

碳氮源对 *Bacillus pumilus* K9 产角蛋白酶的影响

王 月, 张荣先, 张旦旦, 龚劲松,
李 恒, 张晓梅, 许正宏, 史劲松*

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 对 *Bacillus pumilus* K9 以羊毛粉为底物产角蛋白酶的培养条件及培养基成分进行了单因素优化和正交试验, 其中重点考察了碳氮源对 K9 产角蛋白酶的影响。实验结果表明, 添加适量外加碳氮源比使用羊毛粉为唯一碳氮源更利于 K9 产角蛋白酶; 葡萄糖、蔗糖和无机氮源等对产酶具有抑制作用, 而适量的麦芽糖和酵母粉则对产酶具有促进作用。 *B. pumilus* K9 最适产酶条件为: 麦芽糖 15 g/L, 酵母粉 10 g/L, 羊毛粉 25 g/L, 磷酸氢二钾 0.4 g/L, 氯化钠 0.5 g/L; 接种量 6%, 初始 pH 值为 8.5, 装液量为 25 mL (250 mL), 温度 35 ℃, 转速 220 r/min, 培养时间 48 h, 上述条件下最高酶活达到 1 270 U/mL, 较优化前提高了 2.54 倍。

关键词: 羊毛角蛋白; 角蛋白酶; 优化; 正交试验

中图分类号: Q 819 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)10—1077—07

Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Keratinase Production from *Bacillus pumilus* K9

WANG Yue, ZHANG Rongxian, ZHANG Dandan, GONG Jinsong,
LI Heng, ZHANG Xiaomei, XU Zhenghong, SHI Jinsong*

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In the study, the effects of culture conditions and medium composition on keratinase production from *Bacillus pumilus* K9 with wool as the substrate were investigated through univariate optimization and orthogonal experimental design. The effect of carbon and nitrogen source on keratinase production of K9 was investigated. Results showed that, addition of appropriate amount of carbon and nitrogen source could promote more production of *B. pumilus* K9 keratinase than using wool as sole carbon and nitrogen source. Glucose, sucrose and inorganic nitrogen could inhibited the production of keratinase, and appropriate amount of maltose and yeast extract could promote keratinase production. The optimal culture conditions were as follows, maltose 15 g/L, yeast extract 10 g/L, wool concentration 25 g/L, K_2HPO_4 0.4 g/L, NaCl 0.5 g/L, inoculum size 6%, initial pH 8.5, liquid medium volume 25 mL, incubation temperature 35 ℃, rotating rate 220 r/min and cultivation time 48 hours, The keratinase activity reached up to 1 270 U/mL, which was about 2.54-fold of

收稿日期: 2014-03-14

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA022204C)。

* 通信作者: 史劲松(1971—), 男, 江苏宿迁人, 工学博士, 教授, 主要从事酶工程及生物活性物质的开发研究。E-mail: shijs@163.com

activity compared with the unoptimized conditions.

Keywords: wool keratin, keratinase, optimization, orthogonal experiment

我国是世界第二大羊毛生产国,羊毛加工过程中,产生大量的废次羊毛,我国每年要处理来自于纺织厂的不适合纺纱的劣质羊毛、羊毛副产品和屠宰场的角、趾甲、羽毛等有机废物超过 400 万吨^[1]。这些废弃物若不能合理利用,既是资源浪费,更对环境造成了严重的污染。羊毛的主要组成是 α -角蛋白,是一种纤维状蛋白质,氨基酸通过肽键构成多肽长链,多肽长链又通过二硫键、氢键、范德华力等联系形成角蛋白的空间构形,使角蛋白呈交联的 α -螺旋结构,形成纤维。其结构复杂而致密^[2-3],难以被普通蛋白酶降解^[4]。由于角蛋白化学结构稳定,不溶于水,是一种抗性很强的硬性蛋白,采用传统的高压水解法和酸碱水解法降解羊毛角蛋白,不仅能耗大、污染重,而且容易破坏氨基酸及肽键,影响一些蛋白及多肽的活性结构。

角蛋白酶是一类特异性降解角蛋白的酶类,使用角蛋白酶降解角蛋白,具有高效,低能耗,作用条件温和的特点。目前已广泛应用于肥料^[5]、饲料^[6]、化妆品、洗涤剂^[7]、医药和制革^[8-9]等工业中。

角蛋白酶主要由自然界中能够降解角蛋白的细菌^[10]、真菌^[11]和放线菌^[12]等微生物产生,其产生大多需要外源诱导物的作用,是一类诱导型酶^[13]。目前已有细菌、真菌等不同来源的许多角蛋白酶被报道,相关研究主要包括降解角蛋白的微生物的筛选,产角蛋白酶菌株的发酵条件优化,角蛋白酶的分离纯化和酶学性质研究,角蛋白酶基因提取、外源表达的研究和角蛋白降解机理的研究等。然而,综合来看角蛋白酶的应用受到诸多因素限制,如酶活偏低、酶发酵产量不高等问题;尽管目前采用基因工程技术进行酶分子改造是流行趋势,但并未取得显著的改善效果,因此传统发酵优化手段仍受到本领域学者的重视。

作者以一株 *Bacillus pumilus* K9 为研究对象,对该菌株产角蛋白酶的发酵条件进行了单因素优化和正交设计优化,探讨了碳氮源对 *B. pumilus* K9 产角蛋白酶的影响,为该酶的纯化和应用研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种 短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* K9: 作者所在实验室筛选,保藏号为 CGMCC No. 8046。

1.1.2 主要试剂 自制羊毛粉:羊毛清洗后 50 °C 烘干,充分粉碎;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器 超净工作台:上海博迅实业有限公司医疗设备厂产品;生化培养箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂产品;组合式摇床:太仓市强乐实验设备有限公司产品;台式高速冷冻离心机:Eppendorf 公司产品;电子天平:METTLER TOLEDD 产品;台式水浴恒温振荡器:太仓市强乐实验设备有限公司产品;紫外分光光度计:PHENIX OPTICAL 产品。

1.1.4 培养基 种子培养基(LB 培养基);发酵培养基:羊毛粉 10 g/L,磷酸氢二钾 0.4 g/L,氯化钠 0.5 g/L,121 °C 高压灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 角蛋白酶酶活测定 参照 Yamamura^[14]方法:取 1 mL 适当稀释的粗酶液加入到 1 mL 用 pH 9 的 Tris-HCl 缓冲液稀释的质量分数 1%角蛋白(J&K 百灵威)溶液中,55 °C 反应 15 min 后,加入 2 mL 0.4 mol/L 的三氯乙酸终止反应,12 000×g 离心 5 min,取上清液 1 mL 加入 5 mL 碳酸钠溶液,和 1 mL 福林酚试剂,于 40 °C 保温 20 min,在波长 680 nm 下测定其吸光值;采用加酶液前添加三氯乙酸的反应管作对照。酶活力定义:在上述反应体系中,吸光度增加 0.01 为一个酶活单位(U/mL)。

1.2.2 种子培养及基本发酵条件 从新培养的 K9 的平板挑取菌体,接种到 50 mL/250 mL 液态种子培养基中,220 r/min,37 °C 摇床培养。每隔 3 h 分别取样,测定 A_{600nm} ,设 3 个平行组,作出 K9 的生长曲线。

采用发酵培养基,基本发酵条件为 250 mL 三角瓶摇瓶培养,装液量 30 mL,摇床转速 220 r/min,培养温度 37 °C。液态种子培养 15 h 后,按体积分数 4%接种量转接。以上条件下每 6 h 取发酵液测定酶活以观察培养时间对产酶的影响。

1.2.3 发酵条件研究 按上述基本发酵条件,发酵培养基中羊毛粉质量浓度设置为 20 g/L,分别调整不同因素,考察单因素变化对发酵产酶的影响。其中培养基初始 pH 值的组别设置为 6.0、7.0、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0,培养温度分别设置为 26、30、35、37、42 ℃;接种量的组别设置为体积分数 2%、4%、6%、8%、10%、15%;装液量分别为 20、25、30、35、50 mL。以 48 h 产酶水平进行比较。

1.2.4 碳源、氮源及其浓度对产酶影响的研究 培养条件为基本发酵条件。底物质量浓度对产酶的影响:将发酵培养基中的添加底物羊毛粉进行培养,将其浓度分别设置为 1、5、10、15、20、30、50 g/L,考察羊毛粉作为唯一碳氮源对产酶的影响。

碳源对产酶的影响:在发酵培养基中,分别添加 10 g/L 的葡萄糖、蔗糖、玉米粉、淀粉、乳糖、麦芽糖,考察碳源对发酵产酶的影响,并对碳源浓度进行优化。

氮源对产酶的影响:分别添加 2 g/L 的脲、硫酸铵、硝酸钠、蛋白胨、酪蛋白、豆饼粉、牛肉膏、酵母粉,考察氮源对发酵产酶的影响,并对添加浓度进行优化。

1.2.5 正交试验优化 选取麦芽糖、酵母粉、羊毛粉 3 个影响角蛋白酶活性的主要因素,每个因素选取 3 个水平,进行 $L_9(3^3)$ 正交试验。确定最佳培养基组成。对正交优化后的最佳方案进行 3 个批次的试验验证,正交试验及验证实验的培养条件均使用单因素优化后的最适培养条件。

2 结果与讨论

2.1 种子时间与接种量

B. pumilus K9 在培养 3 h 后,就由延滞期进入到对数生长期,菌体快速增殖,至 18 h 进入稳定期。适宜的种子培养时间在 12~15 h,此时在对数生长中后期,且菌体浓度 $A_{600\text{nm}}$ 均在 2.5 以上(图 1)。选择培养 12 h 的种子进行接种量研究,当接种量达到体积分数 6% 时,即可达到较优的产酶水平(图 2)。

2.2 培养条件对产酶活性的影响

发酵培养基的自然 pH 为 7.24,当初始 pH 值为 6 时,K9 产酶水平较低,这与低 pH 下生长不良有密切关系(图 3)。研究发现,初始 pH 值为 8.5 时,产酶水平较好。同样在 pH 高于 9.0 时,菌体生长也受到较大影响。由图 4 可以看出,35 ℃ 以下时,酶活力随

温度升高而上升,随后略有下降,因此,选择最适培养温度为 35 ℃。

装液量对产酶的影响可以间接反映菌株对溶氧的需求,装液量越大,溶氧越低。由图 5 中可以看出,装液量对该菌产酶酶活影响不大。当装液量为 25 mL 时,角蛋白酶活相对最高。因此选择最适装液量为 25 mL/250 mL。由图 6 可以看出,培养 6 h 以后,菌体酶活增长较快,到 48 h 达到最高值,随后趋于平稳并逐渐降低,因此确定最适发酵时间为 48 h。

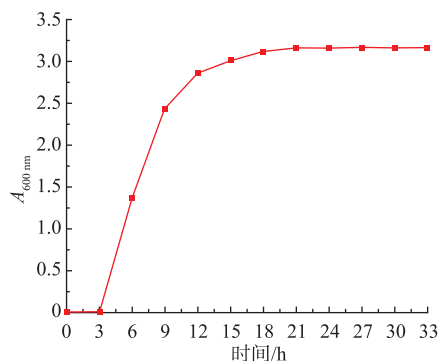


图 1 短小芽孢杆菌 *B. pumilus* K9 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *B. pumilus* K9

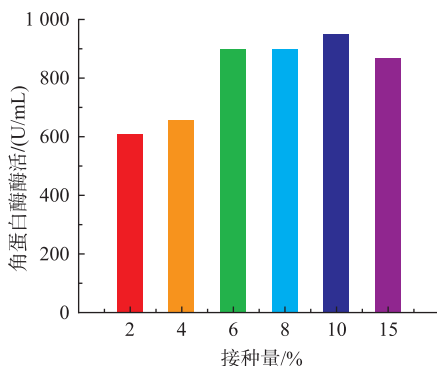


图 2 接种量对产酶活性的影响

Fig. 2 Effects of inoculum size on keratinase production

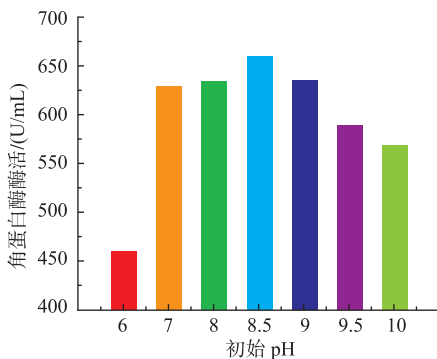


图 3 培养基初始 pH 对产酶活性的影响

Fig. 3 Effects of initial pH value on keratinase production

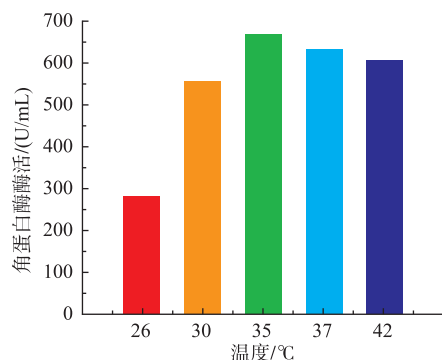


图4 培养温度对产酶活性的影响

Fig. 4 Effects of cultivation temperature of keratinase production

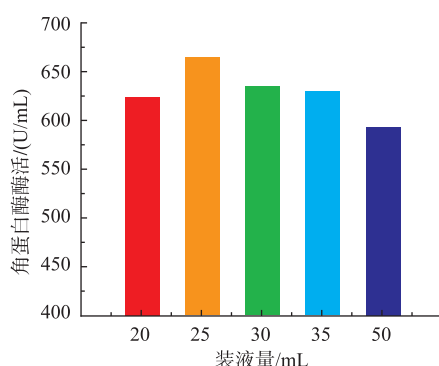


图5 装液量(250 mL 锥形瓶)对产酶活性的影响

Fig. 5 Effects of fermentation medium volume in 250 mL flask

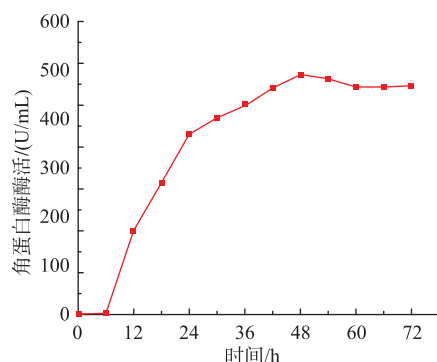


图6 发酵时间对产酶活性的影响

Fig. 6 Time course production of keratinase

2.3 氮源、碳源对产酶活性的影响

羊毛、羽毛、头发等生物质含有不同结构类型的角蛋白,其中羊毛是诱导 *B. pumilus* K9 产酶的较好底物,而采用羽毛、头发作为底物,产酶水平均低于羊毛。以羊毛作为诱导底物进一步研究,其在培养基中添加量达到 20 g/L 时,产酶水平最高(图 7)。

以羊毛作为单一碳氮源,发酵过程的菌体量偏少,显然培养基中的碳氮源相对缺乏,微生物要通过分泌到培养基中的角蛋白酶对羊毛进行水解,才能获得生长所需的碳氮源。但在生长初期,如果菌体量没有达到一定程度的增殖,也不会达到较高的产酶水平。因此,需要在基础培养基中,添加一些容易利用的碳氮源。

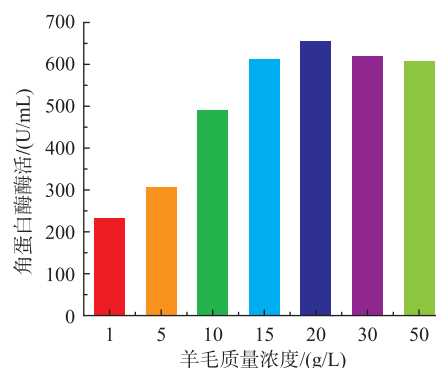


图7 羊毛质量浓度对产酶活性的影响

Fig. 7 Effects of wool content on keratinase production

实验分别添加 2 g/L 的脲、硫酸铵、硝酸钠、蛋白胨、酪蛋白、豆粕粉、牛肉膏、酵母粉等有机氮源或无机氮源,发现酵母粉对产酶有较好的促进作用,其次是蛋白胨,而无机氮源中尿素和硫酸铵对产酶有一定的抑制作用(图 8)。

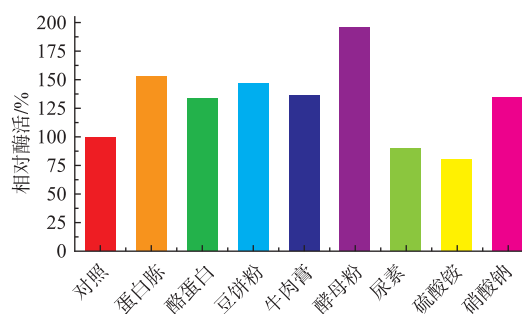


图8 氮源对产酶活性的影响

Fig. 8 Effects of nitrogen resources on keratinase production

在竞争性环境中有效的利用碳源、氮源对于微生物的生存至关重要。为了尽可能充分地利用营养物质,微生物进化出一套完善的控制系统,优先摄取碳水化合物进行快速生长,优先利用葡萄糖等速效碳源,抑制对第二碳源运输和代谢至关重要的蛋白质合成及活性,这种调控现象就称之为碳分解代

谢物阻遏 (carbon catabolite repression)。对 *B. pumilus* K9 而言,由于无机氮源容易利用,也表现出较强的氮源阻遏作用,降低了羊毛角蛋白需求程度,K9 诱导合成角蛋白酶的产量不足;而有机氮源相对较好,在满足发酵初期菌体量快速增加的同时,也不会形成较强的阻遏作用。但其添加量也有一个限度,实验发现,在低于 10 g/L 时,其添加量有助于产酶水平的提升,当增加到 20 g/L 后,也将引起产酶水平的下降(图 9)。

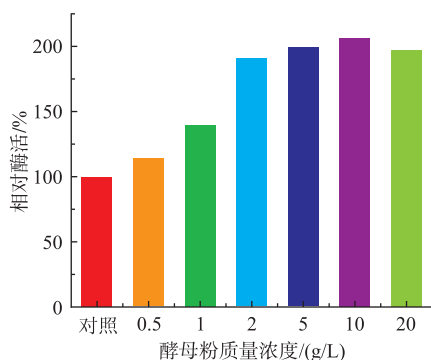


图 9 酵母粉质量浓度对产酶活性的影响

Fig. 9 Effect of Yeast extract concentration on keratinase production

实验发现,碳源代谢也存在代谢阻遏现象,反应在产酶水平上的差异更大(图 10)。葡萄糖、蔗糖是容易利用的碳源,当培养基中添加 10 g/L 时,尽管菌体长势良好,但发酵产酶受到严重的抑制。对于玉米粉、淀粉这样的大分子碳源,由于需要水解酶的作用才能被利用,因而对产酶影响较低。而在培养基中添加少量的麦芽糖(20 g/L),则能够大幅度提高产酶水平(图 11)。实际上微生物对葡萄糖、麦芽糖的利用是依靠不同的跨膜蛋白实现的。最近 Chen 等人在研究肠道细菌的碳阻遏现象时发现,这种代谢阻遏由葡萄糖特异性磷酸转移酶系统 PTS 的一个关键组成元件 EIIAGlc 所介导,大肠杆菌 EIIAGlc 与麦芽糖转运蛋白 MalFGK2 能够结合,阻止其对麦芽糖的利用;PTS 启动可提高未磷酸化 EIIAGlc 水平,相反,磷酸化的 EIIAGlc 可以刺激 cAMP 合成,由此导致许多代谢分解基因转录激活^[15]。因此,要提高产酶水平,必须要抑制葡萄糖的转运。而 K9 产酶现象从另一方面说明了,麦芽糖转运系统的激活,可以提高蛋白酶在内的水解酶的合成,当然在分子机制上仍需要更为深入的研究。

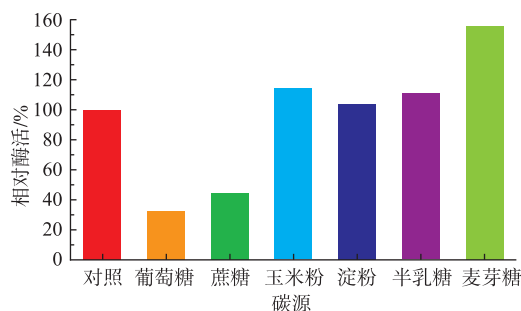


图 10 碳源对产酶活性的影响

Fig. 10 Effects of carbon resources on keratinase production

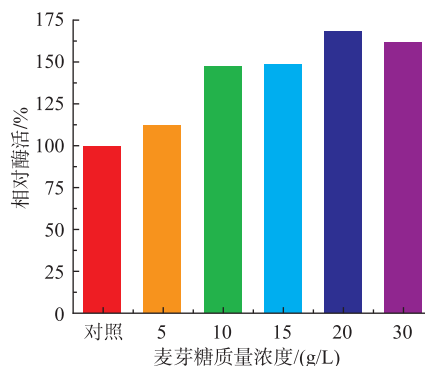


图 11 麦芽糖质量浓度对产酶活性的影响

Fig. 11 Effect of maltose concentration on keratinase production

2.4 正交试验设计优化短小芽孢杆菌 *B. pumilus* K9 产酶条件

在以羊毛为底物进行角蛋白酶发酵优化的过程中,麦芽糖、酵母粉和羊毛粉对菌体的生长和产酶具有比较明显的影响,因此设计正交试验确定最适产酶条件,正交试验因素及水平见表 1。

由正交试验结果分析(表 2)可知,由各因素的最适浓度得到的最优组合为: $A_1B_2C_3$ 。对最优组合验证的结果表明,最适产酶条件为:麦芽糖 15 g/L,酵母粉 10 g/L,羊毛粉 25 g/L,磷酸氢二钾 0.4 g/L,氯化钠 0.5 g/L,接种量 6 g/dL,温度 35 ℃,转速 220 r/min,培养时间 48 h,上述条件下,酶活可达到 1 270 U/mL,较优化前提高了 2.54 倍。蔡成岗等对发酵培养基进行优化后,以可溶性角蛋白为底物测得枯草芽孢杆菌 KD-N2 角蛋白酶活性为 66.5 U/mL^[16];赖欣等对短小芽孢杆菌 B-15 产酶条件进行了优化,以羽毛粉为底物测得的角蛋白酶活性为 2.03 U/mL,是优化前的 2.5 倍^[17]。

表 1 培养基成分优化正交试验因素水平表

Table 1 Table of levels and factors of orthogonal experiment design

水平	质量浓度/(g/L)		
	A 麦芽糖	B 酵母粉	C 羊毛粉
1	15	5	15
2	20	10	20
3	25	15	25

表 2 正交试验结果分析表

Table 2 Analysis of results of orthogonal experimental design

序号	质量浓度/(g/L)			角蛋白酶活性/ (U/mL)
	A 麦芽糖	B 酵母粉	C 羊毛粉	
1	1	1	1	1 084
2	1	2	2	1 203
3	1	3	3	1 216
4	2	1	2	969
5	2	2	3	1 234
6	2	3	1	972
7	3	1	3	992
8	3	2	1	1 046
9	3	3	2	1 007
k_1	1 167	1 015	1 034	
k_2	1 058	1 161	1 059	
k_3	1 014	1 064	1 147	
R	153.0	146.0	113.3	

3 结 语

对影响 *B. pumilus* K9 产角蛋白酶的发酵培养基成分及培养条件进行了单因素优化和正交试验,并重点考察了碳氮源对 K9 产酶的影响。研究发现,底物羊毛粉质量浓度对 *B. pumilus* K9 产酶影响显著,角蛋白酶酶活随羊毛粉质量浓度增加而逐渐升

高,但当底物浓度增加到 20 g/L 以上时,酶活反而有下降趋势,说明羊毛粉质量浓度过高时不利于产酶,该结果与聂康康等的研究结果一致^[18]。原因应为高浓度的羊毛粉底物对角蛋白酶的产生有反馈性抑制作用,同时,底物浓度过高使培养基粘度增加,导致发酵培养基中的溶氧含量下降,影响菌体的生长^[19],从而使产酶量下降。

碳源对产酶的影响表明,麦芽糖的添加对 *B. pumilus* K9 产角蛋白酶有明显的促进作用,酶活性提高了 70%左右,但葡萄糖和蔗糖的添加对产酶有抑制作用;而在不同的氮源中,酵母粉的添加也对菌株产酶有显著的提高,与未添加的对照相比,酶活提高了 110%,无机氮源尿素和硫酸铵的添加对酶活有抑制作用。已有研究表明,外加碳源和氮源对发酵产角蛋白酶会造成不同程度的影响。较多研究表明,葡萄糖的添加对角蛋白酶分泌具有抑制作用^[20],这与本研究的结果是一致的。在添加氮源的研究中,较多报道表明,一些有机氮源(如牛肉膏、蛋白胨等)能够促进产酶^[21],而添加无机氮源对产酶有抑制作用^[22]。这与本研究结果基本一致。

对发酵培养条件进行单因素研究的结果为,最适培养条件:种子培养时间为 12 h,发酵时间为 48 h,发酵温度 35 ℃,初始 pH 值为 8.5,接种量 6%,装液量为 25 mL。与初始条件相比,菌株发酵产角蛋白酶活有了明显提高。选择对产酶影响较大的因素设计正交试验优化产酶条件,由发酵培养基正交试验结果中的各项 k 值可得最优组合为:A₁B₂C₃。对最优组合进行验证,最终获得 *B. pumilus* K9 的最适产酶条件。

作者考察了碳氮源对 *B. pumilus* K9 产角蛋白酶的影响,并通过单因素优化和正交设计使 *B. pumilus* K9 产角蛋白酶的酶活提高到 1 270 U/mL,较优化前提高了 2.54 倍,为该酶的纯化和进一步的工业应用研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘让同,徐博. 巯基乙醇还原法溶解羊毛角蛋白[J]. 毛纺科技,2004(2):5-7.
LIU Rangtong, XU Bo. Wool keratin's solution using mercaethanol[J]. **Wool Textile Journal**, 2004(2):5-7. (in Chinese)
- [2] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, 70(1):21-33.
- [3] Brandelli A, Daroit D J, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications[J]. **Applied**

- Microbiology and Biotechnology**, 2010, 85(6): 1735–1750.
- [4] Riffel A, Brandelli A, Bellato C M, et al. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6[J]. **Journal of Biotechnology**, 2007, 128(3): 693–703.
- [5] Brandelli A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond [J]. **Food and Bioprocess Technology**, 2008, 1(2): 105–116.
- [6] Syed D G, Lee J C, Li W J, et al. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis* [J]. **Bioresource Technology**, 2009, 100(5): 1868–1871.
- [7] Farag A M, Hassan M A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae* [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004, 34(2): 85–93.
- [8] Allpress J D, Mountain G, Gowland P C. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497 [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2002, 34(5): 337–343.
- [9] Anbu P, Gopinatha S C B, Hilda A, et al. Purification of keratinase from poultry farm isolate–*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005, 36(5): 639–647.
- [10] Okoroma E A, Garelick H, Abiola O O, et al. Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather [J]. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2012, 74: 54–60.
- [11] Sylvanus C U, Bamidele I. Production and characterisation of keratinase by fungi isolated from soil samples at Gwagwalada, FCT–Abuja, Nigeria [J]. **Nature & Science**, 2013, 11(10): 1–7.
- [12] Syed D G, Lee J C, Li W J, et al. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis* [J]. **Bioresource Technology**, 2009, 100(5): 1868–1871.
- [13] 朱尽顺, 汪涛, 梁列峰. 羊毛角蛋白的再生及利用 [J]. 毛纺科技, 2007(6): 26–29.
ZHU Jinshun, WANG Tao, LIANG Liefeng. Regeneration and its usage of wool keratin [J]. **Wool Textile Journal**, 2007(6): 26–29. (in Chinese)
- [14] Yamamura S, Morita Y, Hasan Q, et al. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2002, 93(6): 595–600.
- [15] Chen S, Oldham M L, Davidson A L, et al. Carbon catabolite repression of the maltose transporter revealed by X-ray crystallography [J]. **Nature**, 2013, 499(7458): 364–368.
- [16] 蔡成岗, 郑晓冬. 以羽毛为底物发酵产角蛋白酶培养基的优化 [J]. 科技通报, 2009, 25(4): 451–455.
CAI Chenggang, ZHENG Xiaodong. Medium optimization for keratinase production in feather substrates [J]. **Bulletin of Science and Technology**, 2009, 25(4): 451–455. (in Chinese)
- [17] 赖欣, 陈惠. 短小芽孢杆菌 B-15 产酶条件的优化及酶学性质的研究 [J]. 中国饲料, 2008, 15: 39–43.
LAI Xin, CHEN Hui. Study on the optimization of fermentation condition and the enzymatic properties of *Bacillus pumilus* B-15 [J]. **China Feed**, 2008, 15: 39–43. (in Chinese)
- [18] 聂康康, 姚大伟, 马琳, 等. 苏云金芽孢杆菌 NJY1 发酵羊毛粉产角蛋白酶条件的初步研究 [J]. 江苏农业科学, 2010(3): 261–263.
NIE Kangkang, YAO Dawei, MA Lin, et al. Optimization for keratin-degrading enzyme producing conditions by *Bacillus thuringiensis* NJY1 fermentation using wool powder as unique carbon and nitrogen source [J]. **Jiangsu Agricultural Sciences**, 2010(3): 261–263. (in Chinese)
- [19] Ozdamar T H. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: use of citric acid as the carbon source [J]. **Enzyme Microb Tech**, 1998, 23(7): 451–461.
- [20] Nam G W, Lee D W, Lee H S. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe [J]. **Archives of Microbiology**, 2002, 178(6): 538–547.
- [21] 曹军, 郝林, 宋志文, 等. 栖土曲霉生产角蛋白酶研究 [J]. 微生物学杂志, 2001, 21(2): 11–13.
CAO Jun, HAO Lin, SONG Zhiwen, et al. Keratinase production by *Aspergillus terricola* [J]. **Journal of Microbiology**, 2001, 21(2): 11–13. (in Chinese)
- [22] 傅伟. 地衣芽孢杆菌降解羽毛角蛋白及其发酵产角蛋白酶的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.