

# 产共轭亚油酸瑞士乳杆菌L7固定化条件的研究

朱义松, 刘晓华, 曹郁生\*  
(南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 对瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*) L7发酵生产c9,t11-CLA的固定化条件进行研究。应用响应面法对细菌固定化的条件进行优化, 得到的优化条件为: 海藻酸钠质量浓度1.78g/100mL、氯化钙质量浓度3.13g/100mL、固定化时间60.30min, 利用在此条件下制备所得的固定化胶珠发酵, c9,t11-CLA的产量达到561μg/mL。固定化细胞重复利用5次后活力没有明显变化, c9,t11-CLA产量保持在549μg/mL。电镜观察发现, 固定化胶珠表面及内部为错综复杂的网状通道结构, 能够很好的满足物质的传递。结果表明菌体细胞经海藻酸钠固定, 可以有效提高菌体的重复利用率, 从而降低c9,t11-CLA的生产成本。

**关键词:** 瑞士乳杆菌L7; 固定化; 生物转化; 共轭亚油酸; 响应面分析

## Immobilization of Conjugated Linoleic Acid-Producing *Lactobacillus helveticus* L7

ZHU Yi-song, LIU Xiao-hua, CAO Yu-sheng\*  
(Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Immobilized *Lactobacillus helveticus* L7 was used for biosynthesizing c9,t11-CLA from linoleic acid. The immobilization conditions were optimized by response surface methodology. The optimal conditions for the preparation of immobilized cells required 1.78 g/100 mL sodium alginate, 3.13 g/100 mL calcium chloride and 30 min immobilization time. The fermentation of immobilized cells under the optimal conditions could result in the highest accumulation of c9,t11-CLA up to 561 μg/mL. Meanwhile, the immobilized strain displayed good transformation properties. No obvious change in the activity of the immobilized strain was observed after reuse for five times, and the yield of c9,t11-CLA remained up to 549 μg/mL. Examined by scanning electron microscope (ESEM), the internal structure and surface of immobilized bead were observed, and were suitable for the mass transfer. Therefore, sodium alginate-immobilized cells had a good performance in improving the recycling rate of cells, reducing the production costs of c9,t11-CLA, and improving economic efficiency of enterprises.

**Key words:** *Lactobacillus helveticus* L7; immobilization; biosynthesis; conjugated linoleic acid; response surface methodology  
中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2012)21-0231-05

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是一系列含共轭双键的亚油酸的位置和几何异构体的混合物的总称。通过动物实验和体外研究, 发现CLA具有抗癌、预防动脉粥样硬化、增强机体免疫力、抗糖尿病、抑制脂肪积累和减肥、降低胆固醇、促进生长发育等生理功能<sup>[1]</sup>。在CLA的多种异构体中, c9,t11-CLA和c12,t10-CLA均具有较强的生理活性<sup>[2]</sup>。

利用乳酸菌生物转化法生产共轭亚油酸是目前研究的热点之一, 在国内外越来越受到人们的关注。生物细胞固定化技术是指利用化学或物理的手段将微生物自然固定或定位于限定的空间区域内, 保持其固有的生理生化活性, 并能反复使用。它是由固定化酶技术发展而来<sup>[3]</sup>。其中比较常用的一种固定化方法是包埋法。包埋法是将细

胞包埋多孔载体内部而制成固定化细胞的方法。采用固定化乳酸菌可实现连续化或半连续化发酵生产<sup>[4]</sup>。瑞士乳杆菌L7是本实验室分离并保藏的一株共轭亚油酸高产菌株。本实验主要研究海藻酸钠固定化细胞对瑞士乳杆菌L7产共轭亚油酸的影响, 并找出最佳的固定化工艺参数。以期可以减少菌体培养带来的废液的排放, 从而保护生态环境。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与试剂

瑞士乳杆菌L7, 本实验室分离鉴定保藏<sup>[5]</sup>。所用培养基为MRS培养基。

收稿日期: 2011-07-28

基金项目: 江西省工业科技支撑重点计划项目(2009S00476)

作者简介: 朱义松(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: 564061734@qq.com

\*通信作者: 曹郁生(1945—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: yyssccc@hotmail.com

亚油酸(纯度>95%) 自制<sup>[6]</sup>; 正己烷、乙腈、甲醇(均为色谱纯)、海藻酸钠 上海Aladdin公司; 氯化钙 美国Sigma公司; 其余试剂均为国产分析纯。

## 1.2 仪器与设备

PB-10精密pH计 德国Sartorius公司; 3K18高速冷冻离心机 美国Sigma公司; PB602-E电子分析天平 瑞士Mettler Toledo公司; Agilent1200高效液相色谱仪(配有可变波长紫外检测器和Agilent色谱工作站) 美国Agilent公司; ChromSpher 5 Lipids色谱柱 美国Varian公司; FEI QUANTA200F扫描电子显微镜 美国FEI公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 亚油酸乳化

将自制亚油酸按体积分数10%与水混合, 在冰水浴下进行超声波乳化分散, 超声功率500W, 超声工作3s, 间歇3s, 超声工作次数10次。

### 1.3.2 固定化条件的响应面法优化设计

以 $c9,t11$ -CLA的产量为评价指标, 研究不同海藻酸钠质量浓度、氯化钙质量浓度和固定化时间对菌体固定化的影响。然后在单因素试验基础上, 运用Box-Behnken设计原理, 进行三因素三水平响应面分析, 对固定化条件进行优化。对实验结果数据采用Design Expert 6.0.5软件进行数据分析。

### 1.3.3 菌体细胞的固定化

配制一定质量浓度的海藻酸钠溶液和氯化钙溶液, 灭菌后待用。将在MRS培养基中培养15h的菌液(此时乳酸菌浓度为 $3.5 \times 10^{10}$ CFU/mL)离心, 取下层固相, 0.05mol/L PBS缓冲液(pH5.8)洗涤3次<sup>[7]</sup>, 得到洗涤菌体。与等量海藻酸钠溶液混合充分搅拌均匀, 将菌体浓度稀释到 $3.5 \times 10^{10}$ CFU/mL; 将上述混合菌液注入灭菌注射器中, 匀速滴入氯化钙溶液中, 使其凝固成珠状; 凝珠在氯化钙溶液中固定化一定时间后捞出, 用无菌水冲洗, 洗去胶珠表面的氯化钙溶液; 风干表面水分。

### 1.3.4 菌体细胞的培养及转化

将10mL固定化菌体(乳酸菌菌浓度为 $3.5 \times 10^{10}$ CFU/mL)加入到100mL MRS培养基中, 30℃培养6h后加入100μL乳化亚油酸, 发酵36h, 后向发酵液中加入适量萃取剂提取发酵液中的 $c9,t11$ -CLA。

### 1.3.5 发酵产物的提取

培养结束后, 向发酵液中加入一半体积的萃取剂, 萃取剂由正己烷与甲醇按体积比1:1的混合而成, 充分振荡萃取, 4℃、5000r/min低速离心10min, 之后收集上层有机相, 重复萃取1次, 将两次萃取液混合备用。

### 1.3.6 $c9,t11$ -CLA检测

银离子高效液相色谱法( $Ag^+$ -HPLC)。用一根 $Ag^+$ 柱对游离的 $c9,t11$ -CLA进行定性及定量分析<sup>[8]</sup>。色谱柱: ChromSpher 5 Lipids(4.6mm×250mm, 5μm,

Chrompack); 流动相: 正己烷、乙腈、乙醚体积比99.4:0.1:0.5<sup>[9]</sup>; 柱温: 30℃; 流速: 1.0mL/min; 进样量: 20μL; 检测波长: 233nm。

### 1.3.7 固定化细胞内部结构观察

直接将制备得到的含水固定化细胞风干表面水分, 切开后在低真空度下使用环境扫描电镜(ESEM)进行结构观察<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 固定化工艺参数的单因素分析

#### 2.1.1 海藻酸钠质量浓度对 $c9,t11$ -CLA产量的影响

以氯化钙质量浓度2g/100mL、菌体细胞数 $3.5 \times 10^{10}$ CFU/mL, 制备固定化菌体, 温度为30℃的条件下培养36h, 考察不同的海藻酸钠质量浓度对发酵液中共轭亚油酸产量的影响, 结果见图1。

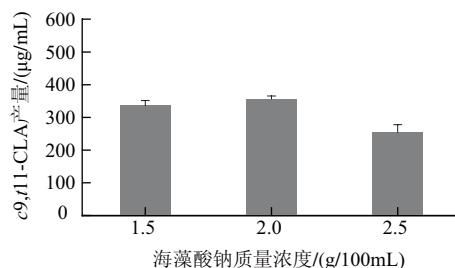


图1 海藻酸钠质量浓度对共轭亚油酸产量的影响

Fig.1 Effect of sodium alginate concentration on the yield of  $c9,t11$ -CLA

由图1可知, 当海藻酸钠质量浓度为2g/100mL时,  $c9,t11$ -CLA产量最高。当质量浓度为1g/100mL时, 胶珠太软而易破碎, 成珠困难; 当质量浓度上升到3g/100mL时, 挤珠困难而且珠子呈现拖尾状, 因此不能进行固定化实验。表明海藻酸钠的质量浓度会影响固定化细胞的成珠性能、物质传递等, 从而影响到 $c9,t11$ -CLA的产量<sup>[11]</sup>。

#### 2.1.2 氯化钙质量浓度对 $c9,t11$ -CLA产量的影响

以海藻酸钠质量浓度为2g/100mL、菌体细胞接种量 $3.5 \times 10^{10}$ CFU/mL, 制备固定化菌体, 温度为30℃的条件下培养36h, 考察不同质量浓度的氯化钙溶液对发酵液中共轭亚油酸产量的影响, 结果见图2。

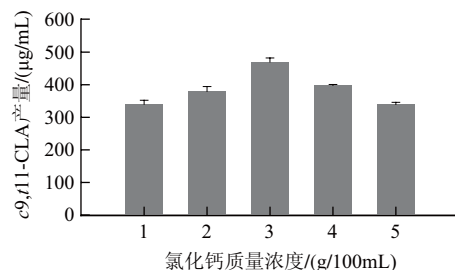


图2 氯化钙质量浓度对共轭亚油酸产量的影响

Fig.2 Effect of  $CaCl_2$  concentration on the yield of  $c9,t11$ -CLA

由图2可知,当氯化钙质量浓度为3g/100mL时,c9,t11-CLA的产量最高。质量浓度低的氯化钙溶液中形成的胶珠易破碎,机械强度较低;随着氯化钙质量浓度升高,胶珠的强度及韧性增强,但质量浓度过高会影响乳酸菌的细胞活性<sup>[12]</sup>。实验表明氯化钙质量浓度影响胶珠的机械强度和细胞活性,从而影响c9,t11-CLA合成的产量。

### 2.1.3 固定化时间对c9,t11-CLA产量的影响

以氯化钙溶液质量浓度为2g/100mL、海藻酸钠质量浓度为2g/100mL、菌细胞接种量 $3.5 \times 10^{10}$ CFU/mL,制备固定化菌体,温度为30℃的条件下培养36h,考察不同的固定化时间对发酵液中共轭亚油酸产量的影响,结果见图3。

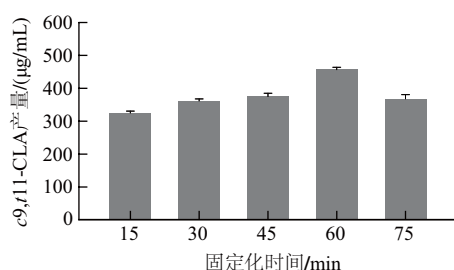


图3 固定化时间对共轭亚油酸产量的影响

Fig.3 Effect of immobilization time on the yield of c9,t11-CLA

由图3可知,当固定化时间为60min时,c9,t11-CLA的产量最高。固定化时间在15~60min时,固定化酶活力随固定时间的增加明显增大,这是因为随着固定化时间的延长,所得胶珠的强度越高,固定化效果越好;固定化时间为60min时,固定化细胞的活力最高。当固定时间大于60min时,酶活力随固定时间的增加呈下降趋势,原因是时间延长增加了细胞与氯化钙的作用,影响菌体活性,同时包埋过于紧密,影响底物与菌体的接触。该实验条件下的最佳固定时间为60min。

### 2.2 响应面试验设计方案及结果

根据单因素试验结果,采用响应面设计方法,运用Box-Behnken试验设计原理<sup>[13]</sup>,选取对c9,t11-CLA产量影响较大的3个因素:海藻酸钠质量浓度、氯化钙质量浓度、固定化时间,进行三因素三水平的响应面试验设计,见表1。响应面试验根据Box-Behnken设计原理进行了17组试验,其中5组中心点重复试验,结果见表2。

表1 Box-Behnken试验设计各变量水平  
Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	编码及水平		
	-1	0	+1
$X_1$ 海藻酸钠质量浓度/(g/100mL)	1.5	2.0	2.5
$X_2$ 氯化钙质量浓度/(g/100mL)	2	3	4
$X_3$ 固定化时间/min	45	60	75

利用Design Expert 5.0软件对表2试验数据进行多元回

归拟合,得到的回归方程如下:

$$Y = 558.20 - 34.94X_1 + 24.66X_2 - 2.15X_3 - 43.14X_1^2 - 124.94X_2^2 - 41.56X_3^2 - 16.88X_1X_2 - 7.50X_1X_3 + 5.20X_2X_3$$

表2 Box-Behnken试验设计及试验结果  
Table 2 Design and results of Box-Behnken experiments

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	c9,t11-CLA产量/(μg/mL)	
				实验值	预测值
1	-1	-1	0	378	383.52
2	1	-1	0	337	347.40
3	-1	1	0	477	466.60
4	1	1	0	368	362.97
5	-1	0	-1	516	503.09
6	1	0	-1	466	448.21
7	-1	0	1	496	513.79
8	1	0	1	416	428.91
9	0	-1	-1	367	374.39
10	0	1	-1	390	413.31
11	0	-1	1	383	359.69
12	0	1	1	426	419.41
13	0	0	0	567	558.20
14	0	0	0	551	558.20
15	0	0	0	542	558.20
16	0	0	0	573	558.20
17	0	0	0	558	558.20

表3 二次多项式模拟方差分析表  
Table 3 Variance analysis for the quadratic polynomial model

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	Prob>F
模型	103300	9	11474.61	26.33	0.0001
失拟项	2439.72	3	813.24	5.33	0.0699
误差项	610.80	4	152.70		
总和	106300	16		$R^2=0.9787$	$R^2_{Adj}=0.9513$

由表3方差分析表明二次多项模型具有高度显著性( $P < 0.0001$ )。失拟项在 $\alpha = 0.05$ 水平上不显著( $P = 0.0699 > 0.05$ ),其决定系数为 $R^2=0.9787$ ,校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.9513$ ,表明模型拟合度良好,响应值仅约6.56%的总变异不能由该模型解释。

表4 回归方程系数显著性检验  
Table 4 Significance test of regression coefficients in the quadratic polynomial model

系数项	回归系数	标准误差	F值	Prob>F
总模型	558.20	9.34	26.33	0.0001
$X_1$	-34.94	7.38	22.41	0.0021
$X_2$	24.66	7.38	11.17	0.0124
$X_3$	-2.15	7.38	0.085	0.7793
$X_1^2$	-43.14	10.17	17.98	0.0038
$X_2^2$	-124.94	10.17	150.82	<0.0001
$X_3^2$	-41.56	10.17	16.69	0.0047
$X_1X_2$	-16.88	10.44	2.61	0.1500
$X_1X_3$	-7.50	10.44	0.52	0.4957
$X_2X_3$	5.20	10.44	0.25	0.6336

根据Box-Behnken试验所得的结果和二次多项回归方程,利用Design Expert软件获得当c9,t11-CLA产量最高



(567.304 $\mu$ g/mL)时,海藻酸钠质量浓度1.78g/100mL、氯化钙质量浓度3.13g/100mL、固定化时间60.30min。

为了检验模型预测的准确性,在最佳固定化条件下,即选取海藻酸钠质量浓度1.8g/100mL、氯化钙质量浓度3.1g/100mL、固定化时间60min进行验证,做3组平行实验所得结果分别为563、572、554 $\mu$ g/mL。可见该模型能较好地预测实际实验情况。

### 2.3 固定化乳酸菌的重复发酵

将制备所得的10mL固定化胶珠加入到100mL MRS培养基中,30℃培养36h,取培养液萃取测定*c9,t11*-CLA含量;然后将胶珠取出用生理盐水冲洗干净,再添加到等量培养基中继续培养36h,如此重复发酵7次<sup>[14]</sup>,*c9,t11*-CLA产量分别为567、553、571、562、549、497、348 $\mu$ g/mL,结果发现,前5次重复发酵实验中共轭亚油酸的产量都比较接近,固定化菌体的活性没有明显变化;实验过程中发现重复发酵5次之后的固定化珠子开始出现破碎现象,由于菌体流失从而导致细胞活性有所下降。实验结果表明,固定化细胞可以重复利用5次,且共轭亚油酸的生成量较稳定。

### 2.4 电镜观察

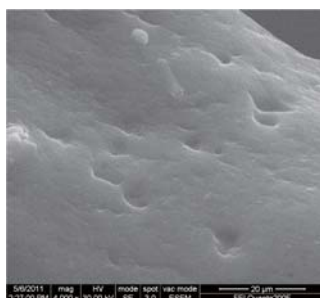


图4 固定化胶珠电子扫描电镜观察

Fig.4 Electron micrograph of immobilizing cell bead

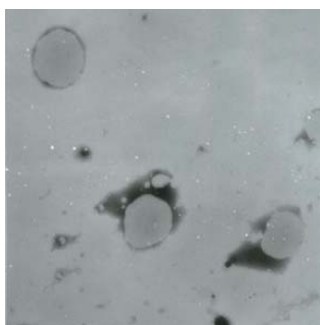


图5 乳化亚油酸透射电镜观察( $\times 8000$ )

Fig.5 Electron micrograph of emulsified linoleic acid( $\times 8000$ )

ESEM样品室为低真空(大于 $1.27 \times 10^{-2}$ MPa),含水样品可直接在较高的加速电压下进行观察。图4是固定化胶珠的ESEM照片,通过电镜观察,固定化胶珠表面及内部有较多错综复杂的大孔径通道,孔径大小为5~10 $\mu$ m。

乳化后的较大的亚油酸微粒直径为1 $\mu$ m左右,较小的0.1 $\mu$ m。因此亚油酸微粒可以通过大通道扩散进入固定化细胞内部,为细胞催化活性的作用的发挥提供所需的底物,同时又能够保证固定化的乳酸菌菌体不被流失。为减小固定化细胞内的传质阻力,实验中亚油酸乳化时可以增加超声的功率和时间,使亚油酸微粒更细小均匀。

## 3 结论与讨论

对高产*c9,t11*-CLA的瑞士乳杆菌L7的固定化方法和条件进行了研究,并对固定化细胞的应用做了探索。以*c9,t11*-CLA产量为响应值,通过响应面设计对固定化条件进行优化,得到最佳固定化工艺参数为海藻酸钠质量浓度1.78g/100mL、氯化钙质量浓度3.13g/100mL、固定化时间60.30min。当海藻酸钠质量浓度低于1g/100mL时,胶珠太软而易破碎;高于3g/100mL时,固定化过程中挤珠困难而且珠子呈现拖尾状,成珠困难,珠子过于致密也影响到反应底物在胶珠中的扩散。因此,海藻酸钠的浓度会影响固定化细胞的成珠性能、物质传递等。氯化钙浓度会影响胶珠的机械强度和细胞活性,从而影响*c9,t11*-CLA合成的产量。

以亚油酸为底物,利用得到的固定化细胞进行生物转化,*c9,t11*-CLA产量明显提高。对固定化细胞进行电镜观察,发现固定化细胞表面及内部有网状通道,这种结构使得菌体细胞被固定时,底物及产物可以在固定化载体中进出扩散,同时增殖的细胞也可通过这些通道扩散到外环境中,因而不会影响物质的转运和转化。

采用固定化发酵技术,菌体活力得到保持并且可以多次重复使用,这可以有效的缩短生产周期,降低生产成本。根据这一原理,海藻酸钠固定化技术不仅可以用于本实验的生产,还可以用于多数的小分子底物的发酵生产,具有普遍适用性。

本实验虽然在延长了菌细胞的使用次数,但是菌细胞的单次发酵产量并没有增加,因此,本课题拟在以后的工作中将固定化与细胞的透性化技术相结合,提高细胞的通透性,使底物更易于与参与*c9,t11*-CLA转化的胞内酶接触,从而提高单次发酵的产量,从而达到更加优化的发酵效果。

### 参考文献:

- [1] ZABALA A, PORTILLO M P, NAVARRO V, et al. Quantitative gas chromatographic method for the analysis of *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 isomers of the conjugated linoleic acid in liver[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 855: 152-158.
- [2] YEONHWA P, MICHAEL W P. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA)[J]. Food Research International, 2007, 40: 311-323.

- [3] 王新, 李培军, 巩宗强, 等. 固定化细胞技术的研究与进展[J]. 农业环境保护, 2001, 20(2): 120-122.
- [4] 蔡华珍, 王亚锋, 王仪. 甘蔗固定化乳酸菌发酵生产芦荟酸乳的工艺条件[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(11): 119-122.
- [5] LI Haixing, CAO Yusheng, LIU Xiaohua, et al. Differentiation of *Lactobacillus* spp. isolated from Chinese sourdoughs by AFLP and classical methods[J]. Annals of Microbiology, 2007, 57(4): 687-690.
- [6] 刘晓华. 共轭亚油酸的生物转化和异构体分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2006: 25-32.
- [7] 刘晓华, 陈燕, 李海星, 等. 乳酸菌洗涤菌体合成共轭亚油酸的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(8): 8-11.
- [8] OSTROWSKA E, DUNSHEA F R, MURALITHARAN M, et al. Comparison of silver-ion high-performance liquid chromatographic quantification of free and methylated conjugated linoleic acid[J]. Lipids, 2000, 35(10): 1147-1153.
- [9] DELMONTE P, ROACH J A G, MOSSOBA M M, et al. Synthesis and isolation of *trans*-7,*cis*-9 octadecadienoic acid and other CLA isomers by base conjugation of partially hydro-genated gamma-linoleic acid[J]. Lipids, 2003, 38(5): 579-583.
- [10] 侯影飞, 王增林, 张建, 等. 固定化对柴油生物脱硫菌UP-1性能的影响[J]. 中国石油大学学报, 2010, 34(4): 158-161.
- [11] 李超敏, 韩梅, 张良, 等. 细胞固定化技术: 海藻酸钠包埋法的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(7): 1281-1282; 1284.
- [12] 王建龙. 生物固定化技术与水污染控制[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] BOX G P, BEHNKEN D W. Some new three level design for the study of quantitative variables[J]. Technometrics, 1960, 2(4): 456-475.
- [14] 张丽莉, 王欢, 穆春, 等. 一株干酪乳杆菌突变株固定化对共轭亚油酸生物合成的影响[J]. 食品科技, 2009, 34(4): 44-47.