

## 碱性蛋白酶产生菌 209 的发酵及其酶的基本特性

河南皮革工业科学研究所

(平 顶 山 市)

为了适应皮革工业上酶法脱毛的需要,筛选到一株碱性蛋白酶产生菌 209 菌株,经鉴定为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)。其产酶的发酵培养基成分是:豆饼粉 2.5—3.5%,麸皮 3.5—4.5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03%,  $\text{CaCl}_2$  0.3%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5%。pH9.0 (灭菌后)用 50 升罐,在 35—36°C,通气量 1:0.5—1:1,发酵 31 小时,酶活达到 5000 单位左右,该酶作用的最适 pH 是 9—11,最适温度 (反应 20 分钟) 50°C,延长反应时间在 40°C 以下为宜,塑料袋贮藏 11 个月酶活力不变,对小白鼠试验无毒。

酶法脱毛是制革工业的一项重大革新。无产阶级文化大革命以来,猪皮脱毛新工艺在全国很多地区得到推广应用,取得了很好效果。这种方法同传统的石灰硫化钠脱毛法相比,有利于污水处理,能改善环境卫生和工人的劳动条件。因其生产废水富含含氮物质,故可用作肥料使农业增产。但是由于原用的几种蛋白酶在正面革脱毛中易造成革面松,手感不丰满及残留小毛等问题,不能适应生产发展的需要。为此,我们开展了制革用酶制剂新菌种的筛选和应用方面的研究。在毛主席革命路线指引下,全体研制人员坚持自力更生的方针,发扬了艰苦奋斗的革命精神,以较快的速度选出了一株编号为 209 的产碱性蛋白酶的生产菌株。在摇瓶和中间试验的基础上,在天津酶制剂厂的协作下,迅速试产成功。在应用方面,与杭州皮革厂协作进行了黄牛皮正面革脱毛试验,也已取得成功。

### 菌种筛选及鉴定结果

#### 一、筛选方法

分离培养基(%)：牛肉膏 0.5, 蛋白

胨 1, 氯化钠 0.5, 琼脂 3, 新鲜牛奶 30 (单独间歇灭菌 3 次)。

摇瓶发酵培养基(%)：麸皮 3, 豆饼粉 3, 玉米面 2, 磷酸氢二钠 0.4, 磷酸二氢钾 0.03, 自然 pH, 500 毫升三角瓶装 50 毫升培养基。

菌种分离：将由空气、污水、烂皮块、食肉动物粪便及土壤取得的含菌样品,用稀释法进行平板分离。接种后的固体培养基平板置于  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  培养箱内,培养 1—2 天后,由培养基平板上挑取透明圈与菌落直径比值大的菌落,转入试管斜面培养基 (牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, 氯化钠 0.5%, 琼脂 1.5—2%) 上,于  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 24 小时后,接入摇瓶液体培养基中,在往复摇床 (振幅 7 厘米、振次 100 次/分钟) 振荡培养 40 小时后,测定蛋白酶活力<sup>[1,2]</sup>。由 880 株细菌中,选出一株产碱性蛋白酶活力较高的 209 号菌。该菌来源于河南省平顶山市制革厂晒生皮场地的土壤中,发酵培养基简单、所产蛋白酶脱毛效果良好。

本文于 1975 年 3 月 17 日收到。

## 二、209 菌株的形态、生理特征及鉴定结果\*

在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上, 209 菌株菌落圆形、浅黄色, 直径 2—4 毫米, 中央隆起, 有不规则的褶皱, 边缘整齐, 有同心环。革兰氏染色阴性, 杆状,  $0.6—0.7 \times 1—2$  微米, 有芽孢, 不膨大, 芽孢次端生, 柱状至椭圆。菌体着色均匀。在含葡萄糖的培养基上和含 7% 食盐的肉汤中生长良好, 液化明胶, 层状, 3 周约液化 2 厘米深度。5 日使牛奶产碱, 7 日后还原, 10 日后胨化。还原硝酸盐、硝酸盐厌气培养不生长。不水解淀粉。氧化酶阴性。据此, 确认 209 菌株属短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)。

### 碱性蛋白酶的发酵条件

为确定合理的发酵条件, 又进行了摇瓶和罐发酵试验, 选出了一种不用淀粉原料而且比较经济的培养基, 确定了适宜的发酵工艺, 在 50 升罐发酵产酶最高达 7000 单位/毫升。

#### 一、摇瓶试验

试验用往复式摇床, 振次 100 次/分, 振幅 7 厘米, 发酵温度  $35^{\circ}\text{C}$ , 500 毫升三角瓶装液 50 毫升。

##### (一) 不同培养基对产酶的影响

在添加  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03% 的条件下, 对玉米粉、薯干粉、麸皮及豆饼粉的用量进行了试验, 结果如表 1。

表 1 结果表明, 用麸皮 4%、豆饼粉 4%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03% 效果较好。

进一步试验确定麸皮与豆饼粉的用量比以 4 比 3 为宜, 在此基础上改变二者的添加浓度, 试验其对产酶的影响, 结果表明

适当降低麸皮与豆饼粉的浓度对产酶影响不大 (表 2)。以下试验均采用麸皮用量 3.5%, 豆饼粉用量 2.5%。磷酸盐添加量不变, 称 I 号培养基。

表 1 不同培养基对蛋白酶产量的影响

培养基编号	玉米粉 (%)	薯干粉 (%)	麸皮 (%)	豆饼粉 (%)	磷酸氢二钠 (%)	磷酸二氢钾 (%)	酶活力 (单位/毫升)
1	2		3	3	0.4	0.03	930
2		2	3	3	”	”	995
3	1	1	3	3	”	”	990
4			4	4	”	”	1029
5	0.5	0.5	3	3	”	”	910
6		3	3	3	”	”	490

表 2 麸皮与豆饼粉浓度对产酶的影响

麸皮 (%)	豆饼粉 (%)	酶活力 (单位/毫升)
1.3	1.0	940
2.0	1.5	1050
2.6	2.0	1150
3.3	2.5	1260
4.0	3.0	1200
4.6	3.5	1220

\* 培养基添加  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03%。

##### (二) 培养基的初始 pH 对产酶的影响

使用 I 号培养基, 加入不同量的碳酸钠, 使其 pH 值在灭菌前分别为 6.4、7.0、8.0、9.0、10.0, 灭菌后进行发酵试验, 间隔一定时间取样分析酶活力, 结果如图 1。

图 1 表明, 培养基 pH 值高时对产酶有利。pH 9 时发酵时间短。酶活迅速达到高峰, 且在较长时间内酶活力稳定, 有利于进行控制管理。pH 9 时培养基的碳酸钠添加量约为 0.5%, 此培养基称为 II 号培养基。

##### (三) 添加氯化钙对产酶的影响

在 II 号培养基中加入不同量的氯化钙, 进行发酵, 结果如表 3 所示。

\* 菌种鉴定工作承中国科学院微生物研究所协助, 特此致谢。

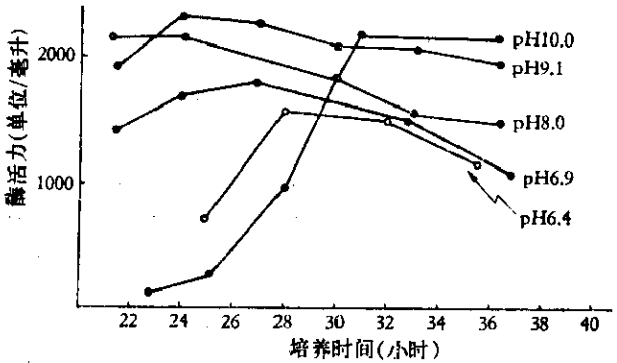


图1 培养基初 pH 对产酶的影响

表3 添加氯化钙对产酶的影响

酶活力 (单位/ 毫升)	培养时间 (小时)	23	26	29	31	33	35
氯化钙用 量(%)							
0		223	780	1780	2110	2340	2340
0.2		1000	1670	1800	2450	2450	2450
0.3		1170	1670	2390	2450	2600	2560
0.5		2500	2850	2780	2720	2250	2250

加入适量的氯化钙(0.3—0.5%)提高了209菌株的产酶能力,缩短了发酵时间,并发现氯化钙的添加能使209菌株生长良好,产酶稳定(把含有0.3%  $\text{CaCl}_2$  的培养基定为III号培养基)。

#### (四) 通气量对产酶的影响

采用III号培养基,于500毫升三角瓶中装液50, 100, 150毫升进行发酵试验,结果如表4所示。

表4 通气量对产酶的影响

酶活力 单位/毫升	培养时间 (小时)	27	29	31	35	47
装液量 (毫升)						
50		2230	2390	2320		
100		0	0	0	490	1200
150		0	0	0	0	0

结果表明,209菌株好气性强,装液量少时,产酶最高,发酵时间也短。由此推测,进一步加大通气量该菌产酶活力还可

能提高。

此外,在摇瓶试验中,还试验了添加硫酸铵及各种金属离子对产酶的影响。结果添加硫酸铵0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5%及添加钴、镍、铜、镁、锌、铁等的硫酸盐(浓度各为0.0005%, 0.0025%, 0.005%)均未获明显效果。钴盐、镍盐用量在浓度为0.005%时即影响产酶。

综合上述试验结果,认为209菌株的摇瓶培养适宜培养基配比为:豆饼粉2.5%,麸皮3.5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03%,  $\text{CaCl}_2$  0.3%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5%。

灭菌后pH为9.0左右。

## 二、50升发酵罐试验结果

### (一) 发酵罐

50升发酵罐,圆盘弯叶涡轮式搅拌器两档。锯齿形消泡器一档,搅拌450转/分。

### (二) 培养基

麸皮4.5%,豆饼粉3.5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03%,  $\text{CaCl}_2$  0.3%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5%,消泡油(植物油)0.4%。

### (三) 工艺条件

1. 灭菌:过滤器及空罐灭菌2公斤/厘米,1小时,实罐灭菌1—1.2公斤/厘米<sup>2</sup>,半小时。

2. 定容:实罐灭菌后为25升。

3. 接种:在无菌条件下,接入1克氏瓶的斜面菌种悬浮液。

4. 罐压:0.5—0.7公斤/厘米<sup>2</sup>。

5. 培养温度:35—36℃。

6. 通气量:前期(发酵1—10小时)1:0.5(V/V/分);后期(发酵11小时至放罐)1:1(V/V/分)。

### (四) 50升罐发酵规律的观察

培养基的最初pH为9,接种后pH逐

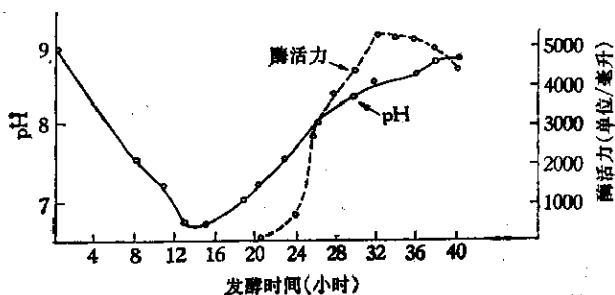


图2 50升罐发酵中酶活力与pH的变化情况

步下降,约经15小时pH可降至整个发酵过程的最低点(6.7左右),这时菌体比较密集,单个菌体明显增多,发酵液开始变得稀薄;又经过3小时左右,pH转而回升,23小时左右可升至7.2—7.4,此时菌体密集、整齐、较为细小,开始有蛋白酶产生。约经27小时pH达到8.0—8.2时,产酶迅速增加,罐内泡沫上升,发酵液粘度增大,镜检可发现个别芽孢,菌体变得稍肥胖;发酵31小时pH达8.5左右,酶活力达到5000单位以上,芽孢约达20%,此时适宜放罐。其后4—6小时内酶活力基本维持不变。继续延长发酵时间,芽孢可达50%,pH增至8.8—9.0,酶活力甚至有所降低(图2)。

## 209 碱性蛋白酶基本特性

为了配合209酶在皮革生产上的应用,对该酶的基本性能进行了研究。

### 一、最适温度及热稳定性

#### (一) 最适温度

将酶液在不同温度下,以酪蛋白为底物,反应20分钟,测其酶活力,最适温度为50℃(图3)。

#### (二) 热稳定性

将稀释好的酶液,在不同温度下,分别保温不同时间,然后以酪蛋白为底物,测其酶活力,结果如图4。

图3表明,在短时间(20分钟),209蛋白酶在50℃时活力最高;而图4表明该酶在40℃以上处理较长时间时,热稳定性降低。因此,在使用时,如作用时间较长,以低于40℃为宜。

### 二、最适pH值

以缓冲液配制不同pH值的酪蛋白溶液和酶液,将配制好的酶液以相应pH的酪蛋白溶液为底物,测定酶活力,结果表明209蛋白酶最适反应pH为9—11,pH低于5或高于13,该酶严重失活(图5)。

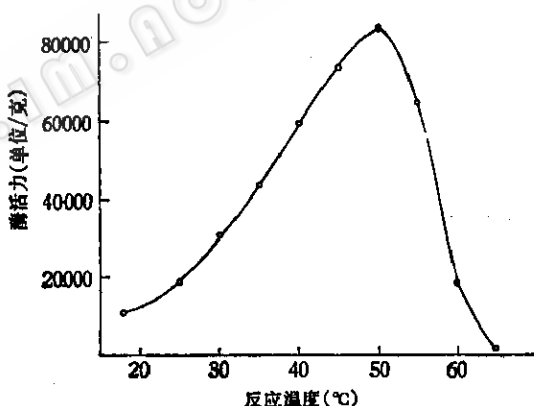


图3 酶活力与反应温度的关系

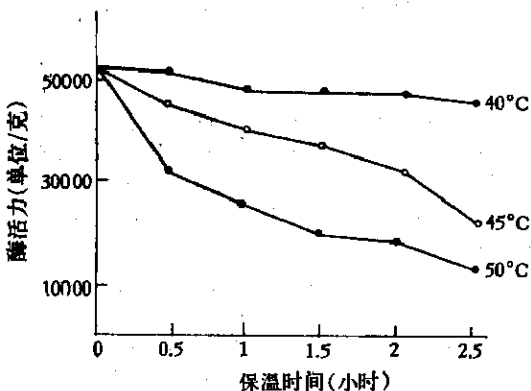


图4 209蛋白酶的热稳定曲线

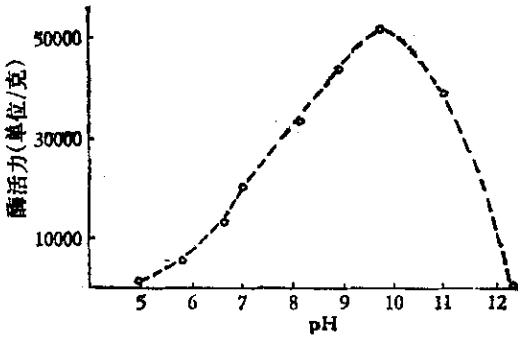


图 5 反应 pH 与酶活力的关系

### 三、贮存试验

将新制出的酶制剂用塑料袋封装，在室内自然条件下存放，定期取样测其酶活力，观察其稳定性，结果列如表 5。

表 5 209 蛋白酶在贮存过程中酶活力的变化情况

测定日期	贮存时间	酶活力(单位/克)
1973.9.1.	0	47000
1973.11.1.	2个月	46000
1974.2.2.	5个月	46500
1974.5.2.	8个月	46000
1974.7.24.	11个月	48000

由此可见，以塑料袋封装贮存11个月，该酶活力基本不变。

### 四、毒力试验\*

参照上海市卫生防疫站对蛋白酶毒力鉴定标准，进行了小白鼠试验，结果在试验范围内小白鼠无一死亡，证明 209 酶制剂是无毒的。

表 6 209 蛋白酶毒力试验结果

试验编号	试验动物及数目	受毒方式	受毒量(克/公斤体重)	结果
1	健康小白鼠 5只	灌胃	0.5	48小时无死亡
2	"	"	1.0	"
3	"	"	1.5	"
4	"	"	0 (对照)	"

### 参 考 资 料

- [1] 天津酶制剂厂、南开大学生物系合编：微生物酶制剂，第 87 页，天津人民出版社，1971。
- [2] 北京大学制药厂编：微生物学和酶学基础知识，第 153, 203 页，科学出版社，1971。

\* 209酶制剂毒力试验蒙杭州市卫生防疫站协助，特此致谢。

## FERMENTATIVE PRODUCTION OF ALKALINE PROTEINASE BY *BACILLUS PUMILUS* STRAIN 209 AND SOME PROPERTIES OF THE ENZYME

HONAN SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE OF LEATHER INDUSTRY  
(Pingdingshan)

Out of 880 bacterial strains, No. 209 has been selected for the production of proteinase for unhairing hide and skin in leather industry. It has been identified as *Bacillus pumilus*.

Fermentation conditions for enzyme production have been established: composition of the medium (%) is soya-bean meal 2.5—3.5, wheat bran 3.5—4.5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03,  $\text{CaCl}_2$  0.3, and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5, pH 9.0. After fermenta-

tion in 50 liter fermentor at 35—36°C, with an aeration rate of 1:0.5—1:1 for 31 hrs., the enzyme activity was about 5000 u/ml of terminated liquor (broth).

The optimum pH for enzyme action is 9—11, optimum temperature, 50°C. No loss of activity was found when it was stored in plastic bag for 11 months. The enzyme preparation is non-toxic to mice.