

中性蛋白酶 AS 1.398 固定化酶的研究

邱秀宝 舒东*

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 枯草芽孢杆菌 AS1.398 中性蛋白酶经海藻胶包埋制成固定化酶,用 3% 的胶包埋率达 98%,表现活力为 7% 左右。其最适反应 pH 为 7.0,最适温度为 55℃,与自然酶相一致。固定化酶的耐热性比自然酶高,最稳定的 pH 为 7.0 左右, pH8.0 以上不稳定。海藻胶容易解体,球形破裂,因此只适合在中性条件下使用。

关键词 蛋白酶;固定化

蛋白酶是水解蛋白质的一群酶类,用途很广,大多用于轻工、医药和食品。在食品工业中应用的酶要求纯度高,不使酶带入产品,因此需要把酶固定在载体上并可反复使用。固定化中性蛋白酶可应用于啤酒澄清,各种蛋白水解液的制备等方面。蛋白酶的固定化方法很多,国内外学者已有较多的研究。用海藻胶包埋法固定蛋白酶还未见报道,现将初步研究结果报道如下。

材料和方法

1. 粗酶粉为江苏省无锡酶制剂厂生产的工业用酶,商品名称 AS 1.398,活力单位 50000 u/g 酶粉。

2. 海藻酸钠(海藻胶):由青岛海洋学院提供。

3. 粗酶抽提:将 50000 u/g 酶粉 100 克用自来水按 1:5 在 40℃ 下浸泡 4 小时,在上述抽提液中加入 50% 的 CaCl_2 溶液,加量为酶液体积的 20%,充分搅拌,所形成的沉淀用布氏漏斗过滤,将酶液放入透析袋中,用自来水进行流水透析 6 小时,再放入蒸馏水中透析 1 小时。用奈氏试剂测透析液及酶液,如无红色沉淀反应即不含有硫酸铵,此酶液可用于固定化。

4. 酶活力测定: Folin 试剂显色法^[1]。

酶活力单位定义:在测定的条件下,1 ml

酶液水解酪蛋白每分钟释放出 1 μg 的酪氨酸的酶量为一个活力单位。

5. 固定化方法:将酶液与一定浓度的海藻酸钠混合,搅匀后,用 5 ml 针筒吸取,打入 10% CaCl_2 溶液中成珠。

结果与讨论

(一) 海藻胶浓度对包埋效果的比较

配 2—4% 不同浓度的胶各 20 ml, (其中酶液 4 ml, 蒸馏水 16 ml), 比较包埋效果(表 1)。结果表明,当胶的浓度为 2—4% 时,随着胶浓度提高酶活力较高。但 4% 太浓,做固定化比较困难,所以选用 3% 浓度的胶为宜。

表 1 海藻胶浓度对包埋效果的比较

| 活力 胶 浓度 (%) | OD ₁ | OD ₂ | OD ₃ | 平均 OD | 酶活 (u/g) |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-------------|
| 2 | 0.324 | 0.324 | 0.322 | 0.323 | 242.25 |
| 3 | 0.426 | 0.424 | 0.420 | 0.423 | 317.25 |
| 4 | 0.462 | 0.460 | 0.460 | 0.461 | 345.75 |

(二) 酶液浓度对包埋效果的影响

当胶浓度为 3% 时,比较不同酶液浓度时的包埋效果,结果见表 2。

* 原山东大学生物系生化专业 88 年应届毕业生

表 2 酶浓度对包埋效果的影响

| 活力 序号 | u/2 ml 胶 | u/g 胶 | u/g 固定 化酶 | 漏出酶 (u/ ml) | 包埋率 (%) | 表现 活力 (%) |
|----------|-------------|----------|-----------------|-------------------|------------|-----------------|
| 1 | 3456 | 4046.8 | 317.14 | 84.48 | 97.6 | 7.8 |
| 2 | 4608 | 4917.8 | 273.58 | 76.80 | 98.3 | 5.56 |
| 3 | 5760 | 5454.5 | 435.48 | 77.28 | 98.7 | 7.98 |
| 4 | 6912 | 7283.5 | 501.5 | 104.16 | 98.5 | 6.88 |
| 5 | 8064 | 8391.3 | 479.1 | 127.20 | 98.4 | 5.70 |
| 6 | 9216 | 10679 | 328.1 | 147.84 | 98.4 | 3.07 |
| 7 | 10368 | 11769 | 299.1 | 184.80 | 98.2 | 2.70 |

由上述数据可看出,选用酶量为 2880 u/ml 包埋效果最好,即酶液与胶的比例为 50%,酶表现活力最高。

(三) 酶性质的测定

1. 温度对酶活力的影响:

配 3% 的胶液 40 ml (内含 50% 酶液),取 4 ml 胶,用 5 号针头注入 10 ml 10% 的 CaCl_2 溶液中,制成固定化酶,总重量为 1.814 g,取重量 0.085 g 固定化酶共 5 份,放入不同温度下测活力,并用稀释 200 倍的自然酶为对照 (图 1)。

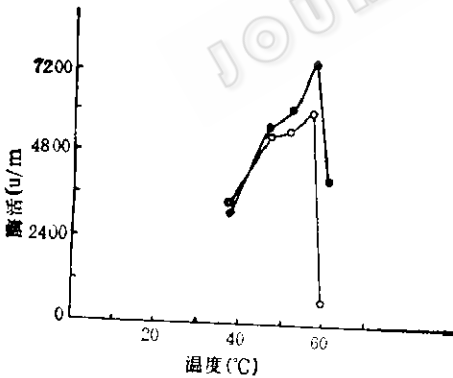


图 1 温度对酶活力的影响
—○—自然酶 —●—固定化酶

从图 1 可知自然酶和固定化酶最适温度均为 50—55 °C,但自然酶在 60 °C 时,几乎全部失活,在 60 °C 时固定化酶活力为 3960 u/ml,自然酶活力为 720 u/ml,固定化酶比自然酶高 5.5 倍。

2. 温度对酶稳定性的影响: 将自然酶液

与固定化酶在 pH 7.0 条件下放在四种不同温度下保温不同时间,然后用常规法测定其剩余酶活力,结果见图 2。

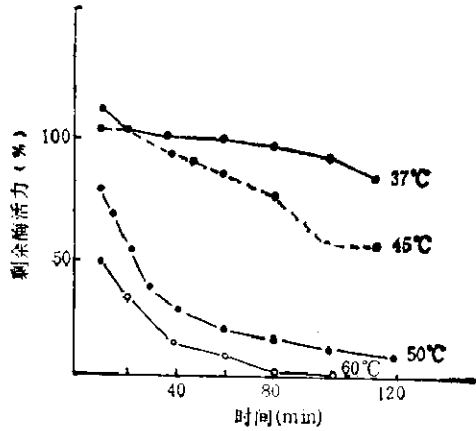


图 2 固定化酶热稳定性比较

从图 2 可知 AS 1.398 固定化酶在 37 °C 下比较稳定,处理 120 分钟酶活性仍然很高,超过 45 °C 稳定性下降。60 °C 处理 80 分钟几乎全部失活,但与自然酶相比稳定性提高 20%,37 °C,120 分钟处理固定化酶剩余 80% 活力,而自然酶为 60%。45 °C,120 分钟处理,固定化酶剩余 60% 活力,而自然酶为 40%。

3. pH 对酶活性的影响:

取一定量的自然酶与固定化酶各 7 份,用不同 pH 缓冲液配制,并用不同 pH 配制的 0.5% 酪蛋白为底物,在 37 °C 测活力,结果表明,自然酶和固定化酶的最适反应 pH 都是 7—7.5。

4. pH 对酶稳定性的影响: 用各种不同 pH 缓冲液配制的酶液及固定化酶,在 37 °C 水浴中处理 60 分钟,然后用常规法测这二种酶的剩余活力,结果表明,固定化酶和自然酶在 pH 6—8 之间比较稳定。

在我们实验的条件下,发现用海藻酸钠固定化酶受 pH 影响很大,在 pH 7.0 以上时,漏酶现象比较严重,pH 8.0 时,37 °C,0.5 小时,固定化球体就有解体现象。而且在固定化过程中形成的网眼较大,这是造成漏酶的主要原因。因此我们发现在 pH 高时,宜在溶液中加入 0.1 mol/L CaCl_2 可以防止球形的解体及漏酶

现象。原因是海藻酸钙在强电解质 (K, Na) 溶液中, Ca^{2+} 容易脱落, 造成解体, 在溶液中有一定浓度 Ca^{2+} , 就可以防止这种现象的发生。

很多研究者认为海藻酸钠只能用来包埋细胞, 不宜包埋自然酶。在我们的实验中 (表 2) 海藻酸钠包埋 1.398 中性蛋白酶效果较好, 包埋率达 98% 以上, 但表现活力较低。据分析与大分子底物有关, 底物分子量大 (用酪蛋白) 使包埋在球内的酶无法接触, 因此在一定时间内表现活力受到限制。有关这一问题有待于今后

进一步证实。

参 考 文 献

1. 邱秀宝等: 微生物学报, 22(2): 169-174, 1982。
2. 严复等: 生物工程学报, 1(1): 81, 1985。
3. 申炳华: 北京师范大学学报, 1: 67-71, 1986。
4. 袁中一等: 固相酶与亲和层析, 北京科学出版社, 1975。
5. 千畑一郎著, 胡保华等译: 固定化酵素, 河北人民出版社, 石家庄, 1981。
6. 清水祥一小林孟, 奥田润杉本悦郎: 酶分析法的原理和应用, 上海科学技术文献出版社, 1982。