

全自动发酵罐小试生产 胆固醇氧化酶发酵条件的研究

王成涛, 曹雁平, 王 静, 张 慧, 孙宝国*

(北京工商大学化学与环境工程学院, 北京 100037)

摘要:目的:为了将胆固醇氧化酶应用于低胆固醇系列食品开发和胆固醇测定中,研究优化了菌株 *Rhodococcus SP. R₁₄₋₂* 发酵生产胆固醇氧化酶(COX)的工艺条件。方法:通过测定比较 COX 酶活力,利用全自动发酵罐小试生产 COX,研究发酵温度、pH、乳化剂、通风量和搅拌速率等因素对 COX 产量的影响。结果:*Rhodococcus SP. R₁₄₋₂* 的生物生长量和产酶是部分偶联的,胞外 COX 酶的合成高峰比生物量高峰滞后约 12h。发酵过程中分段控制搅拌转速和通气量分别为:发酵前 10h, 200r/min 和 4L/min; 10~50h, 300r/min 和 5L/min; 50h 后, 250r/min 和 4.5L/min, COX 达到 1.58U/mL 的最高量。结论:发酵温度、培养基 pH、通气量及搅拌速度等因素影响其生物量和 COX 酶合成,采用分段式控制,有利于 COX 产量的提高。

关键词:胆固醇氧化酶,发酵罐,条件优化,分段调控

Fermentation production of cholesterol oxidase by *Rhodococcus sp. R₁₄₋₂* in fermentor

WANG Cheng-tao, CAO Yan-ping, WANG Jing, ZHANG Hui, SUN Bao-guo*

(College of Chemical & Environmental Engineering, Beijing Technology & Business University, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective: the interest in cholesterol oxidase (COX) is due to its industrial importance and its wide utilization in the determination of cholesterol in food and blood serum. Methods: *Rhodococcus SP. R₁₄₋₂* was grown in a batch fermentor. The effect of cultivation temperature, pH of the culture medium, Tween-80, aeration rate and agitation speed on the production of COX by the microorganism were studied. Results: all of them effected its biomass and production of COX, and there were partly relationship in biomass of *R₁₄₋₂* and production of COX. Adjusting the operation variables could increase the production of COX effectively during the fermentation. By adjusting operation condition, a maximum COX activity of 1.58U/mL could be achieved at 66h.

Key words: cholesterol oxidase; fermentor; optimum conditions; subsection adjusting.

中图分类号: TS201.2*5

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2009)01-0159-04

胆固醇氧化酶(EC 1.1.3.6, COX)可以催化转化胆固醇为胆甾-4-烯-3-酮(4-cholestene-3-one),是微生物降解胆固醇系列反应过程中一种关键酶。目前已经发现多个菌属能够产生此酶,如 *Nocardia*、*Rhodococcus*、*Brevibacterium*、*Streptomyces*、*Schizophyllum*、*Pseudomonas* 等,不同菌种产酶能力和酶学特性不尽相同。该酶可以胞内酶(endoenzyme)的形式存在于菌体,或以胞外酶的形式分泌于发酵液。胆固醇氧化酶已被广泛应用于食品和血清中胆固醇的快速检测;在高胆固醇动物性食品的酶法降解方面也显示出潜在应用价值等。此外,胆甾-4-烯-3-酮在治疗

肥胖、护肝等保健作用也引起人们的关注。笔者课题组筛选出一株高活力的 *Rhodococcus sp. R₁₄₋₂*,并应用全自动发酵罐小试生产胞外胆固醇氧化酶,研究其发酵工艺条件对生物量和产酶的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Rhodococcus sp. R₁₄₋₂ 本实验室分离筛选、保藏,来源于发酵肉制品;胆固醇(生物试剂)、硫酸铵(分析纯)、胆固醇(生物试剂)、30%过氧化氢等 北京化学试剂公司;4-氨基-安替比林(分析纯) Sigma 公司;辣根过氧化物酶 HRP(生物试剂) 北京欣经科公司;胆固醇测定试剂盒 北京奥博星生物技术责任有限公司;其他试剂 均为分析纯;胆固醇(生物试剂) 经无水乙醇三次重结晶精制、干燥后应用;LB 培养基(g/L,斜面菌种保藏用) 牛肉膏 5、蛋白胨 10、NaCl 5、琼脂 18, pH 7.0~7.2, 121℃ 灭菌

收稿日期:2008-04-16 *通讯联系人

作者简介:王成涛(1969-),男,副教授,研究方向:食品生物技术及功能天然产物。

基金项目:北京市优秀人才培养专项(20061D0500300137);黑龙江省教育厅科技项目(10531125)。

20min; 发酵培养基 (g/L) 胆固醇 2.0 (超声处理 400W, 10min)、蔗糖 2.0、胰蛋白胨 2.0、酵母膏 1.0、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.4、 K_2HPO_4 1、 MgSO_4 0.05、 FeSO_4 0.01、 CaCl_2 0.1、Tween-80 0.25% (V/V), pH 7.5, 0.1MPa 灭菌 15min。

1.2 实验方法

1.2.1 胆固醇氧化酶活力测定体系 溶液 A: 4-氨基-安替比林 1.4mmol/L, 苯酚 7mmol/L, 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 50mmol/L, 胆固醇 1mmol/L, Triton X-100 1%。配制溶液 A 时, 胆固醇先用异丙醇溶解, 再与其他成分搅拌混合。配制好后胆固醇仍呈絮状悬浊液, 需静置待其沉淀平衡, 测定时取上清液即可。配制好后盛于棕色瓶中, 防止自然氧化, 一周内使用有效。辣根过氧化物酶 (HRP) 溶液极易失活, 需 4℃ 保存, 测定酶活力时临时加入, 最好现用现配。

1.2.2 胆固醇氧化酶活力测定

1.2.2.1 酶活力的测定 取溶液 A 3mL 和辣根过氧化物酶溶液 (6U/mL) 50 μL 加入到试管中, 37℃ 保温 3min, 加入 100 μL 发酵液, 37℃ 准确反应 10min, 沸水浴加热 3min 终止反应, 冷却, 500nm 下测定其吸光值。

1.2.2.2 酶活力标准曲线的绘制 取溶液 A 3mL 于试管中, 加入不同量的 0.03% H_2O_2 溶液, 用去离子水定容至 3.1mL, 37℃ 水浴保温 3min, 加入辣根过氧化物酶溶液 50 μL , 准确反应 10min, 沸水浴加热 3min 终止反应, 冷却, 于 500nm 下测定其吸光值。

1.2.3 细胞生长和产酶曲线 种子液培养 15h, 以 5% 的接种量转接入发酵培养基, 在 33℃、pH 7.5, 搅拌转速和通气量分别控制在 300r/min 和 5L/min 的条件下, 每 6h 取样一次, 测定其细胞干重和酶活力, 跟踪监测整个生长过程。

1.2.4 总酶活力、胞外酶活力和胞内酶活力测定

1.2.4.1 总酶活力 取发酵液, 加入 0.5% Triton X-100, 用超声波细胞破碎仪在 400W 下处理 10min 后 (冰浴), 12000 \times g 离心 15min 处理, 取上清液测定其酶活力。

1.2.4.2 胞外酶活力 发酵液经 8000 \times g 离心 10min 后, 取上清液测定酶活力。

1.2.4.3 胞内酶活力 发酵液经 8000 \times g 离心 10min, 沉淀的菌体细胞用磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 洗涤 2 次, 加入 50mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.5, 含 0.5% Triton X-100) 至原发酵液体积, 用超声波细胞破碎仪在 400W 下处理 10min 后 (冰浴), 12000 \times g 离心 15min 处理, 取上清液测定胞内酶活力。

1.2.5 胆固醇氧化酶的全自动发酵罐小试生产 种子液于 30℃、1400r/min 条件下振荡培养 15h, 将发酵培养基 (2.5L) 加入发酵罐 (5L, H/D = 2.0), 121℃ 灭菌 20min, 冷却后, 以 5% 接种量接入发酵罐, 培养温度为 25~37℃, 通风比为 1:1~1:1.5, 搅拌速度 150~350r/min, 流加 NaOH 控制 pH, 培养时间为 84h, 测定不同条件下的产酶活力。

1.2.6 比生长速率及 COX 合成速率 比生长速率 $\mu = (1/x) \times (dx/dt)$; COX 合成速率 $\varepsilon = (1/x) \times$

(dE/dt)

其中: x 为生物量 (g/L), E 为 COX 产量 (U/L)。

2 结果与讨论

2.1 *Rhodococcus sp.* R₁₄₋₂ 发酵培养的生长和产酶特征

由图 1 可以看出, *Rhodococcus sp.* R₁₄₋₂ 的生长与 COX 酶产生过程并不完全吻合。在 48h 菌体生长进入稳定期, 达到生物量的最大值 (1.9mg/mL), 发酵 72h 后菌数明显降低; 尽管胆固醇氧化酶 COX 伴随菌体生长而酶活增加, 但 60h 后 COX 酶活力才呈现迅速升高的趋势, 说明 COX 的诱导产生 COX 主要在稳定期的后期。 *Rhodococcus* R₁₄₋₂ 可以产生较高活性的胞内酶和胞外酶, 72h 时总酶活力达到最大值 1.55U/mL, 然后酶活力进入一个平稳期。胞外酶活力的最高峰出现在 60h, 酶活力为 0.89U/mL, 胞内酶高峰的出现滞后于胞外酶大约 12h。发酵总体是一个产酸的过程, pH 不断下降, 发酵终点 78h 时 pH 为 5.6。

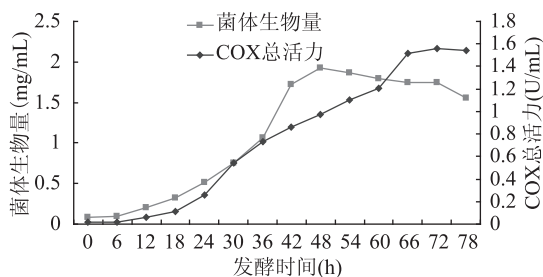


图 1 *Rhodococcus sp.* R₁₄₋₂ 的生长曲线和产酶曲线

2.2 发酵培养基中乳化剂对发酵过程的影响

由于胆固醇在水中的溶解度极小, 在发酵培养基中添加适量的表面活性剂及乳化剂, 能促进胆固醇在培养基中的分散、增加微生物与胆固醇的界面接触, 增加培养基中胆固醇的有效含量, 从而提高 COX 产量。

在 5L 发酵罐中培养 *Rhodococcus* R₁₄₋₂ 时, 当通风量大于 0.6L/min 时, 发现有大量胆固醇相互聚集, 粘在罐壁、挡板及搅拌桨上, 不能分散, 培养基的乳化体系遭到破坏。若增加搅拌速度以增加溶氧量 (DO), 培养基会出现大量泡沫, 泡沫容易溢出罐外, 造成发酵液损失, 同时也增加了染菌机会。因此, 笔者尝试在体系中增加乳化剂 Tween-80 的量, 并维持通风量为 1L/min, 转速为 300r/min, 考察乳化剂的添加量对培养基乳化体系稳定性的影响 (发酵液中胆固醇质量浓度)。图 2 的结果显示, Tween-80 的添加量在 0.25% 以上都能起到较好的乳化作用; 继续增加 Tween-80 的量, 体系表面的泡沫大量增加, 影响发酵和溶氧量, 因此选择 0.25% Tween-80 作为初始添加量。

2.3 pH 对 COX 发酵过程的影响

摇瓶培养实验结果发现, 培养基初始 pH 7.5 时, *Rhodococcus* R₁₄₋₂ 的 COX 产量为最高。图 3 的结果表明, 发酵培养基的 pH 分别控制在 7.0、7.5、8.0, 其 COX 产量相差不大; 但 pH7.5 培养 72h 时, COX 产量

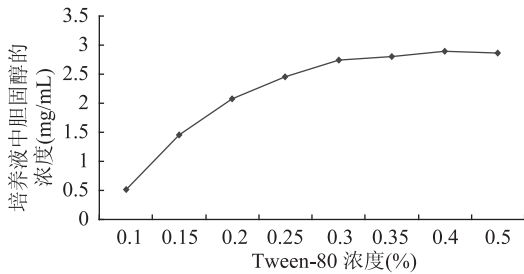


图2 Tween-80的添加量对培养基中胆固醇浓度的影响

达到最大值 1.45U/mL, 然后酶活力逐渐下降。

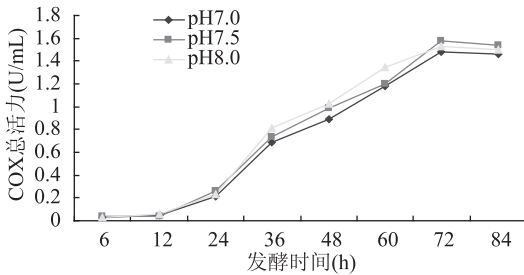


图3 pH对COX发酵过程的影响

2.4 发酵温度对COX产量的影响

前期的摇瓶培养结果提示, *Rhodococcus R₁₄₋₂* 在 30℃ 时较适合菌体的生长和产酶, 应用 5L 全自动发酵罐考察了在 25、29、33、37℃ 条件下, 发酵温度对 COX 产量的影响。图 4 结果显示, 在 33℃, 60h 时 *Rhodococcus R₁₄₋₂* 的 COX 产量为 1.50U/mL, 72h 时 COX 达到最大合成量 1.54U/mL, 从缩短发酵周期和经济方面考虑, 66h 后结束发酵较为合适。这与 *Brevibacterium sp.* DG CDC 82 发酵生产 COX, 在 36℃ 下, COX 合成速率最快, 在 10h 就达到最大值, 20h 左右合成停止有明显的不同, 而接近于 Lee 等的结果。

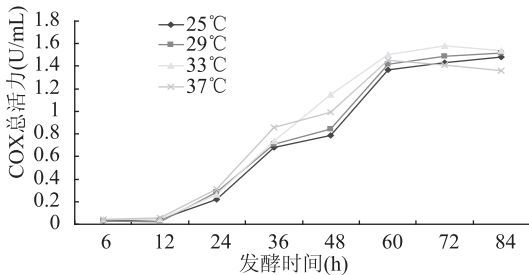


图4 发酵温度对COX产量的影响

2.5 通风量对产酶的影响

考察了不同通风量(4、5、6L/min)对 *Rhodococcus R₁₄₋₂* 生长及产酶的影响(图 5)。由图 5 可知, 发酵前 10h, 不同通气量条件下产酶差别不大; 在通气量为 5、6L/min, 最大 COX 产量分别达到 1.53U/mL 和 1.56U/mL。但是在 6L/min 的通气量下泡沫较多, 发酵液损失较多, 并且发酵后期酶活下降也较快。资料显示, COX 活性中心含有 cys 残基^[3], COX 容易被氧化失活可能与其巯基有关。在 5L/min 通气量时, 泡沫层较薄, COX 活力损失较少, 因此选择该通气量作为 *Rhodococcus R₁₄₋₂* 发酵 COX 的控制参数。

2.6 搅拌转速对产酶的影响

搅拌转速也影响溶氧量, 进而影响 COX 的产量。实验中控制搅拌转速在 150~350r/min, 发酵过程见

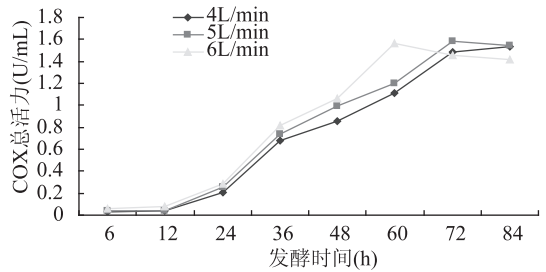


图5 通风量对产酶的影响

图 6。在 250r/min 和 300r/min 下, 在 72h 时 COX 产量分别达到 1.52U/mL 和 1.56U/mL; 随着搅拌速率的提高, COX 产量略有提高; 但搅拌转速达到 300r/min 以上时, 会引起大量的泡沫, 甚至造成发酵液的逃逸, 因此认为 300r/min 搅拌转速较为适合。

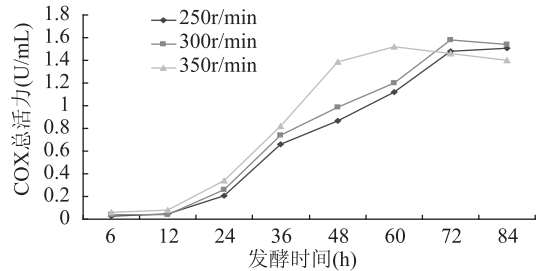


图6 转速对产酶的影响

2.7 发酵过程中的溶氧变化

发酵过程中发酵液中的溶氧变化反映了菌体利用氧的消耗规律。图 7 表明, 在发酵的不同阶段对氧的需求并不相同, 在发酵的前 10h, 菌种生长处于迟缓期, 细胞摄氧速率明显低于供氧速率; 发酵的 10~50h, 细胞摄氧速率明显高于供氧速率, 溶氧迅速下降; 50h 后溶氧开始回升, 其最适溶氧饱和度为 25%~35%, 低于 20% 时产酶受到影响。根据以上实验结果, 搅拌转速和通气量配合采用分段控制, 有利于节能增效。在发酵培养基 pH7.5、33℃ 时, 搅拌转速和通气量分别控制在: 发酵前 10h, 200r/min 和 4L/min; 10~50h, 300r/min 和 5L/min; 50h 后, 250r/min 和 4.5L/min。采用以上条件, 66h, COX 最高酶活达到 1.58U/mL。

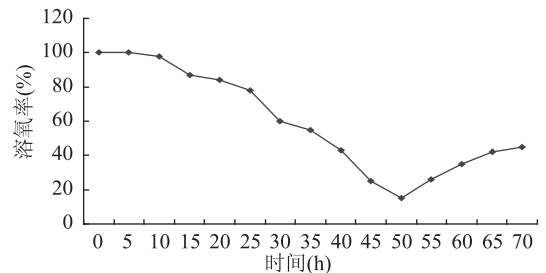


图7 发酵过程中溶氧变化曲线

3 小结

利用全自动发酵罐研究了 *Rhodococcus sp.* R₁₄₋₂ 小试生产胆固醇氧化酶的工艺条件。 *Rhodococcus sp.* R₁₄₋₂ 的生长与 COX 产生是部分偶联的, 其胞外 COX 酶的合成高峰较生物量高峰滞后约 12h; 在发酵过程中, R₁₄₋₂ 在 48h 时其生物量达到最大值 1.9mg/mL, 进入稳定生长期。在控制发酵液 pH = 7.0, 33℃ 时, (下转第 164 页)

2.5 水解液氨基酸的测定结果

2.5.1 氨基酸的色谱图 见图5。

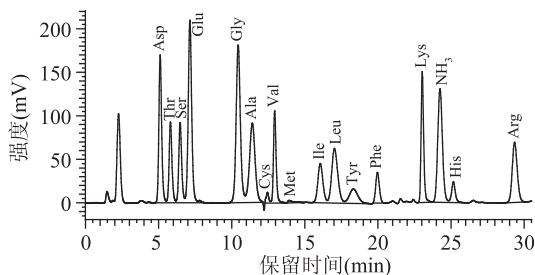


图5 三种酶叠加水解液氨基酸的色谱图

2.5.2 氨基酸的组成和含量 巴非蛤肉水解液的氨基酸组成及含量见表2。

表2 巴非蛤肉三种酶叠加水解液的氨基酸分析结果

氨基酸	含量 (mg/100mL)	氨基酸	含量 (mg/100mL)
△天门冬氨酸	84.25	*异亮氨酸	41.94
*苏氨酸	42.50	*亮氨酸	68.14
丝氨酸	29.97	酪氨酸	38.99
△谷氨酸	158	*苯丙氨酸	30.67
△甘氨酸	75.59	*赖氨酸	59.62
△丙氨酸	61.31	组氨酸	18.13
胱氨酸	11.38	精氨酸	88.22
*缬氨酸	43.40	脯氨酸	31.40
*蛋氨酸	2.89	色氨酸	-

注：* 为人体必需氨基酸；△为鲜味氨基酸。

从表2可见,巴非蛤肉三种酶叠加(I+II+III)水解液中,游离氨基酸含量丰富,约为886.4mg/100mL(色氨酸未计),其中必需氨基酸289.16mg/100mL,占32.6%。值得注意的是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸等支链氨基酸含量尤为丰富。精氨酸可制成营养增补剂或调味剂,在巴非蛤肉复合水解液中含量为88.22mg/100mL,对成人和婴幼儿为必需氨基酸,有一定的解毒作用;与糖加热反应可获得特殊的香味物质,是氨基酸输液及氨基酸制剂的重要成分。此外,谷氨酸(鲜味)、天门冬氨酸(鲜味)、甘氨酸(甜味)和丙氨酸(甜味)等呈味氨基酸含量丰富。由此可见,巴非蛤肉复合水解液营养价值高,可用于制作营养丰富的氨基酸口服液或高级调味料,特别适合于作为手术后病人的疗养营养剂。

(上接第161页)

段调控通气量和搅拌转速有利于COX产生。采用以上条件(分别为发酵前10h,200r/min和4L/min;10~50h,300r/min和5L/min;50h后,250r/min和4.5L/min),66h时COX酶活力达到1.58U/mL。

参考文献:

- [1] 程晓英. 马红球菌胆固醇氧化酶的研究[D]. 中国农业大学硕士学位论文,2002,6.
- [2] 王成涛,籍保平,牛天贵,等. 高效降解胆固醇菌株的筛选及其在食品中的应用[J]. 中国食品学报,2005,5(3):52~56.
- [3] Maclachlan J, Wotherspoon ATL. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications [J]. Steroid Biochem Mol Biol,2000,72:169~195.

3 结论与讨论

以水解率为指标,兼顾考虑水解液的口感、外观和游离氨基酸含量、生产成本,选择木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和中性蛋白酶分步水解制备巴非蛤水解液。通过对水解条件的研究发现,木瓜蛋白酶最适水解条件确定为:酶用量6000U/g原料、料水比1:8(w/v)、酶解温度50℃、pH6.5、酶解4h。在此反应条件下,单一酶水解最高水解度为35.84%。分步酶解的工艺条件是:在料水比1:8(w/v)、pH6.5、温度50℃条件下,用木瓜蛋白酶先水解4h,菠萝蛋白酶、中性蛋白酶再依次水解4h,水解度可达到48.35%,高于李磊^[4]等双酶法水解大豆蛋白的研究中所报道的情况;三种酶叠加水解法时间为12h,比单纯酶解(48h)缩短了2/3,比复合酶水解(18h)乳鸽肉^[5]缩短了1/3。采用蛋白酶水解,能耗大大降低,且不加任何添加剂,具有一定实际应用价值。离心分离后,上清液呈亮黄色,澄清,味道鲜美。

巴非蛤肉复合水解液氨基酸分析结果表明,游离氨基酸含量丰富,约为886.4mg/100mL(色氨酸未计),其中必需氨基酸占32.6%,尤其是谷氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸和丙氨酸等呈味氨基酸含量丰富。这一结果为巴非蛤肉复合水解液作为疗效营养剂或高级调味料提供了依据。

采用三种蛋白酶叠加水解巴非蛤肉,加酶顺序对水解度有一定影响,具体的提高程度以及效果有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 湛素华,洪鹏志,章超桦. 波纹巴非蛤肉及其菠萝汁营养口服液的研制[J]. 食品科技,2004(8):59~61.
- [2] 曾庆祝,曾庆孝. 海洋贝类(牡蛎、扇贝、文蛤等)功能性食品的开发利用[J]. 氨基酸和生物资源,2002(3):31~34.
- [3] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998.72~74.
- [4] 李磊,陈均志. 中性蛋白酶与酸性蛋白酶双酶法水解大豆蛋白的研究[J]. 西北轻工业学院学报,2002,20(1):35~38.
- [5] 周剑忠,陈晓红,张鑫欣,董明盛. 复合酶水解乳鸽肉的研究[J]. 食品科技,2003(2):25~27.
- [4] Richmond W. Preparation and properties of a bacterial cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to enzyme assay of total cholesterol in serum[J]. Clin Chem,1973,19:1350~1356.
- [5] Slotte JP, Gronberg L. Oxidation of cholesterol oxidase in low and high density lipoproteins by cholesterol oxidase[J]. J Lipid Res,1990,31:2235~2242.
- [6] Wang LG, Yang HL, Wang W. The Production of Cholesterol Oxidase by *Brevibacterium* sp. DG CDC-82 in Fermentor[J]. J Wuxi Univer Light Ind,2003,22(2):34~37.
- [7] Lee MT, Chen WC, Chou CC. Medium improvement by orthogonal array designs for cholesterol oxidase production by *Rhodococcus equi* No. 23[J]. Proce Biochem,1997,32(8):697~703.