

瑞士乳杆菌 L7 生物转化共轭亚油酸的研究

刘晓华 曹郁生 陈 燕

(南昌大学中德联合研究院,食品科学教育部重点实验室,南昌,330047)

摘 要 建立了瑞士乳杆菌 L7(*Lactobacillus helveticus* L7)分批发酵生物转化 $c9, t11$ -CLA 的优化条件:MRS 培养基、30℃ 发酵、静置培养、LA 浓度为 1.000 mg/mL、发酵时间 36h。5L 发酵罐分批发酵时, $c9, t11$ -CLA 的产量高达 0.572 mg/mL。

关键词 瑞士乳杆菌 L7、共轭亚油酸、生物转化

共轭亚油酸(CLA)的制备方法有 2 种,一种是化学异构法,另一种是生物转化法。化学异构法需要在碱性条件、高温和一定压力下进行,但其产生的 CLA 异构体组成复杂^[1,2],给食品、医药方面高端产品的开发应用带来了困难。生物转化法反应条件温和,异构体组成较单一,因而有利于产品的开发应用。为了筛选到产单一 CLA 异构体的菌株,人们已进行了较多的研究工作,生产水平普遍较低,文献报道的 CLA 产量为 0.004~0.3 mg/mL^[3~9]。前期工作中,筛选到 1 株生物转化产 $c9, t11$ -CLA 能力较高的乳杆菌 *L. helveticus* L7。为进一步提高产率,本研究对 *L. helveticus* L7 分批发酵生物转化生产 $c9, t11$ -CLA 的条件进行优化,并在 5L 自动发酵罐上进行放大试验,产量高达 0.572 mg/mL。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种和培养基

L. helveticus L7(本实验室分离的高产 CLA 菌株),MRS 改良培养基^[10],其组成根据试验要求做相应变化。

1.1.2 仪器和试剂

电热恒温培养箱、恒温摇床、超纯水制备器、高效液相色谱仪(Sykm, S1121)、紫外可见分光光度计(Amersham Pharmacia, 4300 Pro)、5L 发酵罐(B.E.M., NDL-8C)。亚油酸(LA,自制,纯度>95%)、 $c9, t11$ -CLA(纯度>98%,南昌华兴生物科技有限公司)、正己烷(HPLC 纯)、乙腈(HPLC 纯)、大豆蛋白胨和牛肉提取物(BR,北京双旋微生物培养基制品厂)、酵母提取物(BR,上海蓝季科技发展有限公司),其余试剂均为国产分析纯。

第一作者:博士,讲师。

收稿日期:2006-06-27,改回日期:2006-07-31

1.2 方 法

1.2.1 培养方法

将培养基分装于 20 mL 试管中,每管 4.6 mL,接种 200 μ L,同时加入一定量的亚油酸溶液,混匀,在一定温度下培养一定时间。

1.2.2 CLA 分析

HPLC 法,色谱柱:ChromSpher 5 Lipids,流动相:正己烷:乙腈=99.9:0.1,检测波长:233nm^[11]。

1.2.3 数据处理

每组试验重复 3 次,采用单因素完全随机设计,通过 SPSS10.0 进行方差分析,用 Duncan's 法进行多重比较,显著水平取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 分批发酵单因素条件优化

2.1.1 培养基组成对 $c9, t11$ -CLA 生成的影响

分别以葡萄糖、乳糖、蔗糖、淀粉为培养基的唯一碳源,结果发现在葡萄糖为碳源的培养基上,*L. helveticus* L7 生物转化的 $c9, t11$ -CLA 最多,且与其他碳源有显著差异($P<0.05$)。

以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源的培养基上不生成 $c9, t11$ -CLA。在大豆蛋白胨为氮源的培养基上生成量很少。在以牛肉提取物或酵母提取物为氮源的培养基上生成量较多。对照组(MRS 培养基)生成的 $c9, t11$ -CLA 最多($P<0.05$)。

当 C/N 大于 1:2 时,生成很少的 $c9, t11$ -CLA。当 C/N 为 1:5 或 1:6 时,生成量显著增加。因此此时氮源已能很好的满足菌体生长的需要,若继续增加氮源会增加生产成本。

2.1.2 发酵温度对 $c9, t11$ -CLA 生成的影响

发酵温度 30℃ 时,*L. helveticus* L7 生成的 $c9, t11$ -CLA 最多($P<0.05$)。当温度降至 23℃ 时,菌体量显著减少,生成的 $c9, t11$ -CLA 量也显著减少。

发酵温度为 44℃ 时菌体量有所降低,但其生成的 $c9, t11$ -CLA 量显著减少($P < 0.05$)。由图 1 可知, *L. helveticus* L7 的最适生长温度为 37℃,但菌体中参与生成 $c9, t11$ -CLA 的酶的最适反应温度低于 37℃。

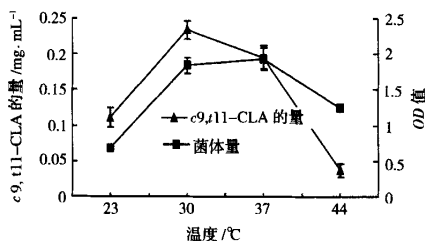


图 1 发酵温度对 *L. helveticus* L7 生成 $c9, t11$ -CLA 的影响

2.1.3 LA 浓度对 $c9, t11$ -CLA 生成的影响

当 LA 浓度为 1.5 mg/mL 时, *L. helveticus* L7 生长受到显著的抑制,生成的 $c9, t11$ -CLA 量很少。随 LA 浓度的逐步降低,菌体量逐步增加,当 LA 浓度为 0.500 mg/mL 时生成的 $c9, t11$ -CLA 量显著增多(如图 2),但 LA 浓度为 0.500 mg/mL 和 1.000 mg/mL 时生成的 $c9, t11$ -CLA 量无显著差异($P > 0.05$)。

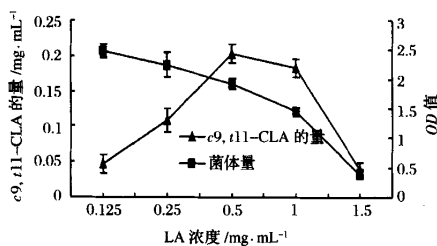


图 2 LA 浓度对 *L. helveticus* L7 生成 $c9, t11$ -CLA 的影响

2.1.4 通气量对 $c9, t11$ -CLA 生成的影响

以改变摇床转速研究通气量对 $c9, t11$ -CLA 生成的影响。随转速的增加,生成的 $c9, t11$ -CLA 量显著减少($P < 0.05$) (见图 3)。转速增加,发酵液中的溶氧量增加,促进了 LA 的氧化分解。因此,不通气时,即静置培养有利于 $c9, t11$ -CLA 的生成。

2.1.5 发酵时间对 $c9, t11$ -CLA 生成的影响

发酵前 24h,菌体量不断增加,随着时间的延长,菌体量开始下降,CLA 产量增加,到 28h 时,生成的 $c9, t11$ -CLA 量最大($P < 0.05$) (见图 4),这可能是老龄菌体自溶释放出更多的酶,促进了 LA 的转化。当时间超过 32h 时, $c9, t11$ -CLA 的量快速下降,可能是 $c9, t11$ -CLA 被微生物利用或转化成其他物质。

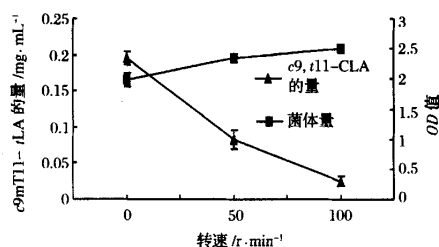


图 3 通气量对 *L. helveticus* L7 生成 $c9, t11$ -CLA 的影响

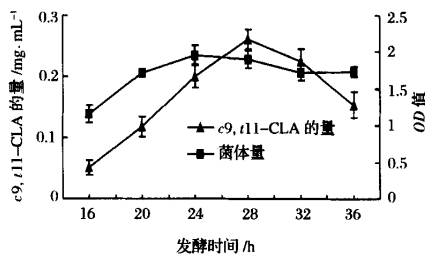


图 4 发酵时间对 *L. helveticus* L7 生成 $c9, t11$ -CLA 的影响

通过单因素条件研究,初步找到了分批发酵生物转化 $c9, t11$ -CLA 的优化条件,LA 浓度和发酵时间还需进一步优化。

2.2 分批发酵的正交试验

根据分批发酵的单因素实验结果,在 30℃ 下,静置培养,考察 C/N、LA 浓度和发酵时间的交互作用,以确定 3 因素的最优条件。采用四因素三水平正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交试验,正交试验的因素水平编码表见表 1,正交试验方案和结果见表 2。

表 1 分批发酵 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平编码表

水 平	因 素			
	C/N (A)	LA 浓度(B) /mg·mL ⁻¹	发酵时间(C) /h	空 白 (D)
1	1:3	0.500	28	
2	1:4	0.750	36	
3	1:5	1.000	44	

结果表明,影响 *L. helveticus* L7 分批发酵生成 $c9, t11$ -CLA 的因素主次顺序为: B>A>C, 即: LA 浓度>C/N>发酵时间。方差分析表明,LA 浓度的影响有显著差异($P < 0.05$)。最优的组合条件为 $A_3B_3C_2$ 。通过优化,确定了分批发酵的条件: MRS 培养基、30℃ 发酵、静置培养、LA 浓度为 1.000 mg/mL、发酵 36 h。

表2 分批发酵的正交试验方案和结果

试验号	A	B	C	D	c9, ι 11-CLA 产量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	1	1	1	1	0.113
2	1	2	2	2	0.175
3	1	3	3	3	0.250
4	2	1	2	3	0.147
5	2	2	3	1	0.203
6	2	3	1	2	0.429
7	3	1	3	2	0.115
8	3	2	1	3	0.310
9	3	3	2	1	0.551
K_1	0.538	0.375	0.852	0.867	
K_2	0.779	0.688	0.873	0.719	
K_3	0.976	1.230	0.568	0.707	
k_1	0.179	0.125	0.284	0.289	
k_2	0.260	0.229	0.291	0.240	
k_3	0.325	0.410	0.189	0.236	
R	0.146	0.285	0.102	0.053	

2.3 5 L发酵罐分批发酵动力学

根据优化的结果,进行了5 L发酵罐发酵动力学研究。从图5可见,菌体20 h进入对数生长期,32 h时菌体量达到最大值。pH 5.4时,参与生物转化CLA的酶仍然有较高的活性。发酵36 h时,c9, ι 11-CLA的量高达0.572 mg/mL,这与正交试验的结果一致,随发酵时间的延长,c9, ι 11-CLA的量逐渐降低。

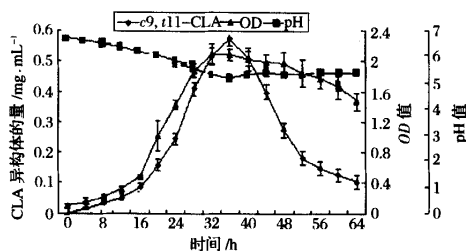


图5 5 L发酵罐分批发酵动力学曲线

3 结论

通过优化,建立了 *L. helveticus* L7 分批发酵生

物转化 c9, ι 11-CLA 的条件:MRS 培养基、30℃ 发酵、静置培养、LA 浓度为 1.000 mg/mL、发酵 36 h。5 L 自动发酵罐分批发酵时,c9, ι 11-CLA 的产量高达 0.572 mg/mL。

参考文献

- Scimeca J A, Miller G D. Potential Health Benefits of Conjugated Linoleic Acid [J]. Journal of the American College of Nutrition, 2000,19(4):470~471
- Christie W W, Dobson G, Gunstone F D. Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid [J]. Lipids, 1997, 32:1 231
- 周艳,张兰威. 共轭亚油酸高产菌株选育及其发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业,2004,30(6):28~31
- Lee S O, Kim C S, Cho S K, et al. Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri* [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(12):935~938
- 胡国庆,张灏. 植物乳杆菌在不同基质中转化生成共轭亚油酸的研究[J]. 郑州工程学院学报,2004,25(2):53~56
- Alonso L, Cuesta E P, Gillilan S E. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(6):1 941~1 946
- 周凌华,张灏,陈卫. 生物合成共轭亚油酸菌种的筛选与鉴定[J]. 无锡轻工大学学报,2004,23(5):53~57
- 苗士达,张中义,刘萍,等. 一株植物乳杆菌转化生成共轭亚油酸的特性研究[J]. 食品工业科技,2005,26(7):72~77
- 于国萍,寇秀颖. 产共轭亚油酸乳酸菌的选育及培养基的确定[J]. 食品工业科技,2005, 26(5):60~62
- 中国普通微生物菌种保藏管理中心编. 菌种目录(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社,1997. 229~233
- Eulitz K, Yurawecz M P, Sehat N, et al. Preparation, separation, and confirmation of the eight geometrical cis/trans conjugated linoleic acid isomers 8,10-through 11,13-18:2 [J]. Lipids, 1999,34 (8):873~877

Optimizing Bioconversion Conditions of Conjugated Linoleic Acid by *L. helveticus* L7

Liu Xiaohua Cao Yusheng Chen Yan

(Jiangxi-OAI Joint Research Institute, The Key Laboratory of Food Science (Nanchang University), Ministry of Education, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT The bioconversion conditions of conjugated linoleic acid by *L. helveticus* L7 were studied. It was found that the optimum conditions were MRS medium, fermentation temperature 30℃, static cultivation, LA concentration 1.000 mg/mL, and fermentation time 36 h. The yield of c9, ι 11-CLA was up to 0.572 mg/mL in 5L fermentor by batch fermentation.

Key words *L. helveticus* L7, conjugated linoleic acid (CLA), bioconversion