

一株气单胞菌属高酶活角蛋白酶生产菌的 分离与鉴定

齐清文 张光祥* 冯婷 赖思思 黄才琴 李维

(四川师范大学生命科学学院 四川 成都 610101)

摘要: 并非所有气单胞菌属(*Aeromonas*)细菌都是致病菌, 近年来气单胞菌功能利用方面的研究取得了一些重要进展。用微生物降解法对废弃羽毛加以有效利用, 既可变废为宝又符合低碳环保的要求, 更多分泌高酶活角蛋白酶的新菌种资源的筛选与功能鉴定, 将有助于微生物降解法中降解不彻底和速度慢等难题的解决。以半腐烂羽毛为材料, 先后通过羽毛粉和酪蛋白选择培养基的反复初筛和复筛、羽毛发酵液酶活测定等筛选出相对酶活最高的菌株, 并按常规方法进行分类学鉴定和生长特性分析。经初筛和复筛得到的 19 个菌株中, FD41 的羽毛发酵液相对酶活最高, 达 3.864 U/OD₆₀₀。根据 FD41 菌株的 16S rDNA 序列比对、形态特征、革兰氏染色和糖发酵试验等结果, FD41 鉴定为气单胞菌属细菌, 这是首次报道产高酶活角蛋白酶的气单胞菌菌株。研究发现接种量和菌株的不同都是影响培养液中菌体细胞增殖特性的重要因素, 并且发酵液酶活受菌体繁殖量的影响很大, 故提出在相同培养条件下按酶活大小筛选菌种时, 应使用均一化的菌种接种量并以相对酶活为比较指标。

关键词: 羽毛降解菌, 角蛋白酶, 相对酶活, 气单胞菌 FD41

Isolation and identification of a keratinase-producing strain of *Aeromonas* bacterium

QI Qing-Wen ZHANG Guang-Xiang* FENG Ting LAI Si-Si
HUANG Cai-Qin LI Wei

(College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610101, China)

Abstract: Not all of *Aeromonas* species were pathogenic, and some bacteria of this genus were found to have important utilization value in recent years. Effective utilization of discarded feather by microorganism-decomposing method could meet the requirements of environment and Low-carbon economy. However, screening and evaluation of more microbe resources should be favourable for solving the

基金项目: 四川师范大学校级科研创新项目

* 通讯作者: Tel: 86-28-84760442; ✉ zhgx-163@163.com

收稿日期: 2010-08-10; 接受日期: 2010-12-01

thorny problem on poor efficiency and low speed of biodegradation. In the study, keratinase-producing strains were isolated from decaying feather using feather selective medium, casein plate and enzyme activity assay of keratinase in fermentation liquid of feather. The morphological observation of cell and colony, sugar fermentation experiments, Gram stain, PCR and sequence analysis of 16S rDNA were performed for taxonomic classification. The strain named FD41 with the highest relative keratinase activity (RKA, viz. the ratio of keratinase activity unit to A_{600} value of feather fermentation liquid) of 3.864 U/ OD_{600} was isolated. The BLAST using the 16S rDNA sequence (GenBank accession No. HM587254) of FD41 showed that the first 100 sequences, all from *Aeromonas*, shared high homology to HM587254 with 99% identity. According to the results of taxonomic classification, the strain FD41 was identified as an *Aeromonas* bacterium. This is the first report on keratinase-producing strain of *Aeromonas* bacterium. The measurement values of keratinase activity of fermentation liquid were found to be influenced signally by cell proliferation. The different strains and inoculation amounts resulted in very distinct proliferation curves of bacterium in liquid medium. These results suggested that the RKA was appropriate index and equalizing inoculation amount was prerequisite for screening and identifying of strains with high enzyme activity at same condition of liquid culture.

Keywords: Feather-degrading bacterium, Keratinase, Relative enzyme activity, *Aeromonas* FD41

气单胞菌属细菌在自然界中广泛存在^[1], 以水环境为多^[2], 有不少为动物甚至人体致病菌^[3]。关于该属细菌的致病性及其防控已有大量研究^[4-6], 但并非所有的该属细菌都是致病菌^[7], 最常见的致病菌如嗜水气单胞菌也有非致病性菌株^[8]。气单胞菌分布环境的多样性造就的种间和种内遗传多样性, 为新的有用基因资源筛选提供了可能。近年来气单胞菌的功能利用研究取得了一些重要进展, 比如对碱性孔雀绿染料的强脱色能力^[9]、对铜离子的强吸附性^[10]、转化月桂酸为可降解塑料聚 3-羟基丁酸-3-羟基己酸酯的功能菌^[11]、几丁质酶产生菌^[12]等。Liu 等从 *A. schubertii* 分离到新的对 SDS 具有抗性的分型几丁质酶^[13]。

羽毛含粗蛋白约 80%以上, 绝大多数是角蛋白, 还含有未知生长因子等^[14]。随着养殖业和屠宰加工业的规模发展, 废弃羽毛越来越多。因羽毛质地坚韧、角蛋白不溶于水且普通蛋白酶很难降解^[15-16], 大量废弃羽毛不能直接作为饲料蛋白源利用。目前生产上主要用高温高压或酸碱处理后加以利用^[17], 有耗能高和三废排放问题, 因此羽毛的微生物降解利用法受到广泛关注。已发现芽孢杆菌^[16,18]、黄单胞菌^[15]、放线菌^[19]和一些菌物^[20]能分泌角蛋白酶, 但生物降解法目前还存在速度太慢和降解不彻底等

难题, 高酶活角蛋白酶新基因资源的发掘将有助于该难题的解决。本实验室在废弃羽毛的生物降解与利用研究中分离到一株高效降解羽毛角蛋白的气单胞菌, 迄今为止还未见气单胞菌降解羽毛角蛋白的相关报道。

1 材料与方法

1.1 羽毛采集

半腐烂羽毛采自四川师范大学东校区半边街农贸市场附近, 新鲜羽毛取自该市场肉鸡宰杀点。

1.2 羽毛处理

1.2.1 培养基用羽毛粉: 将新鲜鸡毛用洗洁精洗净, 用蒸馏水冲洗 2 次, 烘干后剪成小截, 研磨成细粉状, 过 100 目筛。

1.2.2 测酶活用羽毛粉: 将新鲜鸡毛用 0.05% 的 NaOH 溶液煮沸 30 min, 再用蒸馏水冲洗干净, 55 °C 烘干后剪成小截, 研磨成细粉状, 过 100 目筛。

1.3 培养基

富集培养液 1 (g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, pH 7.5。富集培养液 2 (g/L): 可溶性淀粉 20, 羽毛粉 20, 氯化钠 5, pH 7.5^[15]。羽毛粉选择培养基 (g/L): 硫酸镁 0.2, 氯化钠 0.5, 磷酸氢二钾 0.7, 磷酸二氢钾 0.35, 琼脂粉 20, 羽毛粉 10。完全培养液:

配方同富集培养液 1。发酵培养液(g/L): 羽毛粉 10, 磷酸氢二钾 0.3, 磷酸二氢钾 0.4^[15]。酪蛋白选择培养基(g/L): 酪蛋白 10, 氯化钠 5, 琼脂粉 20, pH 7.5。牛肉膏蛋白胨平板: 配方与完全培养液相同, 加琼脂粉 20 g/L。

1.4 主要仪器

UV-755B 紫外可见分光光度计(上海精密实验设备有限公司), KDC-16OHR 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司), GNP-9160 型隔水式恒温培养箱(上海精密实验设备有限公司), Leica DM2000 系统显微镜, DYY-10C 型电泳仪(北京市六一仪器厂), 超净工作台(苏净集团安泰公司制造), 华普达 ZD-85 气浴恒温振荡器, S1000TM 基因扩增仪, JS-380A 自动凝胶电泳图像分析仪(上海培清科技有限公司)。

1.5 菌株的筛选

1.5.1 初筛: 称取 2 g 半腐烂羽毛置 500 mL 富集培养液 1 中, 120 r/min 培养 48 h, 取培养液 0.5 mL 转入 500 mL 富集培养液 2, 于 120 r/min 再富集培养 48 h 后取富集液 100 μ L 涂布于羽毛粉选择培养基上, 培养 48 h 后挑单菌落接入完全培养液, 120 r/min 培养 24 h。菌液再次涂布于羽毛粉选择培养基平板, 重复筛选 2 次以纯化菌株, 培养温度均为 28 $^{\circ}$ C。

1.5.2 复筛: 挑取初筛所得单菌落接种于完全培养液, 120 r/min、28 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 菌液于 4 000 \times g 离心 5 min 弃上清, 用 0.5% 生理盐水重悬菌体至原浓度后点接于酪蛋白选择培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 64 h, 挑有水解圈菌落。

1.6 酶活的测定

以羽毛粉为底物对复筛所得菌株的发酵液进行酶活测定, 参照韩学易等人的方法稍做修改: 从牛肉膏蛋白胨平板上挑取单菌落接于 30 mL 完全培养液中, 于 200 r/min、28 $^{\circ}$ C 培养 24 h 得种子液; 分出 6 mL 于 600 nm 处测 OD 值, 重复 3 次取平均值, 以评价菌体浓度。其余种子液用完全培养液稀释至各菌株的 OD₆₀₀ 值相等。菌体浓度均一化的各菌株种子液取等体积于 4 000 \times g 离心 5 min 弃上清, 加不含羽毛粉的发酵培养液重悬至原体积后取 30 μ L 接入 30 mL 发酵培养液, 于 200 r/min、28 $^{\circ}$ C 发酵培养

24 h。取 5 mL 发酵液滤除羽毛及残渣后于 600 nm 处测 OD 值(重复 3 次取平均值); 剩余发酵液于 8 000 \times g 离心 10 min, 取 1 mL 上清加入 2.0 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液, 加 10 mg 羽毛粉后 37 $^{\circ}$ C 水浴恒温反应 1 h, 其间振摇数次, 加 2.0 mL 10% TCA 终止反应。过滤反应液于 4 $^{\circ}$ C 下 8 000 \times g 离心 10 min, 取上清作 280 nm 比色测定, 重复 3 次取平均值。以反应前就加 TCA 的平行处理作对照。酶活定义: A₂₈₀ 值每增加 0.1 为 1 U^[19]; 相对酶活定义: 发酵液酶活/发酵液 OD₆₀₀。

1.7 形态观察

1.7.1 菌落的形态观察: 选取相对酶活最高的菌株划线于牛肉膏蛋白胨平板上, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 36 h 后观察单菌落的大小、形状、颜色、边缘特征以及质地等。

1.7.2 革兰氏染色鉴定与菌体形态观察: 采用革兰氏染色镜检与结晶紫平板培养相结合鉴定革兰氏染色反应。镜检法是将菌株划线于牛肉膏蛋白胨平板, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 12 h, 经结晶紫单染后显微镜下镜检。完全培养液中培养 24 h 的新鲜菌液用于镜检观察菌体形态。

1.8 生理生化反应测定

参照沈萍等的方法^[21], 用目标菌株对葡萄糖、D-果糖、D-海藻糖、D-木糖、D-鼠李糖、蔗糖和 D-半乳糖进行发酵实验, 观察产气和产酸特性。

1.9 16S rDNA 序列测定与系统发育分析

16S rDNA 引物: 正向引物 BaF1: 5'-AGAGTTT GATCMTGGCTCAG-3'; 反向引物 BaR1: 5'-GAGG TRATCCARCCSCASVTTC-3'。PCR 反应体系: 10 \times buffer 5 μ L, dNTPs 4 μ L, 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μ L, MgCl₂ 3 μ L, 正、反向引物各 1.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 补加超纯水至 50 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55.3 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

扩增结果经琼脂糖凝胶电泳检测, 将条带明亮和片段长度符合预期的扩增产物送上海生工测序。将基因序列提交 GenBank 核酸数据库, 测序结果在 NCBI 用 BLAST 搜索高度同源序列, 并按 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

2.1.1 初筛和复筛的结果: 经 2 次富集培养和 3 次羽毛粉选择培养基上的分离纯化, 筛得 97 株菌株, 按菌落边缘特征、大小、形态、颜色等选出具代表性的菌株编号 FD1-FD45, 进入复筛鉴定。因角蛋白酶可降解酪蛋白, 而酪蛋白比角蛋白更易于使用, 故酪蛋白可用作角蛋白酶生产菌的筛选底物。复筛结果表明 45 个菌株中有 19 株在酪蛋白平板上产生明显水解圈(图 1)。这些菌株进入后续试验。

2.1.2 羽毛发酵液的酶活测定筛选: 在酶活测定过程中, 经 24 h 摇瓶培养的种子液凭肉眼即可观察到菌体浓度有显著差异。于 600 nm 处的 OD_{600} 值测定结果显示, 各菌株在相同条件下培养的发酵用种子液, 菌体浓度最大可相差近 2 倍(表 1)。该结果说明, 为筛出产酶能力最强的菌株, 需避免发酵培养时菌体接种量差异对发酵液酶活鉴定的影响。在发酵培



图 1 产酶菌株在酪蛋白平板上产生大小不等的水解圈
Fig. 1 The casein-digested zones with different sizes produced by the keratinase-producing strains on casein plate

养时, 采用稀释各菌株种子液至 FD32 菌株的 OD_{600} 值后等体积接种的方法使菌体接种量均一化, 便可增大各菌株发酵液酶活测定结果的可比性。

菌体接种量均一化的发酵液酶活测定结果显示, FD41、FD3 和 FD11 的酶活在 0.7 U 以上(图 2), 其中最高的 FD41 达 0.765 U。

表 1 19 个菌株种子液在 600 nm 处的吸光值
Table 1 OD Values at 600 nm of seed liquid from 19 strains

菌株编号 Strain No.	吸光值 OD_{600} value	菌株编号 Strain No.	吸光值 OD_{600} value	菌株编号 Strain No.	吸光值 OD_{600} value	菌株编号 Strain No.	吸光值 OD_{600} value
FD1	0.701	FD9	0.670	FD25	0.740	FD40	0.580
FD2	0.662	FD11	0.693	FD32	0.380	FD41	0.556
FD3	0.662	FD15	0.712	FD33	0.688	FD44	0.604
FD7	0.757	FD18	0.640	FD34	0.623	FD45	0.585
FD8	0.408	FD20	0.752	FD38	0.714		

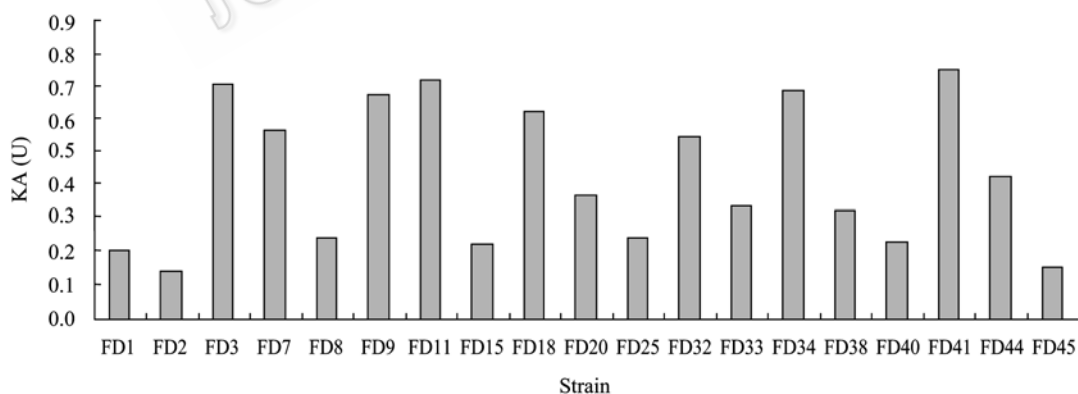


图 2 发酵培养菌体接种量均一化情况下 19 个菌株发酵液角蛋白酶的酶活比较

Fig. 2 Comparison of keratinase activity (KA) of fermentation liquid conditioned on equalized inoculation amount of 19 isolates

在发酵条件下,即便均一化了菌体接种量,不同菌株发酵液的菌体浓度差异比种子液还大,其中FD41的 OD_{600} 值为0.198,FD8仅0.123,FD7是1.037,最大差异达8倍以上。这说明所测酶活是菌体繁殖量和菌体细胞产酶能力的综合体现。为研究角蛋白酶的结构与高酶活的关系,需筛出菌体细胞产酶能力最强的菌株,故本研究以相对酶活(发酵液酶活/发酵液 OD_{600})为鉴定指标。结果发现FD41的相对酶活远远高于其它菌株(图3),达3.864 U/ OD_{600} 。

2.2 菌株FD41的鉴定

2.2.1 形态特征:菌落特征(图4A): (1) 形状:圆形、凸起。(2) 大小:菌落直径约2 mm。(3) 颜色:乳白色。(4) 表面质地:湿润光滑。(5) 菌落边缘:整齐且透明。

菌株FD41在显微镜下菌体形状为球形,无芽孢,菌体呈单个或成群分布(图4B)。在有氧的条件下生长良好,即为好氧呼吸类型。经反复试验证明革兰氏染色呈阴性反应,画线于G菌才能生长的结晶紫培养基上能够长出与对照一样的菌落。在半固体培养基上,菌株只沿接种针穿刺的方向垂直生长,没有向周围扩散生长的迹象,说明FD41不具运动能力。由此可知FD41是革兰氏染色呈阴性反应的无芽孢、无鞭毛好氧球菌。

2.2.2 理化性质:菌株FD41对葡萄糖、D-果糖、D-海藻糖、D-木糖、D-鼠李糖、蔗糖、D-半乳糖进行糖发酵实验,结果表明既能产酸又能产气(图5)。

参阅《伯杰细菌鉴定手册》可知,菌株FD41在好氧性、糖发酵和革兰氏染色反应等各项生理生化特性以及菌体、菌落特征都与气单胞菌相似。

2.2.3 16S rDNA 序列分析:菌株FD41的16S rDNA

PCR扩增产物条带明亮(图6),测序所得完整序列1 483 bp,收录到GenBank的登录号为HM587254。在NCBI用BLAST搜索比对的结果显示,与该序列同源性最高的前100个序列都来自气单胞菌(*Aeromonas*)属,且都达到99%的识别率,进一步证实了FD41为气单胞菌属细菌。

构建菌株FD41与相关菌种的16S rDNA序列系统发育树显示(图7),FD41与*A. punctata*和*A. hydrophila*等的差异太小,仍然难以得出对FD41的定种结论。

2.3 接种量对菌株FD41生长特性的影响

从保存于4℃冰箱的平板中挑取单菌落接入盛有30 mL完全培养液的三角瓶内,于28℃、200 r/min振荡培养的结果显示:菌株FD41在4–28 h期间呈指数增长(图8A);在24–40 h期间呈抛物线增长(图8B),曲线的 OD_{600} 值极值为1.479。整个培养周期的菌株生长显示为类似“S”型的变化趋势,且36 h后进入平台期。但是没有获得很好解释变化规律的Logistic生长曲线,因为拟合的两条曲线都不能反映36 h后进入平台期的特征(图8C)。

吸取经24 h培养的新鲜种子液2.5 mL转入盛有50 mL完全培养液的三角瓶内,混匀后取5 mL混合液分别放入11支无菌试管中,于28℃、200 r/min振荡培养的结果显示:菌株FD41在0–20 h期间呈指数增长,菌体繁殖曲线的最大 OD_{600} 值为1.657,但极值点以后的曲线下滑趋势与试验结果不符(图8D,虚线)。虽然Logistic曲线因0–10 h期间的离差导致拟合度不够高(图8D,实线),但可看出16 h以后便逐步进入平台期。

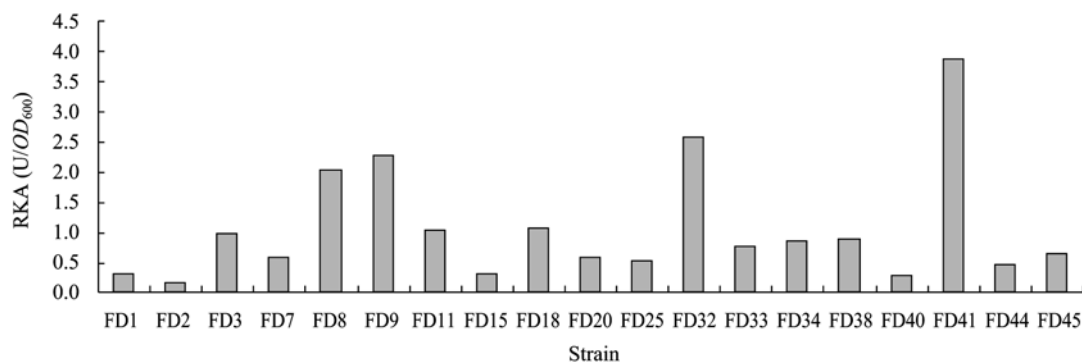


图3 各菌株发酵液相对酶活(RKA)的比较

Fig. 3 Comparison of relative keratinase activity (RKA) of fermentation liquids from 19 isolates

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

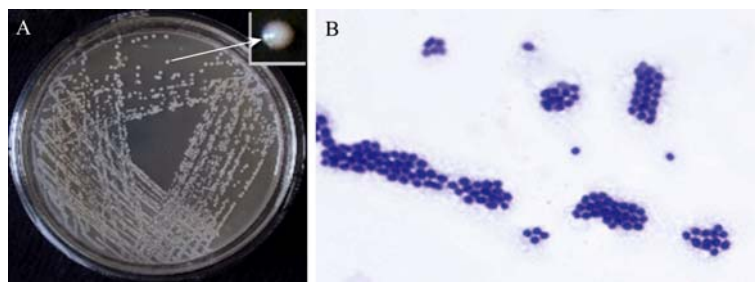


图 4 菌株 FD41 形态特征
Fig. 4 Shape Feature of FD41

注: A: 菌落特征; B: 菌体特征($\times 400$).

Note: A: Colony Feature observed with the naked eye; B: Shape Feature under microscopy ($\times 400$).



图 5 菌株 FD41 的生理生化特征
Fig. 5 Physiological and biochemical characteristics of strain FD41

注: T: 试验组; C: 对照组.

Note: T: Treatment group; C: Control group.

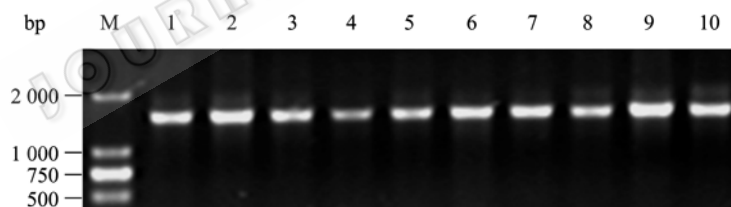


图 6 FD41 菌株 16S rDNA PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 6 The result of agarose gel electrophoresis of PCR product of 16S rDNA from FD41 and other isolates

Note: M: Marker; 1-8,10: Other isolates; 9: FD41.

由此可见,新鲜种子液按 1/20 体积大量接种培养,菌株生长曲线呈抛物线形,且进入增长平台期早,极值也相对较大。单菌落接种于 30 mL 培养基(少量接种)时,生长曲线呈“S”形,进入增长平台期的时间晚,极值也相对较小。说明接种量若不同,培养过程中的菌株生长规律以及最终菌体繁殖量都明

显不同。

3 讨论

本研究从废弃羽毛中分离的菌株 FD41 能够分泌高酶活的角蛋白酶,其相对酶活高达 3.864 U/OD₆₀₀。利用 NCBI 搜索引擎的文献高级搜索工具(<http://>

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

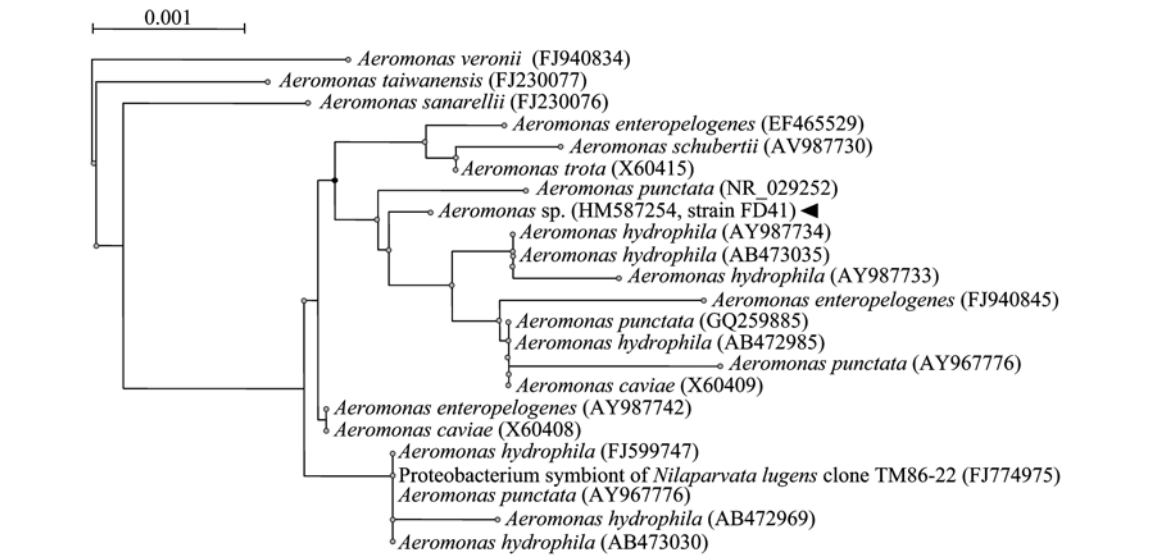


图 7 菌株 FD41 与相关菌种的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of strain FD41 and its relatives based on 16S rDNA sequences

Note: Numbers in parentheses are the GenBank accession numbers of 16S rDNA sequences. The bar indicates 0.1% sequence divergence. The FD41 was marked out with triangle.

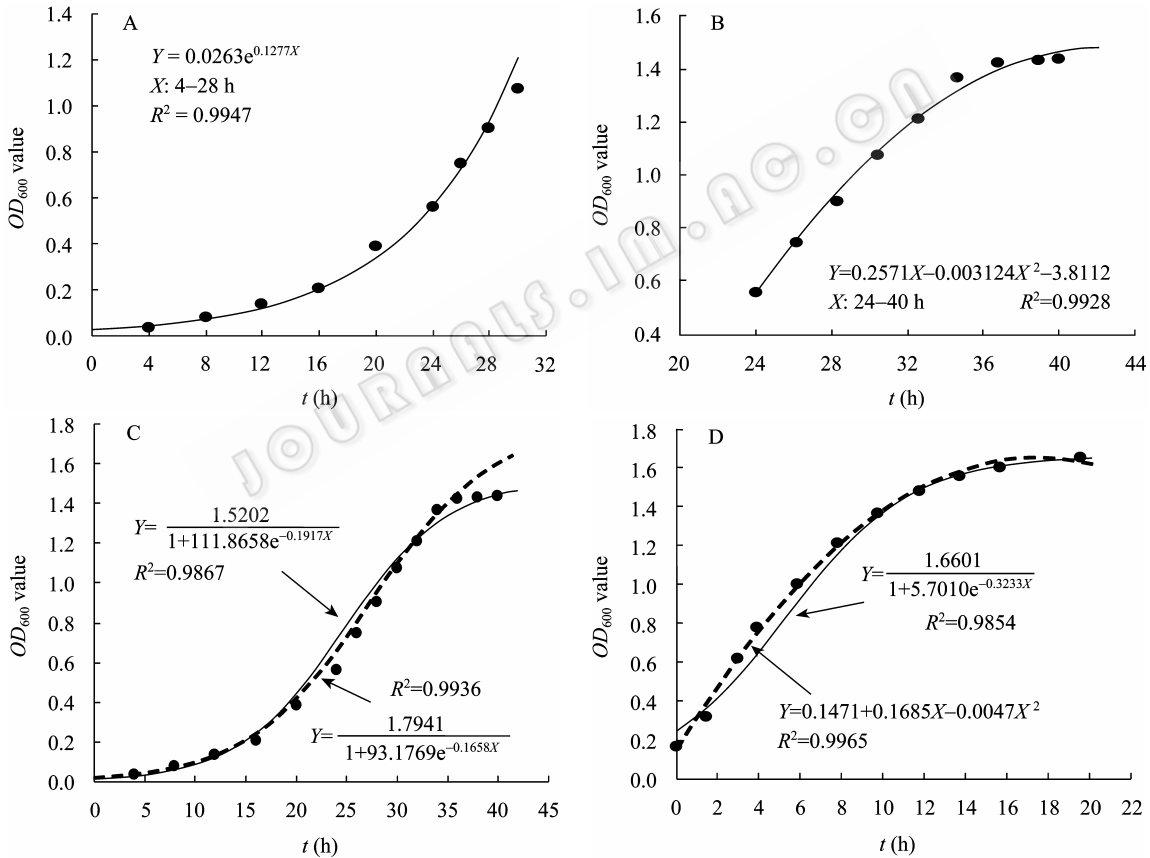


图 8 FD41 菌株不同接种量生长曲线比较

Fig. 8 Comparison of growth curves at different inoculation amount (IA) of strain FD41

注：A、B 和 C：接种单菌落于 30 mL 培养基的生长曲线；D：接种 1/20 体积种子液的生长曲线。

Note: A,B and C: Growth curves at IA of single colony; D: Growth curve at IA of 1/20 (V/V) seed liquid.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/advanced)对“(Aeromonas) AND Keratinase[Title/Abstract]”进行搜索以及中文文献检索结果显示,到目前为止还未见气单胞菌产角蛋白酶的报道。关于菌株 FD41 的定种与安全性鉴定,分泌型角蛋白酶的产生与菌株生长和环境适应性的关系,角蛋白酶基因的序列结构与功能的关系等,有待进一步研究。

本文发现接种量若不同,菌株生长规律、进入增长平台期所需时间和菌体细胞浓度可以达到的极值都明显不同,并且发酵液酶活受菌体繁殖量的影响很大。在相同培养条件下,不同菌株由于遗传基础的不同也导致繁殖速率的显著差异。所以,以酶活为鉴定指标的菌种筛选工作有必要采用均一化的菌种接种量,并且以相对酶活为评价标准。因为相对酶活是反映单位菌体量的酶蛋白产生量和酶蛋白比活大小的综合指标,可以避免不同菌种因对培养条件的要求不同造成的繁殖速率差异的干扰。

参 考 文 献

- [1] Farfán M, Miñana-Galbis D, Fusté MC, et al. Divergent evolution and purifying selection of the flaA gene sequences in *Aeromonas*[J]. *Biology Direct*, 2009, 4(1): 23.
- [2] Bhowmik P, Bag PK, Hajra TK, et al. Pathogenic potential of *Aeromonas hydrophila* isolated from surface waters in Kolkata, India[J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(12): 1549–1558.
- [3] Janda JM, Abbott SL. The genus *aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35–73.
- [4] Yucel N, Erdogan S. Virulence properties and characterization of *aeromonads* isolated from foods of animal origin and environmental sources[J]. *J Food Pro*, 2010, 73(5): 855–860.
- [5] Khajanchi BK, Fadl AA, Borchardt MA, et al. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2010, 76(7): 2313–2325.
- [6] Janda JM, Abbott SL. The genus *aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35–73.
- [7] 阎斌伦,秦国民,暴增海,等. 鱼类 3 种病原气单胞菌耐药状况分析及主要毒力因子检测[J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2009, 18(2): 81–85.
- [8] 王建,沈莉萍,徐锋,等. 企鹅源嗜水气单胞菌的分离鉴定[J]. 动物医学报, 2009, 30(5): 114–116.
- [9] 林玉满,余萍,林少芳,等. 7 株处理印染废水细菌的分离及鉴定[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2008, 24(2): 105–108.
- [10] 徐永健,廖律,倪梦菊. 龙须菜几株附生细菌对铜离子吸附性能的比较[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 170–174.
- [11] 邓媛. 嗜水气单胞菌胞内聚 3-羟基丁酸-3-羟基己酸酯(PHBHHx)提取方法的研究[J]. 化工时刊, 2008, 22(3): 10–13.
- [12] 王海东,刘韞滔,林伯坤,等. 汕头海域几丁质酶产生菌的筛选及其几丁质酶编码基因研究[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(4): 511–514.
- [13] Liu CL, Shen CR, Hsu FF, et al. Isolation and identification of two novel SDS-resistant secreted chitinases from *Aeromonas schubertii*[J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(1): 124–131.
- [14] 傅红梅. 羽毛粉水解制取可溶性蛋白的工艺研究[J]. 四川联合大学学报: 工程科学版, 1997, 11(6): 65–71.
- [15] 王晶,陈丽,曹张军,等. 一株羽毛角蛋白降解菌的分离与鉴定[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(增刊): 105–109.
- [16] 傅伟,阮晖,刘婧,等. 羽毛的生物降解及其酶学性质的研究[J]. 科技通报, 2008, 24(3): 320–325.
- [17] 孟建宇,李贵春. 羽毛角蛋白: 一种新的蛋白资源[J]. 内蒙古科技与经济, 2003(2): 103–104.
- [18] Mukhopadhyay RP, Chandra AL. Keratinase of a streptomycete[J]. *Indian J Exp Biol*, 1990, 28(6): 575–577.
- [19] 韩学易,陈惠,胥兵,等. 产角蛋白酶芽孢杆菌的分离筛选与鉴定[J]. 家禽科学, 2008(4): 7–9.
- [20] Gradisar H, Kern S, Freidrich J. Keratinase of *doratomyces microsporus*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(2): 196–200.
- [21] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [22] 布坎南 RE,吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.