

酶解大豆蛋白的制备工艺研究及其在细胞培养中的应用研究

郑荣^{1,2,3}, 何云富³, 张邵博³, 李倬³, 冶眩青³,
程浩³, 丁功涛³, 冯玉萍^{1,2,3}, 马忠仁^{1,2,3}, 李明生^{1,2,3*}

¹西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室; ²西北民族大学甘肃省动物细胞工程技术研究中心;

³西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州, 730030

摘要: 采用两种非动物源性蛋白酶水解大豆蛋白, 以水解度为指标, 对不同比例 4 种酶两两组合测试其水解度, 选出水解最佳用酶; 在单因素试验基础上, 采用正交试验对酶解大豆蛋白的工艺条件进行优化, 并将产物进行动物细胞的生长进行检测。结果表明: 复合蛋白酶与碱性蛋白酶以等比例进行混合, 其水解效果最佳; 水解最佳工艺为: 温度 60 °C、pH 值 7.0 和酶/底物 (E/S) = 1:4 (质量比), 水解时间为 4 h, 其水解度为 43.7%。将酶解产物培养 BHK-21 细胞, 并与 Hypep1510 进行对比, 细胞生长状态良好, 其细胞密度在 120 h 时最大, 为 3.96×10^5 cells/mL, 与 Hypep1510 相比, 最大细胞密度并无明显差异, 其倍增时间为 26.2 h, 高于阴性对照组与阳性对照组, 且细胞形态基本未发生改变, 表明酶解大豆蛋白的产物能够缩短细胞倍增的时间, 且具有一定的促细胞生长作用, 为在动物细胞大规模培养中的应用提供了理论依据。

关键词: 酶解; 非动物源性; 大豆蛋白; 细胞培养

中图分类号: R965; Q813.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.9.026

Preparation Process of Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein and Its Application in Cell Culture

ZHENG Rong^{1,2,3}, HE Yun-fu³, ZHANG Shao-bo³, LI Zhuo³, YE Xuan-qing³, CHENG Hao³,
DING Gong-tao³, FENG Yu-ping^{1,2,3}, MA Zhong-ren^{1,2,3}, LI Ming-sheng^{1,2,3*}

¹Key Laboratory of Bioengineering & Biotechnology of State Ethnic Affair Commission, Northwest University for Nationalities;

²Engineering Technology Research Center for Animal Cell;

³Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China

Abstract: Two kinds of non-animal-derived protease were used to hydrolyze soy protein, the degree of hydrolysis was taken as an index, the degree of hydrolysis of four kinds of enzymes in different proportions was tested in combination with each other, and the optimal enzymes for hydrolysis were selected. On the basis of single factor test, The orthogonal test was used to optimize the enzymatic hydrolysis of soybean protein, and the enzymolysis product was added to the medium to detect the growth of animal cells. The results showed that the optimum hydrolysis conditions were as follows: temperature 60 °C, pH value 7.0 and enzyme/substrate (E/S) = 1:4 (Mass ratio), hydrolysis time of 4 h, the degree of hydrolysis of 43.7%. BHK-21 cells were cultured and cultured in the medium, and the cell growth was good compared with that of Hypep1510. The cell density reached the maximum of 3.96×10^5 cells/mL at 120 h with a doubling time of 26.2 h. Which were higher than that of the negative control group and the positive control group, indicating that enzymolysed soy protein products can shorten the cell doubling time and promote cell growth, which provides a theoretical basis for its application in animal cell culture.

Key words: enzymatic hydrolysis; animal origin free; soy protein; cell culture

大豆中含有 40% 的蛋白质, 它可以提供动物所

需要的 8 种必需氨基酸、多种维生素和矿物质^[1]。大豆蛋白水解物是以大豆蛋白为原料, 在酸、碱或者酶的作用下, 将大豆蛋白水解为小分子肽以及游离氨基酸, 早在 20 世纪 70 年代, Adler-Nissen J^[2] 就通过碱性蛋白酶水解的产物用于老鼠饲料添加, Al-

收稿日期: 2017-11-20

接受日期: 2018-03-16

基金项目: 中央高校项目 (31920150231); 甘肃省科技计划 (17YF1WA166); 甘肃省科技计划 (1504WK CA094); 兰州市科技计划 (2014-1-158)

* 通信作者 E-mail: limingsheng@xbmu.edu.cn

laoua 通过对大豆蛋白进行酶解,对其氨基酸等进行分析,并发现大豆蛋白水解物具有抗氧化性^[3],范喜宽^[4]等人发现大豆肽具有多种生物学活性,如降低血脂和胆固醇^[5]、低过敏性^[6]等多种功能,Kallel^[7]等人发现动物源性的蛋白质加入到培养基中,可能造成病毒、支原体等污染,故选择植物源性的蛋白或者蛋白水解物可以避免这个问题。早在1999年,Castle等^[8]研究中就已经在无血清培养及中排除了动物来源的添加成分,而现在对于无血清培养基的研究方向已经转向化学成分限定的培养基^[9]。

酶法水解大豆蛋白的研究,最初是始于利用酶部分降解蛋白质,增加其分子内或分子间交联或连接特殊功能基团,改变蛋白质的功能性质,以获得良好加工特性的研究。在早期的细胞培养中,所有培养基中都含有血清,血清的主要作用是提供促细胞生长成分,血清中含有的白蛋白和转铁蛋白可以转运脂类、脂肪酸、激素和微量元素(尤其是铁元素)。随着欧洲许多国家爆发疯牛病(BSE),血清的应用受到越来越多的质疑,血清在使用过程中存在风险,最大的风险就是血清会带来动物源性的病毒、支原体等外源污染^[10,11],动物源性的血清可能含有内毒素、病毒或者支原体等不容易检测及除去的外源污染,此外,血清在工业生产中存在问题如在下游工艺、产品纯化、原料易变、产品供给方面有限制以及昂贵的成本,使得人们一直在探索寻找血清的替代物^[12]。

本研究以大豆蛋白为原料,通过使用非动物源性水解酶来制备大豆蛋白水解物,并添加到培养基中,对细胞生长进行观察,对于研究无蛋白的无血清培养添加成分具有重要意义。现在国外商品化的大豆蛋白水解物只有 Kerry Bio-science 公司的 Hyp-pep1510,国内几乎为空白,研究大豆蛋白水解物的

制备工艺对于大豆蛋白水解物国产化具有深远影响,同时将大豆蛋白水解物添加到低血清或者无血清培养基中培养细胞,对研究培养基中添加的无动物源性蛋白成分也有重要意义。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

大豆蛋白粉、碱性蛋白酶均由西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室提供;中性蛋白酶购自南宁庞博生物工程有限公司;木瓜蛋白酶购自南宁市天微生物科技有限公司;复合蛋白酶购自上海源叶生物科技有限公司;BHK-21 利亚仓鼠肾细胞由甘肃省动物细胞工程中心提供;DMEM 培养基购自兰州民海生物有限公司;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

L8900 全自动氨基酸分析仪(日立中国有限公司);LC-6M 离心机(上海市离心机械研究所);超滤设备(颇尔中国有限公司);LGJ-200F 真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);倒置相差显微镜(奥林巴斯中国有限公司);二氧化碳恒温培养箱(Thermo);细胞多孔培养板(Nunclon™ Δ Surface)。

2 实验方法

2.1 酶种类筛选

将大豆蛋白粉溶于纯水中,配制最终浓度为8%,按总酶与底物的质量比(E/S) = 1:5进行酶解试验,本研究利用双酶水解的方法进行蛋白水解试验,根据酶内外切的位点不同,分别用复合蛋白酶与其他蛋白酶进行水解,两种酶的混合比例分别按1:2、1:1、2:1进行水解,测试其水解度,按照水解度最高组合选择酶。表1为各酶反应的最佳条件及酶切位点。

表1 各酶最佳反应条件及酶切位点

Table 1 Optimal conditions for enzyme reaction

酶 Enzyme	碱性蛋白酶 Alcalase	中性蛋白酶 Dispase	木瓜蛋白酶 Papain	复合蛋白酶 Protease
温度 Temperature	60	50	55	50
pH	8.0	7.0	6.5	7.0
反应时间 Reaction time(h)	4	4	4	4

2.2 单因素试验

根据选择的两种酶进行单因素试验

2.2.1 水解中酶与底物比对水解的影响实验

大豆蛋白水解过程中,配制 10% 大豆蛋白溶液,反应温度为 50 ℃,反应时间为 4 h, pH 为 7.0,探究酶与底物比在 1:4、1:6、1:8、1:10 情况下对水解度的影响。

2.2.2 水解中温度对水解的影响

大豆蛋白水解过程中,配制 10% 大豆蛋白溶液,酶与底物的比为 1:6, pH 为 7.0,探究反应温度为 40、50、60、70 ℃ 时对水解度的影响。

2.2.3 水解中 pH 对水解的影响

大豆蛋白水解过程中,配制 10% 大豆蛋白溶

液,酶与底物的比为 1:6,反应温度为 50 ℃,反应时间为 4 h,探究反应时间为 2、3、4、5 h 下对水解度的影响。

2.2.4 水解中反应时间对水解度的影响

大豆蛋白水解过程中,配制 10% 大豆蛋白溶液,酶与底物的比为 1:6,反应温度为 50 ℃,反应时间为 4 h,探究反应 pH 在 5.0、6.0、7.0、8.0 下对水解度的影响。

2.3 最佳工艺条件确定

根据单因素实验结果,设计 L9 (3⁴) 的正交实验表确定酶解大豆蛋白的最佳工艺参数,设计方案见表 2。

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels for the orthogonal experiments

水平 Level	因素 (Factors)			
	A 酶与底物比 Enzyme /substrate ratio	B 温度 Temperature (℃)	C 时间 Time (h)	D pH
1	1:4	40	2	5
2	1:6	50	3	6
3	1:8	60	4	7

2.4 水解度测定

水解度方法参考 pH-State 法,主要是基于蛋白质水解过程中,总是要伴随质子的释放或吸收,质子化的多少,依赖于溶液的 pH,通过加入的用于维持体系 pH 的碱或酸的量直接计算出水解度。

$$DH = B \times N_b / a \times m \times h_{\text{Dot}}$$

式中 B 为水解过程中消耗的碱量 (mL), N_b 为碱的摩尔浓度 (mol/mL), a 为 NH_3^+ 的平均解离度, m 为样品中蛋白质质量 (g), h_{Dot} 为单位质量蛋白肽键当量数^[13]。

2.5 氨基酸含量测定

取最优组合的酶解产物 100 mg 定容至 100 mL 纯水中,用 5% 三氯乙酸稀释两倍后,3 800 rpm 离心 15 min,采用日立 L8900 型全自动氨基酸分析仪检测,同时以 Hypep1510 大豆蛋白水解物作对照。

2.6 细胞生长试验

2.6.1 大豆蛋白水解物的制备及纯化

以最佳工艺确定的条件制备的大豆蛋白水解物,3500 rpm 离心 30 min 后取上清液,经 10 kd 的超滤膜超滤,去除液体中残留的蛋白酶及大分子蛋白,在保证其结构、组成和功能不变的前提下,将纯

化的小于 10 kd 的水解液进行真空冷冻干燥,去除其中水分,防止对于后续试验的干扰。

2.6.2 细胞形态观察

将纯化冻干后的大豆蛋白水解物加入含 10% 血清的 DMEM 培养基中,配制最终浓度为 0.25%,以同样方法浓度配制含 0.25% Hypep1510 的 DMEM 培养基为阳性对照组,血清浓度为 10% 添加,以不含大豆蛋白水解物但含 10% 血清的 DMEM 培养基阴性为对照组,用倒置相差显微镜观察不同组之间细胞的形态差异。

2.6.3 细胞生长曲线的绘制

将阴性对照组、阳性对照组、实验组的培养至 3 代以上的 BHK-21 贴壁细胞消化计数,按每孔 2×10^4 cells/孔 接种到 24 孔板中,每 24 小时观察细胞生长情况并计数。根据计算结果绘制细胞的生长曲线。

2.6.4 细胞倍增时间的计算

倍增时间为细胞数量每增加一倍所需的时间,根据细胞的计数结果计算其倍增时间。

计算公式为: $DT = T / \log(Y/X) / \log 2$, 其中, Y 为峰值前一天细胞的数量, X 为对应的时间, $\log 2$ 为细

胞初始接种浓度的对数^[14]。

3 结果与分析

3.1 酶筛选结果

由表3可以看出添加不同的,酶其水解效果不同,其原因是酶与底物的结合具有特异性^[15],不同的蛋白酶会根据肽键周围氨基酸的顺序来识别和催化蛋白质中肽键的水解,从而水解为不同的多肽以

及各种氨基酸^[16],水解度越大其对蛋白质水解的效果越好,水解的肽段越多,多肽的增加可以引起一系列的生物活性和功能性的变化^[17]。本次研究采用的方法是双酶水解,根据内切酶外切酶的特点进行蛋白水解,使得蛋白水解所得产物水解程度较为彻底,根据酶筛选的结果可以看出,中性蛋白酶与碱性蛋白酶的添加比例为1:1时,水解度最高为36.8%,故选择中性蛋白酶与碱性蛋白酶混合使用。

表3 不同比例双酶水解大豆蛋白的水解度

Table 3 The hydrolysis of soy protein hydrolyzed by different proportions

比例 Proportion	不同添加比例所得水解度 The degree of hydrolysis of different proportions was added (%)		
	木瓜: 碱性 Papain: alcalase	中性: 碱性 Dispase: alcalase	复合: 碱性 Protamex: alcalase
1:2	29.3%	23.7%	29.6%
1:1	35.9%	35.2%	36.8%
2:1	30.2	28.3%	35.3%

3.2 单因素实验

3.2.1 温度对水解度的影响

由图1可知,随着温度的变化,水解度的变化是较明显的($P < 0.05$),50℃是水解度最高,为28.7%。40~50℃时,水解度增高,50~70℃时,水解度反而下降($P < 0.01$),此次实验测出水解最适温度为50℃。此时水解度最大,最大值为28.7%。

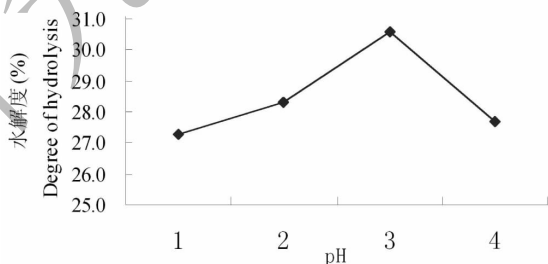


图2 pH对水解度的影响

Fig. 2 Effect of pH on the degree of hydrolysis

注:组间比较, $P < 0.01$ 。

Note: Compared between groups, $P < 0.01$.

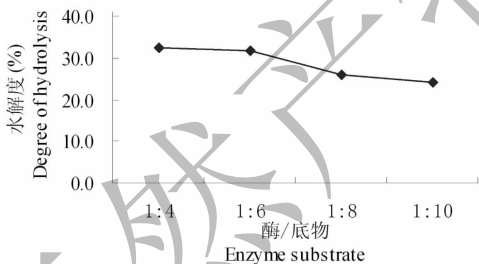


图1 温度对水解度的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the degree of hydrolysis

注:组间比较, $P < 0.01$ 。

Note: Compared between groups, $P < 0.01$.

3.2.2 pH对水解度的影响

由图2可知,随着pH增加,水解度逐渐增加($P < 0.05$),当pH为7.0时,水解度最大,最大值为30.6%,当pH值为5.0~7.0时,水解度逐渐增加($P < 0.01$),当pH增加到8.0时,水解度降低。本次实验结果表明,当水解最适pH为7.0时,最大值为30.6%。

3.2.3 时间对水解度的影响

由图3可知,随着水解时间的增加,水解度逐渐增加($P < 0.05$),当水解时间为4h时,水解度最

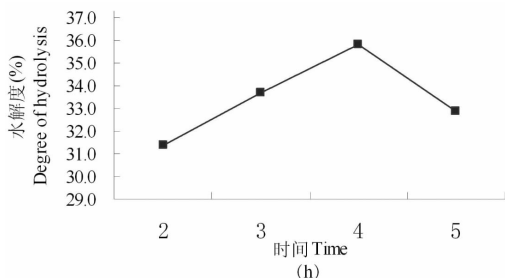


图3 水解时间对水解度的影响

Fig. 3 Effect of time on the degree of hydrolysis

注:组间比较, $P < 0.01$ 。

Note: Compared between groups, $P < 0.01$.

大,最大值为 35.8%,当水解时间值为 2~4 h 时,水解度逐渐增加($P < 0.01$),当水解时间增加到 5 h 时,水解度降低。本次实验结果表明,当水解最适时间为 4 h,最大值为 35.8%。

3.2.4 酶/底物对水解度的影响

由图 4 可知,随着酶/底物的改变,水解度逐渐

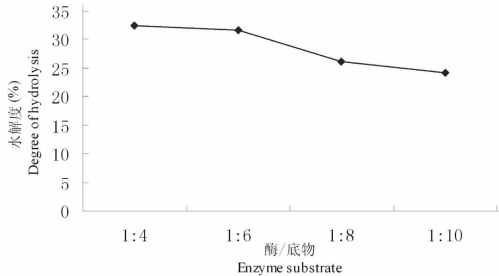


图 4 酶/底物对水解度的影响

Fig. 4 Effect of enzyme /substrate on the degree of hydrolysis

注: 组间比较, $P < 0.01$ 。

Note: Compared between groups, $P < 0.01$.

降低($P < 0.01$),当酶/底物为 1:4 时,水解度最大,最大值为 32.5%,其原因是是由于随着酶量的增加,底物蛋白水解会更加彻底,随着酶与底物比例的降低,即酶量的减少,水解度逐渐降低($P < 0.01$)。故本次实验结果表明,当水解最酶/底物为 1:4,最大值为 32.5%。

3.3 工艺优化

大豆蛋白水解工艺优化正交实验结果如表 4,对本次实验进行极差分析可知,在水解过程中,四种因素对水解度的影响依次为 B(温度) > D(pH) > C(时间) > A(酶与底物比);根据极差分析确定水解最优组合为 $A_1B_3C_3D_1$,而正交实验所得最优组合为 $A_1B_3C_3D_3$,故对两组实验相同条件下的进行工艺验证,确定其水解度 $A_1B_3C_3D_1$ 为 40.1%, $A_1B_3C_3D_3$ 为 43.7%,故选择最优组合为 $A_1B_3C_3D_3$,故水解的最佳工艺为:酶/底物比为 1:4(质量比),温度为 60 °C,pH 为 7.0,水解时间为 4 h。

表 4 正交实验结果

Table 4 Results of orthogonal experiment

试验号 No.	A	B	C	D	DH (%)
1	1	1	1	1	23.6
2	1	2	2	2	27.6
3	1	3	3	3	35.8
4	2	1	2	3	23.6
5	2	2	3	1	29.3
6	2	3	1	2	30.1
7	3	1	3	2	21.8
8	3	2	1	3	26.8
9	3	3	2	1	34.2
K1	29.0	23.0	26.8	29.0	
K2	27.7	27.9	28.5	26.5	
K3	27.6	33.4	29.0	28.7	
R	1.4	10.4	2.2	2.5	

主次顺序: B > D > C > A 最优组合: $A_1B_3C_3D_1$

3.4 游离氨基酸检测结果

由表 5 可以看到市售 Hypep1510(Hy1510)与本次实验所得大豆蛋白水解物(SH)比较,本次研究所得产物游离氨基酸基本高于 Hypep1510(Hy1510)的游离氨基酸,尤其是对细胞生长较为重要的谷氨酰胺($GluNH_2$)含量较高,为后续细胞实验提供了理

论依据。

3.5 细胞生长结果

3.5.1 BHK-21 细胞形态观察

图 5 细胞传代培养图片,每次传代时,试验组与对照组接种量各为 3.0×10^6 cells/mL,每 24 h 进行观察,每 48 h 进行传代,阳性对照组、阴性对照组、

实验组细胞均可正常传代 10 代以上,由图 5 可以看到,培养至 48 h 时,细胞生长致密且形态良好,未出现分化变异现象。实验组细胞较阴、阳性对照组致

密性好一些,试验结果证明:本次酶解大豆蛋白所的产物对 BHK-21 细胞具有一定的促进细胞生长的作用。

表 5 Hypep1510(Hy1510)与大豆蛋白水解物(SH)氨基酸比较

Table 5 Amino acid of Hypep1510 and soy protein hydrolysates

序号 No.	氨基酸名称 Amino acid	Hy1510 (%)	SH (%)	序号 No.	氨基酸名称 Amino acid	Hy1510 (%)	SH (%)
1	精氨酸(Arg)	1.002	4.423	11	组氨酸(His)	0.069	0.413
2	天冬氨酸(Asp)	0.218	0.421	12	赖氨酸(Lys)	0.605	3.144
3	苏氨酸(Thr)	0.238	0.656	13	缬氨酸(Val)	0.420	1.877
4	丝氨酸(Ser)	0.480	0.544	14	胱氨酸(Cys)	0.279	0.493
5	天冬酰胺(AspNH ₂)	0.474	1.408	15	蛋氨酸(Met)	0.280	0.779
6	谷氨酸(Glu)	0.445	0.483	16	异亮氨酸(Ile)	0.418	2.069
7	谷氨酰胺(GluNH ₂)	0.000	2.038	17	亮氨酸(Leu)	1.146	3.529
8	脯氨酸(Pro)	1.144	0.057	18	酪氨酸(Tyr)	0.342	2.480
9	甘氨酸(Gly)	0.191	0.148	19	苯丙氨酸(PHe)	0.588	3.060
10	丙氨酸(Ala)	0.442	1.112	20	鸟氨酸(Orn)	0.000	0.041

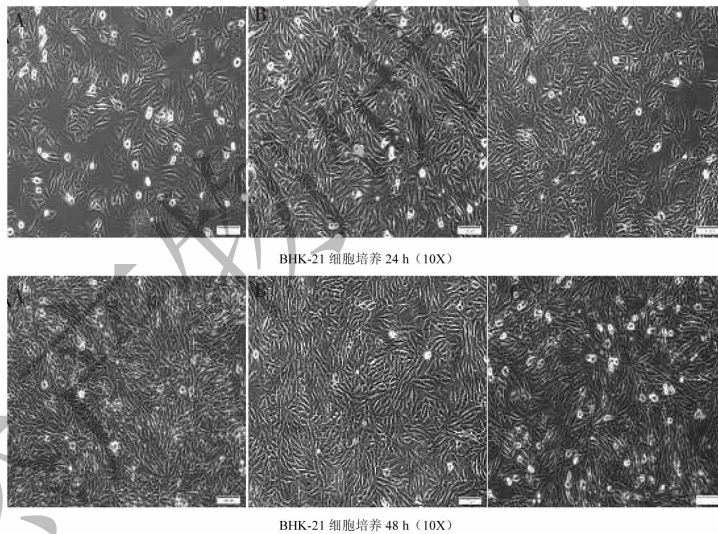


图 5 大豆蛋白水解物培养 BHK-21 细胞

Fig. 5 BHK-21 cells cultured with soy protein hydrolysate

注:A 为阴性对照,B 为阳性对照,C 为实验组。

Note: A was negative control, B was positive control, C was test group.

3.5.2 细胞生长测试结果

由表 6 可知,阴性对照组(DM)与实验组(SH)细胞在 120 h 时数量达到最大,阴性对照组为 3.83×10^5 cells/mL ($P < 0.01$),其倍增时间为 27.4 h,实验组为 3.96×10^5 cells/mL ($P < 0.05$),其倍增时间为 26.2 h ($P < 0.05$),阳性对照组(Hy1510)在 144 h 时细胞数量达到最大,最大值为 4.09×10^5

cells/mL,其倍增时间为 29.1 h。由图 6 可以看出,细胞的生长曲线呈近似“S”型,由此可以看出,本次研究测试的细胞在添加大豆蛋白水解物之后,细胞生长的状态较好,实验组(SH)与阳性对照 Hypep1510 相比,其最大细胞密度基本相同,并无明显差异,显微镜下观察细胞的形态与阴性对照组相比并无改变,且其细胞生长的倍增时间与阴性对照、阳

性对照组相比时间缩短,说明本次研究所制备的产物具有促进细胞分裂的作用,进一步说明本次研究

制备的大豆蛋白水解物对细胞有一定的促生长作用。

表 6 不同组细胞的倍增时间与最大浓度

Table 6 The doubling time and maximum concentration of different cells

分组 Groups	细胞倍增时间(DT) The doubling time of cells (h)	最大细胞浓度 Maximal cell concentration ($\times 10^5$ cells/mL)
DM	27.4	3.83
SH	26.2	3.96
Hypep1510	29.1	4.09

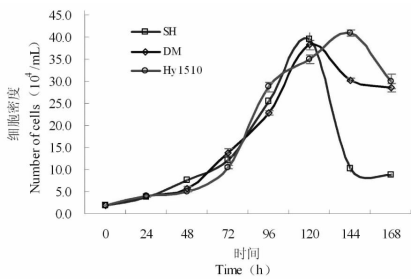


图 6 BHK-21 细胞生长曲线

Fig. 6 Growth curve of BHK-21 cell

4 讨论与结论

在测试水解物提高细胞培养参数时,我们一般选择几种植物源性的蛋白水解物,含有多种游离氨基酸和寡肽,分子量大小一般在 1~10 kDa 同时也包含一小部分分子量高于 10 kDa 的多肽,蛋白水解物最好的作用就是含有大量的寡肽,这些寡肽有选择性的丰富了氨基酸序列,可以模拟特定的动物蛋白^[18-20]。

本次研究我们使用非动物源性的水解酶水解大豆蛋白,制得大豆蛋白水解物,其制备的最佳工艺:温度 60 ℃,pH 值 7.0 和酶/底物(E/S) = 1:4(质量比),水解时间为 4 h,其水解度为 43.7%。并将制备的产物进行细胞生长测试,结果表明,大豆蛋白水解物具有促进细胞生长的作用,与 Hypep1510 相比,最大细胞密度并无明显差异,且缩短了细胞的倍增时间,与不添加水解物的培养基相比,最大细胞密度较高,细胞形态基本未发生变化,说明添加本次研究制备的大豆水解物到细胞的培养基中,对细胞生长有一定的促进作用,为日后其在动物细胞大规模培养的应用中提供了理论依据。

参考文献

1 Yu WH(俞伟辉),Yang JH(阳建辉),Tan XQ(谭溪清),

- et al.* Research progress in soybean protease hydrolysis[J]. *JX Feed*(江西饲料),2008(08):26-28.
- 2 Jens Adler-Nissen. Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food[J]. *Ann Nutr Alim*, 1978;205-206.
- 3 Allaoua. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates[J]. *Food Res International*,2003:617-623.
- 4 Fan XK(范喜宽),Zhuang L(庄磊),Zhao YM(赵一敏), *et al.* Research status and application prospects of soy protein active peptides[J]. *Beve Ind*(饮料工业),2009(9):1-3.
- 5 Zhang YK(张延坤),Liu BZ(刘炳智). Soy peptide in the food industry[J]. *Food Ind*(食品工业),1997(3):5-6.
- 6 Deng Y(邓勇),Wu YH(吴煜欢). Soy peptide research and development: the status problems recommendations [J]. *J Chin Arg Univ*(中国农业大学学报),1999,4(4):89-93.
- 7 Kallel H,Jouini A,Majoul S,*et al.* Evaluation of various serum and animal protein-free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells[J]. *J Biotechnol*, 2002:195-204.
- 8 Castle P,Robertson JS. Animal sera, animal sera derivatives and substitutes used in the manufacture of pharmaceuticals: viral safety and regulatory aspects[M]. *Dev Biol*,1998:191-196.
- 9 Stoll TS, Muhlethaler K, von Stockar U, *et al.* Systematic improvement of a chemically defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production[J]. *J Biotechnol*,1996,45:111-123.
- 10 Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells[J]. *J Cell Biol*, 1981,88:473-485.
- 11 Olsen D, Chang R, Williams KE, *et al.* The development of novel recombinant human gelatins as replacements for animal-derived gelatin hydrolysates in pharmaceutical applications[M]. *Protein hydroly Biotechnol*,2010:209-225.

(下转第 1654 页)