- [2] 张香桐, 中国科学, 1973, 1, 28—52.
- [3] 吴建屏、赵志奇、魏仁榆, 科学通报, 18 (1973), 5, 238.
- [4] Swank, R. L. and Davenport, H. A., *Stain Technology*, 10 (1935), 87—90.
- [5] Nauta, W. J. H. and Kuypers, G. J. M., in Jasper, H. H. et al. (Eds.), *Reticular Formation of the Brain*, 1957, London, Churchill, pp. 3—30.
- [6] Mehler, W. R., in French, J. D. and Porter, R. W. (Eds.), *Basic Research in Paraplegia*, 1962, pp. 26—55.
- [7] Boivie, J., *Exptl. Brain Res.*, 12 (1971), 331—353.
- [8] Lundberg, A., in Eccles, J. C. and Schädé, J. P. (Eds.), *Physiology of Spinal Cord. Progress in Brain Research*, 12 (1964), Amsterdam, Elsevier, pp. 135—163.

短小芽孢杆菌碱性蛋白酶制剂的研究

沈阳林业土壤研究所微生物室酶制剂组

本文简要报道短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 碱性蛋白酶制剂研究的部分结果。

号菌株属于短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus* Gottheil, 1901)。

菌种的筛选、纯化和鉴定

发 酵 试 验

在 1963 年土壤微生物区系工作的基础上, 经过大量的初筛, 1970 年从我国森林土壤中筛选出六株产碱性蛋白酶较强的菌株 (该菌株各分布于我国不同地区的森林土壤中, 但都属于同一个种), 经过菌种的纯化后, 进行菌种的鉴定, 其中产碱性蛋白酶较强的 289 号菌株鉴定的主要结果如下:

用短小芽孢杆菌“289”发酵生产碱性蛋白酶时, 培养基可以完全不用高淀粉含量的原料 (如玉米粉、山芋粉等), 而只需用麸皮、米糠、豆饼粉和无机盐类就行。因此可以大量节省工业发酵用粮。短小芽孢杆菌在发酵过程中, pH 值有明显的下降和回升的现象, 一般当 pH 值下降到最低点而出现回升时, 开始产酶, 此时如加大通风量, 增加氧, 能使产酶速度加快, 产酶量也有很明显的增加。因此, 可以根据发酵液 pH 值的变化来控制通风量, 例如在 2,000 立升罐发酵生产时, 前期 (pH 值逐步下降阶段) 通风量可采用 1:0.5, 后期 (pH 值开始有明显回升时起) 的通风量则可以加大到 1:1。根据发酵液 pH 值的变化, 进行发酵的中间控制, 这是一项切实可行而且十分方便的工艺措施 (见图 1A)。在发酵过程中, 金属离子锰 (Mn^{++}) 对短小芽孢杆菌的生长与产酶有良好的促进作用, 例如在发酵培养基中添加 0.05% 浓度的 $MnCl_2$ 的处理,

形态特征 单独或两个细胞连在一起, 大小为 $0.6—0.7 \times 1.5—2.0$ 微米。产生芽孢, 芽孢大小为 $0.6—0.7 \times 1.0—1.2$ 微米, 呈椭圆形位于菌体中央, 不膨大, 周生鞭毛, 革兰氏染色阳性, 易变。

培养特征 生长在肉汁琼脂斜面上, 光滑、扩散、薄、呈浅黄色、闪光。

生理生化特征 能在含 7% 氯化钠肉汤中生长, 不水解淀粉, 不还原硝酸盐, 牛乳平板形成大的酪素水解圈, 在明胶平板上形成大的水解圈, 牛乳胨化、凝固, V.P. 反应阳性等等。

根据 Bergey's《细菌学鉴定手册》(Manual of Determinative Bacteriology, 1957) 鉴定, 289

本文 1973 年 8 月 13 日收到。

图1 短小芽孢杆菌“289”pH变化规律A及产酶曲线B

①为pH值最低点，②为加大通风量的最适期，③为产酶盛期，④为放罐提取酶的最适期(此时用Casin-Folin法测定，酶活性达到6000u/ml以上)。

一般较对照(不加 Mn^{++})的产酶量增加10%以上。

短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶的某些特性

pH值对酶活性的影响 pH值对短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶活性的影响曲线如图2A，酶的最适pH值在9.0—10.5的范围内。如果“289”碱性蛋白酶用三聚磷酸钠作保护剂时，则其最适pH值为9—11.0，范围比较宽。因此这种酶制剂在生产中应用时，pH值的调节是比较方便的。我们的试验也证明了“289”碱性蛋白酶对pH值的稳定性情况，在最适pH值范围偏酸性方面，酶活力因 H^+ 的影响而降低是一个可逆的抑制过

图2 pH对酶活性的影响A及酶对pH的稳定性B

程，而在最适pH值范围的偏碱性方面则是不可逆的抑制作用(见图2B)。图2中最适pH值范围及酶对pH值的稳定性，为酶在应用时调节合适的环境pH值提供了依据。

温度对酶活性的影响 酶的最适温度范围及酶对热的稳定性，在生产使用时有实用意义。我们的试验证明，“289”碱性蛋白酶酶反应的最适温度是50℃，但是酶对热的稳定性则在20℃到40℃为最好(见图3)。

图3 酶对热的稳定性

表1 金属离子对短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶活性的影响(%)

处 理	酶 活 性 金 属 离 子 %	Mn ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Co ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Fe ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Pb ⁺⁺	Cr ⁺⁺	Al ⁺⁺	Cu ⁺⁺	Hg ⁺⁺	对照(不加)
金属离子 浓 度	4×10 ⁻⁴ M	113.8	117.2	105.2	91.4	103.4	108.6	108.6	112.1	103.4	37.9	17.2	100.0
	4×10 ⁻³ M	176.8	103.4	72.4	46.6	77.6	100.0	72.4	100.0	13.8	62.1	10.3	100.0

在 50℃ 维持 30 分钟以后, 由于酶的热变性缘故, 酶的活性就要降低 30% 以上, 如增温到 60℃ 维持 30 分钟以后, 酶活性则要降低 96%。如果“289”碱性蛋白酶用三聚磷酸钠等作保护剂时, 酶的耐热程度则有极显著的提高。

微量金属离子对酶活性的影响 将“289”碱性蛋白酶与各种微量金属离子一起放在 pH 为 10.0 的硼砂-氢氧化钠缓冲溶液中, 于 40℃ 保温一小时, 然后测定酶活性 (Casin-Folin 法测定), 其结果如表 1。

从表 1 可以看出, 钙 (Ca^{++})、锰 (Mn^{++}) 等金属离子, 特别是锰离子, 对短小芽孢杆菌碱性蛋白酶的活性有显著的激活作用, 而重金属离子, 如汞 (Hg^{++})、铜 (Cu^{++}) 等则有明显的抑制作用。

短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶制剂的应用

短小芽孢杆菌碱性蛋白酶与枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 生产菌株“2709”碱性蛋白酶的比较 各种微生物蛋白酶对所有的蛋白质都有类似的催化能力, 这可以被认为是一种广谱性的蛋白酶, 但不同微生物蛋白酶在不同基质上的酶活性又有一定的差异, 而这种酶活性的微小差异又将影响到酶制剂应用时的效果。短小芽孢杆菌生产菌株“289”碱性蛋白酶与枯草杆菌生产菌株“2709”碱性蛋白酶在不同基质上酶活性的比较如表 2。

从表 2 可以看出, 短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶在柞蚕丝绢上应用时, 较枯草杆菌

表 2 几株细菌碱性蛋白酶在不同基质上酶活性的比较

细菌碱性蛋白酶的类 种	酶 的 作 用			
	柞丝绸 脱胶	桑蚕丝 脱胶	猪皮革 脱毛软化	人血-牛 奶-墨汁 标准污布 去污力
<i>Bac. pumilus</i> (生产菌株 289)	++++	+++	++++	++++
<i>Bac. pumilus</i> 96	+++	+++	+++	+++
<i>Bac. pumilus</i> 54	++	+++	+++	+++
<i>Bac. pumilus</i> 55	+++	+++	—	++
<i>Bac. pumilus</i> 262	++++	++	—	+
<i>Bac. pumilus</i> 290	+++	++++	++++	++++
<i>Bac. subtilis</i> (生产菌株 2709)	+++	+++	+++	++

注: 表中 ++++ 酶活性强, +++ 酶活性较强, ++ 酶活性中等, + 酶活性较弱。

“2709”碱性蛋白酶具有更强的酶活性; 在对猪皮服装革的脱毛软化, 以及对人血——牛奶——墨汁标准污布的去污力方面, 效果也较枯草杆菌“2709”碱性蛋白酶好得多。

短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶在精炼柞蚕丝色织绢方面的应用 柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 丝主要是由丝质纤维和丝胶所组成, 其他尚有一些碳水化合物、无机盐等成分。在柞蚕丝的丝胶中, 如精氨酸、组氨酸、苏氨酸、铬氨酸的含量, 要较桑蚕丝胶中的含量为多。而短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶对这类柞蚕丝绢的作用, 较枯草杆菌“2709”碱性蛋白酶要大。碱性蛋白酶对丝质纤维一类结晶性高的纤维状蛋白质, 一般不能起作用, 但对柞蚕丝的丝胶等非结晶性蛋白质, 则极易酶解成胨、肽及氨基酸等小分子, 所以能够提高丝绸精炼的效果。我们提供短小芽孢杆菌

表 3 酶法精炼柞蚕丝彩格绸对产品内在质量的影响*

精 炼 加 工 方 法	织物色泽	断裂强度 (公斤)		色 牢 度					缩 水 率 (%)		毛细效应 (上升厘米/分钟)
		经	纬	日晒	皂洗	汗渍	水浸	干磨	经	纬	
皂 碱 法 (95—100℃)	黄红橙	30	55	—	5	4	5	4—5	4	-1.8	0.5
“289”碱性蛋白酶法 (40℃)	黄红橙	36	70	—	5	4—5	5	4—5	3.9	-1	5.4

* 由辽宁省海城县丝绸厂测定。

“289”菌种及技术资料,由沈阳市老龙口酒厂酶制剂车间生产并供应“289”碱性蛋白酶制剂,与辽宁海城县丝绸厂合作,共同用“289”碱性蛋白酶精炼出口柞蚕丝彩格绸的试验,根据酶的反应速度、精炼效果等的比较,我们选定了色织绸的精炼温度为40℃,酶活性为20单位/毫升,洗涤剂2克/立升,酶作用三个小时,以一浴法完成酶对柞蚕丝色织绸的精炼,取得了良好的效果。经过柞蚕丝的炼漂、染色,精巧织造和用短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶精炼等技术的新工艺后,提高了产品的内在质量(见表3),并充分地发挥出了柞蚕丝特有的珠宝光泽和良好的手感及弹性等优点。这种柞蚕丝色织绸,在1972年已被列为十四国国际展览的重点产品。

短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶在猪皮服装革脱毛软化和植物鞣革等方面的应用 短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶在猪皮服装革、手套革脱毛软化上的应用(鞍山鞋革厂),在植物鞣革如猪底革、水牛皮革、工业革和栲里革酶处理上的应用(旅大金州制革厂),都已获得了成功,开始外贸出口。用“289”碱性蛋白酶生产的猪皮服装革,以采用无系数酶脱毛,调pH9.5—10.0,温度40—37.5℃,酶活性100单位/毫升,作用二个半小时到三个小时的处理效果为最好。用这种工艺生产的猪皮服装革,等级率普遍提高,其中一等产品就较旧法增多35%。同时,酶法制革新工艺还缩短了制革的生产周期,提高了劳动效率,降低了成本。据鞍山鞋革厂试生产后,认为“289”碱性蛋白酶在软化猪皮时,效果较“1398”中性蛋白酶为快,而且裸皮色泽洁白,软硬接近一致,臀部不露鬃眼。并因“289”碱性蛋白酶是在碱性条件下起作用,故在猪皮脱脂后进行酶脱毛时,不需要加铵盐等调整

pH值,软化时也不需加过多铵盐降低pH值,这样既可节省铵盐,同时又便于工艺的控制。浙江省海宁制革厂在生产试验后鉴定,认为“289”碱性蛋白酶应用于制造猪皮服装革的脱毛软化,质量是好的。而且用“289”碱性蛋白酶法脱毛生产猪皮服装革时,由于在工艺中不必再加入硫化钠等药品,所以污水中含有害成分硫化物的数量大为减少,还因生皮经过酶的作用,蛋白质大量被分解,变成易为农作物所吸收的氨基酸等小分子含氮化合物而溶于水中,这就使污水转化成了肥水(全氮量接近人尿的含量),可以支援农业。对鞍山鞋革厂的皮革污水主要成分的分析结果如表4。

短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶在植物鞣革上的应用效果也是良好的,据旅大金州制革厂较长期的生产对比后认为:应用枯草杆菌“1398”、栖土曲霉(*Asp. terricola*. 3942)等

表4 皮革污水主要成分的比较*

皮革污水类别	全氮量 (克/立升)	全磷量 (P_2O_5) (克/立升)	硫化物 (毫克/立升)
盐碱法脱毛的皮革污水	0.15	0.015	2586.65
“289”碱性蛋白酶法脱毛的皮革污水	4.78	0.110	0.63

* 由我所污水研究室及技术分析研究室分析测定。

中性蛋白酶,在植物鞣革期间,经常发现皮革表面局部地不结合单宁,造成成革局部的鞣制不良,而应用短小芽孢杆菌“289”碱性蛋白酶时,对单宁结合良好。所以该厂已全部采用“289”碱性蛋白酶法生产植物鞣革了。

除此之外,短小芽孢杆菌碱性蛋白酶在绵羊皮毛、青根貂皮毛上的应用,以及试制加酶洗涤剂 and 试制蛋白胨等方面,也都已取得了初步的成效。