金色链霉菌 K13 对降解角蛋 白效果同样显著。可降解角蛋白的细菌大多是革兰氏 阳性细菌, El-Refai 等¹⁹发现短小芽孢杆菌(Bacillus *pumilus* FH9)在 37 ℃条件下培养 48 h 可获得较高的 角蛋白酶活性。黄妙容等[10]发现铜绿假单胞菌对降解 角蛋白具有良好的作用。不同来源的角蛋白酶有着不 同的性质和应用范围,目前还存在着微生物产角蛋白 酶活力不高、降解效果不理想等情况。因此,分离筛选 具备抗逆性强、稳定效果好、产高活性特性的角蛋白酶 芽孢杆菌,对进一步发掘微生物降解角蛋白的特性,探 讨工业生产中的应用前景具有重要的意义。本试验利 用1942株动物粪便源芽孢杆菌,进行产高活性角蛋 白酶菌株的筛选分离和初步鉴定,以期为后续发掘酶 的性质和用途奠定基础。

1 材料与方法

____204

1.1 材料与试剂

供试菌株:河南牧业经济学院食品与生物工程学院微生物实验室保存的动物粪便源的1942株芽孢杆菌;参比菌株[枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis ATCC6633]:中国普通微生物菌种保藏管理中心;鸡毛粉:取自河南田中禾农牧有限公司的鸡毛,清洗干净自然风干,用粉碎机粉碎后过60目筛备用。

丙酸、乙酸:郑州派尼化学试剂厂;苯甲酸、丁二酸:天津市永大化学试剂有限公司;尿素:南京化学试剂积份有限公司;葡萄糖、NaCl:北京化工集团有限责任公司;细菌 DNAout 革兰氏阳性菌试剂盒:青岛天泽生物技术有限公司;考马斯亮蓝 G-250:天津市光复精细化工研究所;吐温-80:河北百灵威超精细材料有限公司;蛋白胨、酵母浸粉:北京陆桥技术股份有限公司;淀粉、琼脂:天津市致远化学试剂有限公司;赖氨酸:上海麦克林生化科技有限公司;精氨酸、几丁质、明胶、酪素、木聚糖、纤维素、锇酸:国药集团化学试剂有限公司; 十二烷基硫酸钠、聚丙烯酰胺、溶菌酶(100 mg/mL):北京索莱宝科技有限公司;以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

电热恒温培养箱(SKP-02):湖北黄石医疗仪器厂; 超净工作台(DL-CJ-1N)、全温振荡器(HZQ-Q):哈尔滨 市东联电子技术开发设备有限公司;显微摄像系统 (Motic B Series):日本 Panasonic 公司;高速离心机 (TGL-16E):北京京立离心机有限公司;电热式压力蒸 汽消毒器(BXM-30R):上海博迅实业有限公司医疗设 备厂;离心机(TGL-16C):上海安亭科学仪器厂;电泳 仪(DYC 23B):北京六一仪器厂;粉碎机(HY-04B):北 京环亚天元机械技术有限公司;二氧化碳临界点干燥 仪(CPD 030):北京裕隆时代科技有限公司;离子溅射 仪(Eiko IB5):日本 Eiko 公司;扫描电子显微镜(S-570):日本 Hitachi 公司;透射电镜(JEOL JEM-F200): 日本电子株式会社;凝胶成像系统(Biosens SC810):上 海山富科学仪器有限公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(Primus 96 Advanced): 德国 Peqlab 公司;紫外可见分光光度计(UV759CRT): 上海佑科仪器仪表有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基

角蛋白酶筛选培养基:鸡毛粉 1 g, NaCl 0.05 g, K₂HPO₄ 0.03 g, KH₂PO₄ 0.04 g, 琼脂 1.5~2.0 g, 蒸馏水 100 mL, pH7.2, 121 ℃灭菌 20 min。种子液培养基:牛 肉膏 0.3 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 100 mL, pH7.0~7.2, 121 ℃灭菌 20 min。角蛋白酶发酵培养基: 鸡毛粉 1 g, NaCl 0.05 g, K₂HPO₄ 0.03 g, KH₂PO₄ 0.04 g, 蒸馏水 100 mL, pH7.2, 121 ℃灭菌 20 min。液体培养 基:0.5 g 葡萄糖, 0.5 g 蛋白胨, 0.5 g 酵母浸粉, 1 g 氯化 钠, 100 mL 水, 121 ℃灭菌 20 min; 保藏培养基为液体 培养基中添加 2% 琼脂粉制得。

1.3.2 产角蛋白酶菌株初筛

将供试 1 942 株芽孢杆菌采用灭菌竹签点种于角 蛋白酶筛选培养基平皿中,置于 37 ℃培养箱中培养 24 h,观察菌株生长状况和透明圈大小。并记录透明 圈与菌落直径之比,挑取比值较大的单个菌落,划线接 种于角蛋白酶筛选培养基平皿,37 ℃培养 22~24 h,传 代培养 2 次,保存备用。

1.3.3 产角蛋白酶芽孢杆菌复筛

将初筛得到的菌株接种于种子液培养基中,培养 至菌落数为 10⁶ CFU/mL 左右,按 2% 的接种量接种于 100 mL 角蛋白酶发酵培养基,37 ℃摇瓶发酵 72 h,每 12 h 取一次样。发酵液于 4 ℃、12 000 r/min 条件下离 心 15 min 后取上清液,测定角蛋白酶的活性。复筛得 到的菌株接种于保藏培养基上,保存备用。

1.3.4 生理生化测定

将复筛获得的菌株划线接种于保藏培养基平皿 上,37℃培养24h,观察细胞和菌落形态,同时进行生 理生化试验:碳水化合物产酸试验、淀粉水解试验、酪 素水解试验、明胶水解试验、吐温-80降解试验、几丁质 降解试验、木聚糖降解试验、纤维素降解试验、赖氨酸 脱羧酶试验、精氨酸水解酶试验、NaCl适应性试验、温 度生长试验、V.P.试验、柠檬酸盐试验、有机酸利用试 验、0.1% 刚果红耐受试验、硝酸盐还原试验、过氧化氢 酶试验、氧化酶试验、核糖核酸酶试验、尿素降解试验、 石蕊牛奶试验、吲哚试验^[11-14]。

1.3.5 电镜观察

1.3.5.1 扫描电镜观察

样品固定:从保藏培养基上选取复筛获得的单菌

205____

落切下,用 2.5% 戊二醛固定 4 h,磷酸缓冲液(pH 值为 7.0~7.4)清洗 3 次,每次 15~20 min;再用 1% 锇酸 (OsO₄)固定 2~4 h,磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 15 min。 乙醇脱水:依次用 30%、50%、70%、85%、95% 的乙醇 溶液各脱水 1 次,每次 15~20 min,再用无水乙醇脱水 2 次,每次 15~20 min。用乙酸异戊酯置换 2 次,每次 15 min。二氧化碳临界点干燥,使用离子溅射仪喷金 镀膜,扫描电镜观察照相。

1.3.5.2 透射电镜观察

复筛后获得的菌株接种于液体培养基,37℃培养 48 h 后,6000 r/min 条件下离心 20 min 收集菌体,参 照 Nam 等^[15]方法制备透射电镜样品。样品制备完毕 后,用透射电镜观察照相。

1.3.6 全细胞蛋白十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel slectrophoresis, SDS-PAGE)

1.3.6.1 细胞蛋白提取液的制备

复筛获得的菌株按 1% 接种量接种于液体培养 基,37℃、140 r/min 振荡培养 18 h。7 000 r/min 离心 15 min 得到菌体,加入 10 mg/mL 溶菌酶溶液 2 mL,振 荡使菌体悬浮,37℃温育 2 h。加入 10% SDS 溶液 0.3 mL,剧烈振荡,12 000 r/min、4℃下离心 15 min 得 上清液。取 1 mL 上清液到 1.5 mL 离心管,加入 100% 三氯乙酸溶液 0.1 mL,混合均匀,4℃下 11 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀用 0.1 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液溶解后为细胞蛋白提取液。以 *B. subtilis* ATCC6633 菌株作为参比菌株。

1.3.6.2 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

采用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶制作凝胶,在 加样孔上样后,设定电压为 70 V 进行电泳,结束后将 凝胶取出,用考马斯亮蓝 G-250 进行染色,弃去染液用 脱色液脱色^[16]。

1.3.7 细菌 16S rDNA 鉴定及系统发育树

将复筛获得的菌株按 1% 接种量接种于液体培养 基,37 ℃、140 r/min 振荡培养 16~18 h。使用 DNAout 革兰氏阳性菌试剂盒提取基因组 DNA。DNA 产物保 存于-20 ℃。PCR 扩增引物为 27F(5'-GAGAGTTT-GATCCTGGCTCAG - 3')和 1541R(5'-AAGGAGGT-GATCCAGCCGCA-3'),由六合华大基因科技有限公司 合成。PCR 扩增体系:10×buffer 5 μ L, Taq DNA 聚合 酶 0.5 μ L,引物 27F 0.5 μ L,引物 1541R 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L,dNTPs 1 μ L,用 ddH₂O 将体系补至 50 μ L。 PCR 扩增程序:开始 94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 变性 1 min,50 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min。完成 30 个 循环后,72 ℃延伸 10 min。

经过 PCR 扩增得到的目的基因片段送六合华大

基因科技有限公司进行测序。将得到的序列在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库使用 Blast 进行同源性比对,并用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树^[17-18]。

1.3.8 角蛋白酶活力的测定

角蛋白酶的活力采用 Riffel 等^[19]以偶氮角蛋白作 为底物的方法进行测定。首先配制 10 g/L 偶氮角蛋白 溶液,然后将 200 μL 的角蛋白酶溶液(1.3.3 方法中的 上清液)加入到 1.6 mL 10 g/L 偶氮角蛋白的 Tris 溶液 中充分振荡使其混匀,将混合液置于 60 ℃的水浴中反 应 15 min;向反应体系中加入三氯乙酸至 100 g/L 时终 止反应。10 000 r/min 离心 15 min 得反应上清液,在 440 nm 测其吸光值。一个酶活单位即为 60 ℃反应 15 min 后,吸光值在 440 nm 改变 0.01 所需要的酶量。 1.4 数据处理

试验数据均以平均数±标准差表示。采用 SPSS 22 和 Origin 2018 软件进行数据处理和绘图。

2 结果与讨论

2.1 产角蛋白酶芽孢杆菌的初筛

从分离自动物粪便的1942株芽孢杆菌中,初步 分离到在角蛋白酶筛选培养基上能产生透明圈的菌株 196株,经过3次平行试验,其中活力透明圈直径与菌 落直径比值大于5.0的有18株,结果见表1,其中3株 菌株的透明圈情况见图1。

表 1 产较高活性角蛋白酶的分离菌株 Table 1 Isolates with high keratin-degrading activity

| 菌株 编号 | 透明圈直径/ mm | 菌落直径/ mm | 比值ª | 动物粪便来源 |
|----------|------------------|-----------------|-----|--------|
| 39-6 | 17.00±0.03 | 3.00±0.07 | 5.7 | 黑猩猩 |
| 50-3 | 19.00±0.26 | 2.00 ± 0.03 | 9.5 | 变色树蜥 |
| 53-1 | 15.00 ± 0.08 | 2.00 ± 0.05 | 7.5 | 双峭冠蜥 |
| 54-5 | 20.50±0.34 | 3.20±0.16 | 6.4 | 金黄领蜥 |
| 56-5 | 16.00±0.07 | 3.00 ± 0.22 | 5.3 | 红头石龙子 |
| 124-6 | 15.00±0.16 | 3.00±0.17 | 5.0 | 雪豹 |
| 134-2 | 11.00 ± 0.48 | 2.00 ± 0.08 | 5.5 | 鹌鹑 |
| 54-10 | 15.80±0.21 | 2.50 ± 0.05 | 6.3 | 金黄领蜥 |
| 156-1 | 15.00±0.16 | 3.00±0.13 | 5.0 | 蓝马鸡 |
| 117-4 | 14.00±0.22 | 2.60 ± 0.04 | 5.4 | 朝鲜豹 |
| 112-4 | 18.20±0.03 | 3.40±0.11 | 5.4 | 青狼 |
| 127-3 | 14.00±0.07 | 2.50 ± 0.14 | 5.6 | 小朝鲜豹 |
| 122-4 | 14.00±0.13 | 2.20 ± 0.06 | 6.4 | 朝鲜豹 |
| 78 | 14.00±0.35 | 2.50 ± 0.09 | 5.6 | 赤狐 |
| 110 | 16.00±0.61 | 2.50±0.23 | 6.4 | 骆驼 |
| 113 | 16.00±0.28 | 3.00 ± 0.07 | 5.3 | 美洲虎 |
| 83 | 14.60±0.33 | 2.40 ± 0.04 | 6.1 | 羚牛 |
| 87 | 18.20±0.04 | 2.60±0.12 | 7.0 | 羚牛 |

注:a为透明圈直径与菌落直径的比值。

=206

食品研究与开发



图 1 产生透明圈的部分菌株 Fig.1 Strains with hydrolysis zones

2.2 产角蛋白酶芽孢杆菌的复筛

将初筛得到的 18 株酶活力较高的芽孢杆菌,经传 代培养后得到遗传特性较稳定的 5 株芽孢杆菌,菌株 编号为 50-3、53-6、124-6、113 和 87。5 株菌分别经摇 瓶发酵 72 h,每 12 h 测定一次角蛋白酶活力,其产酶 情况见图 2。



由图 2 可知,活力较高的菌株为 50-3,其在 36 h 产生的角蛋白酶活力可达(694±15) U/mL。因此将对 菌株 50-3 作进一步研究。结合表 1 可知,菌株 50-3 分离自杂食类动物变色树蜥的粪便。变色树蜥的主要 食物为昆虫类(如蟋蟀、甲壳虫、蜘蛛等),这些昆虫的 鳞翅主要是由角蛋白构成。因此,在变色树蜥的消化 道中可能存在着大量能分泌角蛋白酶的菌株来帮助消 化食物^[20-21]。

菌株 50-3 在只有鸡毛粉作为角蛋白酶诱导底物的培养基上,37℃发酵 36 h角蛋白酶活力可以达到(694±15)U/mL。Lin等^[22]分离的 Bacillus licheniformis 在发酵 60 h时的角蛋白酶活力为 11.1 U/mL; Riffel 等^[19]的研究发现的菌株 Chryseobacterium sp. strain kr6 在发酵 48 h时所产的角蛋白酶活力为 70 U/mL; Sangali等^[23]的研究发现菌株 Vibrio sp. kr2 发酵 30 h产的 角蛋白酶的活力为 50 U/mL。与国内外报道相比,本 试验中的菌株 50-3 产生的角蛋白酶具有较高酶 活力。

- 2.3 菌株 50-3 的初步鉴定
- 2.3.1 菌株细胞形态特征

菌株 50-3 的细胞形态特征见图 3。



a. 菌株的革兰氏染色(1000×);b. 菌落的扫描电镜;c. 菌株细胞的透射电镜。

图 3 菌株 50-3 的形态 Fig.3 Morphology of the strain 50-3

由图 3 可知,菌株 50-3 革兰氏染色为阳性,芽孢 中生膨大,菌体个体较小,短杆状,大小一般在(0.8~ 1.5) μm×(0.2~0.8) μm。由图 3b 可以看出,菌株细胞 黏连在一起,呈矩阵排列。

2.3.2 菌株的生理生化试验测定

对 50-3 菌株进行部分生理生化特征测定,结果 见表 2。

表 2 菌株 50-3 的部分生理生化特性 Table 2 Physiological and biochemical properties of strain 50-3

| 试验项目 | 试验结果 | 试验项目 | 试验结果 |
|-----------------------------------|------|---------------|------|
| D-木糖产酸 | + | V.P. 试验 | + |
| 半乳糖产酸 | + | 柠檬酸盐试验 | - |
| D-果糖产酸 | + | 丙酸利用 | + |
| 甘露糖产酸 | + | 乙酸利用 | + |
| 甘露醇产酸 | + | 苯甲酸利用 | - |
| 纤维二糖产酸 | + | 丁二酸利用 | + |
| 麦芽糖产酸 | + | 明胶水解试验 | + |
| 棉子糖产酸 | - | 淀粉水解试验 | + |
| D-海藻糖产酸 | + | 酪素水解试验 | + |
| 蔗糖产酸 | + | Tween-80 降解试验 | + |
| 5% NaCl | + | 赖氨酸脱羧酶 | + |
| 7% NaCl | + | 精氨酸水解酶 | + |
| 10% NaCl | - | 几丁质降解试验 | - |
| H ₂ O ₂ 酶试验 | + | 木聚糖降解试验 | + |
| 氧化酶试验 | + | 纤维降解试验 | - |
| 硝酸盐还原试验 | + | 石蕊牛奶试验 | + |
| 刚果红耐受试验 | + | 尿素降解试验 | + |
| 10℃生长 | + | RNA 酶试验 | + |
| 55 ℃生长 | + | 吲哚试验 | + |

注:+为阳性;-为阴性。

由表 2 可知,菌株 50-3 不能耐受 10% 的 NaCl,能 在 10~55 ℃下生长,并且能降解木聚糖,但是不能利用 纤维素和几丁质。参照《常见细菌系统鉴定手册》,初 步推断 50-3 菌株为芽孢杆菌,暂时命名为 Bacillus sp. 50-3。经生理生化试验结果比较发现,菌株 Bacillus sp. 50-3 与枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)进化分支中 的越南芽孢杆菌(Bacillus velezensis)^[24]和死亡谷芽孢杆

207_

菌(Bacillus vallismortis)^[25]相似度相对较高。

2.3.3 全细胞蛋白电泳

同种的不同菌株的全细胞蛋白电泳图谱相似性较高,如果两个菌株的电泳图谱差异较大,则可断定不是同种^[26]。图 4 为 *Bacillus* sp.50-3 与枯草芽孢杆菌标准菌株 *B. subtilis* ATCC6633 的电泳图谱。

由图 4 电泳条带可见,菌株 50-3 的全细胞蛋白电 泳条带与枯草芽孢杆菌 B. subtilis ATCC6633 的条带略 有不同, B. subtilis ATCC6633 的全细胞蛋白电泳条带 在大分子量区间的条带比菌株 50-3 的多,说明 Bacillus sp. 50-3 区别于枯草芽孢杆菌。

2.3.4 16s rDNA 序列分析

扩增后 Bacillus sp. 50-3 的 16s rDNA 的片段长度为 1 477 bp,在 GenBank 中经 Blast 比较后,发现其与枯草芽孢杆菌进化分支的菌株同源性较高,在 GenBank 中申请序列号为 EU365432。选取同源性相近的菌株作系统发育树,见图 5。



1. B. subtilis ATCC6633; 2. B. sp 50-3 $_{\circ}$





图 5 菌株 50-3 的系统发育树 Fig.5 Phylogenetic tree of strain 50-3

由图 5 可知,菌株 50-3 与越南芽孢杆菌(B. velezensis)、死亡谷芽孢杆菌(B. vallismortis)、枯草芽孢杆菌(B. subtilis)和解淀粉芽孢杆菌(B. amyloliquefaciens)的相似度均在 99% 以上,超过了相似度为 98.7%的能鉴定到种的范围^[27]。越南芽孢杆菌(B. velezensis)、死亡谷芽孢杆菌(B. vallismortis)、枯草芽孢杆菌(B. subtilis)、解淀粉芽孢杆菌(B. amyloliquefaciens)、萎缩芽孢杆菌(B. atrophaeus)、莫哈韦芽孢杆菌(B. mojavensis)、马拉加芽孢杆菌(B. malacitensis)、埃卡萨昆芽孢杆菌(B. axarquiensis)、杀线虫芽孢杆菌(B. nematocida)均是枯草芽孢杆菌进化分支中的种,其 16S rDNA 相似度均在 98% 以上,通过 16S rDNA 序列难以准确鉴定^[26, 28-29]。

对菌株 50-3 的准确鉴定,还需要做如 DNA 杂交、细胞 脂肪酸分析等研究,因此将菌株 50-3 初步鉴定为枯草 芽孢杆菌群中的一个种,命名为 Bacillus sp. 50-3。

3 结论

从动物粪便源分离的 1 942 株芽孢杆菌中通过初 筛得到产角蛋白酶的菌株 196 株,对其中活力较高的 18 株,又通过传代培养和液体发酵复筛获得菌株 50-3,其 36 h 产角蛋白酶活力可达(694±15)U/mL,具有较 高酶活力。通过形态观察、生理生化分析、全细胞蛋白 电泳和 16S rDNA 序列分析,初步鉴定菌株 50-3 为枯 草芽孢杆菌进化分支中的一个种,将其命名为 Bacil*lus* sp. 50-3。它与越南芽孢杆菌(*B. velezensis*)、死亡谷 芽孢杆菌(*B. vallismortis*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和 解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)的相似度均大于 99%,对菌株 50-3 的准确鉴定还需做进一步的研究, 如 DNA 杂交、细胞脂肪酸分析等。

参考文献:

-208

- LI Z L, REIMER C, PICARD M, et al. Characterization of chicken feather biocarbon for use in sustainable biocomposites[J]. Frontiers in Materials, 2020, 7: 3.
- [2] FERRARO V, ANTON M, SANTÉ-LHOUTELLIER V. The 'sisters' α-helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of application[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 51: 65-75.
- [3] SANTHA KALAIKUMARI S, VENNILA T, MONIKA V, et al. Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry[J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 208: 44-53.
- [4] BORDEL S, MARTÍN-GONZÁLEZ D, MUÑOZ R, et al. Genome sequence analysis and characterization of *Bacillus altitudinis* B12, a polylactic acid- and keratin-degrading bacterium[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2023, 298(2): 389-398.
- [5] SHARIF S, SHAH A H, FARIQ A, et al. Optimization of amylase production using response surface methodology from newly isolated thermophilic bacteria[J]. Heliyon, 2023, 9(1): e12901.
- [6] MINI K, Kalady K, MATHEW J. Purification of keratinase from Aspergillus flavus S125[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 2017, 6(1): 17-21.
- [7] 权金盼,李玉妹,龙宏艳,等.链霉菌 B221 与地衣芽孢杆菌 NJU-1411-1 固体发酵废弃羊毛角蛋白工艺优化和工业化产品 分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(2): 153-156. QUAN Jinpang, LI Yumei, LONG Hongyan, et al. Optimization of wool keratin solid state fermentation process by *Bacillus licheniformis* NJU-1411-1 and *Streptomyces* sp. B221 and industrial keratin product analysis[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(2): 153-156.
- [8] GONG J S, WANG Y, ZHANG D D, et al. Biochemical characterization of an extreme alkaline and surfactant-stable keratinase derived from a newly isolated actinomycete *Streptomyces aureofaciens* K13[J]. RSC Advances, 2015, 5(31): 24691-24699.
- [9] EL-REFAI H A, ABDELNABY M A, GABALLA A, et al. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(7): 2325-2332.
- [10] 黄妙容, 钟楚红, 任广彩, 等. 一株产角蛋白酶的铜绿假单胞菌的分离鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(3): 920-927. HUANG Miaorong, ZHONG Chuhong, REN Guangcai, et al. Isolation and identification of a keratinase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* B1-2[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(3): 920-927.
- [11] EZEBUIRO V, OBICHI E A, MINIMAH S O, et al. Optimization of α - amylase production by *Enterobacter cloacae* strain D1 isolated from cassava effluent-impacted soil using response surface methodology[J]. Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology, 2022, 8(4): 68-80.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版 社, 2001.

DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. Handbook of identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001.

- [13] YUAN H L, TU R, TONG X W, et al. Ultrahigh-throughput screening of industrial enzyme-producing strains by droplet-based microfluidic system[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2022, 49(3): kuac007.
- [14] ROSA MARTINS P H, RABINOVITCH L, OREM J C, et al. Bio-

chemical, physiological, and molecular characterisation of a large collection of aerobic endospore-forming bacteria isolated from Brazilian soils[J]. Neotropical Biology and Conservation, 2023, 18(1): 53-72.

- [15] NAM G W, LEE D W, LEE H S, et al. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinaseproducing thermophilic anaerobe[J]. Archives of Microbiology, 2002, 178(6): 538-547.
- [16] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000. WANG Jiazheng, FAN Ming. Protein technical manual[M]. Beijing: Science Press, 2000.
- [17] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [18] ABDELAZIZ T, ASSIA M. Comparison of IncL/M plasmids using the neighbor-joining method on basis *repA* and *excA* genes[J]. Current Research in Bioinformatics, 2019, 8(1): 14-17.
- [19] RIFFEL A, LUCAS F, HEEB P, et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin[J]. Archives of Microbiology, 2003, 179(4): 258-265.
- [20] DE ANGELIS M, SIRAGUSA S, BERLOCO M, et al. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding[J]. Research in Microbiology, 2006, 157 (8): 792-801.
- [21] BEVILACQUA L, OVIDI M, DI MATTIA E, et al. Screening of *Bifi-dobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens[J]. Microbiological Research, 2003, 158(2): 179-185.
- [22] LIN X, INGLIS G D, YANKE L J, et al. Selection and characterization of feather - degrading bacteria from canola meal compost[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 23(2): 149-153.
- [23] SANGALI S, BRANDELLI A. Feather keratin hydrolysis by a Vibrio sp. strain Kr2[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(5): 735-743.
- [24] KABEER F A, JOHN N, ABDULLA M H. Biodegradation of malachite green by a newly isolated *Bacillus vietnamensis* sp. MSB17 from continental slope of the Eastern Arabian Sea: Enzyme analysis, degradation pathway and toxicity studies[J]. Bioremediation Journal, 2019, 23(4): 334-342.
- [25] CHEBOTAR V K, GANCHEVA M S, CHIZHEVSKAYA E P, et al. Draft genome sequence of *Bacillus vallismortis* strain BL01, isolated from *Artemisia lerchiana* web. roots[J]. Microbiology Resource Announcements, 2022, 11(11): 1-2.
- [26] 孟令缘, 牛沁雅, 廉鲁昕, 等. 基于 16S rDNA 序列、MALDI-TOF-MS 和 VITEK 的沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的鉴定[J]. 中国食 品学报, 2021, 21(10): 197-205. MENG Lingyuan, NIU Qinya, LIAN Luxin, et al. Identification of Salmonella and Staphylococcus aureus using 16S rDNA sequencing, MALDI-TOF-MS and VITEK system[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(10): 197-205.
- [27] ERKO S, EBERS J. Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards[J]. Microbiology Today, 2006, 33: 152-155.
- [28] THIRUVENGADAM R, GANDHI K, VAITHIYANATHAN S, et al. Complete genome sequence analysis of *Bacillus subtilis* Bbv57, a promising biocontrol agent against phytopathogens[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 9732.
- [29] 李书颖,朱天辉. 杜仲黑斑病菌(Pestalotiopsis trachicarpicola)拮 抗细菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 469-480. LI Shuying, ZHU Tianhui. Isolation and identification of antagonistic bacterial strain against Pestalotiopsis trachicarpicola[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 469-480.