

降解胆固醇的芽孢杆菌 T12-1 的培养条件研究

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,从食肉动物雪豹肠道分离出一株胆固醇降解酶活力较高的 T12-1 菌株,初步鉴定为好气性芽孢杆菌。经实验确定,其胆固醇降解酶产生的最适宜条件为培养温度 32℃,培养基 pH 6.5~7。用 250 mL 三角瓶装 60 mL 培养基,振荡培养 10 h,培养基中酵母膏含量为 5 g·L⁻¹、胆固醇含量为 1 g·L⁻¹、吐温 80 含量 1 mL·L⁻¹,其胆固醇降解酶活力可达 3.61 × 10⁻³ μU·mL⁻¹。

关键词 胆固醇降解酶; 芽孢杆菌; 培养条件

分类号 TS201.3

Conditions of Culture of the Strain (T12-1) Degrading Cholesterol

Niu Tianguai Lü Ying Cai Tongyi

(College of Food Science and Technology, CAU)

Guo Sandui Zhang Rui

(Institute of Biological Sciences, CAAAS)

Abstract An bacterial strain that utilized cholesterol as sole carbon and energy sources was isolated from a variety of *Carnivore intestines*. The extracellular enzymes of degrading cholesterol by *Bacillus* sp. No. T12-1 was 3.61 × 10⁻³ μU·mL⁻¹ in the cultural medium which contained (g·L⁻¹) the following: NH₄NO₃ 1.0, KH₂PO₄ 0.25, MgSO₄·7H₂O 0.25, FeSO₄·7H₂O 0.001, cholesterol 1, yeast extract 5, Tween80 1 mL, pH 6.5~7. The culture was grown at 32℃ for 10 h.

Key words enzymes of degrading cholesterol; *Bacillus*; conditions of culture

胆固醇是所有动物细胞膜的重要组成成分,故为人体所必需^[1]。胆固醇主要靠自体合成,少量需要从食物中补充。人体从食物中吸收胆固醇,反馈抑制体内的合成,以达到胆固醇代谢的平衡。但如从食物中吸收过多,超过人体对胆固醇调节代谢平衡的能力,则可造成胆固醇在体内的堆积,出现高脂血症,从而引发一系列疾病^[2]。

胆固醇降解酶催化反应特异性很强,故用胆固醇氧化酶降解食品中的胆固醇,不干扰人体代谢,不影响食品风味,无副作用^[3]。工业所用的胆固醇氧化酶制剂,通常都是从微生物提取。Tuffit^[4]从土壤中分离出降解胆固醇的菌株后,人们先后从节杆菌^[5]、诺卡氏菌^[6]、短杆菌^[7]、链霉菌^[8]、假单胞杆菌^[9]和红球菌^[10]中分离出胆固醇氧化酶。

胆固醇氧化酶(cholesterol oxidase EC1.1.3.6)催化胆固醇与氧反应生成胆甾烯酮和过氧化氢(这是微生物降解胆固醇的第一步反应)。这种胆固醇氧化酶不仅可用来降解肉、蛋、奶

收稿日期: 2000-05-18

国家转基因植物研究与产业化开发专项(JA-013)

牛天贵,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094



食品中的胆固醇,检测食物或血清中的胆固醇含量,在化学合成中催化类固醇激素前体物质的生成,用于细菌鉴定^[5],还可通过转基因技术,用来培育抗棉铃虫植物^[6]。

为了寻找可降解食品中胆固醇的微生物,本实验从北京动物园食肉动物雪豹的肠道中,分离和筛选出一株胞外胆固醇酶活力较高的细菌 T 12-1,经鉴定为好气性芽孢杆菌。用发酵后离心的上清液降解蛋黄中的胆固醇,效果显著。经动物实验鉴定, T 12-1 菌株在食品中应用安全无毒。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养

好气性芽孢杆菌 T 12-1,分离自北京动物园食肉动物雪豹肠道。

1.2 培养基

发酵和种子培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NH_4NO_3 1.0; KH_2PO_4 0.25; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25; FeSO_4 0.001; 胆固醇 1; 酵母膏 5; 吐温 1 mL, pH 7.0 121°C , 15 min 灭菌。

斜面接种种子培养基, 32°C 摇床培养 6 h, 然后按 3% 体积比接入发酵培养基, 培养 10 h。

1.3 胆固醇的测定

发酵培养基中胆固醇的测定参照王慧云方法^[7]。根据发酵培养基中胆固醇的减少量来确定降解胆固醇的活力。仪器为上海产 722 分光光度计。

胆固醇降解酶活力的测定: 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°C 水浴中预热 3 min, 加入粗胆固醇降解酶液(即去除菌体的培养基) $50\ \mu\text{L}$, 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 浓硫酸摇匀后静止。用分光光度计测其在 590 nm 的吸光值。

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

2 结果和讨论

2.1 测定培养基中胆固醇浓度的标准曲线

为了方便实验中胆固醇测定的吸光值和胆固醇含量间的换算, 根据在发酵培养基中使用的胆固醇浓度, 用本实验室自己研制的溶解胆固醇的方法, 把 1% 浓度的胆固醇用水稀释为 0.01%, 0.02%, 0.03%, ... 的系列浓度, 绘制成的标准曲线(如图 1)。图中可以看到, 除 0.06% 和 0.1% 的 2 个胆固醇浓度的吸光度值稍有偏离模拟直线外, 其他数据接近模拟直线的期望值, 胆固醇和吸光度值量效关系明显。

2.2 胆固醇降解酶的培养条件试验

2.2.1 培养基初始 pH 对活性的影响 用 HCl 和 NaOH 溶液将发酵培养基调成不同的 pH, 灭菌后接入种子液, 32°C 培养, 测定离心除菌体后的上清液的胆固醇降解酶活力(以下均为去除菌体的上清液)。从结果(图 2)可以看出, 培养基在 $\text{pH} < 5$ 或 $\text{pH} > 9.5$ 时活力极低, $\text{pH} 7.5$ 左右时活力最高, $\text{pH} < 6$ 或 $\text{pH} > 9.5$ 活力下降, 因此培养基初始选择在 7.5 左右。

2.2.2 胆固醇降解酶产生过程 在 pH 7.0 的发酵培养基中, 接入种子液, 不同时间取样测定

胆固醇降解酶活力及菌体生长量(图 3), 结果表明, 菌株在 5 h 进入对数生长期, 8 h 进入稳定期, 9 h 活性达到最高。说明该菌对数生长期中、后期开始表现活性, 进入稳定期后期活性达到最高值。

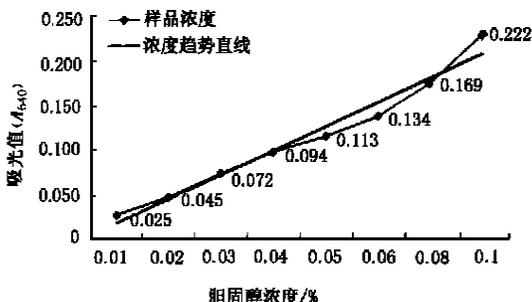


图 1 测定胆固醇浓度的标准曲线

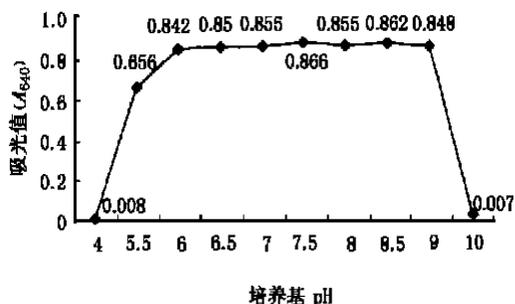


图 2 培养基 pH 值对产胆固醇降解酶的影响

2.2.3 培养温度对产胆固醇降解酶的影响 发酵培养基接种后, 分别在 27, 32, 37 和 42 下振荡培养, 测定其胆固醇降解酶活力及菌生长。结果是 32 胆固醇降解酶活力最高, 菌体生长最好, 低于 32 或超过 37, 胆固醇降解酶活力均会下降(图 4)。

2.2.4 通气量对产胆固醇降解酶活力的影响 于 250 mL 三角瓶中分装入 45, 60, 75, 90 mL 发酵培养基, 接入种子液, 培养后测定胆固醇降解酶活力(图 5)。在 250 mL 三角瓶中装 60 mL 培养基胆固醇降解酶活力较高, 75 mL 和 90 mL 相近, 胆固醇降解酶活力大大下降。说明通气量对 T12-1 的降解胆固醇的活性影响很大。

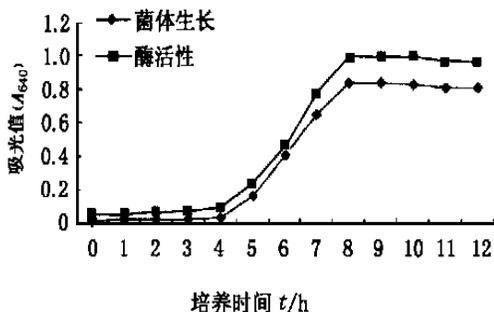


图 3 胆固醇降解酶的产生过程

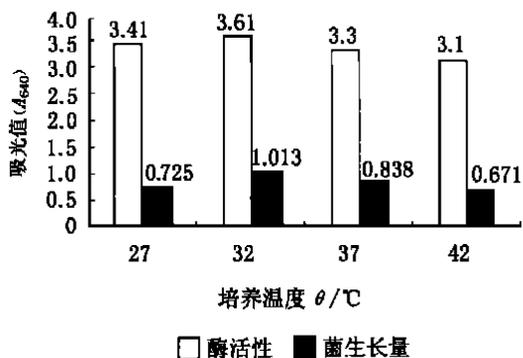


图 4 培养温度对胆固醇降解酶活力的影响

2.2.5 菌龄对胆固醇降解酶的影响 由于该菌生长较快, 因此应试验种子液菌龄对产胆固醇降解酶活力的影响。将培养 4, 5, 6, 7, 8, 9 h 的种子液接入发酵培养基中, 32 培养 10 h, 测定降解胆固醇的活力(图 6), 种子液培养菌龄 6 h 时发酵液活力最高, 超过 7 h 发酵液中的胆固醇降解酶活力略有降低。

2.2.6 发酵培养基成分对产胆固醇降解酶活力的影响 发酵培养基在选择培养基中添加了酵母膏和吐温来缩短发酵周期, 因此对培养基中的酵母膏、吐温、胆固醇这三者的含量作最佳配比研究, 有利于提高发酵培养基的胆固醇降解酶活力, 这 3 个因素所选水平分别为酵母膏

4, 5, 6 g, 胆固醇 1.0, 1.5, 2.0 g, 吐温 0.5, 1.0, 1.5 mL。对这 3 个因素选用一个三因素三水平的正交表(表 2)来进行分析如下。

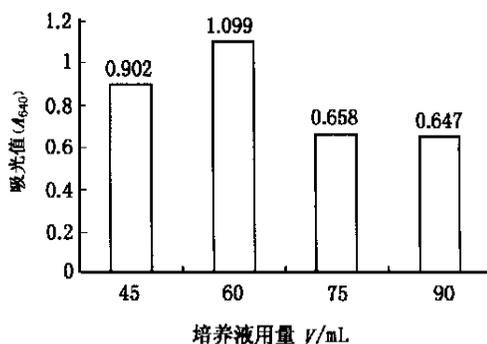


图 5 通气量对胆固醇降解酶活力的影响

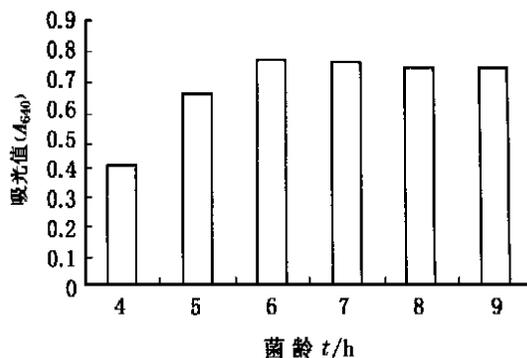


图 6 菌龄对胆固醇降解酶活力的影响

表 2 正交实验设计及结果

试号	水平因素				胆固醇降解酶活力 $\times 10^{-3} \mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
	A (酵母膏)	B (胆固醇)	C (吐温)	D	
1	1	1	1	1	3.26
2	1	2	2	2	2.91
3	1	3	3	3	2.35
4	2	1	2	3	3.61
5	2	2	3	1	2.91
6	2	3	1	2	3.01
7	3	1	3	2	1.09
8	3	2	1	3	1.82
9	3	3	2	1	1.09
K_1	8.52	7.96	8.09	7.26	$T = 22.05$
K_2	9.53	7.64	7.61	7.01	
K_3	4.00	6.45	6.35	7.78	
R	5.53	1.51	1.74	0.77	

从表中各因子的 K 值来看, 因子 A 中以 A_2 的 K 值最高, B 中为 B_1 , C 中为 C_1 , 所得结论是为获得最高的胆固醇降解酶活力, 发酵条件应选酵母膏含量为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、胆固醇 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、吐温 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, 即 $A_2B_1C_1$ 最好。

通过极差 R 值得出 $R_A > R_C > R_B$, 所以酵母膏是影响产胆固醇降解酶活力的主要因子, 吐温影响小些为次要因子, 胆固醇的影响最小。

表 3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F
A	5.78	2	2.89	52.55
B	0.43	2	0.22	3.91
C	0.54	2	0.27	4.91
误差	0.11	2	0.06	
总平方和	6.85	8		

查表得 $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

方差分析(表 3)表明,由 $F_A > F_{0.05}(2, 2)$ 得知 A 差异显著,也即酵母膏的含量对产胆固醇降解酶活力影响大。显著因子 A 选取最高的水平 A_2 ; 因子 B, C 无显著性差异,这与极差分析一致, B, C 可任选。本实验选用了 B_1C_1 。

经过极差分析和方差分析, $A_2B_1C_1$ 应为最佳组合, 试验中无此组合, 经进一步试验, 证实 $A_2B_1C_1$ 并非最佳结合, $A_2B_1C_1$ 组合的胆固醇降解酶活力 $< A_2B_1C_2$ 的胆固醇降解酶活力。即选定 $A_2B_1C_2$, 此胆固醇降解酶活力可达 $3.61 \times 10^{-3} \mu U \cdot mL^{-1}$ 。

4 结论

用邻苯二甲醛快速检验发酵培养基中胆固醇降解酶活力方法是合适的。

菌龄、温度、培养基成分和酸碱度、通气量, 对芽孢杆菌 T12-1 的胆固醇降解酶活力的产生都有一定影响。

选出了培养基的最佳组合是酵母膏 $5 g \cdot L^{-1}$ 、胆固醇 $1 g \cdot L^{-1}$ 、吐温 $80.1 mol \cdot L^{-1}$ 。

参 考 文 献

- 1 Lubert Stryer 著. 唐有祺, 张惠珠, 英相钰, 等译. 生物化学. 北京: 北京大学出版社, 1996, 363
- 2 欧阳红, 杨秀芳. 心脑血管疾病饮食调养. 北京: 金盾出版社, 1996, 41~ 50
- 3 江正强, 沈再春, 阎巧娟, 等. 用胆固醇氧化酶去除猪油中的胆固醇. 中国农业大学学报, 1996, 1(2): 100~ 103
- 4 Turfitt G E. The Microbiological degradation of steroides. Biochem J, 1948, 42: 376~ 383
- 5 Aihara H, Watanabe K, Nakamura R, et al. Degradation of cholesterol in egg yolk by *Rhodococcus equi*. J Food Sci, 1988, 53(23), 659~ 660
- 6 Corbin D R, Greenplate J T, Wong E Y, Purcell J P. Cloning of an insecticidal cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria in plant protoplasts. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(12): 4239~ 4244
- 7 王慧云, 高应. 鸡蛋中胆固醇快速测定方法的研究. 食品科学, 16(6): 58~ 59