

胰蛋白酶激活条件优化及其在细胞培养中的应用

李明生^{1,3}, 靳冬武^{1,2}, 张健², 冯玉萍^{1,2},
郑荣², 张磊², 李倬^{1,2}, 马忠仁^{1,2,3}

(1. 西北民族大学 生物工程与技术国家民委重点实验室, 甘肃 兰州 730030; 2. 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030; 3. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730030)

摘要: 基于猪胰脏提取胰蛋白酶,以酶活力为衡量指标,在单因素试验的基础上通过正交试验探讨了胰蛋白酶原的激活条件,并通过离子交换层析纯化胰蛋白酶,最后探讨胰蛋白酶对 BHK-21 和 Vero 两种贴壁依赖性细胞的消化效果。结果表明,胰蛋白酶原最佳的激活条件为:激活剂浓度 0.2 mol/L, pH 8.5, 16 °C 下激活 1.5 h, 酶活力达到 2 953.68 U/mg。通过 DEAE sepharose FF 纯化后其酶活力达到 3 980.42 U/mg, 纯化倍数达到 2.26; 细胞消化结果表明, 用其消化 BHK-21 细胞和 Vero 细胞并连续 10 代, 平均消化时间和细胞增殖浓度与 Hyclone 和 Gibco 产品没有明显的差异($p>0.05$), 每代细胞形态良好, 生长正常。该工艺简单, 激活耗时短, 易于产业化, 为胰蛋白酶的国产化和进一步研究奠定理论依据。

关键词: 胰蛋白酶; 激活条件; 酶活力; 细胞培养

中图分类号: Q 814.1 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)12-1304-07

Activate Condition Optimization of Trypsin and Its Application in Animal Cell Culture

LI Mingsheng^{1,3}, JIN Dongwu^{1,2}, ZHANG Jian², FENG Yuping^{1,2},
ZHENG Rong², ZHANG Lei², LI Zhuo^{1,2}, MA Zhongren^{1,2,3}

(1. Key Laboratory Bio-Engineering & Technology of State Ethnic Affairs Commission, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 2. Life Science and Engineering College, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 3. Engineering & Technology Research Center for Animal Cell GanSu, Lanzhou 730030, China)

Abstract: Trypsin was extracted from porcine pancreas, enzyme activity was used as the measurement index. On the basis of single factor experiment the orthogonal test was used to determine the optimization of parameters of trypsinogen activation. At the same time, the trypsin was purified using ion exchange chromatography. The effects of digestive BHK-21 and Vero cells were investigated. The results showed that the optimum conditions for activation of trypsinogen were as follows: activator concentration 0.2 mol/L, activation pH 8.5, 16 °C for 1.5 h. Under these

收稿日期: 2015-09-20

基金项目: 中央高校项目(ZYP2015007); 甘肃省科技计划项目(1504WKCA094); 兰州市科技计划项目(2014-1-158)。

作者简介: 李明生(1977—), 男, 陕西靖边人, 农学硕士, 高级实验师, 主要从事生物材料的开发与应用方面的研究。

E-mail: limingsheng@xbmu.edu.cn

引用本文: 李明生, 靳冬武, 张健, 等. 胰蛋白酶激活条件优化及其在细胞培养中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(12): 1304-1310.

conditions, enzyme activity of trypsin was 2 953.68 U/mg. Trypsin was purified to activity get 3 980.42 U/mg with purification fold of 2.26 times onto a DEAE-sepharose-FF column. The cell culture results showed that BHK-21 and Vero cells were digested 10 generation. The growth and proliferate well, every generation cell morphology was normal. The digestion time and cell proliferation concentration had no obvious difference with the products of Hyclone and Gibco. In conclusion, the process is simple and easy to be industrialized with short activate time. The study can be served as a scientific basis for the further exploitation, utilization and localization of trypsin.

Keywords: trypsin, activate condition, enzyme activity, cell culture

从猪、牛或羊胰脏中提取的蛋白质分解酶胰蛋白酶^[1]是丝氨酸蛋白酶家族中特有的成员,属于肽链内切酶,特异性的水解碱性的精氨酸和赖氨酸羧基所组成的肽键^[2]。广泛应用于动物细胞培养、食品、洗涤剂、皮革、医药等领域中^[3-4],尤其是在动物细胞培养领域中应用极为广泛^[5-6]。目前国内外几乎所有科研与生产用户细胞培养用胰蛋白酶都依赖美国 Gibco 和 Hyclone 两家公司,国内生产几乎为空白。这是因为在胰蛋白酶制备过程中酶原激活条件的重要性。这种酶在哺乳动物的胰腺中以无活性的胰蛋白酶原的形式合成和储存,同时也包含有另一种相似的结构和功能特性的丝氨酸蛋白酶糜蛋白酶^[7],在酶原激活过程中,胰蛋白酶和糜蛋白酶在一定的条件下相互转化。而在体内胰蛋白酶原是由胰脏中胰腺细胞合成并分泌到十二指肠,并在肠激酶的催化下将胰蛋白酶原激活为有活性的胰蛋白酶^[8-9],激活的胰蛋白酶能够催化许多胰腺来源的无活性的酶原,例如胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、弹性蛋白酶原和羧肽酶,而蛋白酶活化受体直接或间接控制肠道消化效率^[10]。因此,作者以猪胰脏为原料,酶活力为衡量指标,在单因素试验基础上通过正交试验对胰蛋白酶原体外激活条件进行研究,采用离子交换层析对激活后的粗制胰蛋白酶进行纯化,得到细胞培养用胰蛋白酶单品,最后探讨该单品对 BHK-21 和 Vero 两种贴壁依赖性细胞的消化效果,为细胞培养用胰蛋白酶的进一步研究和国产化奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪胰脏:由青海省乐都县屠宰场提供;细胞培养用胰蛋白酶:购自美国 Hyclone 和 Gibco 公司;苯

甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE):购自 Sigma 公司;DEAE Sepharose FF:购自美国 GE 公司;蛋白质相对分子质量预染 marker:购自 Bio-Rad 公司;BHK-21 细胞和 Vero 细胞:由甘肃省动物细胞工程技术研究中心提供;DMEM 培养基:购自兰州百灵生物技术有限公司;新生牛血清:购自兰州民海生物工程有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

OA2000 型实验室数显定时搅拌器:上海殴河机械设备有限公司;SG2 型 pH 计:梅特勒-托利多仪器有限公司;DYY-12 型电泳仪:北京市六一仪器厂;KjeltecTM 8200 型凯氏定氮仪:丹麦 Foss 公司;LGJ--200F 真空冷冻干燥机:北京松源兴科技发展有限公司;Biomate 5 型紫外分光光度计:美国 Thermo 公司;超滤仪:PALL 公司;AKTA Purifier 快速纯化液相色谱系统:美国 GE 公司;CKX41 型倒置生物显微镜:OLYMPUS。

1.3 试验方法

1.3.1 工艺路线 新鲜胰脏预处理→提取→盐析制备胰蛋白酶原→酶原的激活→超滤脱盐→离子交换层析→冷冻干燥

1.3.2 单因素试验 根据工艺路线,取胰脏 2 kg,加入 3 倍体积 pH 3.0 的纯化水搅拌提取 24 h 后,加入硫酸铵至 0.75 饱和度盐析制备胰蛋白酶原。以激活剂浓度、激活时间、pH 值、温度 4 个因素进行单因素实验,做平行实验 3 次,确定影响胰蛋白酶活力的最佳单因素条件。

1) 激活剂浓度对酶活力的影响:酶原的激活过程中,胰蛋白酶为诱导剂,控制体系的激活时间 1.5 h、pH 8.0、温度 16 °C,激活剂氯化钙的终浓度分别设置为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mol/L。

2) 激活时间对酶活力的影响:酶原的激活过程

中,胰蛋白酶为诱导剂,控制体系的激活 pH 8.0、温度 16 ℃,激活剂氯化钙的终浓度 0.2 mol/L。激活时间分别设置为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h。

3) 激活 pH 对酶活力的影响: 酶原的激活过程中,胰蛋白酶为诱导剂,控制体系的激活时间 1.5 h、温度 16 ℃,激活剂氯化钙的终浓度 0.2 mol/L,激活 pH 值分别设置为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0。

4) 激活温度对酶活力的影响: 酶原的激活过程中,胰蛋白酶为诱导剂,控制体系的激活时间 1.5 h、pH 8.0,激活剂氯化钙的终浓度为 0.2 mol/L,激活温度分别设置为 4、8、12、16、20 ℃。

1.3.3 正交试验的设计 选择激活剂的浓度、激活时间、pH 值和温度 4 个因素,根据单因素试验得出的结果,选择合适的水平采用 $L_9(3^4)$ 正交试验确定胰酶提取的最佳工艺参数,正交试验 $L_9(3^4)$ 因素水平设计见表 1。

表 1 正交试验 $L_9(3^4)$ 因素水平

Table 1 Factors and levels for $L_9(3^4)$ orthogonal test

| 水平 | 因素 | | | |
|----|------------------------|-------------|------------|-------------|
| | 激活剂浓度/ (mol/L) A | 激活时间/h B | 激活 pH C | 激活温度/℃ D |
| 1 | 0.15 | 1.0 | 7.5 | 14 |
| 2 | 0.20 | 1.5 | 8.0 | 16 |
| 3 | 0.25 | 2.0 | 8.5 | 18 |

1.3.4 胰蛋白酶的纯化 采用 AKTA 层析进行纯化,具体洗脱条件为:DEAE Sepharose FF 为介质的层析柱;A 液:10 mmol/L pH 9.0 的 Tris-HCl;B 液:10 mmol/L pH 9.0 的 Tris-HCl 和 0.2 mol/L NaCl 组成;上样液:蛋白质质量浓度在 20~30 mg/mL;流速:1 mL/min。

1.3.5 胰蛋白酶活力和总蛋白质质量浓度的检测 胰蛋白酶活力按照中华人民共和国药典 2010 版二部胰蛋白酶效价测定法进行检测;蛋白质质量浓度按照中华人民共和国药典 2010 版二部附录 VII M 第一法凯氏定氮法检测^[1]。

1.3.6 SDS-PAGE 分析 采用 SDS-PAGE 对胰蛋白酶纯化效果进行鉴定,电泳条件:5 g/dL pH 6.8 的浓缩胶,12 g/dL pH 8.8 的分离胶;样品中加入等量的 2×SDS 上样缓冲液,95 ℃变性 5 min,15 μL 上样。80 V 电泳 2 h 后将胶用考马斯亮蓝染色。

1.3.7 胰蛋白酶在细胞培养中的应用 将胰蛋白

酶配制成 0.25% 活力为 1:250 的胰蛋白酶液,选择 BHK-21 和 Vero 两种传代细胞进行消化试验,连续消化培养 10 代,记录消化时间并进行细胞计数,显微镜观察细胞形态并拍照。同时用 Gibco 和 Hyclone 的胰蛋白酶作为对照组。

1.3.8 数据处理 每组实验平行 3 次,实验数据采用 SPSS 19.0 进行统计分析,最后结果用均数±标准差($\bar{X} \pm S$)表示。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 激活剂浓度对酶活力的影响 Ca^{2+} 是细胞内调节各种细胞活动的关键离子,诸如从胰腺腺泡细胞中酶原的分泌^[11-12]。胰腺分泌的消化酶是由 Ca^{2+} 浓度、神经递质和激素对胰腺腺泡细胞的受体结合调控来实现^[13]。作者以 $CaCl_2$ 为激活剂,对 Ca^{2+} 的浓度进行研究。由图 1 可以看出,随着激活剂浓度的提高,酶活力呈先升高后降低的趋势。在激活剂浓度为 0.1~0.15 mol/L 范围内,胰蛋白酶活力急剧增加 ($p < 0.05$),在激活剂浓度为 0.2 mol/L 时,酶活力达到最大值,为 $1\ 896.69 \pm 6.79$,当激活剂浓度提高至 0.25 mol/L 时,酶活力与最高值没有明显的差异 ($p > 0.05$),随后急剧下降 ($p < 0.05$)。因此,激活剂的浓度以 0.2 mol/L 为最佳。

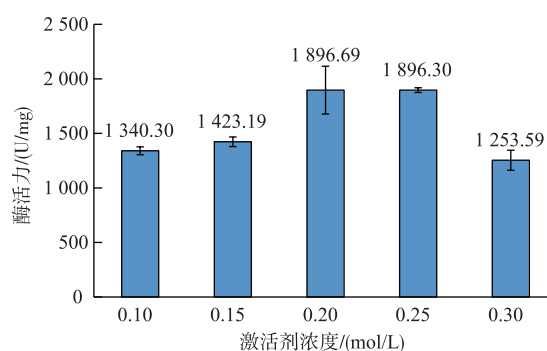


图 1 激活剂浓度对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of activation concentration on trypsin activity

2.1.2 激活时间对酶活力的影响 选择最佳激活时间,既能使胰蛋白酶充分激活,又能避免活化后的胰蛋白酶自身降解,是把握激活时间的关键^[14]。作者对胰蛋白酶的激活时间进行了研究,结果见图 2。由图 2 可以看出,随着激活时间的增加,酶活力呈先升高后降低的趋势,不同时间的酶活力差异极其

显著($p>0.01$)。在 0.5~1.5 h 范围内,胰蛋白酶活力急剧增加($p<0.01$),在 1.5 h 时酶活力达到最高值,为 $2\,522.77\pm 219.55$,随后随着时间的延长酶活力急剧下降($p<0.01$),说明激活时间对胰蛋白酶活力尤为重要。因此激活时间 1.5 h 为最佳。

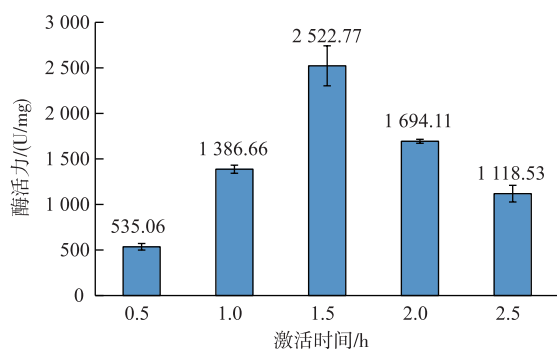


图 2 激活时间对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of activation time on trypsin activity

2.1.3 激活 pH 对酶活力的影响 由图 3 可以看出,随着激活 pH 的增加酶活力呈先升高后降低的趋势。在 7.0~8.0 h 范围内,胰蛋白酶活力差异明显 ($p<0.01$),在 pH 8.0 时酶活力达到最高值,为 $2\,660.10\pm 49.94$ 。随后随着 pH 的变化,酶活力逐渐下降 ($p>0.05$),因此激活 pH 8.0 为最佳。Khandagale AS 等^[15]人从印度马鲛鱼中分离纯化了胰蛋白酶,并对胰蛋白酶的特性进行了研究。Senphan T 等^[16]人从太平洋白虾的肝胰腺中分离纯化了胰蛋白酶,Liu CH 等^[17]人从斜带石斑鱼中分离纯化了胰蛋白酶。其激活的 pH 均为 8.0。这与本研究的激活 pH 相一致。

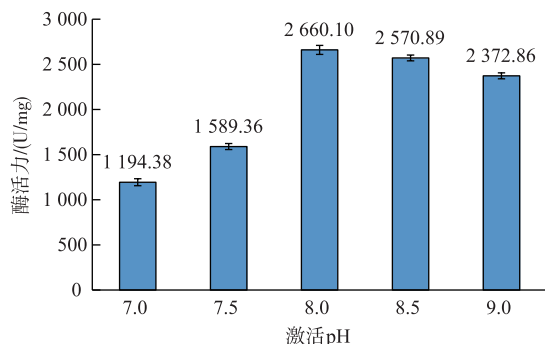


图 3 激活 pH 对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of activation pH on trypsin activity

2.1.4 激活温度对酶活力的影响 由图 4 可以看出,随着激活温度的增加,酶活力呈先升高后降低的趋势。不同温度下酶活力差异极为显著 ($p<0.01$)。

在 4~16 °C 范围内,胰蛋白酶活力差异明显 ($p<0.01$),16 °C 时酶活力达到最高值,为 $2\,845.21\pm 49.45$,当激活温度提高至 20 °C 时,酶活力明显下降 ($p<0.05$),这可能是因为胰蛋白酶提取液中含有大量的糜蛋白酶,在激活过程中胰蛋白酶与糜蛋白酶相互转化,而激活温度过高,胰蛋白酶急剧转化为糜蛋白酶。因此,激活温度以 16 °C 为最佳。

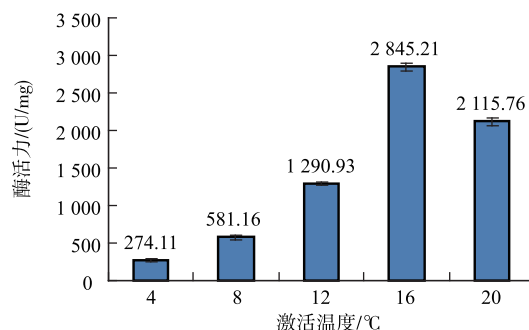


图 4 激活温度对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of activation temperature on trypsin activity

2.2 正交试验结果

根据单因素试验结果,确定影响酶活力的 4 个因素(激活剂浓度、激活时间、pH 值、温度)的主要水平。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验确定胰蛋白酶原激活的最佳条件,其结果见表 2。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

| 试验号 | 因素 | | | | 酶活力 |
|-------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | A | B | C | D | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 421.23 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 892.84 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2 593.18 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 831.37 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 742.94 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 698.38 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 876.45 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 752.39 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 2 398.21 |
| K_1 | 2 635.75 | 2 709.68 | 2 624.00 | 2 520.79 | |
| K_2 | 2 757.56 | 2 796.06 | 2 707.47 | 2 822.56 | |
| K_3 | 2 675.68 | 2 563.26 | 2 737.52 | 2 725.65 | |
| 极差 R | 121.82 | 233.80 | 113.52 | 301.77 | |

由表 2 的 K 值得胰蛋白酶激活的最优组合为 $A_2B_2C_3D_2$,即激活剂的浓度为 0.2 mol/L,激活时间为 1.5 h,激活 pH 为 8.5,激活温度为 16 °C,在此条

件下通过验证可得酶活力达到 2 953.68 U/mg, 优于表 2 中实验号为 2 的结果(2 892.84 U/mg), 因此确定最优激活组合为 $A_2B_2C_3D_2$ 。由极差 R 可以看出, 影响胰蛋白酶活力的四因素的主次顺序为 D (激活温度) $>B$ (激活时间) $>C$ (激活 pH) $>A$ (激活剂浓度)。

2.3 胰蛋白酶的纯化

激活后粗品胰蛋白酶液经超滤浓缩至蛋白质

质量浓度在 20~30 mg/mL 范围内, 电导 500 us/cm 以下, 调 pH 至 9.0 后采用 0.45 μ m 膜过滤后直接上样于已平衡好的 DEAE Sepharose FF 层析柱, 然后采用 100% 10 mmol/L pH 9.0 的 Tris-HCl 洗脱并收集洗脱峰, 超滤浓缩后冻干, 纯化过程的参数详见表 3。可以看出, 在提取过程中胰蛋白酶经纯化后其总蛋白质质量为 137.4 g, 回收率为 36.52%; 酶活力为 3 980 U/mg, 纯化倍数达到 2.26。

表 3 胰蛋白酶分离纯化过程参数

Table 3 Summary of purification process for trypsin

| 纯化步骤 | 体积/L | 总蛋白质质量/g | 蛋白质回收率/% | 酶活力/(U/mg) | 纯化倍数 |
|--|-------|----------|----------|------------|------|
| 提取液 | 100.0 | 376.2 | 100.00 | — | — |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析 | 10.0 | 299.4 | 79.59 | — | — |
| 酶原激活 | 8.5 | 262.1 | 69.67 | 1 759.21 | 1.00 |
| 超滤脱盐 | 10.0 | 216.6 | 57.58 | 2 953.68 | 1.68 |
| DEAE Sepharose FF 离子交换 | 10.0 | 137.4 | 36.52 | 3 980.42 | 2.26 |

李明生等^[6]采用了 CM-Sepharose-FF 层析纯化了胰蛋白酶, 我们采用 DEAE Sepharose FF 层析纯化进行分离。从图 5 可以看出, 图中总共有 4 条峰。经 SDS-PAGE 进行纯度检测, 图中泳带 M 为 Marker, 0 为激活后未纯化的粗品胰蛋白酶, 1 为层

析图谱中的 Peak 1, H 为 Hyclone 的胰蛋白酶, 经对比发现峰 1 为胰蛋白酶, 相对分子质量在 23 000 左右, 其纯度高于 Hyclone 胰蛋白酶。峰 2、3 为其他杂质, 峰 4 为经 100% B 液洗脱后所得峰, 经酶活力检测发现该酶为糜蛋白酶(数据未显示)。

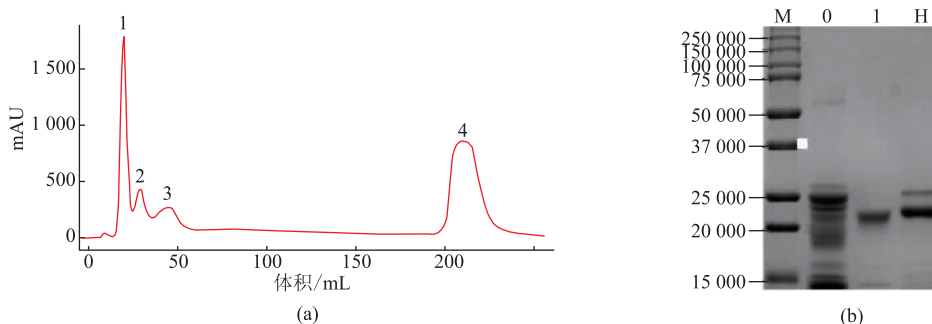
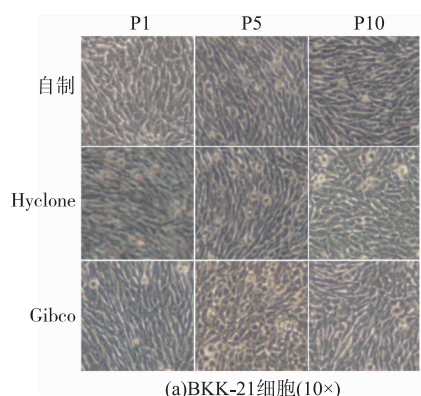


图 5 胰蛋白酶离子交换层析图谱和电泳图谱

Fig. 5 Elution curve of ion exchange chromatography and electrophoretic pattern on trypsin

2.4 胰蛋白酶在 BHK-21 和 Vero 细胞中的应用

采用已纯化的自制胰蛋白酶消化 BHK-21 和 Vero 两种贴壁细胞, 同时以 Hyclone 和 Gibco 两种胰蛋白酶为对照。连续消化传代细胞 10 代次, 从图 6 可以看出, BHK-21 和 Vero 细胞生长良好, 形态正常, 自制胰蛋白酶与 Hyclone 和 Gibco 胰蛋白酶没有明显的差异。



(a)BKK-21细胞(10 \times)

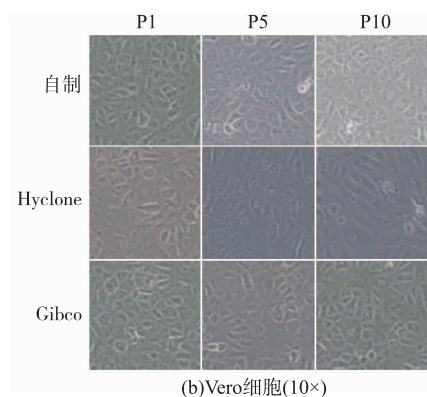


图6 BHK-21和Vero细胞形态图

Fig. 6 BHK-21 and Vero cells morphology
BHK-21和Vero细胞按 1.5×10^6 /瓶浓度接种,

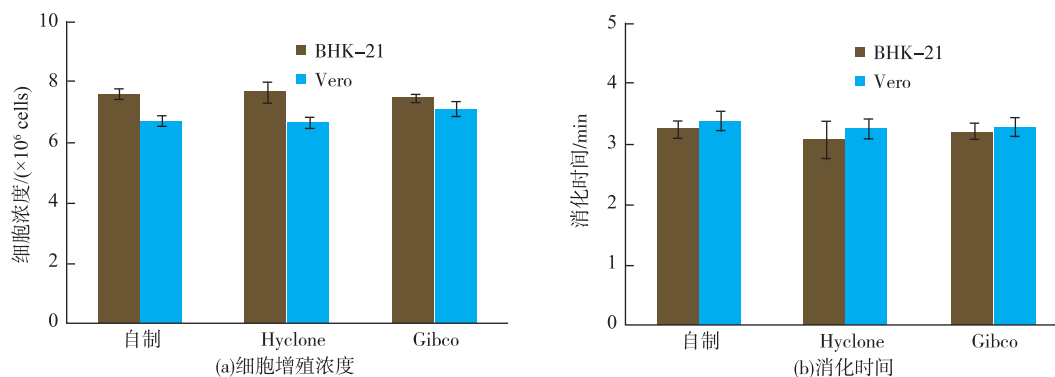


图7 BHK-21和Vero细胞细胞生长密度和消化时间

Fig. 7 Cell proliferation concentration and digestion time for BHK-21 and Vero cells

3 结语

胰蛋白酶原的最佳激活条件为激活剂的浓度0.2 mol/L, pH 8.5, 温度16℃, 激活时间1.5 h, 在该条件下激活后胰蛋白酶的活力达到2 954 U/mg。激活后粗胰蛋白酶经DEAE Sepharose FF纯化后其酶

活力为3 980 U/mg, 酶活力的纯化倍数达到2.26。

自制胰蛋白酶对BHK-21和Vero两种细胞没有明显的影响, 其细胞形态、细胞生长浓度和消化时间与Hyclone和Gibco胰蛋白酶没有明显的差异, 这为细胞培养用胰蛋白酶的进一步研究和国产化奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 847-848.
- [2] SHU M, SHEN W, WANG X J, et al. Expression, activation and characterization of porcine trypsin in *Pichia pastoris* GS115[J]. **Protein Expression and Purification**, 2015, 114: 149-155.
- [3] WOODARD S L, MAYOR J M, BAILEY M R, et al. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants[J]. **Biotechnol Appl Biochem**, 2003, 38(2): 123-130.
- [4] CHEN Jian, LIU Long, DU Guocheng. Current status and prospects of enzyme preparation industry in China[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(1). (in Chinese)
- [5] WICHT O, LI W T, WILLEMS L, et al. Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture[J]. **J Virol**, 2014, 88(14): 7952-7961.

- [6] LI Mingsheng, LI Zhuo, QIAO Zilin, et al. Preparation and trypsin in cell culture applied research[J]. **Nat Prod Res Dev**, 2009, 21; 1011-1014. (in Chinese)
- [7] PEREZ R L, LOUREIRO D B, NERLI B B, et al. Optimization of pancreatic trypsin extraction in PEG/citrate aqueous two-phase systems[J]. **Protein Expr Purif**, 2015, 106: 66-71.
- [8] OGAWA H, KUSUMI I, OGATA A, et al. Autoactivation of pancreatic trypsinogen is controlled by carbohydrate-specific interaction[J]. **FEBS Lett**, 2015, 589(5): 569-575.
- [9] GORELICK F S, MODLIN I M, LEACH S D, et al. Intracellular proteolysis of *Pancreatic zymogens*[J]. **Yale J Biol Med**, 1992, 65(5): 407-420, 437-440.
- [10] CHEN J M, FEREC C. Genes, cloned cDNAs, and proteins of human trypsinogens and pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutations[J]. **Pancreas**, 2000, 21(1): 57-62.
- [11] GORELICK F S, MODLIN I M, LEACH S D, et al. Intracellular proteolysis of *Pancreatic zymogens*[J]. **Yale J Biol Med**, 1992, 65(5): 407-420, 437-440.
- [12] RARATY M, WARD J, ERDEMLI G, et al. Calcium dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of *Pancreatic acinar* cells[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2000, 97(24): 13126-13131.
- [13] PAREKH A B. Calcium signaling and acute pancreatitis: specific response to a *Promiscuous messenger*[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000, 97(24): 12933-12934.
- [14] LI Junlan, YU Qunli, ZHANG Li, et al. Optimization of ovine pancreatin preparation by uniform design method[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2011, 6(37): 120-125. (in Chinese)
- [15] KHANDAGALE A S, SAROJINI B K, KUMARI S N, et al. Isolation, purification and biochemical characterization of trypsin from Indian mackerel (*Rastralliger kanagurta*)[J]. **Journal of Aquatic Food Prod Tech**, 2015, DOI:10.1080/10498850.2013.777864.
- [16] SENPHAN T, BENJAKUL S, KISHIMURA H, et al. Purification and characterization of trypsin from hepatopancreas of Pacific white shrimp: trypsin from Pacific white shrimp[J]. **Journal of Food Biochemistry**, 2015, 4(39): 388-397.
- [17] LIU C H, SHIU Y L, HSU J L, et al. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. **Fish Physiol Biochem**, 2012, 38(3): 837-848.

会 议 消 息

会议名称(中文): 第八届中国饲料营养学术研讨会

所属学科: 动物食品科学

开始日期: 2018-10-01

所在城市: 北京市 东城区

主办单位: 中国畜牧兽医学会动物营养学分会

承办单位: 国家粮食局科学研究院、中国农业科学院饲料研究所、动物营养学国家重点实验室、中国粮油学会饲料分会

全文截稿日期: 2018-07-31

联系人: 窦志斌 18514591297

联系电话: 010-62731297

E-MAIL: ana@cau.edu.cn

会议网站: <http://www.ananutri.com/zhaoyaotongzhi/201706/767.html>

会议背景介绍: 经中国畜牧兽医学会动物营养学分会常务理事会议研究决定, 由我会主办的“中国畜牧兽医学会动物营养学分会第八届中国饲料营养学术研讨会”将于 2018 年 10 月在北京召开, 同时举行第十届二次全体理事会议和《动物营养学报》编委会会议。本次会议是四年举行一次的本行业盛会, 将由国家粮食局科学研究院(牵头单位)、中国农业科学院饲料研究所、动物营养学国家重点实验室、中国粮油学会饲料分会承办, 欢迎国内外动物营养与饲料行业代表参加。