

# 羽毛角蛋白酶摇瓶发酵及其生化特性的研究

★ 王岳峰 (西南交通大学药学院 峨眉山 614202)

★ 余荣台 汪涛 (江西农业大学生物工程系 南昌 330045)

**摘要:**目的:使羽毛角蛋白产生角蛋白酶,并测定其在最适条件下的酶活力。方法:采用弗氏链霉菌 *Streptomyces fradiae* val. s-221 Tu 摇瓶发酵产生角蛋白酶和 Folin 试剂法测定酶活力。结果:弗氏链霉菌 S-221 变种中能够分解羽毛中的角蛋白产生角蛋白酶,酶活力为 254.24 U,且在 pH 9.5~9.0 之间活力最强。结论:羽毛中的角蛋白可以通过微生物的深层发酵培养产生活性较强的角蛋白酶。

**关键词:**羽毛角蛋白酶;摇瓶发酵;生化特性

**中图分类号:**R 512+.6 **文献标识码:**A

本研究主要是利用弗氏链霉菌 S-221 变种摇瓶发酵的生物技术手段,分解羽毛角蛋白产生角蛋白酶,并测定其最适条件下的酶活力。据报道,角蛋白酶不仅能分解蛋白,而且能用于皮革生产中的脱毛和外科手术后的伤口结痂,是一种良好的生化制剂的原料。

## 1 实验材料

1.1 材料与试剂 羽毛,江西共青垦殖场采集;酪蛋白、酪氨酸,上海生化试剂厂生产;Folin 试剂,自配。

1.2 菌株 弗氏链霉菌 S-221 变种,江西农业大学生物工程系研究室提供。

1.3 培养基 茄子瓶种子培养基,高氏 1 号培养基。

发酵培养基:羽毛粉 2.0%,糖蜜 1.0%,蛋白胨 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.1%,  $MgSO_4$  0.025%,  $MnSO_4$  0.000 1%,  $ZnSO_4$  0.000 1%,自来水 200 mL, pH 8.5。

1.4 仪器 岛津 120 型紫外可见分光光度计。

## 2 实验方法

### 2.1 角蛋白酶摇瓶发酵实验

将弗氏链霉菌 S-221 变种接入茄子瓶种子培养基中,放入 31.9℃ 生化培养箱,培养 120 h (其中培养 24 小时后,倒置茄子瓶培养 96 小时)。然后将其孢子洗入 1 支试管,加入一定量的无菌水,混匀,平均接入 10 个分装有 200 mL 发酵培养基的 1 000 mL 培养瓶中,于 32.5~38.5℃, 180 r/min 摇瓶培养 120 小时。发酵液合并过滤,取滤液于 4℃ 冰箱保存。

### 2.2 发酵液中角蛋白酶活力的测定

2.2.1 角蛋白酶活力的定义 以每 1 mL 发酵液在 pH 8.5、温度 40℃、150 r/min 的条件下水解酪蛋白,每分钟生产酪氨酸的微克数为 1 个酶活力单位 (U),即 U 的单位为  $\mu g \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1}$ 。

2.2.2 酪氨酸标准曲线的配制 精密称取 100 mg 酪氨酸溶液置 100 mL 容量瓶中,加水溶解溶置刻度,摇匀。分别吸取 0、1、2、3、4、5 mL 酪氨酸溶液置 50 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,使之成为每 1 mL 溶液含酪氨酸的量分别为 0、20、40、60、80、100  $\mu g$ 。在各瓶溶样中分别准确吸取 1 mL 加入试管中,再分别加入 0.4 mol/L  $Na_2CO_3$  溶液 5 mL 和 Folin 试剂工作液 1 mL,充分摇匀,于 40℃ 水浴锅上保温发色 20 分钟<sup>[1]</sup>。冷却后于岛津 120 紫外可见分光光度计 680 nm 处比色,测定吸光度 (A)。

2.2.3 角蛋白酶活力的测定 先将发酵液和 1% 的酪蛋白溶液 (pH 8.5) 分别在水浴上预热 5 分钟,然后准确吸取 1 mL 酪蛋白溶液加入到 1 mL 的发酵液中,在 40℃、150 r/min 的条件下酶解 10 分钟,再加入 2 mL 三氯乙酸溶液终止反应,继续水浴 15 分钟,过滤。滤液稀释 40 倍按标准曲线配制以下的方法,测定吸光度 (A),并换算成酶活力。

2.3 不同 pH 值培养条件下发酵液中角蛋白酶活力的测定 将发酵培养基分别配成 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10 等 9 种,按角蛋白酶摇瓶发酵实验项下的方法分别进行摇瓶发酵培养。过滤后的发酵液,再按角蛋白酶活力测定项下的方法分别测定吸光度 (A),并换算成酶活力。

## 3 实验结果

3.1 在 pH 8.5 的培养条件下发酵液中角蛋白酶的

# 阿司匹林肠溶片工艺改进研究

★ 全红 (辽宁省锦州九泰药业有限责任公司 锦州 121002)

**摘要:**目的:提高阿司匹林肠溶片释放度。方法:重新拟订制备工艺,改糖衣片为薄膜衣片,增高隔离层,应用正交试验设计进行肠溶层配方筛选。结果:确定的处方工艺生产的阿司匹林肠溶片释放度及其它各项质量指标均符合《中国药典》2000 版规定。结论:改进后的处方工艺操作简便,生产周期短,生产的阿司匹林肠溶片具良好释放度,增强了阿司匹林的临床疗效。

**关键词:**阿司匹林肠溶片;释放度;隔离层;肠溶层

中图分类号:R 944.4 文献标识码:A

阿司匹林(Aspirin),又名乙酰水杨酸(Acetylsalicylic acid),由于其酸性较强,对胃粘膜有很强的刺激作用,可产生一系列胃肠道不良反应。因此,单方制剂多制成肠剂型供口服。由于诸如肠溶材料、生产技术等多种因素的制约,目前国产阿司匹林肠溶片普遍存在释放度不好的问题。为解决阿司匹林肠溶片释放度问题,我们进行了一系列研究工作。

## 1 仪器与试药

TU-1800SPC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);ZRS-8G 智能溶出试验仪

(天津大学无线电厂)。

羟丙基甲纤维素(中港合作肥城瑞泰精细化工有限公司);丙烯酸树脂 II 号、III 号(江苏省连云港元升实业股份有限公司);邻苯二甲酸二乙酯(沈阳试剂三厂);阿司匹林(山东新华制药股份有限公司);聚乙二醇 400(大连龙华精细化工厂);蓖麻油(沈阳试剂三厂)。

## 2 隔离层的设计

阿司匹林是一种具有较强酸性的有机化合物,穿透性较强,长时间与肠溶层接触能使其耐酸能力

活力测定结果 测定结果见表 1。

表 1 酪氨酸标准溶液与发酵液吸光度(A)的测定结果

| 标样号                                         | 0 | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 发酵液   |
|---------------------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 酪氨酸浓度<br>/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 0 | 20    | 40    | 60    | 80    | 100   | /     |
| 吸光度                                         | 0 | 0.211 | 0.427 | 0.622 | 0.819 | 1.043 | 0.661 |

标准曲线方程为:  $Y = 0.010\ 28x + 0.007\ 6$ , 相关系数为:  $r = 0.999\ 7$ , 根据稀释后发酵液的吸光度(A)计算可得, 发酵液中酪氨酸浓度为  $63.56(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}) = 63.56 \times 40(\text{稀释倍数}) \times 1/10(\text{酶解的时间}) = 254.24$ 。

3.2 不同 pH 培养条件下发酵中角蛋白酶活力的测定结果 见表 2。

表 2 不同 pH 的培养条件下发酵液中角蛋白酶活力的测定结果

| pH    | 6.0   | 6.5   | 7.0   | 7.5   | 8.0    | 8.5    | 9.0    | 9.5    | 10.0   |
|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 酶活力/U | 10.64 | 15.72 | 20.06 | 51.42 | 200.36 | 254.24 | 250.28 | 135.60 | 100.72 |

## 4 讨论

弗氏链霉菌 S-221 变种作用于羽毛粉角蛋白, 诱导产生胞外角蛋白酶, 使角蛋白逐渐水解为多肽、

寡肽和游离氨基酸。蛋白质中的酪氨酸(残基)在碱性环境中能够与铜盐形成复合物, 而这种复合物与 Folin 试剂起反应形成蓝色溶液, 由于它在 650 nm 处有最大吸收, 故采用比色法<sup>[2]</sup>, 根据吸光度(A)的大小确定其酶活力。结合不同 pH 培养条件下发酵液中角蛋白酶活力测定的结果, 足可以证明角蛋白分解后的酪氨酸(残基)在偏碱性环境中(pH=8.5~9.0)能够与铜盐最大限度的形成复合物, 从而与 Folin 试剂形成蓝色较深的溶液, 吸光度(A)最大, 酶活力最强。

从发酵液(pH8.5)中酶活力的测定结果来看, 利用弗氏链霉菌 S-221 变种分解羽毛角蛋白产生角蛋白酶是一种较好的生物技术方法, 它具有耗能小、没有污染、成本低的优点, 为充分利用羽毛这一丰富的自然资源提供了现代的科学技术手段。

## 参考文献

- [1] 周德庆. 微生物实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 351
- [2] 吴显荣. 基础生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993. 573

(收稿日期: 2004-02-26)