

胰蛋白酶生产中的固液分离工艺研究

曹雅,周敏,饶春,何泽超*

(四川大学化学工程学院,四川成都610065)

摘要:胰蛋白酶生产中的固液分离对产品的质量和后续处理具有很大影响。在保持酶活的前提下,分别在提取猪胰浆前后用有机试剂去除脂肪,以达到改善提取后固液分离效果的目的。结果表明用有机试剂处理提取前的胰浆效果不理想,而用有机试剂处理提取液效果更佳。其中用三氯乙烯处理提取液,与原工艺相比,离心沉降后的浊度及过滤速度有较大改善。当提取液与三氯乙烯体积比为1:1,处理时间为1 h时,胰蛋白酶的酶活损失仅为3.22%,浊度从2.52降低到0.57,过滤速度从0.46 mL/min提高到2.11 mL/min。

关键词:胰蛋白酶;酶活;固液分离;过滤

中图分类号:Q814.1

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)04-0066-04

Solid-liquid separation process in production of trypsin

CAO Ya, ZHOU Min, RAO Chun, HE Ze-chao*

(College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: The solid-liquid separation, which has a great impact on the quality and subsequent product purification, is a critical step in the production of trypsin. In order to improve the effect of solid-liquid separation, several kinds of organic reagents are used to remove the fat before and after the extraction of pancreas. The method involving in dealing with the pancreatic slurry before extraction is not feasible. In contrast, better solid-liquid separation effect can be achieved with pancreatic slurry after extraction treatment. The turbidity and filtration rate of extraction has been greatly changed. The loss of enzyme activity of trypsin is only 3.22%. The turbidity is reduced from 2.52 to 0.57. The filtration rate increases from 0.46 mL/min to 2.11 mL/min when the volume ratio of extraction and trichloroethylene is 1:1 and the processing time is 1 hour. This easy-operating method which can be applied to real production may provide an additional 80% of separation time-saving. Meanwhile, it can also make the cost down by recovery of the solvents.

Key words: trypsin; enzyme activity; solid-liquid separation; filtration

胰蛋白酶是来源于动物胰脏的一种碱性蛋白水解酶,主要从牛、羊、猪的胰脏中提取获得。广泛应用于制药、食品、皮革、纺织和现代生物技术等领域^[1-3]。

目前胰蛋白酶的生产过程主要包括胰脏的破碎、提取、固液分离、激活、沉淀、纯化、干燥等过程^[4]。对于提取^[5]、激活^[6]、沉淀^[7]和纯化^[8]研究较多,但对固液分离方法的研究报道较少。在胰蛋白酶的生产过程中,固液分离是影响生产周期的关键步骤。胰脏提取液中包含蛋白质、核酸和各种脂质,采用传统方法离心沉降时极易在溶液中形成一个从小到大的连续密度分布状态,造成离心效果不理想。并且由于脂质处于半固体状态,黏度高,过滤时容易堵塞,造成固液分离困难。因此,笔者采用有机试剂萃取法将脂质去除,并根据提取前后胰浆的不同理化性质选用不同极性的有机溶剂,以达到提高胰蛋白酶生产过程中的固液分离,缩短生产周期的效果。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

猪胰脏:由德阳生化试剂厂提供;其他试剂(分

析纯):由成都市科龙化工试剂厂提供。

UV-1800 紫外分光光度计:上海美普达仪器有限公司生产;JYL-350B 料理机:九阳股份有限公司生产;TD-6M 台式离心机:四川蜀科仪器有限公司生产;HY-5 回旋式振荡器:金坛市科析仪器有限公司生产;SC-230LP 冰柜:三洋科龙电器生产。

1.2 实验方法

1.2.1 胰蛋白酶的提取工艺

在粉碎处理好的胰浆中加入4倍于原料量的蒸馏水,充分搅拌均匀,用0.1 mol/L的硫酸溶液调节pH至4.0,在4℃条件下提取12 h后,得提取液。

1.2.2 对提取前的胰浆进行脱脂

取100 g胰脏粉碎成胰浆,4等份放入烧杯中,1份不处理,作为对照组,其余3份分别加入一定量预冷至4℃的脱脂剂乙醚^[9]、丙酮^[10]和乙酸乙酯^[11],低速振荡混合一段时间,去除有机试剂,按1.2.1方法得提取液,4 000 r/min离心10 min,测定离心上清液的浊度和过滤20、30、40 mL上清液的时间;在滤液中加入CaCl₂,4℃条件下激活8 h,测定胰蛋白酶酶活。

收稿日期:2013-11-08

作者简介:曹雅(1989-),女,工学硕士,研究方向为天然产物研究与开发,caoya_221@sina.com;何泽超(1961-),男,工学博士,副教授,研究方向为生化产品分离、污染物的生物净化,通讯联系人,hezecao@scu.edu.cn。

1.2.3 对提取后的胰浆进行脱脂

取5份100 mL提取液,1份不处理,作为对照组,其余4份分别加入一定量预冷至4℃的脱脂剂石油醚^[12]、三氯乙烯^[13]、四氯化碳^[14]和正己烷^[15],低速振荡混合一段时间,4 000 r/min离心10 min,测定水层浊度和过滤20、30、40 mL水层的时间;在滤液中加入CaCl₂,4℃条件下激活8 h,测定胰蛋白酶酶活。

1.2.4 测定方法

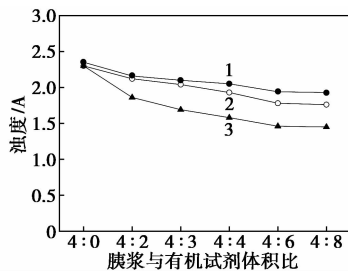
浊度的测定方法:澄清度检查法^[16]。胰蛋白酶酶活的测定方法:取1 mL的激活液称重并稀释^[17],按照中国药典中所述的原理测定吸光度值^[16],计算得到酶活。蛋白质测定方法:凯氏定氮法^[18]。

2 结果与讨论

2.1 提取前脱脂处理

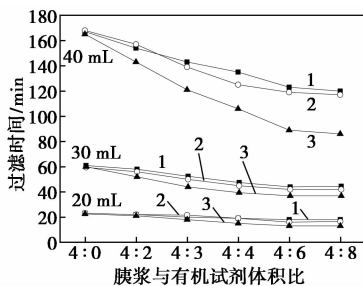
2.1.1 有机试剂用量对分离效果的影响

反应时间为1 h,胰浆与有机试剂的体积比分别为4:0、4:2、4:3、4:4、4:6和4:8,考察有机试剂用量对分离效果的影响,结果如图1、图2所示。



1—乙醚;2—丙酮;3—乙酸乙酯

图1 有机试剂用量对浊度的影响



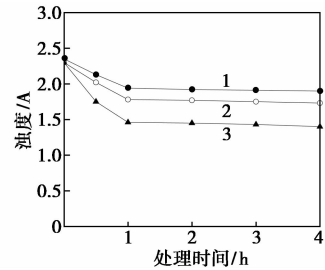
1—乙醚;2—丙酮;3—乙酸乙酯

图2 有机试剂用量对过滤时间的影响

由图1和图2可知,随着有机试剂用量增大,离心液浊度和过滤时间均明显降低,当达到4:6后,离心液浊度和过滤时间的变化趋缓。综合考虑操作成本和处理效果,最佳体积比选为4:6。

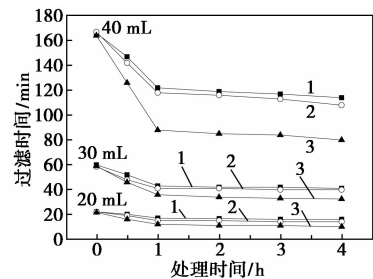
2.1.2 有机试剂处理时间对分离效果的影响

取胰浆与有机试剂的体积比为2:3,反应时间分别为0.5、1、2、3、4 h,考察有机试剂处理时间对分离效果的影响,结果如图3、图4所示。



1—乙醚;2—丙酮;3—乙酸乙酯

图3 有机试剂处理时间对浊度的影响



1—乙醚;2—丙酮;3—乙酸乙酯

图4 有机试剂处理时间对过滤时间的影响

由图3和图4可知,随着处理时间的延长,离心液浊度和过滤时间下降明显,继续延长时间,变化趋于平缓。考虑有机试剂与蛋白酶接触时间过长,对酶活会造成一定影响,故反应时间选为1 h。

当胰浆与有机试剂的体积比为4:6,反应时间为1 h时,胰蛋白酶酶活的变化情况如表1所示。

表1 胰蛋白酶酶活的变化

处理试剂	未处理	乙醚	丙酮	乙酸乙酯
酶活/(U·g ⁻¹)	865.0	386.7	296.7	491.1

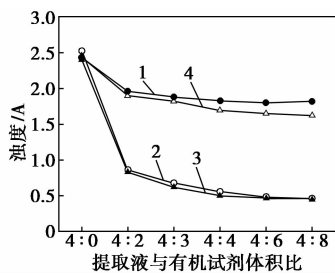
由表1可知,经乙醚、丙酮和乙酸乙酯处理后的酶活与未处理的相比分别降低了65.7%、55.0%和43.2%。说明有机试剂处理后,酶活损失较大。这是由于在提取活化过程中,未除尽的有机溶剂长时间与提取液中的蛋白酶接触,对酶活有负面影响^[19]。试剂处理后的提取液颜色和溶液的状态均有一定程度的改变,也反映出试剂对胰浆的理化性质有一定影响。

综合以上结果得出,虽然乙醚、丙酮和乙酸乙酯处理胰浆后的离心上清液浊度有所降低,过滤速度有一定程度提高,但酶活损失较大,综合处理效果不理想。

2.2 提取后脱脂处理

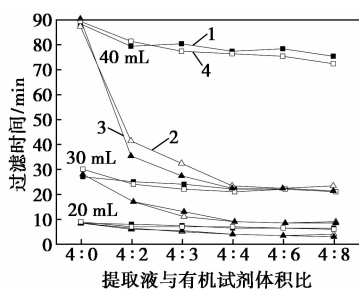
2.2.1 有机试剂用量对分离效果的影响

反应时间为 1 h, 提取液与有机试剂的体积比分别为 4:0、4:2、4:3、4:4、4:6 和 4:8, 考察有机试剂用量对分离效果的影响, 结果如图 5、图 6 所示。



1—石油醚;2—三氯乙烯;3—四氯化碳;4—正己烷

图 5 有机试剂用量对浊度的影响



1—石油醚;2—三氯乙烯;3—四氯化碳;4—正己烷

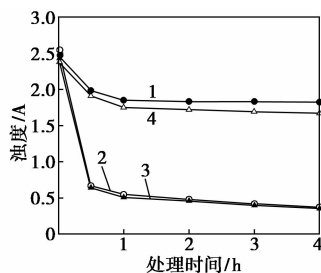
图 6 有机试剂用量对过滤时间的影响

由图 5 和图 6 可知, 随着有机试剂用量增大, 离心液浊度和过滤时间降低明显, 当体积比达到 4:4 以后, 增大有机试剂用量, 影响较小。故在使用有机试剂处理提取液时, 其体积比选为 4:4。

2.2.2 有机试剂处理时间对分离效果的影响

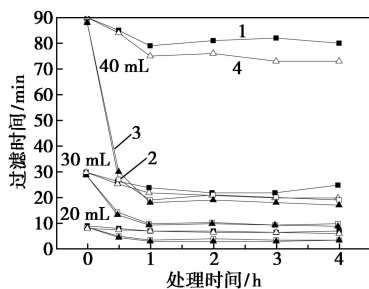
取提取液与有机试剂的体积比为 1:1, 反应时间分别为 0.5、1、2、3、4 h, 考察有机试剂处理时间对分离效果的影响, 结果如图 7、图 8 所示。

由图 7 和图 8 可知, 初始提取液浊度相近的情况下, 延长有机试剂处理时间, 离心液浊度均呈下降趋势。考虑处理 1 h 后, 影响作用较小, 综合考虑对



1—石油醚;2—三氯乙烯;3—四氯化碳;4—正己烷

图 7 有机试剂处理时间对浊度的影响



1—石油醚;2—三氯乙烯;3—四氯化碳;4—正己烷

图 8 有机试剂处理时间对过滤时间的影响

酶活的影响, 处理时间选为 1 h。

通过图 4 和图 8 可以发现, 随着过滤体积的增大, 经有机试剂处理后的滤液过滤速度增加的幅度越大。其中对于提取后脱脂处理, 选择最优体积比和处理时间时, 过滤 20、30、40 mL 滤液所节约的时间最高分别为未处理的 56.2%、70.4% 和 80.5%。进一步增加过滤体积, 所节约的时间将会更加可观, 不仅可以弥补有机试剂处理所花费的时间, 还能大大缩短操作周期。

提取液与有机试剂体积比为 4:4, 反应时间为 1 h 时, 不同有机试剂对胰蛋白酶酶活的影响如表 2 所示。

表 2 不同试剂处理对胰蛋白酶酶活的影响

处理试剂	未处理	石油醚	三氯乙烯	四氯化碳	正己烷
酶活/(U·g ⁻¹)	890.4	842.1	861.7	844.6	879.7

由表 2 可知, 提取液经石油醚、三氯乙烯、四氯化碳和正己烷处理后的酶活较未处理的提取液分别降低 5.42%、3.22%、5.13% 和 1.20%, 较脱脂前处理对胰蛋白酶酶活影响明显降低。说明通过使用有机试剂将提取液中的固性物沉降出来的方法提高固液分离效果具有可行性。因此, 不同试剂的处理效果如表 3、图 9 所示。

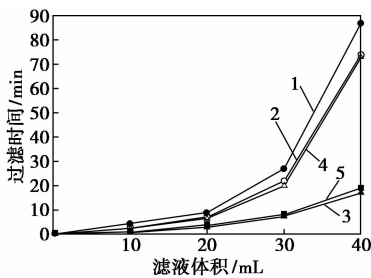
由表 3 可知, 经有机试剂处理后, 石油醚、正己烷处理的离心上清液的浊度变化较小, 而三氯乙烯、四氯化碳处理后的浊度显著降低。

由图 9 可知, 有机试剂处理后的提取液的过滤时间与原液相比明显降低, 原液的过滤速度约为 0.46 mL/min, 石油醚与正己烷处理后的过滤速度与其相差不大, 分别为 0.54、0.55 mL/min, 三氯乙烯、四氯化碳处理的离心液的过滤速度大幅度提高, 分别为 2.11、2.35 mL/min。

综合考虑, 三氯乙烯及四氯化碳的效果均较好, 并且由于三氯乙烯和四氯化碳密度比水大, 还能有

表3 不同试剂处理对浊度的影响

处理试剂	未处理	石油醚	三氯乙烯	四氯化碳	正己烷
浊度/A	2.52	1.84	0.57	0.50	1.72



1—未处理;2—石油醚;3—三氯乙烯;4—四氯化碳;5—正己烷

图9 不同试剂处理对过滤时间的影响

效减少试剂的挥发。处理后离心沉降,不溶性杂质被离心至三氯乙烯和四氯化碳层中,更容易实现上清液的分离,但由于四氯化碳的毒副作用比三氯乙烯更大^[20],所以拟将三氯乙烯定为处理试剂。

通过以上实验可知,对提取后胰浆进行脱脂处理效果较提取前处理更佳,这主要是由于提取前胰浆中水分含量少,搅拌时有机试剂直接与胰蛋白酶原接触机会较提取后的大,且乙醚、丙酮和乙酸乙酯与水互溶,存在改变水溶液介电常数的可能,对活性影响较大。不同有机试剂对过滤时间及酶活影响也与所选有机试剂的极性大小有一定的关系^[21]。

经有机试剂处理后的提取液固液分离效果明显改善,对于工厂大批量生产,可以节省超过80%的时间,且三氯乙烯的沸点比水低,可以用蒸馏的方法再生,循环利用节约成本。对于加入有机试剂处理后的残留问题,胰蛋白酶的生产中会使用喷雾干燥的工序,并且在形成最终产品时,会经过干燥处理,能将有机试剂部分或者完全除去,不会对产品的质量造成明显的影响。

3 结论

(1)用乙醚、丙酮和乙酸乙酯处理提取前的胰浆,浊度有所减小,过滤速度加快,但是胰蛋白酶的酶活损失严重,分别损失了55.0%、65.7%和43.2%,用有机试剂处理胰浆的效果不理想。

(2)用石油醚、四氯化碳、三氯乙烯和正己烷脱脂处理提取液,四氯化碳和三氯乙烯的沉降效果明显改善,过滤速度显著加快,但四氯化碳的毒副作用较大。选择三氯乙烯脱脂,提取液和三氯乙烯体积比为1:1,处理时间为1h时,酶活损失仅为

3.22%,处理效果理想,实现了清液和不溶性杂质的快速分离。此方法操作简单,可应用于实际生产,能节约分离时间达80%以上,可通过有机溶剂循环利用,有效降低成本。

致谢:作者受四川大学中国成达专项研究奖学金的资助。

参考文献

- [1] Tomoyoshi Fuchise, Hideki Kishimura, Haruo Sekizaki, *et al.* Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*) [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116, 342 - 347.
- [2] Cao M J, Osatomi K, Suzuki M. Purification and characterization of two an ionic trypsin from the hepatopancreas of carp [J]. *Fish Sci*, 2000, 66, 1172 - 1179.
- [3] 唐爱星. 胰酶的絮凝沉淀分离研究[D]. 成都:四川大学, 2005.
- [4] 叶响, 林克, 王洪森, 等. 采用亲和层析法生产高纯度胰蛋白酶的方法: CN, 102911926A (CN201110223112. X) [P]. 2013 - 02 - 06.
- [5] 吴晓英, 张聚宝, 林影, 等. 胰酶制备新工艺的研究[J]. *广东药学院学报*, 2005, 21(1): 64 - 67.
- [6] Kang Kai, Kan Chengyou, Anthony Yeung, *et al.* The immobilization of trypsin on soap-free P(MMA-EA-AA) Latex particles [J]. *Materials Science and Engineering*, 2006, 26, 664 - 669.
- [7] 许浩鸿. 制备高活力胰酶的安全低污染新工艺[J]. *华西药学杂志*, 2005, 20(3): 245 - 246.
- [8] 丁凌霄, 孟俊祥, 龙峥, 等. 胰蛋白酶的提取纯化及酶学性质的研究[J]. *粮食与食品工业*, 2013, 20(2): 40 - 43.
- [9] 何新霞, 冯高德, 张旭. 胰酶生产工艺的研究[J]. *现代应用药学*, 1994, 11(3): 35.
- [10] 田昌林, 鲍忠剑, 田文儒. 丙酮法和碱法脱脂对胶原蛋白生产的影响[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(4): 43 - 47.
- [11] 刘竹青, 陈有亮. 乙酸乙酯萃取法精致蛋黄磷脂的工艺研究[J]. *中国油脂*, 2013, 38(3): 55 - 57.
- [12] 范铮, 宋庆宝, 强根荣, 等. 荞麦籽粒石油醚萃取物化学成分的研究[J]. *林产化工通讯*, 2003, 37: 17 - 19.
- [13] 夏守鉴, 黄明智, 缪进康. 三氯乙烯对骨油色泽的影响[J]. *明胶科学与技术*, 1983, 2: 109 - 110.
- [14] 罗晓民, 丁绍兰, 任龙芳, 等. 制革生产中脱脂剂脱脂效果表征方法的研究[J]. *中国皮革*, 2008, 37(7): 19 - 21.
- [15] 裴怀全, 董晓庆, 宋成成, 等. 不同溶剂及配比对轮虫脂肪提取的影响[J]. *中国水产科学*, 2009, 19(6): 1074 - 1078.
- [16] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(二部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 631 - 633, 848.
- [17] 何杰. 胰蛋白酶活力的快速测定[J]. *中国生化药物杂志*, 1994, 15(1): 54 - 55.
- [18] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准 GB 5009.5—2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [19] 赵小兰. 胰酶制备工艺研究[J]. *青海医药杂志*, 2000, 30(4): 56 - 57.
- [20] 邹丽宜, 吴帖, 崔燎. 四氯化碳对大鼠肝毒性的剂量关系研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2003, 8(2): 158 - 161.
- [21] 陈钢, 苏同福, 赵士举. 萃取剂的极性对葛根总黄酮提取率影响的研究[J]. *河南科学*, 2012, 30(11): 1585 - 1588. ■