

# 壳聚糖固定化 AS1.398 中性蛋白酶稳定性的研究

郭敏亮 姜涌明 马中良<sup>①</sup>

(扬州大学农学院基础部酶工程实验室, 扬州 225009)

**摘要** 对以壳聚糖为载体, 由戊二醛作交联剂, 制备的固定化 AS1.398 中性蛋白酶的稳定性进行了研究。实验结果表明, 固定化 AS1.398 中性蛋白酶对热、乙醇、尿素以及 pH 值的稳定性均有明显的提高。

**关键词** 枯草杆菌, 蛋白酶, 壳聚糖, 酶固定化, 酶稳定性

在酶的工业应用中, 由于固定化酶与游离酶相比具有许多优点, 因此固定化酶的研究已经引起了人们的极大兴趣。而对某些蛋白酶进行固定化, 除具备一般固定化酶所具有的优点之外, 它还能在一定程度上防止蛋白酶的自水解<sup>[1]</sup>。AS1.398 中性蛋白酶是一种来源于枯草杆菌的胞外蛋白水解酶。该酶已经广泛地应用于皮革脱毛、软化、畜血蛋白质水解、果酒、啤酒和饮料的澄清以及医药工业等<sup>[2]</sup>。对该酶进行固定化研究, 必将为提高该酶的利用效率, 扩大该酶在工业上的应用范围, 起着重要作用。

我们利用隋德新等人<sup>[3]</sup>所提出的 AS1.398 中性蛋白酶的固定化方法, 即采用壳聚糖吸附和戊二醛交联的方法, 对 AS1.398 中性蛋白酶进行了固定化处理, 并对固定化 AS1.398 中性蛋白酶的稳定性做了深入的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

AS1.398 中性蛋白酶: 无锡酶制剂厂产品, 活性为 50000u/g, 最适 pH7.5, 最适温度 40℃<sup>[2]</sup>。

戊二醛: E.Meark 公司进口, 上海试剂厂分装, 浓度为 25%。

壳聚糖: 从虾壳中自制, 1%醋酸全溶。  
其它试剂均为分析试剂或生化试剂。

### 1.2 方法

蛋白酶浓度测定: 采用 Lowry 法<sup>[4]</sup>。

酶活力测定方法<sup>[5]</sup>: 取适量自由酶液或固

定化酶, 加入 2%酪蛋白底物, 在 pH7.5 的缓冲溶液中, 40℃ 反应 10min, 用三氯乙酸中止反应, 过滤, 取滤液, 加入福林-酚试剂, 显色, 在波长 660nm 处测定光密度值。

固定化方法: 按文献<sup>[3]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化 AS1.398 中性蛋白酶的热稳定性

取一定量的自由酶溶液或固定化酶, 加入适量的 pH7.5 的磷酸缓冲液, 分别于 45℃ 和 50℃ 保温不同时间, 然后测定酶活力。

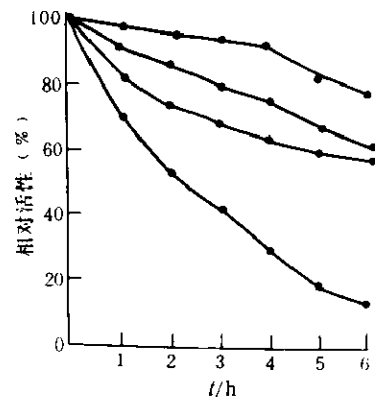


图1 固定化 AS1.398 中性蛋白酶的热稳定性

图中线条自上至下: 1. 固定化酶 45℃ 保温, 2. 游离酶 45℃ 保温, 3. 固定化酶 50℃ 保温, 4. 游离酶 50℃ 保温

从图 1 看出, 不管用 45℃, 还是 50℃ 处理, 固定化酶的热稳定性, 与游离酶相比, 有明显的

<sup>①</sup> 卫检专业 94 届毕业生倪琳、蔡靖参加部分工作  
1995-01-03 收稿

提高。在 50℃ 下处理 6h 后,效果更为明显,游离酶的活性仅剩 10% 左右;而固定化酶的活性还保持在 60% 以上。

### 2.2 固定化 ASI.398 中性蛋白酶对乙醇的稳定性

在 45℃ 和 pH7.5 的条件下,用不同终浓度的乙醇分别对固定化和游离的 ASI.398 中性蛋白酶处理 1h,然后测定酶活力。

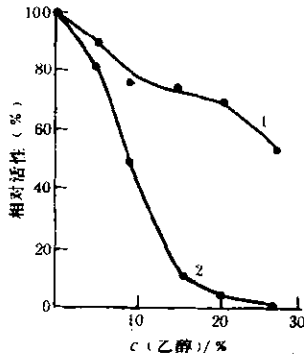


图 2 固定化 ASI.398 中性蛋白酶的乙醇稳定性  
1. 固定化酶, 2. 游离酶

图 2 表明,游离酶在浓度为 21% 的乙醇中,活性几乎全部丧失,而固定化酶在所有相应的乙醇浓度中,都保持较高的活性。因此,壳聚糖固定化中性蛋白酶对乙醇的稳定性有明显的提高。从这一实验结果可以看出,如果用 ASI.398 中性蛋白酶来澄清果酒或啤酒,必须

使用固定化酶,因为游离酶在一般的果酒酒精度数下就已经基本失活了。

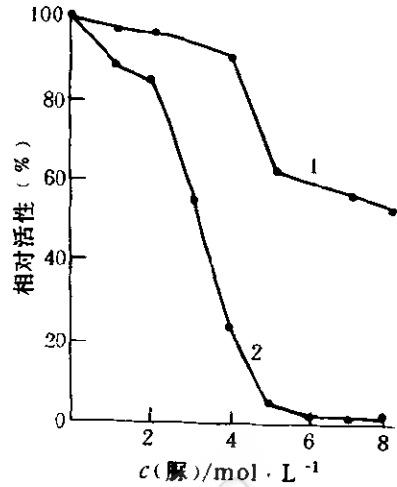


图 3 固定化 ASI.398 中性蛋白酶对脲的稳定性  
1. 固定化酶 2. 游离酶

### 2.3 固定化 ASI.398 中性蛋白酶对脲的稳定性

在 45℃ 和 pH7.5 条件下,用不同浓度的尿素分别处理固定化酶和游离酶 1h,测定酶活性。从图 3 看出:游离酶在 5mol/L 尿素溶液中,活性几乎全部丧失,而固定化酶的活性仍保持 60% 以上。由此可见,固定化 ASI.398 中性蛋白酶对尿素的稳定性有显著的提高。

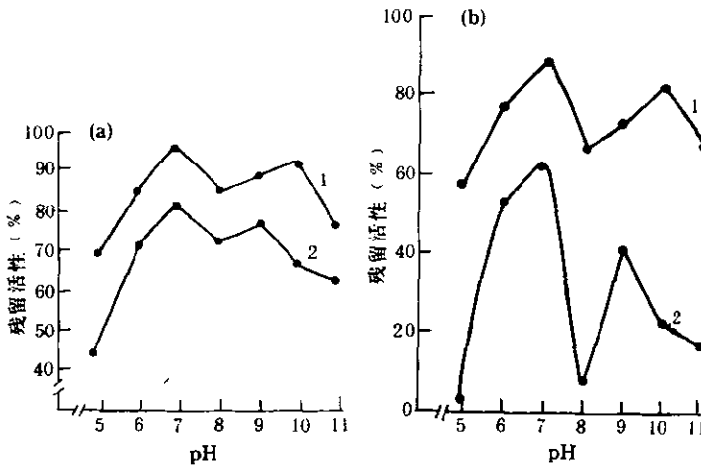


图 4 固定化 ASI.398 中性蛋白酶的 pH 稳定性  
(a) 40℃ 保温 5h (b) 40℃ 保温 24h  
1. 固定化酶 2. 游离酶

## 2.4 固定化 AS1.398 中性蛋白酶的 pH 稳定性

采用广泛的 pH 缓冲液(即由柠檬酸、磷酸二氢钾和巴比妥组成的混合缓冲液)进行 pH 稳定性试验。

取适量的自由酶溶液和固定化酶分别加入不同 pH 值(pH = 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11)的缓冲液,在 40℃ 分别处理 5h 和 24h,测定酶活力。从图 4(a, b)看出,在试验的任何 pH 条件下,固定化酶的稳定性都比游离酶高。尤其在游离酶极不稳定的 pH(5, 8, 11)缓冲液中,固定化酶可保持较高的活性。图 4(b)结果显示,游离酶在 pH8 的缓冲液中 40℃ 放置 24h,活性保持不到 10%,而固定化酶仍能保持 60% 以上的活性。

从图 4 中还可看出,不论是游离酶还是固定化酶,其 pH 稳定曲线都表现出两个峰,在

pH8 出现低谷。游离酶在此条件下的最稳定 pH 为 7.0。如处理时间短,在 pH9 时也能保持较高活性。在处理时间延长的情况下,该酶却表现出在 pH6 的稳定性比 pH9 强。而在 pH8 时,随着处理时间的延长酶活性急剧下降。在 pH8 时,游离酶活性急剧下降的原因,有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Wilson S A, Peek K, Daniel R M. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 43: 225~231.
- [2] 张树政. 酶制剂工业. 科学出版社, 1984, 430.
- [3] 隋德新, 姜涌明, 赵国骏, 等. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(4): 311~313.
- [4] Lowry O M, Rosebrough J, Farr A L, *et al.* *J Biol Chem*, 1951, 193: 265~275.
- [5] 朱 俭, 曹凯鸣, 周润琦, 等编著. 生物化学实验. 上海: 上海科技出版社, 1981, 186.

## STUDY ON THE STABILITY OF CHITOSAN-IMMOBILIZED AS1.398 NEUTRAL PROTEINASE

Guo Minliang Jiang Yongming Ma Zhongliang

(Basic Science Division, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

**Abstract** A neutral proteinase from *Bacillus subtilis* AS1.398 was immobilized to chitosan with glutaric dialdehyde as cross linking agent. The stabilities of the free and chitosan-immobilized enzyme to temperature, alcohol, urea and pH were compared. The immobilized enzyme remained more than 60% of its primal activity after incubated for 6h at 50℃ and pH7.5, compared with the free enzyme which remained 10% under the same conditions. When the immobilized enzyme was incubated in 15% ethyl alcohol for 1h at 45℃ and pH7.5, its activity remained more than 75% of its control, whereas the free enzyme remained less than 10% under the same conditions. The pH stability of the free and immobilized enzymes was compared at 40℃ over the range pH 5~11, stored for 5 and 24h. The results showed, in all cases, the immobilized proteinase had greater stability than that of the free proteinase.

**Key words** *Bacillus subtilis*, proteinase, chitosan, enzyme immobilization, enzyme stability