

# 脂肪酶抑制剂产生菌的筛选和鉴定

刘 兰<sup>1,2,3</sup>, 周培华<sup>2</sup>, 曾 伟<sup>2,3</sup>, 陈桂光<sup>2</sup>, 梁智群<sup>\*2,3</sup>

(1. 广西壮族自治区玉林市食品药品检验所, 广西 玉林 537000; 2. 广西大学 生命与科学技术学院, 广西 南宁 530004; 3. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西 南宁 530004)

**摘要:**通过对不同地点采集样品,分离纯化得到的不同单菌落,再进行发酵培养,并以其产物是否对脂肪酶具有抑制活性作为筛选指标,从 2013 株野生菌中筛选到一株产脂肪酶抑制活性较高的菌株 Sf16。对菌株 Sf16 的菌落、气生菌丝、孢子丝及孢子的形态特征和在不同碳源培养基上的生长表现的特征以及一些生理生化方面特性进行观察,并对菌株的 DNA 进行提取并扩增 16S rDNA,通过对后者序列测定、数据库同源搜索和比对,进而构建菌株的系统进化树。通过形态学和分子生物学手段对产脂肪酶抑制剂菌株 Sf16 进行初步鉴定,结果确定其为 *Streptomyces sp.*。

**关键词:**脂肪酶抑制剂;PCR;16SrDNA;系统发育树

中图分类号:TQ 920.1 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2013)02—0219—05

## Screening and Identification of Lipase Inhibitor-Producing Strain

LIU Lan<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Pei-hua<sup>2</sup>, ZENG Wei<sup>2,3</sup>, CHEN Gui-guang<sup>2</sup>, LIANG Zhi-qun<sup>\*2,3</sup>

(1. Guangxi Yulin Institute for Food and Drug Control, Yulin 537000, China; 2. College of Life Sciences and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China; 3. Key Laboratory of Subtropical Agricultural Bioresources Conservation and Utilization of Guangxi, Nanning 530004, China)

**Abstract:** We collected many samples from different locations, then isolated and purified single colony. By fermentation, the products whether have lipase inhibition activity as a screening indicator. We find a good strain Sf16 after we cultured 2013 wild strains. The morphological characteristics of colony, aerial hyphae, sporothrix and spores and the growth performance characteristics in different carbon sources medium of strain Sf16, as well as some physiological and biochemical characteristics were observed. Extract the DNA, amplified and determined the 16SrDNA. Then homology search in database, compared and constructed the phylogenetic tree. Inhibitor-producing strain Sf16 preliminary identification by means of morphological and molecular biology techniques, the result is *Streptomyces sp.*

**Keywords:** lipase inhibitor, PCR, 16SrDNA, the phylogenetic tree

肥胖是由于人们生活水平的提高随之而来的“文明病”之一,尤其是欧美发达国家大多数人患有

肥胖及其因肥胖带来的一系列如高血压、高血脂等心血管疾病;肥胖的人群逐年增加,其中一些国家

收稿日期: 2012-04-17

\* 通信作者: 梁智群(1959—),男,博士后,教授,博士研究生导师,主要从事食品微生物技术方面的研究。E-mail: zqliang@gxu.edu.cn

也先后报道了青少年肥胖超过警戒线。由于肥胖疾病的日益严重和广泛,人们对于减肥药物的关注也日益加强。但是由于早期药物机理的不确切及其减肥理念的不科学,导致很多消费者付出了很多不必要的代价。如临床表明,化学类减肥药物有中枢神经毒副作用<sup>[1]</sup>,相应的减肥药物也不得不退出市场。所以目前消费者正在期待一种科学的、安全有效的减肥药物和减肥机理的出现,因为任何时候人们对健康和美的追求都是不会停止的。肥胖机理研究表明,食物中的脂肪在胃蛋白酶作用下糜化,在胰脂肪酶及肝脏和胆囊分泌物的协助消化作用下,脂肪最终水解成甘油和脂肪酸,脂肪酸和甘油在小肠处吸收入体内。正常人一天的能量需求所需要的脂肪量一般在 50 g 左右,如果超过此限量,那么没有作为能量消耗的水解产物就会被人体吸收到体内重新合成脂肪,以脂肪的形式累积。脂肪酶抑制剂正是抑制脂肪酶发挥水解活性,使得过量的脂肪在肠道内无法水解成小分子水解物,从而不被人体吸收储存,可不同程度地封锁脂肪在体内积累的路径,可从根本上避免肥胖的产生,也可极大程度地改善目前减肥药物市场的不乐观;另外对于肥胖患者而言,可以在脂肪酶水解活性受到抑制的基础上,开展健康的耗能活动即可消耗人体原本积累的脂肪,进而使得高效而健康的减肥理念成为现实。多年以来,中国国内脂肪酶抑制剂主要集中于植物提取物<sup>[2-5]</sup>方面的研究,存在成本高,得率少,环境污染大等诸多不足。而微生物产物<sup>[6-7]</sup>方面的研究比较少,但是微生物技术强大的生命力和低耗高产的特点对于脂肪酶抑制剂的开发和生产具有广阔的前景。作者主要是根据脂肪酶水解产物的特性进行设计筛选产脂肪酶抑制剂的菌株,从而快速从 2013 株野生菌中筛选到一株产脂肪酶抑制活性较高的菌株 Sf16,通过菌株的鉴定,结果确定为 *Streptomyces* sp.。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 土壤** 土样采集于广西大学校园内食品厂附近、农场实验田等不同地点。

**1.1.2 培养基** 高氏 分离培养基(组分 g/L):可溶性淀粉 20, NaCl 0.5, KNO<sub>3</sub> 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.25, 琼

脂 15; pH 7.2~7.4。

**1.1.3 试剂** 脂肪酶:SIGMA 公司;Taq 酶、dNTP: TAKARA 公司;可溶性淀粉等其他常用化学试剂:均为国产分析纯。

**1.1.4 仪器** MEITLER 电子精密分析天平:德国 MEITLER 公司;SPX-250 型生化培养箱:上海跃进医疗器械厂;HVE-50 全自动立式灭菌锅:日本 HIRAYAMA;SKY-211B 全温度恒温培养摇床、超净工作台:上海苏坤公司;OLYMPUS 显微:日本镜奥林巴斯;Micropipette 移液器:Socorex 公司;DNA 水平电泳仪:大连捷迈科贸;PCR 扩增仪:德国 Biometra 公司;化学发光荧光凝胶成像系统:基因有限公司;Thermo Scientific Multiskan Go 全波长酶标仪:芬兰赛默飞世科技。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌株分离培养** 将采集的土样稀释至适当浓度,利用高氏 培养基为分离培养基,置于 28 ℃ 生化培养箱培养,并分离单菌落。挑取单菌落在 50 mL 的 EP 管中进行液体培养,离心取上清液,以改良平板扩散法进行初步筛选。由于不同菌株代谢产物对脂肪酶的抑制作用不一致,而脂肪酶的水解产物会使添加有一定浓度底物和指示剂的平板产生不同的颜色和直径大小不同的透明圈。挑取阳性菌株进行 250 mL 摇瓶液态发酵培养,离心取上清液,利用改进铜皂法进行复筛,得到产脂肪酶抑制剂的菌株。

**1.2.2 菌株生长形态学** 将筛选得到的遗传稳定的产脂肪酶抑制剂菌株 Sf16,在高氏 培养基上生长至对数期。对其形态学进行分析,通过观察菌株在平板上的单菌落、基内菌丝和气生菌丝的颜色、生长形态;以及利用显微镜观察菌株 Sf16 的孢子、插片气生菌丝的形态。并对菌株 Sf16 在不同碳源培养基上的生长特征和生理生化进行观察<sup>[8]</sup>。综合上述鉴定试验的数据和信息,参考中国科学院微生物研究所放线菌分类组编写的《链霉菌鉴定手册》对菌株 Sf16 进行初步鉴定。

**1.2.3 菌株 Sf16 的分子生物学** 参照文献[9]对需要鉴定的 Sf16 总 DNA 进行提取,以总 DNA 为模板,以通用引物 self1492R 和 self27F 为引物,进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增体系见表 1,PCR 扩增条件<sup>[10]</sup>参数见表 2。扩增产物通过上海生物工程有限公司测序。测序结果提交至 NCBI 进行

BLAST 同源序列搜索与比对, 选取菌株 16S rDNA 碱基覆盖率 100%, 相似性 99% 的相关属和种的 18 个菌株的 16S rDNA 序列, 利用 MEGA4 软件进行比对处理, 再通过 NJ 算法构建系统发育树<sup>[11-13]</sup>。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system

试剂	终浓度	加入体积/ $\mu\text{L}$
底物 DNA 模板		1.5
10 $\times$ PCR 缓冲液	1 $\times$	5
25 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	2.5 mmol/L	5
10 mmol/L dNTP	0.2 mmol/L	1
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物	0.6 $\mu\text{mol/L}$	3
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物	0.6 $\mu\text{mol/L}$	3
5 U/ $\mu\text{L}$ Taq 酶	0.05 U/ $\mu\text{L}$	0.5
ddH <sub>2</sub> O		31
总体积		50

表 2 PCR 反应参数

Table 2 PCR reaction parameters

预变性	扩增	循环	延伸
94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s—55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s—72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min	34	72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株形态观察

对所筛得的菌株 *Sf16* 进行形态观察, 发现其孢子丝直, 柔曲至 2~3 圈松散螺旋形, 孢子卵圆形至椭圆形。高氏 1 号培养基上, 气生菌丝由白色变为灰色, 基内菌丝由白到淡黄至浅褐红色。在马铃薯块上生长气丝丰茂, 絮状, 白色至灰色。基丝好, 地衣状, 乳脂黄色。薯块变为红苍色。淀粉水解弱或者可疑。明胶可以液化, 液化前后颜色不变, 不会褐变, 无色或者少量黄色素。*Sf16* 的菌株在高氏 1 号培养基上气生菌丝和基内菌丝、孢子形态及气生菌丝体形态见图 1。

### 2.2 菌株生理生化特征

菌株 *Sf16* 在不同碳源培养基上的培养特征见表 3, 生理生化特征见表 4。

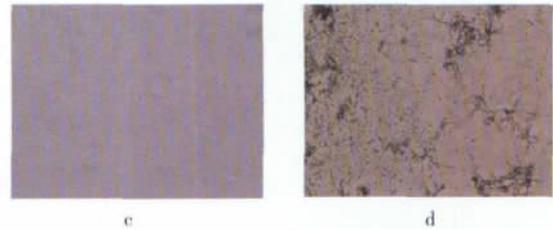
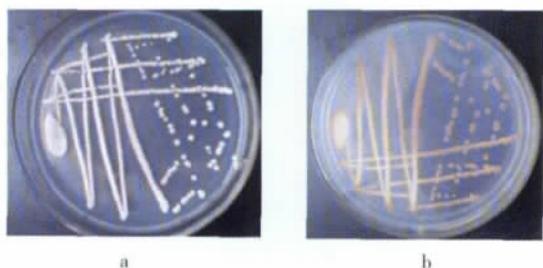


图 1 菌株 *Sf16* 的菌落气生菌丝(a)、基内菌丝(b)、孢子形态(c) (400 $\times$ )及气生菌丝体形态(d) (400 $\times$ )

Fig. 1 Aerial hyphae (a), substrate mycelium (b), Spore morphology (c) (400 $\times$ ) and aerial mycelium morphology (d) (400 $\times$ ) of *Sf16*

表 3 *Sf16* 菌株在各种不同的培养基上的培养特征

Table 3 Culture characteristics of *Sf16* in a variety of different medias

培养基	基内菌丝	气生菌丝	可溶性色素
高氏合成一号琼脂	黄色	白色	粉红色
燕麦粉琼脂(ISP)	白色	白色	无
无机盐淀粉琼脂(ISP)	淡黄色	白粉色	浅粉色
马铃薯块	白色	黄色	微棕色
克氏一号	淡黄带粉色	白粉色	无
蔗糖硝酸盐琼脂	灰褐色	黑色	无
酵母精麦芽精琼脂	淡黄色	金黄色	无

表 4 菌株 *Sf16* 的生理生化特征

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of *Sf16*

特征	结果	特征	结果	特征	结果
明胶液化	+	酪氨酸水解	-	D-甘露醇	+
牛奶凝固	-	硝酸盐还原	+	L-鼠李糖	+
牛奶脓化	-	类黑色素产生	-	L-阿拉伯糖	+
淀粉水解	+	D-葡萄糖	+	蔗糖	+
纤维素生长	+	D-木糖	-	棉子糖	-
H <sub>2</sub> S 产生	+	D-果糖	-	肌醇	+

### 2.3 菌株 *Sf16* 的分子生物学分析

对菌株的总 DNA 和 16SrDNA 通过琼脂糖凝胶电泳, 初步测得 *Sf16* 总 DNA 的大小为 48.5 kb 左右, 其 16S rDNA 的大小为 1.2~1.5 kb。通过测序进一步确定, 菌株的 16SrDNA 扩增后的测序结果为含有 1 316 bp 个碱基长的序列, 序列登录号为 Jc11 15273。总 DNA 和 16SrDNA 以及 Marker 的琼脂糖凝胶电泳见图 2。

用 MEGA4 软件,进行同源多序列比对,选择邻接法进行计算,构建 *Sf16* 的 16SrDNA 系统发育学地位进化树,原始树见图 3。

通过菌株 *Sf16* 的生长形态、不同培养基上的培养特征和生理生化特征,以及序列测定和 16S rDNA 相似性比对结果,构建系统发育树,菌株 *Sf16* 与 *Streptomyces sp.* 的同源性达到 99%,初步鉴定其为链霉菌属的 *Streptomyces sp.*。

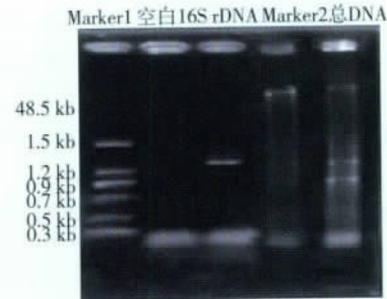


图 2 菌株 *Sf16* 的基因琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Gene by agarose gel electrophoresis of *Sf16*

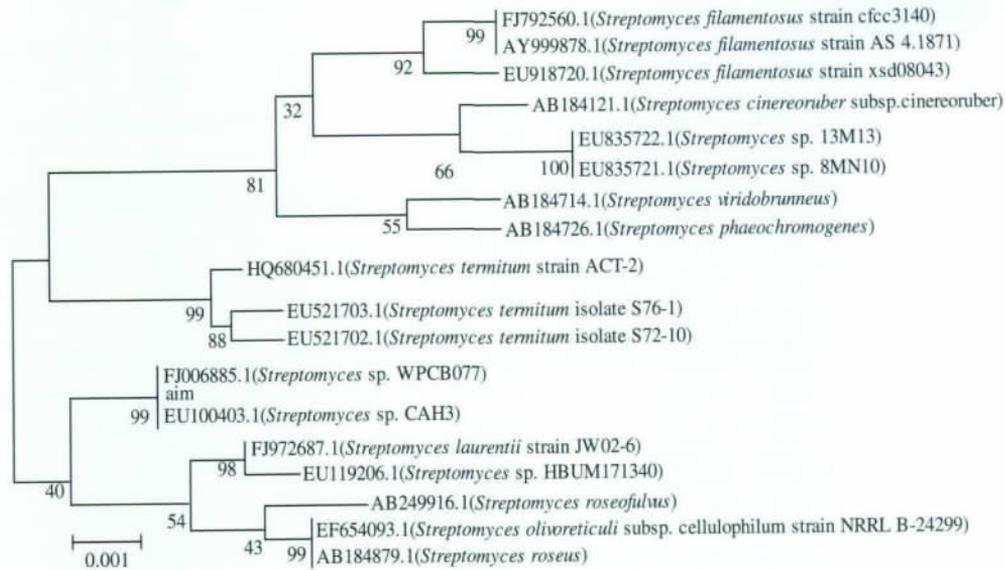


图 3 菌株 *Sf16* 的系统发育学地位

Fig. 3 Phylogenetic status of *Sf16*

### 3 结语

从自然界中的动植物中提取人类所需的物质,具有相对成本高,污染大且有季节和数量限制。而微生物具有宜培养、快速的生长和增殖等优点,将会是未来药物、酶制剂等领域的强大生产者。且目前国内大规模利用微生物工业生产脂肪酶抑制剂

鲜有报道。*Sf16* 菌株在高氏 号培养基上气生菌丝为白色,菌落为圆形,显微镜下孢子为卵圆形或者椭圆形,孢子丝有直、柔曲和螺旋形;纤维素上生长但是不分解,不水解络氨酸;能利用葡萄糖、淀粉等多种碳源。通过形态和生理生化及分子方面鉴定,初步鉴定其为产脂肪酶抑制剂的链霉菌属的 *Streptomyces sp.*。

### 参考文献:

[1] T Ellrott. Aktuelle medikamentöse ansätze in der Adipositas therapie[J]. *Deutsche Medizin*, 2000, 17(6):316-318.

[2] 王燕飞,郭贯新. 米胚芽中脂肪酶抑制剂的分离纯化[J]. *粮油食品科技*, 2006, 14(2):32-34.  
WANG Yan-fei, GUO Guan-xin. Purification and characterization of pancreatic lipase inhibitor derived from rice germ[J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2006, 14(2):32-34. (in Chinese)

[3] 吴子健,王宏,郑俊清,等. 葡萄籽浸提物对胰脂肪酶活性抑制的研究[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(9):83-86.  
WU Zi-jian, WANG Hong, ZHANG Jun-qing, et al. Effects of grape seeds extracts on pancreatic lipase activity [J]. *Food Research and Development*, 2009, 30(9):83-86. (in Chinese)

[4] 陈希平, 杨鹏, 张阳德. 荷叶中生物碱的分离纯化及脂肪酶活性抑制作用研究 [J]. *农业现代化研究*, 2009, 30 (6):748-751,760.

- CHEN Xi-ping, YANG Peng, ZHANG Yang-de. Studies on separation and purification of alkaloid from lotus leaves and inhibition effects of extracts on lipase activity [J]. **Research of Agricultural Modernization**, 2009, 30 (6): 748-751, 760. (in Chinese)
- [5] 沈莉, 王新亮, 王震, 等. 中药及天然产物在减肥领域的研究进展[J]. 中国医药技术经济与管理, 2007, 1(6): 23-29.  
SHEN Li, WANG Xin-liang, WANG zhen, et al. Progress in research of traditional Chinese medicine and natural products in antiobesity field[J]. **Chinese Journal of Pharmaceutical Technology Economics and Management**, 2007, 1(6): 23-29. (in Chinese)
- [6] 钟卫鸿, 卢静. 脂肪酶抑制剂产生菌筛选[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 27(11): 641-643.  
ZHONG Wei-hong, LU Jing. Screening of lipase inhibitor producing strain [J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2007, 27(11): 641-643. (in Chinese)
- [7] 颜震, 李海军, 朱希强, 等. Lipstatin 发酵工艺的优化[J]. 食品与药品, 2009(12): 5-7.  
YAN Zhen, LI Hai-jun, ZHU Xi-qiang, et al. Fermentation process optimization of lipstatin[J]. **Food and Drug**, 2009(12): 5-7. (in Chinese)
- [8] E B Shirling, D Gottlieb. Methods for characterization of streptomyces species [J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1966, 16(3): 313-340.
- [9] 张淑梅, 张龙, 戴世鲲. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 39-41.  
ZHANG Shu-mei, ZHANG Long, DAI Shi-kun. A quick and efficient method for genomic DNA extraction from *Actionbacteria*[J]. **Biotechnology**, 2007, 17(1): 39-41. (in Chinese)
- [10] 林稚兰, 黄秀琴. 现代微生物学与实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 192-201.
- [11] 李树, 陈旭升, 廖莉娟, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸产生菌的筛选方法改进[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(2): 282-287.  
LI Shu, CHEN Xu-sheng, LIAO Li-juan, et al. A protocol for screening of  $\epsilon$ -polylysine producing strains [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(2): 282-287. (in Chinese)
- [12] 蒋彦, 王小衍, 曹毅, 等. 基础生物信息学及应用[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003, 21-73.
- [13] 张萌, 赵伟全, 于秀梅, 等. 中国马铃薯疮痂病原菌 16S rDNA 的遗传多样性分析[J]. 农业科学, 2009, 42(2): 499-504.  
ZHANG Meng, ZHAO Wei-quan, YU Xiu-mei, et al. Genetic diversity of potato scab pathogens in China based on 16S rDNA sequences[J]. **Scientia Agricultura Sinica**, 2009, 42(2): 499-504. (in Chinese)

## 科 技 信 息

研究发现生物炼制产品木聚糖和甘露聚糖可作为食品包装材料

《食品科技动态》(Trends in Food Science & Technology) 杂志刊登一项未来用于可持续食品包装材料的未来生物精炼产品—木聚糖和甘露聚糖的研究。

研究发现,植物细胞壁多糖中含有丰富的木聚糖和甘露聚糖,可从农业和林业副产品中大量提取。木聚糖和甘露聚糖具有成膜性和生物降解性,可作为目前食品包装材料中石油产品的替代品。屏障性能、机械耐久性和热性能是确定木聚糖和甘露聚糖可用作食品包装材料的主要因素。研究表明,采用木聚糖、甘露聚糖制成的薄膜和涂层具有较低的氧气和油脂渗透性,在某些情况下,还具有相对较高的抗拉强度。木聚糖、甘露聚糖的化学结构,混合聚合物的使用,添加增强性纳米颗粒材料影响材料的性能。

[信息来源] Kirsi S. Mikkonen, Maija Tenkanen, Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans[J]. 2012, 28(12): 90-102.

欧盟修订食品添加剂双乙酸钾相关规定

据欧盟网站消息,1月17日欧盟委员会发布(EU)No 25/2013号法规,修订了食品添加剂双乙酸钾(potassium diacetate)相关的规定。

欧盟委员会认为,双乙酸钾是乙酸钾与乙酸的等分子化合物,将双乙酸钾的使用方法参照乙酸钾来执行不会对人体健康产生影响。基于此,欧盟委员会决定将法规附件中的双乙酸钾(E262)纳入乙酸钾(E261),将E261细分为E261(i)-乙酸钾、E261(ii)-双乙酸钾。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟修订食品添加剂双乙酸钾相关规定 [EB/OL]. (2013-1-18). <http://www.foodmate.net/news/yujing/2013/01/222465.html>.