

发酵低温豆粕生产碱性蛋白酶的

工艺研究

吴海波^{1,2}, 江连洲^{1,*}, 赵英², 荆常瑞¹

(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_2PO_4 时, 碱性蛋白酶有最高酶活 $1792 \pm 47.72294 \text{ u/mL}$; 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°C 时碱性蛋白酶活最高。此条件下进行三次平行实验, 酶活为 2401 u/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^{1,2}, JIANG Lian-zhou^{1,*}, ZHAO Ying², XING Chang-rui¹

(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_2PO_4 , the alkaline protease activity could reach $1792 \pm 47.72294 \text{ u/mL}$. 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 2401 u/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^[1]。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^[2]。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°C 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°C 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 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 北京东联哈尔滨仪器制造有限公司; 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

斜面保存菌种→种子培养基→活化培养
↓
豆粕→预处理→121℃灭菌20min→发酵培养基→
发酵→离心→上清液

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^[3]。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_2PO_4 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_2PO_4 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_2PO_4 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_1 、豆粕浓度 x_2 、 KH_2PO_4 浓度 x_3 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_1 葡萄糖浓度(%)	x_2 豆粕浓度(%)	x_3 KH_2PO_4 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_1 pH	x_2 发酵温度(℃)	x_3 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 $y = 0.1184x + 0.02246$, $R^2 = 0.9993$ 。

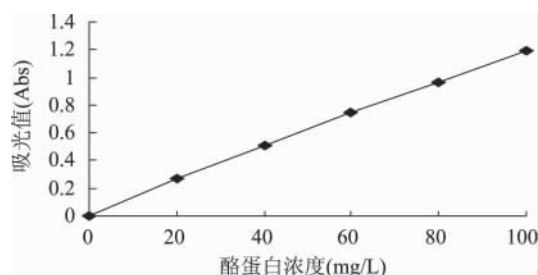


图 1 酶活力测定标准曲线

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^[4]。本实验以低温脱脂豆粕为发酵培养基的唯一氮源,一方面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。

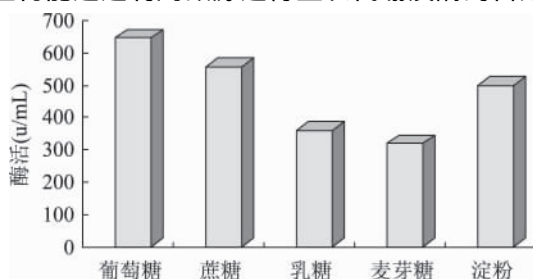


图2 不同碳源对发酵产酶的影响

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。

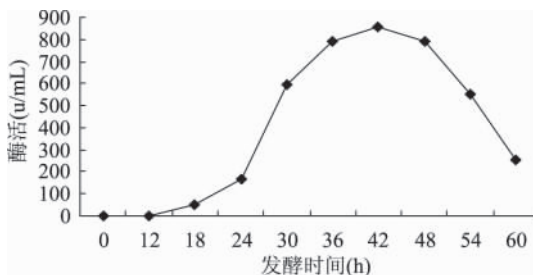


图3 发酵时间对发酵酶活的影响

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^[5]。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_2PO_4 的浓度对产酶量有着重要

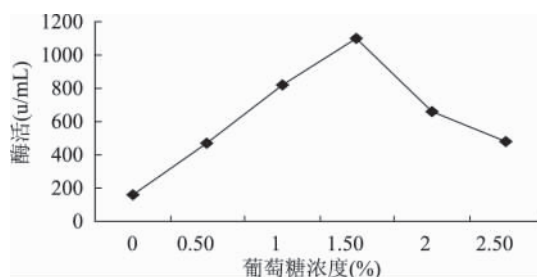


图4 葡萄糖浓度对发酵产酶的影响

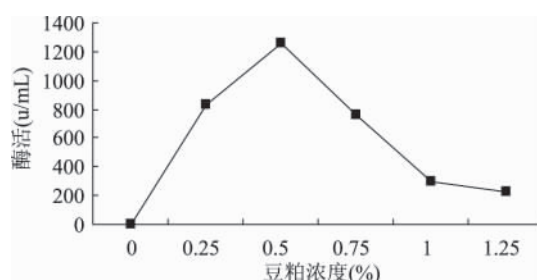


图5 不同豆粕浓度对发酵产酶影响

的影响。在 KH_2PO_4 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。

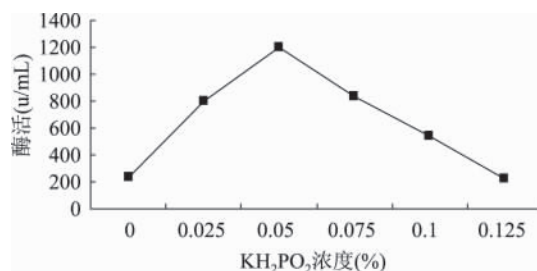


图6 不同浓度的 KH_2PO_4 对发酵产酶影响

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:

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

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 $R^2 = 93.77\%$, $R^2_{\text{adj}} = 88.16\%$,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_2PO_4 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_2PO_4 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_2PO_4 浓度、低温脱脂豆粕浓度和 KH_2PO_4 浓度交互影响对酶活影响不显著($p > 0.05$)。

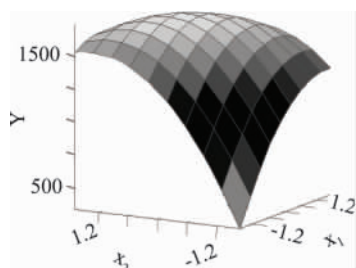
表3 响应面实验方案及实验结果

实验号	x_1 葡萄糖 浓度(%)	x_2 豆粕 浓度(%)	x_3 KH_2PO_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
$x_1 x_1$	1	185352.6	185352.6	13.23837	0.004548
$x_1 x_2$	1	179700.1	179700.1	12.83465	0.004991
$x_1 x_3$	1	17766.13	17766.13	1.268903	0.286278
$x_2 x_2$	1	362793.1	362793.1	25.91163	0.000471
$x_2 x_3$	1	2701.125	2701.125	0.192921	0.669835
$x_3 x_3$	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^2_{Adj}) 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%, KH_2PO_4 浓度 0.05% 时, 响应面(酶活)有最优值 $1792 \pm 47.72294 \text{ u/mL}$ 。

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 KH_2PO_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中, 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^[6-7]。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^[8]。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。

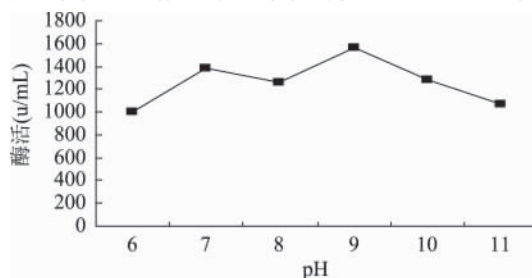


图8 不同起始 pH 对发酵产酶的影响

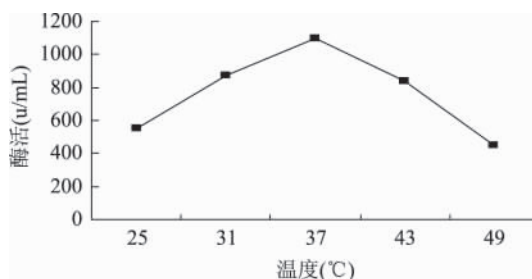


图9 不同发酵温度对发酵产酶影响

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^[9]。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%。

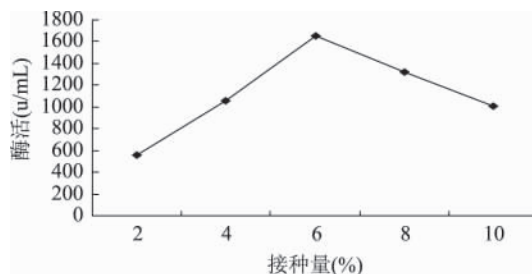


图10 不同接种量对发酵产酶的影响

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 ($^{\circ}$ C)	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:

$$Y = 2278.603 + 13.85216x_1 + 194.4966x_2 - 159.2093x_3 - 115.1585x_1x_1 + 220.75x_1x_2 + 139.5x_1x_3 - 69.37341x_2x_2 + 10.25x_2x_3 - 224.937x_3x_3$$
 式(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 $R^2 = 90.47\%$, $R^2_{Adj} = 81.89\%$,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,总回归的相关性系数(R^2)为 90.47%,决定系数(R^2_{Adj})为 81.89%。

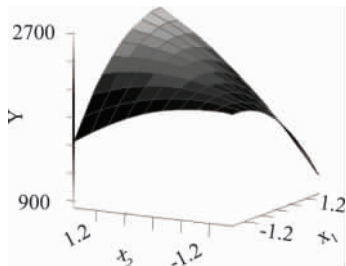


图 11 $Y = f(x_1, x_2)$ 的响应面

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 $^{\circ}$ C,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 $^{\circ}$ C,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、 KH_2PO_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% KH_2PO_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 $^{\circ}$ C,接种量为 4.9%,pH8.9,发酵 42h,酶活有最高值 2401u/mL。

姚刚^[10]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%,4% 接种量,起始 pH9,37 $^{\circ}$ C 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 Famed 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¹, 陈婷婷¹, 刘成梅^{1,*}, 邹常春², 严杰琳¹, 陈 臣¹, 高 鹏¹

(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-jing¹, CHEN Ting-ting¹, LIU Cheng-mei^{1,*}, ZOU Chang-chun²,

YAN Jie-lin¹, CHEN Chen¹, GAO Peng¹

(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 florescence 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(chloramphenicol, 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

逆的再生障碍性贫血, 严重危害人类健康^[1]。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^[2-3]。近年来, 荧光偏振免疫分析^[4]、基于表面等离子共振的生物传感器^[5]等新兴免疫技术越来越多地运用到

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] Ellaiah P, Adinarayana K. 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

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.