

郅卫那, 张兰英, 何 健, 等. 1 株饲用木聚糖酶产生菌的分离、鉴定、发酵、酶学性质及应用[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 196–200.

# 1 株饲用木聚糖酶产生菌的分离、鉴定、发酵、酶学性质及应用

郅卫那<sup>1</sup>, 张兰英<sup>2</sup>, 何 健<sup>1</sup>, 贺 芹<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学生命科学学院/农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏南京 210095;

2. 江西省南康市第一小学, 江西南康 341400)

**摘要:**以木聚糖为唯一碳源, 从长期堆放枯枝败叶的土壤中筛选能够高效降解木聚糖的菌株, 并对该菌的产酶条件和酶学性质进行研究。分离得到 1 株酶活性较高且产酶相对稳定的菌株, 鉴定为尖孢镰刀菌, 命名为 *Fusarium oxysporum* MJ23。研究表明, 木聚糖、酵母粉是该菌的最适培养底物, 在最适培养条件下, 该菌株所产木聚糖酶活力可达 186 U/mL; 木聚糖酶的最适作用温度、pH 值分别为 55 ℃、6.55 ℃保温 3 h, 酶活力仍可维持 90% 以上;  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、Tween 80 和聚乙二醇对木聚糖酶活力有较强促进作用,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、EDTA、尿素和 SDS 则会抑制酶活, 其中 SDS 的抑制作用最强。模拟动物体内对饲料中半纤维素组分的消化, 木聚糖酶的添加可使猪饲料中木糖生成量提高 28%, 鸡饲料中木糖生成量提高 16%, 表明该菌株所产木聚糖酶具有用作饲料添加剂的可能性。

**关键词:**木聚糖酶; 酶学性质; 产酶条件; 饲料; 尖孢镰刀菌

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0196-04

我国作为重要的农业大国, 所产玉米、小麦、大麦、高粱等主粮以及由此形成的诸如麸子、秸秆、稻壳等农副产品是家畜植物性饲料的主要来源, 但其中所含的木聚糖等非淀粉多糖成分不能被反刍动物利用。这主要是因为单胃动物消化道内缺乏植酸酶、纤维素酶和非淀粉多糖酶等相关酶; 并且植物性饲料中存在的  $\beta$ -葡聚糖、阿拉伯木聚糖等物质会增加食糜黏度, 同时影响营养物质的吸收降解, 从而降低饲料的利用率。木聚糖酶的添加可降解饲料中的木聚糖成分, 提高动物对木聚糖等物质的利用率, 而且生成的木糖等小分子物质减轻了肠胃负担, 促进了机体对食物的消化及对营养物质的吸收; 同时, 饲料利用率的提高可以减少饲料的投喂量, 提高料肉比, 降低成本, 进而提高经济效益。木聚糖酶具有广泛的微生物来源, 包括各种真菌、放线菌、细菌等, 其中较为重要的产木聚糖酶的微生物包括曲霉 (*Aspergilli*)、青霉 (*Penicillium*)、镰刀菌 (*Fusarium*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 等<sup>[1-2]</sup>。目前, 国际上的相关研究主要集中在木聚糖酶的发酵诱导与调节机理、酶基因分子的克隆与表达、酶的纯化鉴定等方面; 国内则侧重于产木聚糖酶菌株筛选与驯化、工程菌构建、培养条件优化、酶学性质以及酶的纯化等方面<sup>[3]</sup>。本研究从长期堆放枯枝败叶、作物秸秆的土壤中筛选出 1 株酶活性较高且产酶相对稳定的菌株, 经鉴定为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*), 并对该菌株的酶学性质及发酵条件等进行探讨, 以期为微生物木聚糖酶的工业化生产及应用提供基础。

收稿日期: 2013-12-07

作者简介: 郅卫那 (1986—), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物与环境工程。E-mail: woniubeibao@gmail.com。

通信作者: 贺 芹, 山东枣庄人, 讲师, 主要研究方向为发酵工程。E-mail: qhe@njau.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验土样采集自江西省南康市长期堆放秸秆、枯枝落叶以及施用过沤肥的土壤。

### 1.2 仪器与试剂

Himac CR-21G II 高速冷冻离心机, Hitachi 公司; 722 光栅分光光度计, 上海分析仪器总厂; PCR 扩增仪, 北京东胜创新生物科技有限公司。

真菌提取 DNA 试剂盒, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 木聚糖, 购自 Sigma 公司; D-木糖、3,5-二硝基水杨酸 (DNS)、酒石酸钾钠等均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 麸皮、玉米芯、豆粕、菜籽粕、棉粕、鱼粉, 市售; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 培养基

平板初筛培养基: 1% 木聚糖, 0.2%  $\text{NaNO}_3$ , 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05%  $\text{NaCl}$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2% 琼脂, pH 值自然条件; 液体发酵培养基: 1% 木聚糖, 0.5% 葡萄糖, 1% 酵母粉, 0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%  $\text{NaCl}$ , pH 值自然条件; 其他为 PDA 培养基 (配方略)。

### 1.4 试验方法

1.4.1 菌株的分离纯化 取 1 mL 土样富集液, 进行梯度稀释后涂布于初筛培养基上, 37 ℃ 恒温倒置培养 48 h。挑选透明圈较大的单菌落, 转接到 PDA 培养基中反复纯化。将纯化后的菌株进行液体发酵, 测酶活, 重复测定 3~5 次后确定产酶最高的菌株, 记为 MJ-23, 保存备用。

1.4.2 菌丝体制备及 DNA 提取 从平板上挑取直径 0.6 cm 菌苔, 加入 PDA 液体培养基中, 37 ℃、170 r/min 培养 48 h。纱布过滤得菌丝体, 清洗、挤压、晾干后放入研钵中, 加适量液

氮研磨至粉末状,再装入 1.5 mL 离心管中。DNA 提取采用试剂盒法,加入 400  $\mu$ L 裂解液和 4  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇,震荡混匀后,于 65  $^{\circ}$ C 水浴 1 h 至细胞完全裂解;加入 200  $\mu$ L buffer PF(市购),充分混匀,于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱放置 5 min 后,室温、10 000 r/min 条件离心 5 min;取上清,加入等体积异丙醇后于室温、10 000 r/min 离心 5 min,弃上清;在沉淀中加入 1 mL 75% 乙醇洗涤 2 次,10 000 r/min 离心 2 min;将获得的 DNA 用 50~100  $\mu$ L 去离子水溶解,4  $^{\circ}$ C 溶解过夜,-20  $^{\circ}$ C 冻存。

#### 1.4.3 菌株 rDNA-ITS 的 PCR 扩增及系统发育地位的确定

以菌株 MJ-23 的 DNA 作为模板,利用真菌通用引物进行扩增。其中正向引物 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';反向引物 ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。50  $\mu$ L 扩增体系参照文献[4]。反应程序为:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,55  $^{\circ}$ C 复性 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增产物回收后测序,测序结果与 GenBank 中的已有序列进行 Blast 分析比对,构建供试菌株的系统发育树<sup>[5]</sup>。

1.4.4 木聚糖酶的发酵培养及酶活力的测定 从固体培养基上挑取直径 0.6 cm 的菌苔加入装有 50 mL 发酵液体的培养瓶中,于 37  $^{\circ}$ C、170 r/min 的恒温摇床中培养 72 h;再将发酵液于 4 000 r/min 离心 5 min,所得上清即为粗酶液。木聚糖酶酶活力的测定参照 GB/T 23874—2009《饲料添加剂木聚糖酶活力的测定 分光光度法》<sup>[6]</sup>,酶活力单位定义为 1 min 释放 1  $\mu$ mol 还原糖(以木糖计)所需要的酶量。

1.4.5 产木聚糖酶条件优化 (1)碳源。碳源作为微生物重要的能量与结构来源,对菌株生长及产酶有着重要的作用<sup>[8]</sup>。分别以 10 g/L 麸皮(粉碎过 30 目筛)、玉米芯(粉碎过 30 目筛)、木聚糖、淀粉、葡萄糖、蔗糖、木糖 7 种物质作为菌株 MJ-23 生长的唯一碳源,研究碳源对菌株液体发酵产酶的影响。(2)氮源。分别以无机氮源:氯化铵、硝酸钠、硫酸铵以及有机氮源:尿素、酵母粉、蛋白胨、牛肉膏为唯一氮源进行液体发酵,添加量均为 10 g/L。(3)接种量。设接种量分别为 1、5、10、15、20、25 枚/瓶。

1.4.6 木聚糖酶酶活稳定性的测定 取 1% 木聚糖溶液于刻度试管中,作为底物,加入 2 mL 经适当稀释的粗酶液,于设定的温度、pH 值及其他条件(金属离子、化学助剂等)下处理一定时间后,用 DNS 法测酶活力。

1.4.7 饲料原料的制备 将常用的饲料原料底物如豆粕、玉米粉、菜籽粕、麸皮、玉米芯粉等干燥、粉碎后过 30 目。按照不同动物的饲料配方将上述原料混合后,充分搅拌均匀。育肥猪饲料配方为:21% 豆粕,61% 玉米粉,1% 菜籽粕,8% 麸皮,1% 棉粕,2% 鱼粉;另外 6% 为石粉、蛋氨酸、赖氨酸、微量元素、多种维生素等物质。肉雏鸡饲料配方为:55% 玉米粉,32% 豆粕,2% 鱼粉,2% 菜籽粕,3% 骨粉;另外 6% 为蛋氨酸、赖氨酸、微量元素、多种维生素等物质。

1.4.8 木聚糖酶在饲料原料中的应用 设计对照组(不加酶)、加酶组 2 个处理<sup>[7]</sup>,取 10 g 饲料底物加入 100 mL 缓冲液中,混匀后浸泡 30 min,加入 5 mL 缓冲液或粗酶液,酶解温度 55  $^{\circ}$ C,每隔 1 h 混匀 1 次,用 5 mL 10% 三氯乙酸溶液终止反应。酶解后对加酶组和对照组的样品分别均匀取样,4 000 r/min 离心 2 min,用 DNS 法测定木糖产生量。

## 2 结果与分析

### 2.1 木聚糖酶分泌菌的分离与鉴定

通过富集培养与木聚糖平板初筛,挑选到透明圈较大的单菌落,转接到 PDA 培养基中进行反复纯化。经过酶活检测,最终确定以产酶高的菌株 MJ-23 作为后续试验的基础菌。该菌株在 PDA 培养基上生长良好,菌落正面呈白色,背面呈较深的黄褐色;菌落形态较大,质地相对紧密,由菌丝组成疏松的绒毛或棉花状,菌落边缘不平整,有明显的隆起,在培养基中没有固定的形状,可延续至整个培养基中。菌株所产孢子主要有 3 种形态:个体形态较大的镰刀形、有隔膜的分生孢子,个体形态较小的、单细胞卵圆形孢子,以及厚垣孢子。

以 MJ-23 的 DNA 为模板,用真菌基因序列通用引物 ITS1、ITS4 进行 PCR 扩增,得到长度约为 1 033 bp 的扩增产物。在 GenBank 上比对该序列,根据 Blast 分析结果,结合菌株菌体形态与孢子特征,鉴定该菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),GenBank 收录号:KF751873。

### 2.2 菌株 MJ-23 产木聚糖酶条件的优化

2.2.1 木聚糖酶的产酶曲线 由图 1 木聚糖酶的产酶曲线可以看出,在发酵过程中,0~36 h 内菌株的产酶量很低,这主要是由于此时菌株处于延迟期,并且作为次级代谢产物,木聚糖酶在菌株培养一定时间后才会产生;菌株产酶的高峰期为 70~90 h,以发酵 72 h 时的酶活最高,96 h 后酶活力开始明显下降,因此在后续研究中,选取 72 h 作为培养时间进行研究。

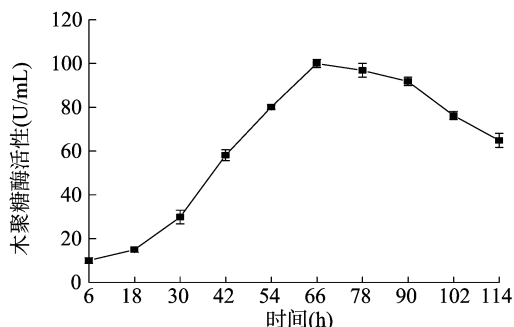


图1 木聚糖酶产酶曲线

2.2.2 碳源对菌株产酶的影响 由图 2 可以看出,以木聚糖为碳源时,木聚糖酶活力最大;麸皮和玉米芯等结构中含有木聚糖成分的底物对诱导木聚糖酶产生也具有促进作用;蔗糖和淀粉对木聚糖酶的诱导作用较小,这主要是因为木聚糖酶是一种诱导酶,其合成受诱导调控,不同诱导物对菌株 MJ-23 合成木聚糖酶的诱导能力不同<sup>[9]</sup>,因此木聚糖及组分中含木聚糖酶成分的底物是最适的诱导底物。

2.2.3 氮源对菌株产酶的影响 由图 3 可以看出,对于菌株 MJ-23 来说,营养丰富的有机氮源比无机氮源效果要好;有机氮源中的酵母粉、蛋白胨、牛肉膏对于发酵产木聚糖酶具有较强的促进作用,其中以酵母粉的促进作用最为显著,而尿素对菌株产酶的影响较弱;无机氮源中,硫酸铵的促进作用最强,硝酸钠最低。分析出现上述情况的原因,可能是菌株对不同来源氮源的利用偏好性有所不同<sup>[10]</sup>。

2.2.4 接种量对菌株产酶的影响 由图 4 接种量对菌株产酶的影响试验可知,接种 5~10 枚/瓶菌时所测得酶活较高,

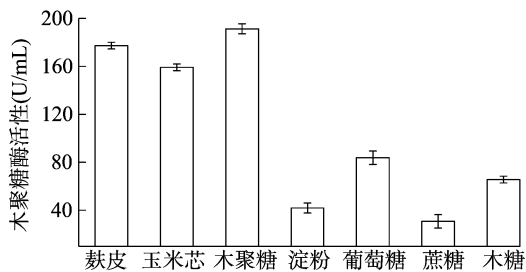


图2 碳源对菌株MJ-23产酶的影响

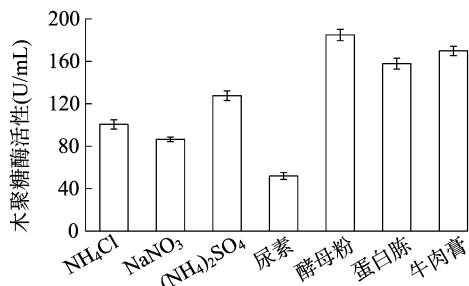


图3 氮源对菌株MJ-23产酶的影响

接种量为 1 枚/瓶或大于 15 枚/瓶时,木聚糖酶活性均较大幅度降低。分析其原因可能是:接种量过低,菌丝体生物量较低,致使产酶周期延长,72 h 时无法达到较高的产酶量;接种量过高,生物量增多导致营养物质消耗过快,同样不利于木聚糖酶的合成,使得产酶量降低<sup>[11]</sup>。

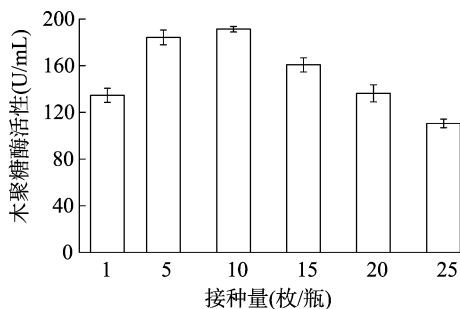


图4 接种量对菌株MJ-23产酶的影响

## 2.3 木聚糖酶的酶学特性

木聚糖酶的酶活力受到多种因素影响,如温度、pH 值、金属离子、激活剂或抑制剂等<sup>[12]</sup>。本研究探讨环境因素对木聚糖酶酶学特性的影响,以期确定酶的水解条件与影响因素。

**2.3.1 木聚糖酶最适反应温度** 在缓冲液 pH 值为 6.0,温度分别为 30、40、50、55、60、70、80 °C 条件下处理粗酶液 20 min,测定木聚糖酶活力。由图 5 可知,菌株产木聚糖酶的最适作用温度为 55 °C,可耐受温度相对较高,并且在 50 ~ 60 °C 温度范围内,酶活力相对比较稳定。

**2.3.2 木聚糖酶最适反应 pH 值** pH 值是影响木聚糖酶活力的重要因素,过高或过低的 pH 值均会改变木聚糖酶蛋白的构象,使酶活力降低,甚至会导致木聚糖酶变性失活。生物来源不同的木聚糖酶所能耐受的 pH 值范围一般不同<sup>[13]</sup>,真菌来源的木聚糖酶多在酸性条件下具有最大活力,最适 pH 值范围一般为 4.0 ~ 6.0<sup>[14]</sup>。由图 6 木聚糖酶的最适反应 pH 值试验结果看出:pH 值 = 6 时,该酶活力最高,并且在 pH 值

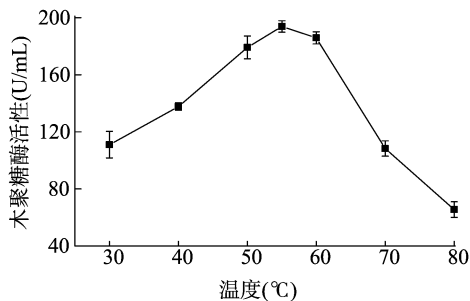


图5 温度对木聚糖酶活力的影响

为 5 ~ 7 范围内可以保持较高活性,是一种酸性木聚糖酶,认为该酶具有用作饲料工业用酶的前景;当 pH 值小于 4 或大于 9 时,木聚糖酶活性均下降明显,开始失活。

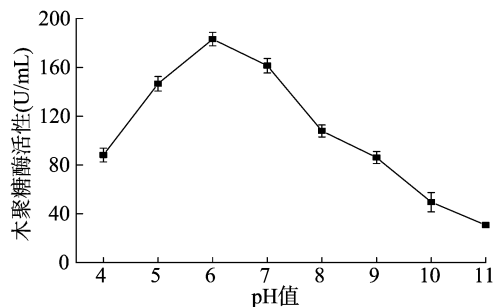


图6 pH值对木聚糖酶活的影响

**2.3.3 木聚糖酶活力的热稳定性** 由图 7 恒温处理对木聚糖酶活力影响的结果看出:以起始酶活力为对照,在 55 °C、pH 值 = 6 的条件下处理 2 h 后,测得的木聚糖酶相对活力仍可维持 95% 以上;反应 3 h 时下降到起始酶活力的 90% 左右;4 h 以后开始出现较大幅度的下降。与其他木聚糖酶<sup>[15]</sup>相比,该酶的酶活力热稳定性较好。

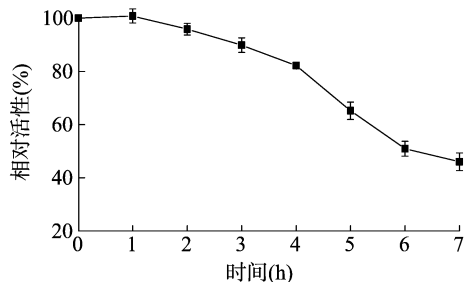


图7 木聚糖酶的恒温稳定性

**2.3.4 金属离子对酶活力稳定性的影响** 木聚糖酶有细菌、真菌等多种来源,不同金属离子对不同酶活力的影响不同,并且离子之间的相互作用对木聚糖酶也有影响<sup>[12]</sup>。本研究探讨金属离子对酶活力稳定性的影响,金属离子浓度设为 1 mmol/L,试验中以未添加金属离子样品的酶活力为对照,其相对酶活默认为 100%。由图 8 研究结果表明:Ca<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 对木聚糖酶的活力有较强的激活作用,I<sup>-</sup>、Mg<sup>2+</sup> 对酶活力的大小基本上没有影响,K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 对酶活力有轻微的抑制作用,Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 对木聚糖酶的活力有较大的抑制作用。

**2.3.5 化学助剂对酶活力稳定性的影响** 研究浓度为 1 g/L 的不同表面活性剂样品对木聚糖酶活稳定性的影响,设不加化学助剂样品的酶活力为对照,数值为 100%。图 9 结果表

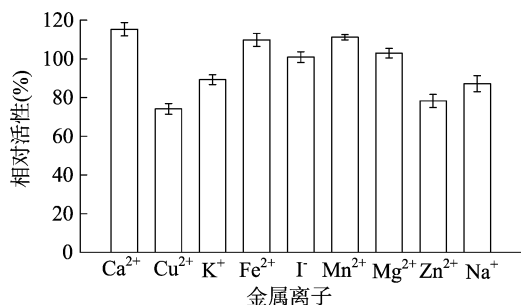
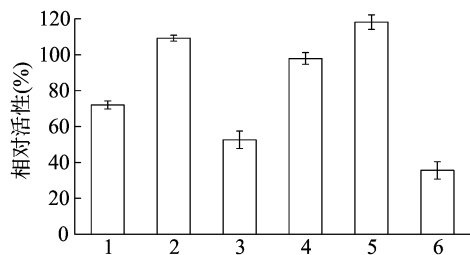


图8 金属离子对酶活力稳定性的影响

明:聚乙二醇和 Tween 80 对木聚糖酶的活力都有促进作用,其中 Tween 80 的促进作用较大;Tris 对酶活力的影响较小,而 EDTA、尿素和 SDS 对木聚糖酶的活力均有不同程度的抑制作用,其中 SDS 的抑制作用最为强烈,酶活损失达 50% 以上。



1—EDTA; 2—聚乙二醇400; 3—尿素; 4—Tris; 5—Tween 80; 6—十二烷基磺酸钠 (SDS)

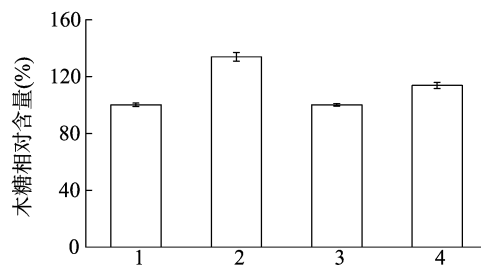
图9 化学助剂对酶活稳定性的影响

#### 2.4 木聚糖酶在饲料中的应用研究

目前,关于酶制剂在饲料中实际功能的量化测定方法还未完完善。有研究对体外模拟动物消化过程进行测定,如采集出栏猪的胃液,加入酶制剂测定其中单一变量<sup>[16]</sup>,且大多数研究还是采用单一因素测定饲料中的碳氮源,以及配制饲料原料综合比较的方法进行测定。

一般来说,猪胃液的 pH 值为 2.0~3.5,十二指肠、空肠、回肠的 pH 值范围分别为 4.0~6.0、5.5~6.7、7.0~7.5。饲料在猪体内首先被胃酸分解成食糜状,这一过程基本没有被吸收,糜状物进入小肠后才被消化吸收。家禽肉鸡的胃液 pH 值约为 2.0~3.0,肠道内 pH 值为 6.0~6.5,食物的消化过程与猪基本相同<sup>[17]</sup>。本试验中,筛选的酸性木聚糖酶最适 pH 值为 5~7,理论上可应用于饲料工业。

本研究中,所有饲料原料均经粉碎后过 30 目筛,且在缓冲液中浸泡 30 min,以模拟动物体内消化道的酸化及糜化作用。其中猪饲料选用 pH 值 5.5 的醋酸缓冲,鸡饲料选用 pH 值 6.0 的醋酸缓冲。由于饲料在鸡体内的消化时间为 2~4 h,在猪体内的消化时间比鸡长,因此鸡饲料酶解时间选用 4 h,猪饲料酶解时间选用 6 h<sup>[18]</sup>。通过测定添加木聚糖酶前后饲料中木糖含量的变化,定量分析木聚糖酶在饲料中的作用<sup>[19]</sup>。研究结果(图 10)表明:木聚糖酶对猪饲料的降解作用显著,可使饲料中木糖含量提高 28%;对鸡饲料也有明显作用,木糖含量提高了 16%。分析 2 种饲料中木聚糖酶作用差异的原因,可能是饲料配方中玉米含量的不同所造成的:玉米、小麦、豆粕中均含有大量的非淀粉多糖,但玉米中木聚糖含量相对较高,因而饲料成分中含玉米较多的猪饲料经木



1—对照猪饲料; 2—木聚糖酶处理猪饲料; 3—对照鸡饲料; 4—木聚糖酶处理鸡饲料

图10 不同处理饲料中木糖的相对含量

聚糖酶处理后得到的木糖含量更高<sup>[20]</sup>。

### 3 讨论

木聚糖酶的制备与应用对于植物性原料来源的工农业生产具有重要意义。本研究从土壤中分离得到 1 株产木聚糖酶较高的菌株 MJ-23,经鉴定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),随后对其产酶条件与酶学特性进行了研究。研究表明,木聚糖是最佳的木聚糖酶诱导底物,以酵母粉作为氮源有利于木聚糖酶的产生;在最适培养条件下,液体发酵产木聚糖酶活性可达 186 U/mL;该酶的最适作用温度与 pH 值分别为 55 ℃、6,并且 55 ℃ 恒温 3 h 后酶活仍可达到初始酶活的 90% 以上,是一种温度稳定性较好的酸性木聚糖酶。Ca<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、聚乙二醇和 Tween 80 对木聚糖酶的活性有较强的激活作用,Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、EDTA、尿素和 SDS 对木聚糖酶有抑制作用,其中 SDS 的抑制作用最强。

将制备的木聚糖酶应用于饲料研究发现,木聚糖酶的添加可使猪饲料中木糖含量提高 28%,鸡饲料中木糖含量提高 16%。可见木聚糖酶的添加有利于猪、鸡饲料中植物纤维原料的降解,提高饲料利用率。

### 参考文献:

- [1] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29 (1): 3-23.
- [2] Subramanian S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(1): 33-64.
- [3] Akpinar O, Erdogan K, Bostanci S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(5): 660-666.
- [4] Cubero O F, Crespo A, Fatehi J, et al. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi[J]. Plant Systematics and Evolution, 1999, 216 (3/4): 243-249.
- [5] Gupta N, Reddy V S, Maiti S, et al. Cloning, expression, and sequence analysis of the gene encoding the alkali-stable, thermostable endoxylanase from alkalophilic, mesophilic *Bacillus* sp. strain NG-27[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (6): 2631-2635.
- [6] GB/T 23874—2009 饲料添加剂木聚糖酶活力的测定 分光光度法[S]. 北京:中国标准出版社.

卢超,郭文柱,权晓弟,等. 丹参酮灌注液制备工艺[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):200-203.

# 丹参酮灌注液制备工艺

卢超<sup>1,2</sup>, 郭文柱<sup>1</sup>, 权晓弟<sup>1</sup>, 梁剑平<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

**摘要:**用甲基- $\beta$ -环糊精不饱和水溶液法制备丹参酮灌注液,并对其制备工艺进行优化。通过单因素试验确定影响丹参酮灌注液制备的主要工艺参数;以丹参酮ⅡA利用率为指标,通过正交试验优化甲基- $\beta$ -环糊精不饱和水溶液法制备丹参酮灌注液制备工艺;采用HPLC法对丹参酮ⅡA的质量浓度进行测定,并计算其回收率及精密密度等。结果表明:影响丹参酮灌注液制备的主要工艺参数为投料质量比、温度、乙醇含量;甲基- $\beta$ -环糊精不饱和水溶液法制备丹参酮灌注液的最佳条件是甲基- $\beta$ -环糊精与丹参酮提取药粉投料质量比80:1,60℃下加热1h,乙醇含量为5%,搅拌时间3h,该条件下丹参酮利用率为69.96%;丹参酮ⅡA含量测定方法稳定性好,回收率高。

**关键词:**甲基- $\beta$ -环糊精;丹参酮灌注液;丹参酮ⅡA;HPLC法

**中图分类号:**S859.5<sup>+</sup>3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)10-0200-04

丹参酮(tanshinone)是一类从中药丹参中提取出的脂溶性萜醌类化合物,包括丹参酮Ⅰ、ⅡA、ⅡB,隐丹参酮,异丹参酮Ⅰ、ⅡA,异隐丹参酮等十多种酮类单体,均含有邻醌或对醌结构,其自身及其代谢产物能参与机体多种生化反应,作为辅酶对某些生化反应起促进、干扰、电子传递作用,因此丹参酮表现出多种药理作用,如天然抗氧化、心血管药理作用、抗菌消炎、抗癌、抗病毒等作用。在抗菌消炎方面,丹参酮对

以金黄色葡萄球菌为主的急性感染特别是对耐药金黄色葡萄球菌株感染有显著疗效<sup>[1-3]</sup>。但丹参酮水溶性差,理化性质不稳定,这大大限制了其应用。

甲基- $\beta$ -环糊精(M- $\beta$ -CD)是一种常用包合辅料,具有外亲水、内疏水的分子结构,溶解度大于 $\beta$ -CD,在25℃水中的溶解度可达到570g/L,既溶于水,又溶于有机溶剂,形成的包合物水溶性增加,可提高药物溶出速度;环糊精甲基化后,封闭了其分子内羟基,可以抑制其与药物的不稳定反应<sup>[4]</sup>。不饱和水溶液法是将M- $\beta$ -CD配制成不饱和水溶液,从而对丹参酮原料药粉进行搅拌包合,制成稳定的丹参酮包合液。

奶牛乳房炎是奶牛三大常见疾病之一,一直以来给奶牛养殖业造成了巨大经济损失。用丹参酮药物治疗奶牛乳房炎

收稿日期:2013-11-04

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2006BAD04A05-04)。

作者简介:卢超(1989—),男,四川广元人,硕士研究生,主要从事中兽药新制剂研究。E-mail:luc19898@126.com。

通信作者:梁剑平,博士,研究员,主要从事天然药物化学研究。Tel:(0931)2115286;E-mail:liangjp100@sina.com。

[7]崔鹏鹏,周平发,王敏,等. 饲料原料为底物一种木聚糖酶体外酶解的方法[J]. 广东饲料,2012,21(2):37-39.

[8]Demirbaş A. Gaseous products from biomass by pyrolysis and gasification: effects of catalyst on hydrogen yield[J]. Energy Conversion and Management, 2002, 43(7):897-909.

[9]Moghtaderi B. Effects of controlling parameters on production of hydrogen by catalytic steam gasification of biomass at low temperatures[J]. Fuel, 2007, 86(15):2422-2430.

[10]王在贵,张宏福,张永跃,等. 体外模拟猪胃条件下木聚糖酶活力稳定性研究[J]. 激光生物学报,2009,18(1):87-90,100.

[11]李卫芬,孙建义. 木聚糖酶的特性研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2001,27(1):105-108.

[12]Cempírková R, Thér R. The effect of living conditions on selected indexes of raw cow's milk[J]. Collection of Scientific Papers, Faculty of Agriculture in České Budějovice, Series for Animal Sciences, 2000, 17(1):55-71.

[13]Polizeli M L, Rizzatti A C, Monti R, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(5):577-591.

[14]Colina A, Sulbarán-de-Ferrer B, Aiello C, et al. Xylanase production by *Trichoderma reesei* rut C-30 on rice straw[J]. Ap-

plied Biochemistry and Biotechnology, 2003, 108(1/2/3):715-724.

[15]国春艳,刁其玉,乔宇,等. 酸性木聚糖酶产生菌株的筛选和酶学性质分析[J]. 中国农业科学,2010,43(7):1524-1530.

[16]Wang S H, Chen J C. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(3):191-204.

[17]Liang H Y, Wu Z H, Jian J C, et al. Protection of red snapper (*Lutjanus sanguineus*) against *Vibrio alginolyticus* with a DNA vaccine containing flagellin *flaA* gene[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(2):156-161.

[18]Jorge I, De la Rosa O, Navas-Cortés J A, et al. Extracellular xylanases from two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: enzyme production in culture and purification and characterization of a major isoform as an alkaline endo- $\beta$ -(1,4)-xylanase of low molecular weight[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2005, 88(1):48-59.

[19]Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3):426-428.

[20]Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259):680-685.