

枯草杆菌 AS 1.398 蛋白酶制剂中的几种酶系

丁鲁华 孙淑琴 徐建军 蒋千里 杜式荣 董俊卿

(河北省科学院微生物研究所,保定)

枯草杆菌 AS 1.398 菌株是产生中性蛋白酶的生产菌株。但由于目前的酶制剂是多种酶的混合物,所以应用范围受到很大限制。为了更好地发挥该酶制剂的应用潜力,我们对其中的几种酶系进行了研究。

材 料

1. 市售 AS 1.398 中性蛋白酶制剂。
2. 硫酸铵、氯化钙为工业产品
3. 0.01M 磷酸缓冲液, pH7.2。

方法和结果

一、蛋白酶、糖化酶和 α -淀粉酶活力的测定

按文献[1]介绍的方法。

二、中性蛋白酶的纯化

称取 200g 酶粉,用自来水溶解,定容为 2200ml。室温搅拌提取 2h 后,先按体积计加入 20% 浓度为 60% 的 CaCl_2 溶液,再加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使其浓度达 30% (重量/体积),搅拌,自然沉淀。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与 CaCl_2 反应后,形成 CaSO_4 、 NH_4Cl 和过量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,过量 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度可由计算求得。20 分钟后离心 (4000 rpm, 20 min)。按上清液体积加入 20% 硫酸铵粉末 (重量/体积,但上清液中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 总含量应加上上述过量部分在内)。盐析过夜,离心 (4000 rpm, 20min) 收集沉淀,称重,用 2—2.5 倍体积的 0.01 M pH 7.2 的磷酸缓冲液溶解,离心 (4000 rpm, 15min),弃去不溶物。在上清液中补加硫酸铵粉末使其浓度达到 20% (重量/体积),盐析,离心 (4000 rpm, 15min) 收集沉淀为组份 1,上清液中按体积补加 1.5% (重量/体积) 的硫酸铵粉末,再盐析得组份 2,如此重复操作,直到补加的硫酸铵浓度

达到 33.5% (重量/体积) 时为止,可得 10 个组份、分别称重,进行以下测定。

三、蛋白酶活力测定

酶活力以 40℃ Folin 单位 (u) 表示;蛋白质含量在 275 nm 波长测定的光吸收 (A) 表示。比活以 u/A 表示^[3]。回收率、比活与盐析浓度的关系见图 1,2。

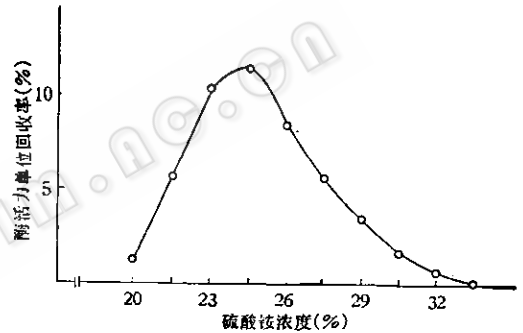


图 1 各组份的回收率与盐析浓度

图 1 表明,硫酸铵浓度为 24.5% 时回收率最高。

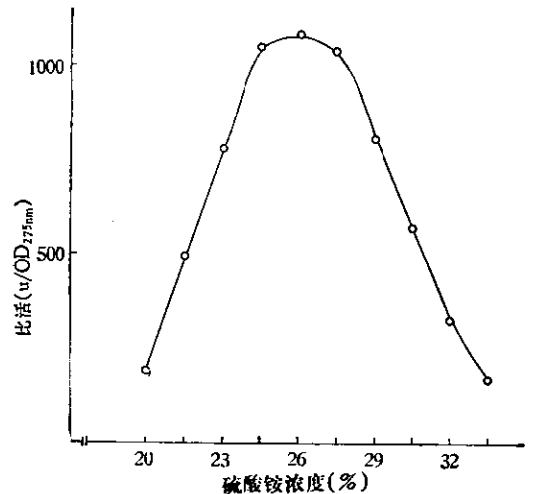


图 2 各组份比活与盐析浓度

图2表明, 硫酸铵浓度为26%时, 其比活最高。

四、比活与回收率的计算

(一) 20—33.5% 硫酸铵盐析所得的10个组份平均比活及回收率按下式计算

$$1. \text{平均比活} = \frac{\sum \text{酶活力单位}(u)}{\sum \text{蛋白质质量}(A)}$$

$$= \frac{900.8 \times 10^4}{12.8 \times 10^3} = 740(u/A_{275nm})$$

$$2. \text{比活提高} = \frac{\text{平均比活}}{\text{酶粉比活}} - 1$$

$$= \frac{740}{36.7} - 1 = 19.2 \text{ 倍}$$

$$3. \text{回收率} = \frac{\sum \text{酶活力单位}(u \times 10^4)}{\text{酶粉酶活力}(u/g) \times 200}$$

$$\times 100\% = \frac{900.8 \times 10^4}{9.32 \times 200 \times 10^4}$$

$$\times 100\% = 48.3\%$$

(二) 20—30.5% 8个组份平均比活及回收率

$$1. \text{平均比活} = \frac{\sum \text{酶活力单位}(u)}{\sum \text{蛋白质质量}(A)}$$

$$= \frac{862.2 \times 10^4}{10.4 \times 10^3} = 829(u/A)$$

$$2. \text{比活提高} = \frac{\text{平均比活}}{\text{酶粉比活}} - 1 = \frac{829}{36.7} - 1 = 21.5 \text{ 倍}$$

$$3. \text{回收率} = \frac{\sum \text{酶活力单位}}{\text{酶粉酶活力} \times 200} \times 100\%$$

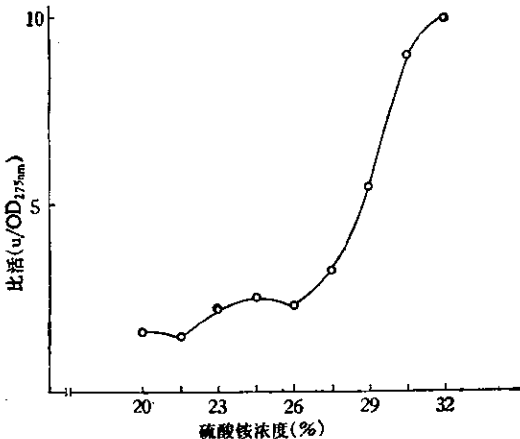


图3 各组份糖化酶比活与盐析浓度关系

$$= \frac{862.2 \times 10^4}{9.32 \times 10^4 \times 200} \times 100\% = 46.3\%$$

五、糖化酶活力的测定

测定各组份的酶活力, 求出比活(用 u/A_{275nm} 表示)结果见图3。

图3表明, 硫酸铵浓度为32%时, 其糖化酶比活最高。

六、α-淀粉酶活力测定

测出各组份的酶活力, 求出比活结果见图4。

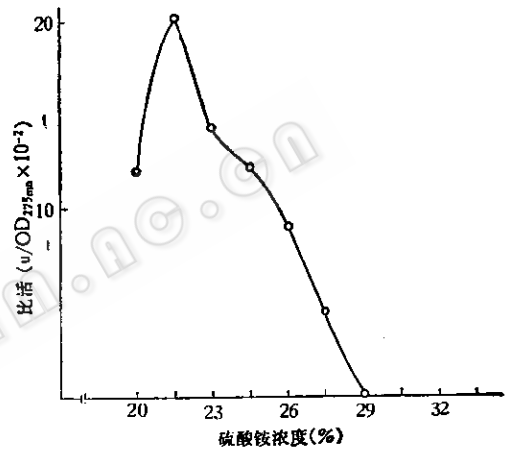


图4 各组份α-淀粉酶比活与盐析浓度关系

图4表明, 硫酸铵浓度为21.5%时, 其α-淀粉酶比活最高。

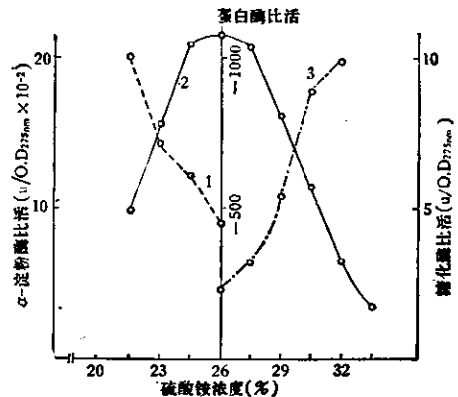


图5 三种酶比活之间的反比关系

1. α-淀粉酶比活; 2. 蛋白酶比活; 3. 糖化酶比活。

七、蛋白酶、 α -淀粉酶、糖化酶三者比活间的关系

结果见图 5。

图 5 表明， α -淀粉酶、蛋白酶、糖化酶的比活，互为反比关系。

讨 论

市售 AS 1.398 菌生产的中性蛋白酶粉，是一个以蛋白酶为主，又有一定量的糖化酶和少量 α -淀粉酶的混合酶粉。用硫酸铵进行分级盐析，可得 10 个组份。蛋白酶主要分布在硫酸铵浓度为 20—30.5% 各组份中，回收率达 46.3%，比活较粗粉提高 21.5 倍，糖化酶主要分布在 27.5% 以后的各组份中， α -淀粉酶主要分

布在 24.5% 以前的组份中。随着硫酸铵浓度的增加，以 26% 为转折点，蛋白酶与 α -淀粉酶和糖化酶的比活变化呈反比关系。所以蛋白酶比活的变化，估计与 α -淀粉酶及糖化酶、蛋白酶的杂蛋白存在形式有关。

随着硫酸铵盐析的浓度增加，各组份的颜色逐次变浅，24.5% 以后的组份基本上为淡黄色，其原因有待探讨。

参 考 文 献

- [1] 中山大学生物系生物化学微生物学教研室：生化技术导论，第一版，人民教育出版社，北京，1978，第 53—57 页。
- [2] 野上·田中：藥誌，80：365，1960。
- [3] Masahiro Kamapa, Koheiopa and Sawao Murao: *Agr. Biol. Chem.*, 36(7): 1097.1972.