

降胆固醇霉菌 TS406 的鉴定与发酵条件的研究*

王素英, 马熟军, 高朋辉

(天津商学院生物工程系, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津, 300134)

摘要 以形态特征为依据, 对具有降解胆固醇能力的霉菌 TS406 菌株进行鉴定, 在此基础上, 通过单因素实验, 以胆固醇氧化酶活性和胆固醇降解率为指标, 确定该菌株发酵培养的最适碳、氮源及其比例, 并对发酵条件进行初步研究。结果表明, 霉菌 TS406 属于青霉属真菌, 其发酵培养的最适碳、氮源分别是淀粉和酵母粉, 两者在培养基中的最适浓度均为 1.5 g/L。发酵培养的最佳条件是: 培养液的初始 pH 为 6.5, 培养温度为 28℃, 接种量为 3%, 装液量为 30 mL/250 L, 胆固醇氧化酶的活性可以达到 1 420 U/L, 发酵培养 2d 后胆固醇的降解率为 91.2%。

关键词 霉菌 TS406, 鉴定, 胆固醇氧化酶, 胆固醇降解率, 发酵条件

胆固醇是机体内重要的固醇类物质, 它既是所有动物细胞膜的重要组成成分, 又是体内一些重要激素、 V_D_3 及胆汁酸的合成原料和前体物质, 并在人体钙磷代谢的调节、维持神经系统的正常机能等方面发挥重要作用^[1,2]。但当血液中胆固醇的含量过高, 超过人体对胆固醇的代谢调节能力时, 则易引起心血管疾病^[3]。

为了消除食物中过多的胆固醇对人体的危害, 人们采用理化方法去除食品原料中的胆固醇以及用微生物转化法降低食品中的胆固醇。有关研究报道, 但因均存在一定缺点而无法工业化应用。因此利用微生物或其产生的酶降低食品中胆固醇含量因具有反应特异性强, 不干扰人体代谢, 不影响食品风味, 副作用小等优点而备受关注^[4]。但由于微生物产酶活力低、酶活性不稳定等原因而无法工业化应用, 因此长期以来许多研究者致力于寻找新的微生物资源。2001 年, 王翠英等首次报道了在以胆固醇为唯一碳源和能源的培养基中生长的霉菌^[5]。文章在此基础上, 对降解胆固醇能力最强的霉菌 TS406 进行了鉴定, 并探讨了该菌株的发酵培养条件。

1 材料和方法

1.1 菌种

霉菌 TS406, 本实验室从土壤中筛选保藏。

1.2 发酵和种子培养基(g/L)

NH_4NO_3 1.0 g; KH_2PO_4 0.25; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005; $NaCl$ 0.005; 胆固

醇 1.0g; pH7.0, 121℃灭菌 15 min。

1.3 霉菌 TS406 的鉴定

采用点种的方法将霉菌 TS406 接种于 PDA 平板, 以观察其菌落形态; 采用小室培养的方法观察其个体形态, 按照《真菌鉴定手册》^[6] 和《真菌分类》^[7] 进行鉴定。

1.4 胆固醇含量的测定

发酵培养基中胆固醇含量的测定采用邻苯二甲酰比色法^[8]。根据发酵培养基中胆固醇的减少量来确定胆固醇降解率。

1.5 胆固醇氧化酶活力的测定

按照参考文献^[9]进行。

2 结果和讨论

2.1 霉菌 TS406 的鉴定

接种于 PDA 培养基平板上的霉菌 TS406, 在 28℃ 条件下培养, 初期菌丝呈白色, 生长 6 d 后形成大小不再变化的绒毡状菌落, 菌落正面因丰富的分生孢子而呈绿色, 菌落反面因产生脂溶性的色素而呈黄色。菌丝具有横隔膜, 成串分生孢子着生在瓶形小梗顶端, 梗基簇状存在并有分枝, 整个无性繁殖结构形成了典型的“帚状枝”(图 1), 对照《真菌鉴定手册》和《真菌的形态和分类》的描述, 认为霉菌 TS406 为半知菌类(Fungi Imperfect), 从梗孢目(Moniliales), 从梗孢科(Moniliaceae), 曲霉族(Aspergilleae), 青霉属(Penicillium LK. ex Fries)。

2.2 霉菌 TS406 的发酵培养

2.2.1 不同碳、氮源对菌种降解胆固醇的影响

以发酵培养基为基础, 分别添加 0.1% 的葡萄糖、蔗糖、淀粉等 7 种含碳化合物作为补充碳源, 或分

第一作者: 博士, 教授。

* 天津市自然科学基金项目(05YFJMJC06100)

收稿日期: 2006-07-06

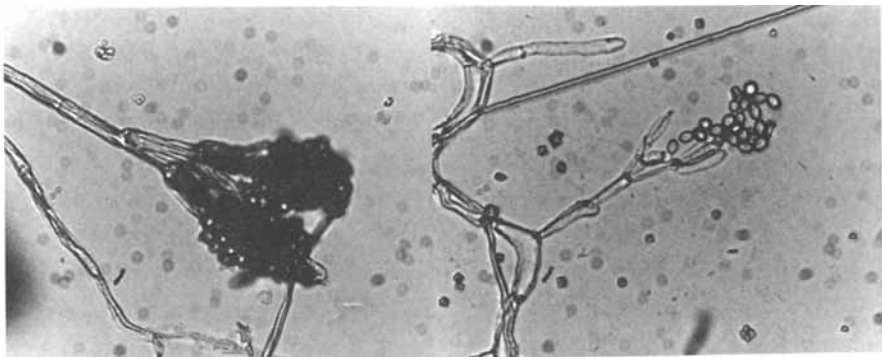


图 1 高倍镜下霉菌 TS406 的无性繁殖结构

别以 0.1% 的干酪素、酵母粉、蛋白胨等 7 种不同含氮化合物替代硝酸铵作为唯一氮源,发酵 2 d 后测定胆固醇降解率及胆固醇氧化酶活力,结果见表 1。

表 1 不同碳、氮源对霉菌 TS406 降胆固醇能力的影响					
碳源/ g · L ⁻¹	胆固醇降解 率/%	胆固醇氧化酶 活力/U · L ⁻¹	氮源/ g · L ⁻¹	胆固醇降 解率/%	胆固醇氧化酶 活力/U · L ⁻¹
对照	60.8	687	对照	70.3	795
葡萄糖	72.8	842	干酪素	67.2	760
糊精	50.2	560	酵母粉	79	1 090
淀粉	80.6	1 110	蛋白胨	75.2	1 000
麦芽糖	64.3	720	(NH ₄) ₂ SO ₄	62	680
乳糖	69	780	NH ₄ Cl	63.2	700
蔗糖	73.3	920	KNO ₃	69.7	780
甘油	63	642	NaNO ₃	67.2	750

从表 1 可以看出,霉菌 TS406 的胆固醇氧化酶活性与胆固醇降解率的变化趋势一致,发酵培养基中以淀粉为补充碳源时,胆固醇氧化酶活力最高,达到 1 110 U/L,发酵 2 d 后,培养液中 80.6% 的胆固醇被转化降解;而在唯一氮源实验中发现,酵母粉是霉菌 TS406 降解胆固醇的最佳氮源,此时胆固醇氧化酶的发酵水平为 1 110 U/L,发酵 2 d 后,培养液中 79% 的胆固醇被转化降解。与对照相比,在培养基中补充添加单糖、双糖和淀粉等碳源有利于该菌产生氧化胆固醇的酶系,有利于培养基中胆固醇的降解。其原因可能是胆固醇属于微生物难降解的多环化合物,添加易利用的含碳化合物,促进了微生物的初始生长,有利于胆固醇氧化酶的诱导产生。另外从表 1 中还可以看出,与无机氮源相比,有机氮源因含有生长因子或可直接利用的氨基酸组分,有利于霉菌 TS406 的生长,从而提高了胆固醇氧化酶的活性,促进了发酵液中胆固醇的降解。

2.2.2 不同碳、氮源比例对菌种降胆固醇的影响

根据单因素实验结果,选取淀粉作为碳源,酵母

粉作为氮源,探讨碳氮源不同比例对菌种降胆固醇的影响,结果见表 2。

表 2 不同碳、氮源比例对霉菌 TS406 降胆固醇的影响			
碳源/g · L ⁻¹	氮源/g · L ⁻¹	胆固醇降解 率/%	胆固醇氧化酶 活力/U · L ⁻¹
0.50	0.50	64.5	720
	0.75	74.1	960
	1.00	75.3	1 010
	1.50	76.1	1 070
	1.75	74.4	976
0.75	0.50	65.5	730
	0.75	74.4	960
	1.00	75.8	1 000
	1.50	76.5	1 070
	1.75	76.2	1 030
1.00	0.50	71.3	890
	0.75	75.6	1 010
	1.00	76.8	1 070
	1.50	82.3	1 120
	1.75	78.1	1 090
1.50	0.50	75.2	1 000
	0.75	77.8	1 130
	1.00	84.2	1 290
	1.50	88.2	1 400
	1.75	85.7	1 310
2.00	0.50	58.8	600
	0.75	64.4	700
	1.00	67.3	750
	1.50	74.1	960
	1.75	68.7	810

从表 2 可以看出,培养基中的 C/N 不同,胆固醇氧化酶活性不同,当 C/N=1,淀粉和酵母粉含量均为 1.50 g/L 时,霉菌 TS406 的胆固醇氧化酶活力最高,达到 1 400 U/L,与基础培养基酶活 687 U/L 相比,提高了 104%,胆固醇降解率提高了 17.4%。

2.2.3 不同初始 pH、接种量、培养温度和通气量对菌种降胆固醇的影响

探讨在含有 1.5 g/L 淀粉和酵母粉的发酵培养

基中,培养基初始 pH、接种量、培养温度和通气量对霉菌 TS406 的胆固醇氧化酶活性和胆固醇降解率的影响,结果见表 3。

表 3 不同初始 pH、接种量、培养温度和通气量对霉菌 TS406 降胆固醇的影响

pH 值	5.5	6.5	7.0	7.5	8.5
胆固醇降解率/%	77.2	88.2	76.8	66	48.4
胆固醇氧化酶活力/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	1 090	1 430	1 090	740	490
接种量/%	1	3	5	8	10
胆固醇降解率/%	77.5	87.2	85.1	77.1	75.5
胆固醇氧化酶活力/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	1 120	1 370	1 300	1 110	1 050
培养温度/ $^{\circ}\text{C}$	20	25	28	32	37
胆固醇降解率/%	74.1	82.7	87.5	66.9	45.3
胆固醇氧化酶活力/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	960	1 230	1 390	740	470
通气量 mL/250 mL	20	30	50	65	85
胆固醇降解率/%	76.6	88.2	75.1	71	63.5
胆固醇氧化酶活力/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	1 060	1 400	990	870	700

从表 3 可以看出,接种量和通气量对胆固醇氧化酶活性和胆固醇降解率影响较小,而碱性条件(pH7.5~8.5)和 $\geq 32^{\circ}\text{C}$ 的温度使胆固醇氧化酶活性迅速降低,胆固醇降解率也大幅度下降。胆固醇氧化酶活性最强和胆固醇降解率最高的发酵条件是:培养基的初始 pH 为 6.5、培养温度为 28°C 、3%接种量和 30 mL/250 mL 的装液量。

按照表 3 单因素实验结果,在 28°C 、220r/min 条件下摇床培养霉菌 TS406 菌株 2 d 后进行测定,胆固醇氧化酶活力达到 1 420 U/L,培养基中胆固醇的降解率达到 91.2%。

3 结 论

(1)根据菌落形态和无性繁殖结构,将降胆固醇

霉菌 TS406 菌株鉴定为青霉属真菌。

(2)通过单因素实验,确定霉菌 TS406 降解胆固醇的发酵培养基中的最适补充碳源是淀粉,最适氮源是酵母粉,两者在培养基中的最佳比例是 1:1,含量均是 1.5 g/L。

(3)对霉菌 TS406 产胆固醇氧化酶和降解胆固醇的发酵条件进行的研究表明,培养基初始 pH 为 6.5、培养温度为 28°C 、3%接种量和 30 mL/250 mL 的装液量时,可以获得最高酶活力 1 420 U/L,发酵培养 2d 后胆固醇的降解率达到 91.2%。

参 考 文 献

- 1 于宗洋,崔洪斌. 中国保健食品进展[M]. 北京:人民卫生出版社,2001. 135~167
- 2 任邦哲. 生物化学与临床医学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1992. 202~206
- 3 欧阳红,杨秀芳. 心脑血管疾病饮食调养[M]. 北京:金盾出版社,1996. 41~50
- 4 Best D. New technology for cholesterol reduction[J]. J of Food Processing, 1989,50(12): 156~160
- 5 王翠英,王素英,张德超. 降胆固醇微生物筛选的初步研究[J]. 华中师范大学学报,2003(专辑),112~115
- 6 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979. 367~394
- 7 戴芳澜. 真菌的形态和分类[M]. 北京:科学出版社,1987. 217~283
- 8 王惠云,高应. 鸡蛋中胆固醇快速测定方法的研究[J]. 食品科学,1995,16(6):58~59
- 9 牛天贵,吕莹. 降解胆固醇的芽孢菌株 T-12 的培养条件研究[J]. 中国农业大学学报,2001,6(1):71~78

Identification and Studies on Fermented Conditions of Mold TS406 Degrading Cholesterol

Wang Suying, Ma Shujun, Gao Penghui

(Department of Biotechnology and the Tianjin Municipal Key Laboratory of Food Biotechnology, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

ABSTRACT Mold TS406 was identified based on the morphological characteristics, the activity of cholesterol oxidase and degrading rate of cholesterol in liquid medium. The suitable carbon source, nitrogen source, the ratio of carbon to nitrogen and the fermented conditions were determined by the experiments of single factor. The results showed that the mold TS406 belonged to genus *Penicillium*. The fermented conditions which are good for the activity of cholesterol oxidase and degrading rate of cholesterol were initial pH6.5 of medium, 28°C culturing temperature, 3% inoculating volum and 30mL liquid medium in 250mL flask. The highest enzyme activity is 1 420U/L, and the degrading rate of cholesterol in medium is 91.2% after 2d shaking fermentation, when the medium contain 1.5g/L starch and yeast extract respectively.

Key words mold TS406, identification, cholesterol oxidase, degrading rate of cholesterol, fermented condition