

嗜酸乳杆菌发酵脱脂乳生成 CLA 的条件优化

许飞, 王志耕^{*}, 姚成虎

(安徽农业大学畜产品加工研究所, 安徽合肥 230036)

摘要: 为提高发酵乳中共轭亚油酸 (CLA) 含量, 以经化学诱变的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 发酵添加亚油酸 (LA) 的脱脂乳, 通过三因素二次正交旋转组合设计对该菌株发酵脱脂乳生成共轭亚油酸的条件进行了优化。结果表明: 培养温度 37℃、pH 5.5 培养时间 28h 时为最佳优化条件, 此时 CLA 产率达 33.4%。

关键词: 嗜酸乳杆菌, 共轭亚油酸, 亚油酸, 脱脂乳

Abstract In order to increase conjugated linoleic acid (CLA) concentration in fermentation milk, skin milk added linoleic acid (LA) was fermented by *Lactobacillus acidophilus* after chemical mutation, and the CLA formation conditions were optimized using three factors quadratic orthogonal rotatable design. The optimum conditions were: reaction temperature 37℃, pH 5.5, and incubation time 28h. Under the optimum conditions the yield of CLA was 33.4%.

Key words *Lactobacillus acidophilus*; conjugated linoleic acid; linoleic acid; skin milk

中图分类号: TS252.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)10-0088-03

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种位置与几何异构体的总称。CLA 主要存在于瘤胃动物如牛、羊的乳脂及肉制品中^[1], 且主要以顺-9 反-11 异构体存在。近年来, 经微生物转化, 特别是经乳酸菌转化获得 CLA 成为研究的热点。Tung Y.Lin 等人把嗜酸乳杆菌、保加利亚德氏乳杆菌、乳酸乳球菌、嗜热链球菌分别接种到添加 LA 的脱脂牛奶中, 发现均能生成 CLA, 且嗜酸乳杆菌的转化能力最强^[2]。L.A. Ionso^[3] 等人对嗜酸乳杆菌研究表明: 在脱脂乳培养基中添加 0.2mg/mL 的 LA 和 1% 的 Tween-80 可以生成 54.31μg/mL CLA。但是, 有关牛乳发酵提高

CLA 含量的实验研究尚处在探索阶段^[4]。深入探讨研究牛乳发酵过程中不同因素对 CLA 水平的影响, 并将其应用于功能性乳制品生产中, 具有重要的意义和广阔的应用前景。本实验以嗜酸乳杆菌为出发菌株, 经化学诱变^[5]后, 对其提高发酵乳中 CLA 的条件进行了优化研究。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 1.1854 购于中科院微生物研究所, 通过化学诱变和诱导处理而获得一株 CLA 高产菌株; 脱脂乳培养基 用新西兰进口脱脂乳粉配成 10% 的脱脂乳培养基; 活化培养基 MRS 培养基; 亚油酸 (99% 以上) Sigma 公司; 共轭亚油酸 (CLA) 青岛澳海生物有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

SW-CJ-1F 无菌操作台 苏州安泰空气技术有限公司; DH P060 型恒温培养箱 上海实验仪器厂有限公司; PHS-3B 精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂; BS210S 电子天平 北京赛多利斯天平有限公司; 高压灭菌锅 上海三申; TU-1901 双束紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 将嗜酸乳杆菌接种到 10mL MRS 液体培养基上, 活化两代后, 接入含有 0.1% 亚油酸的脱脂乳培养基内, 混匀, 静置培养。

1.2.2 共轭亚油酸的提取 脱脂乳发酵结束后, 移入 100mL 分液漏斗中, 加入 25mL 正己烷振荡萃取。静置分层后弃去下层液体, 加入等量蒸馏水振荡水洗, 水洗两遍后, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 然后移入 25mL 的容量瓶中, 加入正己烷定容, 摇匀后进行紫外检测。

1.2.3 培养基中 CLA 产量的测定 以不接种的培养基为参比, 用紫外分光光度计在 190~350nm 范围内扫描, 读取特征吸收峰 233nm 处的吸收值, 根据标准曲线计算发酵液中 CLA 的含量。

1.2.4 实验设计与数据处理 采用三因素二次正交旋转组合设计, 研究培养温度、pH 以及培养时间三因素对发酵生成 CLA 量的影响。各因素水平安排见表 1。实验数据用 SAS (V6.12 版) 统计软件处理。

收稿日期: 2007-02-05 * 通讯联系人

作者简介: 许飞 (1982-), 男, 硕士, 研究方向: 畜产品品质与加工。

基金项目: 安徽省 2006 年重点科研项目资助 (06013045A)。

表 1 三个因素水平编码表

编码水平	X ₁ pH	X ₂ 温度 (°C)	X ₃ 时间 (h)
+ 1.682	7.5	42	42
+ 1	6.5	40	35
0	5.0	37	24
- 1	3.5	34	13
- 1.682	2.5	32	6
Δ _i	1.5	3	11

2 结果与分析

2.1 回归模型的建立和检验

三因素二次正交旋转组合实验结果见表 2, 表 2 实验数据经 SAS 统计软件处理后, 以 CLA 产率为指标剔除不显著项, 建立回归模型如下:

$$Y = 32.55 + 2.71X_1 + 0.75X_2 + 4.13X_3 + 0.24X_1X_2 + 0.16X_2X_3 - 7.36X_1^2 - 2.95X_2^2 - 6.09X_3^2$$

表 2 三因素二次正交旋转组合实验设计结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	CLA 产率 (%)
1	1	1	1	26.1
2	1	1	- 1	15.2
3	1	- 1	1	23.7
4	1	- 1	- 1	13.1
5	- 1	1	1	15.7
6	- 1	1	- 1	11.3
7	- 1	- 1	1	13.9
8	- 1	- 1	- 1	10.5
9	1.682	0	0	14.7
10	- 1.682	0	0	8.6
11	0	1.682	0	25.1
12	0	- 1.682	0	23.2
13	0	0	1.682	23.3
14	0	0	- 1.682	7.2
15	0	0	0	31.7
16	0	0	0	33.4
17	0	0	0	33.1
18	0	0	0	32.9
19	0	0	0	32.7
20	0	0	0	31.5

2.2 因素分析

采用“降维分析法”, 得到单因素及双因素对目标函数的偏回归解析子模型, 分析得到各参试因素单独或交互作用与目标函数的关系。

2.2.1 单因素分析

2.2.1.1 pH 对 CLA 产率的影响 分别对 X₂、X₃ 取零值, 得出 pH 对 CLA 产率的偏回归解析子模型如下:

$$Y_1 = 32.55 + 2.71X_1 - 7.36X_1^2, \text{ 由子模型 } Y_1 \text{ 得图 1。}$$

从图 1 可以看出, 在初始 pH 较低时, CLA 产率也较低, 可能是乳酸菌发酵引起了凝乳, 不利于底物 LA 和菌体细胞亚油酸异构酶的接触, 从而影响了 CLA 生成; 当初始 pH 为 5.5 时生成的 CLA 量最多, 这与 Lin T.Y.^[6] 的研究基本一致。当初始 pH 较高时, CLA 产率下降, 这可能是由于较高 pH 不利于菌体的生长。

2.2.1.2 培养温度对 CLA 产率的影响 分别对 X₁、

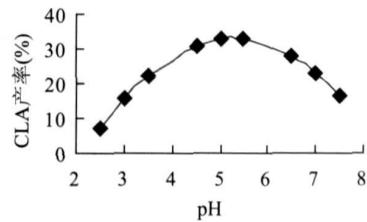


图 1 pH 对 CLA 产率的影响

X₃ 取零值, 得出培养温度对 CLA 产率的偏回归解析子模型如下:

$$Y_2 = 32.55 + 0.75X_2 - 2.95X_2^2, \text{ 由子模型 } Y_2 \text{ 得图 2。}$$

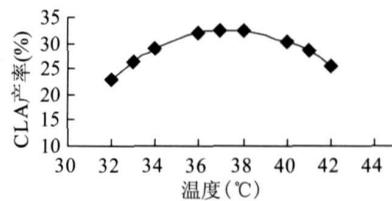


图 2 培养温度对 CLA 产率的影响

乳酸菌转化 LA 为 CLA 主要是亚油酸异构酶作用的结果, 酶活性与温度关系密切, 由图 2 可以看出, 当培养温度为 37°C 时 CLA 产率最高。温度过高, 可能使 LA 的双键不发生迁移或迁移过程中不发生原有构型的变化。

2.2.1.3 培养时间对 CLA 产率的影响 分别对 X₁、X₂ 取零值, 得出培养时间对 CLA 产率的偏回归解析子模型如下:

$$Y_3 = 32.55 + 4.13X_3 - 6.09X_3^2, \text{ 由子模型 } Y_3 \text{ 得图 3。}$$

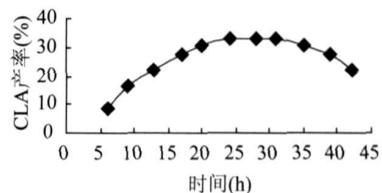


图 3 培养时间对 CLA 产率的影响

从图 3 可以看出开始 5h 是菌体生长的适应阶段, 亚油酸异构酶没有充分释放出来, 随着时间的继续, 亚油酸异构酶的酶活力逐渐提高, CLA 产量也逐渐提高, 28h 时 CLA 产量达到最高, 以后 CLA 产量有所降低, 可能是因为 CLA 进一步被加氢、氧化生成硬脂酸缘故^[7]。

2.2.2 因素交互作用分析

2.2.2.1 pH 和培养温度交互对 CLA 产率的影响 pH 和培养温度交互作用对 CLA 产率的偏回归解析子模型如下:

$$Y_4 = 32.55 + 2.71X_1 + 0.75X_2 + 0.24X_1X_2 - 7.36X_1^2 - 2.95X_2^2, \text{ 由子模型 } Y_4 \text{ 得图 4。}$$

由图 4 可以看出: pH 和温度对 CLA 产率具有显著交互影响。在 pH 5.0~5.5 和培养温度 36~38°C 交互作用区, CLA 产量最高。同时可以看出 pH 的变化

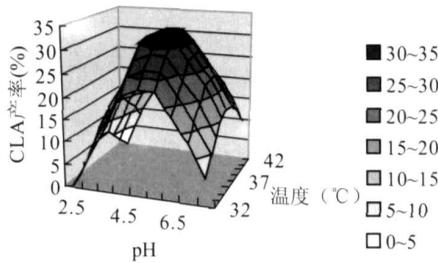


图4 pH和温度交互对CLA产率的影响

大于温度的变化,在温度一定的情况下,通过改变pH可以显著提高CLA产率。

2.2.2.2 培养温度和培养时间交互对CLA产率的影响 培养温度和培养时间交互对CLA产率的偏回归解析子模型如下:

$$Y_5 = 32.55 + 0.75X_2 + 4.13X_3 + 0.16X_2X_3 - 2.95X_2^2 - 6.09X_3^2$$

由子模型 Y_5 得图5

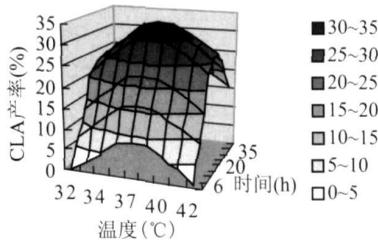


图5 温度和时间交互作用对CLA产率的影响

由图5可知,温度和培养时间对CLA产率有明显的交互影响。在培养温度36~38°C和培养时间24~28h情况下,能获得较多的CLA。

3 结论

本次实验采用三因素二次正交旋转组合设计,

得到了参试因素与CLA产率之间的回归模型: $Y = 32.55 + 2.71X_1 + 0.75X_2 + 4.13X_3 + 0.24X_1X_2 + 0.16X_2X_3 - 7.36X_1^2 - 2.95X_2^2 - 6.09X_3^2$ 。通过对该模型相关分析,得出该菌株发酵脱脂乳生成共轭亚油酸的最佳条件为:培养温度为37°C,培养时间28h,pH5.5。在优化工艺条件下,CLA的产率达33.4%。

参考文献:

(上接第87页)

致一部分的水分迁移。水分活度梯度越大,水分迁移速率越快,发生迁移的量也越大。影响水分子运动的一些因素也会影响水分迁移:低温贮存(4°C)可以延缓水分的迁移;在馅中添加脂肪可以在一定程度上减少水分的迁移。

参考文献:

- [1] E Roca, V Guillard, et al. Moisture migration in a cereal composite food at high water activity: Effects of initial porosity and fat content [J]. *Journal of Cereal Science*, 2006, 43: 144~1512.
- [2] 杨铭铎, 凌强. 中式快餐的研究—包子开发示范工程 [J]. *中国粮油学报*, 2000, 15(4): 44~52.
- [3] V Guillard, B Broyart, et al. Preventing Moisture Transfer in a Composite Food Using Edible Films: Experimental and Mathematical Study [J]. *Journal of Food Science*, 2003, 68: 2267~2277.
- [4] V Guillard, B Bertrand, et al. Moisture diffusivity and transfer modeling in dry biscuit [J]. *Journal of Food Engineering*, 2004, 64: 81~87.

- [1] Ha Y L, Crimm N K, Pariza M W. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids identification and quantification in nature and processed cheese [J]. *Journal of Agriculture and Food chemistry*, 1998, 37: 75~81.
- [2] Tung Y L. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives [J]. *Food Chemistry*, 2000, 69: 27~31.
- [3] L A Bsq, E P Cuesta, S E Gilliland. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin [J]. *Dairy Science*, 2003, 86: 1941~1946.
- [4] Kim Y J, Liu R H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria [J]. *Food Science*, 2002, 67 (5): 1731~1737.
- [5] 杜连祥. 工业微生物实验技术 [M]. 天津: 天津科技出版社, 1992.
- [6] Lin T Y, Lon C W, Wang Y J. Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC14079 [J]. *Food Chemistry*, 2003, 83(1): 27~31.
- [7] 刘晓华, 曹郁生, 陈燕. 微生物生产共轭亚油酸的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2003, 29(9): 69~72.

- [5] 食品分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 75.
- [6] V Guillard, B Broyart, et al. Evolution of Moisture Distribution During Storage in a Composite Food: Modeling and Simulation [J]. *Journal of Food Science*, 2003, 68(3): 958~966.
- [7] 王璋, 许时婴等译. 食品化学 (第三版) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 30~43.
- [8] J J Kester, O Fennema. An Edible Film of Lipids and Cellulose Esters: Performance in a Model Frozen-Food System [J]. *Journal of Food Science*, 1989, 54(6): 1390~1393.
- [9] B Biquet, T P Labuza. Evaluation of the Moisture Permeability Characteristics of Chocolate Films as an Edible Moisture Barrier [J]. *Journal of Food Science*, 1988, 53(4): 989~998.
- [10] T P Labuza, C R Hymen. Moisture migration and control in multi-domain foods [J]. *Food Science and Technology*, 1998 (9): 47~55.
- [11] S L Kamper, O Fennema. Use of an edible film to maintain water vapor gradients in foods [J]. *Journal of Food Science*, 1985, 50: 382~384.