

# 药用枯草杆菌蛋白酶的制备

崔福绵 程秀兰 任永斌 徐大雅 李万年 邱秀宝 李禄先

(中国科学院微生物研究所, 北京)

经过纯化的微生物蛋白酶可作为医药用品<sup>[1,2]</sup>。为了安全,国内外都严格限制生产医药用酶的微生物,但枯草杆菌被认为是安全的<sup>[3]</sup>。本文报道用丙酮作沉淀剂制备口服药用枯草杆菌蛋白酶的研究结果。

## 材料和方法

1. 原料: 江苏无锡市酶制剂厂用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)AS 1.398 生产的工业用蛋白酶制剂(粗酶粉)。每克制剂含蛋白质 0.190 克,硫酸铵 0.350 克,蛋白酶活力 75000 单位。

2. 酶的提纯: 在 10℃ 下操作。① 酶的抽提: 0.2 克粗酶粉与 2 毫升抽提剂(含 0.1% NaOH, 4% CaCl<sub>2</sub> 和 25% 丙酮)在离心管内相混,管口加橡皮塞抽提 30 分钟(隔 5 分钟混合一次)。4000 转/分离心 15 分钟,上清液用于沉淀酶。② 酶的沉淀: 取 1 毫升酶抽提液于离心管中,伴随摇动滴加 1.50 毫升丙酮(混合物中丙酮浓度达 70%),管口加橡皮塞静置 30 分钟,4000 转/分离心 10 分钟,去上清液。③ 除

铵盐: 按①和②步骤所得酶沉淀混合物于布氏漏斗上抽滤,滤饼用 70% 丙酮洗涤至无铵盐(洗涤液滴于滤纸上,除去丙酮后用 Nessler<sup>[4]</sup>试剂检验)。洗涤过的酶沉淀用蒸馏水(按 1 克粗酶粉到 1 毫升酶液的比例)溶解,4000 转/分离心 15 分钟,去不溶物,清液真空冷冻干燥成粉。

3. 蛋白质含量测定: 参照 Folin-Ciocalteu 酚<sup>[5]</sup>试剂法测定。以牛血清白蛋白为标准计算蛋白质含量。

4. 蛋白酶活力分析: 参照 Phenolcolor 法<sup>[5,6]</sup>分析。酶在 37℃, pH 7.2 下水解酪蛋白 10 分钟,每分钟释放出 1 微克的酪氨酸定为一个蛋白酶活力单位。比活力以每毫克蛋白质含酶活力单位数表示。

5. 铵盐含量测定: 按照 Nessler 反应原理<sup>[4]</sup>用比色法测定。

## 结果和讨论

### 一、酶的抽提

1. 抽提剂的选择: 用 7 种抽提剂进行酶的

表 1 不同抽提剂的试验结果

抽提剂组成*	抽 提 酶 液			提 纯 酶 粉			
	蛋白质 (毫克/ 毫升)	酶 活 力		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 含 量 (%)	NH <sub>4</sub> Cl 含 量 (%)	蛋白质含量 (%)	酶活力 (单位/克)
		单位 (单位/毫升)	收率(%)				
蒸 馏 水	5.70	6000	68.0	14.9	0	55.0	1020000
0.1%NaOH	6.60	6990	79.2	14.5	0	54.8	1020000
0.1%NaOH + 4%CaCl <sub>2</sub>	6.60	6990	76.4	0	0	55.0	1050000
0.1%NaOH + 25% 丙酮	6.80	6880	78.0	14.2	0	56.0	1020000
0.1%NaOH + 4%CaCl <sub>2</sub> + 25% 丙酮	6.80	6880	75.2	0	0	64.5	1200000
0.02 M pH 7.0 磷酸缓冲液	6.60	6990	79.2	14.4	0	56.7	1040000
0.1%NaOH + 4%CaCl <sub>2</sub> + 25% 丙酮**	6.80	6880	75.2	0	0	64.5	1200000

\* 除注明外,均用蒸馏水配制。

\*\* 自来水配制。

抽提和沉淀试验,结果见表 1。

表 1 表明,含氢氧化钠、氯化钙和丙酮的抽提剂效果最好。考虑到试验的稳定性和代表性,选用蒸馏水配制的含 0.1% NaOH, 4% CaCl<sub>2</sub> 和 25% 丙酮的混合液作为抽提剂。

2. pH 对抽提效果的影响: 用盐酸或氢氧化钠改变抽提剂的 pH, 抽提效果见图 1。

图 1 表明,抽提酶的最适 pH 范围为 6.0—7.0。

3. 温度对抽提效果的影响: 分别于 5、10、20、30、40 和 50℃ 下进行抽提 30 分钟的试验, 结果见图 2。

图 2 说明,在 30℃ 以下抽提, 都能得到满意的结果。

4. 不同抽提时间的效果: 结果见图 3。

图 3 表明,抽提 30 分钟, 便可达到最好抽

提效果。延长抽提时间, 10℃ 时酶活力不损失, 20℃ 时抽提 24 小时后酶活力开始下降。说明

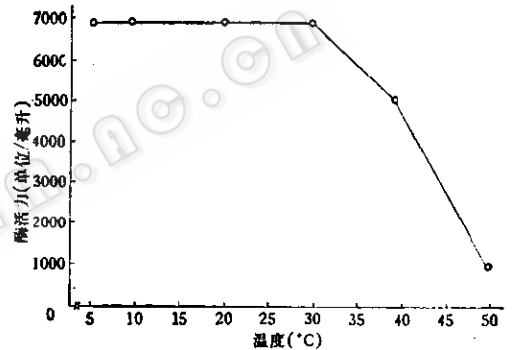


图 2 温度对抽提效果的影响

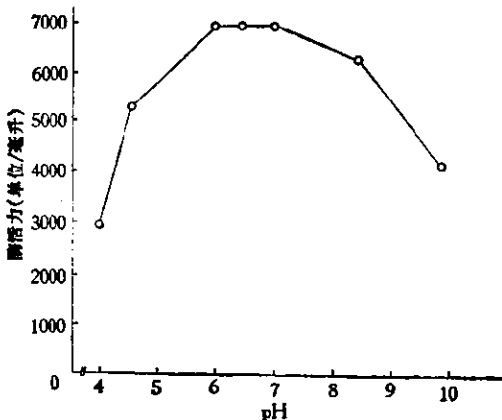


图 1 pH 对抽提效果的影响

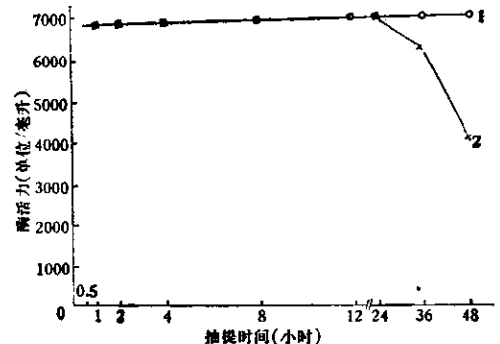


图 3 不同时间的抽提效果

1. 10℃ 下酶活力曲线; 2. 20℃ 下酶活力曲线。

抽提应当在低温下, 尽可能短的时间内完成, 然后立即沉淀酶。

## 二、酶的沉淀

1. 不同丙酮量对酶沉淀效果的影响: 结果见表 2。

表 2 不同丙酮量对沉淀效果的影响

丙酮添加量 (毫升/毫升抽提酶液)	酶 活 力	
	活力回收*	比活力 (单位/毫克蛋白)
1.00	4280	2270
1.25	5680	2100
1.50	5920	1860
1.75	5920	1850
2.00	5920	1850

\* 由 1 毫升抽提酶液得到的酶活力单位数。

表 2 说明, 每毫升酶液中加入 1.5 毫升丙酮可充分沉淀蛋白酶。如再增加丙酮用量, 不仅不会提高酶活的收率, 还会由于沉淀出其它混杂的蛋白质而使酶的比活力降低。

2. pH 对酶沉淀效果的影响: 将抽提酶液以 1 NNaOH 和 1 N HCl 调至不同的 pH 值, 分别进行沉淀试验。结果见图 4。

图 4 表明, 沉淀酶的最适 pH 范围为 5.5—7.0。所以选用自然 pH(6.4) 的抽提酶液进行酶的沉淀是合适的。

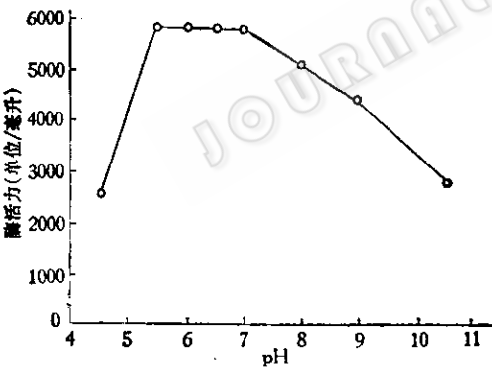


图 4 不同 pH 对沉淀效果的影响

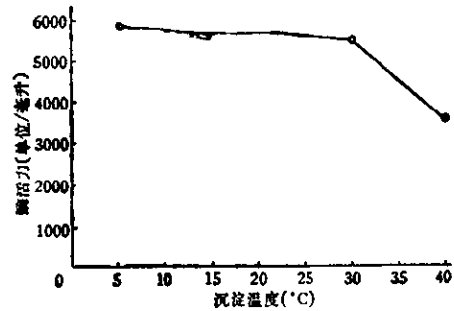


图 5 温度对酶沉淀效果的影响

3. 温度对酶沉淀效果的影响: 在不同温度下沉淀酶的试验结果见图 5。

图 5 说明, 丙酮溶液中的蛋白酶必须在较低的温度下 (15℃ 以下) 进行沉淀, 较高的温度会导致酶活力损失。

4. 时间对酶沉淀效果的影响: 在二种温度下进行酶沉淀的时间试验。结果见图 6。

图 6 表明, 酶沉淀 15 分钟就可达到完全的程度, 当酶在 20℃ 进行沉淀时, 4 小时后酶活力损失较多。

三、提纯各步骤酶的质量指数

取一定量粗酶粉, 用上述最优试验条件进

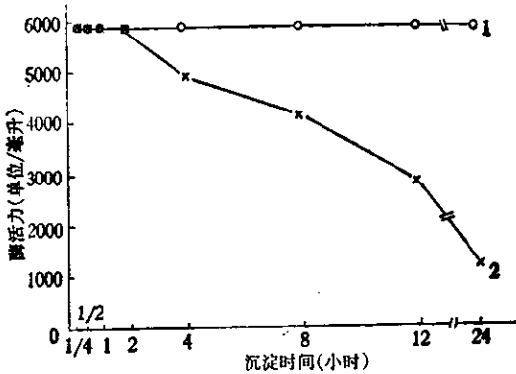


图 6 沉淀时间对酶沉淀效果的影响  
1.10℃ 下酶活性曲线; 2.20℃ 下酶活性曲线

表 3 提纯各步骤酶的质量指数

结 果 步 骤	项 目	酶 量 (克或毫升)	酶活力 (单位/克, 或 单位/毫升)	含蛋白量 (克/克或 克/毫升)	纯 度 (单位/毫克 蛋白)	酶活力收率 (%)	提纯倍数
	粗 酶 粉	10.00	75000	0.190	395	100	1
	抽 提 酶 液	83.5	6880	0.00680	1012	76.6	2.6
	提 纯 酶 液	9.8	50150	0.02696	1860	65.5	4.7
	提 纯 酶 粉	0.40	1200000	0.645	1860	64.0	4.7

行酶的提纯试验,结果见表 3。

表 3 说明,粗酶粉经部分提纯后,酶活力收率为 64.0%,纯度提高了近 4 倍。

在上述研究的基础上,我们和江苏省无锡市酶制剂厂共同进行了中型试验。所得提纯蛋白酶总活力收率近 50%。经初步核算成本,有实际应用价值。所以本方法被认为是一种可行的药用蛋白酶制备工艺。

经安徽省医学科学研究所组织临床应用表明,提纯的蛋白酶对气管炎有良好的疗效,可作为口服消炎药使用。

## 参 考 文 献

- [1] 小林春彦: 発酵工學雜誌, 48(8):513—518, 1970.
- [2] 宮田孝一: 武田研究所報, 31(3):375—428, 1972.
- [3] Keay, L.: *Process Biochemistry*, 6(8): 17—21, 1971.
- [4] Willard, H. H., L. L. Merritt and J. A. Dean: *Instrumental Methods of Analysis*, second ed. Vol. 9, Inc. Toronto-New York-London, 1955.
- [5] Layne, E.: *Methods in enzymology*, Vol. 3, Academic Press, Inc., Publishers New York, 1957. p. 447—450.
- [6] Greenberg, D. M.: *Methods in enzymology*, Vol. 2, Academic Press, Inc., Publisher New York, 1955, p 55.