

生絲脫膠問題的研究

II. 枯草杆菌 S_{114} 的培养条件及其 蛋白酶液的作用条件試驗* **

李祿先 邱秀宝

(中国科学院微生物研究所, 北京)

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 目前是蛋白酶制剂的主要生产菌种。这种杆菌的培养条件問題, 五十年代中, 国外学者已进行了不少細致的研究^[1-6], 我們在 1960 年首先报导了这种細菌对生絲脫膠問題的实用价值^[7], 通过比色法选出了 S_{114} 和 S_{94} 两株优良菌种。中滨敏雄等自三十年代开始的微生物脫絲膠的研究, 到現在止仍着眼于好气性及嫌气性菌的联合应用及其蛋白酶的精制^[8], 至于其发酵液长达五天的脫膠率只 79—81.4%, 脫膠能力显然不高。本文对于 S_{114} 的培养条件和酶液的作用条件作初步报导, 以供工业生产上扩大試驗的参考。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

(1) 菌种保存于葡萄糖牛肉汁培养基斜面上, 在 4℃ 冰库中保存, 每月移种一次。

(2) 种子培养: 先把保存在上述斜面上的菌种, 移种到新的牛肉汁斜面上, 在 37℃ 培养 24 小时备用, 把已培养好的斜面移种到黄豆饼粉或胚芽饼粉培养基中(一般和发酵培养基统一), 在 37℃ 培养 48 小时, 然后作为正式种子使用。

(二) 培养材料

黄豆饼粉; 玉米粉; 甘薯粉; 以上三种由市場购买。胚芽饼粉由上海溶剂厂供给。所用无机盐为国产二级品。

(三) 培养基配方(概用北京自来水调制)

(1) 黄豆饼粉培养基: pH8.0; 黄豆饼粉 1.5%; 玉米粉 1%; K_2HPO_4 0.1%; $MgSO_4$ 0.05%; $CaCl_2$ 0.005%; $MnSO_4$ 0.005%。

(2) 胚芽饼粉培养基: pH8.0; 胚芽饼粉 4%; K_2HPO_4 0.1%; $MgSO_4$ 0.05%; $CaCl_2$ 0.005%; $MnSO_4$ 0.005%。

(3) 甘薯粉培养基: pH8.0; 甘薯粉 3%; 胚芽饼粉 3%; K_2HPO_4 0.1%; $MgSO_4$ 0.05%; $CaCl_2$ 0.005%; $MnSO_4$ 0.005%。

(四) 培养方法

(1) 靜止培养: 通常以 60 毫升培养基装在 250 或 300 毫升锥形瓶中, 经 15 磅 30 分钟灭菌冷却后

* S_{114} 在本所的保藏号为 ASL.337。

** 本项工作得到王大耕、王鐸、李传友、陈必成、吴允山等同志的协助, 特此致谢。

本文于 1964 年 12 月 15 日收到。

接种子 2%，在 37℃ 保温。

(2) 搖床培养：通常将 80 毫升培养基，置 300 毫升锥形瓶中，以转速为 103 次/分的往复式水浴搖床或 220 转/分旋转式搖床，在 37℃ 保温。种子的接种量为 2%。

(五) 蛋白酶活性测定方法

(1) 甘氨酸比色法：以生絲为基质观察脫胶活性时，主要以此方法测定，步骤见前文^[7]。

(2) 总氨基酸测定法：以酪素为基质，测定酶活时，采用 Moore 和 Stein 总氨基酸测定法^[9]。以 1% 酪素液 (pH7.2) 和 0.1 M pH 7.5 磷酸缓冲液各 1 毫升混合，加 1 毫升酶液，37℃ 保温 1 小时，以平均每分钟释放出的游离氨基酸相当于 0.1 微克分子量的白氨酸量，视为一个活性单位 (u)。以酶液中蛋白质含量的毫克数除活性总单位数，求得比活性 (u/毫克)。

(3) 测定蛋白质含量，是采用 Folin-Ciocalten 法^[10]。

(六) 粗酶制备

用纱布滤去菌膜，经离心除去渣滓的发酵液，以冰浴冷却至 1℃ 左右，缓缓加入零下 10 度至 20 度的冷丙酮，达 80% 的浓度，然后在 0℃ 冰浴中放置过夜，冷冻离心，沉淀以冷丙酮洗涤二、三次后，真空干燥，除去丙酮，即得灰白色干粉。总活性回收率为 80—100%。

試 驗 結 果

(一) S_{114} 的培养条件

(1) 碳源的考察

A、淀粉用量試驗 在黃豆餅粉培养基的基础上，将玉米粉改用純淀粉代替，将黃豆餅粉用量固定在 1.5%，淀粉用量为 0—5%，靜止培养三天的結果，以加淀粉 0.5% 为最好，淀粉用量增高时产量随最終 pH 的急下降而剧減。搖床培养 48 小时的結果与此相反，淀粉用量增加，酶活繼續增加，pH 下降也較緩和 (表 1)。

表 1 淀粉用量試驗

編 号	淀 粉 量 (%)	靜 止 培 养		搖 床 培 养	
		酶活(u/毫升)	培养后, pH	酶活 (u/毫升)	培养后, pH
1	0	13	7.0	5.8	9.3
2	0.5	20.1	6.7	29.1	9.0
3	1.0	17.7	6.3	46.5	8.8
4	1.5	12.4	6.0	81.8	7.7
5	2.0	12.4	6.0	81.8	5.8
6	2.5	10.6	6.0	70	5.8
7	3.0	9.4	6.0	93	5.4
8	5.0	8.25	6.0	117	6.2

B、不同碳源的比較 以黃豆餅粉培养基为基础，将其中 1% 的玉米粉部分以其他碳源置換，置換物的用量，按玉米粉含糖量計算，使培养基的糖类含量大致相当于 1% 玉米粉量，五种不同碳源搖床培养两天的結果如表 2 所示。

从表 2 看来，甘薯粉作为碳源較玉米粉酶产量高 40% 左右，較純淀粉高 24%；而葡萄糖作碳源，则产酶量特別低。甘薯粉中的少量蛋白質和黃豆蛋白配合，可能起氨基酸营养上的补偿作用，更有利于酶的产生。

表 2 不同碳源培养基的比较

碳 源	用量(克/100毫升)	酶产量(u/毫升)	碳氮比*
甘 薯 粉	1	49	1.95:1
淀 粉	0.73	39.6	1.84:1
玉 米 粉	1	35	1.83:1
胚芽餅粉	1	23.3	1.57:1
葡 萄 糖	0.73	14	1.84:1

* 按计算用食物成分表查阅估计。

在另一試驗中,除 3% 胚芽餅粉和 3% 純淀粉外,每 50 毫升培养基加各种氨基酸 10 微克分子量,培养結果加:組、胱、苯丙及纈四种氨基酸均增加酶产量 23.8%;加丙,色二氨基酸則增 12% 左右;天,谷,蛋三种无影响;其他氨基酸則降低酶产量 11—33% 不等。这試驗所加的氨基酸量不过是氮源的千分之一上下,补偿或抑制作用却如此明显,值得注意。甘薯粉对胚芽餅粉則不显补偿作用,酶产量未增加,所以酶的增产不象是由于其他物質的刺激。

(2) 氮源的考察

A、黄豆餅粉用量 在黄豆餅粉培养基的基础上,将玉米粉用量固定在 1% 的水平上,而在 0—5% 的范围内变化黄豆餅粉的用量,搖床培养两天的結果以 2.5% 黄豆餅粉为最好(图 1)。

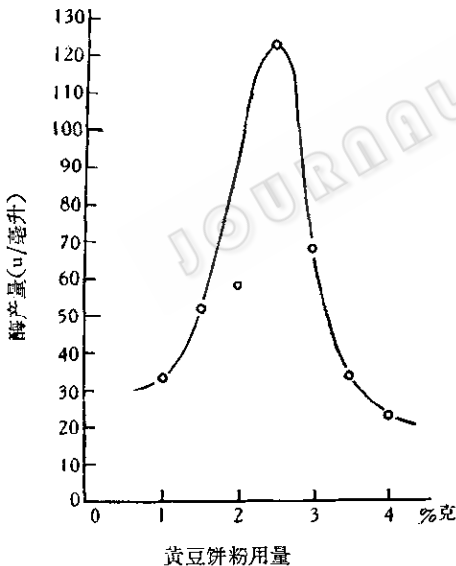


图 1 最适氮用量試驗。

試驗中碳源物內含蛋白質,而氮源物中又含糖类,虽較符合实际生产情况,但是它代表的碳氮比的实际范围較窄,不足以說明全面情况。另一方面碳氮的利用效率是未知数,彼此相差可能很大,难以作准。本試驗采取純馬鈴薯淀粉为碳源,干酪素为氮源,在总有机物料量为 5% 的范围内,变换两者的配合比,观察不同碳氮对于培养的效果。无机盐的用量与黄豆餅粉培养基同。下图为搖床培养两天的結果。

从图 2 可見,在高有机物的培养条件下,最适碳氮比为 3:2 左右,但自 4:1 至 1:1 都可視為在高产范围内,幅度是比較寬的。

B、不同氮源的比較 在黄豆餅粉培养基的基础上,以不同氮源物質代替黄豆餅粉,各氮源物質的用量以 1.5% 黄豆餅粉的蛋白量为基准。在黄豆餅粉,酪素和胚芽餅粉三种氮源中,以胚芽餅粉較好。酪素培养基的酶产量和黄豆餅粉同,而經過水解的酪素,酶产量只有酪素的一半。至于无机氮源—— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NaNO_3 ,細菌生长虽然良好,但实际上不产生体外蛋白酶。

(3) 最适碳氮比

在上述碳氮源的考察中,已大致可以看到培养 S_{114} 的最适碳氮比在 3:2 左右,但在上述

(4) 胚芽餅粉培养基的考察

用胚芽餅粉与甘薯粉,按总有机物为1%, 2.5%, 5% 三个級分別配合 (比例如表 3)。无机盐类用量与黃豆餅粉培养基同。搖床培养两天后按各配比与酶产量的关系,見表 3。

表 3 胚芽餅粉与甘薯粉配合試驗

编号	培养基比例	总干物量 1% (u/毫升)	总干物量 2.5% (u/毫升)	总干物量 5% (u/毫升)
	胚芽餅粉(%): 甘薯粉(%)			
1	5:0	7	35	46
2	4:1	9.9	39.5	83
3	3:2	5.8	39.5	107
4	2.5:2.5	4.6	30.4	100
5	2:3	4.6	35	105
6	1:4	2.3	18.1	62.5
7	0:5	0.58	8.2	16.6

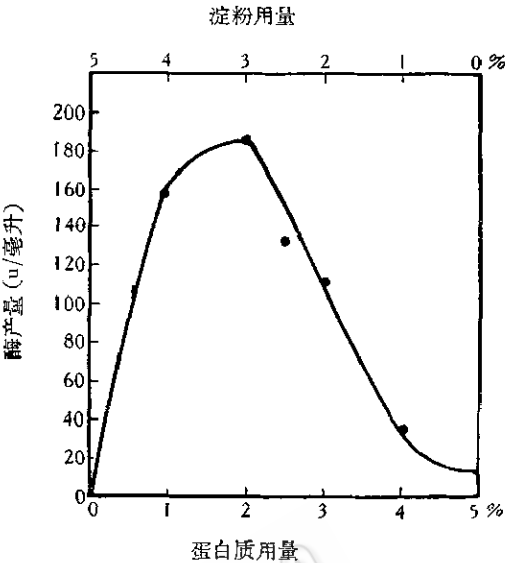


图 2 最适碳氮比試驗。

表 3 显示, 胚芽餅粉和甘薯粉的最适配合比在 3:2 至 2:3 范围内, 最大到 4:1。其次,在一定范围内,有机物用量愈多則酶产量愈高。

在另一次搖床培养中,这两种有机質各加 3%, 培养两天的酶产量为 93 u/毫升,而三天則为 198 u/毫升,其中部分原因可能由于部分碳源或氮源物質分解緩慢所致。

(5) 无机盐的影响

在无机盐类中,鈣和錳对于枯草杆菌-营养很重要^[11-15],我們多次观察黃豆餅粉培养基加減鈣錳的結果,在靜止培养中,加氯化鈣和硫酸錳的酶产量通常比不加鈣錳的高1—3倍,平均約增 2.8 倍。在搖床培养中,約增 40% (表 4)。

表 4 鈣錳对蛋白酶产生的影响

培养批数	加鈣錳量	培养瓶数	平均蛋白量 (毫克/毫升)	平均活性(u/毫升)	比活性(u/毫克)
1 (靜止)	0	104	4.6	4.2	1.12
2 (靜止)	0	60	4.0	4.7	1.1
3 (靜止)	0	60	3.2	5.5	1.7
4 (搖床)	0	2	6.0	44.3	7.4
5 (靜止)	MnSO ₄ 0.005% CaCl ₂ 0.005%	720	2.7	15.7	5.6
6 (靜止)	”	60	3.0	22.2	7.3
7 (靜止)	”	3	2.7	17.6	6.5
8 (搖床)	”	2	5.3	62.7	11.8

如不加錳而单独加氯化鈣,則鈣的效果不显著,反之亦然。

(6) 培养基的适当 pH 值

S₁₁₄ 的靜止培养在 24 小时 pH 值从 7.5 下降至 6.2, 30 小时升至 6.7, 48 小时升至 7.5, 72 小时为 7.2 左右。搖床培养时 CO₂ 排除較快,酸度增加較慢, 24 小时 pH 为 6.8,

30 小时回升至 7.2, 48 小时为 8.5。培养基本身的最初 pH 值影响蛋白酶的产量亦很显著, 可于下项试验结果看到。

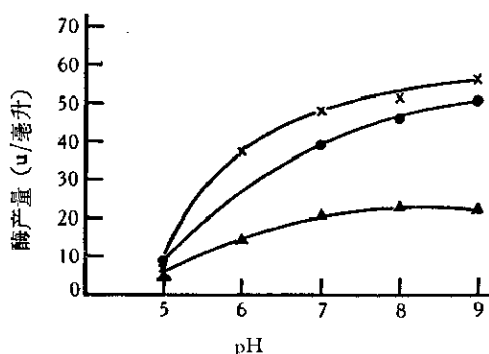


图 3 培养基 pH 与蛋白酶产量的关系。
 ▲——▲ 24 小时; ●——● 48 小时;
 ×——× 72 小时。

以 pH 5, 6, 7, 8 及 9 的胚芽饼粉培养基进行摇床培养, 在不同时间, 取样测定其活性, 结果见图 3。

从图 3 看来, 培养基的适当 pH 是在 9 左右, 最适 pH 可能在 9 以上。静止培养的酶产量因 pH 的增加而递增的趋势和摇床培养是一致的, 增加的程度亦和摇床培养相似。

(7) 培养的适当温度

在多次静止培养中, 33—39℃ 酶产量差异不大。胚芽饼粉、甘薯粉培养基在 30℃ 静止培养酶的增长缓慢, 但到第 7 天酶产量的增长趋势仍旧不衰 (2 天 36u/毫升, 5 天 63u/毫升, 7 天 128u/毫升), 因此培养温度范围较宽, 温度低培养时间要长, 一般采用 37℃ 较为适合。

(8) 最适培养时间

A、静止培养 于不同 pH 及不同温度试验中, 于不同培养时间 (2、3、4 天) 加以比较, pH 7 和 pH 8 的培养基, 35, 37, 39℃ 都在第三天达高峰。pH 8, 35, 39℃ 第四天还在微微上升。

B、摇床培养 以 pH 5, 6, 7, 8 及 9 的 4% 胚芽饼粉培养基, 在 37℃ 进行摇床培养, 于不同时间观察发酵液的酶产量, 结果见图 4。

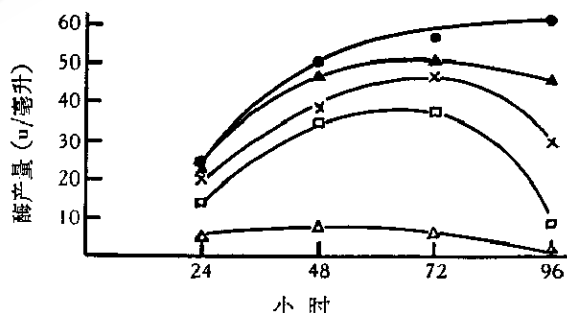


图 4 培养时间试验 (37℃ 摇床培养)。

△——△ pH 5; □——□ pH 6; ×——× pH 7;
 ▲——▲ pH 8; ●——● pH 9。

(9) 静止培养和摇床培养的比较

以 20, 40, 60, 80 和 100 毫升的黄豆饼粉培养基分别装入 300 毫升锥形瓶内分别进行摇床和静止培养, 37℃ 培养

24, 30, 48 小时取样测定酶活性, 结果见图 5。在不同发酵时间中 pH 的变化见图 6。

从图 5—6 可知: (1) S_{III} 是好气性细菌, 在通气良好的摇床培养条件下蛋白酶产量可以比静止培养的高 1—5 倍, 在生长初期差异更为明显; (2) 通气量越大, 酶产量高峰出现愈早; (3) 通气培养可除去 CO_2 , 能较稳定地维持发酵液的 pH 于微碱性, 对酶形成比较有利。两者比活性的差异和它在各阶段的生长趋势, 亦大致与酶产量同。

(10) 种龄及接种量的影响

S_{III} 的种子分别在黄豆饼粉和胚芽饼粉培养基中静止培养 24、48、72 小时; 每种接种培养基的 pH 又分 6、7、8 三级, 然后接入这两种培养基中, 在 37℃ 摇床培养 48 小时, 结果见表 5。

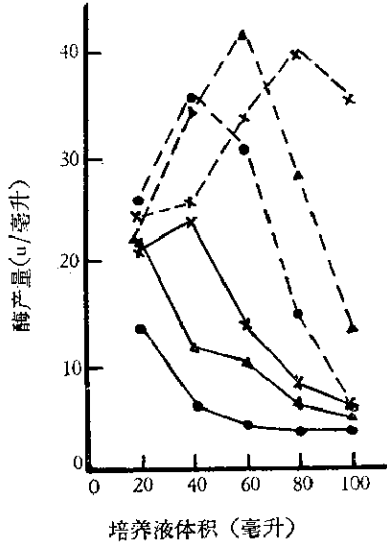


图5 摇床培养和静置培养比较。

静置培养
●—●—● 24 小时 ●—●—● 摇床培养
▲—▲—▲ 30 小时 ▲—▲—▲ 摇床培养
×—×—× 48 小时 ×—×—× 摇床培养

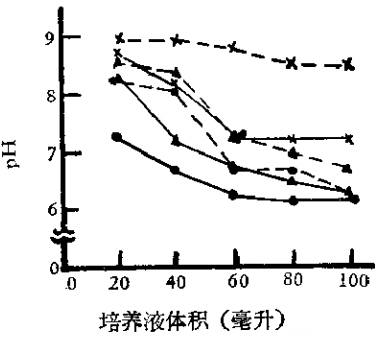


图6 发酵液 pH 变化。

表5 不同种龄的比较

培养基	种 龄 (小时)	培养基 pH		
		6	7	8
		酶产量(u/毫升)	酶产量(u/毫升)	酶产量(u/毫升)
4% 胚芽饼粉	24	60.6	53.6	53.6
	48	44.3	55.9	65.3
	72	46.6	44.3	39.6
1.5% 黄豆饼粉	24	42	53.6	53.6
	48	51.3	37.3	44.3
	72	14	16.3	16.3

从表5 看来,种龄不同,酶产量可以差到 200%左右,种龄以 24 小时为适合。另外作了接种量的试验,种子的接种量自 1—3% 酶产量无显著区别,超过 4%,酶的产量反趋下降。

(二) S₁₁₄ 蛋白酶系的作用条件

S₁₁₄ 的发酵液中,可能包含 1 种或多种体外蛋白酶,但在生产实用的目的上,我们不妨视之为一个统一的整体来考察它的各种作用条件。以下的 pH、温度等试验都以干酪素为基质。

(1) 最适 pH

以发酵液及其粗酶制剂溶液在不同 pH 作用下,比较两者所得的 pH 曲线形状基本上

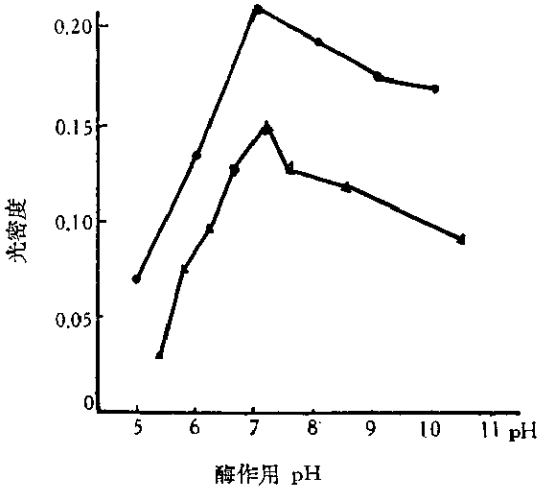


图7 pH对酶作用的影响。

▲——▲ 粗酶粉; ●——● 发酵液。

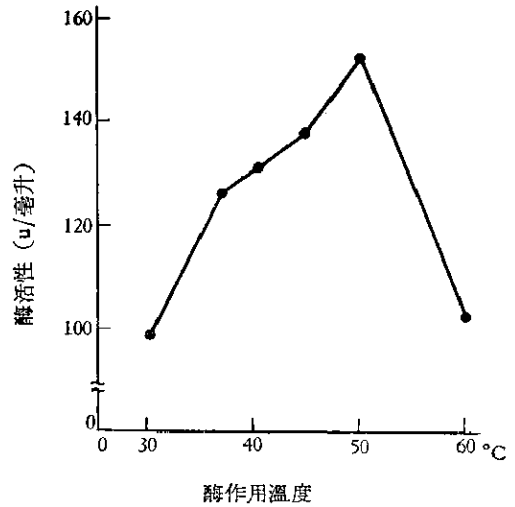


图8 温度对酶反应的影响。

相同,最适 pH 都在 7.2 左右(图 7),显示它主要的酶是中性酶。又从 pH 曲线的形状看来,在这酶系中,还可能有碱性酶存在。

(2) 最适温度

观察 S_{H4} 发酵液 (pH 7.5) 在各种不同温度中对干酪素作用的结果,表明它的蛋白酶系的最适温度似在 50°C 左右,如果改变基质,最适温度可能会有变化,生产上应就不同的对象,分别测定各自的最适温度。

(3) 适当酶浓度

A、酪素分解 将摇床培养的发酶液(含酶量 198u/毫升) 10 倍稀释后,取 0.1 至 0.8 毫升,以酪素为基质,按总氨基酸测定法,制成作用曲线(图 9)。图中光密度读数系在 3 毫升酶解液中取 0.1 毫升制成 10 毫升比色液的读数(用科伟 581 光电比色计)。从这曲线估计,该酶在 1 小时内能分解 50% 左右的酪素(即 5 毫克酪素)的需酶量是 1.2 单位弱(即 0.08 毫升 10 倍稀释的酶液),由于酪素是溶解状态的,所以酶解效率较高。

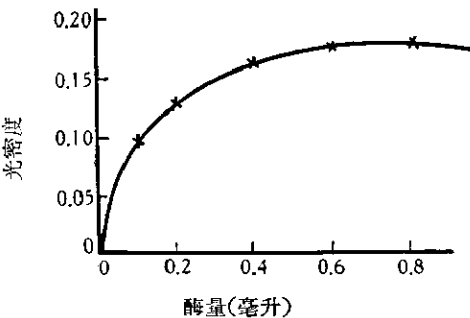


图9 酶浓度对反应的影响。

B、生丝脱胶 在前篇报导中,用未加钙锰的静止培养液 1 毫升(按本篇定义估计活性不超过 5 单位)在 15 分钟内能脱除桑蚕丝丝胶蛋白 82.7%,约含 87.5 毫克,30 分钟的除胶量为 92.7%,约含 98 毫克。如将那时的酶液浓度视作适当的作用浓度之一,则每毫升为 1.7 单位。

在此以后,由于培养条件改进,每毫升的酶活性,按分解酪素计算已可增加几十倍,但从多次试验观察,脱胶效率并非按比例增加。这可能是因为酶的特异性的差别。

將 4% 胚芽餅粉培养基搖床培养 3 天的发酵液(活性为 70u/毫升), 取 0.1、0.4、0.7 及 1.0 毫升与 0.5 克 AE 桑蚕絲在 37℃、pH 7.5 中作用, 作用液共 10 毫升, 30 分钟后取 0.1 毫升酶解液测定总氨基酸, 观察其絲胶的酶解傾向(图 10) 及蚕絲洁白、柔軟、光泽、手感程度等結果表明, 0.4 毫升酶液的脫胶結果已可滿足要求, 按这試驗估計, 脫胶酶适当酶浓度为 2.8u/毫升。

其他各次試驗情况虽有差异, 趋向大致相同, 如果說适当脫絲胶酶浓度是在 2—5u/毫升范围内, 應該和实际情况相差不远。每克生絲需要的高产酶量約 0.4—2 毫升。如按粗酶制剂計算, 約需生絲重量的 0.12—0.6%。

此种酶液在 37℃ 及 pH 7.5 左右相当稳定, 在一般情况下, 可以連續使用若干次, 所以实际酶与絲的比值應該还要低些。

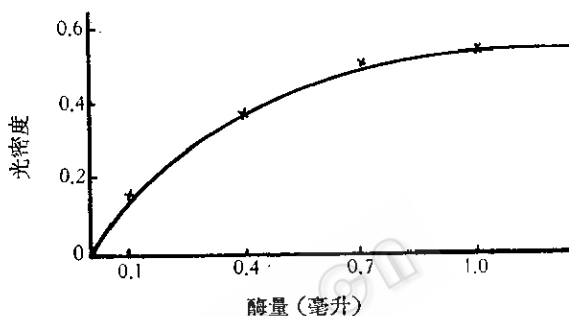


图 10 不同酶量脫絲胶試驗。

C、生綢脫胶 关于带胶生綢的脫胶, 曾观察过柞蚕綢、杭紡、电力紡三种, 柞蚕綢 5.5 平方厘米用 3 毫升发酵液, 37℃ 作用两小时, 光泽和手感都基本合乎工业要求, 这試驗的酶綢比約每平方厘米 30 单位左右, 作用酶浓度为 16.5u/毫升。如能經過后处理效果会更好。生綢杭紡膨軟比較困难, 可能需作适当預处理。

另外 S_{114} 蛋白酶液对废胶卷脫胶也同样有效。

(4) 酶液的貯藏

此酶用丙酮粉形式的粗酶制剂貯藏較为便利, 一般可达数年。至于发酵液的短期貯存, 我們曾比較了 8 种防腐剂, 其中以金霉素的防腐及稳定酶活性的效果比較好。若貯藏期限不超过 6 天, 用 20% 的食盐最适宜(表 6)。

(5) 不同基质的比較

由于酶分解基质的特异性不同, 分解酪素活性很高的酶液, 对分解絲胶不一定高。例如, 我們最近比較过三种枯草杆菌, 对照这两种基质的差別(表 7)。

从表 7 可知, 以酪素測定时, 1.398 在玉米粉培养基中的产酶量几乎是 S_{94} 的 5 倍, 但脫胶的能力似相同, 甚至于略低。再就 1.398 本身而論, 它在玉米粉培养基中的酶产量为它在胚芽餅粉中的 8.8 倍, 但脫絲胶效果, 两者几无差异。如果酶作用的对象是生絲, 在这情况下就不如用胚芽餅粉合算。我們又将 1.398 玉米粉靜止培养发酵液 (175u/毫升) 和胚芽餅粉的 S_{114} 发酵液 (151u/毫升) 作比較, 将两者各取 50 单位, 与 500 毫克生絲作用 1 小时后, 計算每单位酶每分鐘释放甘氨酸和除胶的效果(表 8)。

由表 8 可見, 以測甘氨酸的方法指示脫胶实现(粗略計算, 以游离甘氨酸量乘 100, 大致可視為除胶重量), 比酪素測定法可靠。

表 6 酶液防腐

防腐 剂 放置 时间 (天)	对照	NaCl		苯 酚		甲 醛		链霉菌		青霉菌		金霉素		氯霉素		地霉素	
		10%	20%	0.2%	0.6%	0.2%	0.6%	5p.p.m	10p.p.m	5p.p.m	10p.p.m	5p.p.m	10p.p.m	5p.p.m	10p.p.m	5p.p.m	10p.p.m
6	23.3u	52.4u	26.2u	49.5u	5.8u	42.5u	42.5u	49.5u	49.5u	49.5u	49.5u	52.4u	52.4u	52.4u	52.4u	49.5u	49.5u
		83.5%	41%	78.5%	11%	67.5%	67.5%	78.5%	78.5%	78.5%	78.5%	83.5%	83.5%	83.5%	83.5%	78.5%	78.5%
15	长菌	39.4u	36.5u	36.5u	13.3u	33.5u	33.5u	35u	38u	39.4u	33.5u	42.4u	43.7u	33.6u	33.6u	36.5u	43.8u
		62.5%	58%	58%	21%	54%	54%	55.5%	60%	62.5%	54%	67.5%	70%	54%	54%	58%	70%
29	长菌	33.8u	29u	13.4u	0.7u	4.45u	4.45u	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		54%	46%	21%	1.5%	8%	8%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表 7 不同基质比较试验

菌 号	酶素测定活性(u/毫升)		两者 比		脱乳酪比色(光密度)			脱乳效果 次序
	玉米粉	胚芽饼粉	两者 比	两者 比	玉米粉	胚芽饼粉	两者 比	
S ₁₁₄	67	55.5	1.21	1.21	.920	.590	1.56	2
S ₉₄	87.5	55.2	1.54	1.54	.970	.480	2.04	1
1.398	434	49	8.85	8.85	.640	.600	1.06	2

表 8 S₁₁₄ 与 1.398 对生丝的作用

编号	菌 种	甘氨酸 (微克/单 位,分)	脱 丝 胶 (微克/单 位,分)
1	S ₁₁₄	0.153	13.6
2	1.398	0.091	5.3

討 論

(一) 按照蛋白酶产量和氮源性质的密切关系看来, S_{114} 的体外蛋白酶系很象具有适应酶的性质, 选择适当氮源, 不失为引导它生产合乎生产对象要求的主要途径。

(二) S_{114} 在各种培养基取得的高产纪录

- | | |
|--------------------------------|---------|
| (1) 甘薯粉: 胚芽餅粉 = 3:3 | 198u/毫升 |
| 培养 3 天 | |
| (2) 淀粉: 酪素 = 3:2 | 187u/毫升 |
| 培养 2 天 | |
| (3) 玉米粉: 豆餅粉 = 5:1 | 157u/毫升 |
| 培养 3 天 | |
| (4) 玉米粉: 豆餅粉 = 1:2.5 | 123u/毫升 |
| 培养 2 天 | |
| (5) 玉米粉: 豆餅粉: 胚芽餅粉 = 1:1.5:2.5 | 110u/毫升 |
| 培养 3 天 | |

(三) 在工业生产上, 通气问题是核算成本的重要因素之一, 在本文中我們已經知道通气是增加酶产量的重要手段之一, 但是通气究竟能增加多少脱絲胶的效果, 我們还不能确切回答? 但从前面結果来看, S_{114} 和 S_{94} 以酪素测定的趋向, 尚能和脱胶效果一致, 我們不妨暂时认为通气培养是合算的, 但是应考虑生产上各种条件再加比較。

(四) 为了使酶的经济作用高度发挥, 生产上必须考虑如何使酶很好地工作和长期地工作, 这必须从温度、pH 及稳定剂 (如 Ca^{++}) 各方面加以考虑。从前面的試驗看来, 温度保持在 $30^{\circ}C$ 左右, pH 7—7.2 之間, 再加少量 $CaCl_2$, 酶就比较稳定。可使酶利用时间延长, 或仅需补充少量新酶液, 都是可能的, 但若流水作业, 工序要求迅速脱胶, 那么应考虑在 $50^{\circ}C$ 的高温下进行脱胶。

(五) 按甘薯粉加胚芽餅粉为 3:2 計算, 每毫克有机物产酶量为 3.3 单位, 如每公斤生絲需酶 10 万单位, 則需用有机物約 40 克。在实际使用时, 若工艺条件作适当改变, 酶的利用率还可以提高。

(六) 在少数的观察中, 我們觉得 S_{94} 可能比 S_{114} 更合用些, 須多加注意, 另外 1.398 肯定也是一个优良的菌种, 这些良种在我国工业生产中应用均具有很大的可能性。

参 考 文 献

- [1] Kamo, S. and Higuchi, T.: *J. Fermentation Technol.*, **28**:201, 1950.
- [2] Hoogerheide, J. C. and Laughery, E. G., *U. S. Pat.*, **2**:449—459, 1951.
- [3] Evans, D. G. and Wardlaw, A. C.: *J. Gen. Microbiol.*, **7**:397, 1952.
- [4] Fukumoto, J. and Negoro, H., *Sci. Ind. (Osaka)*, **27**:171, 174, 176, 271, 1953.
- [5] *Symposia on Enzyme Chem. (Japan)* **7**:8, 1952.
- [6] Güntelberg, A. V.: *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.* **29**:27, 1954.
- [7] 李祿先、邱秀宝、韩连仲: 生絲脱胶问题的研究(一)。脱胶细菌的筛选, *微生物学报*, **2**(6): 267—274, 1960.
- [8] 今原广次、中滨敏雄: 日本农芸学会志, **36**, 第 4 号 P. 327—335, 1962.
- [9] Moore, S. and Stein, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **176**:367, 1948.
- [10] *Methods in Enzymology*, **111**: p. 448.

- [11] Haines, R. B.: *Biochem. J.*, **25**:1851, 1931, **26**:323, 1932, **27**:466, 1933.
- [12] Gorini, L. and Audrain, L.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **6**:477, 1951.
- [13] Gorini and Fromageot, C.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **5**:524, 1950.
- [14] Merrill, A. T. *et al.*: *J. Bact.* **15**:267, 1928.
- [15] Stockton, J. R. and Wyss, O.: *J. Bact.*, **52**:227, 1946.

STUDIES ON THE DEGUMMING PROBLEM OF RAW SILK

II. EXPERIMENTS ON FERMENTATION AND THE PROTEOLYTIC ENZYME ACTIVITIES OF *BACILLUS SUBTILIS* S₁₁₄

LEE LOU-SIEN AND CHOU SHIO-PAO

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking*)

In the preceding paper, we reported that two strains of *B. subtilis* S₁₁₄ and S₉₄, produced proteolytic enzymes which were useful for the degumming treatment of raw silk. The present work presents the experimental results in relation to the factors influencing the fermentation and the enzyme activities of S₁₁₄. Among various culture media tested, the "sweet potato meal plus corn germ cake" medium was most desirable. The mineral salts, especially calcium and manganese were important for the enzyme production. Besides the organic and inorganic nutrients, other factors such as pH, temperature, aeration, and the age of the inoculum were investigated and discussed.

For the action of the proteolytic enzyme mixture, the optimum pH was found to be about 7, and the optimum temperature was about 50°C.

The quantity of fermented liquid required for degumming raw silk is discussed.