

# 高效降解胆固醇乳酸菌的融合子构建及其在食品中应用

王成涛<sup>1\*</sup> 牛天贵<sup>1\*\*</sup> 郭三堆<sup>2</sup>

(1 中国农业大学食品学院, 北京 100094)

(2 中国农科院生物研究所, 北京 100081)

**摘要** 应用原生质体融合技术构建、筛选出 2 株高效降解胆固醇的融合子。比较 2 株融合子 C-T 24-8、S-T 13-37 及 3 株亲本的胆固醇降解能力、凝乳能力、形状大小、抗生素抗性、生理生化等表现特征及 (G+ C)% 含量等遗传特征, 证明它们确实区别于双亲本的乳酸菌融合子。C-T 24-8 和 S-T 13-37 对胆固醇的降解率约为 54% ~ 78%, 可降低食品基质中胆固醇约 23% ~ 45%, 这比亲本乳酸菌 ST 与 C3 有明显提高。

**关键词** 原生质体融合; 融合子; 鉴定; 食品应用

中图分类号 TS201.3; Q548.1

## Studies on Rebuilding Cholesterol-Degrading Fusion Lactic Acid Bacteria and Ability of Cholesterol-Degrading in Food

Wang Chengtao<sup>1</sup> Niu Tiangui<sup>1</sup> Guo Sandui<sup>2</sup>

(1 College of Food Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(2 Institute of Biological Sciences, CAAS, Beijing 100081, China)

**Abstract** Fusion hybrids C-T24-8 and S-T13-37 were reconstructed and screened using the protoplast fusion technique. Comparing the ability of cholesterol-bioconversion and skin milk solidifying, size, physiologic character, biochemical character and (G+ C)% of DNA and so on. It is certified eventually that C-T24-8 and S-T13-37 are fusion hybrids of C3 and T12-1, ST and T12-1. Their rates of cholesterol-degrading are 54% ~ 78%, 23% ~ 45% in medium of PY-Cho and food respectively.

**Key words** protoplast fusion; fusion hybrids; identification; food application

基因重组在工业微生物育种中占有重要地位, 在降解胆固醇微生物的育种方面也有许多有益的探索。Somkuti<sup>[1,2]</sup>将链霉菌(*Streptomyces* spp.)的胆固醇氧化酶基因(ChoA)克隆到嗜热链球菌和干酪乳杆菌, 其中嗜热链球菌转化子 ST128, 经 8 h 培养, 75% 的胆固醇转化为胆甾-4-烯-3-酮(cholest-4-en-3-one)。Rossi<sup>[3]</sup>将来源于 3 种细菌的胆固醇氧化酶基因(ChoB)、脂酶基因和  $\alpha$ -peroxidase 基因克隆到质粒 DNA 上, 重组质粒电转化到 5 种常见双歧杆菌中, 并得以表达。

在当前转基因食品的安全问题引起人们警觉的情况下, 原生质体融合技术由于其遗传基因重组频率高且自发产生、不需知其遗传系统、背景等优点, 也引起很多人的兴趣。台湾

收稿日期: 2001-08-06

国家转基因植物研究与产业化开发专项资助(JA-013)

\* 王成涛, 现工作单位黑龙江八一农垦大学食品学院, 密山 158308

\*\* 牛天贵, 教授, 研究方向为食品营养与生物技术。联系作者。北京圆明园西路 2 号

Liu<sup>[4]</sup>将2株节杆菌(*A. simplex*)进行原生质体融合,融合子的胆固醇氧化酶活性提高了20%~60%。笔者课题组将分离、筛选出的1株高效降解胆固醇的芽孢杆菌与食品发酵常用的嗜热链球菌和嗜酸乳杆菌,利用原生质体融合技术进行远缘杂交,构建出高效降解胆固醇、产乳酸的优势工程菌,并应用于食品发酵,获得较好效果。本研究重点报道了融合子的鉴定方法及融合子在食品中的应用效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 亲本菌株 嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)ST,河北农业大学张柏林惠赠,来源于波兰;嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)C3,轻工业部食品工业发酵研究所提供;芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)T12-1,从采集的样品中分离、筛选获得<sup>[5]</sup>。

1.1.2 培养基 培养基PY及PYG<sup>[6]</sup>;PY-胆固醇(PY-Cho)培养液及选择培养基I和II<sup>[7]</sup>;灭菌脱脂乳。

1.1.3 主要试剂 聚乙二醇PEG 6000;对氟苯丙氨酸(PFA);卡那霉素(Kanamycin);氨苄青霉素(Ampicillin);DNase和蛋清溶菌酶(Sigma公司),均由北京鼎国生物技术公司提供。

### 1.2 方法

1.2.1 原生质体的形成、再生、融合及融合子的检出 原生质体的形成、再生和融合方法参考文献<sup>[8]</sup>进行;通过正交实验设计(L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>))和极差分析,得到T12-1、ST和C3原生质体形成和再生的最佳条件;以35%的PEG为化学促融剂;以卡那霉素、氨苄青霉素为抗生素双重标记物,胆固醇为碳源和能源标记物;以0.5 mol·L<sup>-1</sup>的甘露醇溶液作为融合介质。

经选择培养基夹层培养和连续传代,初筛出稳定遗传的融合子;比较融合子的胆固醇降解能力、发酵葡萄糖产生乳酸能力、凝乳能力等表观特征,进而筛选高效降解胆固醇、产乳酸的融合子。

1.2.2 乳酸的测定 乳酸标准液甲酯化处理后<sup>[6]</sup>,确定气相色谱仪(GC)经程序升温测定乳酸的条件。亲本T12-1、ST、C3和融合子C-T24-8、S-T13-37的PYG培养上清液,经甲酯化处理、离心,取管底氯仿层2 μL注入装有FD1A检测器的气相色谱仪中测定其乳酸含量,并以PY培养上清液作对照。

1.2.3 DNA的提取及(G+C)% DNA的提取采用苯酚氯仿混合提取法<sup>[6]</sup>;DNA的(G+C)%测定,采用熔链温度测定法(T<sub>m</sub>)<sup>[6]</sup>。

1.2.4 食品基质胆固醇降解率的测定 将蛋黄、鸡肝和鲜猪肉绞碎,加适量水经超声波细胞粉碎机600 W振荡乳化20 min,分装于试管灭菌。接种后培养72 h,测定发酵前后胆固醇的含量,计算降解率。胆固醇含量的测定采用邻苯二甲酰比色法<sup>[9]</sup>。

胆固醇降解率=胆固醇降解量/发酵前胆固醇含量×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 原生质体的融合及高效降解胆固醇融合子的筛选

ST和T12-1、C3和T12-1融合后,初筛出稳定遗传的融合子452株,比较融合子的胆固醇降解能力、凝乳能力等表观特征,进而筛选出高效降解胆固醇、产酸的2株融合子C-T24-8和S-T13-37。

## 2.2 高效降解胆固醇融合子 C-T24-8 S-T13-37 的初步鉴定

2.2.1 融合子 C-T24-8 S-T13-37 与 3 株亲本的胆固醇降解能力、凝乳能力和 pH 值变化  
从表 1 的实验结果可以看出,在含胆固醇的 PY 培养液中,融合子 S-T13-37 对胆固醇降解率为 54%;C-T24-8 对胆固醇降解率达 78%,这比亲本 ST、C3 对胆固醇转化能力有明显的提高,且 C-T24-8 S-T13-37、ST 及 C3 都可使灭菌脱脂乳凝固良好,pH 值发生明显变化。

表 1 融合子和亲本降解胆固醇能力与产酸能力

项目	融合子		亲本			CK
	C-T24-8	S-T13-37	C3	ST	T12-1	
胆固醇降解率 (PY-Cho)/%	78	54	13	10	98	0
灭菌脱脂乳	凝乳良好	凝乳良好	凝乳良好	凝乳良好	未凝乳	未凝乳
乳的 pH	4.3	4.8	4.0	4.2	7.2	6.8

2.2.2 产乳酸鉴定 乳酸标准液经甲酯化处理,试验确定气相色谱仪经程序升温测定乳酸的条件是:初始温度 100 , 10 min, 然后以每分钟升高 2 速度升至 120 , 保持 5 min, 气化室温度 260 , 检测器温度 270 , 在此条件下 10.2 s 左右有较高的乳酸峰(图 1)。

按照上述测定乳酸的条件,测定 5 株菌的 PYG 培养上清液的乳酸含量。其结果是 T12-1 培养液未检测到乳酸;C3、ST、C-T24-8 及 S-T13-37 的 PYG 培养液都检测到较高含量的乳酸(图 2)。

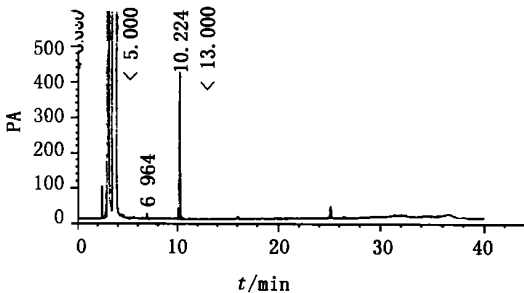


图 1 乳酸标准液气相色谱图

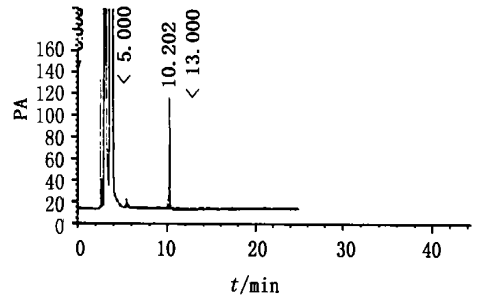


图 2 C-T24-8 的 PYG 培养上清液的气相色谱图

2.2.3 个体形态和菌落特征 从表 2 可见,融合子 C-T24-8 S-T13-37 的形状、大小和菌落等特征均不完全同于亲本 T12-1、ST、C3,革兰氏染色表明均为革兰氏阳性菌。

2.2.4 其他生理、生化特征 通过比较融合子和亲本的部分生理、生化特征(表 3),发现融合子 C-T24-8 S-T13-37 的许多特征都与双亲本不完全相同,而且又主要表现出亲本乳酸菌的部分特征。如 C-T24-8 和 S-T13-37 在利用胆固醇、15 生长等情况均类似于 T12-1;而在发酵海藻糖、鼠李糖、淀粉,及石蕊牛乳、过氧化氢酶活性、pH 4.5 生长情况等生理、生化特征更接近于亲本 C3 和 ST。

表 2 融合子和亲本菌体菌落特征比较

融合子和亲本	菌体形态	菌体大小/ $\mu\text{m}$	菌落特征	直径/mm
C-T24-8	短杆菌	1.8×0.6	乳白色小型菌落	1.5
S-T13-37	稍弯曲短杆菌	2.0×0.8	乳黄色小型菌落	1.5
T12-1	粗短杆菌	3.8×1.2	灰色中型菌落	3~5
ST	椭圆链状排列	1.2×0.7	菌落细小	1
C3	细短杆菌	1.6×0.4	乳黄色圆形小菌落	1

表 3 融合子和亲本的部分生理、生化特征和(G+C)%

测定项目	S-T13-37	C-T24-8	T12-1	ST	C3
胆固醇	+	+	+	-	-
棉籽糖	-	-	+	-	-
海藻糖	+	+	-	+	+
D-木糖	+	-	-	-	-
鼠李糖	+	-	-	+	-
纤维二糖	+	+	+	+	+
甘露醇	-	-	-	-	-
蔗糖	+	+	+	+	+
淀粉	+	-	+	+	-
麦芽糖	+	+	-	+	+
丁二酸钠	+	+	+	+	+
石蕊牛乳	+	+	-	+	+
过氧化氢酶	-	-	+	-	-
45 生长	-	-	-	+	-
15 生长	+	+	+	-	-
pH 4.5 生长	-	+	-	-	+
pH 9.0 生长	-	-	+	-	-
(G+C)%	38.9%	41.6%	45.7%	37.5%	39.3%

注: + 表示呈阳性反应; - 表示呈阴性反应。

**2.2.5 遗传学的研究** 遗传学的研究表明: C-T24-8 和 S-T13-37 确系区别于双亲的融合子, C-T24-8 和 S-T13-37 基因型为原养型加双重抗性( $COX^+$ ,  $Kan^r$ ,  $Amp^r$ ), 这明显区别于亲本 C3( $COX^-$ ,  $Kan^r$ ,  $Amp^s$ )、ST( $COX^-$ ,  $Kan^r$ ,  $Amp^s$ )和 T12-1( $COX^+$ ,  $Kan^s$ ,  $Amp^r$ )。C-T24-8 和 S-T13-37 的 DNA 中(G+C)% 均介于双亲本之间值(表 3)。

### 2.3 融合子 C-T24-8 和 S-T13-37 应用于食品基质的发酵实验

表 4 各菌株的胆固醇降解能力和对食品风味的影响的结果表明, 在降低食品中胆固醇的能力上, 融合子 C-T24-8、S-T13-37 比亲本 C3 与 ST 有明显提高, 发酵出的食品风味与亲本 C3 和 ST 相似, 尤其是 C-T24-8 可降低食品基质中胆固醇约 39%~45%。亲本 T12-1 虽然能大大降低食品中的胆固醇, 但发酵出的食品风味欠佳, 这说明 T12-1 菌体直接应用于食品发酵还有一定的问题, 这也正是进行原生质体融合改良菌种目的之所在。

表4 融合子和亲本降解食品基质中胆固醇的效果

融合子和亲本	蛋 黄 乳		鲜 肉 糜		鸡 肝 糜	
	胆固醇降解率/%	风味	胆固醇降解率/%	风味	胆固醇降解率/%	风味
S-T13-37	31	酸乳风味	28	酸, 无异味	23	酸, 无异味
C-T24-8	45	酸乳风味	42	酸, 无异味	39	酸, 无异味
ST	8	酸乳风味	8	酸, 无异味	5	酸, 无异味
C3	11	酸乳风味	10	酸, 无异味	7	酸, 无异味
T12-1	75	有异味	68	有异味	70	有异味

### 3 讨 论

经选择的合胞体杂种细胞还必须进行杂种的鉴定, 以便验证其真实性, 常用的方法有: 形态特征分析(革兰氏染色反应、菌体或孢子形态、大小的比较等); 染色体核型和DNA含量分析(亲本与杂种染色体组形态、大小长短、数目、带型上的差异, (G+C)%); 同工酶谱分析(包括淀粉酶、过氧化物酶、酯酶、磷酸酯酶、天冬氨酸转氨酶及丙氨酸转氨酶等); 分子杂交分析(DNA探针、Southern杂交); 酶活性的测定。

本试验从C-T24-8和S-T13-37胆固醇降解能力、凝乳能力、菌落特征、形状大小、抗生素抗性、生理生化等表现特征, 及(G+C)%含量等遗传特征均不完全同于亲本, 说明C-T24-8和S-T13-37确系区别于双亲的融合子。但由于目前还未知T12-1的胆固醇氧化酶基因结构, 对融合子未能作分子生物学深入研究。

C-T24-8和S-T13-37比亲本ST和C3具有更高的胆固醇降解能力, 可降低食品基质中胆固醇约23%~45%; 并可发酵葡萄糖产生乳酸; 使灭菌脱脂乳凝固, 发酵出的食品风味与亲本ST和C3相似。这些都说明利用原生质体融合技术来选育发酵食品工业生产菌是完全可行的, 为远缘工业微生物育种展示了前景。但试验获得的融合子在食品安全性、发酵条件及产物分析等方面还有待于深入研究。

### 参 考 文 献

- Somkuti G A, Solaiman D K Y, Steinberg D H. Expression of *S treptomyces* spp. cholesterol oxidase in *L actobacillus casei*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 37 (3): 330~ 334
- Somkuti G A, Solaiman D K Y. STP2201, a chromosomal promoter sequence of *S treptococcus thermophilus*. Current Microbiology, 1997, 35(3): 180~ 185
- Rossi M, Brigidi P. Improved cloning vectors for *B if idobacterium* spp. Letters in Applied Microbiology, 1998, 26(2): 101~ 104
- Liu W H, Chow L W, Lo C K. Strain improvement of *A rthrobacter simplex* by protoplast fusion. Journal of Industrial Microbiology, 1996, 16(4): 257~ 260
- 牛天贵. 降解食品中胆固醇的芽孢杆菌T12-1的筛选与应用研究, 中国农业大学学报, 2001, 6(1): 74~ 83
- 凌代文主编. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 85~ 126
- 王成涛. 原生质体融合技术构建降解胆固醇的乳酸菌. [学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2001
- 张克旭, 陈宁, 张永志, 等. 用原生质体融合技术选育谷氨酸高产菌. 微生物学报, 1991, 31(2): 108~ 114
- 王惠芸, 高应. 鸡蛋中胆固醇快速测定方法的研究. 食品科学, 1995, 16(6): 58~ 59