

产共轭亚油酸乳酸菌的筛选及产物分析

张中义^{1,2} 胡锦涛¹ 刘萍¹ 苗士达¹ 柴秋儿¹ 孙君社¹

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083;

2. 郑州轻工业学院 食品科学与生物工程系,郑州 450002)

摘要 为获得共轭亚油酸(CLA)乳酸菌的菌种,从酸菜汁中筛选出1株CLA生成能力较强的乳酸菌,发酵液中CLA生成量为 $267.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。此株为革兰氏阳性杆菌,过氧化氢酶阴性,45℃下生长,15℃基本不生长。基于生化试验和培养基成分的利用情况,鉴定为植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*。经气相色谱检测,该菌种合成的CLA产物为c9,t11/t9,c11-CLA和t10,c12-CLA的混合物。

关键词 共轭亚油酸;乳酸菌;植物乳杆菌

中图分类号 Q939.117

文章编号 1007-4333(2004)03-0005-04

文献标识码 A

Screening of conjugated linoleic acid producing lactic acid bacteria and its product analysis

Zhang Zhongyi^{1,2}, Hu Jinrong¹, Liu Ping¹, Miao Shida¹, Chai Qiuer¹, Sun Junshe¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Department of Food and Biology Engineering, Zhengzhou Institute of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract The study was carried out to obtain conjugated linoleic acid (CLA) producing lactic acid bacteria. A lactic acid bacteria L₁₈ was isolated from pickle juice samples which have the higher value of CLA forming ability, its CLA production in the supernatant was $267.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The culture was found to be Gram positive, rods and catalase negative. It grew at 45℃ but not at 15℃, identified as *Lactobacillus plantarum*, on the basis of the biochemical characteristics and the utilization of substrates. The production of L₁₈ culture is the mixture of c9,t11/t9,c11-CLA and t10,c12-CLA by gas chromatography analysis.

Key words conjugated linoleic acid; lactic acid bacteria; *Lactobacillus plantarum*

共轭亚油酸CLA是一种在双键位置和几何构型上存在差异的亚油酸异构体混合物。近年来的许多研究表明,CLA的特定异构体具有促进健康的潜在功能,如抗动脉粥样硬化、增强免疫功能、减肥等^[1~3],同时,CLA还被认为是皮肤刺瘤、乳腺癌、结肠畸变、前列腺瘤和实验动物体内、人体乳腺癌细胞组织扩散的潜在抑制剂^[4]。由于CLA特有的生理作用,因此对CLA产品、富含CLA的发酵食品有潜在的市场需求。

CLA的异构体中,cis-9,trans-11十八碳二烯酸(c9,t11-18:2),具有重要的生理活性,是主要的异

构体。CLA可在强碱条件下通过异构化生成,但化学合成法的安全性受到质疑。共轭亚油酸可由丁酸弧菌(*Butyrivibrio species*)^[5]等瘤胃微生物转化多不饱和脂肪而获得,但是瘤胃菌是严格厌氧菌,培养困难,难以实现大规模生产。Jiang等人研究发现费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium fremdenreichii*)可以牛乳为培养基利用游离亚油酸产生CLA^[6]。近年来有报道,乳酸菌可以将游离亚油酸转化为CLA。目前,国内外乳酸菌合成CLA的研究尚处在菌种筛选和转化条件研究阶段,原始菌株发酵液中CLA生成量最高为 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。为此,笔者从酸菜汁样

收稿日期:2004-02-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20376084)

作者简介:张中义,副教授,博士研究生;孙君社,教授,博士生导师,主要从事食品与生物工程的研究,E-mail:sunjsh61@263.net

品中筛选出1株生成CLA能力较强的乳酸菌。

1 材料与方法

1.1 材料

样品:酸菜汁,自购。

培养基:MRS肉汤培养基,pH6.5。

试剂:API 50 CHL 液体培养基和 API 50 CH 菌种鉴定试剂条,法国 bioMerieux sa 公司产品;亚油酸,质量分数99%,密度 $0.9\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$;CLA 甲酯混合标样由 cis9,trans11/trans9,cis11-CLAMe 和 trans10,cis12-CLAMe 组成,质量分数99%,Sigma 公司产品。其他试剂均为分析纯。

仪器:TU-1901 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司。日本岛津 GC-4CM 气相色谱仪,手动进样,载气为高纯 N_2 ;JS-3050 色谱工作站,大连江申分离科学公司;氢火焰离子化检测器 FID,燃气 H_2 ,助燃气空气。

分析条件:熔融石英毛细管柱 FFAP($d\ 0.53\text{ mm}\times 30\text{ m}\times 1.0\ \mu\text{m}$),兰州化学物理所生产;固定柱温 195°C ,柱前压力 40 kPa ,柱流速 $17\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,分流比 $6.3:1$,进样温度 250°C ,检测器温度 250°C ,空气压力 50 kPa ,氢气压力 60 kPa ,氮气压力 400 kPa ,每次进样量 $2\ \mu\text{L}$ 。面积采用归一化法计算。

1.2 筛选及分析方法

1) 酸菜汁中细菌的分离。将酸菜汁接种于 MRS 肉汤液体培养基中,增殖培养后,倾注法倒 MRS 琼脂平板,37 $^\circ\text{C}$ 培养后,挑取单菌落接种于 MRS 琼脂斜面上保存。

2) CLA 紫外吸收标准曲线的测定。以正己烷为溶剂,将 CLA 标样配成不同浓度的溶液,以正己烷为参比,在 233 nm 处测定其吸收值,以 CLA 浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

3) 菌种的筛选。菌种在 MRS 液体培养基中 37 $^\circ\text{C}$ 条件下 2 次活化。带螺帽的试管($d16.5\text{ mm}\times 125\text{ mm}$)中装入 5 mL MRS 培养基,培养基中亚油酸的质量浓度为 $0.1\text{ g}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$,菌种接种量为 1%(体积分数)接种后进行发酵,发酵条件 37 $^\circ\text{C}$,24 h,振荡频率 $120\text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$ 。发酵结束后,正己烷萃取发酵液,萃取液水洗 2 次,加入无水硫酸钠吸水干燥,用正己烷定容至 25 mL ,混匀,备检测。

紫外分光光度计在 $200\sim 350\text{ nm}$ 范围内对样品

扫描,观察在 233 nm 处有无特征吸收峰。有特征吸收峰者表明其发酵液中有 CLA 生成,读取 233 nm 处的吸收值,根据标准曲线计算发酵液中 CLA 的生成量。以不接种的培养基为参比,培养基加入与样品同量的亚油酸,不接菌种,其他步骤同样品。

4) 菌种的菌落和形态特征。分离出的细菌培养物在 MRS 琼脂平板上划线,培养后观察菌落特征。涂片后革兰氏染色,显微镜下观察细胞形态特征。

5) 菌种的鉴定。分离出的菌种培养后接入 API 50CHL 液体培养基中,制成菌悬液后接入 API 50CH 菌种鉴定试剂条,用无菌液体石蜡封口,37 $^\circ\text{C}$ 培养 36~48 h,检测菌种对 49 种碳水化物的利用情况。采用 IBIS (intelligent bacteria identification system, the netherlands) 软件系统^[7]对菌种进行鉴定。

6) 洗涤细胞的制备。筛选出的菌种在 MRS 液体培养基中 2 次活化,菌种接种量 1%(体积分数)接入 500 mL MRS 肉汤液体培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h,振荡频率 $120\text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$ 。培养结束后离心(10 kg ,15 min,4 $^\circ\text{C}$)收集细胞。收集的细胞用生理盐水洗涤 2 遍,作为洗涤细胞制备 CLA。

7) 用洗涤细胞制备 CLA 的条件。反应液为 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸钾缓冲液,pH 6.5,在带有螺旋帽的试管($d16.5\times 125\text{ mm}$)中微氧条件下进行,进行前用高纯氮气去除试管内的空气。

每管反应物的体积为 5 mL ,每 100 mL 反应混合物的组成为,亚油酸 LA 0.5 g 、牛血清白蛋白 BSA 0.1 g 、洗涤细胞 10 g 。37 $^\circ\text{C}$ 下反应 44 h,振荡频率 $120\text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

8) 脂肪酸的甲酯化和气相分析。向洗涤细胞反应混合物中加入氯仿和甲醇混合物,体积比为氯仿:甲醇=2:1,萃取,收集下层液体,冷冻离心(10 kg ,15 min,4 $^\circ\text{C}$)后,再用无水硫酸钠干燥,旋转蒸发仪 30 $^\circ\text{C}$ 下蒸发脱除溶剂,将残余物转移到带螺旋帽的试管中,用氮气吹干。取样品 50 mg 置于烧瓶中,加入 50 mL 盐酸甲醇溶液,100 $^\circ\text{C}$ 加热 10 min 进行甲酯化^[8];加入 100 mL 蒸馏水,将溶液移入分液漏斗中,加入 30 mL 正庚烷,振荡后静置,收集庚烷层;用 30 mL 庚烷再次萃取水层,合并 2 次庚烷萃取物,水洗至中性。用无水硫酸钠干燥后,在氮气保护下将溶液蒸发至约 20 mL ,用气相色谱确定 CLA 异构体的生成量。

2 结果与讨论

2.1 CLA 紫外吸收标准曲线

CLA 紫外吸收标准曲线的线性回归方程为 $A = 0.0988C - 0.0284$, 式中 A 为 233 nm 处紫外吸收光值, C 为 CLA 的质量浓度, 线性范围 $0 \sim 15.000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 菌种的筛选

紫外分光光度计检测发酵液中 CLA 的生成量。从 20 个酸菜汁样品中共分离出 24 株 CLA 生成能力较强的乳酸菌, 其生成量为 $62.68 \sim 267.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。图 1 示出 24 株乳酸菌的 CLA 生成量, 其中菌种 L₁₈ 的最高。

2.3 菌种的鉴定

菌种 L₁₈ 培养物的菌落呈凸起、圆形、光滑、白色, 培养液中生长物浑浊, 兼性厌氧。菌体圆而短直,

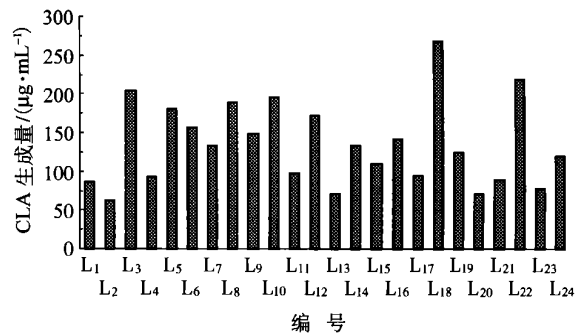


图 1 菌种发酵液 CLA 的生成量

Fig. 1 Amount of CLA isolated strain liquid culture 为革兰氏阳性杆菌, 菌体宽 $0.9 \sim 1.2 \mu\text{m}$, 长 $2 \sim 6 \mu\text{m}$, 单个、成对排列或呈短链状; 过氧化氢酶阴性, 不产芽孢, 45 °C 生长, 15 °C 基本不生长。基于其对底物的利用情况(表 1)可确定菌种 L₁₈ 为植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*, 置信度 96.1%。

表 1 菌种 L₁₈ 对碳水化合物的利用

Table 1 Utilization of carbohydrate substrates

化合物	反应	化合物	反应	化合物	反应	化合物	反应	化合物	反应
甘油	+	赤藓糖	-	熊果甙	+	苦杏仁甙	+	L-阿拉伯糖	+
核糖	+	阿东醇	-	七叶灵	+	纤维二糖	+	D-阿拉伯糖醇	+
果糖	+	半乳糖	+	麦芽糖	+	牻牛儿糖	+	L-阿拉伯糖醇	-
肌醇	-	葡萄糖	+	蜜二糖	-	D-岩糖	-	-甲基-D-木糖甙	-
柳醇	+	甘露糖	+	海藻糖	+	L-岩糖	-	-甲基-D-甘露糖甙	+
乳糖	+	山梨糖	-	松三糖	+ -	D-松二糖	-	-甲基-D-葡萄糖甙	-
蔗糖	+	鼠李糖	+	棉子糖	-	D-来苏糖	-	N-乙酰-葡糖胺	+
菊糖	-	卫茅醇	-	木糖醇	-	D-塔格糖	-	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
淀粉	-	甘露醇	+	D-木糖	+	葡萄糖酸盐	+	5-酮基-葡萄糖酸盐	-
糖原	-	山梨醇	+	L-木糖	-	D-阿拉伯糖	-		

注: + 为可利用此碳水化合物生长, 反应呈阳性; - 为不利用此碳水化合物生长, 反应呈阴性。

2.4 CLA 的气相分析

菌种 L₁₈ 的洗涤细胞制备 CLA 的气相色谱检测结果见图 2。其中峰 为 c9, t11/t9, c11-CLA, 质量分数 6.343%, 出峰时间 34.078 min; 峰 为 t10, c12-CLA, 质量分数 14.023%, 出峰时间 35.475 min。其他峰: 峰 为棕榈酸, 质量分数 0.462%, 出峰时间 11.80 min; 峰 为油酸, 质量分数 1.630%, 出峰时间 23.018 min; 峰 为亚油酸, 质量分数 30.788%, 出峰时间 25.832 min; 41.808 min 洗脱出的峰 可能是合成 CLA 过程的中间产物^[9]。从气相色谱图看, 当反应进行到 44 h 时, 体系中尚有 30% 的亚油酸尚未转化, 今后的研究应考虑延长反应时间和优化反应条件以进一步提高转化率。目前

由微生物生产的 CLA 成本较高, 但较强碱条件下采用异构化方法制备 CLA 安全, 且乳酸菌不需要严格

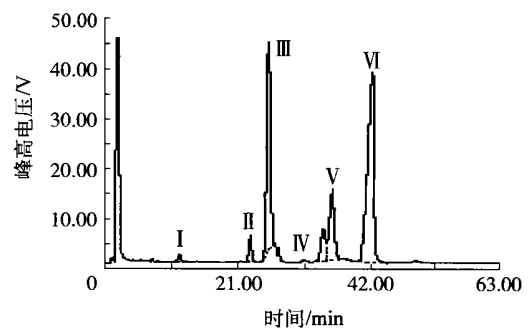


图 2 气相色谱图

Fig. 2 Gas chromatography analysis of CLA methyl ester

的厌氧条件,更易生长。

3 结束语

本研究从酸菜汁样品中分离出了1株CLA生成能力较高的乳酸菌,发酵液中CLA的生成量为 $267.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,鉴定后确定其为植物乳杆菌 *L. plantarum*。经气相色谱检测产物中的CLA为c9, t11/t9, c11-CLA和t10, c12-CLA的混合物。该菌种有望作为乳制品的发酵剂和合成CLA的酶制剂来源。

洗涤细胞制备CLA时,反应时间44h时,反应体系中尚有30%的亚油酸未转化,说明应对所选取的反应条件和时间进行改进和优化研究,以进一步提高底物的转化率和产物得率。

参 考 文 献

- [1] Nicolosi R J, Rogers E J, Kritchevsky D, et al. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hyper-cholesterolaemic hamsters[J]. *Artery*, 1997, 22(1): 266 ~ 277
- [2] Hayek M G, Han S N, Wu D, et al. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCRIBR mice [J]. *Journal of Nutrition*, 1999, 129(1): 32 ~ 38
- [3] Park Y, Albright K J, Liu W, et al. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice[J]. *Lipids*, 1997, 32(3): 853 ~ 858
- [4] Visonneau S, Cesano A, Tepper S A, et al. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice [J]. *Anticancer Research*, 1997, 17(3): 969 ~ 973
- [5] Fogarty A C, Ford G L, Svoronos D. Octadeca-9, 11-dienoic acid in food stuffs and in the lipids of human blood and breast milk[J]. *Nutr Rep Int*, 1988, 38(3): 937 ~ 944
- [6] Jiang J, Bjorck L, Fonden R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures[J]. *J Appl Microbiol*, 1998, 85(1): 95 ~ 102
- [7] Wijtzes T, Bruggeman M R, Nout M J, et al. A computerised system for the identification of lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 38(1): 65 ~ 70
- [8] GB/T 17376—1998 动植物油脂脂肪酸甲酯制备[S]
- [9] Ogawa J, Matsumura K, Kishino S, et al. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during micro-aerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Appl and Environ Microbiol*, 2001, 67(3): 1246 ~ 1252