

共轭亚油酸高产菌株选育及其发酵条件的研究

周 艳 张兰威

(东北农业大学, 哈尔滨, 150030)

摘 要 以嗜酸乳酸杆菌 PB1(*Lactobacillus acidophilus*) 为出发菌株,经紫外线、亚硝基胍单独处理和复合处理,获得一株 CLA 高产菌株 U-N-f34,通过单因子和正交试验对该菌株生产共轭亚油酸的发酵条件进行了优化,优化的发酵条件是:培养温度 43℃,pH 值 7.5,培养时间 48 h,在优化条件下,U-N-f34 可以生产共轭亚油酸达 42.05μg/mL。

关键词 嗜酸乳酸杆菌,共轭亚油酸,诱变育种,发酵条件

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid,CLA)是亚油酸(9Z,12Z—18:2)的分子的几种位置与几何异构体的统称。近几年来,由于 CLA 具有一系列特有的生理功能而倍受关注^[1]。

CLA 主要是存在于反刍动物牛和羊等的肉和奶中。这是由于在反刍动物肠道中厌氧的溶纤维丁酸弧菌亚油酸异构酶能使亚油酸转化成 CLA,主要是以 c-9,t-11 异构体形式存在。故天然的 CLA 主要以反刍动物消化道的微生物代谢产物存在。近几年来,已经报道有瘤胃菌、丙酸菌、乳酸菌能将亚油酸转化为共轭亚油酸,然而,其 CLA 产量都比较低,因此通过诱变等措施以打破其正常的调控机制来提高其产量势在必行。

本实验以嗜酸乳酸杆菌 PB1(*Lactobacillus acidophilus*) 为出发菌株,经紫外线、亚硝基胍单独处理和复合处理,获得一株 CLA 高产菌株 U-N-f34,通过单因子和正交试验对该菌株生产共轭亚油酸的发酵条件进行了优化。

1 材料和方法

1.1 菌 株

嗜酸乳酸杆菌 PB1(*Lactobacillus acidophilus*) (东北农业大学畜产品研究室贮藏)。

1.2 培养基。

MRS 培养基、12%脱脂乳培养基

1.3 仪器与试剂

仪器 SP-6800A 气相色谱仪(山东鲁南瑞

虹化工仪器有限公司);氢火焰离子化检测器 FID;N2000 双通道气相色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所);标准品:CLA、LA、内标物十七烷酸,均为 Sigma 公司产品。

1.4 色谱条件

毛细管柱为 FFAP(30 m×0.32 mm i.d×0.20 μm);柱前压 100 kPa;柱温 200℃;进样口温度 250℃;检测器温度 250℃;空气压力 100 kPa;氢气压力 69 kPa;氮气压力 82 kPa;进样量 1 μL;衰减为 1;灵敏度为 4。

2 方 法

2.1 样品的预处理

2.1.1 菌种的活化

将保存在冰箱的嗜酸乳酸杆菌(PB1)活化在液体的 MRS 培养基中,混匀后置 37℃ 恒温箱中培养 9~10 h 后,挑取菌液做革兰氏染色、镜检,并用划线法分纯,确定纯后,接种于液体培养基中反复活化,备用。

2.1.2 培养方法

100 mL 三角瓶装 20 mL 的 12%的脱脂乳(含 0.1 mg/mL 亚油酸),将活化后的菌种按 4%接种,混匀,在 37℃ 温度下静止培养 24 h。

2.1.3 样品的提取及甲酯化

(1)向培养液中加入 50 mL V(CCl₄):V(甲醇)=2:1 混合液,摇匀,6 000 r/min 离心 30 min;

(2)将下层溶液加一定量无水硫酸钠吸水

干燥；

(3)再取上层放入减压蒸馏装置中,减压蒸馏至干燥；

(4)剩余物加入 5 mL 1 mol/L NaOH/甲醇溶液,放入水浴锅中在 60℃ 下加热 30 min；

(5)将其转移入 25 mL 刻度试管中,加入 0.2 mL、2 mg/mL 十七烷酸和 10 mL 4% HCl/甲醇,放入水浴锅中在 60℃ 下加热 60 min；

(6)取出试管,冷却至室温,加入 2 mL 正己烷,1 mL 蒸馏水,3 000 r/mim,离心 10 min；

(7)将下层再用 2 mL 正己烷萃取 1 次,3 000 r/mim,离心 10 min；

(8)合并 2 次的正己烷,N₂ 吹干,备检测。

2.2 菌株的诱变处理

2.2.1 紫外线诱变处理

(1)菌悬液的制备

将 5 mL MRS 发酵液 4 000 r/m 离心 15 min 收集沉淀得菌体。用 0.85% 生理盐水洗涤 2 次。向菌体中加入已灭菌的生理盐水(0.85%),悬浮,转移入装有玻璃珠的三角瓶中振荡 15 min。将菌悬液适当稀释,制备成 10⁷~10⁸/mL 的细胞悬浮液,备用。

(2)诱变处理

用紫外光(30 W,距离 40 cm)照射 40 s,在红灯下涂于 MRS 培养基平板上,用黑布包裹平板 37℃ 避光培养。

2.2.2 亚硝基胍诱变

(1)菌悬液的制备

菌株发酵培养和菌体的获得与紫外诱变处理相同。菌悬液的制备用 pH 6.0,0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(先灭菌)配制,将菌体悬浮,转移入装有玻璃珠的三角瓶中,振荡 15 min。将悬浮液适当稀释,菌液浓度为 10⁷~10⁸/mL,装于三角瓶中,每个 20 mL。

(2)亚硝基胍试液的配制

精确称取 NTG 20 mg 于小试管中,加入 2 mL 丙酮溶解。

(3)亚硝基胍诱变处理

将 NTG 试液分别转移入上述三角瓶中,终浓度为 1.0 g/L。将三角瓶于 37℃ 转速为 100 r/m 的摇床上振荡处理(60 min),大量稀释

中止诱变作用。

2.2.3 紫外线和亚硝基胍复合诱变

以紫外线和亚硝基胍二者的最佳诱变剂量对菌悬液进行诱变。将经过 NTG 诱变处理的菌体悬浮液转入平底培养皿并保持溶液厚度小于 2 mm 无菌条件下用 30 W 紫外灯于 40 cm 处照射,取 0.5 mL 经紫外照射的变异菌株,适当稀释,取 0.1 mL 菌液涂布于固体 MRS 培养基平板,37℃ 培养 36 h。

筛选出水平较高的菌株作为第 2 轮诱变的出发菌株,以相同剂量和时间进行第 2 次照射。如此反复若干次,比较不同轮间诱变菌株的生产性能,筛选出最优生产菌株。

3 结 果

3.1 各轮诱变生产 CLA 能力的比较

在相同的发酵和样品提取、检测的条件下,将出发菌株与每一轮诱变所得的高产菌株进行比较,结果如下：

表 1 选育过程中各代菌株的产 CLA 水平

	菌株编号	CLA 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
原菌株	PBI	9.51
紫外线	U-8	12.69
亚硝基胍	N-35	18.92
复合诱变第 1 轮	U-N-C1	22.32
复合诱变第 2 轮	U-N-f34	31.83
复合诱变第 3 轮	U-N-g36	27.75

表 1 表明,经过紫外线诱变后,得到一株产 CLA12.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 U-8 菌株,比原菌株产 CLA 能力提高了 28%。将 U-8 菌株进行亚硝基胍诱变后,得到一株产 CLA18.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 N-35 菌株,比原菌株产 CLA 能力提高了 91%。接下来进行了 3 轮复合诱变,其中第 2 轮所得的 U-N-f34 产 CLA 含量最高,达 31.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比原菌株产 CLA 能力提高了 221%。在第 3 轮亚硝基胍加紫外线处理后,产量有所下降,可能是由于亚硝基胍加紫外线处理后,对 DNA 损伤太大或仅引起抗性基因发生改变,使抗性增大而产量基因并未发生改变。

3.2 诱变菌株培养条件的优化

3.2.1 最佳培养温度的确定

分别在 100 mL 三角瓶中,装入 20 mL,

12%脱脂乳,各加入 2 mg 的亚油酸,调整温度在 19~55℃ 之间,分别在不同的温度下培养 24 h,测定 CLA 产量。根据 CLA 产量,确定最佳培养温度。结果见表 2。

表 2 温度对 CLA 产率的影响

温度/℃	CLA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
19	13.11
25	21.43
31	27.12
37	32.12
43	37.93
49	27.46
55	21.52

从表 2 中可以看出,温度在 37~43℃ 之间,有利于 CLA 的形成。

3.2.2 最佳培养 pH 的确定

分别在 100 mL 三角瓶中,装入 20 mL, 12%脱脂乳,各加入 2 mg 的亚油酸,调整温度在 4.5~8.5 之间,于 37℃ 下培养 24 h,测定 CLA 产量。根据 CLA 产量,确定最佳培养 pH 值。结果见表 3。

表 3 培养 pH 对 CLA 产率的影响

pH	CLA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
4.5	13.06
5.5	23.62
6.5	32.12
7.5	34.52
8.5	30.66
9.5	16.67

由表 3 可知,pH 在 6.5~7.5 之间有利于 CLA 的形成

3.2.3 最佳培养时间的确定

分别在 100 mL 三角瓶中,装入 20 mL, 12%脱脂乳,各加入 2 mg 的亚油酸,在 37℃ 下培养不同时间后,测定 CLA 产量。根据 CLA 产量,确定最佳培养时间。结果见表 4。

表 4 培养时间对 CLA 产率的影响

培养时间/h	CLA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
6	18.37
12	20.63
24	32.12
36	32.57
48	32.96

由表 4 可知,培养时间 48 h 可以产生最大量的 CLA,但 24、36、48 h,CLA 产量相差不大。

3.3 正交实验设计

根据以上单因素实验结果,考察培养温度、培养 pH 值、培养时间的交互作用,5 种影响因素依次用 A、B、C 表示,分别取不同的浓度水平,做 $L_9(3^4)$ 即 3 因素 3 水平正交实验,确定 CLA 的最佳培养条件。正交实验因素及水平编码表见表 5。实验实施及结果见表 6。

表 5 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表

水平	实验因素		
	温度(A)/℃	pH 值(B)	时间(C)/h
1	37	6.5	24
2	40	7.5	36
3	43	8.5	48

表 6 CLA 发酵条件 $L_9(3^4)$ 正交实验方案及结果

试验号	A	B	C	CLA 产量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	1	1	1	31.09
2	1	2	2	32.99
3	1	3	3	30.11
4	2	1	3	34.04
5	2	2	1	34.7
6	2	3	2	32.58
7	3	1	2	32.78
8	3	2	3	42.05
9	3	3	1	30.94
K ₁	94.19	97.24	96.73	
K ₂	101.32	114.74	98.35	
K ₃	109	93.63	106.2	
k ₁	31.39	32.41	32.24	
k ₂	33.77	38.24	32.78	
k ₃	36.33	31.21	35.4	
R	4.94	7.03	3.16	
主次		B>A>C		

从试验数据的分析可知,试验中所选用的 3 个因素均对 CLA 产量有显著影响。各因素间差异显著。由极差分析可知,各因素对 CLA 产量贡献率的主次顺序为:B>A>C,即培养 pH>培养温度>培养时间。也就是说在各因

素的交互作用下中 ,培养 pH 是影响 CLA 产量的主要因素。

根据正交试验确定的最佳发酵条件是 : $A_3B_2C_3$,即培养温度 43℃ ,pH 值 7.5 ,培养时间 48 h ,在优化条件下 ,U-N-f34 可以生产共轭亚油酸达 42.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4 结 论

通过紫外线和亚硝基胍多次诱变 ,从出发

菌株嗜酸乳酸杆菌 PB1 成功选育出 1 株产共轭亚油酸达 31.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高产菌株 ,编号为 U-N-f34。

通过单因子和正交试验 ,得到 U-N-f34 的最佳发酵条件是 :培养温度 43℃ ,pH 值 7.5 ,培养时间 48 h ,在优化条件下 ,U-N-f34 可以生产共轭亚油酸达 42.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Breeding of High Conjugated Linoleic Acid Producing Strains and Optimization of the Fermentation Conditions

Zhou Yan Zhang Lanwei

(Northeast Agricultural University ,Haerbin ,150030)

ABSTRACT A high conjugated linoleic acid producing mutant was screened from *Lactobacillus acidophilus* PB1 after UV and NTG. The fermentation conditions were optimized using single factor and orthogonal experiments. The optimum conditions were as follows :reaction temperature 43℃ ,pH 7.5 ,incubation time 48h. Under the optimum conditions the CLA production level reached 42.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
Key words *Lactobacillus acidophilus* conjugated linoleic acid mutation breeding fermentation conditions

政策
法规
标准

我国对进口食品提前注册管理

近日 ,国家认证认可监督管理委员会表示 ,我国将进一步加强《进口食品国外生产企业注册管理规定》,今年“洋食品”进中国评审考核的工作将集中在法国、意大利、泰国、巴西等国的肉类企业。未获得注册的国外生产企业 ,不得从其进口相关食品。

国家认监委注册管理部有关人士称 ,2004 年 5 月中旬 ,国家认监委举行了工作会议 ,要求各地进一步加强进口食品国外生产企业注册管理。据悉 ,有关规定早在 2002 年 3 月已实施 ,至今为止 ,第 1 批执行企业注册的进口食品类别只限于肉类 ,包括各种畜禽肉、肉制品、可食用的副产品和内脏。

按照《进口食品国外生产企业注册管理规定》,所有向中国出口肉类食品的国家 and 地区的企业均需要提前注册。

事实上 ,为保障食品安全 ,近年世界多个国家都开展食品进口提前注册的规定。注册管理部有关人士介绍 ,有些不了解情况的企业以为中国的进口食品需提前通报的做法 ,是在美国去年出台相关规定之后。其实 ,我国早在 2 年前已实施。

据悉 ,美国食品药品监督管理局(FDA)自 2003 年 12 月 12 日正式实施《食品饲料企业注册法规》和《进口提前通报法规》。截止到 2003 年 12 月 31 日 ,中国对美有出口的食品、饲料企业为 2 138 家 ,其中已有 1 845 家企业取得注册 ,近 50 %的企业是自行注册。至今 ,中国食品、饲料对美出口顺利 ,未发生因注册问题被 FDA 扣留或退货。

信息
窗

台湾推出透明质酸保健新品

我国台湾地区辅英科技大学和科景生物科技公司宣布研制成功牛樟芝结合透明质酸——玻尿酸的保健新产品。有关研究人员介绍 ,该产品结合了用基因转殖发酵方式生产的安全透明质酸和筛选培养的优良牛樟芝菌丝体 ,经证实 ,它不仅具有牛樟芝的保肝、解毒防癌功效 ,而且还具有提高人体免疫力和活化细胞的作用。