

# 纯化大肠杆菌表达胆固醇氧化酶的两种亲和分离介质的研究

辛瑜, 张玲, 张玉然, 陈亦, 仝艳军, 王武\*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏, 无锡 214122)

**摘要:** 建立了从重组菌中高效亲和制备胆固醇氧化酶的方法, 将一种源自 *Brevibacterium* sp. (DQ345780) 的胆固醇氧化酶基因转入 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 表达, 选择核黄素-5'磷酸(FMN)及 7-氯-异咯嗪作为亲和配体, 构建胆固醇氧化酶亲和制备介质。通过两种介质的一步亲和吸附, 获得纯度较高的胆固醇氧化酶样本, 蛋白回收率分别为 9.4% 与 9.9% (质量百分比), 活性回收率分别为 85.2% 与 93.4% (活性百分比)。使用 SDS-PAGE 分析, 纯化得到蛋白分子量为约 50 000, 纯度分别为 98.0% 与 97.5% (纯度百分比)。通过静态吸附分析, 胆固醇氧化酶相对两种亲和介质的最大理论吸附值分别为 71.0 与 78.5 mg/g 介质; 解离常数分别为 12.8 和 7.3  $\mu\text{g/g}$  介质。

**关键词:** 胆固醇氧化酶; 大肠杆菌; 核黄素; 异咯嗪; 亲和分离

**中图分类号:** Q 55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)06-0599-07

## The Research of Two Affinity Mediums for the Purification of a Cholesterol Oxidase (COD) Expression in *Escherichia coli*

XIN Yu, ZHANG Ling, ZHANG Yu-ran, CHEN Yi, TONG Yan-jun, WANG Wu\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In this study, affinity protocols were developed for the preparation of cholesterol oxidase (COD) from recombinant bacteria, a COD gene from *Brevibacterium* sp. (DQ345780) was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3), Riboflavin 5'-phosphate and 7-chloroalloxazine were chosen as the affinity ligands, and they were coupled with Sepharose CL 4B through spacers. After one step of affinity binding with the two mediums, the enzyme could be extracted with high purity. The yields of the enzyme purified with the two mediums were 9.4% and 9.9%, respectively. and the recoveries of typical cholesterol oxidase activity were 85.2% and 93.4%. The purified cholesterol oxidases were 98.0% and 97.5% pure with SDS-PAGE analysis. On SDS-PAGE gel, the enzyme was a single polypeptide with the mass of ~50 kDa. The theoretical maximum absorption  $Q_{\max}$  were 71.0 and 78.5 mg/g medium; the desorption constant  $K_d$  of the two mediums on the mediums were 12.8 and 7.3 g/g medium.

收稿日期: 2011-08-31

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(SBE201170578); 江南大学自主科研项目青年基金(JUSRP11120)。

作者简介: 辛瑜(1982-), 男, 上海人, 工学博士, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学、生物工程领域研究。

E-mail: marshalxy@gmail.com

\* 通信作者: 王武(1952-), 女, 福建福州人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程、遗传工程领域研究。

E-mail: wangwu@jiangnan.edu.cn

**Key words:** cholesterol oxidase (COD), *Escherichia coli*, riboflavin 5'-phosphate, 7-chloroaloxazine, affinity separation

胆固醇氧化酶 (EC 1.1.3.6) 属于黄素酶类, 需要核黄素-5'磷酸(FMN)或核黄素-5'-腺苷二磷酸(FAD)作为辅酶。该类酶可由多种微生物生产, 如 *Brevibacterium*<sup>[1]</sup>, *Streptomyces spp.*<sup>[2]</sup>, *Corynebacterium*<sup>[3]</sup>, *Arthrobacter*<sup>[4]</sup>, *Pseudomonas*<sup>[5]</sup> 及 *Rhodococcus*<sup>[6,7]</sup> 等。源自于 *Brevibacterium sp.* (DQ345780) 的胆固醇氧化酶的辅酶为核黄素-5'-腺苷二磷酸(FAD), 从已获得三级结构的相近酶来看, 在胆固醇氧化酶的表面有较深的 FAD 结合位点<sup>[8-9]</sup>。胆固醇氧化酶已经被广泛应用, 如食品和血液中胆固醇含量的检测<sup>[10-11]</sup>, 如医药工业中类固醇类药物的合成; 此外, 有报道胆固醇氧化酶也具有一定的杀虫活性, 可用于防治农作物的病虫害<sup>[12-13]</sup>。

*Streptomyces sp.* SA-COO 中的胆固醇氧化酶基因已经被克隆并测序<sup>[14-15]</sup>, *Brevibacterium sterolicum* 的胆固醇氧化酶基因也已经被克隆并测序<sup>[16]</sup>。在本实验室的前期工作中, 已从土壤中分离得到了一株 *Brevibacterium sp.* CCTCC M201008 菌株, 在胆固醇存在的情况下能够分泌表达胆固醇氧化酶, 其基因也已经被克隆并被转入大肠杆菌进行表达<sup>[17-20]</sup>。

在前期研究报导可见, 要从原始菌或基因工程菌中分离胆固醇氧化酶需要较多的步骤, 包括盐析、表面活性剂抽提、热处理和色谱层析等几个步骤的组合。如使用一步 DEAE 离子交换层析、一步疏水层析以及一步分子筛层析, 从 *Proteobacteria* 菌中分离胆固醇氧化酶<sup>[21]</sup>; 如使用一步盐析、一步离子交换层析、一步疏水层析以及一步分子筛层析, 从 *Pseudomonas sp.* 菌中提取胆固醇氧化酶<sup>[22]</sup>; 此外, 也有其他的利用多种分离手段组合提取胆固醇氧化酶的报道一些报道<sup>[23-27]</sup>。但是, 上述方法由于其步骤较多, 蛋白和酶活力回收率均较低。在本实验室的前期工作中, 已经使用核黄素作为亲和配体, 可通过一步亲和吸附, 高效地获得纯度较高的胆固醇氧化酶<sup>[28]</sup>。

本研究基于前期工作, 进一步探索黄素辅酶及其类似物作为胆固醇氧化酶亲和配体的可行性。利用核黄素-5'磷酸(FMN)和 7-氯-异咯嗪作为亲和

配体, 合成亲和分离介质, 建立较好的胆固醇氧化酶高效分离体系, 为工业化的应用奠定理论基础, 并对其他黄素辅酶依赖型酶类的分离有较高的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

*Brevibacterium sp.* CCTCC M201008 菌株由作者所在实验室保存; 胆固醇氧化酶基因 (DQ345780) 克隆载体为 *E. coli* JM109, 表达载体为 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP (Novagen, USA)。

### 1.2 主要试剂

Sepharose CL 4B 购自 GE Healthcare, USA; 其它试剂均为分析纯。

### 1.3 主要仪器

高效液相色谱系统 (德国诺尔公司); 3K15 低温高速离心机 (德国 SIGMA 公司); UV754 紫外可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司)。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 胆固醇氧化酶基因在大肠杆菌中的表达**  
在本实验室前期工作中 *Brevibacterium sp.* CCTCC M201008 菌株的胆固醇氧化酶基因已被克隆、测序并保存<sup>[18]</sup>, 该基因的编号为 DQ345780。为了插入 pET28a(+) 质粒, 设计上游引物为 5'-AATTACCgCCATggCCCCAgCCgCACCTC-3' (下划线部分为 Nco I 酶切位点); 设计下游引物为 5'-AATTACCgAAgCTTTCACgATgTCgACgAgATg-3' (下划线部分为 Hind III 酶切位点)。在验证过程中, 使用已构建的质粒为模板进行 PCR 扩增, 产物用 Nco I 和 Hind III 双酶切处理。质粒被转入大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3), 在卡那霉素含量为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LB 培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜; 菌液转接如 100 mL 相同的培养基 37  $^{\circ}\text{C}$  培养, 直至 OD<sub>600</sub> 达到 2; 随后加入 10 g/L 的乳糖在 28  $^{\circ}\text{C}$  诱导 10 h。大肠杆菌菌体在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 g 离心 20 min, 菌体沉淀用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 悬浮, 超声破碎后 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 g 离心 30 min。上清液测定胆固醇氧化酶活性及蛋

白浓度,用于分离纯化实验。

**1.4.2 胆固醇氧化酶活性的测定** 胆固醇氧化酶活性测定方法主要基于检测胆固醇氧化酶作用胆固醇后产生的过氧化氢的量;过氧化氢与辣根过氧化物酶及 4-氨基比林反应显红色,在 500 nm 波长检测吸光度。具体操作参照 Richmond 和季文明的方法<sup>[29-30]</sup>。胆固醇氧化酶酶活动力学的米氏常数  $K_m$  与最大反应速度  $V_{max}$  则分别在胆固醇浓度为 0~1 mmol/L 的情况下,测定反应初速度,应用 Lineweaver-Burk plots 法作图来计算。

**1.4.3 亲和介质的合成** 由于胆固醇氧化酶以核黄素-5'-腺苷二磷酸(FAD),且其三级结构表面有较深的辅酶结合区域,所以,核黄素-5'-腺苷二磷酸(FAD)的组成部分核黄素-5'-磷酸(FMN)以及 FAD 的核心结构域类似物 7-氯异咯嗪环被选为亲和配体。介质合成方法参照李荣秀和辛瑜的文章<sup>[31-32]</sup>,首先,Sepharose CL 4B 在经过环氧氯丙烷活化后与氨水反应,形成氨基-Sepharose,然后再通过三聚氯嗪、乙二胺等间隔臂与两个亲和配体连接。

**1.4.4 亲和介质与酶的静态吸附试验** 利用静态吸附试验来验证合成的两种亲和介质对胆固醇氧化酶的吸附效率,操作方法参照<sup>[32]</sup>。利用本实验室获得的纯度为 98% (纯度百分比)以上的胆固醇氧化酶样品作为测试对象,溶解在 1 mL 20 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.2),形成质量浓度梯度(100、200、300、400、500、600、700、800 以及 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),各溶液加入 10 mg 亲和介质,在 25  $^{\circ}\text{C}$  混合 4 h,随后 2 000 g 离心 5 min,上清测试胆固醇氧化酶的活性,每组实验都用不加介质的酶液作为空白对

照。测得数据使用 Scatchard 法进行分析,分别算得两种亲和介质的理论最大吸附值  $Q_{max}$  和解离常数  $K_d$ 。

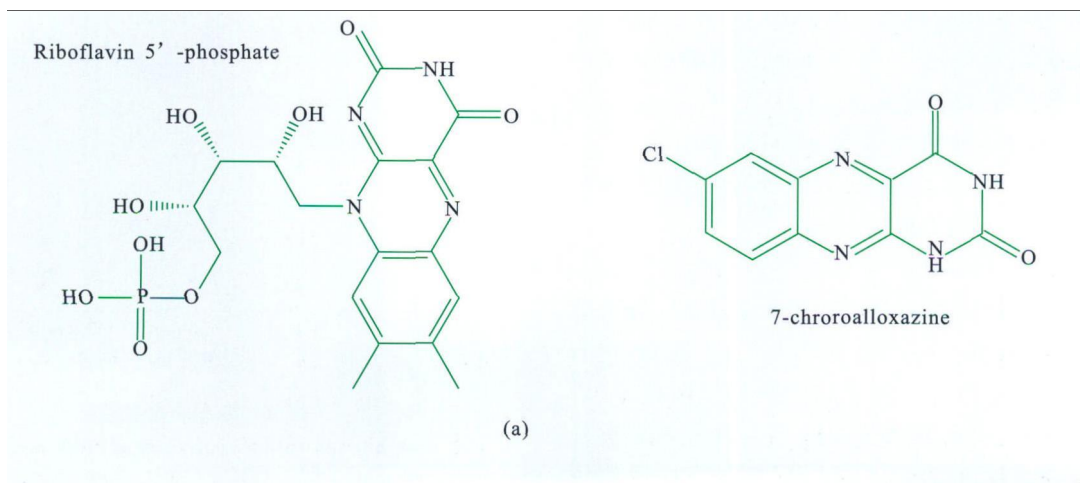
**1.4.5 大肠杆菌表达胆固醇氧化酶的亲和纯化** 取 20 mL 菌体破碎液上清,与 20 mL 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 值 7.2)混合,作为上样样品。利用两种亲和介质分别装填两根 5 mL 的小型层析柱,首先用 20 mL 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 值 7.2)进行平衡清洗;随后每根层析柱以自然重力流速上 5 mL 上样样品,上样完成后使用 20 mL 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 值 7.2)清洗;清洗完成后,使用 10 mL 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 值 7.2, 0.02 mol/L NaCl)清洗;然后使用 10 mL 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 值 7.2, 0.3 mol/L NaCl)洗脱结合蛋白。洗脱的蛋白测定胆固醇氧化酶活性并利用 Bradford 法测定浓度。

**1.4.6 还原性 SDS-PAGE 分析** 电泳在 Bio-Rad 公司的 Miniprotean II 电泳槽中进行。利用 Gel pro 3.0 软件对电泳胶进行扫描,通过黑度积分计算蛋白纯度。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲和介质的合成以及静态吸附试验

以核黄素-5'-腺苷二磷酸(FAD)的组成部分核黄素-5'-磷酸(FMN)以及 FAD 的核心结构域类似物 7-氯异咯嗪环(图 1(a))为基础合成亲和配体,并通过环氧氯丙烷、三聚氯嗪等间隔臂与 sepharose CL 4B 连接,两种亲和配体被命名为 L-A 和 L-B (图 1(b)),两种亲和介质被命名为 M-A、M-B。



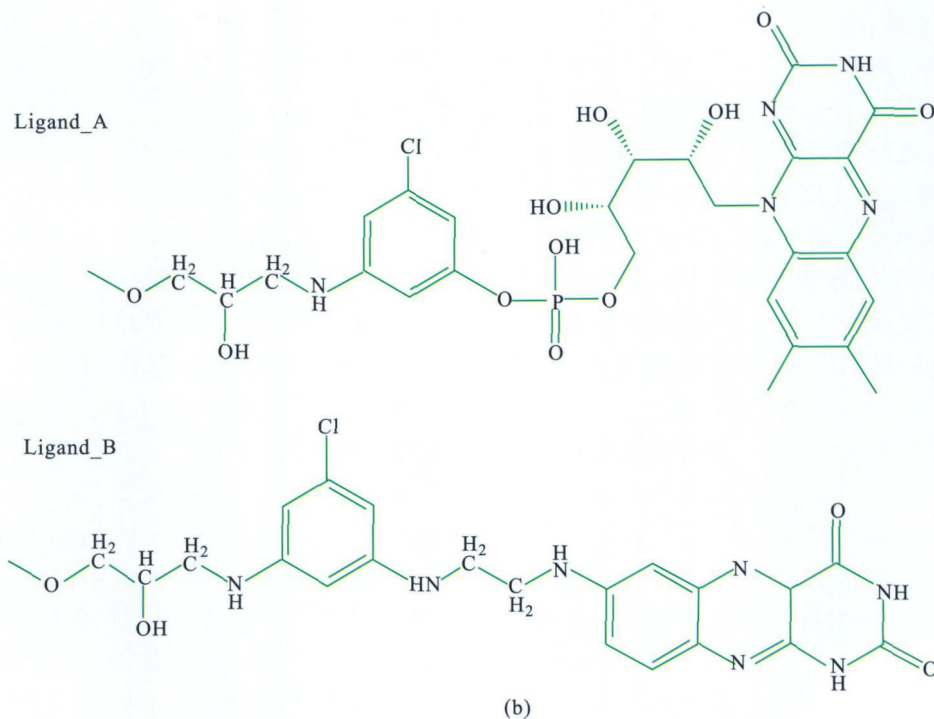


图 1 亲和配体结构

Fig. 1 The structure of affinity ligands

为了测定胆固醇氧化酶和亲和介质的吸附-解离作用,进行了静态吸附试验。测定了上清中残留的胆固醇氧化酶浓度以及介质吸附的酶量,通过 Scatchard 法的公式进行计算:

$$Q = \frac{Q_{\max} [C^*]}{K_d + [C^*]} \quad (1)$$

其中,  $Q$  为介质对酶的吸附量,  $Q_{\max}$  是介质对酶的理论最大吸附量,  $K_d$  为解离常数,  $[C^*]$  为溶液中残留的酶浓度。公式(1)能够转换为:

$$\frac{Q}{[C^*]} = \frac{Q_{\max}}{K_d} - \frac{Q}{K_d} \quad (2)$$

以  $Q$  与  $Q/[C^*]$  拟合曲线,计算  $Q_{\max}$  与  $K_d$  (见图 2)。

求得亲和介质 M-A 与 M-B 对胆固醇氧化酶的最大理论吸附量  $Q_{\max}$  分别为 71.0 与 78.5 mg/g 介质;解离常数  $K_d$  分别为 12.8 和 7.3  $\mu\text{g/g}$  介质。

由图 2 可见,亲和介质 M-A、M-B 均对胆固醇氧化酶有较大的吸附能力。

## 2.2 胆固醇氧化酶的分离提取

大肠杆菌超声破碎后,取 20 mL 上清,与磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 值 7.2)1:1 混合,作为上样样品。利用两种亲和介质分别装填两根 5 mL 的小型层析柱,用磷酸盐缓冲液平衡后每根层析柱以自然重力流速上 5 mL 上样液,上样完成后使用

20 mL 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 值 7.2)清洗;随后使用 10 mL 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 值 7.2, 0.02 mol/L NaCl)清洗;最后使用 10 mL 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 值 7.2, 0.3 mol/L NaCl)洗脱结合蛋白。洗脱的蛋白测定胆固醇氧化酶活力并利用 Bradford 法测定浓度。经过计算, M-A 与 M-B 介质的蛋白回收率分别为 9.4% 与 9.9% (质量分数),其活力回收率分别为 85.2% 与 93.4% (活性百分比)(见表 1)。

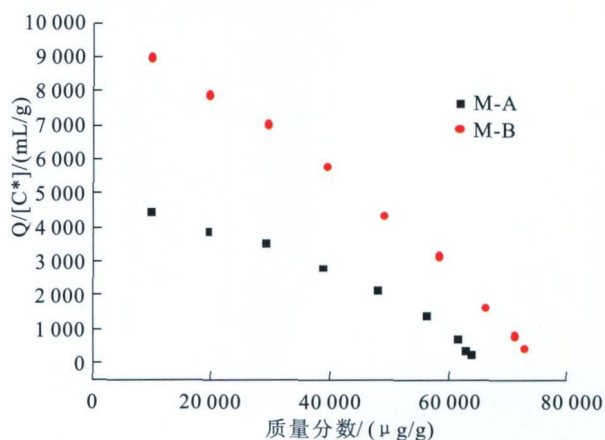


图 2 静态吸附试验

Fig. 2 Adsorption analysis of affinity medium

表 1 使用两种亲和介质分离纯化胆固醇氧化酶的效果

Tab. 1 Affinity purification processes with the two affinity mediums

步骤		蛋白质			活性	
		质量	产率/ %	全部活性/ U	部分酶活/ (U/mg)	产率/ %
M-A	Crude sample	50	100	85	1.35	100
	Affinity medium	4.7±0.32	9.40%	72	15.2	85.2
M-B	Crude sample	50	100	85	1.35	100
	Affinity medium	5.0±0.43	9.89%	77	15.4	93.4

由表 1 可见,在对胆固醇氧化酶的纯化过程中,活力回收率达到 85% (活性百分比)以上,说明两种亲和介质对胆固醇氧化酶均有较高的选择性。

### 2.3 纯化得到胆固醇氧化酶的电泳分析

将通过两种亲和介质纯化得到的胆固醇氧化酶进行 SDS-PAGE 还原电泳分析。得到的电泳条带均在 50 000 附近(见图 3)。随后使用 Pro gel 软件扫描并通过黑度积分的方法计算蛋白的纯度,经过计算,M-A 介质纯化得到的酶纯度为 98.0% (纯度百分比),M-B 介质纯化得到的酶纯度为 97.5% (纯度百分比)。

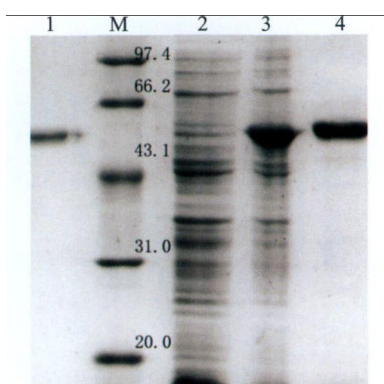


图 3 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis

图中,泳道 M 为分子量 Marker,泳道 2 为不带质粒的大肠杆菌破碎液上清,泳道 3 为胆固醇氧化酶表达后大肠杆菌破碎液上清,泳道 1 为利用 M-A 介质分离纯化得到的蛋白,泳道 4 为利用 M-B 介质分离纯化得到的蛋白。

由图 3 可见,利用两种亲和介质纯化得到的胆固醇氧化酶纯度均较高,表明亲和介质对目标蛋白的特异性识别能力较强,除杂能力较好。

## 3 结语

胆固醇氧化酶是一种黄素酶类,在如食品、血液的检测<sup>[10-11]</sup>,医药工业中类固醇类药物的合成、以及防虫害等领域均有应用<sup>[12-13]</sup>。通常,胆固醇氧化酶的分离纯化步骤较多,操作复杂,回收率较低<sup>[19-25]</sup>。本研究以胆固醇氧化酶辅酶 FAD 的核心部件及结构类似物为配体,研发了两种胆固醇氧化酶亲和介质。这两种介质在试验中显示了对胆固醇氧化酶较高的特异选择性吸附,为今后胆固醇氧化酶的大规模应用提供了理论及技术基础。

此外,黄素酶家族成员众多,在医药、化工、食品等领域均有广泛应用,这类基于黄素辅酶类似结构的亲和配体对各类黄素酶均有较好的应用潜力。

## 参考文献(References):

- [1] Uwajima T, Yagi H, Terada O. Properties of crystalline 3/3- hydroxysteroid oxidase of *brevibacterium sterolicum*[J]. *Agricultural and biological chemistry*, 1974, 38: 1149-1156.
- [2] Tomioka H, Kagawa M, Nakamura S. Some enzymatic properties of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid oxidase produced by *streptomyces violascens*[J]. *Journal of Biochemistry*, 1976, 79: 903-915.
- [3] Shirokano Y, Nakamura K, Mizusawa K. Purification and some properties of an extracellular 3 $\beta$ -hydroxysteroid oxidase produced by *Corynebacterium cholesterolicum*[J]. *Journal of fermentation technology*, 1977, 55: 337-344.
- [4] Liu W, Hsu J, Wang W. Production of cholesterol oxidase by antibiotic resistant mutant and a constitutive mutant *Arthrobacter simplex* B-7[J]. *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC*, 1983, 7: 255-260.

- [ 5 ] Aono R, Doukyu N, Kobayashi H, et al. , Cloning of organic solvent tolerance gene *ostA* that determines n-hexane tolerance level in *Escherichia coli*. [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1994, 60: 2518–2523.
- [ 6 ] Kreit J, Lefebvre G, Germain P. Membrane-bound cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. cells production and extraction[J]. *Journal of Biotechnology*, 1994, 33: 271–282.
- [ 7 ] Sojo M, Bru R, Lopez-Molina D, et al. , Cell-linked and extracellular cholesterol oxidase activities from *Rhodococcus erythropolis*. Isolation and physiological characterization. [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1997, 47: 583–589.
- [ 8 ] Yue Q K, Kass I J, Sampson N S, et al. , Crystal structure determination of cholesterol oxidase from streptomyces and structural characterization of key active site mutants. [J]. **Biochemistry**, 1999, 38: 4277–4286.
- [ 9 ] Lyubimov A Y, Lario P I, Moustafa I, et al. , Atomic resolution crystallography reveals how changes in pH shape the protein microenvironment. [J]. **Nature Chemical Biology**, 2006, 2: 259–264.
- [10] Allain C C, Poon L S, Chan C S G, et al. , Enzymatic determination of total serum cholesterol. [J]. **Clinical Chemistry**, 1974, 20: 470–475.
- [11] Richmond W. Analytical reviews in clinical biochemistry; the quantitative analysis of cholesterol. [J]. **Annals of Clinical Biochemistry**, 1992, 29: 577–582.
- [12] Purcell J P, Greenplate J T, Jennings M G. Cholesterol oxidase; a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae. [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1993, 196: 1406–1409.
- [13] Cho H J, Choi K P, Yamashita M. Introduction and expression of the streptomyces cholesterol oxidase gene (*ChoA*), a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae, into tobacco cells. [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1995, 44: 133–138.
- [14] Murooka Y, Ishizaki T, Nimi O, et al. , Cloning and expression of a streptomyces cholesterol oxidase gene in streptomyces *lividans* with plasmid pIJ702. [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1986, 52: 1382–1390.
- [15] Ishizaki T, Hirayama N, Shinkawa H, et al. , Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into xenopus oocytes. [J]. **Journal of Bacteriology**, 1989, 171: 596–603.
- [16] Ohta T, Fujishiro K, Yamaguchi K, et al. , Sequence of gene *choB* encoding cholesterol oxidase of *Brevibacterium sterolicum*: comparison with *choA* of streptomyces sp. SA-COO. [J]. **Gene**, 1991, 103: 93–101.
- [17] Lv C F, Wang W, Tang Y X, et al. , Effect of cholesterol bioavailability-improving factors on cholesterol oxidase production by a mutant *Brevibacterium* sp. DGDC-82. [J]. **Process Biochemistry**, 2002, 37: 901–907.
- [18] Wang L G, Wang W. Coenzyme precursor-assisted expression of a cholesterol oxidase from *Brevibacterium* sp. in *Escherichia coli*. [J]. **Biotechnology Letter**, 2007, 29: 761–766.
- [19] 李闯, 孙艳, 张玲, 杨海麟, 等. 乳糖诱导重组大肠杆菌表达胆固醇氧化酶的研究. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(3): 470–474.
- LI Chuang, SUN Yan, ZHANG Ling, YANG Hai-lin, et al. Expression cholesterol oxidase gene in recombinant *Escherichia coli* using lactose as inducer[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**, 2011, 30(3): 470-474. (in Chinese)
- [20] 杨海麟, 王长城, 张玲, 等. 产胆固醇氧化酶重组大肠杆菌的发酵培养基和诱导条件的优化. *食品与生物技术学报*. 2009, 28(5): 670–674.
- YANG Hai-lin, WANG Chang-cheng, ZHANG Ling, et al. Optimization of culture conditions for production of cholesterol oxidase using recombinant *E. coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**, 2009, 28(5): 670–674. (in Chinese)
- [21] Isobe K, Shoji K, Nakanishi Y, et al. Purification and some properties of cholesterol oxidase stable in detergents from gamma-proteobacterium Y-134. [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2003, 95 (3): 257–263.
- [22] Doukyu N, Aono R. Purification of extracellular cholesterol oxidase with high activity in the presence of organic solvents from *Pseudomonas* sp. Strain ST-200. [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, 64 (5): 1929–1931.
- [23] Sampson N S, Kass I J, Ghoshroy K B. Assessment of the role of an omega loop of cholesterol oxidase; a truncated loop mutant has altered substrate specificity. [J]. **Biochemistry**, 1998, 37 (16): 5570–5576.
- [24] Wang C T, Cao Y P, Sun B G, et al. , Preparation and some properties of cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. R14-

2. [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24: 2149—2157.
- [25] Doukyu N, Shibata K, Ogino H, et al. Purification and characterization of *chromobacterium* sp. DS-1 cholesterol oxidase with thermal, organic solvent, and detergent tolerance. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80 (1): 59—70.
- [26] Ye D P, Lei J H, Li W, et al. Purification and characterization of extracellular cholesterol oxidase from *Enterobacter* sp. [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24: 2227—2233.
- [27] Doukyu N, Shibata K, Ogino H, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of a gene encoding *Chromobacterium* sp. DS-1 cholesterol oxidase. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82 (3): 479—490.
- [28] Xin Y, Yang H L, Xia X L, et al. Affinity purification of a cholesterol oxidase expressed in *Escherichia coli*. [J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879: 853—858.
- [29] Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. [J]. *Clinical Chemistry*, 1973, 19: 1350—1356.
- [30] 李文明. 短杆菌胆固醇氧化酶的生成及性质研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 2000.
- [31] Li R, Dowd V, Stewart D J, et al. Design, synthesis, and application of a protein A mimetic. [J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(2): 190—195.
- [32] Xin Y, Dong D X, Wang T, et al. Affinity purification of serine proteinase from *deinagkistrodon acutus* venom. [J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 859: 111—118.

## 会议信息

会议名称: 第二届全国大宗淡水鱼加工技术与产业发展研讨会

### 一、会议背景

在第一届全国大宗淡水鱼加工技术与产业发展研讨会的基础上,近两年来我国淡水鱼加工产业正在逐步发展,为了进一步引领和指导大宗淡水类加工企业将水产加工技术应用于大宗淡水鱼的加工中,促进我国大宗淡水类加工企业的快速发展,推进我国大宗淡水鱼类产业的壮大,加强产学研的结合,加强技术交流和推广,由国家大宗淡水鱼类产业技术体系主办、国家大宗淡水鱼类产业技术体系加工研究室承办的第二届全国大宗淡水鱼加工技术与产业发展研讨会计划在今年九月份举行。

### 二、会议论文征稿

本次大会将进行会议征集与上述会议主要内容相符的论文与文章,并印刷《第二届全国大宗淡水鱼加工技术与产业发展研讨会论文集》。

提交截止时间与提交地址:摘要提交截止时间:2012年7月15日;论文全文提交截止时间:2012年8月15日;提交可通过 Email 或邮寄等方式或按照下列联系方式。

### 三、联系方式:

邮寄地址:江苏省无锡市蠡湖大道1800号江南大学食品学院(邮编214122)

联系人:许艳顺 电话:13861462459 Email: xyshn@163.com

姜启兴 电话:13585028520; Email: qixingj@163.com

办公电话、传真:0510—85329057