

利用親和層析法分離豬胰臟蛋白質水解酵素 Trypsin
和 Chymotrypsin 之中間規模試驗

Pilot-Test Scale Affinity Chromatographic Purification of
Trypsin and Chymotrypsin from Hog Pancreas

蘇仲卿 張珍田 莊榮輝

抽印自中國農業化學會誌第十九卷第三、四期

Reprinted from Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society

Vol. 19, No. 3~4, Taipei, Republic of China, June, 1981

利用親和層析法分離豬胰臟蛋白質水解酵素 Trypsin 和 Chymotrypsin 之中間規模試驗

蘇仲卿 張珍田 莊榮輝

臺灣大學農業化學系

(接受刊載日期：中華民國 70 年 10 月 18 日)

以連結有專一性抑制劑的蟹殼幾丁質 (chitin) 為不溶性親和吸著劑，來純化胰臟中 trypsin 及 chymotrypsin 的方法，在本實驗中加以擴大為中間規模試驗 (pilot test)。胰臟可不經丙酮粉末步驟，直接活化。抽出液先後經過兩支 4 l 管柱：第一支管柱裝 CHOM-chitin 吸著劑，可特異地吸附 trypsin；第二支裝 DKOM-chitin 吸著劑，可吸附 trypsin 及 chymotrypsin。結果每次操作 (使用 1.5 kg 胰臟) 可生產 trypsin 粉末 2 至 4 gm 及 Chymotrypsin 粉末 1.5 至 3 gm。產品 trypsin 之比活性很高，每 mg 固體達 40 BAEE 單位，且不含 Chymotrypsin 活性；但 Chymotrypsin 產品只得每 mg 6 TEE 單位活性，且夾雜 2 BAEE 單位 trypsin 活性。所得粉末在碟形電泳上均出現五條環帶，故尚非均質，須進一步純化。本法以一段法用 glutaraldehyde 將結合基 (抑制劑) 與幾丁質鍵結，然後再以 NaBH₄ 還原 Schiff's base，結果可以增加鍵結之穩定性。由所得資料略估得失，與商品比較，優劣互見。但若在某些方面加以改進，則其正式應用於工業化生產酵素，乃十分可行。

Pilot-Test Scale Affinity Chromatographic Purification of Trypsin and Chymotrypsin from Hog Pancreas

Jong-Ching Su, Chen-Tien Chang, and Rong-Huay Juang

*Department of Agricultural Chemistry,
National Taiwan University*

(Received for publication, October 18, 1981)

The purification method of trypsin and chymotrypsin by affinity chromatography utilizing inhibitor-bound chitin was scaled up in this pilot test experiment. The pancreas was activated directly without the acetone powder step. The activated extract was passed through two 4-liter columns in series. The first CHOM-chitin column can bind trypsin specifically and the second DKOM-chitin column may bind chymotrypsin and residual trypsin. Each operation, started with 1.5 kg pancreas, produced 2 to 4 grams of trypsin powder and 1.5 to 3 grams of chymotrypsin powder. The specific activity of the trypsin product was 40 BAEE units per mg solid without chymotrypsin activity. But the chymotrypsin product reached only 6 TEE units per mg solid, and was contaminated with 2 BAEE units of trypsin activity. Both products were analyzed in disc polyacrylamide gel electrophoresis, and 5 bands were found in each case. So they are not homogeneous enzymes yet, and further purification is needed. We used one-step method in the coupling of ligands to chitin by using glutaraldehyde as the bridge compound. Then the Schiff's base was reduced by NaBH₄ in order to improve the stability of the linkage. When compared with the commercial products, it was realized that some improvements in the purification procedure are needed before the method can be applied in the industrial production of pancreatic enzymes.

緒 言

豬胰臟除了含有胰島素之外，尚有很高量的蛋白質消化酵素，其中以 trypsin、chymotrypsin、carboxypeptidase A 及 B 最多，這些酵素可作為臨床醫藥、生化試劑及食品加工之用⁽¹⁻⁸⁾。而工業上抽取這些酵素的方法，屬於商業秘密，不易獲知；文獻上所記載者僅止於實驗室規模⁽⁴⁻⁶⁾，且均為古典蛋白質抽取精製方法，操作繁雜，收率亦低。近年來一種新的酵素純化技術——親和層析法^(7,8)——已成功地被應用在純化胰臟的蛋白質水解酵素⁽⁹⁾。此親和層析法利用蟹殼幾丁質為不溶性擔體⁽¹⁰⁾，其上固定著具有特殊親和力的結合基 (ligand)，可以特異地吸著所欲分離的物質，在洗去其他雜質後，可以用酸液洗下純度頗高的產品。由於此種結合基具特異性，往往一步即可達理想的純化效果，可省去許多繁複的操作。

鑑於本省年宰豬隻不下六百萬頭，可得一千噸以上的胰臟，目前這些胰臟大部分只供炸製低級豬油，少數冷藏運往國外供作提製生化製品。本於高度利用本國資源的原則，實有開發大規模抽取胰臟蛋白質水解酵素技術的必要。此外，本省漁撈發達，每年有大量濕蟹殼剩餘⁽¹¹⁾，一般均作為廢棄物，而本親和層析法即利用蟹殼中所含之幾丁質做為不溶性擔體，取代了以 Agarose 等昂貴物品作為擔體的方法，大大地降低成本。因此，本實驗不但可充分利用本省出產的各種有用但廉價的資源，且符合發展技術密集工業之要求。

本報告乃敘述將實驗室規模⁽⁹⁾擴大為中間規模實驗的結果。設立兩支 4l 大型管柱，用以大量分離胰臟中之 trypsin 及 chymotrypsin，並在某些技術方面加以改良。所得資料將用來考慮進一步工業化之可能性。

材 料 及 方 法

1. 豬胰臟及其抽取法

本實驗所使用之豬胰臟，均由三牧企業有限公司惠予贈送。胰臟送至實驗室時，大部分已凍結成塊（於零下 20°C 貯存），有一小部分為剛剛屠宰之溫體胰臟。上述胰臟均保存於零下 20°C 凍箱，抽取時，先將胰臟切碎，加入四倍 (v/w) 活化緩衝液 (0.1 M Tris-HCl 含 0.1 M CaCl₂, pH 8.0)，在果汁機中打一分鐘，然後置 4°C 下活化三至五天。使用時，先撈去液面的白色浮渣，加入 10~20% (v/v) 氯仿，再以果汁機打一分鐘後，離心十分鐘 (2,500 × g)。倒出上層液，得到澄清金黃色抽取液 (PX)。若上清不甚澄清，則須加 Celite 過濾一次。

2. Trypsin 及 Chymotrypsin 活性之測定

Trypsin 以 *N*-(α)-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) 為基質，每一單位之 trypsin 活性係指每一分鐘能水解 0.94 mM 濃度 BAEE 1 μmole 的 trypsin 量⁽¹²⁾。

Chymotrypsin 以 *L*-tyrosine ethyl ester (TEE) 為基質，每一單位之 chymotrypsin 活性係指每一分鐘能水解 0.94 mM 濃度 TEE 1 μmole 之 chymotrypsin 量⁽¹²⁾。

3. 螃蟹殼幾丁質 (chitin) 之精製

粗蟹殼得自基水食品公司，以微鹼液浸漬過夜，洗淨曬乾，磨成約 20 mesh 之顆粒。依 Stanley 氏的方法⁽¹⁰⁾，先用 6 N HCl 中和蟹殼中的碳酸鈣，直至不再產生氣泡為止。用清水洗過，再以 5 N KOH 煮沸 3 小時。用水洗過，以 KMnO₄ 液 (0.5%) 浸 1 小時，再水洗，加 1% 草酸溶液在 60~70°C 煮半小時，得到純白蟹殼幾丁質。沖水洗去草酸後，浸在飽和 thymol 水溶液中，於 4°C 下保存。

縮寫：CHOM=Chicken Ovomuroid；DKOM=Duck Ovomuroid；PX=Pancreas Extract；PXX=PX 通過 CHOM-chitin 管柱後，未吸著部分；PXXX=PXX 通過 DKOM-chitin 管柱後，未吸著部分；TCA=Trichloroacetic acid。

4. CHOM 及 DKOM 之抽取

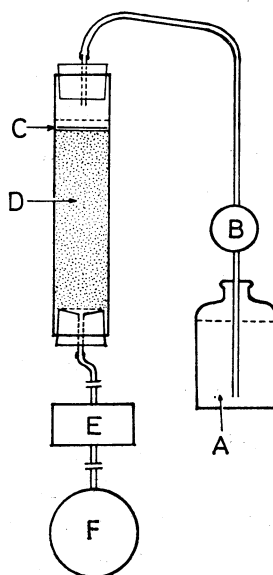
CHOM 及 DKOM 之抽取法乃參考 Lineweaver 及 Murray⁽¹³⁾ 的方法，並稍加修改。取雞蛋或鴨蛋之卵白（每次處理 6 kg 蛋，約 2,000 ml 卵白），加等體積之 TCA-丙酮混合液（0.5 M TCA：丙酮=1：2，v/v），邊加邊攪拌，成爲白色雪糕狀，pH 調至 3.5 左右，再均勻攪拌 15 分鐘。然後離心 20 分鐘（8,000×g），取上清，加入 2 至 2.5 倍體積之丙酮，生成沉澱，靜置 4°C 30 分鐘，虹吸吸去上層液，再離心 20 分鐘（6,000×g），取出沉澱溶於水（約 400 ml），pH 調至 4.5，在 4°C 下對水透析（5 l × 2 次）。透析後若生沉澱，則離心去除之。再加四倍丙酮使生沉澱，離心 20 分鐘（8,000×g），倒掉上清，挖出沉澱塊，在布氏漏斗中先用丙酮洗之，再用乙醚洗過，於真空中抽乾，可得白色粉末。每 2,000 ml 卵白大約可得 20~25 gm 固體。

5. CHOM 或 DKOM 與幾丁質鍵結

CHOM 或 DKOM 均以一段法⁽⁹⁾直接和幾丁質鍵結。精製之白色幾丁質以布氏漏斗儘量抽去水分，稱重。每 gm 幾丁質加 5 ml CHOM 水溶液（6 mg/ml）或 5 ml DKOM 水溶液（4 mg/ml）。混合後，加入適量 glutaraldehyde（25%），使其最終之 glutaraldehyde 濃度爲 0.5%。以螺旋攪拌器在室溫下攪拌一小時後，置 4°C 下過夜。然後在布氏漏斗中用水洗若干次，浸在 0.1 M Tris-HCl（pH 7.3）緩衝液中備用。爲增加親和吸附劑之穩定性，鍵結後之幾丁質每 gm 濕重加入 5 ml NaBH₄ 溶液⁽¹⁴⁾（30 mg NaBH₄ 溶於 5 ml 0.05 M Tris-HCl 緩衝液，pH 7.3，用時製備），攪拌 30 分鐘後，用水洗淨，加入 0.05 M Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）；再於室溫下攪拌 3 小時後，移入 4°C 中靜置過夜。

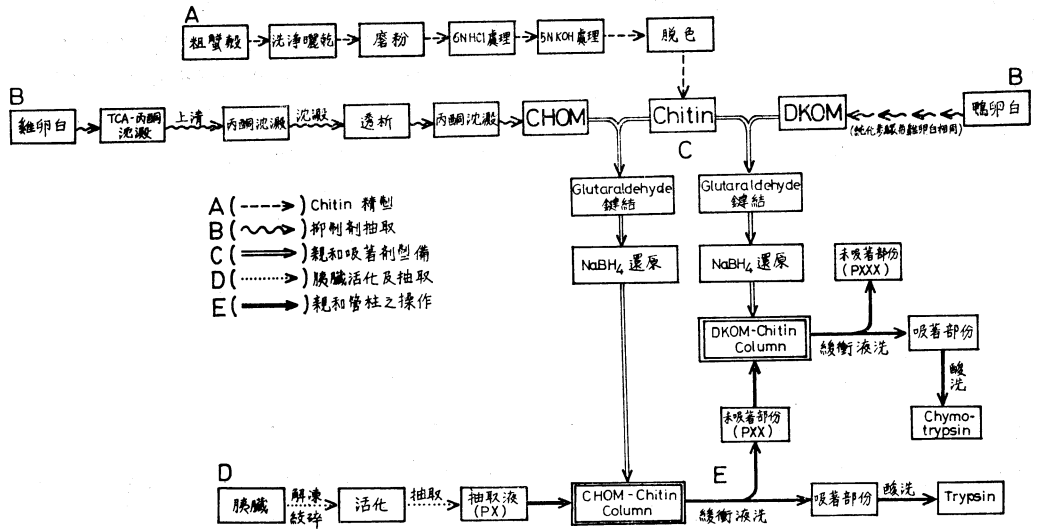
6. 親和層析管柱之設立與操作

本實驗所用之管柱爲兩支內徑 10 cm，長 70 cm 之大玻璃管，上下以橡皮塞塞住，通以玻璃管爲出入口，裝置如圖一。兩管柱各填充約 1,800 gm（約 4 l）的 CHOM-chitin 或 DKOM-chitin，以便分別親和吸著 trypsin 及 chymotrypsin。樣品以 pump（ISCO 1612 型）打入管柱，由出口流出，出口接一檢示器（ISCO UA-5，波長 280 nm），以大型分割收集器（ISCO 568 型）收集流出液。



圖一 親和層析管柱操作系統簡圖

- | | |
|----------------|-----------|
| A：樣品或緩衝液 | D：親和吸著劑 |
| B：Pump | E：檢示器 |
| C：濾紙（覆蓋於吸著劑上方） | F：大型分割收集器 |



圖二 本實驗工作之詳細操作流程圖，可略分為五個部分（圖中標示以A、B、C、D及E）。

由於 CHOM-chitin 只對 trypsin 有吸附作用，而 DKOM-chitin 則對 trypsin 及 chymotrypsin 均有吸附作用。因此，胰臟抽取液 PX 先通入 CHOM-chitin 管柱，其中的 trypsin 即可被吸著，其餘物質便以 pH 7.3 緩衝液 (0.05 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl 及 0.05 M CaCl₂) 洗出 (稱為 PXX)，以分劃收集器收集。然後 CHOM-chitin 管柱改用 pH 2.5 緩衝液 (0.5 M 甲酸) 洗下 trypsin。而 PXX 的每一分劃做 trypsin 活性分析，取無 trypsin 活性的分劃通入 DKOM-chitin 管柱，同樣以 pH 7.3 液洗去不能吸附部分後，再改用 pH 2.5 甲酸液洗下 chymotrypsin。各管柱在用酸洗出酵素後，馬上通入 pH 7.3 液平衡之。以上各步驟之操作流程圖如圖二。

7. 產品處理

上述所得之 trypsin 或 chymotrypsin 液，以 Amicon Hollow Fiber (H1P10) 濃縮，然後加入四倍體積丙酮，置 4°C 中 30 分鐘使沉降，然後離心 15 分鐘 (7,000 × g)，挖出沉澱，於布氏漏斗中以丙酮洗之，最後通以乙醚，抽乾，置於真空中乾燥成爲白色粉末成品。產品做酵素活性分析，並以碟狀膠體電泳法鑑定其純度，所用膠體爲 7.5% 聚丙烯酰胺，pH 8.9^(15,16)。

結 果

1. 豬胰臟之抽取

本實驗直接將胰臟加四倍活化緩衝液打碎活化，不再經丙酮粉末之步驟⁽⁹⁾，可以節省許多時間與人工。所得到的胰臟抽取液 (PX) 爲極清澈之金黃色溶液，不致傷害到吸著劑。一般抽取得之 PX，每 ml 可得 50~65 單位 trypsin 及 15~25 單位 chymotrypsin。胰臟本身品質對酵素活性影響頗鉅，新鮮或貯存期間較短之胰臟，活性較高，有高至上述活性三倍者。

胰臟打碎，在 4°C 置三至五天後，殘渣會浮至液面，若能小心撈去浮渣，倒出上清，則只要再經 Celite 過濾即可澄清；否則必要再加氣仿抽取。抽取液加 10~20% 之氣仿，於果汁機打成乳白液體，靜置 4°C 下兩天，可自動分層，輕輕倒出上清，再經 Celite 過濾，即可使用，可免離心。但所抽取得之 PX 量，不及離心分離法多。

若活化期間太久 (10 天以上)，浮渣上面會開始長黃色的霉，並且發臭，極不易處理，且酵素活性漸漸下降。若先經氣仿抽取後，所得之澄清液則無發霉之慮。氣仿帶有殺菌之效，但對酵素活性無妨。

浮渣或打碎的胰臟組織，與酵素活性或活化效果沒有顯著關係。因此，氣仿處理可在打碎活化兩三天內，俟浮渣完全浮至液面後，便著手進行。澄清之 PX 液靜置一兩天後，可能會變得稍稍混濁或生沉澱，可再次用 Celite 過濾，使澄清後再通入管柱。Celite 處理前後，除了 PX 體積稍減外，酵素活性並無顯著改變。

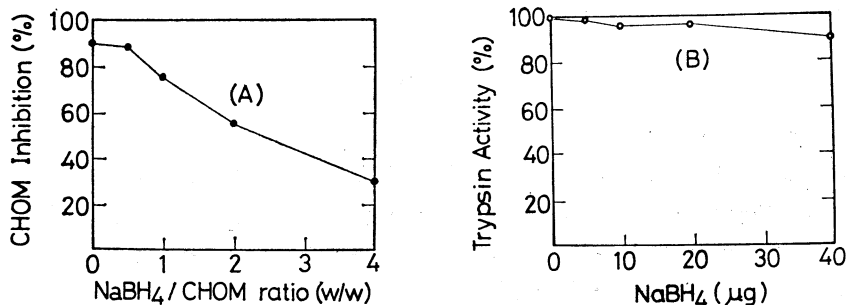
胰臟所加活化緩衝液的量，四倍 (v/w) 為最佳比例，太多或太少活化液均不合適。若加太多活化液，則體積太大，處理不便，酵素濃度也太稀。若活化液太少，則一方面抽取所得之 PX 過於混濁，即使用 Celite 過濾也不易澄清，對管柱內之吸著劑有害；另一方面，所得 PX 之單位體積所含酵素活性太高，對抑制劑與酵素的吸附或有不良影響。PX 之最佳酵素濃度為每 ml 含 50~70 單位 trypsin 或約 20 單位 chymotrypsin。

2. CHOM-chitin 及 DKOM-chitin 親和吸著劑之製備

蟹殼顆粒經酸鹼處理所得白色幾丁質，在 4°C 飽和 thymol 水溶液中保存，可保品質不變。由卵白所抽取之 CHOM 及 DKOM，分別對 trypsin 及 chymotrypsin 作抑制試驗。結果 CHOM 20 μg 可完全抑制 0.35 單位 trypsin，而 DKOM 15 μg 可完全抑制 0.1 單位 chymotrypsin。

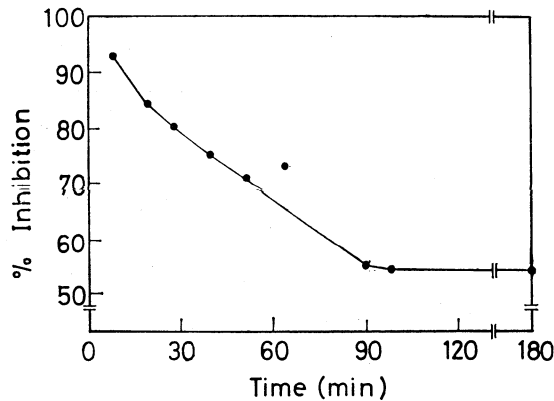
對於 CHOM 或 DKOM 與幾丁質鍵結的最佳條件，我們做了一些探討。發現用兩段法⁽⁹⁾進行反應不比一段法⁽⁹⁾效果良好。故鍵結時，一律採用一段法合成，glutaraldehyde 之濃度為 0.5%；抑制劑之濃度，每 ml 水溶液中含 6 mg CHOM 或 4 mg DKOM，增加濃度對所合成吸著劑之吸附力並無增加。同樣地，每 gm 幾丁質所加之 CHOM 溶液由 5 ml 到 10 ml，所得結果亦無差異。故推論我們所用抑制劑溶液之濃度及體積已能使抑制劑飽和地附著在幾丁質上。至於是否能降低抑制劑之使用量，則有待探討。鍵結反應在室溫下進行，溫度對反應結果之影響並不很大，但若室溫太低（低於 10°C），則須使用水浴保持反應液在 25°C 左右。反應混合液在加入 glutaraldehyde 後，pH 急降至 4.5 左右；若 pH 調回 8.0，隨反應進行，在 30 分鐘內 pH 降至 6.5 左右。所得親和吸著劑的吸附力與不調 pH 者差不多。但外觀上 pH 調至 8.0 合成者呈黃土色，比不調 pH 者深很多。

以上鍵結反應是以 glutaraldehyde 為架橋分子，分別和抑制劑及幾丁質生成 Schiff's base，不甚安定；以 NaBH_4 還原 Schiff's base 中的 $-\overset{\text{H}}{\text{C}}=\text{N}-$ 雙鍵，可增強鍵結⁽¹⁴⁾。但 NaBH_4 會破壞 CHOM 對 trypsin 的抑制力，由圖三可得知 $\text{NaBH}_4/\text{CHOM}$ 比例為 1 時，CHOM 活性降至 80%；比例為 2 時，CHOM 活性降至 60%（均在溶液中反應，反應時間均 3 小時）。反應時間長短亦有影



圖三 NaBH_4 還原反應對 CHOM 抑制力之影響（均在溶液狀態進行，反應時間 3 小時）。

- (A) CHOM 對 trypsin 活性之抑制力隨所加 NaBH_4 增多而下降。在無 NaBH_4 時，10 μg CHOM 對 trypsin (0.4 單位) 有 91% 之抑制力，但加四倍 NaBH_4 時，抑制力降至 29%。
- (B) NaBH_4 對 trypsin 的影響：同量 NaBH_4 對 trypsin 僅有些微抑制力，顯示 trypsin 被 NaBH_4 影響不大。



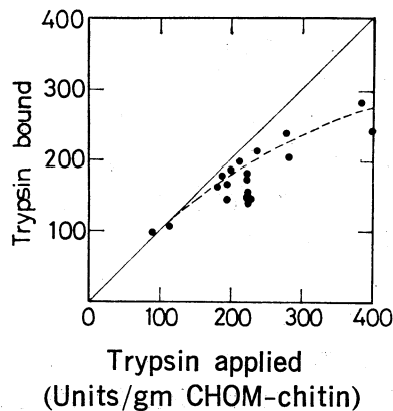
圖四 還原反應時間對 CHOM 抑制力的影響：反應開始後 90 分鐘內，CHOM 抑制力一直下降；90 分鐘後便保持在 55% 左右（此反應之 $\text{NaBH}_4/\text{CHOM}$ 比例為 2）。

響，若以 $\text{NaBH}_4/\text{CHOM}$ 比例為 2 做還原反應（溶態），在不同時間測 CHOM 活性，可得如圖四的曲線：CHOM 對 trypsin 的抑制力隨反應時間增長而下降，但在 90 分鐘降至 55% 以後便不再下降。基於上述結果，將 CHOM 鍵結於幾丁質後再經還原所製成的吸着劑（ $\text{NaBH}_4/\text{CHOM}$ 比例為 1，反應 30 分鐘），有下列特點：

- (1) 未還原之親和吸著劑為土黃色，經還原後為雪白。
- (2) 還原後，吸著劑之吸附力不但不下降，反而增加。平均上升 20~40%（圖五，但詳細數據未出示），符合固定化蛋白較穩定之理論。
- (3) 重複使用性增加，至少可使用 15 次以上（圖五）。

另外我們試提高 NaBH_4 之用量（ $\text{NaBH}_4/\text{CHOM}=2$ ），反應 30 分鐘，結果相同。DKOM-chitin 經還原後之吸附劑亦變為白色，但其吸附力則無增加。其重複使用性則待進一步試驗，但相信與 CHOM-chitin 者相仿。

如此合成之親和吸著劑，均各取 1 gm 濕重裝入小管柱（內徑 0.9 cm），分別加入純 trypsin（約 200 單位）或 chymotrypsin（約 40 單位），試其吸附力。每 gm CHOM-chitin 至少要能吸附 120 單位 trypsin，每 gm DKOM-chitin 至少要能吸附 20 單位 chymotrypsin，才能將其裝入大管柱中使用。



圖五 經 NaBH_4 還原之吸著劑，測其吸附力及重複使用性。樣品中 trypsin 含量大約在 200 單位時，操作結果較為理想。又十九次實驗中，有十五次之結果集中於回歸線附近，可見吸著劑至少可用十五次。

3. 親和層析管柱之設立與操作

全部操作過程，持恒定流速，以本實驗的管柱而言，時速在 600~800 ml 間較為理想。以 20 mesh 大小之幾丁質裝成的管柱，其通透性非常良好，可長久使用而不慮阻塞發生。但仍須注意下列事項：(一)胰臟抽取液 PX 應盡量濁清，太混濁的 PX 不但易使管柱阻塞，也會污染幾丁質，縮短其壽命。最好在 Celite 過濾後，立刻將 PX 通入管柱。(二)管柱出口之設計必須良好，否則很容易在出口塞住，造成流率不良。如圖六的設計，是本實驗所使用者，使用情況良好。

本實驗中，每次操作可收獲 trypsin 200,000 至 260,000 單位及 chymotrypsin 30,000 至 45,000 單位。酵素液以 Amicon Hollow Fiber (H1P10) 濃縮時，可達濃縮效果，但酵素損失幾達 50%，建議使用孔隙更小的 Hollow Fiber 或其他濃縮方法。

4. 產品處理及分析

酵素液經濃縮製成白色略帶淡黃之丙酮粉末。每一單元操作，處理胰臟 1.5 kg，可得到 2~4 gm trypsin 及 1.5~3 gm chymotrypsin。測得活性每 mg 之 trypsin 粉末含 40 單位活性，無 chymotrypsin 活性；而 chymotrypsin 粉末每 mg 含 6 單位活性，但夾雜 2 單位 trypsin 活性。因為 DKOM-chitin 管柱兼可吸著 trypsin 及 chymotrypsin，故若欲降低 chymotrypsin 中之 trypsin 夾雜量，必須 PXX 中儘量不含有 trypsin 活性。由電泳得知，所得酵素粉末並非均質，含多條環帶（圖七），須進一步純化。但與胰臟之粗抽取液 (PX) 相比，確有良好的分離純化效果，並且此等產物之比活性已達最好商業產品之水準⁽¹⁷⁾。

討 論

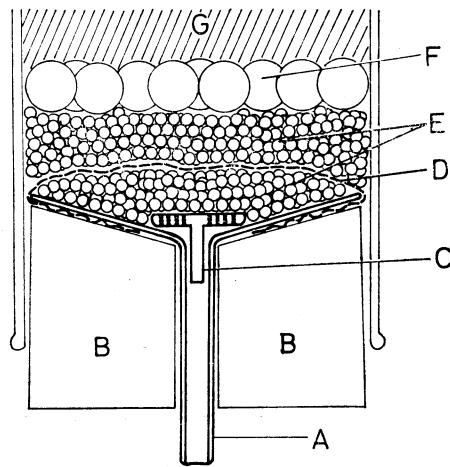
以本法純化蛋白質有一特點，即不論產品價格高低，若暫不考慮原料及結合基之價格，則一次操作的成本幾乎為固定，因為大部分成本均耗於管柱操作所用的緩衝液。因此，若能以本法純化更具價值之產品，則在經濟上更為合算。

本實驗所抽得之 trypsin 之比活性相當高（約每 mg 固體含 40 BAEE 單位活性），且幾無 chymotrypsin 活性夾雜。與現有市場之產品⁽¹⁷⁾比較：Sigma (Type II) 豬胰臟抽出之粗品每 mg 蛋白質含 4 單位 trypsin 活性；Sigma (Type IX) 豬胰臟抽取之 trypsin 結晶，每 mg 蛋白質含 36 單位活性。本實驗抽得之 chymotrypsin 其比活性只得每 mg 固體含 6 TEE 活性單位，另夾雜 2 單位 trypsin 活性。而 Sigma (Type I) 牛胰臟之 chymotrypsin 比活性為 7~9 單位（每 mg 蛋白質）。Sigma 產品均未說明夾雜其他酵素活性之情形。

欲消除 chymotrypsin 中 trypsin 之夾雜，且增高比活性，必須嚴格管制 PXX 中絕不可雜有 trypsin 活性；或者可將 chymotrypsin 產品再通過一次 CHOM-chitin 親和層析管柱。欲得更精純之酵素，也許經過兩次親和層析操作較佳：即先用大型管柱得到第一步產品，此時可用工業級藥品以降低成本；然後再通過較小而精細的管柱，再次純化，除去雜質。此時可使用高級藥品，以提高產品品質。此二酵素在酸中均相當穩定，可經得起多次酸洗操作而不妨害活性。

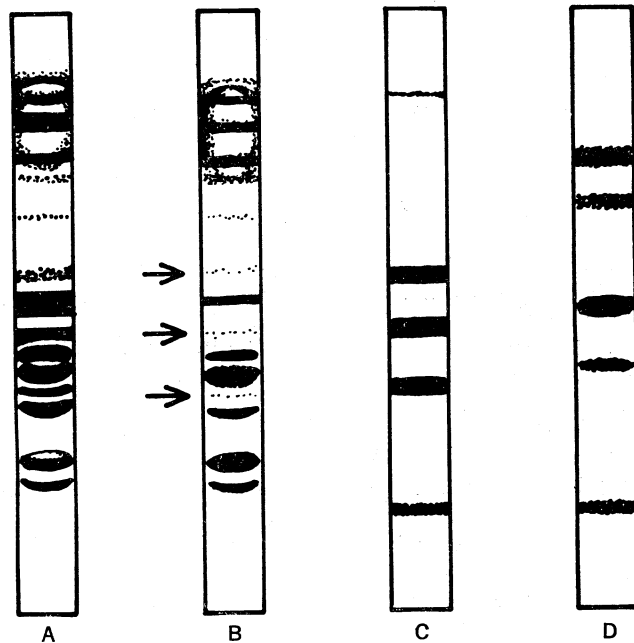
關於管柱之擴大，以目前 4 l 管柱而言，並無任何困難發生。預期以後更大的管柱（以 80 l 計）所會遭到的問題是緩衝液的流速。若以目前每小時 800 ml 流速操作 80 l 管柱，則一次操作將耗費 800 小時以上，誠不可能之事。若一次操作定為三天，則流速必須在每小時 10 l 以上。高流速會使幾丁質承受重壓，極可能造成阻塞。因此，在考慮管柱大小時，必須顧及此一問題。若以 20 l 管柱四支同時並聯操作，則可得與 80 l 管柱相同之吸附容量，而避免阻塞的問題。

基礎研究的一個問題是如何提高吸著劑的吸附力及其重複使用性。若 CHOM 鍵結到幾丁質後，未加還原，則經過半年之後，其吸附力降至一半以下（圖八）。若鍵結後再經 NaBH_4 還原處理，則吸附



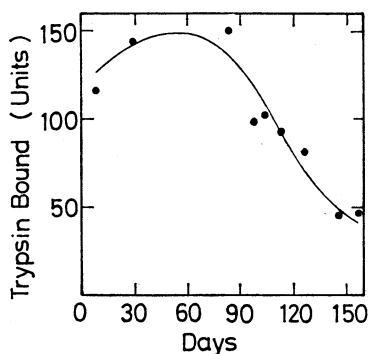
圖六 管柱出口之設計

- A: 漏斗 (淺底)
- B: 橡皮塞
- C: 玻璃 adaptor, 支撐小玻璃珠
- D: 絹布 (包住漏斗)
- E: 小玻璃珠 (隔開吸著劑與出口)
- F: 大玻璃珠 (壓住小玻璃珠)
- G: 親和吸著劑



圖七 純化過程中，以碟形膠體電泳測定純化情形。

- A: 胰臟抽取液 (PX) 之電泳圖型，有很複雜的成分。
- B: PX 經過 CHOM-chitin 管柱後，流出液 (PXX) 之電泳圖型，與A比較，有三條環帶消失 (箭頭所示)。
- C: 再以酸洗下吸附在 CHOM-chitin 吸著劑上的蛋白質，具高 trypsin 活性。出現五條主要環帶，其中三條即B所消失的三條環帶。
- D: 以 DKOM-chitin 吸著劑所純化得之 chymotrypsin 電泳圖型，亦具五條環帶。



圖八 親和吸著劑 (CHOM-chitin)，的吸附力隨時間增長及使用次數增加而衰退之情形。吸著劑合成之日為零點，trypsin 吸附量（縱軸）以每 gm 吸著劑計。

力及重複使用性均提高。但相信時間是一重要因素，鍵結在幾丁質上的抑制劑結合基隨著時間增長而漸漸失去抑制力。

幾丁質之非專一性吸著，相信頗為嚴重。因此，所純化之 trypsin 或 chymotrypsin 在碟形電泳上均出現多條環帶。欲解決此一問題，除了在酵素吸附後徹底以高鹽溶液洗去非專一性吸著物質以外，須對幾丁質本身結構作更進一步之探討，找出防止此種吸附的方法。雖然如此，本親和層析法的純化效果仍十分良好，一個操作步驟即可得到比活性非常高的產品。相信再經簡單純化步驟即可得到均質蛋白質。

綜上所述，本法之應用於工業生產是可行的。其方便、經濟及效率，均比一般傳統純化方法高出甚多。若能對一些基本問題再加以改進，並考慮本文所提出降低成本之建議，則必可使本法更具實用價值而達成工業化生產酵素的目標。

誌謝：本計劃承行政院國家科學委員會之資助，胰臟承三牧企業公司惠贈，蟹殼由基水食品公司惠贈，在此一併致謝。

參 考 文 獻

- (1) Weetall, H.H. 1975. *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors* (Ed. by Messing, R.A.) p. 201.
- (2) Shipe, W.F. 1977. *Enzymes in Food and Beverage Processing* (Ed. by Ory, R.L. and St. Angelo, A.J.) American Chemical Society, San Francisco, Calif.
- (3) Yamamoto A. 1975. *Enzymes in Food Processing* (Ed. by Reed, G.) p. 151, 160. Academic Press.
- (4) Laskowski, M. 1955. In *Methods in Enzymology* (Ed. by Colowick, S.P. and N.O. Kaplan.) Vol. 2, p. 8, Academic Press, New York.
- (5) Anson, M..L. 1935. *Science*, **181**: 467.
- (6) Kunitz, M. and J.H. Northrop. 1963. *J. Gen. Physiol.*, **19**: 991.
- (7) Lowe, C.R. and P.D.G. Dean. 1972. *Affinity Chromatography*, John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto.
- (8) Porath, J. 1974. In *Methods in Enzymology* (Ed. by Colowick, S.P. and N.O. Kaplan) Vol. 34, p. 13, Academic Press, New York.
- (9) 張珍田、蘇仲卿，1979：科學發展月刊，卷七，頁 883。
- (10) Stanley, W.L., G.G. Wattera, B. Chen, and J.M. Mercer. 1975. *Biotech. Bioengin.*, **17**: 315.
- (11) 錢明賽，1978：食品工業發展研究所，研究報告第 118 號。食品工業發展研究所，新竹，中華民國。
- (12) Rick, W. 1965. in *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. by Bergmeyer, H.U.) p. 800, Academic Press, New York and London.
- (13) Lineweaver, H. and C.W. Murray.. 1947. *J. Biol. Chem.*, **171**: 565.
- (14) Nakane, P.K. and A. Kawaoi. 1974. *J. Histchem. Cytochem.*, **22**: 1084.
- (15) Ornstein, L. 1964. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**: 321.
- (16) Davis, B.J. 1964. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**: 404.
- (17) Sigma Price List, Feb. 1981. Sigma Chemical Company, Missouri, U.S.A.