

# 氮酮促进啤酒废酵母蛋白质释放的研究

韩 刚, 江洪涛, 张卫国  
(华北煤炭医学院药理学系, 河北 唐山 063000)

**摘 要:** 目的: 研究啤酒酵母菌的破壁技术。方法: 利用氮酮对生物膜类脂具有特异性溶解作用, 使酵母菌细胞内膜类脂流动性增强, 促进酵母菌体内蛋白质释放。结果: 发现氮酮除了可以作为药物的透皮吸收促进剂外, 还有促进酵母菌体内蛋白质释放的作用。结论: 氮酮可使啤酒酵母菌蛋白质释放率达湿重的 4%。

**关键词:** 氮酮; 啤酒酵母菌; 蛋白质

## Study on Using Azone to Enhance the Release of Protein in Beer Yeast Drey

HAN Gang, JIANG Hong-tao, ZHANG Wei-guo  
(Pharmaceutical Department, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

**Abstract:** Aim: The essay mainly studied the technique on fragmenting of beer yeast. Methods: Azone has shown solubilization specificity for membrane liposome and could cause protein release from beer yeast. Results: The azone could be not only a penetration enhancer but also promote protein released from beer yeast. Conclusion The release rate of protein is about 4%.

**Key words:** azone; beer yeast; protein

中图分类号 Q939

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)04-0127-02

中国啤酒产量 2002 年达到 2386.83 万 t, 居世界第一位。每生产 1t 啤酒可获得湿酵母菌约 24kg。对于啤酒生产过程中大量的废酵母菌, 通常用来做动物饲料, 附加值低。菌体内有价值的蛋白质、活性酶等没有得到充分利用。原因是没有一种比较合适的细胞破碎的方法。本实验通过加入少量破壁剂的方法使啤酒废酵母菌体内物质释放, 从而获得胞内产物。氮酮 Azone 是 70 年代开发的一种安全性很高的药物透皮吸收促进剂。一般认为, 氮酮作用于细胞间质双分子层, 对生物膜类脂有特异性的溶解作用<sup>[1]</sup>, 使药物容易透过皮肤。根据这一原理, 我们将氮酮应用到啤酒废酵母菌蛋白质释放的研究中。酵母菌细胞壁内膜上也有一层类脂<sup>[2]</sup>, 氮酮作用在酵母菌内膜上改变酵母菌壁的通透性促使蛋白质释放。实验结果表明氮酮使酵母菌蛋白质的释放率达到菌体湿重的 4%, 对于氮酮促进酵母菌体内蛋白质的释放的研究鲜见报道。

### 1 材料与仪器

牛血清白蛋白标准品 新疆化学所生化试剂厂; 啤酒废酵母菌悬浮液浓度约为  $10^8$  个细胞/ml 唐山市啤酒厂提供。氮酮 分析纯, 北京制药四厂, 表面活性剂

均为试剂级, 其余试剂均为分析纯。

TU—1800 紫外可见分光光度计 北京普析通用公司; 离心沉淀机 上海安亭科学仪器厂; FA1004 电子天平 上海精密科学仪器公司; PHS-3C 型精密 PH 计 上海雷磁仪器厂; JJ-1 增力电动搅拌器 常州国华仪器公司。

### 2 方法与结果

**2.1 标准蛋白质溶液** 精确称取干燥后的牛血清白蛋白 0.0201g, 于 25ml 容量瓶中定容, 即为 0.8g/L 牛血清白蛋白。

**2.2 微量双缩脲试剂** 称取 17.3g 柠檬酸三钠 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、100g 无水碳酸钠溶于温水中, 称取 17.3g 硫酸铜 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 溶于 100ml 水中, 两者合并用水稀释至 1L 即为双缩脲试剂。

**2.3 蛋白质标准曲线(微量双缩脲法<sup>[3]</sup>):** 在试管中分别加 0.00、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90ml 蛋白质标准溶液, 用水补足到 1.50ml, 加 1.50ml 6% 氢氧化钠溶液混匀, 再加 0.15ml 微量双缩脲试剂, 混匀后在室温 (25℃) 保温 15min, 在 310nm 处用 TU-1800 紫外可见分光光度计测定吸光度值。回归方程为:  $y = 0.6304x -$

收稿日期: 2004-04-14

作者简介: 韩刚 (1957-), 男, 教授, 主要从事中药有效成分及药物新剂型的研究。

0.0018,  $r=0.999$ 。

2.4 啤酒酵母菌的处理 啤酒废酵母悬浮液用 pH=8.3, 浓度为 0.05mol/L 的磷酸缓冲溶液 1:1 比例混合, 搅拌均匀, 3000r/min 离心 10min, 弃去上清液, (除去残存的蛋白质) 得湿酵母菌。

2.5 啤酒酵母菌细胞自溶实验 按文献<sup>[4]</sup>要求称取 25g 湿重酵母菌, 悬浮于 100ml, 0.25mol/L 的醋酸—醋酸钠缓冲液 (pH5.5) 中, 增力搅拌器匀速搅拌, 于 55℃ 恒温水浴中反应 20h, 4000r/min 离心 20min, 收集上清液, 沉淀用去离子水洗涤, 再离心 20min, 合并两次上清液, 定容至 250ml 容量瓶中, 准确移取 2ml 未知浓度蛋白质溶液, 于 25ml 容量瓶中定容, 微量双缩脲法测定吸光度, 计算酵母菌蛋白质释放率。蛋白质释放率 = 溶液中蛋白质质量 / 酵母菌湿重。结果如表 1。

表1 啤酒酵母菌细胞自溶蛋白质释放率(n=4)  
Table 1 The release rate of beer yeast of protein by cell autolysed

酵母湿重(g)	蛋白质量(g)	蛋白质释放率(%)
25	1.2167	4.87

2.6 不同破壁剂对蛋白质释放率的影响 称取湿重酵母菌 25g, 悬于 100ml, 0.05mol/L 的 pH8.5 磷酸缓冲溶液中, 向混悬液中加入溶液总重量 0.5% (质量比) 的破壁剂, 于 29℃ 的恒温水浴中搅拌 3h, 将混悬液在 4000r/min 的速度下离心 20min, 收集上清液, 沉淀用去离子水洗涤, 然后在同样的条件下再离心一次, 收集上清液, 合并两次上清液, 定容至 250ml 容量瓶中。准确吸取 1ml 上清液, 10ml 容量瓶定容, 吸取 1.50ml, 按微量双缩脲法测定蛋白含量及蛋白质释放率。

表2 加入 0.5% 不同物质对释放率的影响(n=4)  
Table 2 Effect of different substance on the release rate

物质名称	乙醚	氮酮	异丙醇	甲苯	吐温 80	司盘 60	乙酸乙酯	SDS
蛋白质释放率(%)	1.14	4.10	0.98	1.20	—	1.80	1.64	8.36

注: 吐温 80 对溶液的乳化作用很强, 吸光度很大, 无法测定吸光度值。  
结果表明: 除 SDS (十二烷基硫酸钠) 外, 氮酮对蛋白质释放率影响最大。

2.7 氮酮的加入量对蛋白质释放率影响 方法同前, 向混悬液中加入不同浓度的氮酮, 于 29℃ 的恒温水浴中搅拌 3h, 按微量双缩脲法测定蛋白质含量。

表3 氮酮浓度对释放率的影响(n=4)  
Table 3 Effect of concentration of azone on release rate

氮酮加入量(%)	0.30	0.50	0.70	1.00
蛋白质释放率(%)	2.90	4.18	4.08	4.24

结果表明: 氮酮加入量为 1% 时蛋白质释放率最大。考虑到实用性, 确定氮酮加入量为 0.5%

2.8 不同 pH 值缓冲溶液对蛋白质释放率的影响: 25g 湿重酵母, 加入 100ml 浓度为 0.05mol/L 不同 pH 值的缓冲溶液, 29℃ 恒温水浴中搅拌 3h, 测定蛋白质含量。

表4 pH值对释放率的影响(n=4) (氮酮含量为0.5%)  
Table 4 Effect of pH on release rate (azone 0.5%)

缓冲溶液 pH 值	5.5	6.0	7.0	7.5	8.5	9.0
蛋白质释放率(%)	2.25	2.58	2.64	3.09	4.18	3.37

结果表明: 氮酮在 pH=8.5 的缓冲溶液中蛋白质释放率最大, 蛋白释放率达到 4.18%。

### 3 讨论

3.1 实验结果表明: 氮酮可促使酵母菌体内蛋白质的释放。释放的蛋白质占酵母菌湿重的 4%, 蛋白质释放量已相当可观, 为进一步分离活性酶奠定了基础。本方法有较强的应用价值, 氮酮低毒无味不溶于水, 呈油状, 浮于液面上, 易从溶液中分离。从实验结果分析, 氮酮促进蛋白质释放的机理可能是氮酮使菌壁内膜的类脂溶解, 使菌体通透性改变有利于蛋白质释放。作用机理有待于深入研究。

3.2 十二烷基硫酸钠 (SDS) 是较有效的菌体破壁剂<sup>[5]</sup>。实验结果表明蛋白质释放率最高达到 8%。但 SDS 毒性较大, 不易从蛋白质溶液中分离。因此 SDS 在此仅作为蛋白质释放率的评价指标, 应用价值不大。甲苯、异丙醇、乙醚虽有破壁作用, 但他们毒性大又有异味, 实际生产中无法应用。酵母菌自溶也可以使蛋白质释放, 释放率较高, 但反应温度较高, 反应时间长, 易使一些活性酶失活。

3.3 蛋白质释放与溶液 pH 值有关, 当 pH=8.5 时蛋白质释放的量最大。温度对蛋白质释放有一定影响, 温度高蛋白质易变性分解, 太低蛋白质释放速度慢, 建议温度控制在 25~30℃ 为宜。

### 参考文献:

- [1] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998. 526.
- [2] 管敦仪. 啤酒工业手册(修订版)[M]. 科学出版社, 1998. 330-332.
- [3] 鲁子贤. 蛋白质和酶学研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1989.
- [4] 宁正祥. 酵母菌细胞自溶动力学研究[J]. 微生物学报, 1994, 34(3): 213-219.
- [5] 钟静芬. 表面活性剂在药学中的应用[M]. 人民卫生出版社, 1996. 447.