

# 脂肪酶抑制剂产生菌 *Bacillus* sp. LF 深层发酵条件研究

钟卫鸿 缪建军

(浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310014)

关键词 脂肪酶抑制剂 培养基 深层发酵条件 芽孢杆菌

中图分类号 :Q939.97 ; TQ925.3 文献标识码 :A 文章编号 1001-6209 (2003) 04-0514-05

随着生活水平的不断提高,肥胖在中国也开始成为影响人们健康的主要危险之一。目前市场上常见的减肥产品主要是作用于大脑,通过抑制食欲减少食物的摄入,由于这类药可能产生大脑、心血管及神经系统的副作用,不宜长期使用。瘦素(Leptin)是一种肥胖基因表达的多肽激素,也是通过食欲中枢发挥作用,可以抑制食欲,提高代谢率,达到减肥的目的。因而另一类减肥药品脂肪酶抑制剂近年来受到国内外重视。脂肪酶抑制剂可直接阻断人体对脂肪的吸收,它不需要通过影响中枢神经系统来抑制人体的食欲,而是阻止脂肪在胃肠道的吸收。文献报道脂肪酶抑制剂可以不进入人体血管和神经系统,对人体矿物质平衡以及骨质循环均无影响。同单一地调整饮食结构减肥相比,脂肪酶抑制剂除了可降低体重,还对一些和肥胖相关的症状如高血压、高胆固醇和糖尿病有明显的改善作用。已发现这类产品可以从水稻胚芽提取得到,也有报道从放线菌培养物和培养液中找到了脂肪酶抑制剂<sup>[1-5]</sup>。微生物是多种抗生素(包括酶抑制剂)有较高的脂肪酶抑制的广泛来源<sup>[6-8]</sup>,本研究所用菌种为自行分离获得的一株芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) LF 菌株,该菌株具活性,而淀粉酶抑制活性较低,同时未检测到蛋白酶抑制活性,因而用该菌株开发减肥用品不会影响人体对必需营养物质的吸收,该菌株是适宜的高效脂肪酶抑制剂生产菌<sup>[9]</sup>。而且细菌这种单细胞微生物作为生产菌株将比放线菌更易于操作,有更好的生产效益。本研究主要考察该菌深层发酵条件对发酵液脂肪酶抑制活性影响,确定产生菌的最佳培养基和培养条件,为进一步生产试验奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和试剂

菌种:芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) LF,自行分离筛选自浙江工业大学校园土壤。实验所用试剂均是国产化学纯和分析纯试剂。脂肪酶为浙江嘉善药厂产品。

### 1.2 培养基

种子培养基:每升含有牛肉膏 3g,蛋白胨 10g, NaCl 5g,琼脂 20g, pH 7.2;发酵培养基:每升含有乳糖 8g,蛋白胨 10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8g, NaCl 5g, pH 7.2;以上均 101 kPa 高压蒸汽灭菌 20min。

### 1.3 脂肪酶抑制活性测定

分别以 1 mL 原始培养基和发酵液滤液溶解 1 g 脂肪酶酶粉配制酶液,参照文献[10]分别测定各样品的脂肪酶活性,以脂肪酶活性的降低比例计量抑制活性的大小。脂肪酶活力单位:以 1g 酶粉在 40℃ pH7.5 条件下,脂肪酶水解脂肪,每分钟产生 1 微克分子脂肪酸的酶量,为 1 个脂肪酶单位。

基金项目 浙江工业大学科学研究中心资助项目(20010052)

作者简介 钟卫鸿(1966-),男,浙江兰溪人,副教授,博士,主要从事应用微生物技术方面研究。Tel:86-571-88320057; Fax 86-571-88320387; E-mail:whzhong168@yahoo.com; wh-zhong@sina.com

收稿日期 2002-11-11,修回日期 2003-02-28

1.4 菌悬液的制备

菌种斜面加定量无菌生理盐水 ,接种环刮取菌苔 ,菌液倒入含有无菌水和玻璃珠的三角瓶中摇动直至菌体细胞株均匀分布得菌悬液待用。

1.5 摇床发酵液的制备

移取菌悬液到装有 30 mL 培养液的 250 mL 三角瓶中 ,30℃ 150 r/min 培养 24 h ,发酵液以滤纸过滤去除菌体 ,滤液置 4℃ 冰箱保存待测。

1.6 生物量测定

取 10mL 发酵液 ,离心 ,105℃ 干燥 2 h 称干重 ,即为发酵液中的生物量。

2 结果和讨论

2.1 脂肪酶抑制剂产生菌 *Bacillus* sp. LF 的培养基选择

2.1.1 碳源物质对 *Bacillus* sp. LF 发酵液脂肪酶抑制活性的影响 :首先考察了碳源物质对脂肪酶活性影响。以肉汤为基本培养基和参照 ,添加 1% 不同碳源物质来考察各碳源物质对 *Bacillus* sp. LF 发酵液脂肪酶抑制活性的影响 ,结果显示(表 1)添加乳糖的发酵液具有较高的脂肪酶抑制活性 ,而其他碳源物质均未见抑制活性的提高 ,反而不如基本肉汤培养基 ,是否乳糖促进了脂肪酶抑制活性成分的形成 ,抑或乳糖结构是抑制成分的组成结构 ,从而促进了发酵液抑制活性的提高 ,这些可在抑制成分的分离纯化及结构分析后得到确定。

改变乳糖的添加量考察乳糖浓度对脂肪酶抑制活性的影响。结果显示(表 2)乳糖添加量 1% 时同比抑制活性最高。

表 1 碳源对脂肪酶抑制活性的影响

碳源物质/1%	发酵液脂肪酶活性/( U/g )	抑制率/%
初始肉汤	433	空白对照
无添加碳源	280	30.0
葡萄糖	317	26.9
蔗糖	425	1.9
麦芽糖	333	23.1
乳糖	217	40.8
淀粉	417	3.8
乙醇	317	26.9
甘油	333	23.1

表 2 乳糖添加量对脂肪酶抑制活性的影响

乳糖添加量 ( g/L )	生物量 ( g/L )	培养基脂肪 酶活性/( U/g )	发酵液脂肪 酶活性/( U/g )	抑制率/%
5	1.2	466	325	30.4
10	1.5	458	300	34.5
15	1.7	441	342	22.6
20	2.0	458	375	18.2
25	1.0	433	392	9.6

2.1.2 氮源选择 :基础肉汤培养基的双有机氮源(牛肉膏和蛋白胨) ,对进一步生产实践来说 ,成本较高 ,因而挑选  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、尿素、蛋白胨、酵母膏和牛肉膏进行重组 ,考察有机氮源与无机氮源、有机氮源与有机氮源的新组合的 11 种双氮源培养基对发酵液抑制活性的影响 ,试验结果表明(表 3) ,在含 1% 乳糖的培养基中添加蛋白胨和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  组合显示出比其他组合更高的抑制活性 ,虽然不及基础肉汤的氮源组合 ,但差距不是太大 ,而且以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  替代牛肉膏可以大大节省发酵成本。因而初步选定发酵培养基的组成为 :每升培养基含 10g 乳糖、10g 蛋白胨、3g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和 5g NaCl。

分别改变蛋白胨和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  添加量 来考察氮源的浓度对脂肪酶抑制活性的影响。结果显示(表 4) ,蛋白胨添加量为 1.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  添加量为 1% 时同比抑制活性较高。

表 3 氮源对脂肪酶抑制活性的影响

氮源 1 (g/L)	氮源 2 (g/L)	生物量 (g/L)	初始培养基脂肪酶活性 (U/g)	发酵液脂肪酶活性 (U/g)	抑制率 /%
牛肉膏 3	酵母膏 10	0.8	383	325	15.2
牛肉膏 3	硫酸铵 10	1.3	425	408	3.9
牛肉膏 3	磷酸铵 10	1.5	441	333	24.5
牛肉膏 3	尿素 10	0.7	392	350	10.6
蛋白胨 10	酵母膏 3	0.8	433	358	17.3
蛋白胨 10	硫酸铵 3	1.0	466	292	37.5
蛋白胨 10	磷酸铵 3	1.2	450	325	27.8
蛋白胨 10	尿素 3	0.9	408	375	8.2
酵母膏 3	硫酸铵 10	1.5	441	425	3.8
酵母膏 3	磷酸铵 10	0.6	417	317	24
酵母膏 3	尿素 10	1.4	400	325	18.8

表 4 氮源的浓度对脂肪酶抑制活性的影响

氮源种类	浓度(g/L)	生物量(g/L)	初始培养基脂肪酶活性(U/g)	发酵液脂肪酶活性(U/g)	抑制率/%
蛋白胨	5	1.6	458	333	27.3
	10	1.8	466	325	30.4
	15	1.5	450	308	31.5
	20	2.0	425	317	25.5
	25	1.9	417	317	24.0
硫酸铵	3	1.7	433	342	21.2
	5	1.5	458	358	21.8
	10	1.8	458	325	29.1
	15	1.6	450	333	25.9
	20	2.0	441	358	18.9

表 5 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交结果

编号	乳糖/%	蛋白胨/%	硫酸铵/%	氯化钠/%	抑制率/%
1	0.8	1.0	0.8	0.5	41.1
2	0.8	1.5	1.0	0.8	37.3
3	0.8	2.0	1.2	1.0	37.7
4	1.0	1.0	1.0	1.0	42.9
5	1.0	1.5	1.2	0.5	31.9
6	1.0	2.0	0.8	0.8	38.0
7	1.2	1.0	1.2	0.8	34.6
8	1.2	1.5	0.8	1.0	26.2
9	1.2	2.0	1.0	0.5	36.4
k <sub>1</sub>	6.2	6.2	6.0	5.8	
k <sub>2</sub>	5.5	5.1	5.9	5.6	
k <sub>3</sub>	5.5	5.9	5.3	5.8	
K <sub>1</sub>	2.07	2.07	2.0	1.93	
K <sub>2</sub>	1.83	1.7	1.97	1.87	
K <sub>3</sub>	1.83	1.97	1.77	1.93	
R	0.24	0.37	0.23	0.06	

2.1.3 培养基的优化 :考虑到培养基各组成因子间的相互作用 ,进一步对培养基组成进行正交优化 ,选择 乳糖、蛋白胨、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 NaCl 等 4 个因素 ,每因素选择 3 个水平 ,采用正交表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)对培养基进行优化 ,结果显示(表 5)实验的最佳值为 4 号培养基 ,但理论最佳值是 1 号培养基 ,由于 1 号培养基与 4 号培养基的抑制率相差不大 ,因此最终确定培养基组成 :每升培养基含 8g 乳糖、10g 蛋白胨、8g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 5g NaCl。进一步验证理论最佳培养基抑制活性保

2.2 脂肪酶抑制剂产生菌 *Bacillus* sp. LF 培养条件选择

2.2.1 初始 pH 对菌株发酵液脂肪酶抑制活性的影响 :考察了上述优化确定发酵培养基初始 pH 分别为 5、6、7、8 和 9 时的发酵液脂肪酶抑制活性 结果显示(图 1)初始 pH 7.0 的发酵液脂肪酶抑制活性最高。发酵培养基初始 pH 为 7 比较适宜。进一步考察发酵培养基起始 pH 分别为 6.5、6.8、7.0、7.2 和 7.5 时发酵液的脂肪酶抑制活性 结果显示(表 6) 培养基初始 pH7.2 时抑制活性比 pH7.0 要高一些 因此发酵培养基的初始 pH 在 7.2 最佳。

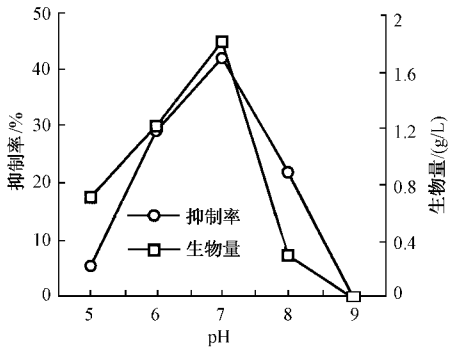


图 1 初始 pH 对脂肪酶抑制活性的影响

表 6 初始 pH 对菌株发酵液脂肪酶抑制活性的影响			
pH	生物量( g/L)	发酵液脂肪酶活性( U/g)	抑制率/%
6.5	1.3	367	20.0
6.8	1.3	350	23.6
7.0	1.7	283	38.2
7.2	1.5	260	43.1
7.5	1.2	262	42.9

458 ( 初始培养基 )

2.2.2 温度对菌株发酵液脂肪酶抑制活性的影响 :分别考察了 26℃、28℃、30℃、32℃ 和 37℃ 培养温度下发酵液脂肪酶抑制活性 ,其他发酵条件为 :摇瓶装量为 30mL ,接种量为 1mL ,pH 7.2 ,150r/min 条件下培养 24h。结果可知(图 2) ,温度高于或低于 30℃ 时无论发酵液抑制率或者产生生物量均下降 ,因此最佳发酵温度为 30℃。

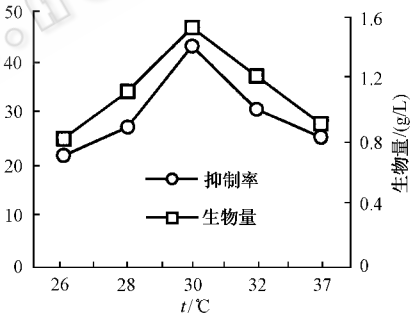


图 2 培养温度对脂肪酶抑制活性的影响

2.2.3 接种量对菌株发酵液脂肪酶抑制活性的影响 :在 30mL 培养液中按不同接种量接入种子液 ,在 30℃ ,pH7.2 , 150r/min 条件下培养 24h ,测定各发酵液的脂肪酶抑制活性。结果显示(图 3) ,当接种量为 4% 时其发酵液的抑制率明显高于其它接种量 ,因此可以确定最佳接种量为 4%。

2.2.4 通气量对菌株发酵液脂肪酶抑制活性的影响 :在 250mL 三角瓶中分别加入不同体积的培养基 ,各接 4% 种子液 ,在 30℃ ,pH7.2 ,150r/min 培养 24h 后 ,测定各发酵液的酶活。结果显示(图 4) ,摇瓶装液量为 40mL 时其发酵液的抑制率最高可以达到 52.3% ,因此可以确定最佳摇瓶装液量为 40mL。

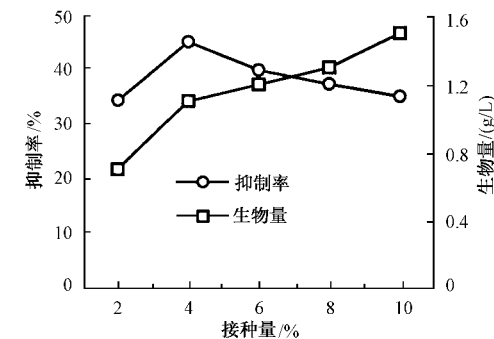


图 3 接种量对脂肪酶抑制活性的影响

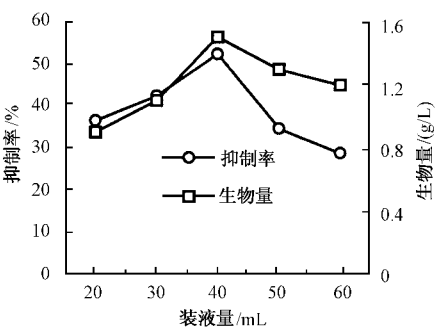


图 4 培养基装量对脂肪酶抑制活性的影响

### 3 结论

通过检测发酵液对脂肪酶的抑制活性大小确定 *Bacillus* sp. LF 产脂肪酶抑制剂的最佳发酵培养基组成和培养条件为:乳糖 8g,蛋白胨 10g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  8g, NaCl 5g% 发酵培养基的起始 pH 值为 7.2 接种量 4% 温度 30℃, 250mL 摇瓶装液量 40mL 的条件下培养 24h 可获得较高的抑制率,最高可以达到 52.3% 的抑制率。同时本研究采用的土壤中分离获得的 *Bacillus* sp. LF 菌株发酵液对脂肪酶有较强抑制活性,有关抑制活性成分的分离纯化和物质鉴定工作正在研究中,对抑制剂成分的最终确定将会有助于更深入地研究 *Bacillus* sp. LF 菌株产脂肪酶抑制剂的代谢过程规律。

致谢 本研究项目得到沈寅初先生的启发指导,在此表示衷心感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Davidson M H, Hauptman J. Weight control and risk factor reduction in obese subjects treat for 2 years with Orista. *Journal of the American Medical Association*, 1999, **28**(3): 235 ~ 243.
- [2] Leisier J P, Gunning K. What is the long-term efficacy and tolerability of oristat, a gastrintestinal lipase inhibitor. *Journal of Family Practice*, 2000, **49**(6): 573 ~ 575.
- [3] Pace D G, Blotner S, Guerciolini R. Short-term treatment does not affect mineral balance and bone turnover in obese man. *Journal of nutrition*, 2001, **131**(6): 1694 ~ 1650.
- [4] Isler. Biomass lipase inhibitor useful for treating adiposity. United states patent, 5540917, 1996.
- [5] Takahashi. Lipase inhibitor derived from a defatted rice germ. United states patent, 5503831, 1996.
- [6] 徐成勇, 诸葛健. 微生物来源的酶抑制剂研究进展. *微生物学报*, 1999, **39**(2): 185 ~ 187.
- [7] 胡海峰, 朱宝泉, 龚炳永. 微生物来源的胆固醇合成酶抑制剂 VI. 抗生素 SIPI-8926-IV 的研究. *中国医药工业杂志*, 1995, **26**(11): 484 ~ 488.
- [8] 孟晓峰, 龚炳永, 朱宝泉. 微生物来源的甾体 52-还原酶抑制剂: SIPI-94-1079-II 的研究. *中国抗生素杂志*, 1997, **22**(6): 401 ~ 403.
- [9] 钟卫鸿, 卢静亚. 脂肪酶抑制剂产生菌的筛选. *中国抗生素杂志*, 2002, **27**(11): 641 ~ 643.
- [10] 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984. 660 ~ 662.

## Study on Submerged Culture Conditions of Lipase Inhibitor Producing Strain

Zhong Weihong\* Miao Jianjun

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

**Abstract:** The optimum medium and fermentations conditions of the lipase inhibitor producing strain *Bacillus* sp. LF were studied. The optimal medium was selected after single factor test and orthogonal test as follows: lactose 0.8%, peptone 1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.8%, NaCl 0.5%, original pH 7.2. With 4% (V/V) inoculum in 40 mL medium in 250 mL flask, *Bacillus* sp. LF could reach high yield of lipase inhibitor after 24 h at 30℃. The highest lipase inhibitory activity in broth could reach 52.3%.

**Key words:** Lipase inhibitor, Medium, Fermentations conditions, *Bacillus* sp.

Foundation item: Project Granted by the Science Research Center of Zhejiang University of Technology (20010052)

\* Corresponding author. Tel: 86-571-88320057; Fax: 86-571-88320387; E-mail: wh-zhong@sina.com

Received date: 11-11-2002