

AS 1398 蛋白酶对各种不同蛋白底物特异性的研究

丁鲁华 杜式荣 孙淑琴 徐建军

蒋千里 董俊卿 李树品

(河北省科学院微生物研究所, 保定)

AS 1398 中性蛋白酶, 主要用于皮革脱毛。胶原蛋白酶、弹性蛋白酶、糖苷酶是酶法生皮脱毛中所涉及到的最主要的蛋白水解酶。在目前的实际应用中, 一般以 Folin 单位计量使用。对未经处理而含有多种酶的粗粉来说, 是不易得到理想的试验结果的。本文报道以 AS 1398 中性蛋白酶为材料, 通过硫酸铵盐析的各组分对不同底物作用表现的活力的结果。

材料和方法

1. 中性蛋白酶: 市售 AS 1398 中性蛋白酶粗粉。
2. CaCl_2 : CP 级或工业纯。
3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: CP 级或工业纯。
4. 蛋白酶的测定: 采用 Casein-Folin 法。
5. 糖的测定: 用蒽酮法。

6. 羟脯氨酸测定: 参照文献[1]。
7. 氮的定量: 用微量凯氏定氮法^[2]。
8. 脱脂带毛生猪皮: 保定市皮革厂提供。
9. 弹性蛋白粉(elastin powder): Switzerlend Chemische Fabrik 产品。

结 果

1. 粗酶粉的去渣和分级盐析: 取中性蛋白酶粗粉 500g 加 10 倍自来水溶解, 用 60% (W/V) 的 CaCl_2 (20%, V/V) 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末 (30%, W/V) 去渣。取上清液按体积加入 20% (W/V) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末盐析沉淀 (硫酸浓度为 35.7%)。将酶沉淀以 2 倍体积 pH 7.5 磷酸缓冲液 (0.01M) 溶解, 计算硫酸浓度, 离心去不溶物。补加硫酸粉末至 20% (W/V) 盐析的组份“1”。以 1.5% (W/V) 硫酸为一个组份间隔分级盐析, 直至硫酸浓度为 32% 为止, 共得到 9 个不同硫酸浓度盐析组份酶。

2. 不同组份酶对不同底物的水解活性: ① 酪蛋白水解活性的测定: 40°C Folin 法测定各组份的蛋白酶的活性, 并据此确定以下试验的加酶量。② 糖蛋白水解活性和胶原蛋白酶活力测定。以脱脂生猪皮为底物, 按 250u/g 猪皮加酶, 38°C 振荡脱毛水解 2.5 小时。结果见表 1, 图 1—3。③ 弹性蛋白酶活力: 以弹性蛋白粉

表 1 各组份的脱毛结果(以“+”数多少表示)

结果 组份编号	项目 脱毛结果(四块)	平均脱毛 “+”数
1	++ ++ ++++ ++++	3.00
2	++ ++ ++++ ++++	3.00
3	++ ++ ++++ +++++	3.25
4	++ +++ +++ +++++	3.25
5	++ +++ +++ +++	2.75
6	++ ++ +++ +++	2.50
7	++ ++ +++ +++	2.50
8	+ ++ +++ +++++	2.50
9	+ + ++ ++++	2.00
粗酶粉	++ ++ +++ +++++	2.75

为底物, 用各组份的稀释液在 40°C、pH 8.9 条件下水解 20 分钟, 加三氯乙酸中止反应 (并

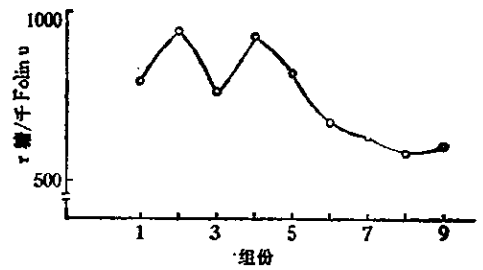


图 1 各组份水解糖蛋白酶活力

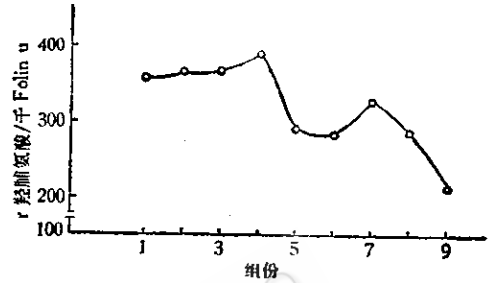


图 2 各组份的胶原蛋白酶活力

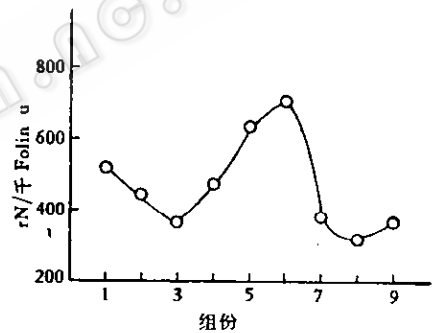


图 3 各组份的弹性蛋白酶活力

设对照), 测定产氮量。以单位酶量的产氮 γ 数表示其酶活力。结果见图 3。

讨 论

AS 1398 中性蛋白酶粗粉, 能水解多种蛋白底物。根据水解结果分析, 它不是单一蛋白酶作用的结果。如果它是一种蛋白酶, 那么对于一种底物(如酪蛋白)产生同样水解酶活力的各组份的酶量(即同值 Folin 单位)对于另一种底物产生的水解结果应该相同。但图 1—3 说明, 各组份的酶对糖蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白的水解结果很不相同, 因此不能证明这种假设。

AS1398 中性蛋白酶粗粉很可能除含有酪蛋白酶外, 还含有对酪蛋白不起作用^[3]的和能水解酪蛋白^[4]的弹性蛋白酶等。

AS1398 中性蛋白酶粗粉的不同硫酸浓度的盐析结果, 说明使用具有相同 Folin 单位的酶量, 对糖蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白的水解酶活力差别很大。所以仅以 Folin 单位计量而不考虑底物的具体情况笼统地加以使用, 往往难以收到理想结果。按照脱毛机制理论, 对生猪皮中不同蛋白质的水解程度要求不同: 非纤维型蛋白要求尽量水解彻底, 而胶原蛋白则应尽量保留不受损失, 对弹性蛋白则要求水解彻底。所以单使用 AS1398 粗酶粉, 以 Folin 单位计量是难以达到理想的水解效果的。这很可能是该酶在应用于脱毛时遇到困难的原因之一。

以同样 Folin 单位的酶量, 在 1—5 这 5 个

组份对糖蛋白的水解酶活力较 6—9 这四个组份强。大多数研究工作者认为: 脱毛就是类粘蛋白与粘蛋白之类的糖蛋白水解的结果。脱毛的实践也证明了这一观点。此外, 经过本法提纯分离的酶, 可能会提高脱毛效果。如 2 和 4 二组份脱毛效力最高, 而第 9 组份对糖蛋白水解活力最低, 脱毛效果也最差。而未经提纯的酶, 其脱毛效果居中。

参 考 文 献

- [1] Neuman, R. and Logan, M.: *J. Biol. Chem.*, 184: 299, 1950.
- [2] 潘家秀等编著: 蛋白质化学研究技术, 4—8, 科学出版社, 北京, 1962.
- [3] Кунина, О. В., Шликитер, В. О.: *Успехи Современ. Биол.*, т. 50, вып. 3 (6): 294, 1960.
- [4] Lewis, U. J., Williams, D. E., Brink, N. G.: *J. Biol. Chem.*, 2: 705, 1956.