

# 黄原胶对蛋白酶耐热性的作用

刘稼骏      赵光鳌      霍兴云      程 鹏

(无锡轻工大学生物工程学院,无锡,214036) (无锡酶制剂厂,无锡,214035)

**摘要** 黄原胶对1.398中性蛋白酶的热稳定性有一定的保护作用,使含0.4%黄原胶的酶液在55℃处理20min后残留酶活达50%以上,而对照酶则几乎完全失活。

**关键词** 多糖;黄原胶;1.398中性蛋白酶;热稳定性;稳定剂

中图分类号 TS201.25

## 0 前言

黄原胶 (Xanthan Gum)简称 XG,是近年来微生物多糖工业中产量较大的一种。由于它的特殊性能,使得它在食品工业、医药工业、石化工业和其它工业上具有很大的应用潜力,作者初步研究了黄原胶对中性蛋白酶的耐热作用,为黄原胶的应用探索一条新路子。

## 1 实验材料

### 1.1 实验用酶

选用中性蛋白酶(来源于 1.39 $\mu$ g 枯草杆菌),其理由是:1)该酶是微生物蛋白酶中最不稳定的酶之一,较易失活;2)该酶热稳定性差,pH7-60 $^{\circ}$ C处理 15min,失活 90%;3)酶产量有一定的规模,来源充足;4)对该酶已有一定程度的研究,酶活测定重复性好,稳定性高。

|                  |                |
|------------------|----------------|
| 具体为: 中性蛋白酶粉(工业级) | 酶活 40000u /g   |
|                  | 比酶活 120u /mg蛋白 |
| 中性蛋白酶粉(食品级)      | 酶活 55000u /g   |
|                  | 比酶活 260u /mg蛋白 |

以上均为无锡酶制剂厂产品

蛋白酶I 取食品级酶粉 40g,加 0.02mol/L pH6.5 的磷酸盐缓冲液 100ml,搅拌浸泡 4h,在低温下用滤纸过滤,可得 45ml 酶液,加入 1% 苯甲酸钠,使用时按实验需要稀释 (2d 内使用)

收稿日期: 1996-08-26

第一作者: 刘稼骏, 男, 1966年6月出生, 工学硕士

蛋白酶II 取工业级酶粉 20g,加 0. 02mol/L pH6. 5 的磷酸盐缓冲液 100ml,搅拌浸泡 4h,再经 Sephadex G-25 脱盐后用 BS-100 部分收集仪收集前段蛋白峰,稀释后立即实验。

1. 2 黄原胶

工业用黄原胶 美国 Keleo 公司出品

食品级黄原胶 美国 Keleo 公司出品

2 黄原胶对酶热稳定性的作用

2. 1 不同温度下黄原胶的作用

1. 398 中性蛋白酶热稳定性差,将蛋白酶 I 用 0. 01mol/L pH7. 5 的磷酸盐缓冲液稀释至 30u/ml 左右,分别在 30℃, 35℃, 40℃, 50℃ 保温 20min 测得残留酶活,对等条件下,加入 0. 1% 黄原胶测得残留酶活,结果见图 1。

2. 2 黄原胶含量与酶热稳定的关系

分别将黄原胶质量浓度为 0. 05g/100ml, 0. 1g/100ml, 0. 2g/100ml, 0. 4g/100ml 的酶液(酶活约 30u/ml)

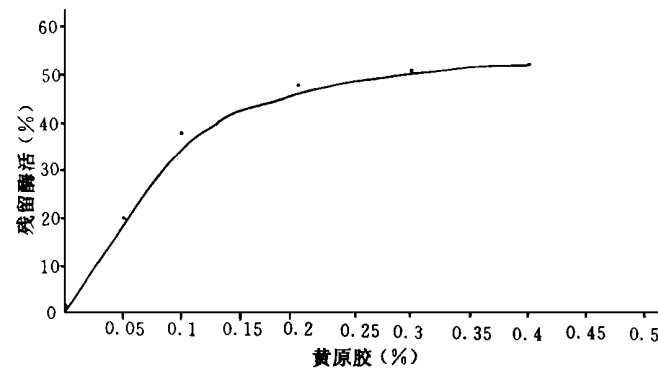


图 2 黄原胶对酶热稳定作用

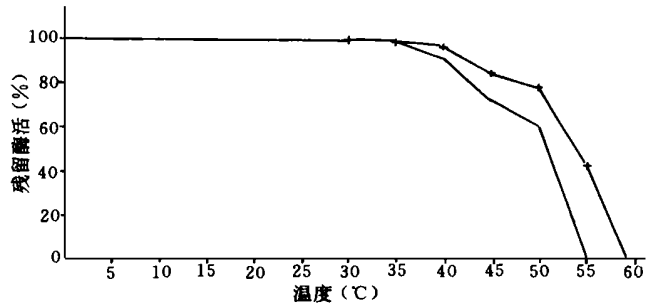


图 1 酶热稳定性关系

— 对照 —+— 1% XG

在 55℃ 保温 20min,测得残留酶活,结果见图 2。

据实验结果,黄原胶对酶热稳定的作用随其量的增加而增大,并且残留酶活增至 53% 左右时上升趋势接近平衡,推断是由于黄原胶对部分酶起热稳定作用的缘故。

实验也表明添加 0. 4% 以上黄原胶在 55℃ 处理 20min 可使残留酶活在 50% 以上,而不添加黄原胶的对照组则几乎完全失活

3 热稳定性的分析

3. 1 热稳定性实验

1. 398 中性蛋白酶是一种金属酶(含有锌),而钙离子对维持该酶分子的构象起着重要作用,即钙离子对中性蛋白酶热稳定有一定的保护作用。由于多糖产品不同程度地含有一些金属离子如  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  等,这些金属离子是否对酶起稳定作用?通过超滤分析,利用蛋白酶相对分子质量(3. 5~4 万)与多糖相对分子质量(10 万以上)的差异,采用平板型超滤膜(截面分子量 20 万)对酶与一些小分子物质(包括一些游离的金属离子)进行热稳定实验对比。

实验程序如下:

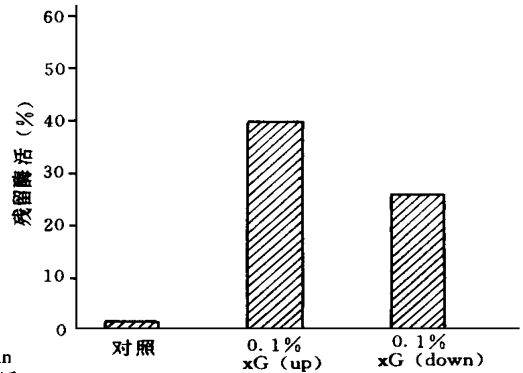
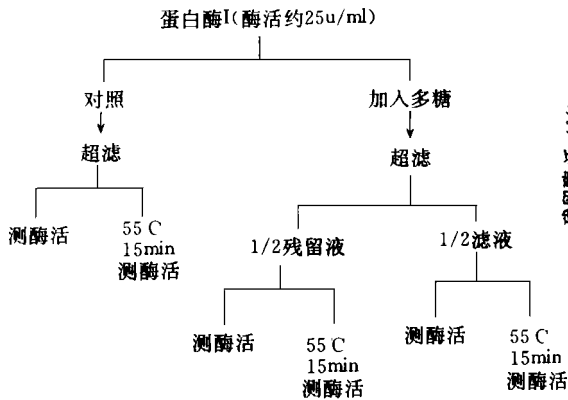


图3 多糖热稳定性比较实验

实验结果见图3.

通过超滤之后,黄原胶的稳定性作用略为下降.推断滤液中还剩下一些酶分子与金属离子,因为实验中还观察到过滤后的黄原胶滤液仍具有一定的浊度与粘度,这表明有许多相对分子质量较小的黄原胶与金属离子穿过滤膜,使滤液还有一定的抗性.由此推论,中性蛋白酶液中,黄原胶主要以其高分子胶体性质对酶起热稳定作用.

### 3.2 热分析

从蛋白质角度看,生物分子是热敏分子,其功能取决于其分子结构的完整和严格的构象,功能效率的高低很大程度上受表面几何构象变化的影响,生物大分子的构型和表面构象对热有较高的敏感性,一般 60~ 70°C 呈现可逆性失活,70~ 80°C 出现不可逆变性.

示差扫描量热法(DSC)通过蛋白质受热过程中,由于蛋白质吸热,蛋白质主体构象不能维持,氢键大量破坏,蛋白质的 $\alpha$ 螺旋体无规则地散开,有序分子结构变成无序, $\Delta H$ 上升,在图谱中这些吸热过程变化呈现为吸收峰.

将浓缩至原来 1/10 左右的蛋白酶 I 和含 0.2% 黄原胶的蛋白酶分别进行 DSC 测试,得图 4 和图 5.

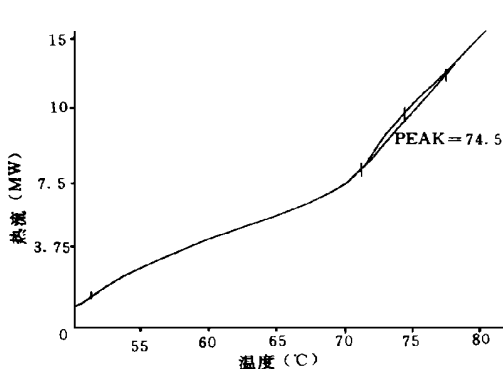


图4 热分析谱图(对照)

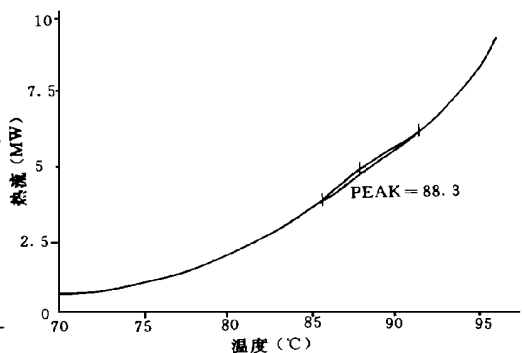


图5 热分析谱图

实验结果表明,酶中蛋白质热变温度为  $71 \sim 77^{\circ}\text{C}$ ,而加入黄原胶之后蛋白质变性温度提高到  $85 \sim 90^{\circ}\text{C}$ .

图 6 为黄原胶扫描电镜图,图 7 为黄原胶与中性蛋白酶的扫描电镜图。

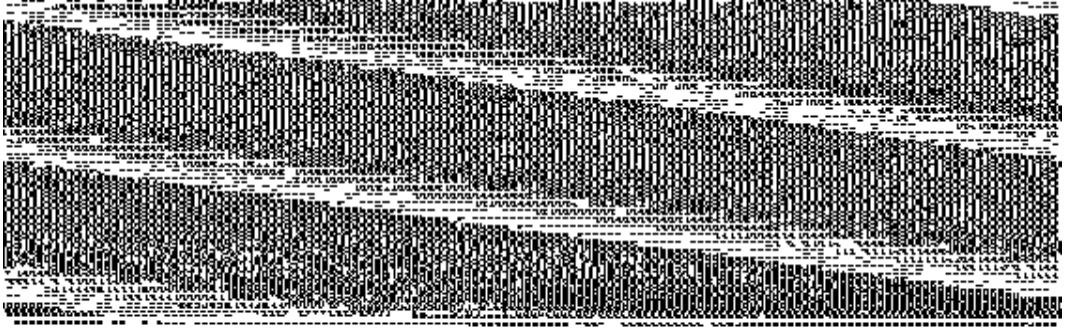


图 6 黄原胶扫描电镜图

图 7 黄原胶与中性蛋白酶扫描电镜图

# Effect Of Xanthan Gum on Enzyem Thermostability

Liu Jiajun Zhao Guangao

( School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Hua Xinyum Chen Peng

(Wuxi Enzymology Factory, Wuxi, 214035)

**Abstract** The thermostability of neutral bacterial protease in the presence of xanthan was investigated. Experimental result shous that xanthan was capable of protecting the pro-tease against thermal denaturation. The residual activity of the protease solutions contain-ing 0.4 wt% xanthan was found to be up to 50% apher being incubated for 20 min at  $55^{\circ}\text{C}$ , whearas, that of the systems without xanthan was mostly lost.

**Key-words** polysaccharide; xanthan gum; 1.398 neutral proteases; heat stability; stabi-lizer

(责任编辑: 秦和平)