



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103343114 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 09

(21) 申请号 201310305400. 9

(22) 申请日 2013. 07. 22

(71) 申请人 四川大学

地址 610041 四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号

(72) 发明人 崔瑜霞 余蓉 王欢欢 杨继虞

(51) Int. Cl.

C12N 9/94 (2006. 01)

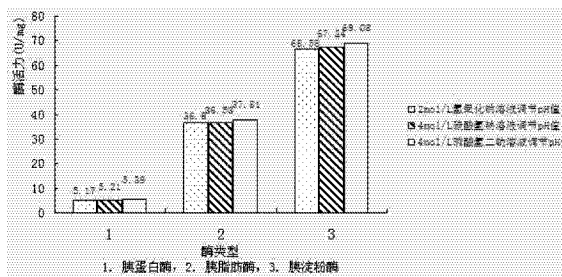
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种制备高活力胰酶的方法

(57) 摘要

以猪胰脏或经中性乙醇提取胰岛素后所剩的胰渣为原料,加入 2% 氯化钙溶液作为活化,同时加入 NaCl、NH₄Cl、蔗糖、淀粉、甘油及吐温 80 适量,4mol·L⁻¹的 Na₂HPO₄溶液调 pH5. 5-7. 0,30 °C 活化 6h,分浆过滤除去残渣后放冷至 4-6 °C,经 PEG-6000 沉淀、丙酮脱脂干燥得胰酶。该实验中所设定的胰酶提取环境,使胰酶收率提高了 16%,三种酶的活力有显著提高,其中胰蛋白酶活力提高 13%,胰淀粉酶提高 26%,胰脂肪酶活力提高 43%,其中活性极易被破坏的胰脂肪酶其活性有较大限度的提高。



1. 一种制备高活力胰酶的方法,以猪胰脏或生产胰岛素后所剩的胰渣为原料,以 200mL/100g 的比例加入提取液,用磷酸盐溶液调 pH 5.5-7.0,30℃活化 6h,分浆过滤除去残渣后放冷至 4-6℃,经 PEG-6000 沉淀和丙酮脱脂干燥后得胰酶,其中,提取液由重量含量分别为 2% 的 CaCl_2 ,0.5% 的 NaCl ,0.5%~0.8% 的 NH_4Cl ,0.5%~1% 的糖,1% 的淀粉,1% 的甘油和 0.1%~1.0% 的吐温 80 组成,所说的糖为蔗糖、海藻糖、葡聚糖中的一种,所说的磷酸盐为 Na_2HPO_4 、 Na_3PO_4 、 K_2HPO_4 中的一种。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于在提取液中加入 NH_4Cl 、 Na_2HPO_4 、蔗糖、及吐温 80 等成分作为保护剂。

一种制备高活力胰酶的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备高活力胰酶的方法,以保证所制备的胰酶有较高的收率和活性。

背景技术

[0002] 动物胰脏素有“酶库”之称,因其含有多种酶,如蛋白水解酶(胰蛋白酶、糜蛋白酶等)、胰脂肪酶、弹性蛋白酶等。胰酶是我国及国际上多国药典收载的助消化药品,用于治疗消化不良及肝脏疾病引起的消化障碍等^[1]。除此之外,胰酶还作为生物酶应用于科学研究。同时,胰酶还多应用于皮革加工、丝绸、纺织、印染等工业部门^[2]。

[0003] 我国对动物胰脏中提取制备胰酶的研究在上世纪 80 年代及 90 年代较多。目前,有关胰酶的制备多采用低浓度有机溶剂(如 25% 乙醇、10% 丙酮、7.5% 异丙醇等)提取,然后用高浓度有机溶剂沉淀,各工艺所生产的胰酶中三酶(胰蛋白酶、胰脂肪酶和胰淀粉酶)活力差异较大,还没有胰酶三酶活力都相对较高的工艺,尤其是胰脂肪酶的活力最容易受到有机溶剂及蛋白酶的破坏,因而通过采用温和的提取及沉淀方式,并添加合适的保护剂来提高各酶活力是优化胰酶生产工艺的一项重要措施。现已有使用壳聚糖替代有机溶剂作为沉淀剂的研究^[3,4]。还有研究者将胰脏用 CaCl_2 水溶液活化后,用 PEG6000 进行沉淀,所得胰酶各酶活性有所提高^[5,6]。

[0004] 除了采用温和的沉淀方法来提高蛋白质产物的收率和活性外,也可以在提取过程中添加合适的保护剂来为目标蛋白提供适宜的存在环境。目前有研究者在提取胰酶的过程中加入保护剂麦芽糖、淀粉、甘油、氯化钠等^[7,8,9]。

[0005] 糖类作为蛋白保护剂应用已久,其保护作用与它们的化学结构有密切关系。它们通常具有 5 个以上的羟基,可以与蛋白质形成氢键以取代水,保证了蛋白质的稳定性;在溶液中它们易结合水分子,发生水合作用,减少了游离水的含量并增加了溶液的粘性,从而减缓晶核的生长过程,使形成的冰晶较细小,以达到保护的目。常用作保护剂的糖类单糖主要有葡萄糖,双糖有蔗糖、海藻糖、乳糖,聚糖有葡聚糖。它们有一个共同的特点就是具有大量的自由羟基,其中,葡萄糖、乳糖具有还原性,而蔗糖、海藻糖、葡聚糖没有还原性。糖的还原性越弱,对蛋白质的稳定保护作用也越强。

[0006] 表面活性剂如吐温 80 等,在临界胶束浓度附近,对蛋白质有稳定和保护作用^[10]。

[0007] 本发明在目前胰酶制备工艺基础上从生产猪胰岛素的胰渣中提取制备胰酶,由于胰酶中各有效成分是溶于水的,因此用水作为提取溶媒安全环保,成本低,制得酶活力高,提取溶媒也可多次回收利用。本发明通过避开有机溶剂的大量使用及添加适宜的保护剂等措施,制备高活力的胰酶。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种在胰酶生产过程中能较大限度地保存各酶的活性同时提高胰酶收率的方法。

[0009] 本发明在制备胰酶的活化液中加入 2%CaCl₂ 溶液,并添加 NH₄Cl、NaCl、蔗糖、淀粉、甘油及吐温 80, Na₂HPO₄ 调 pH 为 5.5 ~ 7.0, 30℃活化 6h, 加入沉淀剂 PEG-6000 搅拌 30min, 4℃冰箱放置 1 h, 离心, 沉淀用两倍体积冷丙酮脱脂两次, 乙醚脱脂一次, 干燥得胰酶。本发明所加的 NH₄Cl、NaCl、Na₂HPO₄ 等盐可以使胰酶生产环境维持一定的离子强度, 适于蛋白质活性的保存。NH₄Cl 对胰脂肪酶的活性有一定的激动作用, 可以提高其活性。蔗糖、淀粉、甘油等对酶等蛋白质都有一定的保护作用, 甘油和吐温 80 对胰脂肪酶的保护作用比较明显, 而在生产胰酶的过程中, 胰脂肪酶的活性最易损失。通过加入本发明所述的上述保护剂, 所制得的胰酶重量回收率为 12% 左右, 三酶活力分别为胰蛋白酶 5.40 U/mg、胰脂肪酶 39.73 U/mg、胰淀粉酶 76.72 U/mg, 三酶活力比为 1:7.4:14.2, 接近天然比例。

[0010] 本发明的特征是在活化液中所加的保护剂的组合为 0.5%NH₄Cl、0.5%NaCl、1%蔗糖、0.2%淀粉、1%甘油及 0.5%吐温 80, 经 4molL⁻¹ 的 Na₂HPO₄ 溶液调 pH 值为 5.5 ~ 7.0。

[0011] 本发明中胰蛋白酶、胰脂肪酶、胰淀粉酶的活力测定方法参照欧洲药典 6.0 版。

[0012] 经本发明的提取液在 30℃活化 6h, 分浆过滤除去残渣后放冷至 4-6℃, 经 PEG-6000 沉淀、丙酮脱脂干燥即得胰酶。

附图说明

[0013] 图 1 不同 pH 调节剂对胰酶中三酶活力的影响

其中条形图从左到右依次表示用 2mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH、4mol/L 碳酸氢钠溶液调节 pH、4mol/L 磷酸氢二钠溶液调节 pH, 各组编号依次表示 1. 胰蛋白酶 2. 胰脂肪酶 3. 胰淀粉酶

图 2 不同 pH 调节剂对胰酶收率的影响

其中条形图从左到右依次代表不同 pH 调节剂, 1. 2mol/L 氢氧化钠溶液、2. 4mol/L 碳酸氢钠溶液、3. 4mol/L 磷酸氢二钠溶液

图 3 吐温 80 添加量对胰酶收率和胰脂肪酶活力的影响

其中两条曲线分别表示吐温 80 添加量对胰酶收率和胰脂肪酶活力的影响

具体实施方式

[0014] 实例 1

本实例考察该配方组成的提取液提取胰酶的效果。50g 胰渣中加入 2%CaCl₂ 溶液 100ml, 搅匀, 并添加 0.5% NH₄Cl、0.5%NaCl、1%蔗糖、1%淀粉、1%甘油及 0.5%吐温 80, 同时用 4molL⁻¹ 的 Na₂HPO₄ 调 pH6.5-7.0。放冷至 4℃后加入 30%PEG260mL, 搅拌 30min, 4℃冰箱放置 1h, 虹吸上清液, 3500r. pm 离心 10min, 沉淀用两倍体积冷丙酮脱脂两次, 乙醚脱脂一次, 干燥得胰酶。采用中国药典 2010 版的方法测定胰酶中胰蛋白酶、胰脂肪酶和胰淀粉酶的活力。与未添加 NH₄Cl、蔗糖、淀粉、甘油及吐温 80 的提取液提取所得的胰酶进行比较。对比结果见表 1, 胰酶收率提高了 16%, 三种酶的活力有显著提高, 其中胰蛋白酶活力提高 13%, 胰淀粉酶提高 26%, 胰脂肪酶活力提高 43%, 三酶比例也接近天然组成。

表 1 该组合配方提取液对胰酶收率及各酶活力的影响

No	添加组合保护剂组				未添加保护剂组			
	收率 (%)	胰蛋白酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰脂肪酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰淀粉酶活力 (U·mg ⁻¹)	收率 (%)	胰蛋白酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰脂肪酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰淀粉酶活力 (U·mg ⁻¹)
1	12.09	5.46	38.36	76.16	10.52	4.87	23.64	56.77
2	12.17	5.51	37.69	74.23	9.87	4.58	19.52	53.81
3	12.23	5.44	38.90	77.51	11.16	4.81	22.08	57.26
$\bar{X} \pm$	12.16	5.47±	38.32±	75.97±	10.52	4.75±	21.75±	55.95±
SD	±0.07	0.04	0.61	1.65	±0.65	0.15	2.08	1.87

实例 2

本实例考察 NH₄Cl 的加入对胰脂肪酶活力的激动作用。对照组除不加 NH₄Cl 外,其余均同前面所述操作。结果除去 NH₄Cl 后,胰酶收率、胰蛋白酶、胰淀粉酶几乎没有变化,胰脂肪酶活力降低 2.6%。结果见表 2。

[0015]

表 2 NH₄Cl 的添加对胰酶收率及酶活力的影响

No	组合保护剂组				除去 NH ₄ Cl 组			
	收率 (%)	胰蛋白酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰脂肪酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰淀粉酶活力 (U·mg ⁻¹)	收率 (%)	胰蛋白酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰脂肪酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰淀粉酶活力 (U·mg ⁻¹)
1	12.17	5.32	38.13	76.21	11.87	5.46	36.82	75.17
2	12.21	5.41	37.87	73.18	12.32	5.38	37.57	76.01
3	11.93	5.49	38.82	79.22	12.09	5.43	37.41	76.42
$\bar{X} \pm$	12.10	5.41± 0.09	38.27±	76.20±	12.09	5.42± 0.04	37.27±	75.87±
SD	±0.15		0.49	3.02	±0.23		0.40	0.64

实例 3

本实例考察蔗糖对胰酶的保护作用,从组合保护剂中除去 1% 的蔗糖,所得胰酶中三种酶的活力均有降低,胰蛋白酶降低 3.7%,胰淀粉酶降低 5.3%,胰脂肪酶降低 5.6%,胰酶收率变化不明显(表 3)。

表 3 蔗糖的添加对胰酶收率及活力的影响

No	组合保护剂组				除去蔗糖组			
	收率 (%)	胰蛋白酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰脂肪酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰淀粉酶活力 (U·mg ⁻¹)	收率 (%)	胰蛋白酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰脂肪酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰淀粉酶活力 (U·mg ⁻¹)
1	11.87	5.27	37.63	75.43	12.06	5.15	35.11	71.24
2	12.18	5.52	37.73	76.08	12.15	5.08	35.69	72.87
3	12.09	5.46	38.39	78.12	12.04	5.02	36.91	72.62
$\bar{X} \pm$	12.05	5.42 ± 0.13	37.92 ±	76.54 ±	12.08	5.22 ±	35.90 ±	72.24 ±
SD	±0.22		0.41	1.40	±0.06	0.07	0.92	0.88

实例 4

本实例考察甘油对胰酶的保护作用,组合保护剂中除去 1% 的甘油,所得胰酶中三种酶的活力均有降低。其中胰蛋白酶活力降低 3.7%,胰淀粉酶活力降低 5.6%,胰脂肪酶活力降低 8.4%,对胰酶收率影响不大,降低了 1% (表 4)。

表 4 甘油的添加对胰酶收率及活力的影响

No	组合保护剂组				除去甘油组			
	收率 (%)	胰蛋白酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰脂肪酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰淀粉酶活力 (U·mg ⁻¹)	收率 (%)	胰蛋白酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰脂肪酶活力 (U·mg ⁻¹)	胰淀粉酶活力 (U·mg ⁻¹)
1	12.01	5.32	37.93	69.82	11.75	5.16	35.62	65.94
2	12.16	5.41	38.27	71.83	12.13	5.28	32.87	66.82
3	12.08	5.49	38.32	71.67	12.08	5.30	36.45	68.63
$\bar{X} \pm$	12.08 ±	5.41 ± 0	38.17 ±	71.11 ± 1.	11.99	5.21 ±	34.98 ±	67.13 ±
SD	0.08	.09	0.21	12	±0.21	0.08	1.87	1.37

[0016] 实例 5

本实例考察吐温 80 对胰酶的保护作用,从组合保护剂中除去 0.5% 的吐温 80,所得胰酶中三种酶的活力也均有降低,其中胰脂肪酶的活力降低尤其明显,约为 12.3%,胰蛋白酶降低约 3.4%,胰淀粉酶降低约 5.1%;吐温 80 对其它两种酶活力的影响相对较小,但吐温的添加会使得胰酶的收率有所下降,下降约 4% (表 5)。

[0017] 实例 5

本实例考察 Na₂HPO₄ 在调节 pH 方面中的作用,分别使用 2molL⁻¹ 氨水溶液、4molL⁻¹ 碳酸氢钠溶液、4molL⁻¹ 磷酸氢二钠,比较胰酶收率及酶活力大小。结果显示(图 1、图 2),通过 4molL⁻¹ Na₂HPO₄ 溶液调节 pH 值,胰酶收率及三酶活力均有较好的效果。

实例 6

本实例考察吐温添加量对胰酶收率及活力的影响。吐温 80 的添加量依次为 0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%，比较所得胰酶的收率和胰脂肪酶活力。结果如图 3 所示，可见在加入吐温 80 的量为 0.5% 时胰脂肪酶活力最高，随着吐温添加量的增加，胰酶收率有所下降，综合考虑之下，可选择 0.5% 的吐温添加量。

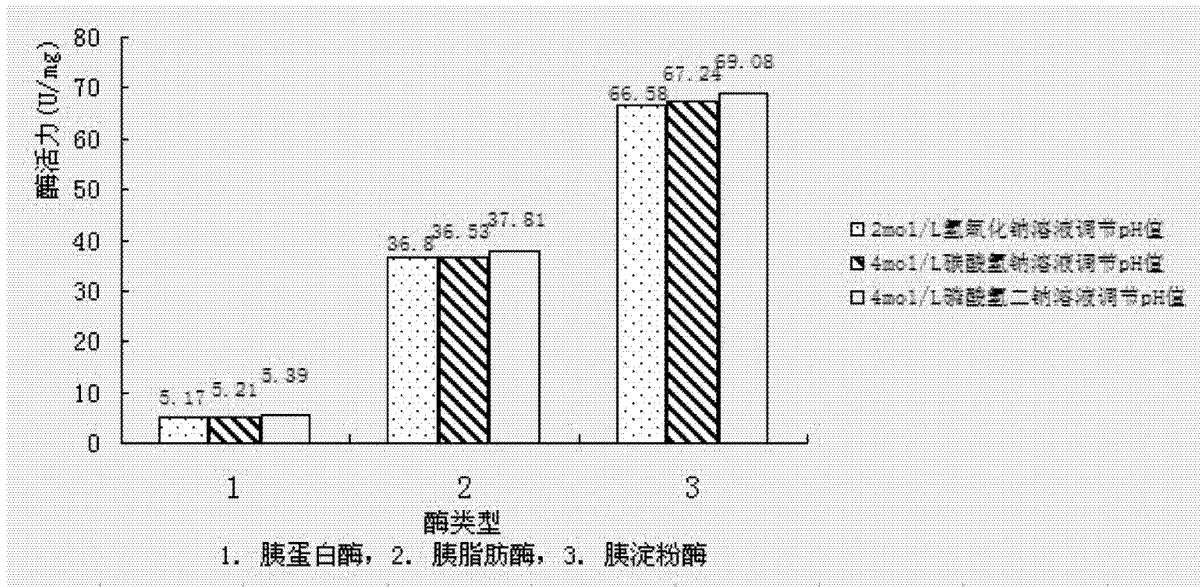


图 1

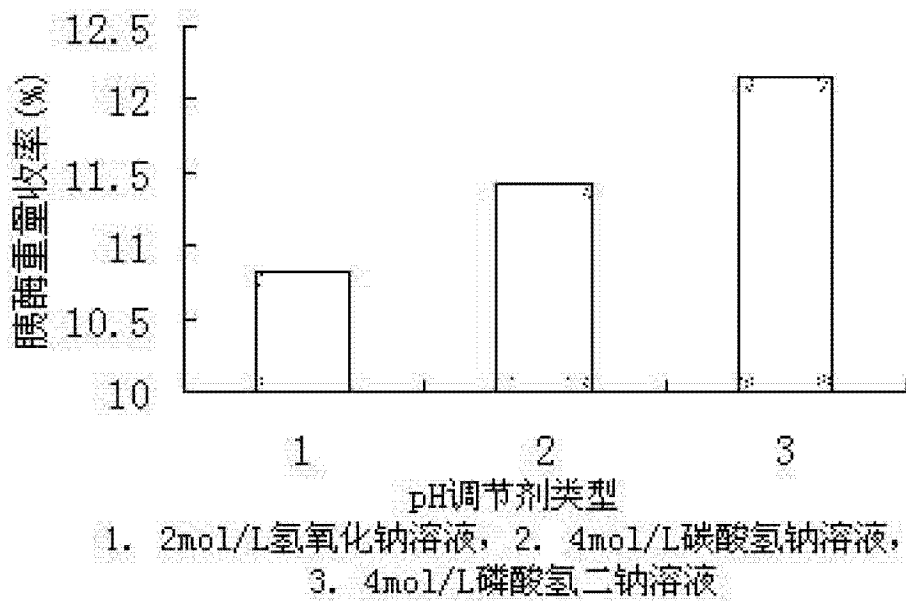


图 2

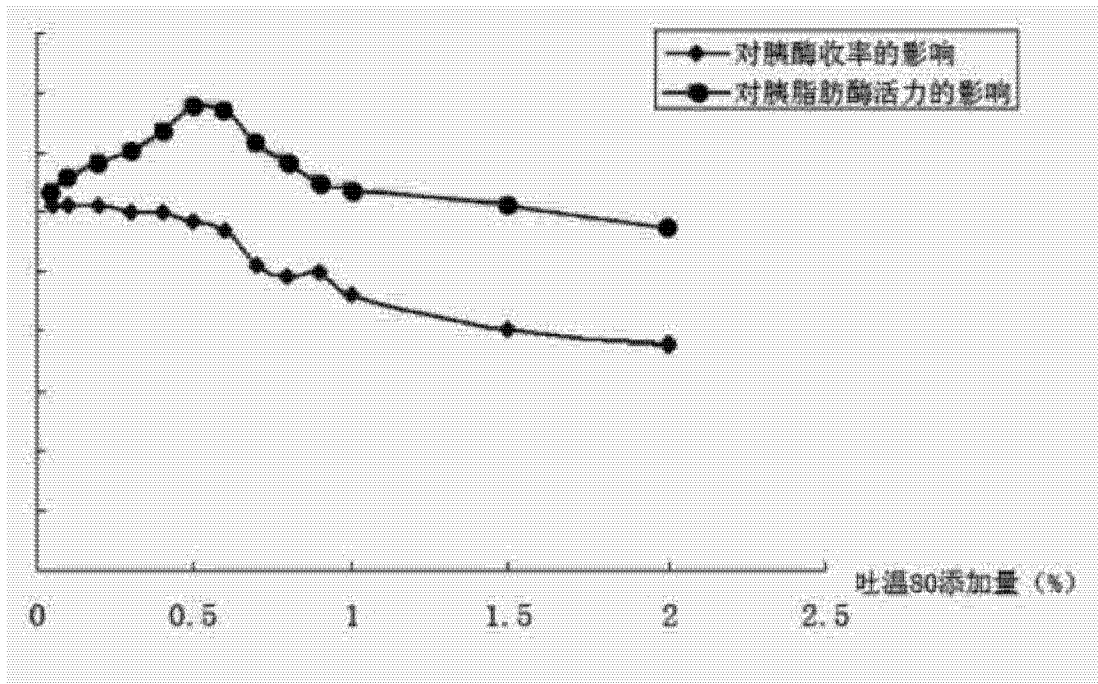


图 3