

一株产碱性蛋白酶菌株的选育及其发酵条件的研究

那淑敏 余茂劲

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从土壤中分离到的 553 株芽孢杆菌中选出一株产蛋白酶活力较高菌株, 经紫外线和亚硝基胍诱变, 获得一株产碱性蛋白酶的菌株, 酶活力可达 10000u/ml, 此菌株经鉴定为地衣状芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。适宜的发酵条件: 培养基由 6% 玉米粉(山芋粉或葡萄糖), 4% 豆饼粉(或其水解液), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.4%, KH_2PO_4 0.03%, Na_2CO_3 0.1% 组成, pH7.0, 37℃ 旋转摇床振荡培养 42—46 小时。酶作用的最适条件: 60℃, pH9.0—10.5, 在 pH6.0—10.5 范围内稳定。酶受 DFP 抑制。

关键词 碱性蛋白酶; 地衣状芽孢杆菌

1913 年 Röhlm 首先将胰蛋白酶作为洗涤剂使用^[1], 后来发现了微生物产生的碱性酶, 使蛋白酶有可能广泛用于洗涤剂。目前, 有关这种蛋白酶已有不少报道, 对芽孢杆菌产生的几种蛋白酶的性质研究得较清楚^[2-7]。

碱性蛋白酶广泛存在于微生物中, 与动物体内的胰蛋白酶相似^[1,4,7]。该酶是加酶洗涤剂的主要添加剂之一, 在制革、丝绸工业方面也有广泛的用途^[1]。目前国内生产菌株单一, 需要配合不同性状和优良的高产菌株, 以满足工业生产的要求。1983 年我们从采集的土壤中分离到 553 株芽孢杆菌, 经筛选比较后, 选择其中编号为 533 的一株, 经物理化学方法诱变后提高产酶能力 20 倍。

材料和方法

(一) 菌株

菌株 533-F13 经本所周惠玲同志鉴定为 *Bacillus licheniformis*。

(二) 培养基

1. 斜面培养基 (%) : 牛肉膏 1, 鱼蛋白胨 1, NaCl 0.5, 琼脂 2, pH7.0。

2. LB 培养基 (%) : 酵母粉 0.5, 胰胨 1, NaCl 0.5, pH7.0。

3. 双基质固体平板培养基: 按参考文献 [8], 并作部分改进, 用琼脂糖代替琼脂作平板, 用 pH 10.5 NaOH 和四硼酸钠缓冲液配制, 每皿 (φ9cm) 用 20ml 铺成平板。

4. 发酵培养基: 按参考文献 [9], 并补充酪素 0.5% 和酵母膏 0.5%。自然 pH。

5. 孢子培养基、见文献 [10]。

6. 分离培养基: 见文献 [11]。

7. 摇饼条件和发酵培养基 (%) : 山芋粉(玉米粉或葡萄糖) 6, 豆饼粉 4, KH_2PO_4 0.03, Na_2CO_3 0.1, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.4, 自然 pH。250ml 三角瓶装 25ml 37℃, 230r/min 旋转摇床振荡培养, 接种量 2% (V/V)。

(三) 蛋白酶活力测定

按轻工业部部颁标准方法测定。1 毫升酶液在 40℃, pH10.5, 每分钟水解酪蛋白产生 1 微克酪氨酸的酶量为一个酶活力单位。

(四) 初筛菌种蛋白酶活力的测定

注入 φ9cm 皿 20ml 双基质培养基, 用打孔器取出直径 0.5cm 的培养基圆片, 依次加入 20μl 的 48 小时的发酵液, 37℃ 培养 20 小时, 根据水解

本文于 1987 年 1 月 16 日收到。

本课题为国家科学技术委员会资助项目。

透明圈大小测定蛋白酶活力。也可加少量 10% 三氯乙酸于皿上,以增强观察效果。

(五) 试剂和仪器

亚硝基胍 (NTG), (西安化学试剂厂); 二异丙基磷酸氟 (Diisopropyl phosphorofluoridate), 简称 DFP (Carl Roth KG); 邻菲罗啉 (O-Phenanthroline), 简称 O-P (北京化工厂); 苯甲基磺酰氟 (Phenylmethanesulfonyl fluoride), 简称 PMSF (MERCK); 8-羟基喹啉 (8-Hydroxyquinoline) (北京化工厂)。

pH S-2 型酸度计 (上海第二分析仪器厂)。

结果和讨论

(一) 产碱性蛋白酶菌株的分离

以 LB 液浸泡 5—10g 土壤样品 (采自大庆, 无锡、上海、嘉定, 杭州, 富阳, 桐庐, 庐山, 九江, 汉口, 神农架, 吐鲁番, 天池) 30℃ 保温过夜, 取浸出液于小管中, 在 Eppendorf 离心机上离心 3—5 秒, 将上清液置于 70℃ 水浴中保温 10 分钟, 杀死营养细胞, 冷却。取一定量稀释液涂布在分离培养基平板上, 30℃ 培养过夜, 挑取有蛋白水解圈的菌落, 经纯化, 镜检, 保留在斜面上。共挑出 553 株芽孢杆菌, 供筛选用。

(二) 初筛产蛋白酶菌株

取 1.4×14cm 试管, 内装 2.5ml 发酵培养基, 接入上述分离的菌株, 37℃ 旋转摇床培养 48 小时, 离心, 取 20μl 上清液加入双基质培养基平板的小孔中, 37℃ 培养 20 小时, 次日根据蛋白水解圈的大小决定酶活的高低。复筛后, 选出水解圈直径大于 1cm 的菌株 34 株, 再经发酵后测定, 其中 14 株产酶在 190—500 u/ml 之间, 有两株产酶虽高些, 但发酵液极粘, 对后提取不利, 故选用产量低些、性状较好的 533 号菌进行诱变。结果见表 1。

(三) 孢子热处理

将菌株 533 接种在生孢子培养基上, 30℃ 生长 5—7 天, 用少量无菌水洗下孢子

表 1 初筛菌株的蛋白酶活力

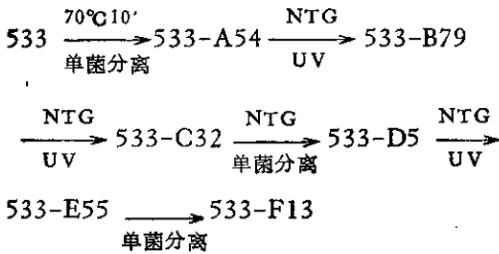
Table 1 Protease activity of preliminary selected strains

菌株 Strain No.	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
52	334
70	222
49	186
68	393
148	2276
250	483
276	925
284	406
292	297
392	297
411	322
446	372
411	322
446	372
460	407
533	501
468	194

70℃ 水浴保温 10 分钟, 冷却, 稀释涂布平板, 挑单菌落进行发酵, 选出产酶比 533 高的一单菌 533-A54 进行诱变。

(四) 亚硝基胍和紫外线复合处理

将 37℃ 培养 15 小时的 533-A54 菌液, 离心去上清液, 用 pH6, 0.1mol/L 磷酸缓冲液洗涤菌体 2 次, 再用此缓冲液配成 10⁸ 细胞/ml 的菌悬液, 加入 NTG 液使其终浓度为 1000 μg/ml, 37℃ 水浴处理 30 分钟, 间歇摇动, 离心后去掉含 NTG 的上清液, 再用磷酸缓冲液洗一次, 重悬在同样体积的缓冲液中, 倒入直径为 5cm 的小皿中, 在黑暗中用紫外灯 (15W, 距离 30cm) 照射 30 秒或 1 分钟, 经适当稀释后涂布平板, 37℃ 培养 16 小时, 待长出单个菌落时接到斜面上。复合处理致死率达 99.99%。重复多次上述诱变, 最后获得一产酶达 10000u/ml 的突变株 533-F13。533 菌株的诱变过程为:



(五) 533-F13 菌株的特性

533-F13 菌株在平板上的菌落为圆形,中凸,上有一小凹,幼龄时透明,光滑,稍粘,老龄时乳黄,扁平,基本上圆形,呈同心圈,不粘,无荚膜。

牛肉汁斜面上的 533-F13 菌,幼龄时光滑,湿润,呈稀糊状,半透明,稍粘,24 小时后斜面不光滑,乳白色,久后斜面基部出现小皱纹,533-F13 细胞呈杆状(图 1)。



图 1 533-F13 菌株细胞的电镜照片($\times 10000$)

Fig. 1 Electron morphology of *B. licheniformis* 533($\times 10000$)

533-F13 菌发酵液的粘度比生产上使用的 2709 菌低,菌易分离,对后处理有利。

(六) 发酵条件试验

1. 碳源试验: 发酵培养基中加入 6% 不同碳源,从表 2 可见以葡萄糖作碳源产酶量高,可达 9400u/ml。6% 和 8%(W/V) 葡萄糖的发酵培养基产酶水平接近,都可达到 10500u/ml,葡萄糖浓度增至 10%,

酶活有下降趋势。这可能是一种分解代谢物阻遏现象^[12,15]

一般来说,胞外酶生物合成的调节涉及分解代谢物阻遏。在葡萄糖或其它快速代谢碳源的存在下,组成酶和诱导酶的合成都受控于这种现象。例如枯草杆菌 168 在几种可代谢的碳源中生长和产酶进行比较,以在葡萄糖中生长最好,但 α -淀粉酶产量最低。这种现象在地衣芽孢杆菌等产生蛋白酶的过程中也存在^[22]。Laishley^[26]报道地衣芽孢杆菌需在有限量的葡萄糖培养基中才能产蛋白酶。虽然芽孢杆菌分解代谢阻遏的机制还不清楚,但众所周知的大肠杆菌的分解代谢阻遏机制不同^[22]。为了避免这种分解物阻遏,采用流加碳源可能是可取的。以水解糖作碳源较为方便,既可降低发酵液粘度,又便于提取。

2. 氮源试验: (1) 不同氮源的试验: 发酵培养基中分别加入含纯氮 1.32%, 除标明碳源外均以葡萄糖为碳源,将培养基调至 pH7.2, 结果以豆饼水解液(取 10g 豆饼粉和 100ml 水加 0.5g 或 1g 氢氧化钠, 121 $^{\circ}\text{C}$ 水解 30 分钟,使用前中和至 pH7.2) 为氮源,结合玉米粉产酶活力最高可达 9440u/ml, 其次为豆饼粉,其它氮源严重影响产酶活力(表 3)。(2) 不同浓度豆饼水解液作氮源的产酶比较: 表 4 指出, 10% 豆饼水解液比用豆饼粉作氮源产酶活力高,达 10400u/ml, 用 15% 豆饼水解液作氮源,酶活力增加不明显。用 10% 豆饼水解液配合 6% 玉米粉比配合 6% 葡萄糖酶活力高 45%(表 3)。(3) 不同浓度豆饼粉以不同浓度的 NaOH 水解后作氮源的产酶比较: 从表 5 看出,以 0.5% NaOH 水解 10% 豆饼粉为宜,产酶可达 9590 u/ml, 比对照高 14%。

3. 培养期间蛋白酶产生的时间, 细胞

表 2 各种碳源对产酶的影响

Table 2 Effect of various carbohydrate on protease production

碳源 Carbohydrate	初 pH Initial pH	终 pH Final pH	蛋白酶活力 Protease activity (u/ml)
玉米粉 Maize flour	7.0	7.5	7900
糊精 Dextrin	7.0	7.5	6900
葡萄糖 Glucose	7.0	7.2	9400
可溶性淀粉 Soluble starch	7.2	7.3	5850
蔗糖 Sucrose	7.5	7.5	5250
果糖 Fructose	6.5	6.8	8750
麦芽糖 Maltose	6.7	6.6	6850
山芋粉 Sweet potato-meal	7.0	7.5	8640

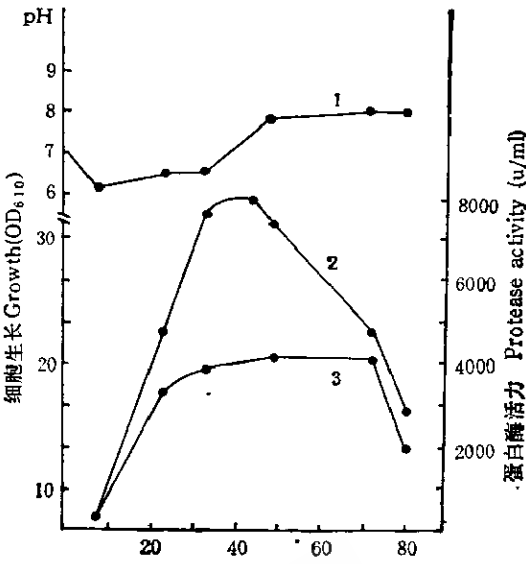


图 2 培养期间蛋白酶产生的时间过程,细胞生长及 pH 变化

Fig. 2 Time course of protease production, cell growth and pH variation during cultivation

1. pH; 2. 蛋白酶活性; 3. 细胞生长
1. pH; 2. Protease activity; 3. Cell growth

生长及pH的变化^[43]: 在 42—46 小时之间酶活力达到最高值,超过 48 小时以后酶活力下降。发酵初期(10 小时左右) pH 稍

表 3 不同氮源对产酶的影响

Table 3 Effect of various nitrogen compounds on protease production

氮源 Nitrogen source	初 pH Initial pH	终 pH Final pH	蛋白酶活力 Protease activity (u/ml)
KNO ₃	6.7	6.0	56
NH ₄ Cl	6.5	6.0	36
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.7	6.0	38
NH ₄ NO ₃	6.7	6.0	36
多肽 Polypeptone	6.5	8.0	268
肽 Peptone	6.5	6.2	288
牛肉膏 Beef extract	7.0	6.5	176
酵母膏 Yeast extract	6.7	7.5	2780
豆饼粉 Soy bean cake meal	7.0	7.5	8240
豆饼粉水解液(+葡萄糖) Soy bean cake meal hydrolysate (+Glucose)	7.5	6.5	6720
酪素 Casein	6.5	6.0	400
豆饼水解液(+玉米粉) Soy bean cake meal hydrolysate (+maize flour)	7.5	7.5	9440

有下降,以后慢慢上升至 pH 8.0,菌体在 24 小时内生长迅速,以后细胞略有增长,处于稳定期,正是产酶时间。48 小时后,酶活力下降,细胞也逐渐自溶。一般发酵

周期在 44—48 小时之间,发酵周期的长短与碳源种类及通气条件有关(图 2)。

4. 通气量对产酶的影响: 250 ml 或 500ml 三角瓶分别装发酵培养基 25、75 和

表 4 不同浓度豆饼水解液作氮源的产酶比较

Table 4 Comparison of various concentration of soy bean cake hydrolysate on protease production

培养基	10%豆饼水解液	10%豆饼水解液	15%豆饼水解液	15%豆饼水解液	6% 豆饼粉	6% 豆饼粉
Media	10% SBCM ^H *	10% SBCM ^H *	15% SBCM ^H *	15% SBCM ^H *	6% SBCM ^{**}	6% SBCM ^{**}
	玉米粉	葡萄糖	玉米粉	葡萄糖	玉米粉	葡萄糖
	Maize flour	Glucose	Maize flour	Glucose	Maize flour	Glucose
蛋白酶活力 Protease activity (u/ml)	10400	5760	11200	8160	8480	8640

* SBCM^H: Soy bean cake meal hydrolysate
** SBCM: Soy bean cake meal

表 5 不同 NaOH 浓度的豆饼水解液对产酶的影响

Table 5 Effect of SBCM hydrolysate of various NaOH concentrations on protease production

培养基	10%豆饼水解液	10%豆饼水解液	10%豆饼水解液	10%豆饼水解液	15%豆饼水解液	15%豆饼水解液	4% 豆饼粉
Media	10% SBCM ^H *	10% SBCM ^H *	10% SBCM ^H *	10% SBCM ^H *	15% SBCM ^H *	15% SBCM ^H *	4% SBCM ^{**}
	0.5% NaOH	0.5% NaOH	1.0% NaOH	2.0% NaOH	2.0% NaOH	2.0% NaOH	玉米粉
	玉米粉	葡萄糖	玉米粉	葡萄糖	玉米粉	葡萄糖	Maize flour
	Maize flour	Glucose	Maize flour	Glucose	Maize flour	Glucose	
Protease activity (u/ml)	9590	4329	5890	2076	1358	1265	8293

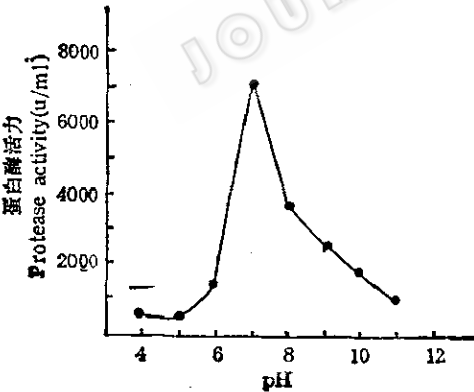


图 3 不同起始 pH 的起始培养基对产酶的影响
Fig. 3 Effect of initial pH on protease production

100ml, 结果表明,装 25ml 培养基产酶高。如加大通气量,产酶水平还可增加。

5. pH 对产酶的影响: 用玉米粉,豆

饼粉配制发酵培养基,以起始 pH7 的发酵培养基(即自然 pH)对产酶最有利(图 3)。

6. 发酵培养基碳氮配比试验: 为了获得 533-F13 菌株生长和产酶的最适碳氮比,选择了玉米粉,山芋粉与豆饼粉作不同碳氮比试验,结果以 6% 山芋粉与 4% 豆饼粉组成的发酵培养基适于产酶。以玉米粉作碳源时,以 4% 豆饼粉配合 5% 和 6% 玉米粉产酶均佳。

(七) 粗酶的性质

1. 最适温度和热稳定性: 从图 4 看出,在 60℃ 酶活力可达 23500u/ml。高于 65℃ 酶活力显著下降。这与生产中使用的 2709 所产生的碱性蛋白酶的最适温度(50℃)明显不同^[7](图 4)。

将酶稀释液分别在不同温度(40、45、50 和 60℃)的恒温水浴中保温,结果表明,

50℃保温 1 小时,酶活力剩余 16.6%,60℃保温 50 分钟,酶活力剩余 10%(图 5)。但在有底物保护时,酶反应进行 90 分钟完全不失活。

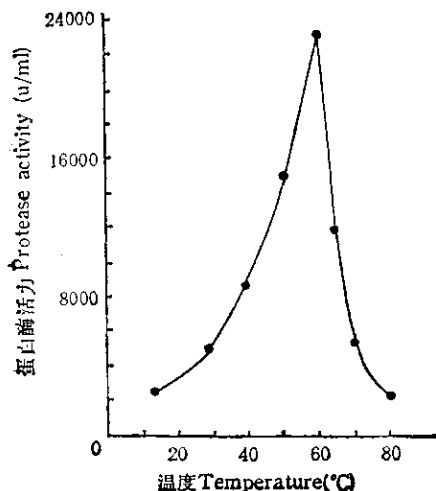


图 4 温度对蛋白酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on protease activity

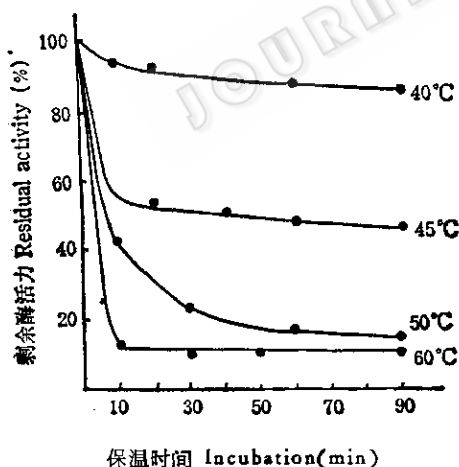


图 5 无底物存在时酶的热稳定性

Fig. 5 Thermal stability of enzyme at the absence of substrate

应 10 分钟测定酶活力。酶的最适 pH 为 10.5,在 pH 9.0—10.5 之间酶活力都较高,大于 pH 11 时酶活力显著下降。

Keay^[4] 将芽孢杆菌产生的碱性蛋白酶按不同 pH 时蛋白酶作用于酪素的活性曲线,酯酶对蛋白酶活力的比值,免疫学分析中是否有交叉反应,以及蛋白酶氨基酸组成和序列的差异,将其区分为两种类型。A 型为 Carlsberg 型蛋白酶, B 型为 Novo 型蛋白酶。由地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌产生的碱性蛋白酶属 A 型。这类菌只产生碱性蛋白酶,而不产生中性蛋白酶。它的 pH 活性曲线比 B 型陡,酯酶活性与蛋白酶活性比值较 B 型高,氨基酸残基为 274。一般认为 A 型酶组成的洗涤剂除污效果好^[14]。因为它在洗涤溶液中具有较大的稳定性。地衣芽孢杆菌 533-F13 产碱性蛋白酶的 pH 活性曲线与 A 型酶相似,由此推测它所产生的碱性蛋白酶可能属 Carlsberg 型(图 6)。

取不同 pH 缓冲液稀释的酶液,在 40℃ 恒温水浴中保温 2.5 小时后,测定剩余酶活力。结果表明,在 pH 6.0—10.5 之间酶比较稳定,剩余酶活力在 90% 以上,大于 pH 11 时酶活力下降 50%。

3. 金属离子对酶活力的影响: 稀释酶液中加入各种金属离子,使其终浓度为 1×10^{-3} mol/l, 37℃ 水浴中保温 15 分钟, Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶有显著的抑制作用,钙离子对酶稍有激活作用。

Feder^[18] 等人指出,钙离子对许多酶都有稳定保护作用,尤其对耐热酶的热稳定性有很强的保护作用。淀粉酶、蛋白酶,尤其是中性蛋白酶均要求钙离子存在。钙离子能稳定酶的三级结构,从而保护了酶。

4. 各种抑制剂对酶活力的影响: 碱性蛋白酶又称丝氨酸蛋白酶,除 DFP 外, PMSF, 甲氧磷酸异丙酯 (Sarin) 和其它

2. 最适 pH 和对 pH 的稳定性: 在反应体系中加入不同 pH 的缓冲液,不同 pH 的酪素对相应 pH 的酶稀释液在 40℃ 反

磺酰卤化物以及来自马铃薯、大麦和大豆的蛋白酶抑制剂均可引起碱性蛋白酶失活，而金属螯合剂如 EDTA、O-P 能引起中性蛋白酶失活但不抑制碱性蛋白酶活性^[2,13,14,19]。丝氨酸蛋白酶在它们的活性位点上有丝氨酸残基，DFP 与丝氨酸残基反应生成磷酸酯^[20]，使酶失活。

粗酶的稀释液中分别加入终浓度为 1×10^{-2} mol/L 的 DFP、PMSF、O-P 和

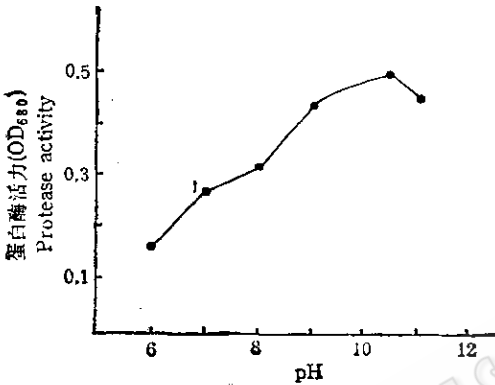


图 6 pH 对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of pH on enzyme activity

表 6 抑制剂对蛋白酶活力的影响

Table 6 Effect of various inhibitors on protease activity

抑制剂 Inhibitor	保留活力 Remaining activity(%)	
	pH 10.5	pH 7.5
Nil	100	100
DFP	0	0
EDTA	84	100
O-p	100	100
PMSF	12.5	0
8-羟基喹啉	103	112

8-羟基喹啉液，37℃ 处理 15 分钟，结果表明，碱性蛋白酶的特异性抑制剂 DFP 完全

抑制 533-F13 菌株的蛋白酶活性。EDTA 和 O-P 不抑制其活性。8-羟基喹啉不仅不抑制酶活性，反而有一些激活作用，其原因尚待研究。533-F13 菌株产生的胞外蛋白酶与丝氨酸蛋白酶的特性一致（表 6）。

参 考 文 献

- [1] Fogarty, W. M. et al.: *Process Biochemistry*, 9: 27—35, 1974.
- [2] Keay, L.: *Process Biochemistry*, 6: 17—21, 1971.
- [3] Ottesen, M. et al.: *Methods in Enzymology*, 19: 199—215, 1978.
- [4] Keay, L.: *Ferment. Technol. Today*, 289—298, 1972.
- [5] Leay, L. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 12: 213—249, 1970.
- [6] Ganesan, A. T. et al.: *Genetics and Biotechnology of Bacilli*. Academic pr. N. Y. p. 163, 1984.
- [7] Fergus, G. P.: *Bacteriol. Rev.*, 41: 711—753, 1977.
- [8] Thomas, J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 200—204, 1983.
- [9] Anagnostopoulos, C. et al.: *J. Bacteriol.*, 81: 741—746, 1961.
- [10] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著：一般细菌常用鉴定方法，科学出版社，北京 p. 192—193, 1978。
- [11] 中国科学院土壤研究所微生物室主编：土壤微生物分析方法手册，科学出版社，北京，P. 12, 1960。
- [12] Dubnau, D. A.: *Molecular Biology of Bacilli*, 1: 331—363, 1982.
- [13] Okada, J. et al.: *Appl. Microbiol. Biotech.*, 20: 406—412, 1984.
- [14] 胡学智：酶制剂工业（下）（张树政主编），科学出版社，北京，p. 387—455, 1984。
- [15] Arnold, L. D.: *Methodes in Enzymology*, 22: 86—95, 1971.
- [16] Laishley, E. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 96: 322—329, 1968.
- [17] 徐子渊：食品与发酵工业，4: 12—17, 1984。
- [18] Feder, J. et al.: *Biochemistry*, 10: 4552—4555, 1971.
- [19] James, A. W. et al.: *Nucleic Acid Research*, 11: 7911—7935, 1983.
- [20] Wharton, C. W. et al.: *Molecular Enzymology*, Blackie, london, 220—244, 1981.

SCREENING OF A HIGH YIELD ALKALINE PROTEASE PRODUCING STRAIN AND STUDIES ON ITS FERMENTATION CONDITIONS

Na Shumin Yu Maoxiao

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

553 strains of *Bacillus* from soil samples were isolated. After combination treatment with ultraviolet light and NTG, a mutant 533-F13 producing 10000u/ml of alkaline protease in culture broth was obtained from 553 strains.

The medium for fermentation consisted of 6% sweet potato meal (maize meal or glucose), 4% soy bean cake meal, 0.4% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.03% KH_2PO_4 , 0.1% Na_2CO_3 . The strain produced maximum al-

kaline protease activity after growth at 37°C for 42—46 h on a rotary shaker. The optimum pH and temperature for the protease activity production are pH 9—10.5, 60°C, and inhibited by DFP. Some other properties of the enzyme were discussed in detail.

Key words

Alkaline protease; *Bacillus licheniformis*