

胆固醇诱导甾短杆菌发酵产胆固醇氧化酶能力的研究

傅 裕, 丁晓雯*, 蒋丽施, 李 凯, 罗金凤, 任美燕
(西南大学食品科学学院, 重庆市农产品加工技术重点实验室, 重庆 400716)

摘 要: 利用胆固醇诱导甾短杆菌发酵来提高胆固醇氧化酶产量; 通过对单因素的研究, 选取影响比较显著的3个因素: 胆固醇质量浓度、吐温-80添加量、超声波功率, 并利用Box-Behnken试验设计和响应曲面分析法进一步研究得到结果: 甾短杆菌产酶的最佳条件是当超声时间为20min时, 胆固醇质量浓度为3.30g/L、吐温-80添加量为3.72mL/L、超声波功率为80W, 在此条件下测得的胆固醇氧化酶产量为731.967U/L。比未使用胆固醇诱导产酶时, 酶产量提高了1.17倍。

关键词: 胆固醇氧化酶; 胆固醇; 吐温-80; 超声波功率

Optimization of Cholesterol-Induced Cholesterol Oxidase Production by *Brevibacterium* sp.

FU Yu, DING Xiao-wen*, JIANG Li-shi, LI Kai, LUO Jin-feng, REN Mei-yan
(Chongqing Key Laboratory of Agricultural Products Processing, College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract : In this study, *Brevibacterium* sp. was cultured in a fermentation medium supplemented with cholesterol to enhance the production of cholesterol oxidase. Through one-factor-at-a-time analysis, three experimental conditions including cholesterol and Tween-80 concentration in the fermentation medium and ultrasonic power (for promoting the release of intracellular cholesterol oxidase) were found to significantly influence the activity of crude cholesterol oxidase solution. The optimal cholesterol and Tween-80 concentration as well as ultrasonic power and treatment time were 3.30 g/L, 3.72 mL/L, 80 W and 20 min, respectively, as optimized using Box-Behnken experimental design and response surface methodology. The resulting cholesterol oxidase activity was 731.967 U/L, which was increased by 1.17-fold when compared with that obtained in the absence of cholesterol.

Key words : cholesterol oxidase; cholesterol; Tween-80; ultrasonic power

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0253-05

胆固醇氧化酶(cholesterol oxidase, COD)是一种能由产酶微生物产生, 并分泌到胞外, 或仍留在胞内, 或结合在细胞上的可氧化并降解胆固醇的微生物酶。它可以快速检测血清中胆固醇的含量^[1], 用来诊断动脉硬化和其他脂质紊乱疾病; 也可以用于心血管疾病的治疗^[2-3]; 它还能有效抑制鳞翅目昆虫的生长繁殖, 可作为生物杀虫剂^[4-5]; 另外, 胆固醇被胆固醇氧化酶氧化生成的胆甾-4-烯-3-酮在治疗肥胖^[6]和肝病^[7]等方面也具有广阔的应用前景。

胆固醇氧化酶的来源广泛, 现已发现许多微生物能够合成此酶, 如链霉菌属(*Streptomyces violascens*)、假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)、短杆菌属(*Brevibacterium* sp.)等。尤其是短杆菌属的微生物产生胆固醇氧化酶的 K_m 值低, 胞外分泌, 杂蛋白含量很低, 加之这种胆固醇氧化酶氧化胆固

醇的氧化产物仅为胆甾-4-烯-3-酮, 不再产生其他胆甾类副产物^[8], 所以目前利用短杆菌属的微生物产胆固醇氧化酶已成为研究热点, 日本已将其成功应用到工业化中^[9]。

本实验采用甾短杆菌(*Brevibacterium* sp.)发酵生产胆固醇氧化酶, 通过控制诱导底物胆固醇的质量浓度、乳化剂吐温-80添加量、超声波功率和超声时间来研究其产酶能力, 并利用响应曲面法分析, 以期得到更高的胆固醇氧化酶产量, 更稳定的产酶性能, 从而降低胆固醇氧化酶的生产成本。

1 材料与方法

1.1 菌种

甾短杆菌(*Brevibacterium* sp.)CICC 10192购于中国工业菌种保藏中心。

收稿日期: 2011-09-25

作者简介: 傅裕(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: fuyu0205@163.com

*通信作者: 丁晓雯(1963—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: xiaowend@sina.com

1.2 试剂与仪器

辣根过氧化物酶 美国Sigma公司；4-氨基-安替比林、30% H₂O₂、异丙醇、胆固醇、Triton X-100、吐温-80 成都市科龙化工试剂厂。

S22分光光度计 上海棱光技术有限公司；B-260 恒温水浴锅 上海亚荣生化仪器厂；KQ5200DB数控超声波清洗仪 昆山市超声仪器有限公司；PHS-3C型酸度计 成都方舟科技开发公司；TOMY SS-325高压灭菌锅 日本Tomy Kogyo公司；GL-20G-II型高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.3 培养基及培养条件

培养基：斜面培养基、种子培养基和发酵培养基的配制参考许晓燕等^[10]的方法。

培养条件：在斜面上30℃培养48h，接入种子培养基(100mL/250mL)于30℃、200r/min旋转摇床培养24h，再按10%的接种量接入装有50mL发酵培养基的250mL三角瓶中，于30℃、200r/min旋转摇床培养24h。

1.4 方法

1.4.1 胆固醇氧化酶酶活测定

参考季文明等^[11]的方法测定。胆固醇氧化酶酶活的定义为：在37℃、pH7.0，1min内催化1μmol胆固醇氧化为胆甾-4-烯-3-酮所需的酶即1min内转化胆固醇生成1μmol H₂O₂的酶量。酶活力按下式计算。

$$\text{胆固醇氧化酶酶活}/(\text{U/L}) = \frac{0.1587 \times A \times 1000 \times V \times K}{t} \times 1000$$

式中：A为反应液吸光度；V为反应液体积/mL；K为酶液稀释倍数/mL⁻¹；t为反应时间/min。

1.4.2 粗酶液的提取^[12]

发酵液在4℃以12000r/min离心5min，上清液即为无细胞的粗酶液。

1.4.3 影响甾短杆菌产酶能力的单因素试验

1.4.3.1 胆固醇质量浓度对甾短杆菌产酶能力的影响

在发酵培养基中乳化剂吐温-80添加量为4mL/L、超声波功率为60W、超声时间为15min的条件下，设胆固醇的质量浓度分别为1、2、3、4、5g/L。培养条件同1.3节，发酵液在4℃以12000r/min离心5min，上清液即为无细胞的粗酶液。测胆固醇氧化酶酶活力，选择适宜的胆固醇质量浓度。

1.4.3.2 乳化剂吐温-80添加量对甾短杆菌产酶能力的影响

在发酵培养基中胆固醇质量浓度为3g/L、超声波功率为60W、超声波作用时间15min的条件下，设吐温-80添加量分别为1、2、3、4、5mL/L，培养条件同1.3节，发酵液在4℃以12000r/min离心5min，上清液即为无细胞的粗酶液。测胆固醇氧化酶酶活力，选择适宜的吐温-80添加量。

1.4.3.3 超声时间对甾短杆菌产酶能力的影响

在发酵培养基中胆固醇质量浓度为3g/L、吐温-80添加量为4mL/L、超声波作用功率60W的条件下，设超声时间分别为5、10、15、20、25、30min。培养条件同1.3节，发酵液在4℃以12000r/min离心5min，上清液即为无细胞的粗酶液。测胆固醇氧化酶酶活力，选择适宜的超声时间。

1.4.3.4 超声波功率大小对甾短杆菌产酶能力的影响

在发酵培养基中胆固醇质量浓度为3g/L、吐温-80添加量为4mL/L、超声波作用时间为20min的条件下，设超声波功率分别采用20、40、60、80、100W。培养条件同1.3节，发酵液在4℃以12000r/min离心5min，上清液即为无细胞的粗酶液。测胆固醇氧化酶酶活力，选择适宜的超声波功率。

1.4.4 响应曲面法优化甾短杆菌产酶能力

根据单因素试验的结果，运用Box-Behnken试验设计原理^[13]，进行响应曲面优化试验。实验数据均是经过3次平行实验得到的平均值，并计算标准差，利用Design Expert分析响应面数据。

2 结果与分析

2.1 影响甾短杆菌产酶能力的单因素研究

胆固醇是诱导甾短杆菌产胆固醇氧化酶的关键之一，其有效质量浓度和在培养基中的分散性，与胆固醇氧化酶的产量成正相关^[13]。但胆固醇是一种不溶于水而溶于有机溶剂的酯类物质，因此需要利用乳化剂吐温-80乳化胆固醇，使胆固醇在培养基中能有效的分散，从而诱导甾短杆菌产酶。有研究表明，通过一定条件的超声波辅助处理能促进胆固醇在培养基中的较大分散^[14]。为提高胆固醇氧化酶的产量，本实验选取了胆固醇质量浓度、吐温-80添加量、超声时间、超声波功率这4个因素来研究甾短杆菌产酶的适宜条件。

2.1.1 胆固醇质量浓度对甾短杆菌产酶能力的影响

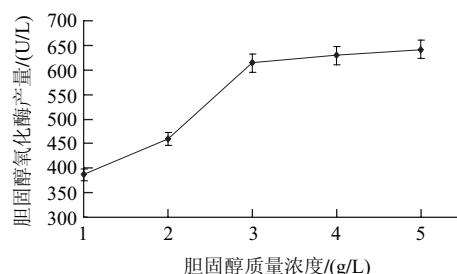


图1 胆固醇质量浓度对甾短杆菌产酶能力的影响

Fig.1 Effect of cholesterol concentration on the activity of crude cholesterol oxidase solution

由图1可知，胆固醇氧化酶产量随着胆固醇质量浓度的增大而增加，当胆固醇质量浓度达到3g/L后，继续

增加培养基中胆固醇的质量浓度,胆固醇氧化酶产量略有增加,但不明显,故出于经济成本考虑,选择胆固醇质量浓度为3g/L。在培养基中,胆固醇只有以微小粒子分散于培养基形成乳状液体,才能提高菌体对其的利用率,从而提高产酶能力^[14-15]。当胆固醇质量浓度过低,甾短杆菌利用不足,酶产量不高;当胆固醇质量浓度过高,胆固醇会析出,引起培养基中不溶性固形物增多,可能影响到培养基的传质、溶氧,造成胆固醇氧化酶产量下降。

2.1.2 吐温-80添加量对甾短杆菌产酶能力的影响

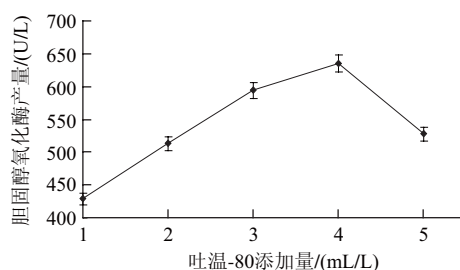


图2 吐温-80添加量对甾短杆菌产酶能力的影响

Fig.2 Effect of Tween-80 concentration on the activity of crude cholesterol oxidase solution

由图2可知,当吐温-80添加量在1~4mL/L时,胆固醇氧化酶产量与随着吐温-80添加量成正相关;当吐温-80达到4mL/L以后,胆固醇氧化酶产量反而下降。故选择吐温-80添加量为4mL/L。吐温-80可以有效地促进胆固醇的溶解,使菌体能够很好地利用胆固醇,从而促进胆固醇氧化酶的产生;当培养基中吐温-80添加量不足,不能促进胆固醇有效的分散,那么菌体能利用的胆固醇反而下降,使胆固醇氧化酶产量不高;当吐温-80添加过量,就会对菌体生长有抑制作用,从而胆固醇氧化酶产量下降。

2.1.3 超声时间对甾短杆菌产酶能力的影响

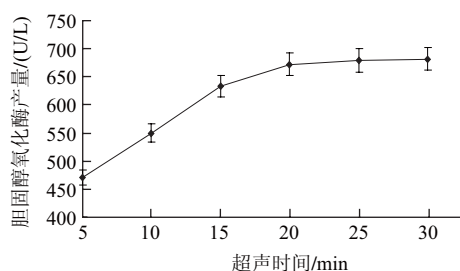


图3 超声时间对甾短杆菌产酶能力的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic treatment time on the activity of crude cholesterol oxidase solution

由图3可知,当超声时间在5~20min时,胆固醇氧化酶产量随着超声时间的延长而增大,当超声时间在20~30min时,酶产量基本维持稳定。故选择超声时间为20min。超声时间的延长可以促进胆固醇在培养基中的分

散,提高菌体对胆固醇的利用率,从而使胆固醇氧化酶产量升高。但超声时间过长对提高酶产量效果不明显,而且会引起胆固醇结构的变化。

2.1.4 超声波功率对甾短杆菌产酶能力的影响

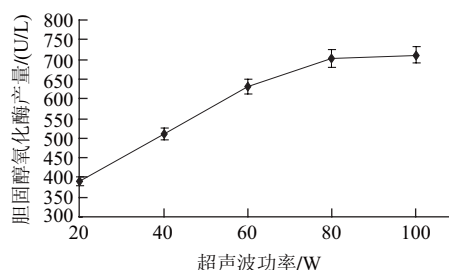


图4 超声波功率对甾短杆菌产酶能力的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic power on the activity of crude cholesterol oxidase solution

由图4可知,超声波功率的大小对酶产量的影响是显著的,胆固醇氧化酶产量随着超声波功率的增大而增加,当功率达到80W时,继续增大超声波功率,胆固醇氧化酶产量变化不明显。故选择超声波功率为80W。在发酵过程中,以胆固醇作为诱导底物的培养基,通过超声波处理发酵液,可以使胆固醇均匀分散,形成均匀稳定体系,从而提高甾短杆菌对诱导底物胆固醇的利用率,使胆固醇氧化酶产量增加。

2.2 响应曲面法分析

2.2.1 响应曲面优化试验结果

根据单因素研究结果,选择对产胆固醇氧化酶能力有显著影响的3个因素(胆固醇质量浓度、吐温-80添加量、超声波功率)作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 进行三因素三水平的响应曲面优化试验,以胆固醇氧化酶产量作为响应变量 Y 。因素与水平设计见表1。

表1 响应曲面优化试验因素与水平
Table 1 Factors and levels tested in response surface analysis

因素	编码水平		
	-1	0	+1
X_1 胆固醇质量浓度/(g/L)	2	3	4
X_2 吐温-80添加量/(mL/L)	3	4	5
X_3 超声波功率/W	70	80	90

2.2.2 回归模型的建立和方差分析

采用Box-Behnken设计,利用Design Expert 7.0软件对17组试验结果,进行响应曲面分析,见表2。得出回归模型参数的方差分析,结果见表3。

由方差分析可知,模型的 $P < 0.05$,表示模型显著。失拟项 $P = 0.2221 > 0.05$,表示差异不显著,说明模型选择合适。相关系数 $R^2 = 0.9992$,说明模型拟合程度良好,实验误差小,该模型能够反映响应值的变化,本实验的变异系数为0.67%,说明模型方程能够很好的反映真实的实验

值。所以，可以用该模型来分析响应值的变化。同时，由表3可知，经回归拟合后，选择对响应值胆固醇氧化酶产量(Y)影响显著的各项，胆固醇质量浓度、吐温-80添加量、超声波功率对响应值的影响可用回归方程表示：

$$Y=721.67+74.41X_1-28.92X_2+18.10X_3+28.03X_1X_2-10.88X_1X_3-2.98X_2X_3-100.65X_1^2-63.96X_2^2-68.08X_3^2$$

表 2 响应曲面分析方案及试验结果

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	胆固醇氧化酶产量/(U/L)
1	0	-1	-1	599.21
2	0	0	0	718.34
3	0	0	0	721.13
4	-1	-1	0	541.56
5	1	0	1	638.27
6	0	-1	1	635.98
7	0	0	0	726.43
8	-1	0	1	509.21
9	1	1	0	628.63
10	-1	1	0	425.74
11	0	1	1	574.08
12	0	0	0	723.33
13	0	1	-1	549.25
14	0	0	0	719.14
15	1	0	-1	445.85
16	1	0	-1	618.42
17	1	-1	0	632.31

表 3 响应模型方差分析

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1.454×10 ⁵	9	16158.72	968.05	<0.0001	**
X ₁	44293.30	1	44293.30	2653.55	0.0001	**
X ₂	6690.93	1	6690.93	400.84	<0.0001	**
X ₃	2621.24	1	2621.24	157.03	<0.0001	**
X ₁ X ₂	3143.84	1	3143.84	188.34	<0.0001	**
X ₁ X ₃	473.28	1	473.28	28.35	0.0011	**
X ₂ X ₃	35.64	1	35.64	2.14	0.1873	
X ₁ ²	42657.17	1	42657.17	2555.53	<0.0001	**
X ₂ ²	17225.17	1	17225.17	1031.93	<0.0001	**
X ₃ ²	19517.17	1	19517.17	1169.25	<0.0001	**
失拟项	73.65	3	24.55	2.27	0.2221	
误差	43.19	4	10.80			
总和	1.455×10 ⁵	16				

注：* 在 P < 0.05 水平上显著；** 在 P < 0.01 水平上极显著。

2.2.3 响应曲面分析

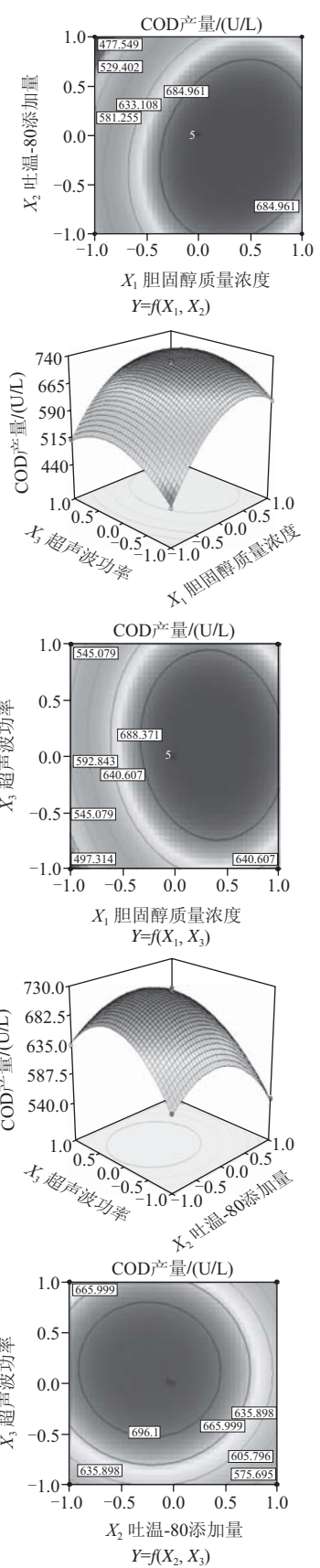
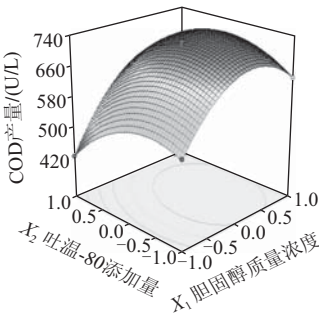


图 5 各因素交互作用对胆固醇氧化酶产量影响的等高线和响应曲面
Fig.5 3-D response surface plots showing the interactive effects of three variables on the activity of crude cholesterol oxidase solution

为了进一步研究相关变量之间的交互作用以及确定胆固醇氧化酶产量的最佳条件,可以通过Design Expert 7.0软件绘制等高线图和响应曲面图来进行直观的分析^[16]。如图5~7的等高线和响应曲面表示胆固醇质量浓度、吐温-80添加量、超声波功率中任意一个变量取零水平时,其余两个变量对胆固醇氧化酶产量的交互作用影响情况。

图5中等高线成椭圆形,表明胆固醇质量浓度和吐温-80添加量交互作用十分显著。图6等高线也成椭圆形,表明胆固醇质量浓度和超声波功率的交互作用十分显著。图7等高线偏圆形,表明吐温-80添加量和超声波功率交互作用不明显。

通过Design Expert 7.0软件分析可以得到,甾短杆菌产胆固醇氧化酶产率最佳的条件为:胆固醇质量浓度3.30g/L、吐温-80添加量3.72mL/L、超声波功率80.14W,胆固醇氧化酶产量预测值为735.906U/L。考虑到实际操作情况,将超声波功率修正为80W,按此优化条件做3个平行实验,以此来验证预测值,3次平行实验测定值分别为744.832、720.4557、730.6125U/L,平均值为731.967U/L,与预测值非常接近,表明了响应曲面分析方法可靠,有实用价值。

未用胆固醇作为底物诱导甾短杆菌产酶时,3次平行实验胆固醇氧化酶产量测定值分别为352.1024、335.1744、325.6947U/L,平均值为337.6572U/L,与此相比,酶产量提高了1.17倍。

3 结 论

本实验利用胆固醇诱导甾短杆菌发酵产胆固醇氧化酶,相比未使用胆固醇诱导时,酶产量明显提高,同时运用Box-Behnken试验设计方法和响应曲面法分析得到产酶的最佳条件:胆固醇质量浓度3.30g/L、吐温-80添加量3.72mL/L、超声波功率80W、超声时间20min,此时胆固醇氧化酶的产量为731.967U/L。

参考文献:

- [1] LEBOVICS V K, MAGDOLNA A, ODON G. Enzymatic determination of cholesterol oxidase[J]. J Sci Food Agric, 1996, 71: 21-26.
- [2] MACLACHLAN J, WOTHERS P, OON A T L, et al. Cholesterol oxidase: source, physical properties and analytical applications[J]. Steroid Biochem Molecular Biology, 2007, 72: 169-195.
- [3] VOLKER F W, ALBERT A D, HERMANN S, et al. Quantitative determination of metabolic fluxes during co-utilization of two carbon sources: comparative analysis with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and glucose[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 38(16): 3088-3096.
- [4] CORBIN D R, GREENPLATE J T, WONG E Y, et al. Cloning of an insecticidal cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(12): 4239-4244.
- [5] PURCELL J P, GREENP T. Cholesterol oxidase: a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 196(3): 1406-1413.
- [6] SUZUKI K. Antiobesity agent 4-cholesten-3-one: US, 5610152[P]. 1995-01-11.
- [7] KASHIMA M, KINOSHITA T, INAOKA A, et al. Cholestanones for treatment of liver diseases: JP, 0769898[P]. 1995-03-14.
- [8] CHRISTODOULOU S, HUNG T V, TREWHELL M A, et al. Enzymatic degradation of egg yolk cholesterol[J]. Journal of Food Protect, 1994, 57: 908-912.
- [9] 赵芳. 胆固醇氧化酶的研究进展[J]. 食品科技, 2008, 12(5): 50-52.
- [10] 许晓燕, 张锐, 谭晓晶, 等. 胆固醇氧化酶的发酵条件及酶学性质研究[J]. 食品发酵与工业, 2006, 32(2): 41-45.
- [11] 季文明, 陈毅力, 张和春, 等. 比色法测定胆固醇氧化酶酶活[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(3): 251-254.
- [12] 钟学敏, 孙艳, 张玲, 等. 胆固醇氧化酶分离纯化及应用的研究进展[J]. 生物技术通报, 2009(4): 44-49.
- [13] 杨胜利, 张慧, 石轩峰, 等. 响应曲面分析应用于短杆菌产酶工艺的优化[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(6): 60-62.
- [14] 杨胜利. 超声波促进胆固醇的分散对短杆菌产酶的影响[J]. 工业微生物, 2005, 35(4): 33-35.
- [15] LÜ Chenfeng, TANG Yixin, WANG Longgang, et al. Bioconversion of yolk cholesterol by extracellular cholesterol oxidase from *Brevibacterium* sp.[J]. Food Chemistry, 2002, 77: 457-463.
- [16] 刘翠平. 响应面法优化干酪乳杆菌LC2W合成胞外多糖的培养条件[J]. 食品发酵与工业, 2008, 34(12): 85-89.