

岳晓禹, 崔丽伟, 常惟丹, 等. 菌株 *Bacillus* sp. 50-3 产角蛋白酶的发酵工艺优化及纯化 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (12): 27-33.

YUE X Y, GUI L W, CHANG W D, et al. Fermentation optimization and purification of keratase from *Bacillus* sp. 50-3 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (12): 27-33.

菌株 *Bacillus* sp. 50-3 产角蛋白酶的发酵工艺优化及纯化

岳晓禹¹, 崔丽伟¹, 常惟丹¹, 李长滨¹, 李欣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 100083)

摘要: 旨在优化菌株 *Bacillus* sp. 50-3 产角蛋白酶的发酵工艺及纯化。研究不同发酵条件对菌株 *Bacillus* sp. 50-3 产角蛋白酶的影响, 采用硫酸铵沉淀和阴离子交换柱层析对酶进行分离纯化。结果: 角蛋白酶最佳发酵条件为 60 mL/300 mL、pH=8.0、种龄 12 h、接种量 2%、温度 37 °C、140 r/min 摇床培养 36 h; 40%~80% 的硫酸铵沉淀可以去除发酵液中的大部分杂蛋白, 通过 DEAE-Sephadex-A50 阴离子交换柱层析, 经 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色得到一条电泳条带, 分子量约为 30 kDa, 经酶活性电泳检测具有角蛋白酶活力。综上, 该研究结果对角蛋白酶在工业生产中的推广应用具有重要的参考价值。

关键词: 芽胞杆菌; 角蛋白酶; 发酵条件; 纯化

中图分类号: S816 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)12-0027-07

Fermentation optimization and purification of keratase from *Bacillus* sp. 50-3

YUE Xiaoyu¹, CUI Liwei¹, CHANG Weidan¹, LI Changbin¹, LI Xin¹, XU Wentao²

(1. College of Food and Biotechnology Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;

2. Department of Nutrition and Health, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: This experiment aimed to optimize the fermentation process of keratinase production by the *Bacillus* sp. 50-3 strain and to purify the enzyme. Different fermentation conditions were studied for effects of keratinase from the strain *Bacillus* sp. 50-3. Ammonium sulfate precipitation and anion-exchange column chromatography were used to separate and purify the keratinase. The results showed that the optimal fermentation conditions were 60 mL/300 mL, pH=8.0, seed age 12 h, inoculation amount 2%, temperature 37 °C, and 140 r/min shaker culture for 36 h. The keratinase was purified through 40%~80% of (NH₄)₂SO₄ precipitation and DEAE-Sephadex-A50 ion exchange column. It was found that the co-omassie brilliant blue R-250 stain obtained one band with keratinase activity determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Its molecular weight was about 30 kDa. In summary, this study is of important reference significance for the application of keratinase in industrial production.

Keywords: *Bacillus*; keratinase; fermentation conditions; purification

我国畜禽养殖量大, 其屠宰后会产生大量的羽毛、皮革边角料等废弃物, 造成环境污染和巨大浪费, 这些废弃物的主要成分为不易被环境降解的角蛋白^[1]。虽然物理化学法是处理角蛋白废物的有效策略, 但有高能耗和营养损失的缺点, 尤其是必需氨基酸如赖氨酸、蛋氨酸和色氨酸在处理过程中会被破坏, 微生物源角蛋白酶作为一种高效、环保的生物降解手段受到广泛关注, 其能够将角蛋白水解成多肽和

氨基酸等产物^[2]。研究发现, 角蛋白酶在皮革、纺织和洗涤剂行业、医疗、化妆品、杀虫剂、可生物降解薄膜生产, 以及农业工业废物降解等多个领域有着广泛应用前景, 如角蛋白酶水解羽毛, 可用作饲料、肥料、胶水和薄膜制备的成分之一, 在皮革加工业中, 利用角蛋白酶进行山羊皮脱毛的环保应用也有广泛关注, 因此, 寻找合适的微生物并获得优化的工艺以充分利用角蛋白废物受到了广泛的关注^[1-5]。角蛋白酶的微生物来源有多种, 据报道, 细菌如假单胞菌、微杆菌、芽胞杆菌、微杆菌、金黄杆菌等具有产角蛋白酶的潜力, 真菌如曲霉、拟青霉、木霉、小孢子属、镰刀菌等是角蛋白基质的天然溶解菌, 放线菌如链霉菌、节杆菌等也分泌角蛋白酶^[3-11]。微生物产

收稿日期: 2024-10-18; 修回日期: 2025-11-04

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计划项目 (22A550012)

第一作者: 岳晓禹, 博士, 教授, 研究方向为畜产品资源开发与安全, E-mail: yuerain@163.com。

角蛋白酶的研究主要集中在产角蛋白酶菌株的筛选鉴定、发酵、酶学性质^[4-5,7-11]以及酶的分离纯化^[12]等。由于工业应用对角蛋白酶的需求不断增长,相关研究关注度高,但不同来源角蛋白酶的特性及应用存在很大的差异,角蛋白降解仍存在降解周期长、酶活力低等系列问题,导致目前废弃羽毛等工业化处理受到影响。因此,提升角蛋白酶降解效率仍然是一项重要任务。本文以筛选到的一株高酶活菌株 50-3 为研究对象,开展角蛋白酶的发酵条件及分离纯化研究,为其工业化应用提供借鉴。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

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菌株 *Bacillus* sp. 50-3^[7]。鸡毛粉:取自河南田中禾农牧有限公司的鸡毛,清洗干净后自然风干,用粉碎机粉碎后过 60 目筛备用。头发:取自实验室成员收集的不同人群的头 发。牛蹄筋:购自郑州永和时光里欧德福超市。

种子液培养基 (100 mL):牛肉膏 0.3 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水补足配制, pH 值为 7.0~7.2, 121 °C 蒸汽灭菌 20 min。角蛋白酶发酵基础培养基 (100 mL):鸡毛粉 1 g; NaCl 0.05 g; K₂HPO₄ 0.03 g; KH₂PO₄ 0.04 g, 蒸馏水补足配制, pH = 8.0, 121 °C 灭菌 20 min。

偶氮角蛋白 (自制); 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 过硫酸铵, Tris, 考马斯亮蓝 G250, SDS 均为分析纯, 购自天津光复精细化工研究所; 低分子量标准蛋白 Marker (Sigma) 购自北京拜耳迪生物有限公司; 牛血清白蛋白购自北京鼎国生物技术有限公司; 透析袋 (Sigma) 购自北京舒伯伟化工仪器有限公司; 其他试剂均为分析纯或化学纯, 购自北京蓝弋生化试剂公司。

1.2 偶氮角蛋白的制备

准备溶液: 100 g/L NaHCO₃ 溶液, 0.12 mol/L NaOH 溶液, 5.0 mol/L HCl 溶液, 5.0 mol/L NaOH 溶液。A 液配制: 首先将 15 g 鸡毛角蛋白粉 (鸡毛粉碎过 100 目筛) 加入到 1 L 蒸馏水中, 再一边搅拌一边加入 100 mL 100 g/L 的 NaHCO₃ 溶液, 继续搅拌。B 液配制: 首先将 8.65 g 对氨基苯磺酸溶于 200 mL 0.12 mol/L 的 NaOH 溶液中, 然后加入 1.7 g NaNO₂ 搅拌使其溶解; 边搅拌边加入 10 mL 5.0 mol/L 的 HCl 溶液; 最后将 10 mL 5.0 mol/L 的 NaOH 溶液加入其中, 搅拌使其充分混合^[13]。

偶氮角蛋白的获得: 混合 A 液和 B 液, 搅拌 5~10 min, 使其充分混合, 然后将其置于 4 °C 蒸馏水中

透析 24 h 后, 将透析溶液冷冻干燥得到橘红色的偶氮角蛋白粉末, 最大吸收波长在 440~450 nm 之间。

1.3 角蛋白酶活力的测定

角蛋白酶的活力测定采用 Riffel 等^[13]以偶氮角蛋白作为底物的方法。首先配制 10 g/L 偶氮角蛋白溶液 (用 50 mmol/L 甘氨酸/NaOH, pH = 10.0 缓冲液配制); 将 200 μL 的角蛋白酶溶液加入到 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 °C 的水浴中反应 15 min; 向反应体系中加入三氯乙酸 (TCA) 至 100 g/L 时终止反应。离心后的反应上清液, 在 440 nm 测其吸光值。一个酶活单位即为 60 °C 反应 15 min 后, 吸光值在 440 nm 改变 0.01 所需要的酶量。

1.4 胞外酶和胞内酶的活力测定

角蛋白酶发酵培养基 (1/5 装液量) 按 2% 的接种量接种 10⁶ CFU/mL 的种子液, 在 37 °C, 140 r/min 条件下发酵 72 h, 每 12 h 取发酵液, 0~4 °C 下 10 000 r/min 冷冻离心 10 min, 取上清液测定角蛋白酶活为胞外酶, 收集菌体。用相同体积的 pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释收集的菌体, 在冰浴下超声破碎菌体 (功率 400 W, 100 次, 每次 5 s, 间隙 5 s), 然后在 0~4 °C, 10 000 r/min 冷冻离心 10 min, 取该上清液测角蛋白酶活为胞内酶。

1.5 菌株生长曲线的测定

将菌株 *Bacillus* sp. 50-3 接种于种子液培养基中, 于 37 °C 下摇瓶生长, 每隔 4 h 取样测定其单位菌落个数 (CFU/mL), 连续测定 48 h, 绘制生长曲线图。

1.6 最适发酵底物的选择

选用不同的发酵底物 (鸡毛、头发、牛蹄筋) 替代鸡毛粉, 添加 1%, 三角瓶装液 60 mL/300 mL, 种子液培养 12 h, 接种量 2%, 控制培养温度在 37 °C, pH = 8.0, 摇床转速 140 r/min, 发酵 72 h, 每 12 h 测发酵液中酶活。

1.7 最适底物浓度的选择

选择发酵基础培养基, 将鸡毛粉按 0.50%、1.00%、1.50%、2.00% 添加, 接种量 2%, 控制培养温度 37 °C, pH = 8.0, 摇床转速 140 r/min, 发酵 72 h, 每 12 h 测发酵液中酶活。

1.8 发酵生长条件的选择

以起始 pH = 8.0, 装液量 60 mL/300 mL 三角瓶, 接种量 2%, 考察培养温度分别为 25、37、50、70 °C 时对菌株生长的影响; 以温度 37 °C, 装液量 60 mL/300 mL 三角瓶, 接种量 2%, 考察初始 pH 值分别为 4.0、5.0、7.0、8.0、11.0 时对菌株生长的影响; 以装液量 60 mL/300 mL 三角瓶, 培养温度 37 °C, 初

始 pH=8.0, 考察接种量分别为 1%、2%、4%、6% 时对菌株生长的影响; 以接种量 2%, 培养温度 37 °C, pH=8.0, 考察每 300 mL 装液量分别为 25、50、60、75、100 mL 时对菌株生长的影响。培养时摇床转速 140 r/min, 发酵 72 h, 每 12 h 测发酵液中酶活。

1.9 粗酶液的获得

角蛋白酶发酵培养基 (1/5 装液量) 按 2% 的接种量接种 10^6 CFU/mL 的种子液, 在 37 °C, 140

r/min 条件下发酵 36 h, 0~4 °C 下 10 000 r/min 冷冻离心 10 min 取上清液即为粗酶液。

1.10 蛋白质含量的测定

根据 Bradford^[14] 的方法测定发酵液的蛋白质含量。

蛋白质标准曲线的制作: 取 7 支试管, 按表 1 配制 0~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛血清白蛋白溶液。加入 5 mL 考马斯亮蓝 G250 试剂, 混匀, 放置 2 min 后, 用 10 mm 光径的比色杯, 在 595 nm 下比色, 绘制标准曲线。

表 1 蛋白标准曲线的制作

试剂	1	2	3	4	5	6	7
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛血清白蛋白/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
蒸馏水/mL	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.4	0.2
牛血清白蛋白/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0	10	20	30	40	60	80

1.11 硫酸铵饱和度的确定

0~30%、30%~40%、40%~80%和 80%~90% 这 4 个硫酸铵饱和区间被用来确定沉淀角蛋白酶的最佳硫酸铵添加量。首先在冰浴条件下, 将 30% 饱和度的硫酸铵粉末边搅拌边加入到粗酶液中, 静置 12 h, 0~4 °C 条件下 10 000 r/min 离心 20 min 将沉淀和上清液分离; 同样条件下, 上清液继续添加硫酸铵至饱和浓度为 40%, 静置沉淀 12 h 后, 同样条件离心分离沉淀和上清液; 上清液继续添加硫酸铵至饱和浓度为 80%, 静置沉淀 12 h 后, 离心分离沉淀和上清液; 最后上清液继续添加硫酸铵至饱和浓度为 90%, 静置后离心收集沉淀。将收集的 4 次沉淀分别溶解于相同体积的 50 mmol/L, pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, 分别透析, 最后测定各个饱和度沉淀蛋白的比酶活力。

1.12 DEAE-Sephadex-A50 阴离子交换柱层析

在 0~4 °C 条件下, 将透析好的硫酸铵沉淀蛋白液加入到 DEAE-Sephadex-A50 (1.0 cm \times 20 cm) 阴离子交换柱中, 按照 0.5 mL/min 的流速用 50 mmol/L pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 当粗酶溶液完全进入阴离子柱中时, 自动收集器开始收集流出的洗脱液, 每管收集 3 mL, 收集 25 管后, 改用 0~1.0 mol/L NaCl (50 mmol/L, pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液溶解) 盐溶液以相同的流速进行梯度洗脱。收集的洗脱液分别测定其蛋白质含量和角蛋白酶活力。具有角蛋白酶活力的蛋白吸收峰经蒸馏水透析后, 冷冻干燥后储存于 -20 °C 的冰箱中备用。

1.13 SDS-PAGE 分析

1 mm 厚的凝胶, 14.5% 的分离胶, 4.0% 的堆积胶, 配置方法参照文献 [15]。经阴离子交换柱分离

后的角蛋白酶冻干粉溶解于 65 mmol/L, pH=6.8 的 Tris 缓冲液, 然后加入 2% SDS, 10% 甘油和 5% β -巯基乙醇, 100 °C 下煮沸 5 min。70 V 稳压电泳后, 凝胶用考马斯亮蓝染色, 甲醇冰醋酸溶液脱色。

1.14 酶活性电泳

酶活性电泳按照 Riffel 等^[16] 方法进行改进。不经加热煮沸的纯化后的角蛋白酶样品液, 4 °C 环境下在分离胶为 9.0% 的 SDS-PAGE 中进行分析, 其中分离胶中包含 1 mg/mL 的明胶, 并且不加还原剂。电泳完毕后, 凝胶用 50 mmol/L, pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次, 然后将其放入 2.5% 的 Triton X-100 冷水溶液中浸泡 30 min; 然后将凝胶浸入 60 °C, 50 mmol/L, pH=10.0 的甘氨酸/NaOH 缓冲液中 (含 5 mmol/L CaCl_2), 反应 60 min 后用 0.5% 的考马斯亮蓝 G250 染色, 用甲醇: 冰醋酸: 水 (30: 10: 60) 脱色后, 在蓝色背景上将显现角蛋白酶的活性电泳条带。

1.15 数据统计与分析

用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析, 采用 Duncan's 法对平均值进行多重比较, 试验设 3 次重复, 结果以“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 菌株生长曲线

菌株 *Bacillus* sp. 50-3 的生长曲线如图 1 所示, 0~8 h 是菌体生长的迟滞期, 8~12 h 是菌体的对数生长期, 12 h 后进入稳定期, 24 h 时后进入衰退期, 因此一般选择对数生长末期时为种子液发酵结束时期, 此时菌落个数约为 10^6 CFU/mL。

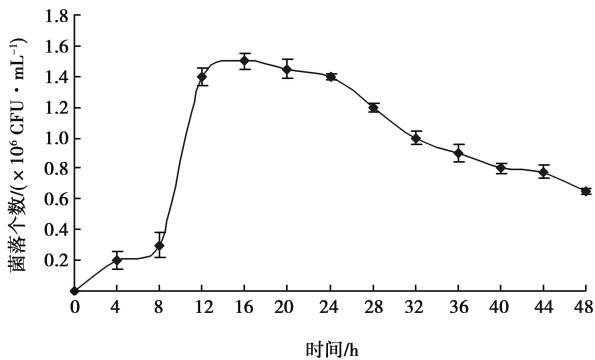


图1 *Bacillus sp. 50-3* 的生长曲线

2.2 胞外酶和胞内酶

对菌株 *Bacillus sp. 50-3* 所产的角蛋白酶进行了胞内酶和胞外酶的确证, 结果如图 2 可知, 菌株 *Bacillus sp. 50-3* 所产的角蛋白酶主要为胞外酶。

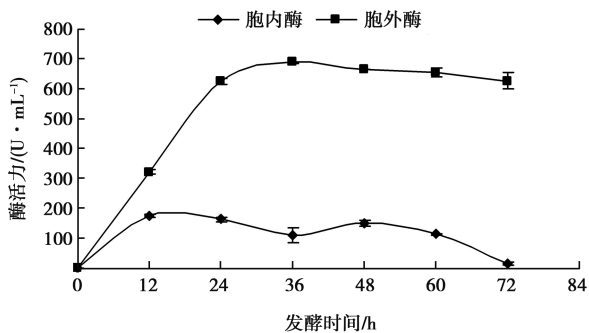


图2 胞内酶和胞外酶的比较

2.3 最适底物

由图 3 可知, 用鸡毛作为底物时, 酶活力相对较高, 且影响极显著, 随着鸡毛的降解, 72 h 内角蛋白酶活力逐渐升高, 当以头发和牛蹄筋作为底物时, 72 h 内酶活力差别不大, 且相对较低。因此菌株 *Bacillus sp. 50-3* 在以鸡毛作为培养基时, 产酶活力较高。

2.4 底物最适浓度

由图 4 可知, 4 种不同底物浓度对 *Bacillus sp. 50-3* 产角蛋白酶的活力影响不显著。在不同的时间阶段, 4 种浓度的产酶活力相差不大, 相比较而言 1.0% 的底物添加量时, 角蛋白酶的活力相对较高, 因此选择 1.0% 的底物添加量。

2.5 确定最佳发酵温度

由图 5 可知, 不同发酵温度对菌株产角蛋白酶影响显著, 当处于 37 °C 的发酵温度时, 菌株产生的角蛋白酶活力较高, 其次是 25 °C。当发酵温度在 50 °C 和 70 °C 时, 角蛋白酶的活力较低。因此 37 °C 是菌株比较适宜的发酵温度, 代谢比较旺盛, 产角蛋白酶的

活力较高。

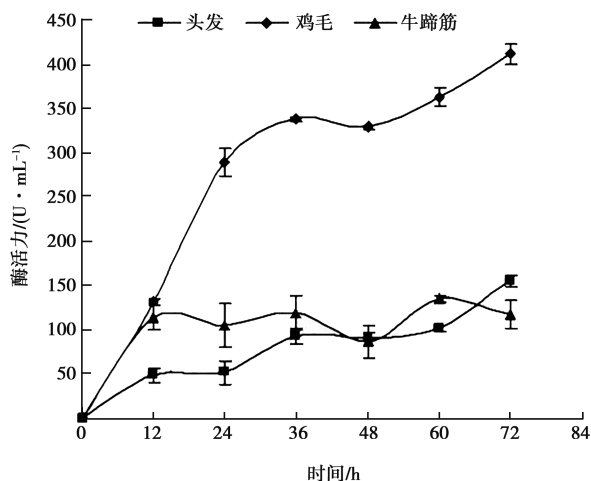


图3 不同底物对菌株 *Bacillus sp. 50-3* 产角蛋白酶的影响

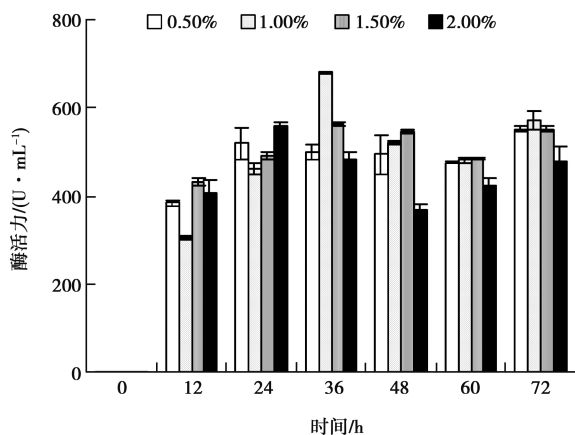


图4 底物浓度对产酶的影响

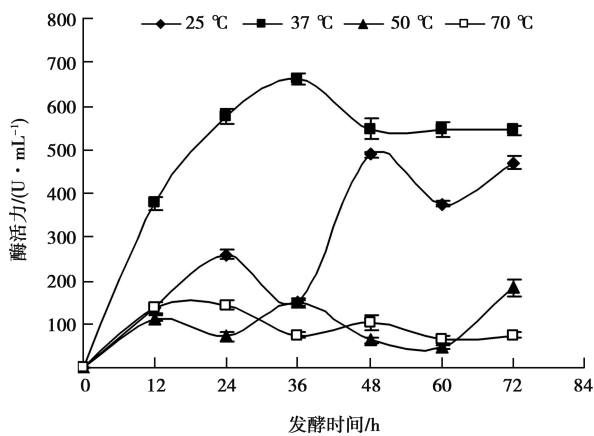


图5 发酵温度对菌株产角蛋白酶的影响

2.6 初始 pH 值的选择

如图 6 所示, 不同初始 pH 值对菌株产角蛋白酶的活力影响显著, pH 值为 8.0 时酶活力较高, 在 36 h 时达到最大值。pH 值为 4.0 时, 36 h 后产酶量

逐渐上升，酶活力逐渐升高，测其发酵液 pH 值已升至 8.0 左右，此时更有利于菌株生长，所以酶活力逐渐升高，pH 值为 11.0 时，菌株的生长受到了抑制，产生的角蛋白酶活力相对较低。因此，初始 pH 值为 8.0 时更有利于菌株生长和产生角蛋白酶。

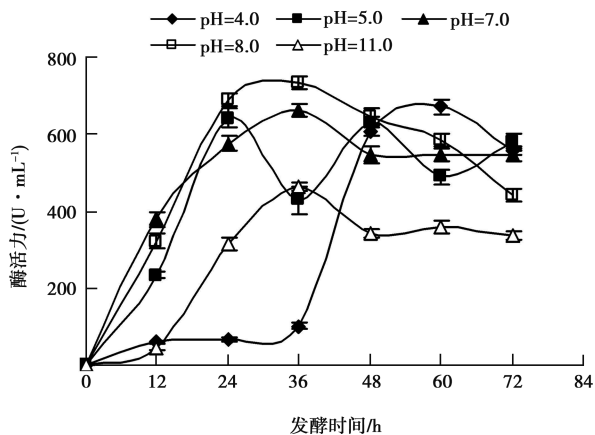


图 6 初始 pH 值对菌株产酶的影响

2.7 最佳接种量

如图 7 所示，1%~6% 的接种添加量对菌株产角蛋白酶影响不显著，当接种量大于 2% 时分析各个测定时间段的酶活力有下降趋势，而 2% 的接种量酶活力相对较高，因此选择 2% 的接种量。

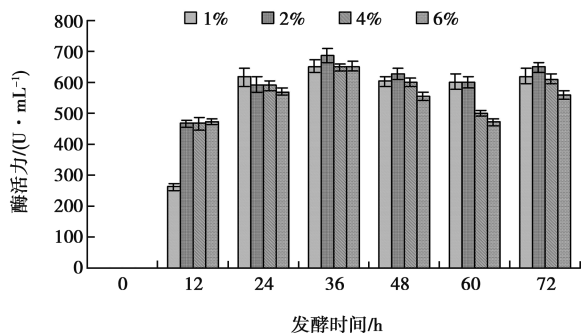


图 7 不同接种量对产酶的影响

2.8 装液量

如图 8 所示，当 300 mL 的三角瓶装液量为 50、60 和 75 mL 时，72 h 内菌株产生的角蛋白酶活力差异不显著，但与装液量 25 和 100 mL 相比，产酶影响显著，且酶活力较高，因此 300 mL 三角瓶的装液量应为 50~75 mL，即体积比为 1/6~1/4。由图可知，装液量 60 mL 时相对酶活力较高，因此选择装液量为 60 mL/300 mL。

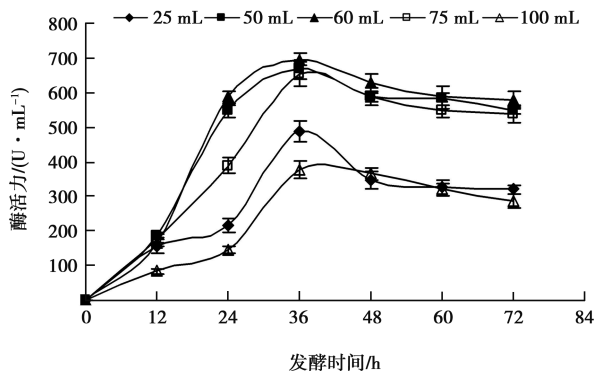


图 8 装液量对产酶的影响

2.9 蛋白质含量标准曲线

测定酶液中牛血清蛋白的蛋白质含量作标准曲线，如图 9 所示，其相关系数 R^2 为 0.990 9，待测样品中蛋白质浓度可根据吸光度从图中方程得出。

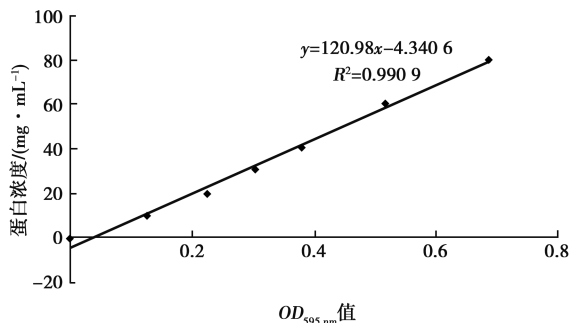


图 9 蛋白质含量标准曲线

2.10 硫酸铵饱和度

从表 2 中可知，当添加的硫酸铵的量在 40%~80% 的饱和度区间时，沉淀得到蛋白的角蛋白酶比酶活力最大，角蛋白酶活力较高，杂蛋白含量低。0~30% 和 30%~40% 饱和度和区间，蛋白的比酶活力相对较低，可见 0~40% 硫酸铵饱和度沉淀的杂蛋白含量较高，酶活力较低，因此选择 40%~80% 饱和度的硫酸铵添加量。

表 2 硫酸铵饱和度对角蛋白酶去杂

硫酸铵饱和度/%	角蛋白酶活力/ (U · mL ⁻¹)	蛋白浓度/ (mg · mL ⁻¹)	比酶活力/ (U · mg ⁻¹)
0~30	260	0.344	755.8
30~40	55	0.105	523.8
40~80	679	0.141	4 815.6
80~90	0	0	0

2.11 DEAE-Sephadex-A50 阴离子交换柱层析

饱和度硫酸铵沉淀后的角蛋白酶粗蛋白经 DEAE-Sephadex-A50 阴离子交换柱层析, 结果如图 10 所示。在 NaCl 溶液洗脱前有 2 个较小的蛋白吸收峰, 出现在 2~12 管和 13~25 管, 当用 NaCl 溶液洗脱后, 30~60 管有一个较大的蛋白吸收峰。通过测定每个收集管洗脱液的角蛋白酶活力, 可知只有 2~12 管的蛋白吸收峰有角蛋白酶活力。

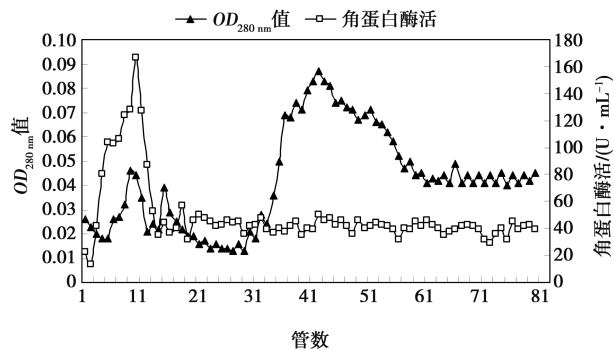
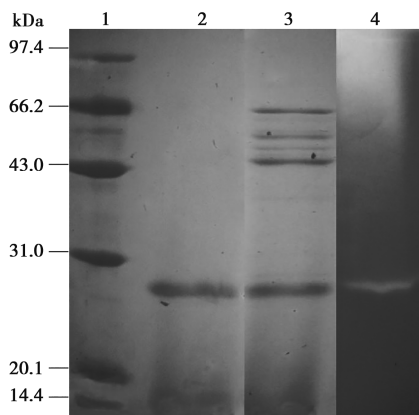


图 10 角蛋白酶的 DEAE-Sephadex-A50 柱层析

2.12 酶的电泳和活性电泳图谱

如图 11 所示, 硫酸铵沉淀后的角蛋白酶粗酶样品经 DEAE-Sephadex-A50 阴离子交换柱层析后得到的活性蛋白峰经 SDS-PAGE 后出现唯一电泳条带; 图 11 中通道 4 所示的角蛋白酶的活性电泳图也显示了唯一的电泳条带, 菌株 *Bacillus* sp. 50-3 所产的角蛋白酶的分子量约 30 kDa。



1. 低分子量标准蛋白; 2. 纯化后角蛋白酶; 3. 粗酶; 4. 纯化后活性角蛋白酶。

图 11 纯化后角蛋白酶的电泳和活性电泳

3 讨论

微生物源角蛋白酶对羽毛等废弃物中角蛋白的利用具有重要作用, Nam 等^[17]报道的 *Feridobacterium*

islandicum AW-1 产角蛋白酶为胞内蛋白酶, Sangali 等^[18]报道的 *Vibrio* sp. strain kr2 产角蛋白酶为胞外酶, El-Refai 等^[6]报道的 *Bacillus pumilus* 产角蛋白酶也为胞外蛋白酶。本研究发现, *Bacillus* sp. 50-3 产角蛋白酶为胞外酶, 其生长 12 h 后进入稳定期, 如需要提升对数生长末期菌落数, 可通过菌株诱变、发酵条件探索等途径来实现。

角蛋白分为 α -角蛋白和 β -角蛋白, α -角蛋白是羊毛、毛发、爪子、蹄子和角等的主要成分^[2,5]。 β -角蛋白则主要存在于鸟类的羽毛、喙、爪子, 以及爬行动物的鳞片和爪子等^[4,19], 许多研究通过在培养基中使用羽毛粉确证了角蛋白酶阳性菌^[3-5]。本研究结果显示, 当鸡毛角蛋白作为发酵底物时, *Bacillus* sp. 50-3 产生角蛋白酶活力较高, 36 h 时羽毛已被降解掉, 并且当鸡毛添加量为 1% 时, 36 h 时产生的角蛋白酶活力达到最高。

角蛋白酶的产生取决于角蛋白的存在及其浓度。在较高浓度的羽毛粉存在下, 酶的产量可能会下降, 表明分解代谢受到抑制, Barman 等^[3]报道在 1% 羽毛粉存在的情况下是获得最高角蛋白酶产量的良好底物, 有的报道其角蛋白酶产生的最佳底物浓度为 0.5% 或 0.8%^[4-5]。当培养基中保持合适的 pH 值时, 蛋白酶产量会达到最大。Barman 等^[3]和 Sharma 等^[4]报道菌株产酶最佳初始 pH=7.0, 有的文献报道菌株产酶最佳初始 pH=8.0^[6,13]。不同研究人员测试了不同接种量下对角蛋白酶产生的影响, 发现酶产量随着接种量的增加而增加, 但当接种量进一步增加时酶产量出现了大幅下降, 可能是过大接种量会引起底物的大量消耗, 易造成产物合成阶段营养物质供应不足所致。许多文献报道的接种量大多处于 2%~5%^[3-4,6]。发酵温度对菌株产角蛋白酶的影响较大, Barman 等^[3]和 El-Refai 等^[6]报道产角蛋白酶最佳温度为 37 °C, Sharma 等^[4]报道在 40 °C 时产角蛋白酶最佳。本研究发现, *Bacillus* sp. 50-3 产生角蛋白酶的最佳培养条件为: 300 mL 三角瓶装 60 mL 液体培养基, 调节 pH=8.0, 种龄 12 h, 接种量 2.0%, 培养温度 37 °C, 140 r/min 摇床培养 36 h。

通过硫酸铵饱和度 (70%) 和凝胶色谱分析, Shad 等^[20]报道 *Bacillus subtilis* K-5 蛋白酶的比活性分别为 124.72 U/mg 和 143.65 U/mg。Khan 等^[21]对 *Bacillus velezensis* MAMA 的角蛋白酶通过硫酸铵沉淀 (80%) 和 Sephadex G-75 凝胶过滤进行纯化, 得到的最高蛋白质浓度为 6.5 μ g/ml。Revankar 等^[22]报道也用 80% 硫酸铵从菌发酵液中开展分离纯化角蛋白酶研究。本研究结果显示, *Bacillus* sp. 50-3 产生角蛋白酶发酵液中添加饱和浓度为 40%~80% 的硫酸铵

固体粉末时,所沉淀蛋白的角蛋白酶比酶活力较高为4 815.6 U/mg,并可以去掉大部分杂蛋白,经过DEAE-Sephadex-A50阴离子交换柱层析,纯化得到了具有角蛋白酶活性的一个蛋白吸收峰。

许多报道发现角蛋白酶分子量有所不同,Al-kadmy等^[23]报道来自*Acinetobacter baumannii*的纯化角蛋白酶分子量约为35 kDa。Gegeckas等^[24]报道*Bacillus thuringiensis*产角蛋白酶BtKER分子量为39 kDa,Revankar等^[22]报道*Bacillus velezensis* strain ZBE1产角蛋白酶分子量也是39 kDa。本研究发现,*Bacillus* sp. 50-3产角蛋白酶纯化后经SDS-PAGE检验为一条电泳条带,分子量约为30 kDa,经酶活性电泳检测具有角蛋白酶活力。综上,本研究为今后的羽毛等废弃物的处理和角蛋白资源的高值化利用提供了一定的理论依据和研究借鉴。

参考文献:

[1] AKRAM F, AQEEL A, SHOAI B M, et al. Multifarious revolutionary aspects of microbial keratinases: an efficient green technology for future generation with prospective applications [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29 (58): 86913-86932.

[2] NNOLIM N E, UDENIGWE C C, OKOH A I, et al. Microbial keratinase: next generation green catalyst and prospective applications [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 580164.

[3] BARMAN N C, ZOHORA F T, DAS K C, et al. Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples [J]. *AMB Express*, 2017, 7 (1): 181.

[4] SHARMA I, KANGO N. Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 166: 1046-1056.

[5] AKRAM F, HAQ I U, HAYAT A K, et al. Keratinolytic enzyme from a thermotolerant isolate *Bacillus* sp. NDS-10: an efficient green biocatalyst for poultry waste management, laundry and hide-dehairing applications [J]. *Waste Biomass Valorization*, 2021, 12 (9): 5001-5018.

[6] EL-REFAI H A, ABDELNABY M A, GABALLA A, et al. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity [J]. *Process Biochem*, 2005, 40 (7): 2325-2332.

[7] 岳晓禹, 常惟丹, 崔丽伟, 等. 产角蛋白酶芽胞杆菌50-3的分离与初步鉴定 [J]. *食品研究与开发*, 2024, 45 (23): 203-208.

[8] ALAHYARIBEIK S, SHARIFI S D, TABANDEH F, et al. Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria [J]. *Process Saf Environ Prot*, 2020, 135: 171-178.

[9] NNOLIM N E, OKOH A I, NWODO U U. Proteolytic bacteria isolated from agro-waste dumpsites produced keratinolytic enzymes [J]. *Biotechnol Rep*, 2020, 27: e00483.

[10] BOHACZ J, KORNIEŁOWICZ-KOWALSKA T, KITOWSKI I, et al. Degradation of chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus*

and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect [J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2020, 151: 104968.

[11] ABIRAMI S, RAGAVI R, ANTONY V S. Utilization of keratinolytic *Lichtheimia corymbifera* AS1 for degradation of cattle hoove - a slaughter house waste to use in plant growth [J]. *Biointerface Res Appl Chem*, 2020, 10 (5): 6417-6426.

[12] KEROUAZ B, JAOUADI B, BRANS A, et al. Purification and biochemical characterization of two novel extracellular keratinases with feather-degradation and hide-dehairing potential [J]. *Process Biochem*, 2021, 106: 137-148.

[13] RIFFEL A, LUCAS F, HEEB P, et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin [J]. *Arch Microbiol*, 2003, 179 (4): 258-265.

[14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72 (1/2): 248-254.

[15] SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa [J]. *Anal Biochem*, 1987, 166 (2): 368-379.

[16] RIFFEL A, BRANDELLI A, DE M BELLATO C, et al. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. Kr6 [J]. *J Biotechnol*, 2007, 128 (3): 693-703.

[17] NAM G W, LEE D W, LEE H S, et al. Native-feather degradation by *Ferribacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe [J]. *Arch Microbiol*, 2002, 178 (6): 538-547.

[18] SANGALI S, BRANDELLI A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain Kr2 [J]. *J Appl Microbiol*, 2000, 89 (5): 735-743.

[19] PLOWMAN J E, HARLAND D P, DEB-CHOUDHURY S. The hair fibre: proteins, structure and development [M]. Singapore: Springer Singapore, 2018: 89-96.

[20] SHAD A A, AHMAD T, IQBAL M F, et al. Production, partial purification and characterization of protease through response surface methodology by *Bacillus subtilis* K-5 [J]. *Braz Arch Biol Technol*, 2024, 67: e24210355.

[21] KHAN A, MEHMOOD K, NADHMAN A, et al. Microbial production of keratinase from *Bacillus velezensis* strain MAMA: a novel enzyme for eco-friendly degradation of keratin waste [J]. *Heliyon*, 2024, 10 (12): e32338.

[22] REVANKAR A G, BAGEWADI Z K. Keratinase from *Bacillus velezensis* strain ZBE1: purification, structural characterization, immobilization and its multi-faceted applications [J]. *J Indian Chem Soc*, 2025, 102 (1): 101522.

[23] AL-KADMY I M S, AZIZ S N, SUHAIL A, et al. Enhancing the anti-biofilm activity of novel keratinase isolated from *Acinetobacter baumannii* using Reduced Graphene oxide: a way to recycle feather waste pollution [J]. *Clean Waste Syst*, 2023, 5: 100087.

[24] GEGECKAS A, GUDIUKAITÈ R, CITAVICIUS D. Keratinolytic proteinase from *Bacillus thuringiensis* AD-12 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 69: 46-51.