

# 猪胃蛋白酶的生产工艺优化研究

饶春, 田倩, 周敏, 何泽超\*

(四川大学化学工程学院, 四川成都 610065)

**摘要:**在不影响胃蛋白酶活性的条件下,对现有的胃蛋白酶生产工艺加以改进,以降低胃蛋白酶产品的丙酮残留量。采用酸法提取胃蛋白酶,用丙酮作沉淀剂,且在2次固液分离中丙酮的加入量分别至溶液比浓度为0.95和0.87效果最佳,酶活收率为140.7 U/(g原料),产品收率为5.38%,比活为8.61 U/mg,5%胃蛋白酶溶液的浊度为1.270 A。利用将产品粉碎后再干燥的方法除去残留的丙酮,通过单因素试验和正交试验,以产品中丙酮残留量及比酶活作为指标,确定的最优工艺条件为:粉碎时间为45 s,干燥温度为20℃,干燥时间为6 h。该工艺参数下得到胃蛋白酶中丙酮残留量仅为0.75%,比酶活为8.72 U/mg,较未处理的胃蛋白酶产品丙酮残留量减少了40.5%,比酶活基本保持不变。

**关键词:**胃蛋白酶;生产工艺;沉淀;丙酮残留量

中图分类号:Q814.1

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2015)03-0094-04

## Optimization of porcine pepsin production process

RAO Chun, TIAN Qian, ZHOU Min, HE Ze-chao\*

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

**Abstract:** To reduce the acetone residues, the optimization of porcine pepsin production process is performed. Using acid extraction technology with acetone as precipitant, the enzyme activity, yield and specific activity are 140.7 U/g (raw material), 5.38% and approximately 8.72 U/mg, respectively. The turbidity of 5% porcine pepsin solution is 1.270 A. The method of crushing and drying pepsin is used to remove the residue of acetone with acetone residues and enzyme activity as an index. The optimum conditions are: 45 seconds of the pulverizing time, 20℃ of the drying temperature and 6 hours of the drying time. Under this condition, the acetone residue is only 0.75% and the specific activity is approximately 8.72 U/mg. Compared with the untreated porcine pepsin, the acetone residues is reduced by 40.5% and the specific activity nearly remains.

**Key words:** pepsin; production process; precipitation; acetone residues

胃蛋白酶是哺乳动物胃肠道中一种重要的蛋白水解酶<sup>[1]</sup>,属天冬氨酸蛋白酶家族<sup>[2]</sup>。他由位于胃壁上皮的胃腺主细胞分泌的胃蛋白酶原在pH 2.0左右的酸性条件下激活而成<sup>[3]</sup>。已激活的胃蛋白酶也可以催化胃蛋白酶原转变成有活性的胃蛋白酶<sup>[4]</sup>。在pH 2.0时胃蛋白酶具有最高活性<sup>[5]</sup>,在中性或者碱性溶液中会自发失活<sup>[6-7]</sup>。目前,蛋白酶是构成世界上工业酶的最重要的组分,约占整个工业酶市场总额的50%<sup>[8]</sup>。胃蛋白酶作为蛋白酶中的一种,广泛应用于医药、食品、轻工以及生物技术等各个领域。

酶的生产过程主要包括:粗酶液的制备、酶的分离纯化、酶浓缩、结晶与干燥等工艺<sup>[9]</sup>。合理设计和优化分离纯化过程可以降低生产成本,有利于酶制剂的大规模工业化生产<sup>[10]</sup>。经丙酮沉淀的胃蛋白酶黏度大(沉淀时呈片状,沉淀后呈膏、块状),产品易吸潮,生产中很难实现机械化脱水分离,且胃蛋白酶中丙酮残留量稍高,过多的残留溶剂会降低药品的稳定性。而且丙酮有对人体产生致畸、致癌的可能性,因此,检测、控制胃蛋白酶产品中的丙酮残

留量是十分重要的环节。在不影响胃蛋白酶活性的条件下,笔者对现有的胃蛋白酶生产工艺加以改进,并探索减少胃蛋白酶产品中丙酮含量的最佳生产工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

猪肚膜:由四川省德阳市生化制品有限公司提供。

电子天平:AR2140型,奥豪斯国际贸易有限公司生产;料理机:JYL-350B型,九阳股份有限公司生产;pH计:8205型,上海科仪有限公司生产;恒温水浴锅:CS501型,重庆试验设备厂生产;搅拌器:JJ-1型,江阴市保利科研器械有限公司生产;冰柜:SC-230LP型,三洋科龙电器生产;电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9030A型,上海鸿都电子科技有限公司生产;台式离心机:80-2型,金坛市科析仪器有限公司生产;回旋式振荡器:HY-5型,金坛市科析仪器有限公司生产;电炉:DL-1型,北京中兴伟业仪器有限公司生产;高效液相色谱仪:Waters 1525双泵,美国沃特斯公司生产;紫外分光光度计:UV-1800

收稿日期:2014-09-19

作者简介:饶春(1991-),女,硕士生,研究方向为制药过程检测及质量控制,raochun1991@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,hezhechao@scu.edu.cn。

型,上海美普达仪器有限公司生产。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 胃蛋白酶的提取

取适量猪肚膜绞碎,加入肚膜质量20%的蒸馏水,充分搅拌均匀,用0.1 mol/L的盐酸溶液调节pH至2.7,在40℃条件下搅拌酸化4 h后,用200目纱网过滤胃浆得粗酶液。

### 1.2.2 胃蛋白酶的沉淀

取5份粗酶液,每份30 mL,分别加入15 mL的蒸馏水,再分别加入45 mL丙酮、乙醇、甲醇、异丙醇和正丁醇。过滤取滤液,搅拌条件下向滤液中分别加入2倍体积的这5种有机试剂,放入4℃的冷藏室静置<sup>[11]</sup>,静置20 h后,取出过滤,将滤饼加入1倍体积的同种有机试剂脱水,再放入4℃冷藏室中静置。4 h后取出抽取上层清液回收,下层沉淀放入40℃烘箱内干燥<sup>[12]</sup>,得胃蛋白酶产品,测定不同有机试剂沉淀分离的胃蛋白酶产品的收率、酶活、蛋白质的质量分数以及5%胃蛋白酶溶液的浊度。

### 1.2.3 胃蛋白酶中丙酮残留量的研究

根据生产经验,分析工艺中影响胃蛋白酶活力、丙酮残留量的各个因素,通过多组单因素实验选出合适的工艺参数范围,主要参考因素有粉碎时间、干燥温度、干燥时间。最后根据单因素实验筛选的影响因素的工艺参数范围,采用L9(3<sup>3</sup>)正交试验表优化试验,正交试验因素水平表如表3所示,以胃蛋白酶的丙酮残留量和比酶活为考察指标进行数据分析,选择最佳工艺条件。

### 1.2.4 测定方法

浊度的测定方法:采用澄清度检查法<sup>[13]</sup>。胃蛋白酶酶活的测定方法:称取酶粉0.100 g,加入pH 3.0乳酸-乳酸钠缓冲液配成500倍的酶粉稀释液,采用福林法<sup>[14]</sup>并参照中华人民共和国专业标准SB/T 10317—1999蛋白酶活力测定法。产品中丙酮残留量测定方法:采用高效液相色谱法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同有机试剂对分离效果的影响

在相同条件下考察不同有机试剂对胃蛋白酶的沉淀效果,如表1所示。

由表1可知,从产品收率来看,丙酮>乙醇>甲醇>异丙醇;从浊度来看,丙酮<乙醇<异丙醇<甲醇;从酶活收率和比酶活来看,甲醇>丙酮>乙醇>异丙醇。综合考虑各因素,用丙酮沉淀得胃蛋白酶产品最佳,原因是由于其介电常数较小且与水的亲

表1 不同有机溶剂沉淀制备胃蛋白酶的结果

有机溶剂	产品收率/%	酶活收率/[U·(g原料) <sup>-1</sup> ]	浊度/A	蛋白质质量分数/[g·(100 g) <sup>-1</sup> ]	比酶活/(U·mg <sup>-1</sup> )	外观
丙酮	5.38	140.7	1.270	65.33	8.61	白色粉末状
乙醇	4.10	123.2	1.602	58.18	8.47	白色粉末状
甲醇	3.53	168.0	1.957	75.62	8.88	白色粉末状
异丙醇	2.39	111.6	1.696	60.70	7.35	棕色粉末状
正丁醇	—	—	—	—	—	—

和力较强,胃蛋白酶中的水分很容易转入有机试剂相,从而使胃蛋白酶沉淀下来<sup>[15]</sup>。

有机试剂沉淀胃蛋白酶时还需注意一些细节。分离沉淀时要低温操作,有机试剂在使用前要预冷,有利于分离<sup>[16]</sup>。有机试剂脱水后的胃蛋白酶要立即干燥,尽量缩短酶与有机试剂直接接触的时间,以免造成酶活损失<sup>[17]</sup>。为提高胃蛋白酶的收率,避免有机试剂的过量使用以节约成本,2次沉淀时加入有机试剂的量应严格控制,因此需要考察加入丙酮的最佳用量。

将粗酶液分为4份,每份30 mL,分别加入15 mL的蒸馏水,再分别加入冷丙酮至溶液比轻度为0.97、0.95、0.93、0.91。过滤取滤液,搅拌条件下向滤液中分别加入冷丙酮至比轻度为0.89、0.87、0.85、0.83,放入4℃的冷藏室静置。静置20 h后,取出过滤,将滤饼加入1倍体积的冷丙酮脱水,再放入4℃冷藏室中静置。4 h后取出抽取上层清液回收,下层沉淀放入40℃烘箱内干燥,得胃蛋白酶产品。比较不同体积丙酮分离得到胃蛋白酶产品的收率和酶活,结果如表2所示。

表2 丙酮沉淀制备胃蛋白酶的结果

比轻度	产品收率/%	酶活收率/[U·(g原料) <sup>-1</sup> ]	比酶活/(U·mg <sup>-1</sup> )	外观
0.97/0.89	4.53	119.6	7.32	白色粉末状
0.95/0.87	5.43	137.5	8.61	白色粉末状
0.93/0.85	3.58	123.8	7.58	白色粉末状
0.91/0.83	1.42	98.2	6.01	白色粉末状

由表2可知,不同比轻度所得的胃蛋白酶的酶活收率和比酶活相差不大,但对产品收率有显著影响。综合考虑,在2次固液分离的丙酮加入量分别为加至溶液比轻度达0.95和0.87为最优条件。

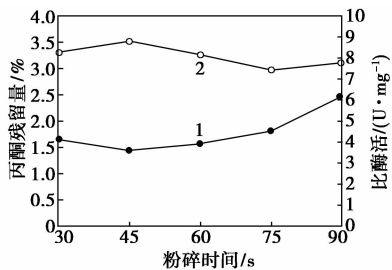
### 2.2 胃蛋白酶中丙酮残留量的研究结果

#### 2.2.1 单因素试验结果

实验所得的胃蛋白酶产品有残留丙酮包裹其

中,影响产品质量,故采用将产品粉碎后干燥的方法除去残留的丙酮。

将胃蛋白酶产品分为 5 份,每份 1 g,分别用料理机粉碎 30、45、60、75、90 s,将粉碎后的产品分别装入相同规格的培养皿中,放入 40℃ 的烘箱内干燥 6 h。测定干燥后产品的比酶活及丙酮残留量。结果如图 1 所示。

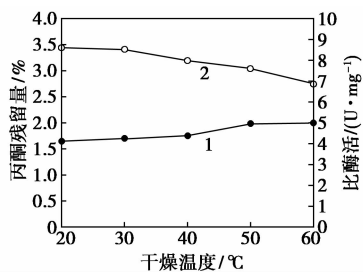


1—丙酮残留量;2—比酶活

图 1 粉碎时间对胃蛋白酶中丙酮残留量和比酶活的影响

由图 1 可以看出,当粉碎时间为 45 s 时,胃蛋白酶产品丙酮残留量最低,比酶活最高。粉碎时间增长,包裹在胃蛋白酶中的丙酮外露,重新干燥后部分丙酮挥发,残留量减少,比酶活增加;粉碎时间过长,粉碎环境中温度增大,影响胃蛋白酶的活性。故选择粉碎时间为 45 s 效果最佳。

将胃蛋白酶产品分为 5 份,每份 1 g,用料理机粉碎 45 s,将粉碎后的产品装入相同规格的培养皿中,分别在室温(20℃左右)、30、40、50、60℃ 的温度下干燥 6 h。测定干燥后产品的比酶活及丙酮残留量。结果如图 2 所示。

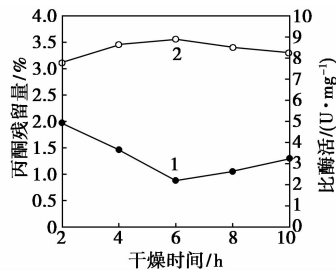


1—丙酮残留量;2—比酶活

图 2 干燥温度对胃蛋白酶中丙酮残留量和比酶活的影响

由图 2 可以看出,干燥温度对胃蛋白酶中丙酮残留量的影响不是很明显,对比酶活的影响反而相对大一些,温度过高,容易导致胃蛋白酶中组分变性。故选择室温(20℃左右)直接放入干燥器中干燥,节约成本,经济可行。

将胃蛋白酶产品分为 5 份,每份 1 g,用料理机粉碎 45 s,将粉碎后的产品分别装入相同规格的培养皿中,放入 40℃ 的烘箱内干燥 2、4、6、8、10 h。测定干燥后产品的比酶活及丙酮残留量,结果如图 3 所示。



1—丙酮残留量;2—比酶活

图 3 干燥时间对胃蛋白酶中丙酮残留量和比酶活的影响

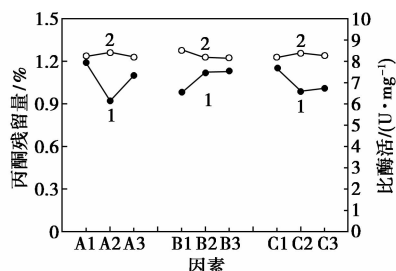
由图 3 可以看出,在干燥 6 h 之前,胃蛋白酶中丙酮残留量呈下降趋势,比酶活持续上升;而干燥 6 h 之后,丙酮残留量又有所上升,比酶活略有下降。由于刚开始时,干燥时间增长有利于丙酮挥发,丙酮残留量持续下降,而干燥时间过长,不利于胃蛋白酶产品中其他成分的保存,故干燥时间选为 6 h 最佳。

### 2.2.2 正交实验结果

对单因素试验结果进行分析,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交试验表优化试验,正交试验因素水平表如表 3 所示。以胃蛋白酶产品的丙酮残留量和比酶活作为考察指标进行数据分析,选择最佳工艺条件。因素指标关系如图 4 所示,正交试验结果如表 4 所示。

表 3 正交试验因素水平表

因素	A	B	C
水平	粉碎时间/s	干燥温度/°C	干燥时间/h
1	30	20	4
2	45	30	6
3	60	40	8



1—丙酮残留量;2—比酶活

图 4 胃蛋白酶中丙酮残留量研究的因素效应图

表4 胃蛋白酶中丙酮残留量研究的正交试验结果

编号	A 粉碎时间/s	B 干燥温度/°C	C 干燥时间/h	丙酮残 留量/%	比酶活/ (U·mg <sup>-1</sup> )
1	30	20	4	1.17	8.36
2	30	30	6	1.15	8.24
3	30	40	8	1.26	8.10
4	45	20	6	0.75	8.72
5	45	30	8	0.97	8.31
6	45	40	4	1.05	8.20
7	60	20	8	1.01	8.40
8	60	30	4	1.22	8.01
9	60	40	6	1.07	8.15
丙酮残留量					
k1	3.58	2.93	3.44		
k2	2.77	3.34	2.97		
k3	3.30	3.38	3.02		
R	0.81	0.45	0.47		
比酶活					
k1	24.70	25.48	24.57		
k2	25.23	24.56	25.10		
k3	24.56	24.42	24.81		
R	0.67	1.06	0.53		

由表4可以看出,以胃蛋白酶中丙酮残留量为指标,在所选取的3个因素范围之内,因素A对丙酮残留量的影响最为显著。以胃蛋白酶比酶活为指标,因素B对比酶活影响最为显著。同时,由图4可知,因素A以第2水平为最好,因素B以第1水平为最好,因素C以第2水平为最好。因此,该工艺的优化工艺是A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>,即粉碎时间为45s,干燥温度为20℃,干燥时间为6h。这组工艺参数下得到胃蛋白酶中丙酮残留量仅为0.75%,比酶活为8.72U/mg,较未处理的胃蛋白酶产品丙酮残留量减少了40.5%,比酶活基本保持不变。

### 3 结论

(1)采用丙酮沉淀最为经济可行,用丙酮沉淀得到的胃蛋白酶产品的酶活收率为140.7U/(g原料),产品收率为5.38%,比酶活为8.61U/mg,5%胃蛋白酶溶液的浊度为1.270A。

(2)采用将产品粉碎后再干燥的方法除去残留的丙酮,综合考虑确定的最优工艺条件为:粉碎时间为45s,干燥温度为20℃,干燥时间为6h。这组工

艺参数下得到胃蛋白酶中丙酮残留量仅为0.75%,比酶活为8.72U/mg,较未处理的胃蛋白酶产品丙酮残留量减少了40.5%,比酶活基本保持不变。该工艺所得的胃蛋白酶产品酶活较高,丙酮残留量较少,达到了提高产品质量的目的。

### 参考文献

- [1] Masaki Suzuki, Yuichi Narita, Sen-ichi Oda, *et al.* Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 1999, 122(2):453-460.
- [2] 李政. 部分生物小分子对胃蛋白酶部分酶学性质影响的初步研究[D]. 成都:四川大学硕士学位论文,2007.
- [3] Gritti I, Banfi G, Roi G S. Pepsinogens: Physiology, pharmacology, pathophysiology and exercise[J]. *Pharmacological Research*, 2000, 41(3):265-281.
- [4] 刘西之, 邱晓燕, 蔡秋风, 等. 青石斑鱼胃蛋白酶原的分离纯化及酶学性质[J]. *水产学报*, 2011, 35(11):1736-1742.
- [5] Darío Spelzinia, José Peleteirob, Guillermo Picóa, *et al.* Polyethylene-glycol-pepsin interaction and its relationship with protein partitioning in aqueous two-phase systems[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 67(6):151-156.
- [6] Xinli Lin, Jeffrey A. Loy, Fredy Sussman, *et al.* Conformational instability of the N- and C-terminal lobes of porcine pepsin in neutral and alkaline solutions[J]. *Protein Science*, 1993, 2(6):1383-1390.
- [7] 冷向军, 李小勤, 王康宁. pH值对胃蛋白酶原激活率影响的研究[J]. *广西农业生物科学*, 2001, 20(1):27-30.
- [8] Ali Bougatef, Rafik Balti, Saïda Ben Zaïed, *et al.* Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences[J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(2):777-784.
- [9] 白利涛, 张丽萍. 酶及蛋白质分离纯化技术研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(14):8018-8020.
- [10] Rajagopalan T G, Stanford Moore, Willuam H Stein. Pepsin from pepsinogen[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1966, 241(21):4940-4950.
- [11] 顾云, 段卫宁. 胃酶—胃膜素联产工艺研究[J]. *肉类工业*, 1994, (9):39-40.
- [12] 喻智伟. 低活力胃蛋白酶的简单处理方法[J]. *生化药物杂志*, 1990, (3):39.
- [13] 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.
- [14] 中华人民共和国商业部. 中华人民共和国专业标准 SB/T 10317—1999[S]. 北京:中国标准出版社, 1999.
- [15] 王伟, 孔明. 胃蛋白酶生产方法研究[J]. *生化药物杂志*, 1989, (12):67-69.
- [16] 王成忠. 胃蛋白酶丙酮脱水生产工艺[J]. *脏器生化制药*, 1982, (12):32-33.
- [17] 周庆元. 胃蛋白酶工艺改革[J]. *生化药物杂志*, 1990, (10):87-88. ■