

固定化乳酸菌 3-9 转化菜油脚生成共轭亚油酸研究

胡冰彬¹, 徐颖宣², 范相振¹, 巫小丹³, 徐尔尼^{3*}

(1. 南昌大学生命科学学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; 2. 南昌大学高等研究院, 南昌 330047; 3. 南昌大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047)

摘要: 对从泡菜中分离到的乳酸菌 3-9 菌株采用固定化技术转化菜油脚料生成共轭亚油酸进行研究。首先对乳酸菌 3-9 细胞的固定吸附材料及固定化条件进行探讨, 确定最适固定化材料为直径 1~3 mm 的瓷颗粒, 细胞吸附固定化时间是 1 h, 细胞固定率达到 75%。将该固定化细胞接入经爪哇毛霉脂肪酶水解后的菜油脚介质转化液中, 转化生成的 CLA 量为 $(187.91 \pm 3.71) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 是未固定化细胞 CLA 产量的 1.16 倍。随后对固定化乳酸菌 3-9 转化菜油脚生成共轭亚油酸条件进行研究。当以 pH8.0 的磷酸缓冲液为转化介质基础液, 转化时间为 17 h、转化温度为 40℃、固定化的细胞浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及摇床转速为 $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, CLA 的生成量可达 $(261.65 \pm 3.21) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 转化率为 17.64%。该固定化细胞能连续转化利用 16 个批次, 前 10 个批次 CLA 产量均保持在 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上, 其最高产量可达 $(283.81 \pm 6.02) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 转化率为 19.14%。最后对经 1、8 和 16 批次转化后的固定化细胞瓷颗粒进行电镜扫描观察, 图片显示经 8 批次的转化利用后, 仍可见大量形态完整的乳酸菌细胞吸附固定于瓷颗粒中。

关键词: 乳酸菌 3-9; 固定化; 菜油脚料; 共轭亚油酸; 爪哇毛霉脂肪酶

中图分类号: TS201.1; Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)03-0398-07

Immobilized lactic acid bacteria 3-9 for a conversion of rapeseed oil sediment into conjugated linoleic acid

HU Bingbin¹, XU Yingxuan², FAN Xiangzhen¹, WU Xiaodan³, XU Erni³

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330047;

2. Institute for Advanced Studies, Nanchang University, Nanchang 330047;

3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract: In this paper, lactic acid bacteria 3-9 screened from pickles was used to convert rapeseed oil sediment into conjugated linoleic acid. Simultaneously, the cells of lactic acid bacteria 3-9 were handled for immobilization. Firstly, adsorption immobilization conditions for lactic acid bacteria 3-9 were investigated and the optimum immobilization conditions were: using 1-3 mm ceramic particles to immobilize the cells for 1 h. The immobilization rate of the cells could reach to 75%. The immobilized cells were placed into rapeseed oil sediment conversion liquid that was hydrolyzed by mucor javanicus lipase and the yield of CLA was $187.91 \pm 3.71 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, which was 1.16 times higher compared to the resting cells. Secondly, the conditions for immobilized lactic acid bacteria 3-9 to convert rapeseed oil sediment into conjugated linoleic acid were studied. When phosphate buffer (pH8.0) was used as the transformation base liquid, under the conditions of 17 h transformation at 40℃, the cell concentration at $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the oscillation speed at $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, the yield of CLA could reach to $261.65 \pm 3.21 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the conversion rate was 17.64%. These immobilized cells can continuously convert 16 batches of rapeseed oil sediment. The yield of CLA was higher than $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ among the 10 batches. The highest yield could reach to $283.81 \pm 6.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the conversion rate was 19.14%. Lastly, the immobilized cell granules were observed by SEM after conversion of 1, 8, and 16 batches. After 8 batches of conversion and utilization, a large number of intact lactic acid bacteria 3-9 cells absorbed in ceramic particles still could be observed.

收稿日期: 2015-02-04

基金项目: 江西省科技厅科技支撑项目(20111BBF60024)和江西省教育厅一般项目(GJJ14148)共同资助。

作者简介: 胡冰彬, 硕士研究生。E-mail: 15970632619@163.com

* 通信作者: 徐尔尼, 教授。E-mail: xuerni@126.com

Key words: Lactic acid bacteria 3-9; immobilization; rapeseed oil sediment; conjugated linoleic acid; mucor javanicus lipase

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)可以降低致癌率、减少动脉粥样硬化的发生、降低体脂含量^[1], 是一类主要存在于反刍动物奶制品及肉制品中的天然活性物质。CLA 是指一系列含有共轭双键、具有不同位置和空间的十八碳二烯酸同分异构体的混合物, 其中最具有生理活性的异构体是 *c9,t11*-CLA 和 *t10,c12*-CLA^[2]。目前, 主要是通过化学异构法转化亚油酸(Linoleic acid, LA)来生产 CLA, 但是该法生产的 CLA 异构体成分复杂, 难以分离纯化出有效异构体。据报道, 多种微生物能利用其体内亚油酸异构酶将 LA 转化生成 CLA, 且生成的 CLA 具有成分单一, 反应条件温和等特点^[3], 特别是乳酸菌因其使用安全性而备受关注。作者对 1 株从泡菜中筛选得到的乳酸菌 3-9, 采用细胞吸附固定技术转化菜油脚料生成 CLA 进行研究。

中国是世界上最大的油菜籽生产国, 年产量早已突破 1000 万 t, 在菜籽油加工过程中, 油脚料每年排放量高达 20 万 t。油脚料极易发酵变质、酸败发臭, 是我国城镇油厂环境污染的重要源头^[4], 菜籽油脚料中含有 25%~30%的中性油(其中 LA 含量达到 15.16%), 25%~35%的磷脂^[5]等物质。因此, 如何从中提取中性油和磷脂, 并进一步生产获得附加值高的产品, 实现资源的再利用及有效环境治理是一个值得研究的课题。

自然界中的油脂大多以甘油三酸酯的形式存在, 但是乳酸菌细胞只能利用游离的脂肪酸, 因此需预先对油脂进行水解处理。脂酶属于水解酶类(hydrolase), 能水解油脂中的三甘酯成分释放出游离的脂肪酸。脂酶不能作用于分散在水中的底物分子, 但能作用于乳化的脂肪球^[6], 所以要预先将菜油脚料制成乳化液。本试验利用爪哇毛霉脂肪酶对菜油脚中的中性油脂进行了水解, 以生成游离脂肪酸为底物供固定化后的乳酸菌 3-9 细胞利用转化生成 CLA。通过对固定化载体材料, 固定化转化介质基础液, 以及转化过程中温度、时间、pH、细胞浓度、摇床转速的条件研究, 旨在提高固定化细胞转化菜油脚料生成 CLA 的产量及转化率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 乳酸菌 3-9 (Lactic acid bacteria 3-9):

本实验室从泡菜中筛选所得。

1.1.2 主要试剂 共轭亚油酸标准品(含有 *c9,t11* 和 *t10,c12* 两种异构体, 纯度≥99%), Sigma 公司; 爪哇毛霉脂肪酶(酶活≥10000 U·g⁻¹), Sigma 公司; 菜籽油脚料(酸价 38.15, 皂化值 182.64), 来自江西南昌; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 紫外/可见分光光度计, 上海分析仪器厂; THZ-C 恒温振荡器, 江苏太仓市实验设备厂; SK-1 快速混匀器, 常州国华电器有限公司; 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市英峪予华仪器厂; 手提式压力蒸汽灭菌器, 上海华线医用核子仪器有限公司; 低速大容量离心机(DL-5-B)上海安亭科学仪器厂; 酸度计(PHS-25 型); 扫描电子显微镜(FEI QUANTA200F 型)等。

1.1.4 培养基 MRS 液体培养基: 牛肉膏 1 g、蛋白胨 1 g、酵母膏 0.5 g、葡萄糖 2 g、乙酸钠 0.5 g、K₂HPO₄ 0.2 g、柠檬酸氢二铵 0.2 g、MgSO₄ 0.02 g、MnSO₄ 0.025 g, 蒸馏水 100 mL。pH7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

产酶诱导培养基: 在 MRS 液体培养基中添加至终浓度为 0.30%的亚油酸乳化液, 诱导乳酸菌 3-9 菌株亚油酸异构酶的产生。

1.2 实验方法

1.2.1 菜油脚料乳化液的制备 称取 2.0 g 吐温 80 和 1.5 g 菜油脚料于试管中, 75 °C 恒温水浴 10 min, 再边振荡边加入去离子水, 至油脚的终浓度为 75 mg·mL⁻¹。振荡 5 min 后重新放入 75 °C 水浴锅中保温 10 min, 再次取出振荡混匀 5 min, 如此反复保温振荡 6 次, 至油脚与水充分混匀, 于 125 °C 水解 30 min, 4 °C 保存备用。

1.2.2 乳酸菌 3-9 菌悬液的制备 从乳酸菌 3-9 斜面上挑取一环菌接种于 150 mL MRS 液体培养基中, 30 °C 静置培养 24 h, 即为种子液。按 5%的接种量将所得种子液接种于产酶诱导培养基中, 30 °C 增殖诱导培养 18 h。培养结束后, 取菌液冷冻离心(5000 r·min⁻¹, 25 min, 4 °C), 去上清, 得到湿细胞用 0.85%的无菌生理盐水离心洗涤 2 次, 再用生理盐水配成浓度 0.4 g·mL⁻¹ 菌悬液。

1.2.3 固定化乳酸菌 3-9 转化生成 CLA 的方法 (1) 固定化乳酸菌 3-9 细胞颗粒的制备。固定化载体先用 3 mol·L⁻¹ 的 HCL 浸泡 24 h, 后用自来水冲洗至中性; 再用 3 mol·L⁻¹ 的 NaOH 浸泡 24 h, 最后用

水洗至中性。将载体浸泡在水中于 125℃ 灭菌 30 min, 取出烘干, 分装 (10.00 g·管⁻¹), 再次置于 125℃ 灭菌 30 min, 备用。取 1.2.2 所述菌悬液 5 mL 置于装有固定化载体离心管中, 加入 10 mL 生理盐水, 4℃ 下吸附固定化一定时间。经 5000 r·min⁻¹, 4℃ 离心 15 min, 弃上清, 得到固定化菌细胞颗粒。

细胞固定率测定方法: 按 1.2.2 配制成一定已知浓度菌悬液后, 取一定体积的菌悬液进行细胞固定化, 算得固定前细胞总质量为 (W_0)。细胞固定化后, 收集固定化上清液, 5000 r·min⁻¹, 25 min, 4℃ 离心, 获游离菌体质量 (W_1), 用固定前菌体总量减去游离菌体质量, 即可得到已固定的菌体质量, 其百分比即为细胞固定率。

$$\text{细胞固定率}(\%) = (W_0 - W_1) / W_0 \times 100\%$$

(2) 固定化乳酸菌 3-9 转化菜油脚料生成 CLA。取 3 mL 菜油脚料乳化液加入爪哇毛霉脂肪酶至酶终浓度为 300 U·mL⁻¹, 同时加入 5 mL 浓度 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 40℃ 酶促水解 40 min。将酶促水解液移入上述的固定化菌细胞颗粒中, 再加入一定量的缓冲液作为介质基础液, 至转化液介质总体积为 23 mL, 至菜油脚料终浓度为 9.87 mg·mL⁻¹。在一定温度和振荡速度下转化一定时间, 得到含 CLA 的转化液, 萃取测定 CLA 产量。每次实验均进行 3 次独立重复实验。

1.2.4 共轭亚油酸的提取和检测^[7] (1) 共轭亚油酸标准曲线的绘制。共轭亚油酸在 233 nm 处有明显的吸收峰, 用正己烷将 CLA 标准品配制一系列不同浓度的 CLA 溶液, 以正己烷为空白对照, 在 233 nm 处分别测其吸光值, 然后以 CLA 浓度为横坐标, 测得的吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。

(2) 共轭亚油酸的提取^[8]。转化液离心后取 5 mL 上清液于 60 mL 分液漏斗中, 加入 20 mL 正己烷, 振摇萃取 5 min, 静置至完全分层, 弃去下层水相, 再加入 5 mL 蒸馏水, 振荡萃取 2 min, 静置至分层完全, 弃去下层水相, 将上层液体和乳化层一并用水 Na₂SO₄ 过滤, 并移至 25 mL 容量瓶中, 用正己烷定容, 以正己烷为空白对照, 然后用紫外分光光度法测定吸光度。最后根据标准曲线, 稀释倍数等参数计算出 CLA 的产量。

1.2.5 乳酸菌 3-9 细胞固定化条件研究 (1) 固定化载体材料对乳酸菌 3-9 产 CLA 的影响。选择颗粒大小一致的多孔陶粒和瓷颗粒作为固定化载体, 按上述方法处理后, 转化生成 CLA, 根据 CLA 生成量确定最适固定化载体。

(2) 瓷颗粒大小对乳酸菌 3-9 产 CLA 的影响。

分别选择直径为 1~3 mm、4~6 mm 和 7~10 mm 瓷颗粒, 按上述得到固定化细胞瓷颗粒, 再转化生成 CLA, 根据 CLA 生成量确定最适瓷颗粒大小。

(3) 吸附固定化时间对乳酸菌 3-9 产 CLA 的影响。选择 0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h 6 个吸附固定时间, 得到固定化细胞瓷颗粒, 再进行转化生成 CLA, 由 CLA 量确定乳酸菌 3-9 细胞的最适固定化时间。

(4) 吸附固定化乳酸菌 3-9 和游离乳酸菌 3-9 产 CLA 的比较。得到游离细胞和固定化细胞后, 在相同介质体系和反应条件下转化菜油脚料生成 CLA, 测定比较 CLA 产量。

1.2.6 吸附固定化乳酸菌 3-9 细胞转化菜油脚料生成 CLA 条件研究 (1) 转化用缓冲液种类及 pH 对固定化菌产 CLA 的影响。选择浓度均为 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸-柠檬酸钠^[9]和磷酸 2 种缓冲液作为转化介质基础液, 分别设置 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5 共 8 个 pH 水平, 固定化细胞浓度为 0.4 g·L⁻¹, 37℃, 100 r·min⁻¹ 转化 23 h。比较不同缓冲液不同 pH 条件下转化生成的 CLA 量, 确定最适转化用缓冲液种类及其最适转化 pH 值。

(2) 转化温度对固定化菌产 CLA 的影响。在已经确定缓冲液种类及 pH 值的情况下, 选择 25、30、35、40、45 和 50℃ 共 6 个温度水平, 固定化细胞浓度 0.4 g·mL⁻¹, 100 r·min⁻¹ 转化 23 h。比较不同温度下转化生成 CLA 的量, 确定最适转化温度。

(3) 固定化菌细胞浓度对产 CLA 的影响。设置 0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55 和 0.60 g·mL⁻¹ 共 8 个固定化细胞浓度水平, 缓冲液种类、pH 值和温度已确定, 100 r·min⁻¹ 转化 23 h。比较不同的固定化菌细胞浓度对 CLA 产量的影响, 确定转化的最适固定化菌细胞浓度。

(4) 转化时间对固定化菌产 CLA 影响。在已确定缓冲液种类、pH 值、温度、细胞浓度的情况下, 选择 10、12、15、17、19、21、23、25 和 27 h 共 9 个时间水平, 100 r·min⁻¹ 转化相应的时间。比较不同转化时间得到的 CLA 量, 确定转化最适时间。

(5) 转化振荡速度对固定化菌产 CLA 的影响。在转化反应的缓冲液 pH 值、温度、细胞浓度、时间都已经确定的情况下, 设置 0、50、80、100、120 和 140 r·min⁻¹ 共 6 个振荡转速水平。比较不同振荡速度下 CLA 产量, 以此确定最适转化振荡速度。

1.3 吸附固定化乳酸菌 3-9 连续多批次转化菜油脚料生成 CLA

当完成一批次转化后, 取出上清液进行 CLA 的

萃取, 在留有固定化菌细胞颗粒试管中再加入新鲜的菜油脚料转化液介质, 将此固定化细胞颗粒继续用于转化生成 CLA, 如此连续进行多个批次, 从而了解该固定化细胞瓷颗粒转化能力的稳定性。

1.4 不同批次吸附固定化乳酸菌 3-9 电镜扫描

将未吸附菌体的空白瓷颗粒和吸附有菌体的不同批次的瓷颗粒烘干后, 用 FEI QUANTA200F 型扫描电子显微镜观察不同瓷颗粒表面细胞附着情况, 以了解使用了多批次后乳酸菌 3-9 在瓷颗粒中的细胞形态及数量。

2 结果与分析

2.1 CLA 标准曲线

见图 1 所示。

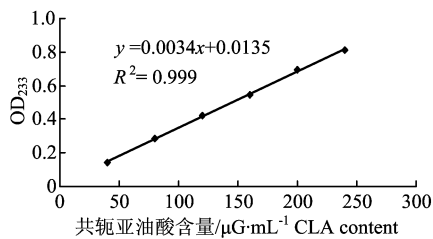


图 1 共轭亚油酸标准曲线
Figure 1 Standard curve of CLA

2.2 乳酸菌 3-9 细胞固定化条件的研究

2.2.1 固定化载体材料对乳酸菌 3-9 产 CLA 的影响
从图 2 可以看出, 以瓷颗粒作固定化载体的细胞固定率为 68%, 是多孔陶粒的 1.24 倍。乳酸菌 3-9 细胞用瓷颗粒固定化后, 其转化生成 CLA 产量为 $(165.34 \pm 1.63) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 是多孔陶粒的 1.11 倍。所以瓷颗粒更适合菌体的吸附固定化, 并且多孔陶粒结构不如瓷颗粒坚固, 反复使用后易碎, 不利于保持固定化细胞颗粒的完整性和稳定性。综合以上结论, 选择瓷颗粒作为固定化细胞载体。

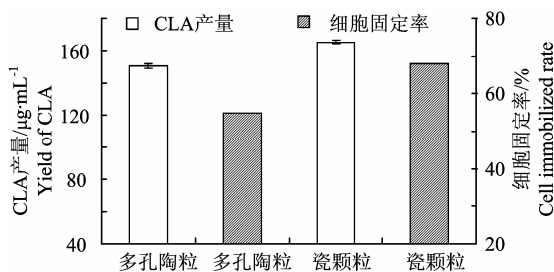


图 2 固定化材料对 CLA 产量的影响

Figure 2 Effect of the immobilized material on the yield of CLA

2.2.2 瓷颗粒大小对乳酸菌 3-9 产 CLA 的影响 图 3 结果表明, 当瓷颗粒直径为 1~3 mm 时, 转化生

成的 CLA 值最高, 为 $(176.81 \pm 2.34) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。这是因为瓷颗粒直径越小, 比表面积反而越大, 固定化菌细胞颗粒与底物反应的接触面越大, 吸附的菌体则越多, 亚油酸异构酶量也越多, 转化底物生成的 CLA 就越多。

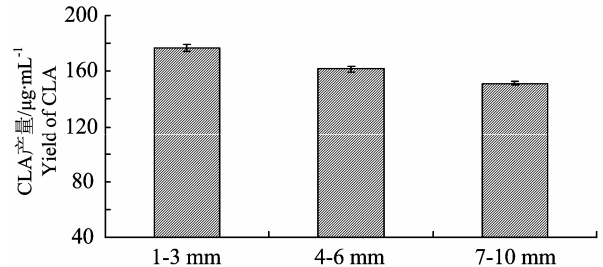


图 3 瓷颗粒大小对 CLA 产量的影响

Figure 3 Effect of the diameter of ceramic particles on the yield of CLA

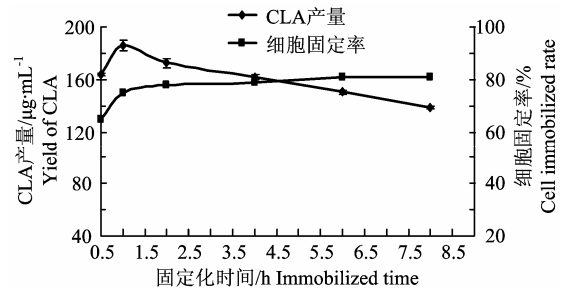


图 4 吸附固定化时间对 CLA 产量的影响

Figure 4 Effect of immobilized time on the yield of CLA

2.2.3 吸附固定化时间对乳酸菌 3-9 产 CLA 的影响
从图 4 可以看出, 固定化时间为 1 h 时, 细胞固定率为 75%, CLA 产量为 $(185.83 \pm 4.35) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 达到最高。随着固定化时间延长, CLA 产量逐渐降低。因为菌体吸附到载体上需要一定的时间, 当固定化 1 h 后, 瓷颗粒吸附量达到饱和, 若继续固定化会导致单位载体上吸附的细胞数量过多, 使瓷颗粒内的微空间更为狭小, 影响传质效果。同时, 菌体放置时间过久, 会降低胞内亚油酸异构酶活性, 从而降低 CLA 产量, 所以选择固定化时间为 1 h。

2.2.4 吸附固定化乳酸菌 3-9 与游离乳酸菌 3-9 产 CLA 的比较 从图 5 可知, 当乳酸菌 3-9 细胞被固定化后, CLA 产量可达 $(187.91 \pm 3.71) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 是游离状态下 CLA 产量的 1.16 倍。可能是因为细胞被固定化后, 其体内亚油酸异构酶的活性增强, 细胞密度增大, 导致 CLA 产量提高。说明固定化乳酸菌 3-9 比游离乳酸菌 3-9 在转化生成 CLA 方面有一定的优势。

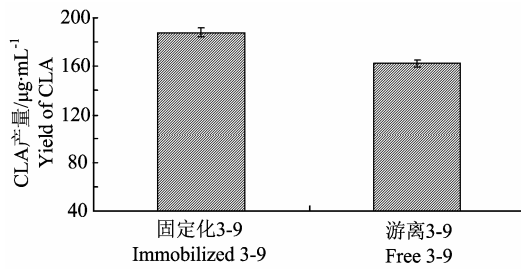


图5 固定化乳酸菌3-9和游离乳酸菌3-9产CLA的比较

Figure 5 The comparison between immobilized and free Lactic acid bacteria 3-9 on the yield of CLA

2.3 吸附固定化乳酸菌3-9转化菜油脚料生成CLA条件研究

2.3.1 缓冲液种类及pH对固定化菌产CLA的影响 采用不同pH值的柠檬酸-柠檬酸钠和磷酸两种缓冲液作为转化介质基础液,结果如图6所示。当柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液pH值为8.0时,CLA产量最高,为 $(196.26 \pm 2.78) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,当pH值继续增高,CLA的产量反而减少。同样,当磷酸缓冲液pH值为8.0时,CLA产量也达到最高,为 $(206.26 \pm 2.80) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。这是因为转化体系pH值过高或过低都会影响亚油酸异构酶的活性,而当2种缓冲液pH值均为8.0时,磷酸缓冲液更有利于CLA的生成,这可能是由于磷酸缓冲液更有利于亚油酸异构酶结构的稳定,从而保持酶的活性。所以选择pH值为8.0的磷酸缓冲液作为转化介质基础液。

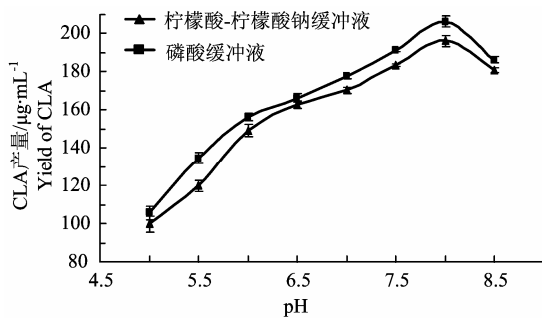


图6 2种缓冲液及其pH值对CLA产量的影响

Figure 6 Effect of pH of buffer solution on the yield of CLA

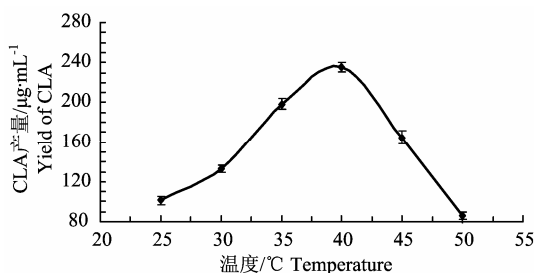


图7 转化温度对CLA产量的影响

Figure 7 Effect of conversion temperature on the yield of CLA

2.3.2 转化温度对固定化菌产CLA的影响 适宜的温度条件对酶促反应的进行是至关重要的,图7显示,当反应温度达到 40°C 时,CLA产量最高,为 $(235.72 \pm 4.75) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。随着温度进一步升高,CLA的产量反而降低,这是因为高温会使酶蛋白质遭到不可逆的破坏,从而导致亚油酸异构酶活性降低,所以最适转化温度为 40°C 。

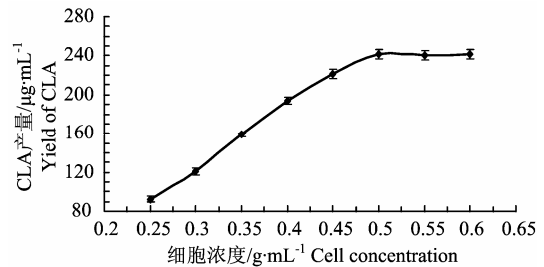


图8 细胞浓度对CLA产量的影响

Figure 8 Effect of cell concentration on the yield of CLA

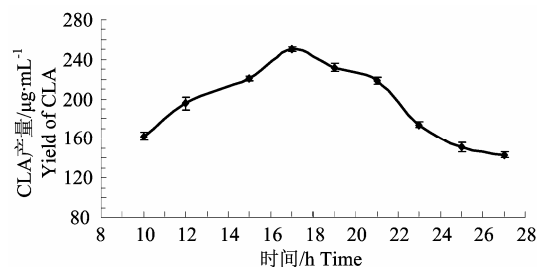


图9 转化时间对CLA产量的影响

Figure 9 Effect of reaction time on the yield of CLA

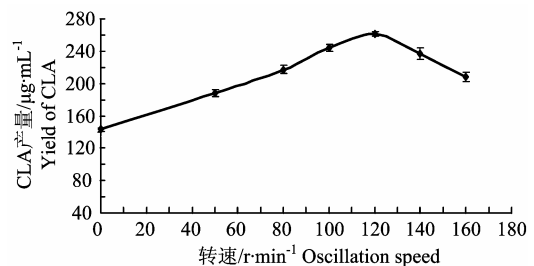


图10 转化振荡速度对CLA产量的影响

Figure 10 Effect of oscillation speed on the yield of CLA

2.3.3 细胞浓度对固定化菌产CLA的影响 转化体系中,细胞浓度大小代表体系所含亚油酸异构酶的多少,所以细胞浓度的改变会导致亚油酸异构酶含量的改变,最终影响转化效果。从图8可以看出,当细胞浓度为 $0.25 \sim 0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,CLA产量随细胞浓度增高而增加,但细胞浓度超过 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,CLA产量不再有明显变化,这是因为酶浓度已达到饱和,而且过密的菌细胞会影响瓷颗粒中底物介质的传递。所以转化的最适细胞浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,

CLA 产量为 $(241.85 \pm 5.06) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

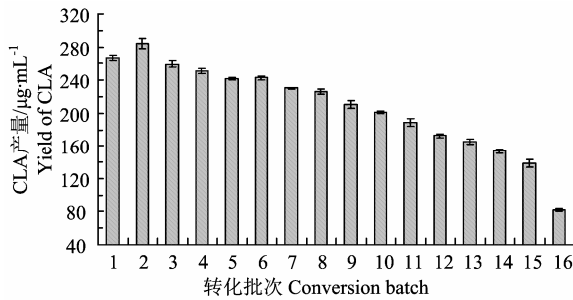


图 11 固定化乳酸菌 3-9 批次转化生成 CLA

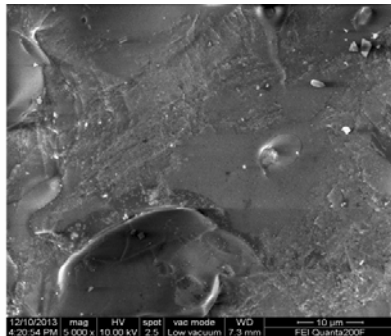
Figure 11 The continual conversion of immobilized Lactic acid bacteria 3-9 for CLA

2.3.4 转化时间对固定化菌产 CLA 的影响 从图 9 可知, 在反应初始阶段, CLA 产量随反应的进行而增加, 当反应时间达到 17 h 时, CLA 产量最高, 为 $(250.34 \pm 2.58) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。随着反应继续进行, CLA 产量逐渐下降, 这是因为 CLA 极易被氧化, 稳定性较差。有文献报道^[10], CLA 只是亚油酸异构酶转化 LA 的中间产物, 随着反应的进行, CLA 最后会被

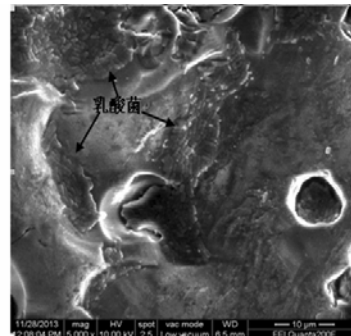
还原为十八碳一烯酸或是进一步被还原为硬脂酸。

2.3.5 转化振荡速度对固定化菌产 CLA 的影响 适当的振荡速度有助于酶与底物充分接触, 从图 10 可知, 振荡速度为 $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, CLA 产量达到最高, 为 $(261.65 \pm 3.21) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。随着振荡速度继续加快, CLA 产量反而降低, 主要是因为转速太高, 影响了酶与底物的有效结合, 所以转化的最适振荡速度为 $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

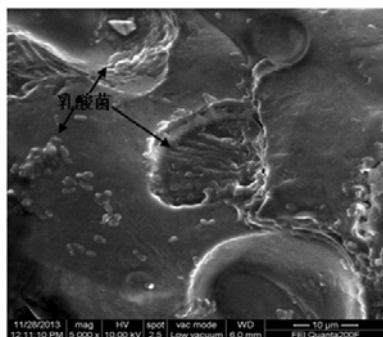
2.4 吸附固定化乳酸菌 3-9 连续多批次转化菜油脚料生成 CLA 图 11 结果显示, CLA 产量在转化第 2 个批次达到最大值, 为 $(283.81 \pm 6.02) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 可能是因为细胞固定化后有一个适应环境的过程。随着固定化细胞颗粒使用批次数的增加, CLA 产量逐渐下降, 到第 16 批次下降的最为显著, 不宜再进行转化。这主要是因为随着转化反应持续进行, 细胞中的亚油酸异构酶的活性逐渐减弱。前 10 个批次 CLA 产量均保持在 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上, 充分证明乳酸菌 3-9 被吸附固定于瓷颗粒后, 能被多次重复利用。



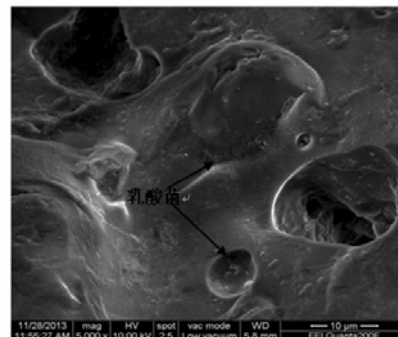
(1) 未吸附细胞的空白瓷颗粒表面的形貌 ($\times 5000$)
Surface morphology of blank ceramic particle without cells ($\times 5000$)



(2) 第 1 批次瓷颗粒表面吸附菌体的形貌 ($\times 5000$)
Surface morphology of the first batch of ceramic particles adsorbed by the bacterial cells ($\times 5000$)



(3) 第 8 批次瓷颗粒表面吸附菌体的形貌 ($\times 5000$)
Surface morphology of the 8th batch of ceramic particles adsorbed by the bacterial cells ($\times 5000$)



(4) 第 16 批次瓷颗粒表面吸附菌体的形貌 ($\times 5000$)
Surface morphology of the 16th batch of ceramic particles adsorbed by the bacterial cells ($\times 5000$)

图 12 吸附固定化乳酸菌 3-9 颗粒电镜扫描图

Figure 12 SEM photographs of immobilized Lactic acid bacteria 3-9

2.5 不同批次固定化乳酸菌 3-9 细胞颗粒电镜扫描
从图 12 可以清楚的看到, 吸附固定化后, 大量的乳酸菌细胞吸附在瓷颗粒上, 在第 8 个批次时瓷

颗粒上仍吸附有大量形态完整菌体细胞, 直到第 16 个批次, 瓷颗粒上的菌体细胞大量脱落, 因此细胞酶也大大减少。另外, 由于批次转化经历的时间较

长,酶的活性也逐渐丧失,最终导致 CLA 产量下降。

3 小结与讨论

固定化细胞是在固定化酶的基础上发展起来的新技术,利用固定化细胞可以进行单酶、多酶催化反应,甚至细胞仍可以继续生长与增殖,从而制造各种复杂生化物质^[11]。作者对固定化乳酸菌 3-9 细胞用于转化菜油脚料生产 CLA 进行了研究,首先对乳酸菌 3-9 固定材料及固定化条件进行了探讨,确定其最适固定化材料为直径 1~3 mm 的瓷颗粒,最佳吸附固定化时间是 1 h,细胞固定率为 75%,CLA 产量为 $(187.91 \pm 3.71) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,是未固定化细胞 CLA 产量的 1.16 倍。然后对吸附固定化乳酸菌 3-9 细胞转化菜油脚料的转化介质基础液、温度、时间、pH、细胞浓度、转化振荡速度这些主要影响因素进行了研究,当以 pH8.0 磷酸缓冲液为转化介质基础液,在细胞浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,温度为 40°C ,摇床转速为 $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,转化 17 h 后,CLA 的产量可达 $(261.65 \pm 3.21) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,转化率为 17.64%。随后,利用吸附固定化乳酸菌 3-9 连续多批次地转化菜油脚生成 CLA,结果证实该固定化细胞瓷颗粒能连续转化 16 个批次,其中 CLA 最高产量可达到 $(283.81 \pm 6.02) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,转化率为 19.14%,前 10 个批次 CLA 产量均保持在 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上。最后,选取了不同批次的固定化细胞瓷颗粒进行了扫描电镜观察,图片显示经 8 批次的转化后瓷颗粒仍吸附固定有大量形态完整的乳酸菌 3-9 菌细胞,这充分说明该固定化细胞的吸附及稳定性较好。

从以上数据可知,瓷颗粒固定化乳酸菌 3-9 细胞转化菜油脚料生成 CLA 是可行的。目前,大部分研究采用蓖麻油、亚油酸、大豆油等较昂贵的原料为底物来转化合成 CLA,而本试验采用廉价易得的菜油脚料为底物转化生成 CLA,其转化率达到 19.14%。本研究不仅降低了生产成本,还可以减少废弃物对环境的污染,变废为宝。今后,可以进一步研究固定化方法,增强细胞的吸附和转化效率,达到更高产量、多批次转化生成 CLA 的效果。同时,

本研究发现菜油脚料不仅含 15.50%的亚油酸,还含有 10%左右的亚麻酸,亚麻酸也能在亚油酸异构酶的作用下生成共轭亚麻酸,其与 CLA 的生理功能相似,这也促使我们进一步去开发和研究菜油脚料的新用途。

参考文献:

- [1] Ogawa J, Kishino S, Ando A, et al. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(4): 355-364.
- [2] Michihiro S, Akira T, Masao Y, et al. Lymphatic recovery, tissue distribution and metabolic effects of conjugated linoleic acid in rats[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1997, 8(1): 38-43.
- [3] Kishino S, Ogawa J, Omura Y, et al. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria[J]. *JAOCs*, 2002, 79(2): 159-163.
- [4] Xu D G, Xiao L S, Cai Y, et al. Research of lipase - catalyzed synthesis of ethyl hexanoate in nonaqueous conditions[J]. *Fine Chemicals*, 2004, 21(4): 279-281.
- [5] 孙尚德, 毕艳兰, 徐玲, 等. 从油脚、皂脚混合物中提取油脂的不同方法的比较研究[J]. *粮油加工与食品机械*, 2005(5): 48-49.
- [6] Ando A, Ogawa J, Kishino S, et al. Conjugated linoleic acid production from castor oil by *Lactobacillus Plantarum* JCM 1551[J]. *Enzyme Microb Technology*, 2004, 35: 40-45.
- [7] Lee S O, Hong G W, Oh D K. Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid by immobilized *Lactobacillus reuteri*[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(3): 1081-1084.
- [8] 齐士朋, 徐尔尼, 李焱. 乳酸菌 UV₃₋₉ 包埋固定化技术发酵产共轭亚油酸[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(11): 36-41.
- [9] 何国庆. 一种植物乳杆菌生物转化共轭亚油酸的方法[P]. 中国, 201110105610, 2011-10-05.
- [10] Paimquist D L, Lock A L, Shingfield K J, et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans[J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2005, 50: 179-217.
- [11] 韩静淑. 生物细胞的固定化技术及其应用[M]. 北京: 北京科学出版社, 1993.