

聚合高分子电解质分离纯化蛋白质

张海花, 李司, 童富淡

浙江理工大学 生命科学学院, 杭州 310018

摘 要: 聚合高分子电解质含有大量阳离子或阴离子, 通过静电作用结合带相反电荷的蛋白质, 生成聚合高分子电解质-蛋白质复合物, 电解质-蛋白质复合物通过桥连作用或疏水作用形成沉淀颗粒; 聚合高分子电解质的选择性沉淀作用受电解质的分子量、添加剂量、溶液离子强度和 pH 的影响。用高分子电解质从大规模的低浓度溶液中选择性地沉淀目的蛋白质, 为生物工程的下游处理开辟了一条新途径。

关键词: 聚合高分子电解质沉淀, 蛋白质分离纯化, 碱性蛋白, 生物工程

Polyelectrolyte as vehicles for isolation and purification of protein: a review

Haihua Zhang, Si Li, and Fudan Tong

College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

Abstract: Polyelectrolyte with a large number of cations or anions could precipitate the oppositely charged proteins to form polyelectrolyte-protein complexes, which then aggregated to form larger particles via electrostatic attraction or hydrophobic interaction. The precipitation was affected by the molecular weight and concentration of the polyelectrolyte as well as the ionic strength and pH of the solution. The use of precipitation is an efficient method for selective separation of proteins from crude biological mixtures in the downstream processes of bioengineering.

Keywords: polyelectrolyte precipitation, protein isolation and purification, basic protein, bioengineering

在生物工程领域, 特别是在食品、医药等领域中常常涉及到大规模的蛋白质分离提纯过程。由于样品体积大、目的蛋白质浓度低及各种蛋白质之间物理化学性质的相似性致使目的蛋白分离成本很

高。降低分离成本和提高回收率是蛋白质分离工程的主要目标。虽然层析法有较高的灵敏度和分离度, 在分离纯化过程中占据了主导地位, 但是成本高、处理量较小, 适合蛋白分离的后期纯化阶段; 而沉

Received: April 7, 2011; **Accepted:** June 20, 2011

Supported by: Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (No. Y3110354), Department of Education Scientific Research Program of Zhejiang Province (No. 200909740).

Corresponding author: Fudan Tong. Tel: +86-571-86843516; E-mail: fdtong@zstu.edu.cn
浙江省自然科学基金 (No. Y3110354), 浙江省教育厅科研项目 (No. 200909740) 资助。

淀法常用于生物工程下游的前处理过程, 不仅能对蛋白质进行分馏和浓缩, 整个过程消耗低、目的蛋白质不变性, 也是层析法发挥高灵敏度和分离度的前提^[1-2]。

目的蛋白质浓缩是从大规模的低浓度溶液中纯化回收目的蛋白的关键步骤之一, 而选择性沉淀是最常用的有效方法。在多种沉淀方法中, 聚合高分子电解质沉淀反应由于它的低消耗、高蛋白回收率、处理量大、设备简单等优势引起了越来越多研究者的高度重视^[3-5]。聚合高分子电解质沉淀技术还具有聚合高分子电解质用量少 (0.05%~0.1%, W/V)、选择性强的特点, 高分子电解质-蛋白质复合物沉淀能重溶于一定离子强度的溶液, 目的蛋白质保持生物活性, 同时能形成高浓度的蛋白质溶液^[6-7]。

1. 聚合高分子电解质的理化性质

高分子电解质具有线型和交联型两种形式, 呈现球状、线团、螺旋状和伸展的构象; 由于内在因素 (化学本性、酸碱基团的分布、共聚物的组成和疏水性等) 和外在因素 (pH、温度、溶液的离子强度和溶剂的热力学性质等) 的影响, 会发生线团与球状、螺旋状与线团构象的转变, 以及溶液与凝胶、体积收缩与膨胀等变化。聚合高分子电解质分为聚阳离子电解质和聚阴离子电解质, 分别选择性沉淀酸性蛋白和碱性蛋白^[8]。

1.1 聚阳离子电解质

聚乙烯基亚胺 (Polyethylenimine, PEI; $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)]_n$), DEAE-纤维素 (Diethylaminoethyl-cellulose, DEAE, $[\text{C}_2\text{H}_7\text{O}_2(\text{OH})_2\text{OCH}_2\text{COONa}]_n$) 和 Poly-(dimethylamine-co-epi-chlorohydrin-coethylene diamine (PDEHD; $[\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{CICH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}]_n$) 都是高分子聚阳离子电解质, 在溶液中解离产生带正电荷基团, 能与带负电荷基团的化合物结合, 如与带负电荷的 DNA 及细胞表面标记结合, 促进靶细胞对 DNA 的摄取, 或者保护 DNA 免受核酸酶降解; 能沉淀酸性蛋白, 如重组 β -葡萄糖

苷酸酶 (Recombinant β -glucuronidase, rGUS; 分子量 68.2 kDa, pI 值约 5.5)^[9]。

PEI 是一种多聚阳离子电解质, 结构特点是每隔 3 个原子出现一个氨基氮, 构成多聚网状结构^[10]。PEI 在酸性环境中带正电荷, 与 DNA 结合生成颗粒状复合物, 也能与细胞表面的蛋白多糖、酸性蛋白结合, 通过内吞作用进入细胞。PEI 分为线性 PEI (Linear polyethylenimine, LPEI) 和支链型 PEI (Branched polyethylenimine, BPEI)。

1.2 聚阴离子电解质

聚丙烯酸 (Polyacrylic acid, PAA)、聚丙烯酸钠盐 (Polyacrylic acid sodium salt, PAASS)、聚乙烯磺酸钠 (Polyvinyl sulfonate, PVS) 和羧甲基纤维素 (Carboxymethyl cellulose, CMC) 都是高分子聚阴离子电解质, 在溶液中解离产生带负电荷基团, 能与带正电荷基团的化合物结合^[11]。如 PAA 选择性沉淀溶菌酶、核糖体失活蛋白等碱性蛋白质^[12-13]。

2 聚合高分子电解质沉淀蛋白质的作用机理

Chen 等^[1]和 Clark 等^[3]研究了聚合高分子电解质沉淀蛋白质的机理, 提出“两步法反应”学说: 即蛋白质-高分子电解质复合物的形成和复合物分子相互聚集成絮状沉淀。当聚合高分子电解质被添加到蛋白质溶液中时, 通过静电吸引、氢键或疏水作用, 聚合高分子电解质与蛋白分子迅速反应生成不溶性复合物; 不溶性复合物聚集成更大的微粒体, 形成絮状沉淀。

Hill 等^[14]研究了高分子电解质与蛋白质分子之间的静电吸附-电性中和作用和高分子多聚体的桥连 (Bridging) 作用。静电吸附-电性中和作用指高分子多聚体胶粒表面强烈吸附异种离子、胶粒或链状离子带异种电荷的部位, 中和部分电荷, 减少静电斥力, 使之容易接近而互相吸附, 形成复合物; 吸附桥连作用是指高分子物质与胶粒的吸附和桥连,

即高分子链的一端吸附了某一胶粒后, 另一端吸附另一胶粒, 形成“胶粒-高分子-胶粒”的絮凝体。

3 聚合高分子电解质沉淀蛋白质的影响因素

蛋白质-高分子电解质复合物的形成受高分子电解质的分子量、添加剂量、溶液离子强度和 pH 的影响; 影响沉淀微粒成长为絮凝体的因素还包括搅拌强度, 即搅拌速度和搅拌时间, 既要为絮凝体的成长创造良好的碰撞机会, 又要防止已形成的絮凝体被打碎, 因而搅拌强度要小, 但时间要比较长^[1]; 而粗提液中杂质成分也干扰高分子电解质对目的蛋白的特异性吸附。

3.1 高分子电解质的添加剂量、分子量、溶液离子强度和 pH 对沉淀作用的影响

Clark 等^[3,6]研究了蛋清白蛋白-羧甲基纤维素(CMC) 沉淀反应中聚合高分子电解质的剂量和添加方式对沉淀反应的影响, 结果显示蛋清白蛋白的回收量仅与 CMC 的添加量有关, 与添加方式无关。Chen 等^[1]和 Kim 等^[4]在聚丙烯酸-溶菌酶沉淀实验中也证实目的蛋白的回收率主要与高分子电解质的添加剂量成正比。Kim 等^[15]研究了聚合高分子电解质的分子量和添加剂量对聚丙烯酸-溶菌酶系统的影响, 发现 PAA 的沉淀效果与其分子量成正比; 同样的反应条件下, 高分子量 PAA 沉淀蛋白质的效率更高。

Clark 和 Glatz^[6]研究了溶液中离子强度对沉淀微粒大小的影响, 离子强度能减少蛋白质与带相反电荷的高分子电解质之间的相互作用; 溶液离子强度大, 溶液中的蛋白质会被更多的带相反电荷的离子包围, 妨碍高分子电解质与蛋白质的结合。Sternberg 等^[16]在聚丙烯酸-溶菌酶沉淀反应中发现随着 NaCl 浓度的升高, 聚丙烯酸-溶菌酶复合物溶解度变大, 有利于高分子电解质-蛋白质复合物的重溶和高分子电解质的回收。

聚阳离子电解质与目的蛋白沉淀反应时溶液

pH 值一般在该蛋白的等电点以上; 聚阴离子电解质与目的蛋白沉淀反应时溶液 pH 值一般在该蛋白的等电点以下。溶液 pH 值越偏离蛋白质的等电点, 蛋白质所带的电荷越多, 更加利于与高分子电解质的结合, 但极端 pH 环境能使蛋白质变性, 降低蛋白质的沉淀率; 一般在聚合高分子电解质和蛋白质带相反电荷的 pH 值范围内选择一个最佳 pH 值, 既要使聚合高分子电解质-蛋白质沉淀反应的 pH 位于目的蛋白质稳定的 pH 值范围, 又要有利于聚合高分子电解质-蛋白质沉淀的形成。PAA 沉淀碱性蛋白时, 沉淀的形成与溶液 pH 值偏离蛋白质的等电点程度有关, 目的蛋白质的等电点 pI 值越大, 越有利于 PAA 与蛋白质之间离子键的形成; 如鱼精蛋白等电点 pI 为 12.2, PAA 沉淀反应的溶液 pH 值为 9.5、8.5、7.5、6.5 和 5.0 时, 沉淀率分别为 85%、88%、83%、63% 和 79%, 当溶液 pH 为 3.5 时, 鱼精蛋白变性, 沉淀率仅为 10%^[17]; 而苦瓜种仁碱性蛋白的等电点 pI 为 8.7~9.5, PAA 沉淀反应的溶液 pI 为 4.0 时, 沉淀率仅为 40%^[13]。同时, 蛋白质的性质也影响沉淀率, 如胰蛋白酶等电点 pI 为 11.2~11.4, PAA 沉淀反应的溶液 pH 为 3.0 时, 沉淀率为 98%^[18]; 核糖核酸酶等电点 pI 为 9.1, PEI 沉淀反应的溶液 pH 为 7.0 时, 沉淀率为 90%^[16,18]。

3.2 搅拌作用对沉淀颗粒的影响

Kim 等^[19]系统研究了各种因素对 PAA 沉淀溶菌酶的影响。当带负电荷的 PAA 添加到带有正电荷的溶菌酶溶液中时, 借助布朗运动和静电吸附-电性中和作用, 生成 PAA-溶菌酶沉淀复合物^[19-21]; PAA-溶菌酶沉淀复合物相互聚集, 同时继续吸附游离的溶菌酶分子, 形成直径 0.1~1 μm 的初级粒子 (Primary particle)。根据斯莫卢霍夫斯基 (Smoluchowski) 碰撞理论^[22], PAA-溶菌酶沉淀复合物的生成和聚集是与布朗运动有关的聚集反应, 单位体积内二元运动的频率主要依靠溶液的环境及聚合体的性质, 如反应体系的温度、溶液的粘性、PAA 的添加方式及其分子量等因素^[23]。如果反应体系的

条件不改变,生成的初级粒子大小与反应体系的搅拌力度成反比^[19,24],表明在电性中和阶段生成初级粒子时溶菌酶与聚丙烯酸之间的作用模式随着搅拌强度的变化而变化。

初级粒子在剪切碰撞 (Shear-induced collisions) 中生成较大的絮凝体,这时布朗运动不再是主要因素,而“同向移动”(“Othokinetic” aggregation) 聚合机制占据了支配地位。根据 Smoluchowski 理论,这个阶段碰撞频率的主要影响因素是在布朗运动中生成的溶菌酶沉淀物数目和液体流剪切速率 (Shear rate),这一反应的主要机理是桥连吸附作用;絮状沉淀粒径的大小决定于 PAA-溶菌酶复合物中 PAA 上剩余的位点^[1,3]。Kim 等^[19]在 PAA 沉淀溶菌酶试验中还研究了影响 PAA 桥连的各种因素,如混合强度、PAA 剂量和溶液离子强度等。增加混合液的机械搅拌力、PAA 剂量和降低离子强度可以提高 PAA 桥连吸附作用。反应刚开始时(混合阶段),粒径大小随溶液振荡速度的增加而增加,与 PAA 的量无关;振荡速度超过 1 000 r/min 时,沉淀粒径便随着振荡速度的增加而减小,直到稳定在一定粒径。除了溶液 pH、离子强度等因素外,一分子 PAA 结合溶菌酶的数目还与 PAA 链的长度(PAA 链长度与其分子量相关)有直接的关系,所以为了充分发挥 PAA 的桥连吸附作用,应使它的长链生长到最大限度;同时,可解离基团达到最大的离解度并充分暴露,产生更多的带电部位,与蛋白质微粒的碰撞机会更多,絮凝效果可提高数倍。分子量为 4×10^6 的 PAA 长链分子具有足够多的位点与溶菌酶结合。混合不充分或者 PAA 用量过少,形成的沉淀复合物不能聚集成更大的微粒,加入的 PAA 主要结合溶液中过量的溶菌酶分子或者是形成富含溶菌酶的复合物^[24-25]。

3.3 杂质对沉淀作用的影响

聚合高分子电解质沉淀蛋白质的作用机理是蛋白质与聚合体之间的离子作用形成聚合高分子电解质-蛋白质复合物,这些复合物通过盐键或借助残余电荷或通过疏水作用进一步形成更大的絮凝体^[8];

但是大量的杂质可能粘附到靶蛋白上,或吸附到多聚体上,或间接与带电基团作用干扰沉淀的形成。如植酸 (Phytic acid) 是植物性饲料中普遍存在的抗营养因子,其中以玉米、麦麸、米糠、豆粕、菜籽粕、棉籽粕等的含量较高。植酸能与蛋白质形成复合物,影响菜籽粕 (Canola) 蛋白质的等电点沉淀作用^[26];植酸在低于蛋白质等电点的酸性条件下,与蛋白质反应生成植酸-蛋白质二元复合物;在高于蛋白质等电点的碱性条件下,植酸以金属阳离子为桥生成植酸-金属阳离子-蛋白质三元复合物;同时,植酸也可能与聚合高分子电解质如 PEI 结合生成沉淀,从而使分离植物材料蛋白的 PEI 用量提高^[27]。

3.4 聚合高分子电解质的选择与去除

选择高分子电解质时,最重要是高分子电解质-蛋白质复合物复溶后,高分子电解质能否与蛋白质解离并去除,同时要关注高分子电解质是否干扰目的蛋白质的后续纯化处理,而有些沉淀剂禁用于食品或药品。

高分子电解质-蛋白质复合物复溶后的溶液含有聚合高分子电解质,高分子电解质的去除、回收或重新利用取决于目的蛋白质的后续应用,如 PAA 沉淀胰蛋白酶时,当胰蛋白酶应用于皮革软化时,PAA 就没有必要去除^[17]。根据聚合高分子电解质与目的蛋白分子量的差异可以采用超滤法去除高分子电解质,如 PAA 沉淀溶菌酶和牛血清白蛋白时可分别选择 MWCO 1 00 000 和 MWCO 3 000 00 回收 PAA 并重新利用^[28]。沉淀法也是去除高分子电解质的有效方法,聚阳离子电解质可以与 Ca^{2+} 或者 Ba^{2+} 结合生成沉淀,如 PAA 沉淀溶菌酶和苦瓜种仁碱性蛋白时,利用 PAA 与 Ca^{2+} 结合生成不溶于水的沉淀除去,这样 PAA 不能再重新利用^[13]。

4 高分子电解质在蛋白质分离纯化过程中的应用

近 30 年来,人们已经用多种聚合高分子电解质分离纯化不同材料中的蛋白质。1974 年 Sternberg

和 Hershberger^[16]用 PAA 从蛋清中分离纯化溶菌酶, 产物的酶比活力提高 9 倍; 1978 年 Hill 等^[25]以 CMC 处理奶酪生产的副产品乳清, 高效去除糖类和脂肪, 获得高纯度乳清蛋白。Hollera 等^[9]使用 PEI 从转基因烟草中分离纯化重组 β -葡萄糖苷酸酶 (rGUS), 与用阴离子交换柱纯化 rGUS 的方法比较, 两者的得率分别是 85%~90% 和 66%~90%, 但是 PEI 沉淀法显著降低实验成本, 缩短实验时间, 减少劳动工作量; 笔者使用 PAA 从苦瓜种仁中选择性沉淀具有抗肿瘤功能的碱性蛋白^[12]。表明 PAA 能吸附不同分子量和不同来源的碱性蛋白, 是碱性蛋白分离纯化有效方法之一。2009 年 McDonald 等^[29]用聚阴离子高分子电解质 PVS 从中华仓鼠卵巢细胞培养液中分离纯化人源单克隆抗体 IgG1, 当溶液 pH 为 5.0 时, 提取率为 95%。2009 年 Boeris 等^[30]使用 PVS 从牛胰腺中分离纯化胰凝乳蛋白酶, 当溶液 pH 为 2.5 时, 胰凝乳蛋白酶提取率为 61%。2011 年 Cappella 等^[31]用 Eudragit[®] L100 和 Eudragit[®] S100 分离纯化牛胰凝乳蛋白酶, 当溶液 pH 为 4.6 时, Eudragit[®] L100 沉淀胰凝乳蛋白酶的提取率为 95%, 当溶液 pH 为 5.4 时, Eudragit[®] S100 沉淀胰凝乳蛋白酶的提取率为 60%。

利用生物反应器生产功能蛋白是蛋白质工程的核心内容之一, 而转基因动植物系统是一种高效的生物反应器, 生物工程中下游处理方法的缺乏和重组蛋白的低回收率限制了动、植物生物反应器的利用效率^[32], 聚合高分子电解质选择沉淀带异种电荷蛋白质, 为生物工程的下游处理开辟了一条途径。

REFERENCES

- [1] Chen W, Walker S, Berg JC. The mechanism of floc formation in protein precipitation by polyelectrolytes. *Chem Eng Sci*, 1992, 47(5): 1039–1045.
- [2] Zaman F, Kusnadi AR, Glatz CE. Strategies for recombinant protein recovery from canola by precipitation. *Biotech Prog*, 1999, 15(3): 488–492.
- [3] Clark KM, Glatz CE. Polymer dosage considerations in polyelectrolyte precipitation of protein. *Biotech Prog*, 1987, 3(4): 241–247.
- [4] Kim WS, Kim WS. Lysozyme precipitation with polyacrylic acid in semi-batch reactor. *Hwahak Konghak*, 2000, 38(2): 236–243.
- [5] Ma JF, Hoang H, Myint T, et al. Using precipitation by polyamines as an alternative to chromatographic separation in antibody purification processes. *J Chromatogr B*, 2010, 878(9/10): 798–806.
- [6] Clark KM, Glatz CE. Protein fractionation by precipitation with carboxymethyl cellulose // Hamel JP, Hunter JB, Sikdar SK. *Downstream Processing and Bioseparation*. ACS Symp Ser 419. Washington DC: ACS Press, 1990: 170–187.
- [7] Jervis L, Pierpoint WS. Purification technologies for plant proteins. *J Biotechnol*, 1989, 11(2/3): 161–198.
- [8] Niederauer MQ, Glatz CE. Selective precipitation // Fiechter A. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. New York: Springer-Verlag, 1992: 159–188.
- [9] Holler C, Vaughan D, Zhang CM. Polyethyleneimine precipitation versus anion exchange chromatography in fractionating recombinant β -glucuronidase from transgenic tobacco extract. *J Chromatogr A*, 2007, 1142(1): 98–105.
- [10] Demeneix B, Behr JP. Polyethylenimine (PEI). *Adv Genet*, 2005, 53: 217–230.
- [11] Lali A, Balan S, John R, et al. Carboxymethyl cellulose as a new heterobifunctional ligand carrier for affinity precipitation of proteins. *Bioseparation*, 1998, 7 (4/5): 195–205.
- [12] Zhang CM, Lillie R, Cotter J, et al. Lysozyme purification from tobacco extract by polyelectrolyte precipitation. *J Chromatogr A*, 2005, 1069(1): 107–112.
- [13] Zhang HH, Wang QM, Hu JS, et al. The method and influencing factors of alkalescency protein purification from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds by polyacrylicacid precipitation. *Chin J Biotech*, 2007, 23(4): 735–740.
张海花, 汪俏梅, 胡家恕, 等. 聚丙烯酸分离纯化苦瓜种仁碱性蛋白的方法及影响因素. *生物工程学报*, 2007, 23(4): 735–740.
- [14] Hill RD, Zadow JG. The precipitation of whey proteins by carboxymethyl cellulose of differing degrees of

- substitution. *J Dairy Res*, 1974, 41(3): 373–380.
- [15] Kim HS, Kim WS. Model for removal of lysozyme by polyelectrolyte precipitation of polyacrylic acid in MSMR reactor. Miami: A I Ch E Annual Meeting, Session 163, 1998.
- [16] Sternberg M, Hershberger D. Separation of protein with polyacrylic acids. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 342(1): 195–206.
- [17] Porfiri MC, Braia M, Farruggia B, et al. Precipitation with poly acrylic acid as a trypsin bioseparation strategy. *Process Biochem*, 2009, 44(9): 1046–1049.
- [18] Dubin PL, Gao J, Mattison K. Protein purification by selective phase separation with polyelectrolytes. *Sep Purif Methods*, 1994, 23(1): 1–16.
- [19] Kim WS, Kim HS, Hirasawa I, et al. Combination mechanism of lysozyme with polyacrylic acid at equilibrium in polyelectrolyte precipitation. *J Chem Eng Japan*, 2001, 34(10): 1244–1250.
- [20] Kennedy JF, Cabral JMS. *Recovery Processes for Biological Materials*. New York: Wiley, 1993: 33.
- [21] Levich VG. *Physicochemical Hydrodynamics*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1962: 207.
- [22] Kusters KA, Wijers JG, Thoenes D. Aggregation kinetics of small particles in agitated vessel. *Chem Eng Sci*, 1997, 52(1): 107–121.
- [23] Petenate AM, Glatz CE. Isoelectric precipitation of soy protein: I. Factors affecting particle size distribution. *Biotechnol Bioeng*, 1983, 25(12): 3049–3058.
- [24] Walles WE. Role of flocculant molecular weight in the coagulation of suspensions. *J Coll Inter Sci*, 1968, 27(4): 797–803.
- [25] Hill RD, Zadow JG. Recovery of whey proteins from precipitated complexes of carboxymethyl cellulose and protein. *J Dairy Res*, 1978, 45: 77–83.
- [26] Blaicher FM, Elstner F, Stein W, et al. Rapeseed protein isolates: effect of processing on yield and composition of protein. *J Agric Food Chem*, 1983, 31(2): 358–362.
- [27] Menkhaus TJ, Eriksson SU, Whitson PB, et al. Host selection as a downstream strategy: polyelectrolyte precipitation of β -glucuronidase from plant extracts. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 77(2): 148–154.
- [28] Bozzano AG, Glatz CE. Separation of proteins from polyelectrolytes by ultrafiltration. *J Membr Sci*, 1991, 55(1/2): 181–198.
- [29] McDonald P, Victa C, Carter-Franklin JN, et al. Selective antibody precipitation using polyelectrolytes: a novel approach to the purification of monoclonal antibodies. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(4): 1141–1151.
- [30] Boeris V, Romanini D, Farruggia B, et al. Purification of chymotrypsin from bovine pancreas using precipitation with a strong anionic polyelectrolyte. *Process Biochem*, 2009, 44(5): 588–592.
- [31] Cappella LV, Boeris V, Picó G. A simple method of chymotrypsin concentration and purification from pancreas homogenate using Eudragit[®] L100 and Eudragit[®] S100. *J Chromatogr B*, 2011, 879(13/14): 1003–1007.
- [32] Oscar JM, Goddijn, Pen J. Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol*, 1995, 13(9): 379–387.