

降解食品中胆固醇的芽孢杆菌 T12-1 的筛选与应用研究

牛天贵 吕莹 蔡同一 郭三堆 张锐

(中国农业大学食品学院)

(中国农科院生物研究所)

摘要 以胆固醇为惟一碳源和能源, 从食肉动物肠道的 19 份样品中筛选出有胆固醇降解酶活性的菌株 40 株; 通过比较, 选出了在培养液中生长速度较快和产酸能力较强的 4 株菌, 进而选出胆固醇降解活性较高的菌株 T12-1; 菌株 T12-1 发酵上清液应用在蛋黄胆固醇降解中, 作用显著; 经动物试验, T12-1 菌株在食品中应用安全、无毒。

关键词 胆固醇; 芽孢杆菌; 胆固醇降解酶

分类号 TS201.3; Q548.1

Isolation and Application of Cholesterol-Degrading Strain (T12-1) from Carnivorous Animal Intestines

Niu Tiangui Lü Ying Cai Tongyi

(College of Food Science and Technology, CAU)

Guo Sandui Zhang Rui

(Institute of Biological Sciences, CAAS)

Abstract 40 bacterial strains that utilized cholesterol as sole carbon and energy source were isolated from carnivorous animal intestines. A strain of *Bacillus*, No. T12-1 was selected for degradation of cholesterol. The action of degrading cholesterol in egg yolk was obvious and it was safety without any toxicity to apply in food processing.

Key words cholesterol; *Bacillus*; cholesterol-degrading enzymes

目前, 冠心病日益严重地威胁着人类的健康和生命, 在欧美等发达国家冠心病死亡已超过所有癌症死亡的总和, 占总死亡率的 27.4%。如果再加上脑中风的死亡率, 则以动脉粥样硬化为基础病变导致的死亡率将更高。在我国虽然农村地区冠心病发病率较低, 但在北京、上海等许多大城市, 冠心病发病率越来越接近欧美国家。

调节人体血清胆固醇含量, 目前主要有 5 种方法: 通过药物阻断自体合成或抑制小肠对胆盐的再吸收; 通过食用豆固醇、谷固醇或菜固醇竞争性抑制食物中胆固醇的吸收; 限制食用胆固醇含量高的食物; 新近发展起来的方法是用酶降解食品中的胆固醇, 这种方法不干扰人体代谢, 不影响食品风味, 无副作用。

1988 年日本 Aihara^[1,2]就把从黄油中分离的 *Rhodococcus equi* No. 23 菌株接种在鸡蛋黄中做降解胆固醇试验, 效果显著, 并证明没有积累酶解中间产物。澳大利亚 Christodoulou 等^[3]用诺卡氏菌、链霉菌、短杆菌和假单胞杆菌提取的胆固醇氧化酶降解鸡蛋黄中胆固醇, 其降解的效果是假单胞杆菌 > 诺卡氏菌 > 链霉菌。在 37℃ 下培养 72 h, 假单胞杆菌降解鸡蛋黄中胆

收稿日期: 2000-05-18

国家转基因植物研究与产业化开发专项资助(JA-013)

牛天贵, 北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094

固醇达 93.4%。中国农业大学江正强等^[4]用 Sigma 公司(美国)生产的胆固醇氧化酶做了脱除猪油中胆固醇的试验,结果猪油脱除胆固醇后,理化性质变化不明显。

微生物转化胆固醇,专一性强、产量高、反应条件温和^[5],所以,降解食品中胆固醇的效率高、对食品特性(如风味、营养等)影响小。目前应用中尚需解决的问题是:使用纯酶成本太高;胆固醇在食品中的存在有游离胆固醇和胆固醇酯 2 种方式,为达到效率高的目的,应该使用胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶;把菌直接应用于食品,菌的细胞及其产物必须对人体无害。

本研究采集了食草动物(编号 1~26)和食肉动物(编号 27~45)粪便、胆固醇含量高食品原料(编号 46~62)和土壤及其他来源的样品(编号 63~103) 103 份,分离到有降解胆固醇能力的革兰氏阳性菌 107 株。通过比较在以胆固醇为惟一碳源和能源的基础上的生长情况,初选出 29 株菌,比较表型特征和生化特征,复选出 4 株菌,比较降解胆固醇的活力,终选出 1 株菌,即 T12-1。经初步鉴定为好气性芽孢杆菌,用于降解蛋黄中的胆固醇,效果显著。经检测和动物实验,在食品中应用安全无毒。

本文介绍从北京动物园食肉动物肠道中分离的 T12-1 菌株的筛选和应用的研究工作。

2 材料与方 法

2.1 材 料

在北京动物园采集食肉健康动物新鲜粪便共 19 份,分别包装,标记编号,保存。采集当天分离菌种。

筛选培养基组成($g \cdot L^{-1}$): NH_4NO_3 1.0, KH_2PO_4 0.25, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, $FeSO_4$ 0.001, 胆固醇 1.0, pH 7.0, 121 15 min 灭菌。

发酵及种子培养基($g \cdot L^{-1}$): NH_4NO_3 1.0; KH_2PO_4 0.25; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25; $FeSO_4$ 0.001, 胆固醇 1.0, 酵母膏 5.0, 吐温 80 1.0 mL, pH 7.0, 121 15 min 灭菌。

XY-X3 型恒温摇瓶机, 山东大学; HS21-4 型电热恒温水浴锅, 恒温范围 37~100, 北京长安科学仪器厂; 722 光栅可见分光光度计: 上海第三分析仪器厂。

2.2 分离、筛选方法

2.2.1 分离 分别将 1 g 动物粪便,用无菌操作方法接入 10 mL 无菌胆固醇选择培养基中, 37 培养 24 h, 观察结果。然后取培养液 100 μL 加到同样的培养基里培养。为除去分离菌株在原环境中的碳源干扰,再取 100 μL 培养好的菌悬液,转接到同样的培养基中培养,共 3 次转管培养。取连续 3 次转管培养后的菌液 200 μL ,放入编好号的无菌培养皿中,再倒入溶化后冷却至 45 左右加有琼脂的发酵培养基 12~15 mL,置水平位置,迅速旋动混匀,待凝固后,30 倒置培养。菌落长出后,挑取有代表性的单菌落,镜检无杂菌后,转接在发酵培养基制成的斜面上培养。斜面长好后 4 冰箱冷藏。

2.2.2 培养方法 取斜面菌种接种种子培养基,32 摇床培养 6 h,然后按 3% 体积接入发酵液,32 摇床培养 10 h(频率为 200~220 转,偏心距 4~5 cm)。

2.2.3 菌株特性的鉴定 首先观察菌落形态和显微镜下的个体形态,然后参照细菌生物学鉴定的一般方法,检测菌株的生理生化特征^[6]。

2.2.4 胆固醇降解酶活力测定和活力单位定义 酶活力的测定:用 pH 7.0 的磷酸缓冲液

($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)配制成 1% 的标准胆固醇溶液,取 $400\ \mu\text{L}$,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中预热 3 min ,加入粗酶液(即去除菌体的培养液) $50\ \mu\text{L}$,保温 5 min 后,迅速加入 3 mL 邻苯二甲醛溶液(1 L 冰醋酸溶解 100 mg 邻苯二甲醛)终止反应,然后加入 2 mL 浓硫酸摇匀后静置。用分光光度计测其在 590 nm 的吸光值。

酶活力单位定义^[7]:上述反应条件下,每分钟催化 $1\ \mu\text{mol}$ 胆固醇降解所需的酶量定为 1 个酶活力单位(U nit)。

2.2.5 蛋黄中胆固醇的测定 胆固醇的提取参照 Pasin^[8]方法,胆固醇的测定参照王慧云^[9]方法。

3 结果和讨论

3.1 样本与菌株

来自食肉动物肠道的 19 份样品,共分离到 40 株能降解胆固醇的细菌(表 1),其中 T12-1 和 T18 在筛选培养基生长较快。

3.2 培养基成分

微生物培养基都是以水为溶剂,胆固醇不溶于水,室温下在乙醇中溶解度也低。为此,试验对以胆固醇为惟一碳源和能源的筛选培养基和相应的发酵培养基也分别作了研究。

3.2.1 筛选培养基 筛选培养基中含有 0.1% 胆固醇和其他无机盐。胆固醇不溶于水,但又不能加助溶剂,否则又等于加了新的碳源。通过试验,筛选培养基配制采用了磁力机连续搅拌分装,以促进胆固醇的乳化。试验结果通过比浊、比色(培养基加溴麝香草酚蓝作酸碱指示剂)及观察胆固醇的剩余量,来评估微生物在筛选培养基中降解胆固醇的能力。

3.2.2 发酵培养基 发酵培养基不仅是为了繁殖菌体,而且还要使菌能降解胆固醇,所以不仅需要加入酵母膏丰富营养,还要求胆固醇能够在培养基中分布均匀。单独加甲醇、乙醇、甘油、丙酮、丁酸、四硼酸钠、苯甲醇、乙酸乙酯、二甲苯、石油醚、二甲基甲酰胺、吐温等,都不能使胆固醇在培养基中均匀分布。经反复实验,最后确定用吐温加少量有机溶剂构成复合溶剂,使培养基形成均匀稳定的乳化液,结果较理想。

3.3 菌株的生物学特性

从动物肠道中分离出的 40 株可以降解胆固醇的细菌,根据发酵液浊度比较,选出 12 株菌。为了进一步识别菌株的差异,根据在胆固醇为惟一碳源时,细菌碳源生物氧化(降解)产物与生长量的相关关系,其数量则可通过加入酸碱指示剂显示出来,故在筛选培养基加入指示剂(溴麝香草酚蓝),根据菌株产酸能力,选出 T12-1 和 T18 菌株,进一步和其他来源筛选出的 2 株菌(X0 分离自胆固醇化学试剂,X5 分离自商品猪肝)比较,从中筛选出 1 株高效降解胆固

表 1 样品来源及分离菌株数量

动物编号	实验编号	宿主名称	分离菌株数
27	T1	黑豹	2
28	T2	黑仔	2
29	T3	狐狸	1
30	T4	孟加拉虎	2
31	T5	非州狮	1
32	T6	青狼	3
33	T7	朝鲜豹	1
34	T8	豺	2
35	T9	犬	2
36	T10	黑狼	1
37	T11	红狼	2
38	T12	雪豹	4
39	T13	猢狲	1
40	T14	美洲狮	3
41	T15	白虎	3
42	T16	华南豹	2
43	T17	白熊	3
44	T18	棕熊	3
45	T19	黑熊	2

醇的菌株。

通过革兰氏染色和显微镜镜检, 观察到 T12-1, T18, X0 及 X5 共 4 株都是革兰氏阳性菌, 其中 T12-1 为芽孢杆菌, X0, T18 及 X5 为无芽孢杆菌。表型特征区别明显。进一步测定了 131 个生理、生化和生态表型特征, 结果是 4 株菌 75 个特征为全阳性, 29 个特征为全阴性, 4 菌株在 27 个特征差别明显。在这 27 个特征中, T12-1 和 T18 对氯霉素和链霉素($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)敏感, X0 和 X5 则抗氯霉素和链霉素($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。在石蕊牛奶试验中 T12-1 和 X0 产酸为阳性, T18 和 X5 脲化为阳性。总的来说 T12-1 与 T18, X5, X0 虽个体形态特征差异明显, 但生理上的一些特征基本一致。

3.4 胆固醇降解酶活力比较和培养条件的选择

3.4.1 胆固醇降解酶活力比较 在表型特征比较的基础上, 进一步又对这 4 株菌降解胆固醇活力情况做了测定。胆固醇降解酶活力($\times 10^{-3} \mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)从高到低顺序: T12-1 为 3.31, X0 为 3.20, X5 为 2.98, T18 为 2.86。

3.4.2 培养条件选择 根据酶活力比较结果, 以 T12-1 为代表, 又对胆固醇高降解酶活性的培养条件做了实验。除温度和菌龄外, 还对发酵液的主要成分酵母膏、胆固醇、吐温做了三因素、三水平正交设计实验, 经极差分析和方差分析, T12-1 菌株的发酵液中活力较高的条件是: 发酵培养基中成分是酵母膏 5.0, 胆固醇 1.0, 吐温 1 mL ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 6.5~7; 在 32 振荡培养 10 h 后, 胆固醇降解酶活力可达 (3.61×10^{-3}) $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.5 降解鸡蛋黄胆固醇试验

经试验, 蛋黄液大于 1/32 比例则样品太浓, 对试验略有影响。故用 2% 的氯化钠把新鲜鸡蛋黄配成 1/32 溶液, 振荡 1 min 后, 分装在 5 支试管内, 每支装 1.00 mL 蛋黄液, 然后加入 0, 50, 100, 150, 200 μL 的 T12-1 发酵上清液, 酶液不足 200 μL 的, 用 2% 的氯化钠补足到 200 μL 。10 min 后检测, 蛋黄中胆固醇已明显降低(表 2)。

表 2 鸡蛋黄胆固醇降解

项 目	发酵上清液 $v/\mu\text{L}$				
	CK	50	100	150	200
2% 盐水 v/mL	200	150	100	50	0
T12-1 v/mL	0	50	100	150	200
吸光度值(A_{590})	0.225	0.194	0.164	0.148	0.129
胆固醇(%)	100	86.2	72.9	67.3	58.6
降解量(%)	0	13.8	27.1	32.7	41.4

3.6 毒力检测

经北京市卫生防疫站检测, T12-1 菌株、所用培养基及发酵上清液用雌、雄小鼠急性经口试验 LD_{50} 均大于 $21\,500 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}(\text{BW})$, 根据《食品安全性毒理学评价程序和方法》中急性毒性分级标准, 判定菌株、所用培养基及发酵上清液均为无毒级。

4 结论

筛选出了胆固醇降解酶活性较高的菌株 T12-1。

确定了 T12-1 菌株胆固醇降解酶的最适培养温度为 32℃, 培养基 pH 6.5~7。菌株发酵上清液在蛋黄胆固醇降解中, 效果显著。经鉴定, T12-1 菌株在食品中应用安全无毒。

参 考 文 献

- 1 Kenji Watanabe, Hisako Shimizu, Hidetaka Aihara, et al Isolation and identification of cholesterol degrading *Rhodococcus* strains from food of animal origin and their cholesterol oxidase activities J Gen App Microbiol, 1986, 32: 137~ 147
- 2 Aihara H, Watanabe K, Nakamura R, et al Degradation of cholesterol in egg yolk by *Rhodococcus equi* No. 23 J Food Sci, 1988, 53(23): 659, 660
- 3 Christodoulou S, Hong T V, Trewell, M A, et al Enzymatic degradation of egg yolk cholesterol J Food Protection, 1994, 57(10): 908~ 912
- 4 江正强 用胆固醇氧化酶脱除猪油中的胆固醇 中国农业大学学报, 1996, 1(2): 100, 101
- 5 俞俊棠 生物工艺学 上海: 华东化工学院出版社, 1994
- 6 李颖, 牛天贵, 陈文新 压缩根瘤菌分类属性空间的聚类方法研究 北京农业大学学报, 1995, 21(2): 116 ~ 125
- 7 Kenji Watanabe, Hidetaka Aihara, Yoko Nakagawa, et al Properties of the purified extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus equi* No. 23, J Agric Food Chem, 1989, 37: 1178~ 1182
- 8 Pasin G Rapid determination of total cholesterol in egg yolk using commercial diagnostic cholesterol reagent Food Chemistry, 1998, 61(1/2): 255~ 259
- 9 王慧云 鸡蛋中胆固醇快速测定方法的研究 食品科学, 1995, 16(6): 58, 59