

# 发酵低温豆粕生产碱性蛋白酶的

工艺研究

吴海波<sup>1,2</sup> 江连洲<sup>1,\*</sup> 赵英<sup>2</sup> 刑常瑞<sup>1</sup>

(1.东北农业大学食品学院 黑龙江哈尔滨 150030;  
2.国家大豆工程技术研究中心 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:**以提油后的副产物——低温豆粕为培养基的主要成分,利用枯草芽孢杆菌为发酵剂发酵产酶,以碱性蛋白酶活力为考察指标,通过响应面法对培养基和发酵条件进行了优化。结果显示在发酵条件一定的前提下,当培养基组成为1.48%葡萄糖、0.57%豆粕、0.05%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>时,碱性蛋白酶有最高酶活1792±47.72294u/mL;以此为培养基,对发酵初始pH、温度、接种量三个条件进行优化,发现当pH8.9,接种量为4.9%,35.4℃时碱性蛋白酶活最高。此条件下进行三次平行实验,酶活为2401u/mL,比未优化前提高了37%,从而以低成本的原料,得到较高的经济效益。

**关键词:**枯草芽孢杆菌,碱性蛋白酶,响应面方法

## Alkaline protease produced by *Bacillus Subtilis* with defatted soy flour

WU Hai-bo<sup>1,2</sup> JIANG Lian-zhou<sup>1,\*</sup> ZHAO Ying<sup>2</sup> XING Chang-rui<sup>1</sup>

(1.Northeast Agricultural University ,Harbin 150030 ,China;  
2.The National Research Center of Soybean Engineering and Technology ,Harbin 150030 ,China)

**Abstract:** In this study, alkaline protease activity produced by *Bacillus Subtilis* as an index, culture and fermenting condition were optimized by response surface method. The result showed when the fermentation conditions were certain, the optimum ingredient levels of culture were obtained as follows: 1.48% glucose 0.57% defatted soy flour and 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, the alkaline protease activity could reach 1792 ± 47.72294u/mL. On the basis of the culture, initial pH, inoculation amount and temperature were optimized, the optimum fermentation conditions were: pH8.9, inoculation amount 4.9% and 35.4°C. Under these conditions, the protease activity could reach 2401u/mL which was increased by 37% in comparison with the not optimized conditions, and realized the better economic benefits.

**Key words:** *Bacillus Subtilis*; alkaline protease; response surface method

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2011)03-0195-06

蛋白酶是一种重要的酶制剂,在轻工、食品、医药工业中用途尤为广泛<sup>[1]</sup>。蛋白酶按其酶解作用的酸碱条件分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶,由于碱性蛋白酶比中性和酸性蛋白酶具有更强的水解能力和耐碱、耐热性能,被认为是最重要的应用型酶类,在工业酶中用量最大<sup>[2]</sup>。虽然我国对碱性蛋白酶的研究和利用已有多年的历史,研究水平不断提高,但仍主要依赖于进口,存在着酶制剂品种单一、价格昂贵等问题。虽然近年来利用微生物发酵产酶的研究较多,但多以化学分析试剂为主要组成部分,不仅成分较多,成本较高,而且酶活迟迟提高不上去,限制了工业化生产的实现。本实验以提油后剩余的副产物——低温脱脂豆粕为主要成分,枯草芽孢杆菌为发酵剂,通过响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)来优化各种条件,在较低成本的前提下,提高了碱性蛋白酶活,为实现工业化大生产提供了依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 购自于中国工业微生物菌种保藏中心;牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、酪氨酸、福林酚试剂、三氯乙酸、无水碳酸钠、氯化钠 均为分析纯;低温脱脂豆粕 哈尔滨高科生物技术公司;斜面保藏培养基 蛋白胨1%、牛肉膏0.5%、氯化钠0.5%、琼脂1.5%,pH7.5,121℃灭菌20min;种子培养基 蛋白胨1%、牛肉膏1%、氯化钠0.5%,自然pH,121℃灭

收稿日期:2010-08-12 \* 通讯联系人

作者简介:吴海波(1975-),女,在读博士,助理研究员,研究方向:植物油脂与蛋白工程。

基金项目:黑龙江省科技攻关计划项目(GA09B401-6)。

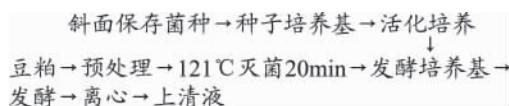
菌 20min。

DK-2000-Ⅲ L型电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司; PHS-3C型酸度计 上海盛磁仪器有限公司; TU-1901型双光束紫外可见分光光度计

北京普析通用仪器有限责任公司; HZQ-X100型振荡培养箱 中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司; LDZX-50FB型立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; 无菌操作台 北京东联哈尔仪器制造有限公司; Z36HK型高速恒温离心机 德国 HERMLE Labortechnik GmbH 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 实验流程



1.2.2 菌种活化 取1~2环斜面保存菌种接入装有50mL种子培养基的250mL三角瓶中,37℃下160r/min振荡培养20~24h,使菌体浓度达到 $10^8$ cfu/mL。

1.2.3 原料预处理 将低温脱脂豆粕粉碎成豆粉,过100目筛。

1.2.4 碱性蛋白酶活力的测定 发酵液在4℃条件下5000r/min离心20min取上清液,采用Folin酚法测定碱性蛋白酶活力<sup>[3]</sup>。酶活定义为:40℃条件下,1min水解酪素产生1μg酪氨酸定义为1个酶活力单位,以u/mL表示。

### 1.2.5 发酵培养基成分的确定

1.2.5.1 碳源的确定 不同碳源对枯草芽孢杆菌发酵产酶的影响:碳源分别为蔗糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖,添加量为1%、2%豆粕,接种量为5%,pH9按料液体积:瓶体积为1:5比例装料,在37℃条件下,160r/min振荡培养36h。

1.2.5.2 发酵时间的确定 接种的上述发酵培养基在37℃下160r/min振荡培养60h,每隔6h测一次酶活。

### 1.2.6 发酵培养基的优化

1.2.6.1 发酵培养基各成分浓度的确定 不同豆粕浓度对枯草芽孢杆菌发酵产粗酶的影响:豆粕浓度分别为0、0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%,在37℃的条件下,葡萄糖浓度为1%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度为0.075%,接种量为5%,pH9,发酵42h。

不同碳源浓度对枯草芽孢杆菌发酵产粗酶的影响:当葡萄糖浓度分别为0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%时,37℃的条件下,豆粕浓度为0.75%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度为0.075%,接种量为5%,pH9,发酵42h。

不同无机盐浓度对枯草芽孢杆菌发酵产粗酶的影响:当KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度分别为0、0.025%、0.05%、0.075%、0.1%、0.125%时,在37℃的条件下,豆粕浓度为0.75%,葡萄糖浓度为1%,接种量为5%,pH9,发酵42h。

1.2.6.2 响应面实验 在单因素实验的基础上,选取葡萄糖含量x<sub>1</sub>、豆粕浓度x<sub>2</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度x<sub>3</sub>为自变量,以碱性蛋白酶活Y为响应值,根据中心组合设计原理设计响应面分析实验,表1为因素水平编码表。

表1 因素水平编码表

编码 水平	因素		
	x <sub>1</sub> 葡萄糖 浓度(%)	x <sub>2</sub> 豆粕 浓度(%)	x <sub>3</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 浓度(%)
-1.682	1.1636	0.1636	0.01636
-1	1.3	0.3	0.03
0	1.5	0.5	0.05
1	1.7	0.7	0.07
1.682	1.8364	0.8364	0.08364

### 1.2.7 发酵条件的优化

1.2.7.1 发酵条件的单因素实验 当培养基初始pH分别为6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0时,在37℃条件下,接种量为5%,发酵42h。

发酵温度分别为25、31、37、41、43℃时,接种量为5%,pH9,发酵42h。

接种量分别为2%、4%、6%、8%、10%时,37℃,培养基起始pH9的条件下,发酵42h。

1.2.7.2 响应面实验 在单因素实验的基础上,应用响应面优化法进行过程优化。以pH、发酵温度、接种量为自变量,以碱性蛋白酶活值为响应值Y,表2为因素水平编码表。

表2 因素水平编码表

编码 水平	因素		
	x <sub>1</sub> pH	x <sub>2</sub> 发酵温度 (℃)	x <sub>3</sub> 接种量 (%)
-1.682	8.6954	35.682	4.3182
-1	8.9	36	5
0	9.2	37	6
1	9.5	38	7
1.682	9.7046	38.682	7.6818

## 2 结果与分析

### 2.1 酶活力标准曲线的制作

所得标准曲线如图1所示,回归方程为y=0.11184x+0.02246,R<sup>2</sup>=0.9993。

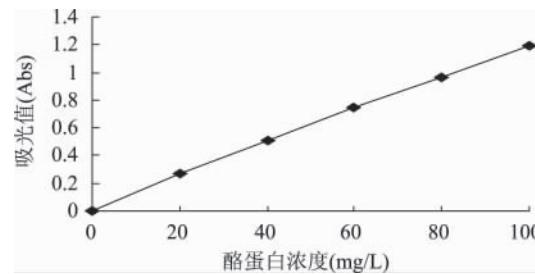


图1 酶活力测定标准曲线

根据标准曲线得酪氨酸标准曲线的回归方程为:

$$y = 0.01184x + 0.02246$$

按式(1)计算蛋白酶酶活:

$$\text{蛋白酶活力 } X = K \times A \times 4 / 10 \times N \times 1 / V \quad \text{式(1)}$$

式中: A—平行实验的平均吸光度; K—吸光常数;

4—离心管中反应液总体积(mL); 10—反应时间10min; N—稀释倍数; V—取酶液体积(mL)。

### 2.2 发酵培养基成分的确定

豆粕是大豆提油后的副产物,蛋白质含量丰富,在43%~48%左右,并且还含有少量的糖、无机盐、维生素和某些生长因子,因而菌种可在以豆粕为氮源

的培养基中生长良好<sup>[4]</sup>。本实验以低温脱脂豆粕为发酵培养基的唯一氮源,一方面是豆粕可以提供微生物生长所需的氮源;另一方面豆粕中的大豆蛋白可被产生的酶类水解成大豆多肽,提高蛋白质生物效价,有利于吸收利用。

**2.2.1 碳源的选择** 碳源是供给菌种生命活动所需能量的重要来源,不同的碳源影响着产物的生产能力。枯草芽孢杆菌发酵选择的碳源为蔗糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖。

由图2可知,以葡萄糖作为碳源时,产酶量最高,这是由于葡萄糖在所有碳源中最易被利用,因此微生物能迅速利用碳源进行生长代谢及酶的合成。

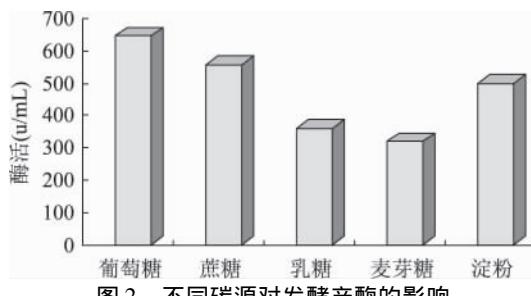


图2 不同碳源对发酵产酶的影响

**2.2.2 发酵时间对酶活的影响** 图3显示随着发酵时间的延长,枯草芽孢杆菌产生的蛋白酶活力先增加后降低。在0~12h之前几乎不产酶活,发酵24h后酶活急剧升高,42h时酶活力达到高峰,其后酶活下降。因此发酵时间选择42h。

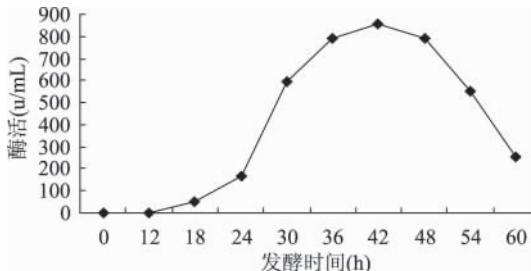


图3 发酵时间对发酵酶活的影响

### 2.2.3 培养基中各成分浓度的确定

**2.2.3.1 培养基中各组分不同浓度时的蛋白酶活** 见图4~图6。从图4中可看出,在葡萄糖浓度为1%~2%之间,发酵酶活最大,而浓度在小1%和大于2%范围内,产酶量减少。由于葡萄糖是一种速效碳源,菌体由种子液接种到发酵液中时,迅速获得大量碳源维持继续生长势头,从而大量产酶;但过高的葡萄糖浓度(>2%)反而会降低酶产量,因为过多的葡萄糖会加速菌体呼吸,使培养基中溶解氧迅速消耗,不能满足菌体生长的需要<sup>[5]</sup>。因此,葡萄糖优化范围选定为1%~2%范围内。

豆粕浓度对蛋白酶产量具有举足轻重的作用。为获得最高的酶产量,豆粕浓度也必须保证在一个合适的范围内。氮源过多,菌体生长过于旺盛,导致pH偏高和溶氧不足,不利于酶的积累;氮源不足,影响菌体生长繁殖,易引起菌体衰老自溶,从而影响酶产量。从图5可知,豆粕浓度优化范围选定在0.1%~1%之间。

从图6可知,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度对产酶量有着重要

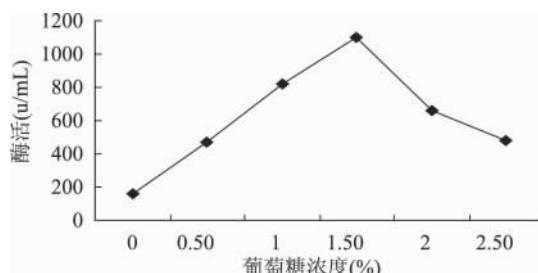


图4 葡萄糖浓度对发酵产酶的影响

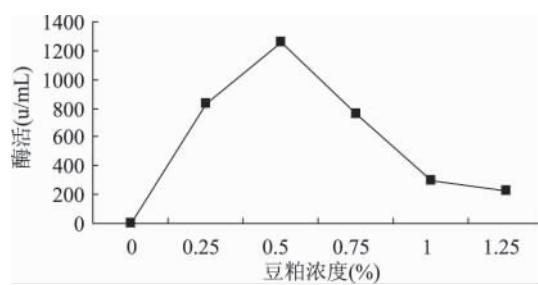


图5 不同豆粕浓度对发酵产酶影响

的影响。在KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度0~0.09%范围内,有最大酶活,所以优化范围选定为此区间。

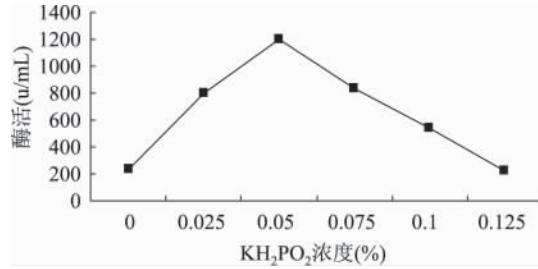


图6 不同浓度的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>对发酵产酶影响

**2.2.3.2 响应面实验安排及实验结果** 本实验应用响应面优化法进行过程优化。响应面实验方案及结果见表3。实验号1~14为析因实验,15~20为6个中心实验,用以估计实验误差。

**2.2.3.3 响应面实验结果分析** 通过统计分析软件SAS9.1进行数据分析,建立二次响应面回归模型如下:

$$Y = 1731.872 + 30.49123x_1 + 91.645x_2 - 6.8929x_3 - 113.4092x_1x_1 - 149.875x_1x_2 - 47.125x_1x_3 - 158.664x_2x_2 - 18.375x_2x_3 - 319.5311x_3x_3 \quad (2)$$

从表4中可看到,方程因变量与自变量之间的线性关系明显,该模型回归显著( $p < 0.001$ ),失拟项不显著( $p > 0.05$ ),并且该模型 $R^2 = 93.77\%$ , $R_{Adj}^2 = 88.16\%$ ,说明该模型与实验拟合良好,自变量与响应值之间线性关系显著,可以用于该反应的理论推测。由F检验,可知因子贡献率为: $x_2 > x_1 > x_3$ ,即低温脱脂豆粕浓度>葡萄糖浓度>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度,即低温脱脂豆粕浓度对酶活影响最显著,其次是葡萄糖浓度,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度对酶活影响最不显著;三者之间的相互影响对酶活的影响表现为:葡萄糖浓度和低温脱脂豆粕浓度交互影响对碱性蛋白酶活影响显著( $p < 0.05$ ),见图7;而葡萄糖浓度和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度,低温脱脂豆粕浓度和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度交互影响对酶活影响不显著( $p > 0.05$ )。

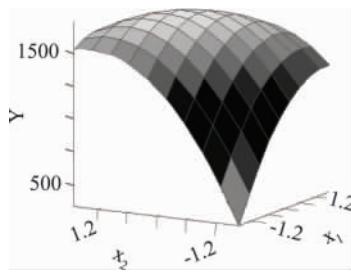
表3 响应面实验方案及实验结果

实验号	$x_1$ 葡萄糖 浓度(%)	$x_2$ 豆粕 浓度(%)	$x_3$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度(%)	酶活 Y (u/mL)
1	-1	-1	-1	789
2	-1	-1	1	860
3	-1	1	-1	1280
4	-1	1	1	1210
5	1	-1	-1	1365
6	1	-1	1	1180
7	1	1	-1	1189
8	1	1	1	998
9	-1.6818	0	0	1508
10	1.6818	0	0	1403
11	0	-1.6818	0	1099
12	0	1.6818	0	1556
13	0	0	-1.6818	789
14	0	0	1.6818	956
15	0	0	0	1780
16	0	0	0	1669
17	0	0	0	1754
18	0	0	0	1637
19	0	0	0	1849
20	0	0	0	1687

表4 回归与方差分析结果

变量	自由度	平方和	均方	F值	Pr > F
$x_1$	1	12696.97	12696.97	0.906851	0.363401
$x_2$	1	114701.2	114701.2	8.192257	0.016893
$x_3$	1	648.8649	648.8649	0.046344	0.833879
$x_1x_1$	1	185352.6	185352.6	13.23837	0.004548
$x_1x_2$	1	179700.1	179700.1	12.83465	0.004991
$x_1x_3$	1	17766.13	17766.13	1.268903	0.286278
$x_2x_2$	1	362793.1	362793.1	25.91163	0.000471
$x_2x_3$	1	2701.125	2701.125	0.192921	0.669835
$x_3x_3$	1	1471391	1471391	105.0905	0.0001
回归	9	2106474	234052.7	16.71665	0.0001
剩余	10	140011.7	14001.17		
失拟	5	108558.4	21711.67	3.451411	0.100078
总和	19	2246486			

注:经分析,总回归的相关性系数( $R^2$ )为93.77%,决定系数( $R_{\text{Adj}}^2$ )为88.16%。

图7  $Y = f(x_1, x_2)$  的响应面

应用响应面寻优分析方法对回归模型进行分析,寻找最优响应结果。由表5可知,当低温脱脂豆粕浓度为0.57%,葡萄糖浓度为1.48%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度0.05%时,响应面(酶活)有最优化值 $1792 \pm 47.72294 \text{ u/mL}$ 。

表5 响应面寻优结果

因素	水平值	实际值
$x_1$ 葡萄糖浓度	-0.07844	1.48
$x_2$ 低温脱脂豆粕浓度	0.32668	0.57
$x_3$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度	-0.01439	0.05

### 2.3 发酵条件的优化

在各个外部培养条件下,初始pH和发酵温度直接影响菌体的生长和蛋白酶类的产量,只有在合适的范围内,菌体才能生长良好同时产生蛋白酶。同样,接种量的多少也影响着酶的产量;接种量太大,短时间营养物质迅速消耗掉,抑制了菌种的生长和繁殖,不利于产酶;接种量太少,菌种增殖缓慢,产酶量减少<sup>[6~7]</sup>。因此,我们以碱性蛋白酶活为响应值,对初始pH和发酵温度、接种量进行优化。

不同pH、不同发酵温度、不同接种量条件下的产酶情况见图8~图10。

从图8中可看到,在初始pH为9时有最大酶活,因此优化范围选择pH8~10;温度对微生物的生长产生重要影响,温度过低,菌种生产迟缓,不易产酶;温度过高,其生长周期变短,菌株过早老化,也不利于产酶<sup>[8]</sup>。从图9可知,随着发酵温度的升高,枯草芽孢杆菌产蛋白酶活力增强,35℃以后蛋白酶开始减少,因此,发酵温度范围选择在31~40℃之间。

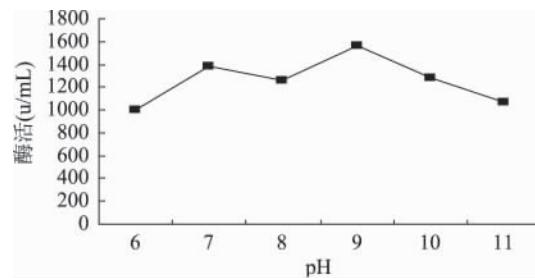


图8 不同起始pH对发酵产酶的影响

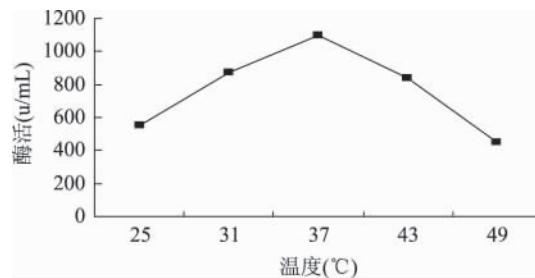


图9 不同发酵温度对发酵产酶影响

接种量对菌体产酶有较大影响,接种量太少,菌群较难繁殖;接种量太高又抑制了枯草芽孢杆菌的生长和繁殖,更不利于其产蛋白酶,因此选择合适的接种量尤为重要<sup>[9]</sup>。从图10可知,在接种量2%时,酶活最低,接种量为6%时酶活最高。因此,接种量的优化范围选择为4%~8%。

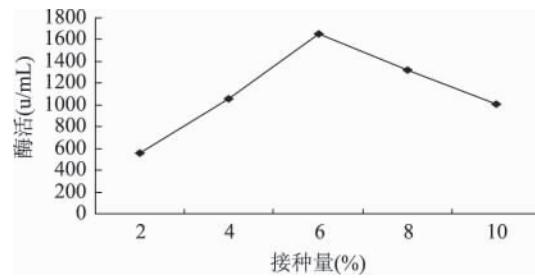


图10 不同接种量对发酵产酶的影响

2.3.1 响应面实验安排及结果 响应面实验方案及结果见表6。实验号1~14为析因实验,15~20为6个中心实验,用以估计实验误差。

表 6 响应面实验方案及实验结果

实验号	$x_1$ pH	$x_2$ 温度 (℃)	$x_3$ 接种量 (%)	酶活 Y (u/mL)
1	-1	-1	-1	2338
2	-1	-1	1	1639
3	-1	1	-1	2114
4	-1	1	1	1722
5	1	-1	-1	1425
6	1	-1	1	1550
7	1	1	-1	2350
8	1	1	1	2250
9	-1.6818	0	0	1749
10	1.6818	0	0	2003
11	0	-1.6818	0	1657
12	0	1.6818	0	2354
13	0	0	-1.6818	1895
14	0	0	1.6818	1236
15	0	0	0	2286
16	0	0	0	2393
17	0	0	0	2089
18	0	0	0	2190
19	0	0	0	2266
20	0	0	0	2474

2.3.2 响应面实验结果分析 通过统计分析软件 SAS9.1 进行数据分析,建立二次响应面回归模型如下:

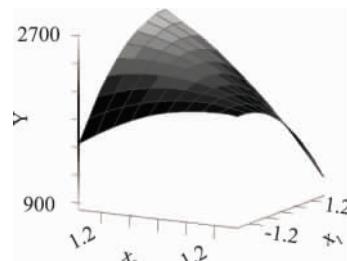
$$Y = 2278.603 + 13.85216x_1 + 194.4966x_2 - 159.2093x_3 - 115.1585x_1x_1 + 220.75x_1x_2 + 139.5x_1x_3 - 69.37341x_2x_2 + 10.25x_2x_3 - 224.937x_3x_3 \quad (3)$$

由表 7 可知,方程因变量与自变量之间的线性关系明显,该模型回归显著( $p < 0.001$ ),失拟项不显著( $p > 0.05$ ),并且该模型  $R^2 = 90.47\%$ , $R_{Adj}^2 = 81.89\%$ ,说明该模型与实验拟合良好,自变量与响应值之间线性关系显著,可以用于该反应的理论推测。由 F 检验,可以得到因子贡献率为:  $x_2 > x_3 > x_1$ ,即对酶活影响的作用分别为: 温度 > 接种量 > pH; 三者间相互作用对酶活的影响为: 温度和 pH 交互影响对菌体产碱性蛋白酶量影响显著( $p < 0.05$ ),见图 11,而 pH 和接种量、温度和接种量交互影响对菌体产碱性蛋白酶量影响不显著( $p > 0.05$ )。

表 7 回归与方差分析结果

变量	自由度	平方和	均方	F 值	Pr > F
$x_1$	1	2620.506	2620.506	0.108704	0.748427
$x_2$	1	516623.7	516623.7	21.43056	0.000937
$x_3$	1	346168.3	346168.3	14.35974	0.003547
$x_1x_1$	1	191114.6	191114.6	7.927807	0.018297
$x_1x_2$	1	389844.5	389844.5	16.17151	0.002433
$x_1x_3$	1	155682	155682	6.457993	0.0293
$x_2x_2$	1	69356.63	69356.63	2.877048	0.120706
$x_2x_3$	1	840.5	840.5	0.034866	0.855611
$x_3x_3$	1	729161.5	729161.5	30.24704	0.000262
回归	9	2288275	254252.8	10.5469	0.000504
剩余	10	241068.7	24106.87		
失拟	5	145904.7	29180.94	1.533192	0.325268
总和	19	2529344			

注: 经分析,总回归的相关系数( $R^2$ )为 90.47%,决定系数( $R_{Adj}^2$ )为 81.89%。

图 11  $Y = f(x_1, x_2)$  的响应面

应用响应面寻优分析方法对回归模型进行分析,寻找最优响应结果,由表 8 可知,当温度为 35.4℃,接种量为 4.9%,pH 为 8.9 时,响应面(酶活)有最优值 2407.9u/mL。

表 8 响应面寻优结果

因素	水平值	实际值
$x_2$ 温度	-1.56070	35.4
$x_3$ 接种量	-1.14514	4.9
$x_1$ pH	-0.86394	8.9

2.3.3 验证实验与对比实验 在响应面分析法求得的最佳条件下,即温度为 35.4℃,接种量为 4.9%,pH 为 8.9 时进行平行实验(3 次)。酶活 3 次平行实验的均值为 2401u/mL,酶活预测值为 2407.9u/mL。说明响应值的实验值与回归方程预测值吻合良好,比未优化前(1745u/mL)提高了 37%。

### 3 讨论与结论

本实验在以提油副产物——低温豆粕为培养基主要成分,枯草芽孢杆菌为发酵菌株,以碱性蛋白酶活为考察指标,对培养基中的三个成分——豆粕、葡萄糖、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的浓度进行优化,结果显示最佳培养基组成为: 1.48% 葡萄糖、0.57% 豆粕、0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。

以此为培养基,应用响应面法对发酵起始 pH、接种量、发酵温度三个发酵条件进行优化,结果显示当温度 35.4℃,接种量为 4.9%,pH 8.9,发酵 42h,酶活有最高值 2401u/mL。

姚刚<sup>[10]</sup>利用枯草杆菌发酵产碱性蛋白酶,优化后的各培养条件为: 酵母浸粉 2%、蔗糖 1.5%、0.5% 吐温 80、硫酸镁 0.02%、A% 接种量,起始 pH 9,37℃ 发酵 36h,碱性蛋白酶活力达 1670u/mL。本研究与姚刚所用菌种相同,通过采用不同的培养基组分,考虑到各种条件下的相互影响,在培养基成分尽可能简单,易操作的前提下,大大提高了酶活,是其的 146%,且成本低廉,更易实现工业化生产。

### 参考文献

- [1] Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline Protease: A Review [J]. Bioresource Tech, 1998, 64: 175–183.
- [2] Ito S, Kobayashi T, Ara K, et al. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures [J]. Extremophiles, 1998, 2: 185–190.
- [3] Iemura Y, Yamada T, Takahashi T, et al. Properties of the peptides liberated from rice protein in Sokujo-moto [J]. Biosci and Bioeng, 1999, 88(3): 276–280.
- [4] El-Sayed A FM. Alternative Dietary Protein Sources for Farmed Tilapia, Oreochromis spp [J]. Aquaculture, 1999, 179

# 对甲基苯甲酸连接的 氯霉素全抗原合成与鉴定

罗舜菁<sup>1</sup> 陈婷婷<sup>1</sup> 刘成梅<sup>1,\*</sup> 邹常春<sup>2</sup> 严杰琳<sup>1</sup> 陈臣<sup>1</sup> 高鹏<sup>1</sup>

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室 江西南昌 330047;

2.南昌大学 江西南昌 330031)

**摘要:**以对氯甲基苯甲酸( CBA) 或对氯甲基苯甲酸甲酯( MCB) 分别与氯霉素( CAP) 反应合成氯霉素-对甲基苯甲酸半抗原( CAP-MBA I 、CAP-MBA II ) ,再与牛血清白蛋白( BSA) 偶联制备全抗原;通过紫外、荧光光谱扫描定性鉴定合成成功; bradford 法结合 TNBS 法定量计算出全抗原表面半抗原密度( HD ) 。再将 CAP-MBA II 与卵清蛋白( OVA) 合成包被抗原( CAP-MBA II-OVA ) ,间接竞争 ELISA 计算其抑制率。研究结果表明 ,半抗原全抗原偶联效率优于 CAP-MBA I , MCB 与 CAP 反应合成的半抗原 CAP-MBA II 更适合蛋白偶联。采用 CAP-MBA II-OVA 作为包被抗原可以提高 ELISA 检测的抑制率从而增加其灵敏度。

**关键词:** 氯霉素 对甲基苯甲酸 连接臂 全抗原

## Synthesis and characterization of chloramphenicol complete antigen linked by 4-methylbenzoic acid

LUO Shun-jing<sup>1</sup> ,CHEN Ting-ting<sup>1</sup> ,LIU Cheng-me<sup>1,\*</sup> ,ZOU Chang-chun<sup>2</sup> ,  
YAN Jie-lin<sup>1</sup> ,CHEN Chen<sup>1</sup> ,GAO Peng<sup>1</sup>

( 1.State Key Laboratory of Food Science and Technology Nanchang University Nanchang 330047 ,China;

2.Nanchang University Nanchang 330031 ,China)

**Abstract:** A new Chloramphenicol( CAP) hapten was prepared by conjugate CAP with 4-( Chloromethyl) benzoic acid( CBA) or Methyl 4-( chloromethyl) benzoate( MCB) .Two types of hapten( CAP-MBA I ,CAP-MBA II ) were used to synthesis complete antigen( CA) with BSA.CA was identified by UV and fluorescence spectrum.The hapten density of CA was evaluated by Bradford method together with TNBS method.CAP-MBA II was then linked to OVA forming Solid-coating antigen( CAP-MBA II-OVA) .The results showed that MCB conjugated with CAP was better than CBA.CAP-MBA II-OVA can rise the inhibit rate of ELISA and sensitivity can be improved.

**Key words:** chloramphenicol; 4-methylbenzoic acid; linking arm; complete antigen

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306( 2011 ) 03-0200-05

氯霉素( chorampheulcol ,CAP) 及其体内代谢物氯霉素糖醛酸残留具有血液系统毒性 ,可导致不可

收稿日期:2010-11-10 \* 通讯联系人

作者简介:罗舜菁( 1969- ) ,女 副教授 硕士 ,研究方向:食品安全。

基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目( GJJ09062 ) 。

( 5 ):13-23.

[5]余勃 .枯草芽孢杆菌发酵豆粕生产大豆活性肽的研究 [D]. 博士学位论文 2006 : 57-58.

[6]EllaiahP ,AdinarayanaK. Response surface optimization of the cultural conditions for the Production of alkaline Protease [J]. Sei Ind Res 2001 ,60: 868-875.

[7]Beg QK ,Saxena RK ,Gupta R.Kinetic constants determination for an alkaline Protease from *Bacillus mojavensis* using response

逆的再生障碍性贫血 ,严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。因此 ,美国、欧盟等诸多国家规定禁止氯霉素用于食源性动物 ,并将氯霉素列为必检项目 ,规定不得检出<sup>[2-3]</sup>。近年来 荧光偏振免疫分析<sup>[4]</sup>、基于表面等离子共振的生物传感器<sup>[5]</sup>等新兴免疫技术越来越多地运用到

surface methodology [J]. Biotechnol Bioeng 2002 ,78: 289-295.

[8]吴晖 ,卓林霞 ,解检清 等 .发酵条件对枯草芽孢杆菌发酵豆粕中的蛋白酶活力的影响 [J]. 现代食品科技 ,2008 ,24 ( 10 ): 973-976.

[9]舒丹 ,李宏 ,严建华 等 .高温芽孢杆菌碱性蛋白酶发酵条件及酶性质研究 [J]. 四川大学学报 ,2004 ,41( 4 ): 856-860.

[10]姚刚 ,程建军 ,孙鹏 ,等 .枯草芽孢杆菌发酵产碱性蛋白酶的研究 [J]. 食品科学 ,2009 ,30( 23 ): 347-351.