

产共轭亚油酸德氏乳杆菌的诱变选育

郭 焱, 于国萍

(东北农业大学食品学院 黑龙江 哈尔滨

150030)

摘 要:以德氏乳杆菌保加利亚亚种 1.1482 为出发菌株,经硫酸二乙酯、紫外线对细胞悬液进行诱变处理,筛选出一株共轭亚油酸高产菌株 1616u,并优化其培养条件,在培养基初始 pH 值为 5;培养温度为 37℃;培养时间为 30h 时,发酵液中可积累共轭亚油酸平均为 11.04μg/ml,最高可达 11.61μg/ml。

关键词:共轭亚油酸;德氏乳杆菌;诱变选育

Production of Conjugated Linoleic Acids by *Lactobacillus delbrueckii* Mutation Breeding

GUO Yan, YU Guo-ping

(College of Food Science, North East Agricultural University, Harbin

150030, China)

Abstract:Original strain, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1.1482 was mutated by ultraviolet radiation and DES. Then a strain named 1616u, producing conjugated linoleic acid 1616u was obtained. The optimum conditions were found, original pH of culture material 5, culture temperature 37℃, and culture time 30h. 11.61μg/ml is the highest with an average of 11.04μg/ml conjugated linoleic acid.

Key words:conjugated linoleic acid; *Lactobacillus delbrueckii*; mutation breeding

中图分类号:Q93

文献标识码:A

文章编号:1002-6630(2007)01-0176-04

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是由亚油酸衍生的共轭双烯酸的多种位置和几何异构体的总称。其中 9c, 11t 和 10t, 12c 两种异构体具有很强的生理活性^[1]。近些年来 CLA 的各种生理功能不断被发现,包括抗癌、降低血液和肝脏胆固醇、参与脂肪分解、增强机体免疫力、抗氧化等^[2-5]。

关于共轭亚油酸的生产,目前大都采用植物油碱催化共轭化的方法。但此方法存在耗能大、设备腐蚀严重等问题。因此由微生物转化亚油酸为共轭亚油酸的研究近年来倍受关注,日前已有报道乳酸菌可以转化亚油酸并获得较高浓度的共轭亚油酸,微生物代谢诱导产生亚油酸异构化酶有利于合成共轭亚油酸^[6]。本实验是用紫外线和硫酸二乙酯诱变处理从 18 株乳酸菌中筛选的合成共轭亚油酸能力较高的德氏乳杆菌,从而提高发酵液中有活性共轭亚油酸的含量,为共轭亚油酸的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 1.1482 中科院微生物研究所。

1.2 培养基

1.2.1 发酵培养基 硫酸铵 10.0g, 酵母粉 15.0g, 牛肉粉 10.0g, 葡萄糖 10.0g, 果糖 10.0g, 乙酸钠 5.00g, 磷酸氢二钾 2.00g, Tween-80 1.00g, 柠檬酸二铵 2.00g, 硫酸镁 0.20g, 硫酸锰 0.05g, 1000ml 水, pH8.0, 115℃ 灭菌 20min。

1.2.2 平板计数培养基 MRS 培养基。

1.3 实验操作流程

出发菌株的活化 细胞悬液的制备 诱变剂处理 适当稀释涂平板 初筛(观察菌落形态 随机挑选菌落 接入试管 部分冻存, 部分发酵培养 气谱检测) 复筛 反复多次。

1.3.1 出发菌株的活化

-80℃ 冻存菌种按 3% 的添加量接种于 MRS 培养液中, 37℃ 培养 24h, 传代培养, 获得菌体活力较好的菌液。

1.3.2 细胞悬液制备

离心活化好的菌液收集菌体, 用灭菌生理盐水洗涤一次, 旋涡混合器振荡 10min, 血球计数板计数菌体个数再用生理盐水调整细胞浓度使之成为 10⁸ 个/ml 的菌悬液。

收稿日期: 2005-11-16

作者简介: 郭焱(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学。

1.3.3 紫外线诱变

在黑暗条件下先开紫外线(UV)灯 20min, 使灯的功率稳定, 固定照射距离 38cm。取 10ml 细胞悬液于 10cm 培养皿中, 置于放在紫外线灯正下方的磁力搅拌器上, 打开皿盖, 开动磁力搅拌器, 边搅边照射。诱变结束后适当稀释细胞悬液涂平板, 37℃ 静止培养 30h, 计数单菌落个数, 计算致死率。

$$\text{致死率}(\%) = \frac{\text{对照1ml 菌液中活菌数} - \text{处理后1ml 菌液中活菌数}}{\text{对照1ml 菌液中活菌数}} \times 100$$

1.3.4 硫酸二乙酯诱变

将 1.3.2 中所用生理盐水换成 pH7.0 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液同样制成细胞悬液。吸取 1ml 硫酸二乙酯(DES)溶于 9ml 乙醇中, 配成 10% 的 DES 处理液。取 2ml 处理液缓慢加入 18ml 细胞悬液中 37℃ 恒温振荡处理一定时间, DES 的终浓度为 1%, 加入 0.5ml 硫代硫酸钠溶液(25%)终止反应^[7]。诱变结束后适当稀释细胞悬液涂平板, 37℃ 静止培养 30h, 计数单菌落个数, 计算致死率。

1.3.5 发酵培养

采用 50ml 三角瓶装液量 40ml, 接种量为 3%, 其中种子培养液为每毫升 3×10^8 个菌细胞, 于 37℃ 静止培养 24h。

1.4 共轭亚油酸的提取及气谱检测条件

发酵培养液先后分别加入异丙醇及正己烷混匀静置, 取上清液, 并用无水硫酸钠干燥^[8]。再次用正己烷提取菌液中的脂肪酸, 两次清液合并蒸干。先后用 1ml 苯, 1ml 石油醚, 2ml KOH-甲醇(0.4mol/L)溶解, 室温下反应 30min 后, 加水终止反应, 离心 10min, 取上清液用 N_2 吹干后色谱纯正己烷定容、待测。

色谱柱为 PEG-20M(60m \times 0.25mm), 配有氢火焰离子化检测器, 载气为氮气, 流速为 1.3ml/min, 氢气压力为 60kPa, 空气压力为 50kPa, 柱温 210℃, 检测器与气化室温度均为 260℃, 进样量为 1 μ l, 面积外标法计算。

2 结果与分析

2.1 紫外线和硫酸二乙酯最佳诱变剂量的确定

紫外线诱变选取不同的照射时间, 硫酸二乙酯选取不同的处理时间, 计算致死率结果见图 1、2。

表 1 为菌株的相对正突变率与各诱变剂不同诱变剂量的关系。紫外处理 30s, 致死率为 70%~80%, 得到较高的相对正突变率, 紫外照射诱变剂量确定为 30s; 硫酸二乙酯处理 20~30min, 致死率为 76%~86%, 同样得到较高的相对正突变率, 硫酸二乙酯处理诱变剂量确定为 20~30min。实验结果说明在相对不太高的致死率下, 有较高的相对正突变率。

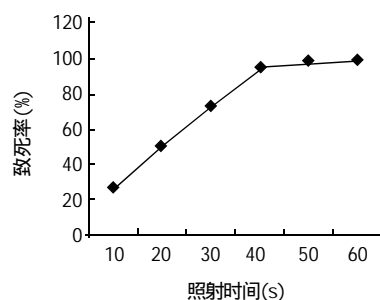


图 1 紫外线处理致死率图

Fig.1 Causing death rate curve of UV treatment

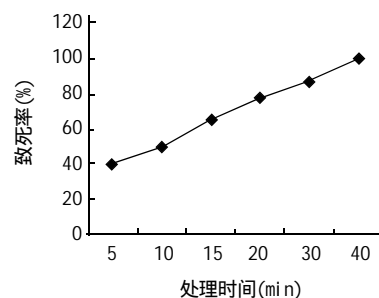


图 2 硫酸二乙酯处理致死率曲线

Fig.2 Causing death rate curve of DES treatment

表 1 菌株的相对正突变率

Table 1 The relative positive mutation rate of strain

UV 诱变剂量 (s)	相对正突变率 (%)	DES 诱变剂量 (min)	相对正突变率 (%)
10	20	5	20
20	29	10	30
30	44	15	28
40	30	20	45
50	-	30	46
60	-	40	30

注:“-”表示未检出正突变株。

2.2 共轭亚油酸高产菌株选育谱系

以德氏乳杆菌保加利亚亚种 1.1482 为出发菌株, 经紫外线、硫酸二乙酯诱变处理, 最终筛选出一株共轭亚油酸产量最高可达 11.29 μ g/ml 发酵液的菌株, 筛选过程如下:

出发菌株(4.95~5.47 μ g/ml)

DES

53(7.05 μ g/ml)

UV

534(9.07 μ g/ml)

DES

1616(9.37 μ g/ml)

UV

1616u(10.42~11.29 μ g/ml)

2.3 1616u 产共轭亚油酸稳定性

对菌株 1616u 进行多次重复发酵实验, 结合产 CLA

水平及统计量“变异系数”值,分析该菌具有良好的产CLA稳定性,结果见表2。表2表明,该菌具有良好的产CLA稳定性,即较低的“变异系数”值。

表2 1616u产CLA稳定性
Table 2 Stability study of 1616u on fermentation of CLA

实验次数	产CLA值($\mu\text{g/ml}$)			产CLA值统计量		产CLA值变异系数(%)
	最高	最低	平均	方差	标准差	
8	11.29	10.42	10.75	0.55	0.28	2.6

2.4 1616u生长曲线

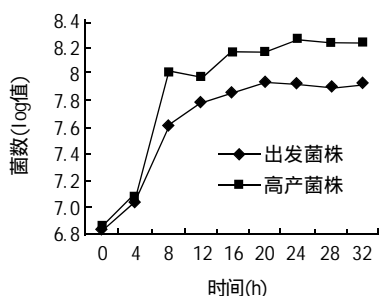


图3 1616u与出发菌株的生长曲线
Fig.3 Growth curve of 1616u and starting strain

从图3可以看出,1616u的对数生长期为24h,比原出发菌株的对数期20h延后4h,并且在初始菌数基本一致的前提下,培养8h时1616u菌体数目明显多于出发菌株的菌体数目,镜检1616u菌株菌体比出发菌株菌体小。

2.5 培养温度对共轭亚油酸产量的影响

按前述发酵培养方法,采用不同培养温度,培养24h后测定共轭亚油酸含量,结果见表3。从表3可知,温度在32~42之间有利于共轭亚油酸的合成。温度过高、过低都对共轭亚油酸产量有很大的影响,是因为过高、过低温度不利乳酸菌生长的缘故。

表3 培养温度对CLA产量的影响
Table 3 Effects of cultivated temperature on CLA production

温度($^{\circ}\text{C}$)	27	32	37	42	47
CLA($\mu\text{g/ml}$)	9.53	10.21	10.58	10.13	8.25

2.6 pH值对共轭亚油酸产量的影响

分别在不同的pH值下,于37℃保温24h,然后测定共轭亚油酸的含量,结果见表4。由表4可知,在偏酸性条件下有利于共轭亚油酸的合成,而在出发菌株的最适合成共轭亚油酸pH值8时,共轭亚油酸的含量却较低。说明菌株合成共轭亚油酸的最适pH值产生了

表4 pH值对CLA产量的影响
Table 4 Effects of pH on CLA production

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
CLA($\mu\text{g/ml}$)	11.53	11.51	11.47	11.13	11.31	10.84	10.42	10.54

很大变化。

2.7 培养时间对共轭亚油酸产量的影响

鉴于1616u菌株的对数生长期为24h,在恒温37℃下,选取不同的保温时间培养后测其共轭亚油酸的含量,结果见表5。由表5可知,保温时间在24~36h之间时CLA含量上升较快,36h之后CLA含量有所下降,可能是被微生物利用转化为其他脂肪酸所致。

表5 保温时间对CLA产量的影响
Table 5 Effects of incubation time on CLA production

保温时间(h)	18	24	30	36	42	48	60
CLA($\mu\text{g/ml}$)	9.70	10.61	10.95	11.06	10.31	10.16	10.58

2.8 培养条件的正交试验

根据以上单因素试验结果,以pH值、培养温度(T)、培养时间(t)作为影响CLA产量的因素,分别取不同的水平,做 $L_9(3^3)$ 即三因素三水平正交试验,确定菌株产共轭亚油酸的最佳培养条件。试验方案及分析结果见表6、7。

表6 共轭亚油酸培养条件 $L_9(3^3)$ 正交试验方案及结果
Table 6 Designing and result of CLA incubation orthogonal test $L_9(3^3)$

试验号	pH	T()	t(h)	CLA 产量(μg/ml)
1	5.0	32	24	9.98
2	5.0	37	30	11.61
3	5.0	42	36	9.44
4	5.5	32	36	8.95
5	5.5	37	24	10.52
6	5.5	42	30	9.86
7	6.0	32	30	10.19
8	6.0	37	36	10.12
9	6.0	42	24	9.78
k ₁	10.34	9.71	10.09	pH 值为 5 , 培养时间 为 30h , 培养温度为 37 时效果最好。
k ₂	9.78	10.75	10.55	
k ₃	10.03	9.69	9.50	
R	0.56	1.06	1.05	
极差分析		保温时间 > 保温温度 > pH		

表7 方差分析
Table 7 Anova analysis

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	显著水平
pH	0.48347	2	0.24173	20.08864	0.04742
T	2.20527	2	1.10263	91.63158	0.01080
t	1.66220	2	0.83110	69.06648	0.01427
误差	0.02407	2	0.01203		
总和	4.37500				

从表6极差分析可以看出,在pH为5,培养温度为37℃,培养时间为30h时最适共轭亚油酸的合成,在单因素试验中得到的最佳培养时间是36h,而正交试验得到的最佳培养时间是30h,这可能是培养基pH值变化所致,因为单因素培养时pH值为8。由表7方差分

花生水解蛋白液的浓缩及体外活性研究

王瑛瑶, 王 璋

(江南大学食品学院 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本文对水酶法工艺中得到的花生水解蛋白采用纳滤分离技术进行浓缩, 确定操作压力为 0.9MPa, 操作温度为 35℃。经 60min 纳滤浓缩水解液中蛋白质浓度由 30.2 提高到 92.1g/L, 浓度提高了 3.05 倍。对纳滤前后的花生水解蛋白的还原能力、抗氧化能力、对·OH 与 DPPH 的清除作用及抑制血管紧张素转化酶(ACE)活性进行研究, 结果表明花生水解蛋白具有相当的还原力和清除·OH 与 DPPH 能力; 具有抗 Fe²⁺ 引发的卵磷脂脂质体过氧化、抑制 ACE 活性的功能。

关键词: 花生水解蛋白; 纳滤; 抗氧化; 清除作用; ACE

Study on Concentration of Peanut Protein Hydrolysates and Its Vi tro-acti vi ti es

WANG Yi ng-yao , WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : In this paper the peanut protein hydrolysates obtained with aqueous enzymatic process were concentrated by nanofiltration. At the conditions of pressure drop 0.9MPa and temperature 35℃, the protein concentration of the peanut protein hydrolysates is increased from 30.2 to 92.1g/L after 60min concentration. The reducing power, the anti oxidative activity, the radical ·OH and DPPH scavenging activities and the ACE inhibitory activity of the peanut protein hydrolysates were studied. The results showed that the peanut protein hydrolysates have the property of reduction, and the anti oxidation in lecithin liposome system is very good. They have the function of both hydroxyl radicals activities and DPPH scavenging activities. The peanut protein hydrolysates have also the ACE inhibiting activity.

Key words: peanut protein hydrolysis; nanofiltration; anti oxidative activity; scavenging activity; ACE (angiotensin converting enzyme)

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0179-05

收稿日期: 2005-06-16

作者简介: 王瑛瑶(1978-), 女, 博士研究生, 研究方向为食品科学。

析表可知, 在 0.05 水平上 pH、T 和 t 三因素对共轭亚油酸的产量的影响都是显著的。

3 结 论

本实验用紫外线、硫酸二乙酯诱变处理德氏乳杆菌细胞悬液经初筛、复筛最终得到一株共轭亚油酸产量较高的菌株 1616u, 其产量可达 11.61μg/ml 发酵液; 经产 CLA 稳定性试验, 结果表明稳定性良好; 对发酵培养条件进行优化得出, 发酵液 pH 为 5, 培养温度为 37℃, 培养时间为 30h 时最有利于共轭亚油酸的合成。

参考文献:

[1] KRAMER J K G, PARODI P W, TENSEN R G, et al. Rumenic acid: A proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer

formed in nature products[J]. Lipids, 1998, 3(8): 835.

[2] HA Y L, GRIMM N K, PARI ZA M W. Anticarcinogenic from ground beef heat-altered derivatives of linoleic acid[J]. Carcinogenesis, 1998, 8(12): 1881-1887.

[3] HUANG Y C, LUEDECKE L O, SHULTZ T D. Effect of cheddar cheese consumption on plasma conjugated linoleic acid in man[J]. Nutrition Research, 1999, 14(3): 373-386.

[4] 易昌华, 贺建华. 共轭亚油酸的免疫调节功能概述[J]. 广东畜牧兽医科技, 2004, 29(1): 23.

[5] CHIN S F, STORKSON J M, ALBRIGHT K J, et al. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency[J]. Nutrition Research, 1994, 124: 2344-2349.

[6] LIN T Y, LIN C W, LEE C H. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lacti cultures and linoleic acid[J]. Food Chemistry, 1999, 67: 1-5.

[7] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1984.

[8] 梁惠珍, 赵树欣, 程丽娟, 等. 共轭亚油酸的微生物转化及检测方法[J]. 油脂工程, 2004(8): 42-45.