

产共轭亚油酸乳酸菌的 选育及培养基的确定

于国萍, 寇秀颖

(东北农业大学食品学院 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 共轭亚油酸(conjugated linoleic acid 简称 CLA)是一种具有多种生理活性的天然脂肪酸。用气相色谱法对十八株乳酸菌产共轭亚油酸的能力进行比较,发现十四株乳酸菌具有明显的产共轭亚油酸的能力,其中德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L.delbrueckii subsp.bulgaricus*)₁₂的产量最高,为4.06 μ g/mL,并且在MRS培养基的基础上确定了乳酸菌产共轭亚油酸的最佳碳源为果糖,氮源为硫酸铵。

关键词: 共轭亚油酸, 乳酸菌, 培养基

Abstract: Conjugated linoleic acid (CLA) is natural fatty acid that has a great variety of physiological activity. The investigation determined CLA-producing capacity of eighteen lactic acid bacteria. The level of CLA formation was determined by gas chromatography. There were fourteen lactic acid cultures that could produce conjugated linoleic acid. *L.delbrueckii sub sp.* and *L. bulgaricus a₂* have the highest level of conjugated linoleic acid, the level was 4.06 μ g/mL. The optimal medium with which lactic acid bacteria could produce conjugated linoleic acid was MRS medium; carbon source was fructose; nitrogen source was ammonia sulfate.

Key words: conjugated linoleic acid; lactic acid bacteria; medium

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2005)05-0060-03

共轭亚油酸是一类含共轭双键的18碳脂肪酸的总称^[1,3],是必需脂肪酸亚油酸的异构体,天然亚油酸是顺-9,顺-12十八碳二烯酸,它异构化形成的CLA因双键位置和顺反构型的不同,形成多种异构体,其中顺-9,反-11和反-10,顺-12是具有生理活性的异构体。近年来关于它的生理功能科学家们已达成一致:抗癌作用,抗氧化作用,抑制脂肪积累作用,改善骨组织代谢,促进生长因子作用,增强机体免疫力,防霉变的作用^[2,3]。

收稿日期: 2004-09-29

作者简介: 于国萍(1963-),女,教授,研究方向:食品科学。

基金项目: 国家教委跨世纪人才基金资助项目。

目前,生产CLA主要是通过化学法,其缺点是对产物中各种构型的CLA无选择性,得到的是一系列位置和几何异构体的混合物。20世纪90年代后期,Lin等报道了几种乳酸菌具有将亚油酸转化为CLA的能力,其产物中顺-9,反-11和反-10,顺-12CLA的含量占总CLA的90%以上,证明了生物法与化学法相比,具有选择性合成活性CLA的优点^[4]。

CLA作为一种新型的营养保健品,在医药及食品工业领域中前景广阔。由于其异构体组成单一,与天然植物中的CLA异构体组成相似,因此用生物学方法生产CLA是将来的发展方向。本实验比较了十八株乳酸菌产CLA的能力,筛选出了产量最高的菌株,并且确定了乳酸菌产CLA的最适培养基。实验中所用的乳酸菌为兼性厌氧菌,易培养,无毒,可食用,因此本实验具有较高的实际价值和应用前景。

1 材料与方法

1.1 菌株

嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*)_{1, 2};嗜热链球菌(*streptococcus thermophilus*)_{1, 2};德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L.delbrueckii subsp.bulgaricus*)_{1, 2, 3};乳酸乳球菌乳酸亚种(*L.Lactis subsp.Lactis*)_{1, 4};乳酸乳球菌乳脂亚种(*L.Lactis subsp.crcmoris*)₂;无乳链球菌(*streptococcus agalactiae*)₃;瑞士乳杆菌(*L.helveticus*)₁;乳酸乳球菌(*Lactococcus Lactis*)₂;发酵乳杆菌(*L.fermentum*)₁;布氏乳杆菌(*L.buchneri*)₂;德氏乳杆菌德氏亚种(*L.delbrueckii subsp.delbrueckii*)₁;乳酸链球菌(*streptococcus Lactis*)₁;干酪乳杆菌干酪亚种(*L.casei subsp.casei*)₁均购于中科院微生物所。

1.2 培养基与培养方法

1.2.1 培养基 MRS培养基、脱脂乳培养基。

1.2.2 培养方法 100mL三角瓶装38mL培养基,接菌量为5%,混匀,静止培养24h,对照为三角瓶内装

40mL 培养基,不接菌,与菌种在同样温度下培养。 $s_1, s_2, c_1, c_2, a_1, a_2, a_3, r_1, r_2, f_1, f_2, h_1, g_1, d_1$ 的培养温度为 37°C , d_1, d_4, d_2, d_3 培养温度为 30°C 。

1.3 脂类提取

培养后的菌液离心,所得上层液体和下层细胞分别进行处理^[5]。上层液体用正己烷萃取,有机相用无水硫酸钠过滤后放入圆底烧瓶中^[6,7]。菌液再用正己烷洗涤一次,合并有机相。下层细胞用超声波破壁,再用正己烷萃取,也用正己烷洗涤一次,合并有机相。

1.4 甲酯化处理

上层的有机相减压浓缩后加入 1mL 苯和 1mL 石油醚,混匀后加入 2mL 0.4mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液^[8]。在室温下静置 30min,然后加入蒸馏水,离心,取出上层清液,用石油醚洗涤后合并清液用于气相色谱分析。下层细胞提取液的处理方法同上层。

1.5 CLA 含量的测定

1.5.1 气相色谱条件 气相色谱仪为岛津 GC-14C,检测器为氢火焰离子化检测器;毛细管柱(30m \times 0.53mm);载气为氮气,流速为 3.3mL/min;空气压力为 60kPa、氢气压力为 50kPa;柱温 200°C ,检测器和汽化室温度为 250°C 。进样量为 1 μL 。

1.5.2 样品分析 将内标物十七烷酸甲酯配成 2mg/mL 的溶液,再将甲酯化的 CLA 标准品(浓度为 10mg/mL)与内标物十七烷酸甲酯等体积混合,进行气相色谱分析(两者混合进样的色谱图见图 1)。样品甲酯化后用氮气吹干,然后用内标物十七烷酸甲酯定容至 150 μL ,根据色谱图的保留时间和峰面积进行定性和定量分析。

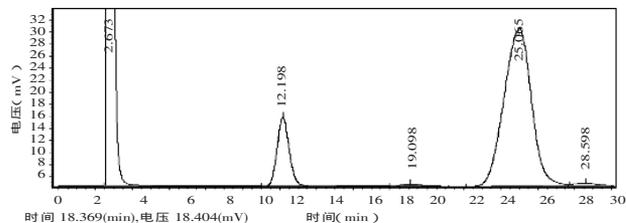


图 1 甲酯化 CLA 标品与内标物十七烷酸甲酯混合后的分离色谱图

注:12.198 为内标物十七烷酸甲酯;25.065 为 CLA

2 结果与讨论

2.1 产共轭亚油酸的乳酸菌的选育

在相同条件下分别接种十八株乳酸菌,样品处理后用气相色谱进行分析,根据峰面积用内标法计算出 CLA 的含量。对照为培养基不接菌,其它处理方法同样品。用 SPSS 软件对数据进行相关性分析。十八株乳酸菌的 CLA 的产量比较见表 1。

测得培养基中的 CLA 产量为 $1.20\mu\text{g/mL}$,可能是由培养基中原料带来的。所测的十八株乳酸菌中,

d_1, d_2, d_3, a_3 的 CLA 含量与培养基之间的差异不显著,说明这四株菌无明显的产 CLA 的能力。其余十四株菌都具备显著的产 CLA 的能力,同时也筛选出了产量最高的菌株 a_2 ,产量为 $4.06\mu\text{g/mL}$ 。并且在对上层菌液和下层细胞进行分析时,发现上层菌液的 CLA 产量远高于下层细胞的产量,说明乳酸菌产的 CLA 主要存在于细胞外相中。

表 1 十八株乳酸菌的 CLA 产量

	CLA 产量($\mu\text{g/mL}$)
对照	$1.20^{ab}\pm 0.15$
d_1	$1.39^{abc}\pm 0.18$
d_2	$1.03^a\pm 0.15$
d_3	$1.35^{abc}\pm 0.26$
a_3	$1.44^{abcd}\pm 0.22$
r_1	$1.66^{cd}\pm 0.29$
c_2	$1.58^{cd}\pm 0.30$
r_2	$1.73^d\pm 0.13$
g_1	$2.17^e\pm 0.14$
d_4	$2.61^f\pm 0.18$
f_2	$2.90^h\pm 0.12$
h_1	$2.06^e\pm 0.13$
a_1	$2.62^f\pm 0.17$
a_2	$4.06^g\pm 0.16$
s_1	$3.36^f\pm 0.25$
c_1	$3.12^{ef}\pm 0.14$
s_2	$2.18^e\pm 0.19$
d_3	$3.14^{ef}\pm 0.16$
f_1	$3.13^{ef}\pm 0.13$

注:文中所有数据均为三次平均值。

2.2 乳酸菌产 CLA 的最适培养基的确定

以产量最高的菌株 a_2 为出发菌株,在培养条件一致的情况下比较其在脱脂乳和 MRS 培养基中的 CLA 产量,结果见表 2。

表 2 脱脂乳与 MRS 培养基中的 CLA 的产量比较

培养基	CLA 产量($\mu\text{g/mL}$)
脱脂乳培养基	0.68
MRS 培养基	2.86

从表 2 可以看出,MRS 培养基中的 CLA 产量远大于脱脂乳培养基中的 CLA 产量,说明与脱脂乳相比,MRS 培养基是产 CLA 的最适宜的培养基。

2.3 培养基的优化

2.3.1 碳源的确定 在添加量一定的情况下,分别选取葡萄糖、D-果糖、D-木糖、D-半乳糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、乳糖、甘露醇和葡萄糖/果糖(1:1)为碳源接种 a_2 ;在培养条件相同的前提下根据最终的 CLA 产量来确定最佳的碳源;各种碳源的比较结果见表 3。

由表 3 可以看出,乳酸菌在果糖中的 CLA 产量最高为 $3.14\mu\text{g/mL}$,并且与在其它碳源中的产量相比差异显著,说明果糖为乳酸菌产 CLA 的最佳碳源。

2.3.2 氮源的确定 MRS 培养基中在牛肉粉固定的

表3 各种碳源的CLA产量比较

碳源	CLA产量($\mu\text{g}/\text{mL}$)
D-木糖	2.18 ^b ±0.27
D-半乳糖	1.70 ^{ab} ±0.49
甘露醇	2.19 ^b ±0.24
葡萄糖	1.59 ^{ab} ±0.61
D-果糖	3.14 ^c ±0.05
蔗糖	1.27 ^a ±0.55
麦芽糖	2.38 ^b ±0.35
可溶性淀粉	1.29 ^a ±0.45
乳糖	1.83 ^{ab} ±0.12
葡萄糖/果糖(1:1)	2.15 ^b ±0.18

前提下,选取大豆蛋白胨、多价胨、聚蛋白胨、胰蛋白胨、硫酸铵、干酪素、蛋白胨、乙酸铵和水解乳蛋白共九种氮源,以最后的CLA产量作为衡量标准来选取最佳的氮源。 a_2 菌在各种氮源中的CLA产量见表4。

表4 a_2 菌在各种氮源中的CLA产量

氮源	CLA产量($\mu\text{g}/\text{mL}$)
水解乳蛋白	2.30 ^b ±0.03
多价胨	1.34 ^a ±0.18
大豆蛋白胨	2.01 ^{ab} ±0.43
蛋白胨	2.21 ^b ±0.22
聚蛋白胨	1.93 ^{ab} ±0.50
胰蛋白胨	2.47 ^b ±0.15
干酪素	2.42 ^b ±0.19
硫酸铵	2.72 ^b ±0.38
乙酸铵	2.16 ^b ±0.71

由表4可以看出,硫酸铵作为氮源时CLA的产量最高,但是与其它氮源相比差异不显著,说明各种氮源对CLA的产量影响不是很大。考虑到培养基中的牛肉粉是有机物,硫酸铵是无机盐,两者结合使用更有利于乳酸菌生长。而硫酸铵作为氮源时CLA的产量也最高,因此选取硫酸铵为氮源。

2.3.3 果糖和硫酸铵添加量的确定 改变果糖和硫酸铵的添加量,考察碳源和氮源的添加量对CLA产量的影响,结果见表5和表6。

表5 果糖添加量对CLA产量的影响

果糖添加量(%)	CLA产量($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.5	1.59 ^a ±0.31
1	1.59 ^a ±0.21
1.5	2.41 ^b ±0.14
2	2.48 ^b ±0.17

表6 硫酸铵添加量对CLA产量的影响

硫酸铵添加量(%)	CLA产量($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	1.96 ^a ±0.11
1.5	1.76 ^a ±0.08
2	1.71 ^a ±0.16

由表5可见,果糖添加量为1.5%和2%的CLA产量之间差异不显著。从经济角度考虑选用1.5%的添加量。由表6可以看出,在硫酸铵的添加量为1%

时CLA产量最大,硫酸铵的添加量增加CLA产量反而有所减少。可能是硫酸铵作为氮源时,由于 NH_4^+ 被吸收会导致培养基的pH下降,而pH下降不利于CLA的产生。因此选用1%的添加量。

3 结论

本实验证实了利用乳酸菌发酵能产生CLA,不同乳酸菌产生CLA的能力不同,选出了产量最高的菌株 a_2 ,并且确定了乳酸菌产CLA的最佳培养基为MRS培养基,在确定培养基的基础上对其碳源和氮源进行筛选,选出了最适合产CLA的碳源和氮源:果糖和硫酸铵,而且确定了果糖的添加量为1.5%,硫酸铵的添加量为1%。实验中对于CLA的测定选用了气相色谱法,与以前常用的紫外吸收法比较,气相色谱法具有更高的精确性,并且所用的内标法抵消了色谱条件变化对测量结果的影响,较好的克服了实验过程中的系统误差。优化的气相色谱条件使内标物十七烷酸甲酯与其它脂肪酸完全分离,不受样品中其他组分的影响,保证了CLA定量测量的准确性。

参考文献:

- [1] Y J Kim R H Liu. Increase of Conjugated Linoleic Acid Content in Milk by Fermentation with Lactic Acid Bacteria[J]. Food Science,2002,67(5):1731~1737.
- [2] Jun Ogawa, Kenji Matsumura, Shigenobu Kishino, Yoriko Omura, Sakayu Shimizu. Conjugated Linoleic Acid Accumulation Via 10-Hydroxy-12-Octadecaenoic Acid during Microaerobic Transformation of Linoleic Acid by Lactobacillus acidophilus[J]. Applied and Environmental Microbiology,2001,67(3):1246~1252.
- [3] Tung Y Lin, Chin-Wen Lin, Chien-Hsing Lee. Conjugated Linoleic acid Concentration as Affected by Lactic Cultures and Added Linoleic Acid[J]. Food Chem,1999,67(4):1~5.
- [4] 邵群,边际,马丽,等.乳酸菌发酵产共轭亚油酸条件的研究[J].山东师大学报,2001,16(4):443~446.
- [5] J Jiang, L Bjorck R Fonden. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures [J]. Journal of Applied Microbiology,1998,85(5):95~102.
- [6] Tung Y Lin. Conjugated Linoleic Acid Concentration as affected by lactic cultures and additives[J]. Food Chem,2000,69(8):27~31.
- [7] Hui Lin, Terri D Boylston, Lloyd O Luedecke, Terry D Shultz. Factors Affecting the Conjugated Linoleic Acid Content of Cheddar Cheese [J]. American Chemical Society, 1998,46(3):801~807.
- [8] 咸漠,康亦廉,刘延.菌油脂肪酸减法甲酯化的研究[J].吉林大学学报(自然科学版),2001(1):103~105.