

鸭空肠液中消化酶粗提纯方法的比较研究

张莉 赵峰* 严峰 米宝民 张宏福

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 本试验旨在比较硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法与低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备鸭空肠液消化酶粉剂的差异。采用两样本完全随机设计, 将8 L鸭空肠液随机分成2组, 每组4个重复, 每个重复1 L肠液。第1组采用硫酸铵沉淀-透析-冻干法, 第2组采用低温浓缩-透析-冻干法, 分别制备消化酶粉剂, 然后对2组制备的粉剂进行脱脂, 比较脱脂前和脱脂后2种方法制备消化酶粉剂的消化酶活性与回收率、总蛋白浓度与回收率及化学成分含量的差异。结果表明: 1) 低温浓缩-透析-冻干法制备的消化酶粉剂中淀粉酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶的活性比硫酸铵沉淀-透析-冻干法分别高34.8%、27.9%和12.1% ($P < 0.05$); 相应地, 3种消化酶回收率及总蛋白回收率比硫酸铵沉淀-透析-冻干法分别高34.8%、35.2%、15.3%和12.6% ($P < 0.05$); 粗蛋白质及粗灰分含量显著低于硫酸铵沉淀-透析-冻干法 ($P < 0.05$), 而粗脂肪含量差异不显著 ($P > 0.05$)。2) 经脱脂处理后, 低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备的消化酶粉剂中淀粉酶、胰蛋白酶活性比硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法分别高11.5%和7.9% ($P < 0.05$), 而糜蛋白酶活性差异不显著 ($P > 0.05$); 淀粉酶和胰蛋白酶回收率比硫酸铵沉淀-透析-冻干法分别高39.4%和43.9% ($P < 0.05$), 而糜蛋白酶回收率差异不显著 ($P > 0.05$); 总蛋白回收率显著高于硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法 ($P < 0.05$), 而总蛋白浓度差异不显著 ($P > 0.05$); 粗蛋白质及粗灰分含量显著低于硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法 ($P < 0.05$), 而粗脂肪含量差异不显著 ($P > 0.05$)。由此可知, 从纯化过程的全程看, 低温浓缩-透析-冻干-脱脂法中淀粉酶、胰蛋白酶活性和回收率均显著高于硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法。

关键词: 北京鸭; 空肠液; 消化酶; 纯化

中图分类号: S834

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2013)10-2363-08

在体外模拟消化中, 模拟消化液的制备一直是核心技术之一。据 Créviu-Gabriel 等^[1]报道, 从生长猪与肉鸡体内获得的胃蛋白酶在酶学特性上, 如针对不同底物的最适 pH、消化能力等方面有较大的差异。由此可见, 在模拟消化液中, 主要消化酶所来源的动物种属与模拟对象的动物种属相一致是提高模拟消化液仿真程度的关键因素之一。因此, 寻求一种快速、有效获取动物体内消化酶的方法迫在眉睫。目前, 在对动物体内的消化

酶提取时, 多采用盐析、透析及超滤等方法进行前处理, 再根据目的酶蛋白的不同, 采用不同型号规格的凝胶层析柱进行过滤, 以相应的缓冲液洗脱并收集峰浓度时的消化酶进行提纯, 如淀粉酶^[2-3]、胰蛋白酶^[4-7]、糜蛋白酶^[6-7]、脂肪酶^[8]等多采用该方法。通过这些方法提纯酶蛋白时, 随着步骤的增加酶蛋白的损失提高, 活性回收率降低。而且, 这些方法获得的酶蛋白的回收率变异较大, 不利于消化酶制备的质量控制。因此, 探讨

收稿日期: 2013-04-16

基金项目: 基本科研业务费专项(2011yq-1); 北京市科技新星计划项(2011098); 科技部创新方法工作专项(2009IM033100)

作者简介: 张莉(1989—), 女, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 从事饲料营养价值的评定。E-mail: douweibahua@163.com

* 通讯作者: 赵峰, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: zsummit@iascaas.net.cn

一套步骤简单、消化酶回收率高且可重复的肠液消化酶粗提方法对解决体外模拟消化中消化酶的来源非常关键。为此,本研究以鸭为试验动物,在前期已建立了鸭肠道痿管的安装方法^[9-10],并可实现从鸭体内大量获取空肠液这一主要原材料的基础上,比较硫酸铵沉淀-透析-冻干法和低温浓缩-透析-冻干法获得的鸭空肠液冻干粉剂在主要消化酶活性与回收率、总蛋白浓度与回收率及化学成分含量上的差异。在此基础上,根据粗提纯肠液消化酶粉剂中化学成分的组成,进一步探讨乙醇脱脂后,硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法和低温浓缩-透析-冻干-脱脂法获得的鸭空肠液冻干粉剂在消化酶活性与回收率上的差异,为最终获得鸭空肠液消化酶粉剂的制备方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验鸭及空肠液的制备

选用 80 只健康、体重基本一致 [(3.25 ± 0.5) kg] 的 18 周龄成年北京公鸭,参考鸭的空肠食糜连续采集方法在卵黄囊憩室部位安装痿管,并进行相应的术后护理^[9-10]。术后第 4、5、6 天试验鸭分别限量饲喂 50、100、150 g 玉米-豆粕型饲料(表 1)。术后第 7 天开始,试验鸭自由采食。待术后恢复 30 d 后,在痿管出口处的皮脂上缝合一中央有孔的瓶盖(孔正好穿过痿管)。3 d 后,按照赵峰等^[9]隔日重复采样的方法于采样日期的 09:30—10:30、13:30—14:30、17:30—18:30 通过收集瓶在低温(0~4 ℃)条件下收集鸭空肠食糜。每次收集后将食糜摇匀,然后全部转移至 250 mL 离心瓶中,于 4 ℃、1 250 × g 条件下离心 10 min。取上清液装于 1 000 mL 样品瓶中,-20 ℃ 保存备用。整个鸭空肠食糜采集期为 4 d,共获得 8 L 制备好的空肠液。

1.2 试验设计

本试验采用两样本完全随机设计,将制备的 8 L 鸭空肠液充分混合均匀,随机分成 2 组,每组 4 个重复,每个重复 1 L 肠液。其中第 1 组采用硫酸铵沉淀-透析-冻干法制备鸭空肠液消化酶粉剂,第 2 组采用低温浓缩-透析-冻干法制备鸭空肠液消化酶粉剂,比较 2 种粗提纯方法制备的消化酶粉剂中主要消化酶(淀粉酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶)活性与回收率、总蛋白浓度与回收率及化

学成分含量的差异。然后在 2 种粗提纯方法的基础上,对制备的鸭空肠液消化酶粉剂进行乙醇脱脂处理,进一步比较硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法与低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备的消化酶粉剂中主要消化酶活性与回收率、总蛋白浓度与回收率及化学成分含量的差异。

表 1 鸭饲料组成及营养水平

Table 1 Composition and nutrient levels of the diet for ducks

项目 Items	含量 Content
原料(风干基础) Ingredients (air-dry basis)	
玉米 Corn	70.34
豆粕 Soybean meal	23.95
DL-蛋氨酸 DL-Met	0.07
L-赖氨酸 L-Lys	0.04
磷酸氢钙 CaHPO ₄	1.68
石粉 Limestone	1.20
食盐 NaCl	0.30
豆油 Soybean oil	1.42
预混料 Premix ¹⁾	1.00
合计 Total	100.00
营养水平(干物质基础) Nutrient levels (DM basis) ²⁾	
干物质 DM	89.68
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.34
粗蛋白质 CP	16.53
粗脂肪 EE	4.96
粗灰分 Ash	5.66
粗纤维 CF	2.14

¹⁾ 预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of the diet: VA 2 500 IU, VD 400 IU, VE 10 IU, VK₃ 0.5 mg, VB₁ 1.8 mg, VB₂ 4.0 mg, VB₆ 3.0 mg, VB₁₂ 0.007 mg, 泛酸 pantothenic acid 11.0 mg, 烟酸 nicotinic acid 55.0 mg, 叶酸 folic acid 0.5 mg, 生物素 biotin 0.12 mg, 氯化胆碱 choline chloride 750 mg, Cu (as copper sulfate) 8 mg, Fe (as ferrous sulfate) 80 mg, Mn (as manganese sulfate) 60 mg, Zn (as zinc sulfate) 40 mg, I (as potassium iodide) 0.35 mg, Se (as sodium selenite) 0.15 mg。

²⁾ 代谢能为计算值,其余为实测值。ME was a calculated value, while the others were measured values.

1.3 鸭空肠液消化酶的粗提纯方法

1.3.1 硫酸铵沉淀-透析-冻干法

依照 0 ℃ 时的硫酸铵饱和度计算表,配制 10 L 饱和硫酸铵溶液,并将其 pH 调节至 7.0;配制 0.1 mol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 3 L 备用。取冷冻的北京鸭空肠液 4 L 左右流水下迅速解冻,

200 目纱布过滤混匀后,用移液器取 6 mL 原肠液分装于 1 mL 离心管中,速冻,待测消化酶活性和总蛋白浓度;其余空肠液取 4 等份各 1 000 mL,每份按 70% 硫酸铵浓度^[11]于冰浴下缓慢并不断搅拌加入 pH 7.0 的饱和硫酸铵溶液 2 333 mL,充分搅拌混合,4 ℃ 冰箱静置 30 min 后于 4 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀用少量 0.1 mol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液复溶,并将复溶物无损失地转入已装好透析袋的玻璃透析管中,连接好进出水管,用蛋白质透析纯化系统透析 200 min(其中 40 min × 2 次 0.1 mol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液透析,40 min × 3 次去离子水透析),透析结束后用 LGJ-4 冻干机冷冻干燥制成鸭空肠液消化酶粉剂。

1.3.2 低温浓缩-透析-冻干法

取冷冻的北京鸭空肠液 4 L 左右于流水下迅速解冻后,经 200 目纱布过滤,混匀后留取 6 mL 肠液于 1 mL 离心管中,速冻,待测消化酶活性与总蛋白浓度。其余肠液取 4 等分各 1 000 mL,倒入 LGJ-4 冷冻干燥机托盘中,冷冻浓缩体积减少 2/3 以上,用少量去离子水复溶后,全部倒入已装好透析袋的透析管中,用蛋白质透析纯化系统透析 200 min(40 min × 5 次去离子水透析)。透析后继续用冻干机冷冻干燥制成鸭空肠液消化酶粉剂。

1.3.3 硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法

将硫酸铵沉淀-透析-冻干法获得的鸭空肠液消化酶粉剂,每个重复取 5 g 放入 G4 玻璃砂芯坩埚中,加入 45 mL 无水乙醇,自流冲洗,共冲洗 3 次。结束后用 LGJ-4 冻干机冷冻干燥制成鸭空肠液消化酶脱脂粉剂。

1.3.4 低温浓缩-透析-冻干-脱脂法

将低温浓缩-透析-冻干法获得的鸭空肠液消化酶粉剂,每个重复取 5 g 放入 G4 玻璃砂芯坩埚中,加入 45 mL 无水乙醇,自流冲洗,共冲洗 3 次。结束后用 LGJ-4 冻干机冷冻干燥制成鸭空肠液消化酶脱脂粉剂。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 主要消化酶活性的测定

α -淀粉酶(EC.3.2.1.1)活性以可溶性淀粉为底物进行测定^[12],淀粉酶活性单位定义为 25 ℃、pH 6.90 条件下每分钟释放 1 μ mol 麦芽糖所具有的活性;胰蛋白酶活性以对-苯磺酸-L-

精氨酸甲酯(TAME)为底物进行测定^[13],胰蛋白酶活性单位定义为 25 ℃、pH 8.10 条件下每分钟释放 1 μ mol 对-甲苯磺酸-L-精氨酸时所具有的活性;糜蛋白酶活性以苯甲酰-L-酪氨酸乙酯(BTEE)为底物进行测定^[14],糜蛋白酶活性单位定义为在 25 ℃、pH 7.80 条件下每分钟释放 1 μ mol 苯甲酰-L-酪氨酸所具有的活性。

1.4.2 总蛋白浓度的测定

采用总蛋白试剂盒(南京建成生物科技有限公司生产)以考马斯亮蓝比色法测定。

1.4.3 化学成分含量的测定

粗蛋白质、粗灰分及粗脂肪含量分别参照 GB/T 6432—1994、GB/T 6438—2007 和 GB/T 6433—2006 测定。

1.5 数据计算与统计分析

消化酶回收率、总蛋白回收率采用如下公式计算:

$$\text{消化酶回收率}(\%) = 100 \times [\text{鸭肠液消化酶粉剂中} \\ \text{消化酶活性}(\text{U/g}) \times \text{粉剂的质量}(\text{g})] / \\ [\text{肠液中消化酶活性}(\text{U/mL}) \times \text{肠液体积}(\text{mL})]; \\ \text{总蛋白回收率}(\%) = 100 \times [\text{鸭肠液消化酶粉剂中} \\ \text{总蛋白的浓度}(\text{mg/g}) \times \text{粉剂的质量}(\text{g})] / \\ [\text{肠液中真蛋白浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{肠液体积}(\text{mL})].$$

试验数据用平均值 \pm 标准差表示,采用 SAS 9.1.3 统计软件对硫酸铵沉淀-透析-冻干法与低温浓缩-透析-冻干法,硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法与低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备的鸭空肠液消化酶粉剂在消化酶活性与回收率、总蛋白浓度与回收率和化学成分含量上分别作两样本的 T 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵沉淀-透析-冻干法与低温浓缩-透析-冻干法制备鸭空肠液消化酶粉剂的消化酶活性与回收率、总蛋白浓度与回收率及化学成分含量的差异

由表 2 可见,从 2 种方法制备的鸭空肠液消化酶粉剂中消化酶活性的差异看,低温浓缩-透析-冻干法制备的粉剂在胰蛋白酶、糜蛋白酶及淀粉酶的活性上分别比硫酸铵沉淀-透析-冻干法所制备粉剂高 27.9%、12.1% 和 34.8% ($P < 0.05$),低温浓缩-透析-冻干法与硫酸铵沉淀-透析-冻干法制备的粉剂在 3 种消化酶活性的平

均变异系数分别为 4.3% 与 5.0%。在消化酶回收率上,低温浓缩-透析-冻干法制备的粉剂在胰蛋白酶、糜蛋白酶及淀粉酶的回收率上分别比硫酸铵沉淀-透析-冻干法所制备粉剂高 35.2%、15.3% 和 34.8% ($P < 0.05$),低温浓缩-透析-冻干法与硫酸铵沉淀-透析-冻干法制备的粉剂在 3 种消化酶回收率的平均变异系数分别为 4.9% 与 8.3%。2 种粗提纯方法制备的粉剂在

总蛋白浓度上无显著性差异 ($P > 0.05$),但在总蛋白回收率上,低温浓缩-透析-冻干法显著高于硫酸铵沉淀-透析-冻干法 ($P < 0.05$)。在 2 种方法制备粉剂的化学成分含量的差异上,低温浓缩-透析-冻干法制备的粉剂在粗蛋白质及粗灰分含量上显著低于硫酸铵沉淀-透析-冻干法 ($P < 0.05$),而 2 方法制备的粉剂在粗脂肪含量上无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 2 硫酸铵沉淀-透析-冻干法与低温浓缩-透析-冻干法制备鸭空肠液消化酶粉剂的消化酶活性与回收率、总蛋白浓度与回收率及化学成分含量

Table 2 Activity and recovery rate of digestive enzyme, concentration and recovery rate of total protein and chemical composition content of duck jejunal digestive enzymes power using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -dialysis-freeze dried method or concentration-dialysis-freeze dried method

项目 Items	硫酸铵沉淀-透析-冻干法 (NH_4) ₂ SO ₄ -dialysis-freeze dried method		低温浓缩-透析-冻干法 Concentration-dialysis-freeze dried method		P 值 P-value
	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	变异系数 CV/%	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	变异系数 CV/%	
消化酶活性 Digestive enzyme activity/(U/g)					
胰蛋白酶 Trypsin	3 037.2 ± 169.5	5.6	3 884.5 ± 123.3	3.2	0.000 2
糜蛋白酶 Chymotrypsin	598.9 ± 35.4	5.9	671.5 ± 41.7	6.2	0.037 9
淀粉酶 Amylase	6 349.7 ± 225.2	3.6	8 556.4 ± 287.5	3.4	<0.000 1
平均值 Mean		5.0		4.3	
消化酶回收率 Recovery rate of digestive enzyme/%					
胰蛋白酶 Trypsin	65.3 ± 4.9	7.5	88.2 ± 3.4	3.9	0.000 3
糜蛋白酶 Chymotrypsin	58.1 ± 3.3	5.7	67.0 ± 4.6	6.9	0.019 8
淀粉酶 Amylase	53.3 ± 6.3	11.8	71.8 ± 2.9	4.0	0.001 7
平均值 Mean		8.3		4.9	
总蛋白浓度 Total protein concentration/(mg/g)	296.3 ± 17.5	5.9	301.6 ± 22.3	7.4	0.103 2
总蛋白回收率 Recovery rate of total protein/%	65.0 ± 2.5	3.8	73.2 ± 2.9	3.9	0.006 2
化学成分含量(干物质基础) Chemical composition content (DM basis)/%					
粗蛋白质 CP	38.6 ± 0.3	0.9	35.5 ± 0.9	2.5	0.045 2
粗灰分 Ash	18.2 ± 0.5	3.0	10.9 ± 0.9	8.4	<0.000 1
粗脂肪 EE	7.3 ± 0.9	12.2	6.7 ± 0.8	11.7	0.076 1

2.2 低温浓缩-透析-冻干-脱脂法与硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法提取鸭肠液酶粉剂的消化酶活性与回收率、总蛋白浓度与回收率及化学成分含量的比较

在采用低温浓缩-透析-冻干法与硫酸铵沉淀-透析-冻干法制备鸭空肠液消化酶粉剂后,发现粉剂中有明显的油迹,化学成分测定也得出 2 种提纯方法获得的粉剂粗脂肪含量在 6.6% 以上(表 2)。因此,对上述 2 种方法制备的粉剂采用无水乙醇脱脂处理,以求降低粉剂中脂肪的含量,提

高消化酶的活性,进一步比较 2 种粗提纯方法的差异。由表 3 可见,低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备的粉剂在胰蛋白酶和淀粉酶活性上分别比硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法所制备粉剂高 7.9% 和 11.5% ($P < 0.05$),而糜蛋白酶的活性差异不显著 ($P > 0.05$)。低温浓缩-透析-冻干-脱脂法与硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法制备的粉剂在 3 种消化酶活性的平均变异系数分别为 3.9% 与 4.2%。在消化酶回收率上,低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备的粉剂在胰蛋白酶

和淀粉酶回收率上分别比硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法所制备粉剂高 43.9% 和 39.4% ($P < 0.05$), 而糜蛋白酶活性回收率差异不显著 ($P > 0.05$)。低温浓缩-透析-冻干-脱脂法与硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法制备的粉剂中 3 种消化酶回收率的平均变异系数分别为 9.0% 与 9.9%。2 种粗提纯方法制备的粉剂在总蛋白浓度上无显著性差异 ($P > 0.05$), 但在总蛋白回收率

上, 低温浓缩-透析-冻干-脱脂法显著高于硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法 ($P < 0.05$)。在 2 种方法制备粉剂的化学成分含量的差异上, 低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备的粉剂在粗蛋白质及粗灰分含量上显著低于硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法所制备粉剂 ($P < 0.05$), 而 2 种方法制备的粉剂在粗脂肪含量上无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 3 硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法与低温浓缩-透析-冻干-脱脂法提取鸭空肠液消化酶粉剂的消化酶活性与回收率、总蛋白浓度与回收率及化学成分含量的差异

Table 3 Activity and recovery rate of digestive enzyme, concentration and recovery rate of total protein and chemical composition content of duck jejunal digestive enzymes power using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -dialysis-freeze dried-defat method or concentration-dialysis-freeze dried-defat method

项目 Items	硫酸铵沉淀-透析- 冻干-脱脂法 (NH_4) ₂ SO ₄ -dialysis-freeze dried-defat method		低温浓缩-透析- 冻干-脱脂法 Concentration-dialysis-freeze dried-defat method		P 值 P-value
	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	变异系数 CV/%	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	变异系数 CV/%	
消化酶活性 Digestive enzyme activity/(U/g)					
胰蛋白酶 Trypsin	4 107.2 ± 136.0	3.3	4 432.0 ± 103.5	2.3	0.009 0
糜蛋白酶 Chymotrypsin	796.0 ± 55.2	6.9	839.5 ± 47.2	5.6	0.276 0
淀粉酶 Amylase	8 584.3 ± 206.2	2.4	9 572.5 ± 362.5	3.8	0.003 2
平均值 Mean		4.2		3.9	
消化酶回收率 Recovery rate of digestive enzyme/%					
胰蛋白酶 Trypsin	56.4 ± 6.1	10.7	81.1 ± 4.9	6.0	0.000 7
糜蛋白酶 Chymotrypsin	50.8 ± 5.0	9.9	60.0 ± 7.2	12.0	0.082 4
淀粉酶 Amylase	45.3 ± 4.1	9.1	63.2 ± 5.6	8.9	0.002 2
平均值 Mean		9.9		9.0	
总蛋白浓度 Total protein concentration/(mg/g)	383.0 ± 30.5	8.0	345.6 ± 19.5	5.6	0.111 7
总蛋白回收率 Recovery rate of total protein/%	52.8 ± 2.0	3.8	67.3 ± 3.4	5.1	0.008 5
化学成分含量(干物质基础) Chemical composition content (DM basis)/%					
粗蛋白质 CP	42.4 ± 0.4	0.8	38.8 ± 0.4	1.1	<0.000 1
粗灰分 Ash	22.4 ± 0.8	3.7	12.2 ± 0.7	5.7	<0.000 1
粗脂肪 EE	2.9 ± 0.4	14.1	3.2 ± 0.3	10.3	0.067 3

3 讨论

在蛋白质纯化中, 一般采用一定浓度的硫酸铵溶液沉淀目的蛋白质, 然后通过透析去除硫酸铵及小分子物质后, 干燥得到目的蛋白质的初级提取物。该方法通过沉淀目的蛋白质可以快速地去除溶液中的水分及其他物质。然而, 该方法是通过降低蛋白质的溶解度而沉淀蛋白质, 其水溶

液中仍有一部分溶解的目的蛋白质被丢弃。特别是在肠液消化酶的纯化中, 淀粉酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶的等电点分别处于 4.5 ~ 4.6^[15]、10.1 ~ 10.5^[7,16]、8.1 ~ 8.6^[7,16], 采用中性硫酸铵溶液沉淀酶蛋白时, 溶液的 pH 并不处于各消化酶的等电点, 这导致水溶液中目的蛋白质的浓度并不是最低值。因此, 采用硫酸铵沉淀酶蛋白需要着重考虑回收率能否接受。

低温浓缩是对冷冻的样品在低温低压条件下,从冻结状态不经过液态直接升华,达到去除部分水分的目的,然后通过透析去除小分子物质后,干燥得到蛋白质的初级提取物。该方法只有在透析过程中去除了低分子质量的物质,而目的蛋白质被留在透析袋中,因此,该方法回收率较为理想,但是低温浓缩过程消耗时间比较长。本试验在硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法与低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备鸭空肠液消化酶粉剂的过程中,在脱脂前处理的差异上,低温浓缩-透析-冻干法制备的鸭空肠液消化酶粉剂在3种消化酶粉剂的活性与回收率上均显著高于硫酸铵沉淀-透析-冻干法。这一结果与硫酸铵在沉淀酶蛋白时,仍有部分酶蛋白溶解在溶液中的现象相对应。硫酸铵沉淀-透析-冻干法制备的鸭空肠液消化酶粉剂在粗灰分与粗蛋白质的含量上显著高于低温浓缩-透析-冻干法,而两者总蛋白浓度接近,这表明,硫酸铵沉淀-透析-冻干法制备的粉剂可能存在硫酸铵的残留。同时,2种方法获得的粉剂在粗灰分的含量上都很高(10%以上),这可能是由于透析中无机小分子物质去除不理想。脱脂处理后,硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法与低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备粉剂的消化酶活性比脱脂前分别平均提高了34%和17%。这一方面与粉剂中脂肪含量的降低有关;另一方面,由于粉剂中脂肪含量的降低,使得消化酶的水溶性更好,降低了脂肪对消化酶与底物接触的干扰。脱脂后,2种方法的消化酶回收率均有下降,这说明脱脂过程对消化酶可能有部分破坏作用。在鸭空肠液消化酶提取过程中,低温浓缩-透析-冻干-脱脂法制备的粉剂在消化酶活性与回收率均比硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法高,且变异系数比硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法低。因此,低温浓缩-透析-冻干-脱脂法在制备鸭空肠液消化酶粉剂的效率上优于硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法。然而,在粗提纯消化酶粉剂的杂质含量上,硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法与低温浓缩-透析-冻干-脱脂法中总蛋白浓度占有有机物的比例为分别为49%与39%,这也表明硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法分离酶蛋白与其他有机物的效果比低温浓缩-透析-冻干-脱脂法好。在进一步的纯化过程中,如粗提纯消化酶粉剂的无机物能被分离,则硫

酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法获得的酶蛋白的纯度及活性将高于低温浓缩-透析-冻干-脱脂法。

4 结 论

① 低温浓缩-透析-冻干法制备的消化酶粉剂中,淀粉酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶的活性与回收率均显著高于硫酸铵沉淀-透析-冻干法。

② 低温浓缩-透析-冻干-脱脂法在淀粉酶、胰蛋白酶活性与回收率均显著高于硫酸铵沉淀-透析-冻干-脱脂法,而在糜蛋白酶的活性与回收率上2种方法间差异不显著。

参考文献:

- [1] CRÉVIEU-GABRIEL I, GOMEZ J, CAFFIN J P, et al. Comparison of pig and chicken pepsins for protein hydrolysis[J]. *Reproduction Nutrition Development*, 1999, 39(4): 443-454.
- [2] GUBERN G, CANALIAS F, GELLA F J, et al. Production and certification of an enzyme reference material for pancreatic α -amylase (CRM 476)[J]. *Clinica Chimica Acta*, 1996, 251(2): 145-162.
- [3] 王海英. 大菱虾主要消化酶——蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶的研究[D]. 博士学位论文. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [4] TRAVIS J, ROBERTS R C. Human trypsin, isolation and physical-chemical characterization[J]. *Biochemistry*, 1969, 8(7): 2884-2889.
- [5] LU B J, ZHOU L G, CAI Q F, et al. Purification and characterization of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish[J]. *Food Chemistry*, 2008: 352-360.
- [6] GUYONNETA V, TLUSCIK F, LONGA P L, et al. Purification and partial characterization of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin, chymotrypsin and elastase from the chicken[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 852(1): 217-225.
- [7] 杨锋. 鲫鱼肝胰脏中胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的分离纯化及性质研究[D]. 硕士学位论文. 厦门: 集美大学, 2009.
- [8] GIDEZ L I. Purification of rat pancreatic lipase[J]. *Journal of lipid research*, 1968, 9(6): 794-798.
- [9] 赵峰, 张子仪, 侯水生. 鸭空肠食糜连续采集方法及其空肠套管的设计[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(7): 672-675.
- [10] ZHAO F, HOU S S, ZHANG H F, et al. Effect of dietary metabolizable energy and crude protein content

- on the activities of digestive enzymes in jejunal fluid of Peking duck[J]. Poultry Science, 2007, 86: 1690 – 1695.
- [11] 胡光源. 生长猪小肠仿生消化试剂设计依据的研究[D]. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [12] DAHLQVIST A. A method for the determination of amylase in intestinal content[J]. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 1962, 14 (2): 145 – 151.
- [13] WIRNT R. Trypsin, measurement with N α -p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester as substrate[M]// Bergmeyer H U. Methods of enzymatic analysis. Weinheim: Verlag Chemie, 1974: 1021 – 1024
- [14] WIRNT R. Chymotrypsin measurements with N-benzoyl-L-tyrosin methyl ester as substrate[M]// Bergmeyer H U. Methods of enzymatic analysis. Weinheim: Verlag Chemie, 1974: 1009 – 1012.
- [15] ZENG F, COHEN A C. Demonstration of amylase from the zoophytophagous anthocorid *Orius insidiosus* [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2000, 44(3): 136 – 139.
- [16] SCHEELE G, BARTELT D, BIEGER W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis [J]. Gastroenterology, 1981, 80(3): 461 – 473.

A Comparison of Methods for Purifying Digestive Enzymes in Jejunal Fluid of Ducks

ZHANG Li ZHAO Feng* YAN Feng MI Baoming ZHANG Hongfu

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100193, China)

Abstract: This experiment was conducted to compare the difference between $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -dialysis-freeze dried-defat (ADFDD) method used and concentration-dialysis-freeze dried-defat (CDFDD) method to purify the digestive enzymes of jejunal fluid of ducks. A two-sample completely randomized design was adopted. Eight liters of duck jejunal fluid were divided into 2 groups with 4 replicates per group, and each replicate contained 1 L jejunal fluid. The 2 groups of jejunal fluid were randomly selected to be treated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -dialysis-freeze dried (ADFD) method or concentration-dialysis-freeze dried (CDFD) method to prepare the digestive enzyme dry powder. Then, the methods of ADFDD and CDFDD were established by defatting the dry powder, respectively. The activities and recovery rates of digestive enzymes, total protein concentration and chemical composition content of digestive enzymes dry power prepared by the methods of ADFD and CDFD, or the methods of ADFDD and CDFDD were compared. The results showed as follows: 1) the activities of amylase, trypsin and chymotrypsin of dry power prepared by CDFD method were 34.8%, 27.9%, and 12.1%, which were significantly greater than those of dry power prepared by ADFD method ($P < 0.05$), respectively; the recovery rates of amylase, trypsin, chymotrypsin and total protein by CDFD method were 34.8%, 35.2%, 15.3% and 12.6%, which were significantly greater than those by ADFD method ($P < 0.05$); the concentrations of crude protein and crude ash in dry power prepared by CDFD method were significantly lower than those of dry power prepared by ADFD method ($P < 0.05$), but no significant difference was observed in the concentration of ether extract ($P > 0.05$). 2) After ethanol defatted, the activities of amylase and trypsin of dry power prepared by CDFDD method were 11.5% and 7.9%, which were significantly greater than those of dry power purified by ADFDD method ($P < 0.05$), but no significant difference was observed in the chymotrypsin activity ($P > 0.05$); the recovery rates and the activities of amylase and trypsin in CDFDD method were 39.4% and 43.9%, which were greater than those by ADFDD method ($P < 0.05$), but no significant difference was observed in the recovery rate of the chymotrypsin activity ($P > 0.05$); the recovery rate of total protein by CDFDD method was significantly greater than that by ADFDD method ($P < 0.05$), but no significant difference was observed in the concentration of total protein in dry power prepared by these two methods ($P > 0.05$); the concentrations of crude protein and crude ash in dry power prepared by CDFDD method were significantly lower than those in dry power prepared by ADFDD method ($P < 0.05$), but no significant difference was observed in the concentration of ether extract ($P > 0.05$). From the entire purification process, the activities of amylase and trypsin and their recovery rates by dry power purified by CDFDD method are greater than those of ADFDD method. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25 (10): 2363-2370]

Key words: Beijing duck; jejunal fluid; digestive enzymes; purification

* Corresponding author, associate professor, E-mail: zsummit@iascaas.net.cn