

文章编号: 1009-038X(2004)05-0053-05

生物合成共轭亚油酸菌种的筛选与鉴定

周凌华, 张灏*, 陈卫, 田丰伟

(江南大学 乳酸菌发酵技术与食品安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 从传统泡菜和生牛乳中筛选出一株乳酸菌 ZS2058 能生物合成共轭亚油酸, 经 API 系统鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。该菌株在 MRS 培养基中将质量分数 11.6% 的亚油酸(1.024 mg/mL) 转化为共轭亚油酸, 经气相色谱分析证实 $c_9, t_{11-18}: 2$ 占 75.9%, $t_{10}, c_{12-18}: 2$ 占 24.1%。

关键词: 共轭亚油酸; 乳酸菌; 生物合成; 鉴定

中图分类号: Q 933

文献标识码: A

Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria for Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid

ZHOU Ling-hua, ZHANG Hao*, CHEN Wei, TIAN Feng-wei

(The Key Laboratory of Lactic Acid Bacteria Fermentation Technology and Food Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A strain ZS2058 was selected from the strains separated from fermented vegetables and raw milk for biosynthesis of conjugated linoleic acid. The strain was identified as *Lactobacillus plantarum* by API system. The strain could tolerate at 11.6% (1.024 mg/mL) LA and convert LA to CLA in MRS broth. The *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers detected by Gas Chromatography were 75.9% and 24.1% of the CLA produced.

Key words: conjugated linoleic acid; lactic acid bacteria; biosynthesis; identification

共轭亚油酸(Conjugated Linoleic Acid, CLA)是亚油酸(Linoleic Acid, LA)衍生的共轭双烯酸的多重位置与几何异构体的总称。它具有很多营养和保健功能,如抗癌、抗动脉粥样硬化和促进细胞分裂、阻止肌肉退化、延缓机体免疫力衰退等^[1]。在共轭亚油酸的各种立体异构体中, $c_9, t_{11-18}: 2$ 和 $t_{10}, c_{12-18}: 2$ 两种异构体被认为最具生物活性, $c_9, t_{11-18}: 2$ 是唯一能被动物细胞吸收进入其磷脂层的共轭亚油酸异构体^[2], 同时 $c_9,$

$t_{11-18}: 2$ 也是在人们的日常食物中含量最高的共轭亚油酸异构体; 而 $t_{10}, c_{12-18}: 2$ 在改善人体减肥等方面具有明显的效果。

目前, 生产 CLA 主要是通过化学法, 如碱法异构化等合成, 其缺点是对于产物中各种构型的 CLA 无选择性, 其中 $c_9, t_{11-18}: 2$ 在 CLA 异构体中所占质量分数低于 40%。许多科学家致力于生物法合成 CLA 的研究, 但早期分离到能合成 CLA 的细菌多为严格厌氧的瘤胃细菌, 培养困难, 应用

收稿日期: 2003-12-05; 修回日期: 2004-02-13.

作者简介: 周凌华(1977-)男, 浙江江山人, 食品科学与工程硕士研究生; * 通讯作者。
万方数据

价值不大.20世纪90年代后期,Lin等^[3]报道了几株乳酸菌具有转化LA为CLA的能力,其产物中c9 μ 11-18:2在产生的CLA异构体中所占质量分数达90%以上,证明了生物法与化学法相比具有选择性合成生物活性CLA的优点,而且乳酸菌在培养方面比较方便.因此若能得到具有较高转化LA为CLA能力的乳酸菌并将其应用于功能性乳制品,将会有非常大的应用前景.

本研究的目的是主要从传统发酵食品和生牛乳中筛选具有较高转化LA为CLA能力的乳酸菌,对其进行菌种鉴定,并对其产生的CLA异构体进行气相色谱分析.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 生牛乳(无锡光明乳品厂提供)、四川泡菜、新疆牧民自制酸奶、亚油酸(LA)、共轭亚油酸(CLA)、共轭亚油酸甲酯均购于Sigma公司(纯度>99%),其它所用试剂均为分析纯.

1.1.2 菌种与保藏方法 从上述原料中筛选出乳酸菌183株,编号分别为:ZS1001~ZS10062,ZS2001~ZS20065,ZS3001~ZS30056.

1.1.3 培养基

1)分离平板培养基(1)改良MRS(乳糖替代葡萄糖)培养基(2)LBS培养基(g/L):乙酸钠25,葡萄糖20,胰蛋白胨10,KH₂PO₄6,酵母膏5,柠檬酸铵2,吐温-801,MgSO₄0.575,FeSO₄0.034,MnSO₄0.12,冰醋酸1.32mL,琼脂15.

2)斜面培养基:MRS琼脂培养基.

3)发酵(种子)培养基:MRS液体培养基(pH6.5).

1.1.4 仪器 752型紫外光栅分光光度计:上海分析仪器厂生产;气相色谱仪(Shimadzu GC-14B):Japan,Tokyo;色谱柱 SP-238Q(60m×0.25mm i.d.×0.20 μ m),Supelco Park,Bellefonte,PA.

1.2 方法

1.2.1 发酵方法 将各菌株以体积分数1%的接种量接入种子培养基,于37℃连续活化2次,每次24h.将活化后的菌种再以体积分数1%接种量接入种子培养基中并添加质量浓度为0.5mg/mL的亚油酸,培养24h.6000r/min离心10min收集菌体,用质量浓度8.5g/L NaCl溶液洗涤.再经离心收集菌体,添加10mL发酵培养基并加入1.024mg/mL的亚油酸,在37℃培养24h.

1.2.2 发酵液中CLA的分析检测 发酵液中

CLA的提取^[4]:1mL发酵液添加2mL异丙醇和1.5mL正己烷提取3min,经6000r/min5min离心,吸取上面的正己烷层.蒸馏水洗涤正己烷层,再经无水硫酸钠干燥后,用氮气将正己烷吹干,得脂肪酸提取物.

比色法测定^[5]:将上述脂肪酸提取物用5mL正己烷溶解,在234nm下测定吸光度.测量时用正己烷做空白.

气相色谱测定法:在上述脂肪酸提取物中加入1mL体积分数2%的硫酸-甲醇溶液,在70℃加热1h.冷却后加入5mL质量浓度为50g/L的NaCl溶液洗涤,再用4mL正己烷将脂肪酸甲酯萃取.正己烷层经无水硫酸钠干燥后,用氮气将正己烷吹干.最后用50 μ L正己烷重新溶解提取的脂肪酸甲酯,进行气相色谱分析.

气相色谱条件参见文献[6].

气相色谱标准曲线的建立:准确吸取850 μ L质量浓度为14.676mg/mL的共轭亚油酸甲酯标准样品,用正己烷定容到50mL的容量瓶中,从中分别准确吸取0.2,4,6,8,10mL的6根试管中,用氮气吹干正己烷,再用100 μ L正己烷溶解样品.将上述不同质量浓度的共轭亚油酸甲酯标准样品进行气相色谱分析,并以峰面积为纵坐标,共轭亚油酸的含量为横坐标建立气相色谱标准曲线,结果见图1.线性回归方程: $Y=0.512X+0.0797$,线性相关系数: $R^2=0.9993$,线性范围0~25mg/mL.

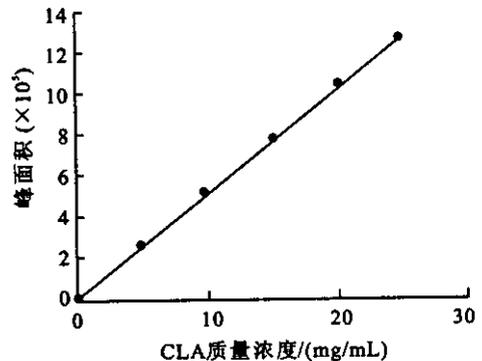


图1 共轭亚油酸气相色谱标准曲线

Fig.1 Standard curve of gas chromatogram of standard CLA

发酵液中CLA的定性、定量分析和转化率:发酵样品中共轭亚油酸异构体类型的鉴定通过对照标准样品中的共轭亚油酸异构体的保留时间来确定.样品中的共轭亚油酸的定量分析采用气相色谱外标法.CLA的转化率为发酵样品中CLA质量浓度与所添加的LA质量浓度之比.

1.2.3 菌种鉴定 用 MRS 固体培养基观察菌落形态,显微镜下观察细胞形态.采用法国梅里埃(BioMe'rieux)公司 API 细菌鉴定系统对菌株进行鉴定^[7].

2 结果与讨论

2.1 初筛

从生牛乳、泡菜和新疆牧民自制酸奶 3 种不同来源筛选出的 183 株乳酸菌,按 1.2.1 发酵方法进行生物转化 CLA 试验.由于 CLA 中存在的共轭双键在 234 nm 波长下有特殊吸收,其摩尔吸光系数 ε 约为 1×10^5 ,属于强吸收,而 LA 在该波长下没有吸收.所以本试验采用紫外分光光度法在 234 nm 处检测样品中的吸光度增加(ΔA_{234nm}),以此初步判定发酵液中 CLA 的质量浓度增加^[5].这种方法较气相色谱法方便得多,可以大大降低菌株筛选的工作量.结果见图 2.从图 2 可以看出,从生牛乳、泡菜和新疆牧民自制酸奶 3 种不同来源获得的菌株中,大部分菌株的发酵液 $\Delta A_{234nm} < 0.2$,分别占 83.9%、70.8% 和 75.0%,而只有很少部分菌株的发酵液 $\Delta A_{234nm} > 0.5$,分别占 3.2%、10.8% 和 5.4%,在发酵液 $\Delta A_{234nm} > 0.5$ 的 12 株菌株中泡菜来源的最多(见表 1).

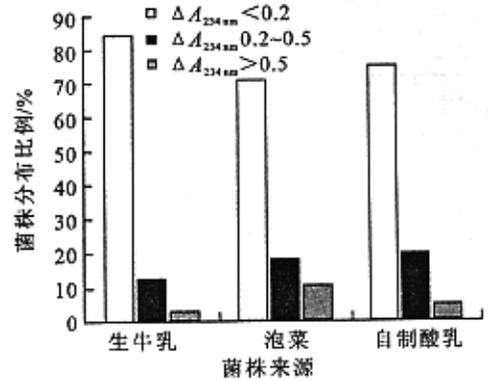


图 2 不同来源的菌株发酵液 ΔA_{234nm} 分布

Fig. 2 Distribution of ΔA_{234nm} of cultured media of strains from three different sources

2.2 复筛

将初筛中 ΔA_{234nm} 值较大的 12 株菌的发酵液进行气相色谱分析,结果(见表 1)表明,在初筛中发酵液 $\Delta A_{234nm} > 0.5$ 的菌株,其大部分 A_{234nm} 增加都在 0.500~0.650 之间,对应的 CLA 质量浓度在 40.00~60.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间.泡菜来源的菌株产 CLA 的能力差异比较明显,CLA 的产量在 47.04~120.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,其中 ZS2058 发酵液中的 CLA 质量浓度达到了 120.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,具有转化 LA 为 CLA 的最高能力,因此挑选 ZS2058 作为本试验理想的菌株.

表 1 不同菌株生物转化共轭亚油酸的能力

Tab.1 The ability of CLA biosynthesis of various strains

菌株编号	ZS1015	ZS1032	ZS2006	ZS2013	ZS2017	ZS2022
ΔA_{234nm}	0.533	0.518	0.524	0.601	0.537	0.614
CLA 质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	47.86	46.72	47.04	53.98	48.43	55.34
菌株编号	ZS2031	ZS2035	ZS2058	ZS3004	ZS3018	ZS3034
ΔA_{234nm}	0.672	0.622	1.323	0.563	0.576	0.593
CLA 质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	60.60	56.13	120.15	50.57	51.73	53.27

2.3 菌种鉴定

2.3.1 ZS2058 形态观察 在 MRS 固体培养基中 ZS2058 的菌落大小为 0.3~2.0 mm,圆形正面凸起,乳白色,表面湿润光滑.细胞革兰氏染色阳性,过氧化氢酶反应阴性,在 MRS 液体培养基中 ZS2058 的细胞形态见图 3.细胞呈短杆状,菌体大小为 0.9~1.2 μm 宽,3~8 μm 长,不产芽孢,两端钝圆.

2.3.2 API 试剂盒反应结果 用 API 50 CH 试剂盒进行 ZS2058 利用 49 种碳水化合物的发酵实验,结果见表 2.将实验结果输入梅里埃(BioMe'rieux)的 API 细菌鉴定系统,经数据库查询核对,ZS2058 为乳酸菌属的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)系统的鉴定结果非常好(% id=99.2).

rum)系统的鉴定结果非常好(% id=99.2).

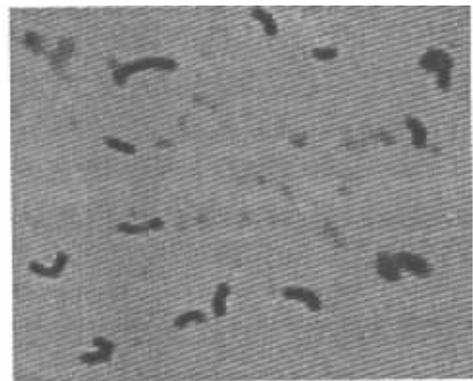


图 3 ZS2058 的菌体形态(1000 \times)

Fig.3 Cell morphology of strain ZS2058 (1000 \times)

表2 ZS2058 API 试剂反应结果
Tab.2 The result of API reagent of ZS2058

API 凹槽号	底物	反应结果	API 凹槽号	底物	反应结果
1	丙三醇	-	26	水杨苷	+
2	赤藻糖醇	-	27	纤维二糖	+
3	D-阿拉伯糖	-	28	麦芽糖	+
4	L-阿拉伯糖	+	29	乳糖	+
5	核糖	+	30	蜜二糖	+
6	D-木糖	d	31	蔗糖	+
7	L-木糖	-	32	海藻糖	+
8	戊五醇	-	33	菊糖	-
9	β -甲基-D-木糖苷	-	34	松三糖	+
10	半乳糖	+	35	棉子糖	+
11	葡萄糖	+	36	amidon	+
12	果糖	+	37	糖原	-
13	甘露糖	+	38	木糖醇	-
14	山梨糖	-	39	龙胆二糖	+
15	鼠李糖	-	40	D-松二糖	+
16	己六醇	-	41	D-来苏糖	-
17	环己六醇	-	42	D-塔格糖	-
18	甘露醇	+	43	D-海藻糖	-
19	山梨醇	+	44	L-海藻糖	-
20	α -乙酰-D-甘露糖苷	+	45	D-阿糖醇	+
21	α -乙酰-D-葡糖苷	d	46	L-阿糖醇	-
22	N-乙酰-葡糖胺	+	47	葡萄糖酸酯	+
23	杏苷	+	48	2-酮-glukonat	-
24	对苯二酚葡糖苷	+	49	5-酮-glukonat	d
25	七叶苷	+			

注：“+”表示试验结果阳性；“-”表示试验结果阴性；“d”表示试验结果不明显。

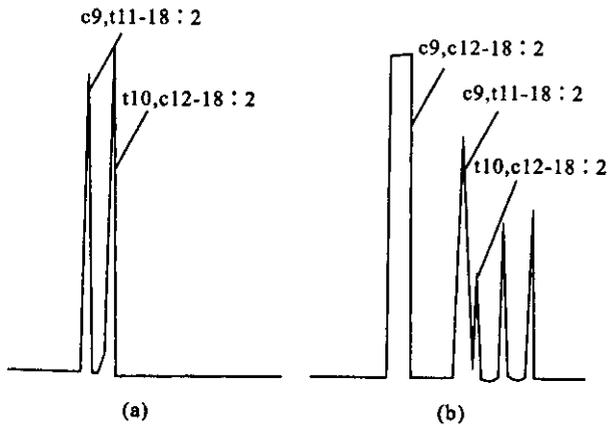
2.4 ZS2058 合成的 CLA 异构体气相色谱分析

按照 1.2.2 中的气相色谱分析法对 ZS2058 发酵液中的脂肪酸进行气相色谱分析,结果见图 4。其中,图 4(a)是共轭亚油酸甲酯标准样品的气相色谱图。从图 4(a)中可以看出,所采用的强极性毛细管气相色谱柱 SP2380 在其操作条件下,可以将标准样品中的 2 种 CLA 异构体 $c9, t11-18: 2$ 和 $t10, c12-18: 2$ 进行较好的分离,2 种异构体的保留时间分别为 65.567 min 和 67.783 min。图 4(b)是发酵样品的气相色谱图。从图 4(b)中可以明显地看出,ZS2058 菌株可以将底物 LA 主要转化为 2 种 CLA,一种是 $c9, t11-18: 2$,另一种是 $t10, c12-18: 2$,而 $t10, c12-18: 2$ 后面的色谱峰可能为 C-20 以上的脂肪酸,结果见表 3。从表 3 中可以看出,在 LA 添加质量浓度为 1.024 mg/mL,

37°C 培养 24 h 条件下,ZS2058 可以转化质量分数 11.57% 的 LA 为 CLA (120.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。其中, $c9, t11-18: 2$ 是主要的异构体类型,占 75.9%; $t10, c12-18: 2$ 含量较少占 24.1%,其它的 CLA 异构体未能检出。出现这种结果的原因可能是,ZS2058 细胞内所含的亚油酸异构酶作用的结果。

目前研究表明,微生物合成 CLA 主要是通过细胞体内的亚油酸异构酶的作用将 LA 转化为 CLA^[4],而且不同的亚油酸异构酶合成不同的 CLA 异构体。因此认为,植物乳杆菌 ZS2058 细胞内所含有的亚油酸异构酶主要为 $c9, t11$ 和 $t10, c12$,其中 $c9, t11$ 亚油酸异构酶是 ZS2058 细胞中最主要的亚油酸异构酶。Lin 等人^[3]报道 *Lactobacillus acidophilus* (CCRC14079) 在添加 1 mg/mL LA 的脱脂乳培养基中,可以将 CLA 质量浓度从 23.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

增加到 105.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,作者将 CCRC14079 产生的 CLA 认为是 $c9, t11-18: 2$ 。Lee 等人^[8]采用 *Lactobacillus reuterizai* 在添加 0.9 g/L LA 的 MRS 培养基中培养 24 h 产生 300 mg/L CLA,其产生的 CLA 异构体经鉴定为 $c9, t11-18: 2$ (包括 $t9, c11-18: 2$) 质量分数 59%) 和 $c10, t12-18: 2$ (质量分数 41%) 2 种异构体。



a. 共轭亚油酸标样 b. 发酵液中的共轭亚油酸

图 4 共轭亚油酸气相色谱分析图

Fig. 4 Gas chromatogram of standard CLA methyl esters

本次实验结果表明, ZS2058 在 MRS 培养基中可以将 LA 比较有效地转化为 CLA,提高样品中的 CLA 质量浓度。另外,由于 ZS2058 产生的 CLA 异构体是 2 种生物活性最强的 $c9, t11-18: 2$ 和 $t10, c12-18: 2$,未有其它的 CLA 异构体检出,所以该菌株具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] Cook, Park Y, Pariza M W, et al. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression[J]. *Poultry Science*, 1993, 72: 1301 - 1305.
- [2] Singh M, Thompson H J, Scimeca J A. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative[J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 1212 - 1215.
- [3] Lin T Y, Lin C W, Lee C H. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid[J]. *Food Chemistry*, 1999, 67: 1 - 5.
- [4] Jiang J, Bjorck L, Fonden R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures[J]. *Applied Microbiology*, 1998, 85: 95 - 102.
- [5] Pariza M W, Yang X Y. Method of producing conjugated fatty acid[P]. 美国专利 5856149, 1999.
- [6] 吴冀华, 裘爱泳. 气相色谱法分析共轭亚油酸异构体[J]. *中国油脂* 2002 27(1): 65 - 67.
- [7] 杨洁彬, 郭兴华, 凌代文, 等. 乳酸菌生物学基础及应用[M]. 北京: 轻工业出版社, 1996.
- [8] Lee S O, Chang S K, Somi K C, et al. Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 935 - 938.

表 3 ZS2058 生物转化共轭亚油酸的结果分析

Tab. 3 The analytic results of the CLA biosynthesized by ZS2058

实验号	$c9, t11-18: 2$		$t10, c12-18: 2$		CLA 转化率/%	CLA 质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$
	质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	转化率/%	质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	转化率/%		
1	91.18	8.8	30.53	2.9	11.7	121.71
2	93.47	9.0	27.30	2.6	11.6	120.77
3	89.82	8.6	29.38	2.8	11.4	119.20

3 结论与展望

通过上述方法,从泡菜中筛选出一株具有较高的生物转化 LA 为 CLA 的植物乳杆菌 ZS2058,在亚油酸添加质量浓度为 1.024 mg/mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 条件下能转化 11.6% 的 LA 为 2 种最具生物活性的共轭亚油酸 $c9, t11-18: 2$ (质量分数 75.9%) 和 $t10, c12-18: 2$ (质量分数 24.1%) 异构体。研究表明,通过乳酸菌生物转化共轭亚油酸的方法是切实可行的,而且由于所采用菌株的安全性和生物转化产生的共轭亚油酸异构体的专一性,为人们提高膳食中的共轭亚油酸含量开辟了广阔的前景。因此下一步的研究计划将对植物乳杆菌 ZS2058 生物转化共轭亚油酸的情况进行深入研究,并对植物乳杆菌 ZS2058 产生共轭亚油酸的机理做进一步探讨。

致谢 承蒙江南大学食品学院裘爱泳教授、傅红博士在共轭亚油酸的气相色谱分析方面给予的指导和帮助,特此致谢!