

酸土脂环酸芽孢杆菌可溶性全细胞蛋白提取工艺优化*

袁亚宏 刘晓珂 岳田利 高振鹏
(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

【摘要】 研究了超声波破碎法、SDS沸水浴、溶菌酶和细胞裂解液处理对酸土脂环酸芽孢杆菌破碎和可溶性全细胞蛋白提取效果的影响,并采用 SDS-PAGE 电泳进行蛋白成分分析,通过单因素试验和响应面法对可溶性全细胞蛋白的提取工艺条件进行了分析与优化。结果表明:细胞裂解液处理提取效果最好;细胞裂解液处理参数对全细胞蛋白提取量有显著影响,因素影响主次顺序为液料比、处理时间、处理温度;细胞裂解液处理优化工艺参数为:处理时间 37.4 min、处理温度 18.9℃和液料比 27.0 mL/g,可溶性全细胞蛋白提取量达到 161.18 mg/g。试验所得可溶性全细胞蛋白提取回归模型高度显著($R^2=0.9892$),拟合性好,可用于预测。

关键词: 酸土脂环酸芽孢杆菌 可溶性全细胞蛋白 SDS-PAGE 细胞裂解液 工艺参数 响应面
中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)06-0139-08

Optimization of Soluble Whole-cell Protein Extraction from
Alicyclobacillus acidoterrestris

Yuan Yahong Liu Xiaoke Yue Tianli Gao Zhenpeng
(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract

The yield of soluble whole-cell protein from *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922^T cells is dependent on the effectiveness of cell lysis post fermentation. Various cell lysis approaches were investigated, including ultrasound, SDS, boiling, lysozyme, and cell lysis reagent treatment, and the different samples of soluble protein were determined by SDS protein polyacrylamide gel electrophoresis. The soluble whole-cell protein by one-factor-at-a-time experiments and response surface method was optimized. The results showed that the cell lysis reagent treatment was the most effective in extracting soluble whole-cell protein. The most significant processing parameters, namely incubation temperature, reaction time, and the ratio of cell lysis reagent volume and bacteria weight (A/B ratio), were optimized by using the Box-Behnken with a quadratic regression model built by response surface methodology (RSM). The influence order of factors to protein extraction rate was: A/B ratio, time and temperature. The highest soluble whole-cell protein yield at 161.18 mg/g was attained under optimal time, temperature, and A/B ratio at 37.4 min, 18.9℃, and 27.0 mL/g, respectively. The regression model of soluble whole-cell protein extraction was highly significant ($R^2=0.9892$), the experimental and simulated results were found to be in good agreement, which could be used to forecast.

Key words *Alicyclobacillus acidoterrestris*, Soluble whole-cell protein, SDS-PAGE, Cell lysis reagent, Process parameters, Response surface

收稿日期: 2012-01-01 修回日期: 2012-03-03
* 国家自然科学基金资助项目(31071550,31171721)、农业部“948”项目(2011-G8-3)、陕西省科技攻关资助项目(2009K01-20)和西北农林科技大学基本科研业务青年项目(QN2009073)
作者简介: 袁亚宏,副教授,博士,主要从事食品工程技术研究,E-mail: yuan324@msn.com
通讯作者: 岳田利,教授,博士生导师,主要从事食品生物工程及食品安全控制研究,E-mail: yuetl@nwsuaf.edu.cn

引言

脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*), 俗称嗜酸耐热菌, 是一类中度嗜热、嗜酸、革兰氏阳性或可变(生长后期该属的一些菌种为革兰氏阴性, 如 *A. fastidiosus*) 产芽孢杆菌。自 1992 年 Wisotzkey 根据其 16SrRNA 序列和细胞膜中的不饱和脂肪酸种类, 将其从芽孢杆菌属划分出来成为独立的菌属之后, 目前已经分离到 20 个种、2 个亚种和 2 个暂定种^[1-2]。脂环酸芽孢杆菌, 由于其耐热性和嗜酸性, 所以在浓缩苹果汁的加工过程中极难控制和去除。果汁中的脂环酸芽孢杆菌已成为果汁生产厂家最为棘手的问题之一, 越来越受到关注。酸土脂环酸芽孢杆菌(*A. acidoterrestris*) 是最常见的污染果汁的脂环酸芽孢杆菌, 国际贸易中严格要求每 10 mL 浓缩果汁中该菌的数量不超过一个^[3-5]。脂环酸芽孢杆菌广泛分布于热泉和酸性土壤中, 在水果、果汁、糖浆及其他食品中亦有发现^[6-10]。我国对嗜酸耐热菌的基础研究和应用研究都比较缺乏, 目前关于酸土脂环酸芽孢杆菌的研究主要集中在对其快速检测、鉴定及其控制, 而对脂环酸芽孢杆菌可溶性全细胞蛋白资源综合利用研究报道较少^[11]。

全细胞蛋白电泳分析技术具有分辨率高、重复性好、操作简单和省时等优点, 在细菌分型和流行病学调查方面具有重要意义, 国外目前尚无关于运用此技术进行脂环酸芽孢杆菌的报道。因此, 开展脂环酸芽孢杆菌可溶性全细胞蛋白成分的研究, 对于建立基于细胞成分的快速鉴定方法具有重要价值^[12]。同时, 对于脂环酸芽孢杆菌的嗜酸、耐热机制的研究一直是国内外研究的热点, 开展此项研究对脂环酸芽孢杆菌可溶性全细胞蛋白功能的应用和可应用于工业需要的耐热酶的开发具有重要意义。文献报道细胞破碎的方法很多, 包括物理方法, 如珠磨破碎法; 化学方法, 如酸破壁法^[13]。这些方法适用于动物蛋白和植物蛋白的提取, 而适合酸土脂环酸芽孢杆菌细胞成分提取的方法未见报道。

本文系统研究超声波破碎法、SDS 沸水浴、溶菌酶、细胞裂解液处理对酸土脂环酸芽孢杆菌破碎和可溶性全细胞蛋白提取效果的影响, 并比较其电泳图谱的差异, 优选出最佳的提取方法, 优化工艺参数, 旨在为可溶性全细胞蛋白的提取及综合开发利用提供指导。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

标准菌: *A. acidoterrestris* DSM 3922^T 购自德国菌

种保藏中心。

1.2 培养基及主要试剂

AAM 培养基 (g/L): 酵母膏 2.00 g, 葡萄糖 2.00 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.20 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g, KH_2PO_4 1.20 g, 琼脂 20.00 g (液体培养基不添加), 蒸馏水 1 L。

SDS (十二烷基硫酸钠) (Sanland Chemical Co., Ltd.); 溶菌酶 (Solarbio Science & Technology Co., Ltd.); 细胞裂解液 (Sigma-Aldrich, Inc.)。

电泳试剂: 考马斯亮蓝 R-250 (Valley Blod, Los Angeles CA, USA); 低分子量蛋白 (Marker Fermentas); Tris (Sigma-Aldrich, Inc.); 丙烯酰胺; N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 (Valley Blod, Los Angeles CA, USA); 过硫酸铵 (Sigma-Aldrich, Inc.); TEMED (Sigma-Aldrich, Inc.); 甘氨酸。

1.3 主要仪器和设备

JY92-II DNCX31 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); UV-2550 型紫外可见分光光度计 (日本岛津); PM180R 型高速冷冻离心机 (意大利 ALC); XW-80A 型漩涡振荡器 (上海精科实业有限公司); JA2003 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); HH-6 型恒温水浴器 (上海福玛实验设备有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 菌体培养

将 1 环生长良好的试管斜面种子接入装有 100 mL AAM 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 45℃、180 r/min 往复摇床培养 24 h。4 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。

1.4.2 杂蛋白去除

用质量分数为 0.85% 的 10 倍体积生理盐水使菌体悬浮, 超速离心洗涤, 10 000 r/min、4℃ 冷冻离心 10 min 清洗培养基中的杂蛋白, 重复 3 次。

1.4.3 细胞破碎

(1) 超声波破碎处理: 1 mL 细菌悬液置冰浴中以 500 W, 工作 3 s、间歇 2 s, 破碎 30 min, 然后 10 000 r/min 离心 10 min 收集上清液贮存于 -20℃^[14]。

(2) SDS 沸水浴处理: 1 mL 细菌悬液中加入 0.1 g/mL SDS 至终质量分数为 0.2%, 沸水浴 5 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液贮存于 -20℃^[15]。

(3) 溶菌酶处理: 1 mL 菌悬液中加入 100 μL 溶菌酶溶液 (0.5 mg/mL 溶菌酶, 0.2 g/mL 蔗糖, 30 mmol/L pH 值 8.0 Tris-HCl, 1 mmol/L pH 值 8.0

EDTA),并使其悬浮,冰浴 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液贮存于 -20℃^[16]。

(4)细胞裂解液处理:1 g 湿菌体中加入 10 mL 细胞裂解液并使其悬浮,在室温下振荡反应30 min,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液贮存于 -20℃。其 3 个考察因素分别为:处理温度(10、20、30、40、50 和 60℃)、处理时间(10、20、30、40、50 和 60 min)以及液料比(5、10、15、20、25 和 30 mL/g 湿菌)。

1.4.4 可溶性全细胞蛋白提取量测定

可溶性全细胞蛋白测定参照 Bradford 方法 (Bradford, 1976),当蛋白含量为 0 ~ 1 000 μg 时,考马斯亮蓝 G-250 与蛋白的结合物在波长 595 nm 下的吸光度与蛋白质的含量呈线性关系,故可用于测定蛋白质的含量。考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的标准曲线方程为 $A = 0.007C - 0.0042$, $R^2 = 0.998$ (其中 A 为吸光度, C 为蛋白浓度)。可溶性全细胞蛋白提取量用单位质量(g)湿菌体中所含的蛋白质质量(mg)表示。

1.4.5 SDS-PAGE 电泳

利用不连续电泳系统^[17],适当改进,分离胶体积分数 12%,浓缩胶体积分数 5%,pH 值 8.3 Tris-甘氨酸缓冲体系,起始浓缩胶电压 90 V,进入分离胶改为 120 V,指示剂离底部 1 cm 时停止电泳,剥胶染色。

1.4.6 凝胶染色

采用考马斯亮蓝 R-250 方法进行染色。将凝胶剥下在水中浸泡 10 min,浸出部分 SDS;将凝胶放在 0.125 mg/mL 的考马斯亮蓝 R-250 溶液中。于 30℃下摇床摇动染色过夜,染色完成后用水冲洗胶,再把凝胶放入脱色液(体积分数 10% 冰乙酸,体积分数 30% 甲醇)充分浸泡,摇床摇动脱色至背景清晰,用凝胶成像仪拍摄图片,进行电泳结果分析^[18]。

1.4.7 细胞裂解液处理优化试验

根据单因素试验结果,选取处理时间、处理温度、液料比 3 个关键因子,采用 Box-Behnken 设计,以可溶性全细胞蛋白提取量为响应值,对上述 3 个因子进行参数优化试验,各因素及水平如表 1 所示。

表 1 中心组合试验因素水平
Tab.1 Levels and factors

水平	因素		
	处理时间 X_1 /min	处理温度 X_2 /℃	液料比 X_3 /mL·g ⁻¹
-1	20	10	10
0	30	20	20
1	40	30	30

1.4.8 统计分析

采用 Design-Expert 7.0.0 进行试验设计及建立模型,结合 SAS 9.1.0.0 进行数据分析^[19]。

2 结果与分析

2.1 细胞破壁方法

超声波、SDS 沸水浴、溶菌酶以及细胞裂解液处理分别作用于脂环酸芽孢杆菌标准菌株 DSM 3922^T,以可溶性全细胞蛋白提取量为响应值,研究不同破壁方法对可溶性全细胞蛋白提取效果的影响,结果如表 2 所示。

表 2 不同破壁方法对可溶性全细胞蛋白提取效果的影响
Tab.2 Amount of soluble whole-cell protein disrupted by using different methods

细胞破壁方法	可溶性蛋白提取量/mg·g ⁻¹
超声波	57.717 0 ± 2.445 9 ^b
SDS 沸水浴	10.142 0 ± 0.131 0 ^e
溶菌酶	0.511 3 ± 0.025 4 ^d
细胞裂解液	120.825 0 ± 7.502 4 ^a

注:结果为平均值 ± 标准偏差($n=3$),小写字母表示 5% 下的显著性差异检验,相同字母表示差异不显著,不同字母表示有差异,字母间隔越大,表示差异越大。

由表 2 可知,4 种细胞破壁提取可溶性全细胞蛋白的方法中,细胞裂解液处理效果最好。与物理法相比,化学方法可以增加细胞膜的穿透性,从而有利于细胞内特定物的释放溶出^[20]。细胞裂解液可使细胞膜通透性增加或破碎(图 1e),同时加入蛋白酶抑制剂和巯基乙醇等物质可以保持提取物的活性,并且使蛋白不被降解掉,所以可提取相对较高含量的可溶性蛋白。超声波处理仅次于细胞裂解液处理。超声波处理是目前实验室研究中最常用的微生物细胞破壁方法之一。超声波能使菌液产生无数微小空泡,随着空泡震动和其猛烈的聚爆而产生出机械剪切压力和动荡,这些瞬间形成的气穴能产生高剪切力梯度,但是由于气穴现象只能发生在振荡表面^[21-22],因此超声波对细菌细胞的破碎并不完全(图 1b)。SDS 沸水浴法处理时,细胞破碎不均匀,聚合边界细胞要比聚合内部细胞受温度起伏影响更剧烈(图 1c)。溶菌酶处理提取蛋白效果最差,溶菌酶只能使细胞膜或细胞膜的通透性增加从而使胞内蛋白选择性地渗透出来,其作用比较温和,所以其破碎细胞能力有限,大部分细胞结构完整(图 1d)。

2.2 不同破碎方法电泳结果比较

图 2 为不同细胞破碎方法所得的可溶性全细胞蛋白电泳图谱。由图 2 可以看出,不同破碎方法的

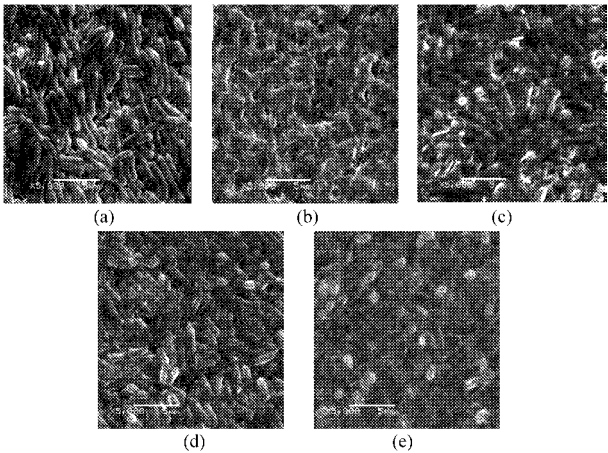


图 1 酸土脂环酸芽孢杆菌菌体扫描电镜图

Fig. 1 Scanning electron micrographs of *A. acidoterrestis* cells

(a) 未处理 (b) 超声波处理 (c) SDS 沸水浴处理 (d) 溶菌酶 (e) 细胞裂解液处理

电泳图谱差异较大,但细胞裂解液处理、SDS 沸水浴处理和溶菌酶处理的带型较相似,这与其均为化学方法有关。脂环酸芽孢杆菌细胞内的可溶性全细胞蛋白所有谱带大约 30 ~ 40 条,分子量范围为 12.15 ~ 126.77 kDa,主要集中在 26.78 ~ 61.51 kDa 之间。在分子量 14.4 ~ 116.0 kDa 内,不同破碎方法共有的条带有 15 条,分子量分别为 105.15、77.60、67.13、60.21、54.13、47.52、45.11、40.82、38.88、34.86、30.73、26.94、23.07、19.17 和 15.46 kDa。

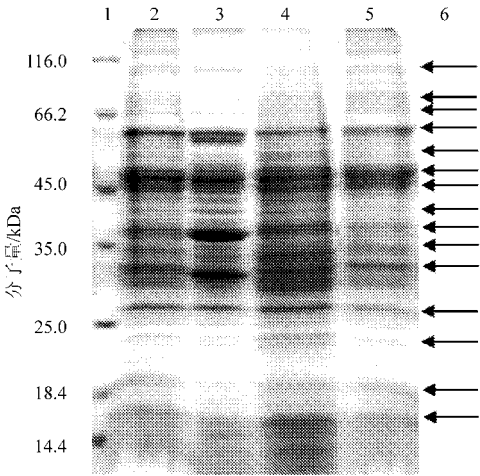


图 2 不同破碎方法提取的可溶性全细胞蛋白电泳图谱

Fig. 2 Soluble whole-cell protein disrupted by using different cell lysis treatments

1. 标准蛋白 2. 细胞裂解液处理 3. 超声波处理 4. SDS 沸水浴处理 5. 溶菌酶处理 6. 4 种破碎方法共有的蛋白条带

对于同一种细菌蛋白的提取,蛋白提取量越高,其所含的蛋白种类就越多,电泳条带就越多。4 种破碎方法中,细胞裂解液处理条带最多,这一点与其提取可溶性全细胞蛋白的量最高相符。该方法的电泳条带比较清晰,但其对分子量小于 16.63 kDa 的

蛋白提取量较少,且电泳条带有拖尾现象。SDS 沸水浴处理的条带数略少于细胞裂解液处理,该方法对于分子量大于 60.79 kDa 的蛋白提取量较低,蛋白条带肉眼很难辨认,而对于分子量小于 14.40 kDa 的蛋白提取量则相对较高,但电泳图谱比较模糊。超声波处理的电泳条带最为清晰,着色较深,但谱带数相对较少。这可能是由于该方法属于物理方法破碎细胞,与其他 3 种化学方法相比,细胞破碎的作用方式不同,因此其所提取的蛋白种类和含量较其他 3 种方法有明显的差异。蛋白条带最少的是溶菌酶处理,这也与其蛋白提取量最低相符。其带型与细胞裂解液处理最为接近,但条带背景比较模糊,且有拖尾现象。因此,开展脂环酸芽孢杆菌可溶性全细胞蛋白成分的研究,采用细胞裂解液处理提取脂环酸芽孢杆菌中的可溶性全细胞蛋白最为可行。

2.3 细胞裂解液处理工艺条件分析

2.3.1 处理温度

处理时间 30 min、液料比 10 mL/g 时,处理温度对脂环酸芽孢杆菌可溶性全细胞蛋白提取量的影响如图 3 所示。

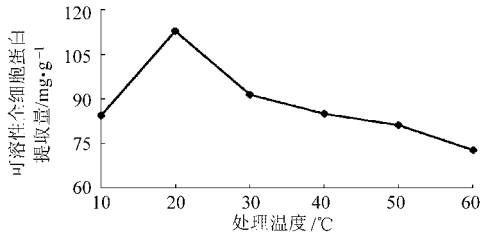


图 3 处理温度对可溶性全细胞蛋白提取量的影响

Fig. 3 Effect of temperature on amount of soluble whole-cell protein

由图 3 可以看出,随着处理温度的升高,可溶性全细胞蛋白提取量呈现先增加后降低趋势,当处理温度为 20℃ 时,可溶性全细胞蛋白提取量达到最大。当温度高于 20℃ 时,可溶性全细胞蛋白提取量开始下降。这可能是由于蛋白质在不同温度下的溶解度不同,温度太高,使得蛋白质变性,溶解度下降^[23]。因此,20℃ 为细胞裂解液处理的最佳温度。

2.3.2 处理时间

处理温度 20℃、液料比 10 mL/g 时,处理时间对脂环酸芽孢杆菌可溶性全细胞蛋白提取量的影响如图 4 所示。

由图 4 可知,随着处理时间的延长,可溶性全细胞蛋白的提取量呈现持续增长的趋势。开始可溶性全细胞蛋白提取量随着时间的增加而显著的增加,30 min 后可溶性全细胞蛋白提取量趋于平缓,基本变化不大。分析原因可能是由于一定时间后,蛋白溶出达到饱和,则溶出率趋于平衡,因此选取 30 min

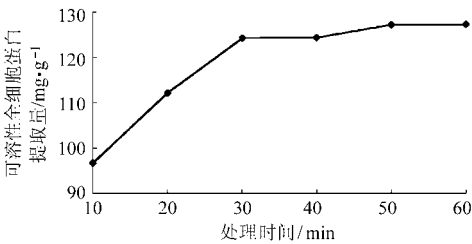


图 4 处理时间对可溶性全细胞蛋白提取量的影响

Fig. 4 Effect of time on amount of soluble whole-cell protein

为细胞裂解液处理的最佳提取时间^[24]。

2.3.3 液料比

处理温度 20℃、处理时间 30 min 时,液料比对脂环酸芽孢杆菌可溶性全细胞蛋白提取量的影响如图 5 所示。

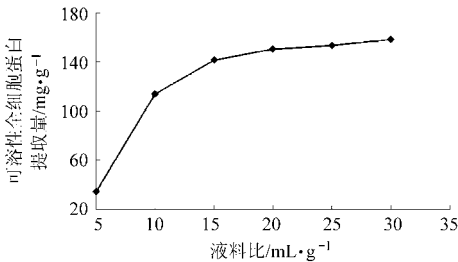


图 5 液料比对可溶性全细胞蛋白提取量的影响

Fig. 5 Effect of the A/B ratio on amount of soluble whole-cell protein

由图 5 可知,随着液料比的增大,可溶性全细胞蛋白提取量随之显著增加,当液料比到达 20 mL/g 后,液料比的影响趋于平缓,可溶性全细胞蛋白提取量变化不大。分析原因是由于适当增大液料比,有利于蛋白质的充分溶出,而使蛋白提取量增大,当底物消耗接近完全时,可溶性全细胞蛋白提取量基本无变化^[25]。因此,选取 20 mL/g 作为细胞裂解液处理的最佳液料比。

2.4 细胞裂解液处理参数模型的构建

表 3 为 Box-Behnken 设计及其响应值。由表 3 可知,可溶性全细胞蛋白提取量为 92.319 ~ 160.429 mg/g。以可溶性全细胞蛋白提取量为响应值,经多元回归拟合,可得可溶性蛋白提取量 Y 对处理时间 x_1 、处理温度 x_2 及液料比 x_3 的二次多项式回归模型为

$$Y = 153.57 + 4.28x_1 - 3.05x_2 + 23.97x_3 - 3.88x_1^2 - 0.44x_1x_2 - 2.07x_1x_3 - 12.88x_2^2 + 0.88x_2x_3 - 18.21x_3^2$$

对模型系数进行方差分析(表 4),由回归方程系数显著性检验可知:模型的一次项 x_1 和 x_3 极显著 ($P < 0.01$), x_2 显著 ($0.01 < P < 0.05$),即处理时间和液料比对可溶性全细胞蛋白提取量的影响极其显著,处理温度的影响显著;交互项均不显著 ($P > 0.05$),即处理时间、处理温度及液料比之间的交互

作用对可溶性全细胞蛋白提取量的影响不显著;二次项 x_1^2 显著 ($0.01 < P < 0.05$), x_2^2 、 x_3^2 极显著 ($P < 0.01$),即二次项 x_1^2 对可溶性全细胞蛋白提取量的影响显著, x_2^2 、 x_3^2 对可溶性全细胞蛋白提取量有极显著的影响。影响可溶性全细胞蛋白提取量的主次因素依次为 x_3 、 x_1 、 x_2 ,即液料比、处理时间、处理温度。

表 3 Box-Behnken 设计及结果

Tab. 3 Design and result of Box-Behnken

序号	x_1	x_2	x_3	$Y/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	
				实测值	预测值
1	-1	-1	0	136.376	135.14
2	-1	1	0	130.805	129.92
3	1	-1	0	143.681	144.58
4	1	1	0	136.352	137.60
5	0	-1	-1	99.831	102.44
6	0	-1	1	150.893	148.62
7	0	1	-1	92.319	94.58
8	0	1	1	146.886	144.28
9	-1	0	-1	106.683	105.30
10	1	0	-1	113.226	109.72
11	-1	0	1	145.586	149.10
12	1	0	1	160.429	161.80
13	0	0	0	156.795	153.57
14	0	0	0	150.452	153.57
15	0	0	0	153.657	153.57
16	0	0	0	152.657	153.57
17	0	0	0	154.298	153.57

表 4 回归模型方差分析

Tab. 4 Variance analysis of regression model

来源	DF	SS	MS	F	P
x_1	1	146.53	146.53	13.07	0.008 6
x_2	1	74.54	74.54	6.65	0.036 6
x_3	1	4 595.29	4 595.29	409.88	<0.000 1
x_1^2	1	63.54	63.54	5.67	0.048 8
x_1x_2	1	0.77	0.77	0.07	0.800 5
x_1x_3	1	17.22	17.22	1.54	0.255 1
x_2^2	1	698.89	698.89	62.34	<0.000 1
x_2x_3	1	3.07	3.07	0.27	0.616 9
x_3^2	1	1 395.62	1 395.62	124.48	<0.000 1
模型	9	7 175.38	797.26	71.11	<0.000 1
误差	7	78.48	11.21		
失拟项	3	56.99	19.00	3.54	0.127 1
总和	16	7 253.86			

由该模型的方差分析(表 4)可见: $F_{\text{Model}} = 71.11, P < 0.0001$,表明本试验所选用的二次多项式模型具有高度的显著性;失拟项 $P = 0.1271 > 0.05$,不显著;模型的校正决定系数 $R^2_{\text{Adj}} = 0.9753$,表明此模型能解释总变异的 97.53%;相关系数 $R = 0.9910$,说明此模型拟合良好,可以用此模型来反映细胞裂解液处理各主要因子对可溶性全细胞蛋白提取量的影响效果。

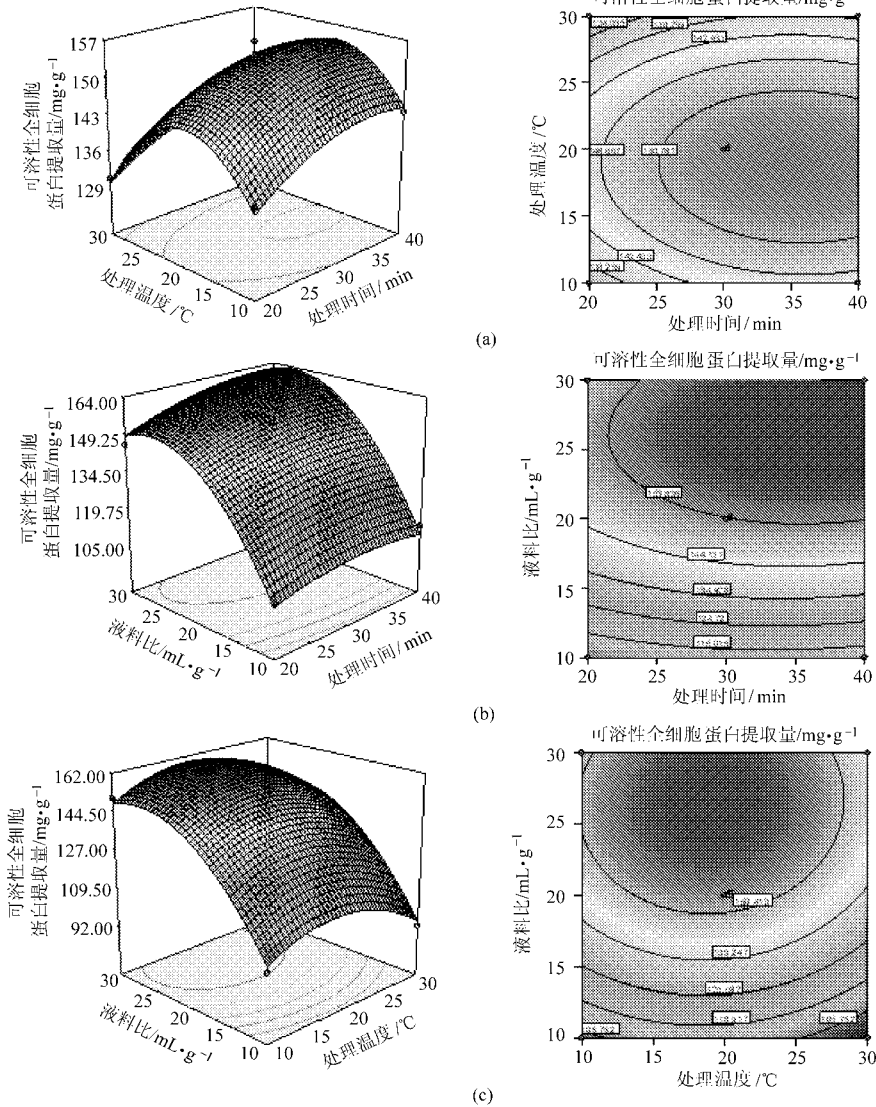
2.5 响应面分析

图 6 为处理时间、处理温度及液料比各因素及其交互作用的响应面和等高线图。液料比为 10 mL/g 时,等高曲线沿时间方向变化较大,而沿温度方向变化较慢,呈抛物线形式变化,在试验水平下处理时间对响应值的影响要比处理温度显著(图 6a)。处理温度为 20℃、处理时间为较低水平时,可溶性全细胞蛋白提取量随着液料比增加呈升高趋势(图 6b)。当处理时间延长、液料比增大时,

可溶性全细胞蛋白提取量达最大,在试验水平下液料比对响应值的影响要比处理温度显著。

通过对多项式模型进行求导和解逆矩阵,得到 3 个因素的最佳组合为:处理时间 37.4 min、处理温度 18.9℃ 和液料比 27.0 mL/g。此时模型预测的最大响应值为 163.69 mg/g。

采用上述优化条件作细胞裂解液处理提取可溶性全细胞蛋白的放大验证试验,重复 5 次,结果测得蛋白提取量为 (161.18 ± 2.93) mg/g,与理论值的相对误差为 1.53%,表明应用响应面分析法优化得到的提取工艺参数准确可靠,具有实际应用价值。



3 结论

(1)以可溶性全细胞蛋白提取量为考察指标,比较超声波法、SDS 沸水浴、溶菌酶及细胞裂解液处理对酸土脂环酸芽孢杆菌 DSM 3922^T细胞破碎和可溶性全细胞蛋白提取量的影响。结果表明细胞裂解液处理提取可溶性全细胞蛋白的效果最好。

(2)不同破碎方法的蛋白电泳图谱差异较大,这可能是由于其细胞破碎作用方式和作用位点的不同而导致的。细胞裂解液处理的蛋白条带背景比较清晰、谱带数最多,采用细胞裂解液处理提取酸土脂环酸芽孢杆菌中的可溶性全细胞蛋白最为可行。该

方法操作简单、重复性好,所提蛋白含量最高且蛋白种类最多。

(3)细胞裂解液处理参数对可溶性全细胞蛋白提取量有显著影响,因素影响主次顺序为:液料比、处理时间、处理温度。

(4)采用 Box-Behnken 试验设计,得到细胞裂解液处理提取可溶性全细胞蛋白的数学模型。通过模型求解和响应面分析,确定细胞裂解液处理提取酸土脂环酸芽孢杆菌 DSM 3922^T可溶性蛋白的最佳工艺条件为:处理时间 37.4 min、处理温度 18.9℃和液料比 27.0 mL/g。此时模型预测的最大响应值为 163.69 mg/g,与实测值偏差 1.53%,没有显著差异。

参 考 文 献

- 1 Wisotzkey J D, Jurtshuk P, Fox G E, et al. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus*gen. Nov[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42(2): 263 ~ 269.
- 2 孔德义,董佳,白小琼. 脂环酸芽孢杆菌的研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2011, 18(2): 39 ~ 42.
Kong Deyi, Dong Jia, Bai Xiaoqiong. Research and development of *Alicyclobacillus* [J]. Cereal and Food Industry, 2011, 18(2): 39 ~ 42. (in Chinese)
- 3 Yamazaki K, Okubo T, Inoue N, et al. Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD)for rapid identification of the spoilage bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(6): 1 016 ~ 1 018.
- 4 王伟军,陈丽安,李延华. 酸土芽孢杆菌检测与控制技术研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 437 ~ 444.
Wang Weijun, Chen Li'an, Li Yanhua. Research progress in detection and control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(4): 437 ~ 444. (in Chinese)
- 5 Smit Y, Cameron M, Venter P, et al. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation—a review [J]. Food Microbiology, 2011, 28(3): 331 ~ 349.
- 6 Goto K, Tanimoto Y, Tamura T. Identification of thermo-acidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan[J]. Extremophiles, 2002, 6(4): 333 ~ 340.
- 7 Chen Shiqiong, Tang Qingyan, Zhang Xiaodong. Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment[J]. Food Microbiology, 2006, 23(5): 439 ~ 445.
- 8 Yamazaki K, Teduka H, Shinano H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverage [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1996, 60(3): 543 ~ 545.
- 9 Groenewald W H, Gouws P A, Witthuhn R C. Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the western cape [J]. Extremophiles, 2008, 12(1): 159 ~ 163.
- 10 Nicolaus B, Improta R, Manca M C, et al. *Alicyclobacillus* from an unexplored geothermal soil in Antarctica Mount Rittmann [J]. Polar Biology, 1998, 19(2): 133 ~ 141.
- 11 Steyn C E, Cameron M, Witthuhn R C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment—a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147(1): 1 ~ 11.
- 12 阮灵伟,刘欣,杨海杰,等.嗜热菌分离筛选及分子分类初探[J].厦门大学学报:自然科学版 2006,45(2):276 ~ 279.
Ruan Lingwei, Liu Xin, Yang Haijie, et al. Isolation and identification of thermophilic microorganisms [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2006, 45(2): 276 ~ 279. (in Chinese)
- 13 修志龙,姜炜,苏志国. 细胞破碎技术的研究进展和发展方向[J]. 化工进展, 1994(1): 15 ~ 21.
Xiu Zhilong, Jiang Wei, Su Zhiguo. Achievements and future trends on disintegration of microbial cells [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 1994(1): 15 ~ 21. (in Chinese)
- 14 杨康. 源于苹果汁的嗜酸耐热菌生长代谢动力学及红外光谱快速检测技术研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2007.
Yang Kang. Study on kinetics and FI-IR rapid detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* originated from apple juice [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)
- 15 黄毅,赵云凤,肖晓蓉,等. 全菌蛋白 SDS - PAGE 技术鉴别口腔细菌分型的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1997, 15(1): 21 ~ 24.

- Huang Yi, Zhao Yunfeng, Xiao Xiaorong, et al. The study on SDS - PAGE technic classification of the whole protein of oral bacteria[J]. West China Medical Journal, 1997, 15(1): 21 ~ 24. (in Chinese)
- 16 何正祥, 张部昌, 马清钧, 等. 大肠杆菌周质蛋白提取工艺的改进[J]. 生物学杂志, 2005, 22(6): 46 ~ 47.
He Zhengxiang, Zhang Buchang, Ma Qingjun, et al. Improvement on extraction of periplasmic proteins in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biology, 2005, 22(6): 46 ~ 47. (in Chinese)
 - 17 Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680 ~ 685.
 - 18 唐泽丽, 李多伟, 王瑶, 等. 秦艽种子蛋白质的提取及 SDS 电泳研究[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(2): 94 ~ 96.
Tang Zeli, Li Duowei, Wang Yao, et al. Extraction of proteins from the seed of *G. macrophylla* and analysis by SDS electrophoresis [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2011, 26(2): 94 ~ 96. (in Chinese)
 - 19 袁亚宏, 王周利, 蔡瑞, 等. 苹果汁中拟除虫菊酯类农药的超声波 - TiO_2 催化去除[J]. 农业机械学报, 2011, 42(11): 124 ~ 129.
Yuan Yahong, Wang Zhouli, Cai Rui, et al. Catalytic removal of pyrethroid pesticides in apple juice by ultrasonic treatment coupling with TiO_2 [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011, 42(11): 124 ~ 129. (in Chinese)
 - 20 Ren Xiaodong, Yu Dawei, Han Siping, et al. Thermolysis of recombinant *Escherichia coli* for recovering a thermostable enzyme [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 33(1): 94 ~ 98.
 - 21 Gogate P R, Kabadi A M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 44(1): 60 ~ 72.
 - 22 张海晖, 武妍, 段玉清, 等. 亚临界水萃取米糠蛋白工艺与功能特性研究[J]. 农业机械学报, 2011, 42(11): 139 ~ 143.
Zhang Haihui, Wu Yan, Duan Yuqing, et al. Optimization for the extraction and function characteristics of protein from rice bran by subcritical water[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011, 42(11): 139 ~ 143. (in Chinese)
 - 23 Hilhorst R, Fijneman P, Heering D, et al. Protein extraction using reversed micelles[J]. Pure and Applied Chemistry, 1992, 64(11): 1 765 ~ 1 770.
 - 24 Zhang Shaobing, Wang Zhang, Xu Shiying. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007, 84(1): 97 ~ 105.
 - 25 Sun Xiaohong, Zhu Kexue, Zhou Huiming. Optimization of a novel backward extraction of defatted wheat germ protein from reverse micelles [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10(3): 328 ~ 333.

(上接第 67 页)

- 11 邱威, 丁为民, 汪小岳, 等. 3WZ-700 型自走式果园风送定向喷雾机[J]. 农业机械学报, 2012, 43(4): 26 ~ 30, 44.
Qiu Wei, Ding Weimin, Wang Xiaochan, et al. 3WZ-700 self-propelled air-blowing orchard sprayer[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(4): 26 ~ 30, 44. (in Chinese)
- 12 张云龙, 诸文农, 孙冬野, 等. 履带拖拉机越障失稳机理与试验研究[J]. 农业机械学报, 1996, 27(4): 7 ~ 11.
Zhang Yunlong, Zhu Wennong, Sun Dongye, et al. Mechanism and experimental research on track-type tractors during surmounting an obstacle [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 1996, 27(4): 7 ~ 11. (in Chinese)
- 13 范华林, 刘福君. 箱式路面体系车辆通过性机理分析[J]. 农业机械学报, 2007, 38(2): 26 ~ 29.
Fan Hualin, Liu Fujun. Terramechanics and traffic ability of pin-jointed box road equipment[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2007, 38(2): 26 ~ 29. (in Chinese)
- 14 Kim C, Yun S, Park K, et al. Sensing system design and torque analysis of a haptic operated climbing robot[C] // Proceedings of IEEE /RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 2004: 1 845 ~ 1 848.
- 15 余志生. 汽车理论[M]. 北京: 机械工业出版社, 1996.
- 16 Liu J G, Wang Y C, Ma S G, et al. Analysis of stairs climbing ability for a tracked reconfigurable modular robot[C] // Proceedings of the IEEE International Workshop on Safety, Security, and Rescue Robots, 2005: 36 ~ 41.
- 17 张海洪, 龚振邦, 谈士力. 全方位越障移动机构研究[J]. 机器人, 2001, 23(4): 341 ~ 345.
Zhang Haihong, Gong Zhenbang, Tan Shili. Omni-directional obstacle avoidance mechanism[J]. Robot, 2001, 23(4): 341 ~ 345. (in Chinese)
- 18 周孔允. 车辆理论基础[M]. 北京: 兵器工业出版社, 1996.
- 19 GB/T 12541—1990 汽车地形通过性试验方法[S]. 1990.