47 卷 2 期
2007 年 4 月 4 日

微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica

47(2):244 ~ 248
4 April 2007

植物乳杆菌 ZS2058 在磷酸盐缓冲液体系中生物转化共轭亚油酸

钮晓燕,陈 卫*,田丰伟,赵建新,张 灏

(江南大学食品学院 无锡 214036)

摘 要 植物乳杆菌 ZS2058 是从泡菜中筛选到一株具有转化共轭亚油酸能力的乳酸菌。该菌株在 MRS 培养基中经 0.5mg/mL 的亚油酸诱导培养后,所获得的菌体细胞具有较强的转化能力。文中就植物乳杆菌 ZS2058 水洗细胞在磷酸盐缓冲液体系中生物转化共轭亚油酸进行了深入研究。在非厌氧条件下,植物乳杆菌 ZS2058 在亚油酸浓度为 1mg/mL,湿细胞质量浓度约为 150mg/mL,120r/min、37℃的条件下反应 24h 后,能将亚油酸转化为共轭亚油酸和羟基脂肪酸,其中 c9,t11-CLA 占所产生的 CLA 总量的 96.4%,产量可高达 312.4μg/mL,说明该菌株有很强的专一性。随着反应进一步进行,反应至 36h 时,c9,t11-CLA 含量逐渐减少,伴随着大量羟基脂肪酸的产生;并且,以 CLA (c9,t11-CLA 和 t10,c12-CLA 的混合样品)为底物进行反应时,c9,t11-CLA 被转化为羟基脂肪酸。由此可知,c9,t11-CLA 可能是该菌株生物转化 LA 过程中的一个中间产物。

关键词:共轭亚油酸;植物乳杆菌;羟基脂肪酸

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)02-0244-05

共轭亚油酸(Conjugated Linoleic Acid,简称 CLA,下同)是一组以位置和立体异构形式存在的十八碳二烯酸(18:2),天然存在的异构体主要在 9,11;10,12 或 11,13 位置含有共轭双键。在众多异构体中,cis-9,trans-11-十八碳二烯酸(c9,t11-18:2)和 trans-10,cis-12-十八碳二烯酸(t10,c12-18:2)被认为是具有生物活性的两种异构体,具有抗癌,提高免疫力,减肥等功能[1,2]。尤其是 c9,t11-CLA,被认为是最具活性的异构体,主要存在于反刍动物的乳制品和肉制品中[3]。目前,CLA 作为一种食品添加剂已经商品化了,但商品化

的 CLA 主要是通过碱异构化制备的,一种由亚油酸(Linoleic Acid,简称 LA,下同)化学合成 CLA 的常用方法,利用该法制备的 CLA 是多种顺反位置异构体的混合物。因此,发明一种选择性制备 CLA 异构体的新方法,非常有研究价值。

一般而言,反刍动物类食品具有更高含量的 CLA,经研究发现,这主要是由于反刍动物体内的瘤胃细菌含有亚油酸异构酶,能够将 LA 催化异构成 CLA[4]。但是,瘤胃细菌严格厌氧,培养困难,难以实现工业化生产。近期研究发现,费氏丙酸杆菌(*Propionibaterium fremdenreichii*),一种常见的乳品发酵剂,能将游离的 LA 转化为 CLA[5]。嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus* CCRC 14097)的完整细胞及其粗酶提取液能将亚油酸转化为 CLA[6],其机理主要为 LA 在亚油酸异构酶(E.C.5.2.1.5)作用下转化为 CLA。嗜酸乳酸杆菌 AKU 1137 水洗细胞在微氧条件下,以 LA 为原料转化为 CLA,该过程不是从非共轭双键经一步异构化而成为共轭双键,而是涉及到中间产物羟基脂肪酸的合成,这是首次揭示 LA 到 CLA 的转化机制[7]。

本实验室已从四川泡菜中筛选到一株有较强生物转化 CLA 的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* ZS2058),并对其在脱脂奶中转化 CLA 进行了初步研究[8]。本文旨在研究植物乳杆菌 ZS2058 水洗细胞在缓冲溶液中,以游离 LA 为底物,生物转化为 CLA 的能力,为探索乳酸菌生物转化 LA 为 CLA 机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* ZS2058),实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:亚油酸(纯度≥95%,实验

基金项目:国家自然科学基金(20576047)

* 通讯作者。Tel/Fax:86-510-85884620;E-mail:weichen@sytu.edu.cn

作者简介:钮晓燕(1981 -),女,江苏无锡人,硕士研究生,从事食品生物技术的研究。E-mail:xyniu1126@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-07-28;接受日期:2006-09-04;修回日期:2006-09-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

室制备)，共轭亚油酸(Sigma，99%，c9，t11-，t10，c12-18∶2)，其他试剂均为国产分析纯。冷冻离心机，德国 HETTICH 公司；气相色谱，日本岛津 GC-14B；色谱柱 SupeLco 公司 SP-2380(60m × 0.25mm i.d. × 0.20μm)；气-质联用仪 GC-2000/Trace，美国 FINNIGAN 公司；色谱柱：BPX-70(30m × 0.25mm i.d. × 0.25μm)SGE，Villenuve Saint Georges，France；其余为实验室常规仪器。

1.1.3 培养基 均采用 MRS 培养基[9]。

1.2 菌种培养

从斜面上挑取少量植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* ZS2058)接入 10mL MRS 培养基，37℃静置培养 24h；然后按照体积分数 1% 的接种量，接入 10mL MRS 培养基，37℃静置培养 12h(OD_{600} 0.8，经 8 倍稀释)。再以体积分数 1% 的接种量，接入 400mL MRS 培养基(含 0.5mg/mL LA)，37℃ 120r/min 培养 12h(OD_{600} 约为 0.8，经 8 倍稀释)，冷冻离心收集菌体(4500 × g，10min，4℃)，菌体用生理盐水洗涤两次。

1.3 植物乳杆菌 ZS2058 在缓冲液中转化共轭亚油酸的反应条件

以 LA 为底物，利用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* ZS2058)生物转化为 CLA。反应在 40mL 0.1mol/L 磷酸钾缓冲溶液(pH 6.5)中进行，添加 LA 乳状液使其终浓度为 1mg/mL，菌体湿细胞的质量约为 6g，37℃ 120r/min 条件下振荡反应。反应前，LA 先与 Tween-80 以 5∶1(W/W)超声乳化 1min，形成稳定的乳状液，经 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌。Tween-80 作为脂肪酸乳化剂能将 LA 均匀分散到反应液中。

1.4 脂肪酸提取

根据 Bligh 和 Dye 法[10]，用氯仿-甲醇(1∶2 V/V)溶液提取脂肪酸。然后在氯仿溶液中加入少量无水 Na_2SO_4 吸水干燥。30℃真空旋转蒸发脱除有机溶剂。将残余物转移到试管中，用氮气吹干，获得游离脂肪酸。

1.5 气相色谱(GC)法分析脂肪酸的组成

1.5.1 脂肪酸甲酯化：上述 1.6 提取到的脂肪酸先加入 1mL 0.5mol/L 的 NaOH-CH_3OH，65℃皂化 0.5h，冷却后再加入 1mL BF3-甲醇溶液，将混合物在 70℃水浴中煮 2min。冷却，加入 1mL 正己烷，振荡使甲酯转入正己烷层，加入饱和 NaCl 溶液，使正己烷上浮到容量瓶细颈处。

1.5.2 GC 分析条件：气相色谱仪(日本岛津 GC-14B)；色谱柱 SP-2380(60m × 0.25mm i.d. × 0.20μm，SupeLco 公司)。采取程序升温，60℃时保持 5min，然后以 13℃/min 的升温速率将温度升至 170℃，保持此温度 70min，最后以 20℃/min 的升温速率将温度升至 200℃，保持 15min。柱前压：100kPa；进样口温度：230℃；检测器温度：250℃；空气压力：50 kPa；氢气压力：60 kPa；氮气压力：100 kPa。分流比：1∶50；进样量：0.8μL。数据处理采用峰面积归一化法。

1.6 气质联用(GC-MS)法分析脂肪酸组成

1.6.1 脂肪酸的杂环化衍生[11] 在上述 1.6 提取到的脂肪酸(约 40mg)中，加入约 200mg 2-氨基-2-甲基丙醇，于 170℃烘箱中反应 1h，取出冷却，加入 0.5mL 氯仿，振摇混匀，静置，供分析用。

1.6.2 GC-MS 分析条件：气-质联用仪(GC-2000/Trace，美国 FINNIGAN 公司)，色谱柱 BPX-70(30m × 0.25mm i.d. × 0.25μm，SGE，Villenuve Saint Georges，France)。采取程序升温，初始温度为 160℃，以 2℃/min 升至 210℃，再以 8℃/min 升至 240℃，保持 10min。载气：氦气，1mm/min；分流比，50∶1。质谱条件：EIMS，能量 70eV，发射电流 150μA，检测器电压 30V。

2 结果和讨论

2.1 微生物细胞生物合成 CLA 的反应结果

反应在非厌氧条件下进行，反应产物中主要有 3 个峰见图 1-C。根据 Sigma 公司的标准样品的 GC 色谱图，其中 LA 的保留时间为 32.219min(图 1-A)，c9，t11-CLA 的保留时间为 38.530min，t10，c12-CLA 的保留时间为 39.554min(图 1-B)。通过比较保留时间，我们可以发现，图 1-C 中，保留时间 31.698min 的峰为 LA，38.687min 的峰为 CLA1，39.529min 处的小峰为 CLA2，而 42.234min 的峰可能是某种极性脂肪酸 HY，例如羟基脂肪酸，因为它的保留时间比较长。CLA1，CLA2 和 HY 均为在反应过程中新产生的脂肪酸。

2.2 GC-MS 法鉴定转化产物

从脂肪酸杂环衍生物(简称 DMOX 衍生物，下同)的质谱图(图 2)上可以发现，共轭酸 DMOX 衍生物(图 2-A)的分子质量为 m/e333。这一结果表示，该共轭酸为十八碳二烯酸，m/e196，208，222 和 234 的离子碎片峰分别是在键 8-9，9-10 和 10-11 处断裂

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

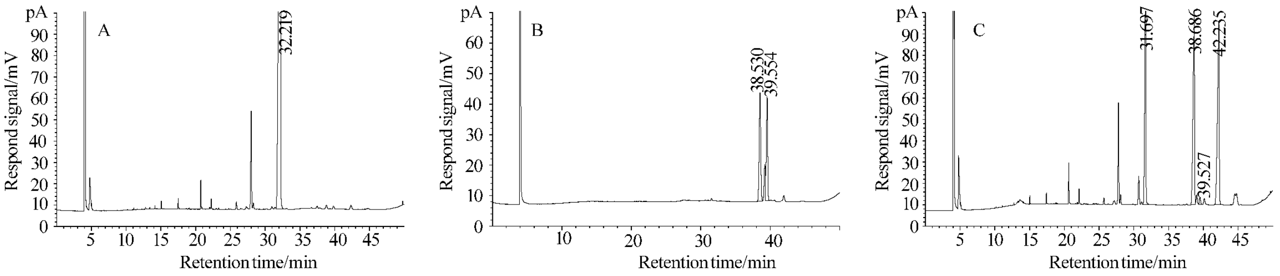

图 1 脂肪酸的甲酯衍生物的气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatograms of fatty acid methyl esters. A: Linoleic acid methyl ester; B: Conjugated linoleic acid methyl ester (Sigma); C: Fatty acid methyl esters produced by washed cells of L. plantarum ZS2058.

所得的，这里的键是指碳链上的位置。根据脂肪酸杂环衍生物离子碎片呈现的规律，可以进一步确定，共轭双键的位置在 9 和 11 位，因此，该共轭酸为 9，11 位的共轭十八碳二烯酸，结合 2.1 中的色谱图，并与标准 CLA 的色谱图比较，可以确定 CLA1 为 c9，t11-CLA。CLA2 由于含量比较低，因此在 GC-MS 图谱上没有被检测到，但根据图 1 的 GC 分析图，我们可以知道 CLA2 为 t10，c12-CLA。图 2B 为 HY 的质谱图，从图上可以知道，HY 的 DMOX 衍生物的分子质量为 m/e351，并且与 CLA 的 DMOX 衍生物的分子质量 m/e333 相差 18，这说明 HY 分子中含有羟基，碳链长度为 18，含有一个双键，并且，根据其各离子碎片所呈现的规律，只能初步断定羟基和双键的位置在碳链的 12～14 位之间，该脂肪酸为羟基十八碳单烯酸。仅通过 GC-MS 的方法不能确定 HY 的结构，若要确定 HY 的具体结构式，则需要通过对样品进行分离纯化后，进行 ^{1}H-NMR，IR 以及 MS-MS 等分析。

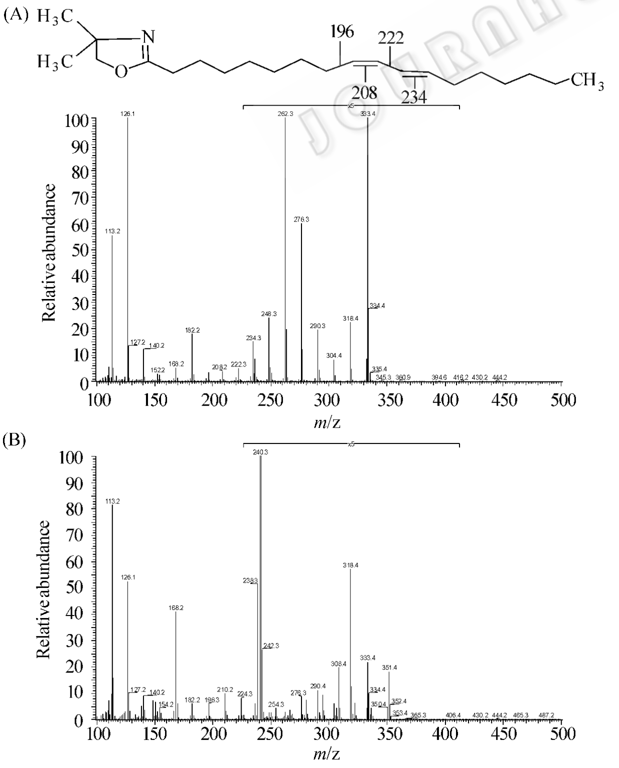

图 2 脂肪酸杂环化的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of 2-substituted 4, 4-dimethyloxazolines derived from. A: conjugated linoleic acid; B: HY.

2.3 反应时间对植物乳杆菌 ZS2058 生物转化 LA 为 CLA 的影响

植物乳杆菌 ZS2058 水洗细胞在生物转化 LA 为 CLA 时，随着反应时间的改变，转化后脂肪酸产物的组成也发生了巨大的变化，以不添加微生物细胞的反应液为空白对照，具体结果见图 3。从图 3-A 中，可以发现在 LA 浓度为 1mg/mL，120r/min，37℃的条

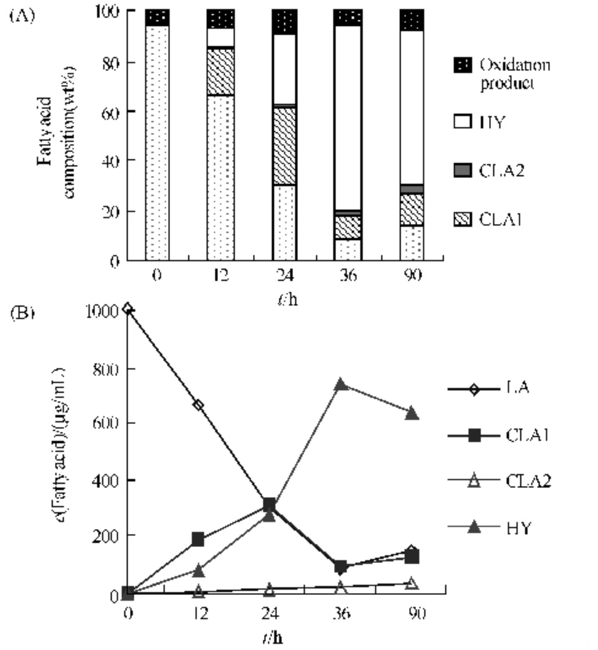

图 3 ZS2058 完整细胞转化共轭亚油酸结果分析图

Fig. 3 Time courses of changes in fatty acid composition during the bioconversion with washed cells of L. plantarum ZS2058 (A) and of changes in levels of CLA and HY production from linoleic acid (B).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

件下反应 24h 后，69.4%的 LA 被转化，其中 CLA1 也即 c9，t11-CLA 占 31.2%，同时，c9，t11-CLA 的产量也达到最大，为 312.4μg/mL(图 3-B)；而另一共轭亚油酸异构体 CLA2 也即 t10，c12-CLA 的产率比较低，仅为 11.7μg/mL；未检出其它异构体。在这两异构体中，c9，t11-CLA 占 96.4%，t10，c12-CLA 占 3.6%。这与 Lee 等[9] 报道的，采用 *Lactobacillus reuteri* 在添加 0.9 mg/mL LA 的 MRS 培养基中培养 24 h 产生 300μg/mL CLA，其中 c9，t11-18∶2 占 59.0% c10，t12-18∶2 占 41.0%结果相似，并且具有更强的专一性。反应 36h 时，CLA1 产率下降，CLA2 略微有些增加，而 HY 的产量迅速增大，时间继续延长至 90h，各脂肪酸的组成基本不变。这说明，利用植物乳杆菌 ZS2058 水洗细胞生物转化 LA 的反应中，主要有两个产物生成，c9，t11-CLA 和 HY，在反应前期，主要生成 c9，t11-CLA，随着反应的继续进行，化合物 HY 大量产生，而且 HY 的稳定性较高，不易被氧化。

2.4 初步探讨植物乳杆菌 ZS2058 生物转化 LA 为 CLA 的机理

由图 3 发现，c9，t11-CLA 的产生趋势是由无到逐渐增多，随着反应的继续进行，又逐渐降低。这说明，c9，t11-CLA 可能是反应的中间体，能被植物乳杆菌 ZS2058 利用，转化为其他物质，因此，我们以 CLA(c9，t11-CLA，t10，c12-CLA 的混合样品)取代 LA 为底物，其他反应条件不变进行反应(图 4)。

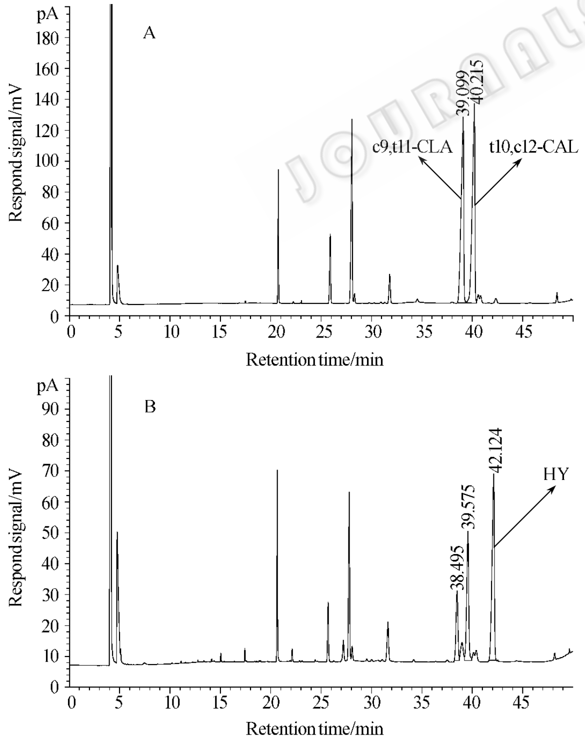

图 4 脂肪酸甲酯衍生物 GC 色谱图

Fig.4 Gas chromatograms of mixed conjugated linoleic acid methyl esters (c9, t11-CLA and t10, c12-CLA) before bioconversion with washed cells of *L. plantarum* ZS2058 (A) and after the bioconversion (B).

比较图 4-A 与图 4-B，可以发现，底物 CLA 中 c9，t11-CLA 和 t10，c12-CLA 两异构体的含量之比约为 1∶1，而经过反应之后，两者比例发生明显的变化，c9，t11-CLA 的含量大大降低了，同时，还产生了新的物质 HY。很明显植物乳杆菌 ZS2058 含有某种酶能将 c9，t11-CLA 转化成 HY，根据 GC-MS 的分析结果，HY 可能是一种羟基脂肪酸，因此，这种能将 c9，t11-CLA 转化成 HY 的酶可能是水合酶。

结合上述 2.3 与 2.4 的结论，可以推测，植物乳杆菌 ZS2058 生物合成 CLA 的途径可能是：首先，底物 LA 在亚油酸异构酶的作用下先生成 c9，t11-CLA；其次，随着 c9，t11-CLA 的积累，水合酶以 c9，t11-CLA 为底物，进一步将 c9，t11-CLA 催化成羟基脂肪酸，并且此时后者的反应常数 K_2 大于前者的反应常数 K1，反应平衡偏向于第二步，因此，HY 得到大量积累，而 CLA 相对减少。

3 结论

实验发现，植物乳杆菌 ZS2058 在非厌氧条件下具有较高的生物转化 CLA 的能力：在亚油酸浓度为 1mg/mL，菌体湿细胞浓度约为 150mg/mL，120r/m in，37℃的条件下反应 24h 后，c9，t11-CLA 产量高达 312.4μg/mL；且在所产生的 CLA 中，c9，t11-CLA 占 96.4%，说明植物乳杆菌 ZS2058 生物转化 CLA 的专一性比较明显。此外，在该反应条件下，随着反应时间的延长，产生大量羟基脂肪酸，而 c9，t11-CLA 含量下降，这一结果说明，c9，t11-CLA 可能是一个中间产物，亚油酸异构酶先利用底物 LA 转化成 CLA，随后，水合酶以 c9，t11-CLA 为底物，进一步将其转化为 HY。因此，在以后的实验中，可以进一步优化反应条件，以提高 CLA 的产量，为生物转化 CLA 的工业化生产奠定基础。

参 考 文 献

[1] Pariza M, Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr*, 2004, **79**:1132S-1136S.

[2] Pariza M, Park Y, Cook M. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res*, 2001, 40:283-298.

[3] Razanamahefa L, Lafay L, Oseredczuk M, *et al*. Dietary fat consumption within French population and quality data on major food contributors composition. *Bull Cancer*, 2005, **92**:647-657.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[4] Kepler CR, Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acid. *The journal of Biological Chemistry*, 1967, **242**: 5686 - 5692.

[5] Jiang J, Bjorck L, Fonden R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J Appl Microbiol*, 1998, **85**: 95 - 102.

[6] Lin TY, Lin CW, Wang YJ. Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of Lactobacillus acidophilus CCRC 14097. *J Appl Microbiol*, 1998, **85**: 95 - 102.

[7] Ogawa J, Matsumura K, Kishino S, *et al*. Conjugated Linoleic Acid Accumulation via 10-Hydroxy-12-Octadecaenoic Acid during Microaetobic Transformation of Linoleic Aicd by *Lactobacillus acidophilus*. *Appli Envir Microbiol*, 2001, **67**: 1246 - 1252.

[8] 赵建新, 陈 卫, 田丰伟, 等. 植物乳杆菌 ZS2058 转化亚油酸为共轭亚油酸条件的初步研究. 食品工业科技, 2005, **12**: 83 - 84.

[9] Lee SO, Chang SK, Somi KC. Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotech Lett*, 2003, **25**: 935 - 938.

[10] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959, **37**: 911 - 917.

[11] Zhang JY, Yu QT, Liu BN, *et al*. Chemical modification in mass spectrometry Ⅳ-2-alkenyl-4, 4-dimethyloxazolines as derivatives for the double bond location of long-chain olefinic acids. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 1988, **15**: 33 - 44.

Bioconversion of conjugated linoleic acid by resting cells of *Lactobacillus plantarum* ZS2058 in potassium phosphate buffer system

NIU Xiao-yan, CHEN Wei*, TIAN Feng-wei, ZHAO Jian-xin, ZHANG Hao

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

Abstract: *Lactobacillus plantarum* ZS2058, which was screened from the Chinese traditional fermented vegetable, has the capacity to convert the linoleic acid (LA) into conjugated linoleic acid (CLA). Some specific isomers of CLA with potentially beneficial physiological and anticarcinogenic effects, were efficiently produced from free linoleic acid by washed cells of *Lactobacillus plantarum* ZS2058 under aerobic conditions. The produced CLA isomers are identified as the mixture of *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid (CLA1) *trans*-10, *cis*-12- octadecadienoic acid (CLA2), 96.4% of which is CLA1. The washed cells of *Lactobacillus plantarum* ZS2058 producing high levels of c9, t11-CLA were obtained by cultivated in MRS media containing 0.5mg/mL linoleic acid, indicating that the enzyme system for CLA production is induced by linoleic acid. After a 24-hour bioconversion at 37℃ with shaking (120 r/min), 312.4μg/mL c9, t11-CLA is produced. And after a 36-hour bioconversion, the content of c9, t11-CLA decreases while hydroxy-octadecaenoic acid increases. In addition, the c9, t11-CLA isomer can be transformed to hydroxy- octadecaenoic acid when the mixed CLA (c9, t11-CLA and t10, c12-CLA) were used as the substrate, which suggests that c9, t11-CLA is one of the intermediates of the bioconversion products from free LA by washed cells of *Lactobacillus plantarum* ZS2058.

Keywords: conjugated linoleic acid; *lactobacillus plantarum*; hydroxy-octadecaenoic acid

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (20576047)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-510-85884620; E-mail: weichen@sytu.edu.cn

Received: 28 July 2006 / Accepted: 4 September 2006/ Revised: 29 September 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn