

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

乳品菌元及其酵素應用於共軛亞麻油酸生產之研究(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-034-009-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國文化大學畜產學系

計畫主持人：林棟雍

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 21 日

# 目錄

	<u>頁數</u>
1. 摘要	3
2. 前言	4
3. 材料與方法	6
4. 結果與討論	8
5. 結論	9
6. 計畫自評	9
7. 參考文獻	10
8. 可供推廣之研發成果資料表	12

# 乳品菌元及其酵素應用於共軛亞麻油酸生產之研究 (2/2)

## 個別型計畫成果報告

NSC 91-2313-B-034-009

執行期間：91/08/01 ~ 92/07/31

林棟雍<sup>1</sup> 林慶文<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 中國文化大學畜產學系

<sup>2</sup> 國立台灣大學畜產學系

### 摘要

共軛亞麻油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 係亞麻油酸經亞麻油酸異構酶異構化作用之產物，為一健康成分，具抗癌、抗氧化、促進生長、降低心血管病變、降低血膽固醇、與調節免疫反應等功能，固定化係一將菌體或酵素加以限制以提高其生物轉化效率之技術。本研究之目的在探討三種不同之固定化技術與 pH 對於 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (CCRC14009) 共軛亞麻油酸生產效率之影響。取培養至對數生長末期之 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 10 ml ( $3.59 \times 10^7$  CFU/ml) 以三種方法：(1) 吸附法：以 0.5 g 幾丁聚糖為單體、(2) 包埋法：以 0.5 g 聚丙醯胺為單體、與 (3) 交聯法：以 0.5 ml, 50 % 1-乙烯-3-丙二甲基碳化二亞胺為交聯試劑，於 pH 5、6、7、與 8, 4°C、2.5 hr 進行固定化處理，在加入亞麻油酸與固定化菌元於 37°C 反應 24 hr 後，以 HPLC 測定 CLA 之生成量，經吸附法處理之菌元，並重

複回收二次，以探討菌元之重複使用效率。結果發現包埋法、交聯法、與未作固定化處理之對照組，其最大 CLA 生成量之 pH 值皆為 pH 7，吸附法則為 pH 8，而此四種處理之 CLA 生成量則分別為 120.83、43.77、29.41、與 84.27 $\mu$ g；吸附法與包埋法處理之菌元在重複回收二次後，其第一次與第二次回收再使用之 CLA 生成率分別 77 與 23% 及 27 與 19%，吸附法略佳。本研究之結果顯示固定化處理能提高 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 之 CLA 產量，而包埋法於 pH 7 之 CLA 生成效率最佳；吸附法與包埋法生成之主要 CLA 異構物皆為 t9,t11-CLA；吸附法重複使用一次，其 CLA 之生成率佳。

### Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA), the isomerization products of linoleic acid has been recognized as bioactive compounds. Immobilized cell technology has great potential for use in improving biological reactions. The objective of the study was to investigate

the effects of various immobilized cell techniques and pH on CLA production using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (CCRC14009). Ten ml *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ( $3.59 \times 10^7$  CFU/ml) was absorbed in 0.5 g chitosan, entrapped in 0.5 g polyacrylamide, and cross-linked with 0.5 ml 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide, respectively, at pH 5, 6, 7, and 8 at 4°C for 2.5 hr. After reacting with linoleic acid at 37°C for 24 hr, CLA production was determined by HPLC. Cultures with absorption treatment were recycled twice for the reusability determination. Results indicated that pH 7 was the optimal pH for entrap, cross-link treatments and the unimmobilized control, while pH 8 was optimal for the absorption treatment, and the CLA productions were 120.83, 43.77, 29.41, and 84.27 µg, respectively. The CLA producing rates of chitosan and polysaccharide after 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> reuses were 77, 23 and 27, 19%, respectively, as compared with the 1<sup>st</sup> use. The study revealed that immobilized *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* could improve CLA production and the highest CLA level was produced in the entrapping treatment using polyacrylamide at pH 7. The major CLA isomer produced by chitosan and polyacrylamide was t9,t11-CLA. In addition, CLA producing rate of chitosan was still high at first reuse and can be reused once.

## 前言

亞麻油酸 (Linoleic Acid, LA) 與亞麻油酸異構酶 (LA Isomerase) 異構化作用後生成之十八個碳，含共軛雙鍵之異構物，稱為共軛亞麻油酸 (Conjugated Linoleic Acid, CLA)，亞麻油酸之不飽和雙鍵皆位於自甲基端 (carboxyl group) 算起第 9、12 號碳之位置，且為順式結構 (cis form)；其不飽和雙鍵則位於第 7、9 號碳，第 8、10 號碳，第 9、11 號碳，第 10、12 號碳，第 11、13 號碳以及第 12、14 號碳上，並會出現反式結構 (trans form)。(Kramer et al., 1998)。

食物中之 CLA 多以 *c*-9, *t*-11/*t*-9, *c*-11 CLA 與 *c*-10, *t*-12/*t*-10, *c*-12 CLA 為主 (Belury, 1995)。早期 CLA 在生理機能方面之研究，主要偏重於改變脂肪組成 (Nicolosi et al., 1997; Baumgard et al., 2000)、預防冠狀動脈粥狀硬化 (Munday et al., 1999; Lee et al., 1994)、抑制腫瘤細胞增生 (Ha et al., 1987; Pariza et al., 1985; Ip et al., 1994; Jenkins et al., 1993) 進行探討；近年來，CLA 經證實還具有調節免疫反應強度 (Sebedio et al., 1997)、提升骨骼肌異化代謝之效 (Pariza et al., 1998)。

膳食中 CLA 主要來源包括動物性及植物性食品，其中以反芻動物製品含量最為豐富。CLA 含量最高者，首推反芻動物的乳、肉及油脂製品，其次為非反芻動物肉品，植物油脂與水產食品之 CLA 含量最低。而具有抗腫瘤特性的異構物 *c*-9, *t*-11/*t*-9, *c*-11 CLA 及具有改變血漿脂肪組成、減少冠狀動脈粥狀硬化發生率之 *c*-10, *t*-12/*t*-10, *c*-12 CLA 與總 CLA 的比例亦以反芻動物製品含量最高，植物油

所含比例最低 (Chin *et al.*, 1992 ; Ha *et al.*, 1989 ; Ip *et al.*, 1994 ; Jiang *et al.*, 1996 ; Parodi *et al.*, 1994 ; Shantha *et al.*, 1992 ; Stanton *et al.*, 1997 ; Werner *et al.*, 1992)。

固定化技術,是利用人工方式以物理或化學發法,將菌體細胞或酵素之機動性加以限制,並保有其基本活性。常用方式有吸附法、共價鍵結法、交聯法、及包埋法三種。菌體細胞或酵素被固定以後,應用於生物轉化器內可使菌體細胞或酵素滯留、提高菌體細胞或酵素濃度、菌體細胞或酵素可快速且定量得移除,所以近年來廣泛應用於生物科技產品的製造。一般常見之方法如下：

1. 吸附法 (absorption) (Bailey *et al.*, 1986 )

酵素或菌體經凡得瓦爾力(van der Waals force)、疏水性作(hydrophobic interation)、氫鍵(H-bond) 、離子鍵(Ionic Binding)等非共價性建結固定於擔體 (carrier) 之上 ,。

2. 共價鍵結法(Covalent Binding) (Chibata.,1978)

指先用化學藥劑例如戊二醛 (Glutaraldehyde)、溴化氫 (CNBr) 活化擔體例如纖維素、幾丁聚醣、交聯葡聚糖 (Sephadex) ,再鍵結上酵素或菌體。

3. 包埋法(Entraping) (Chibata.,1978 ; Hartmeier.,1988)

意指將酵素或菌體包埋在天然或人工合成的高分子載體基材(matrix)的格子內(lattice),大部分為類似膠狀的結構物,為了確定被包埋之酵素或菌體的功能正常,必須確保基質與產物能通過基材,但基才的孔隙又不可以太

大以防止酵素或菌體流失。

4. 交聯法(Cross-linking) (Chibata.,1978)

利用雙或多官能基之反應劑(bi or multi-functional regents)與酵素或菌體細胞互相交聯結合在一起,形成不溶性之巨大凝聚物。

已有文獻探討不同菌元或由其萃取出之 LA Isomerase 對 CLA 生成量之影響, Jiang *et al.*(1996)用 19 種發酵菌元接種於 MRS broth, 觀察 CLA 生成,研究結果指出丙酸菌在 37°C 添加 25µg/mL LA, 厭氧情況下生長良好 *Propionibacterium freudenreichii* subsp 並能將 750µg/mL LA 異構化成 265.3µg/mL CLA。乳酸菌在上述條件下會抑制其生長與 CLA 生成。

汪 (2002)萃取乳品菌元 *Lactobacillus acidophilus* 和 *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* 之 LA Isomerase, 在不同 pH 與亞麻油酸比例與酵素粗萃取液進行活性測定,結果指出 *L. acidophilus* 和 *Prop. freudenreichii* ssp. *shermanii* 之酵素粗萃取液濃度分別為 79.48 及 7.68 mg/ml, 分別於 pH 5 及 pH 7 所得之 c-10,t-12CLA 生成量最高。總 CLA 生成量以添加 25 mg LA 與 50 mg *L. acidophilus* 酵素粗萃取液所得之 1040.10µg 最高, 而二菌元粗萃取液催化總 CLA 生成之差異不顯著。故不同菌元對 CLA 生成量之影響,可能與其 LA Isomerase 含量成正比。

有鑒於固定化技術廣泛應用應用於食品科技且市面上亦無直接用菌元或由其萃取出之 LA isomerase 所生產知 CLA 產品。所以本研究率先將乳品菌元 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 中

LA isomerase 純化出來,將此二菌元與其酵素用不同方式與條件加以固定化後再與亞麻油(linoleic acid)行異構反應後,尋求一最佳 CLA 生成效果之固定化方式與條件。

## 材料與方法

### 一、材料

#### (一) 菌元

購自新竹食品工業發展研究所菌種保存及研究中心 ( Culture Collection and Research Center , CCRC ):

*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ( CCRC 14009 ; Source: commercial yoghurt )

#### (二) 培養基

Lactobacilli MRS 培養液 ( Lactobacilli MRS broth ) 與 Lactobacilli MRS 培養基 (Lactobacilli MRS agar) 購自美國 Difco 公司。

#### (三) 藥品

三氟化硼、三氯醋酸、三氯化鐵、三羥甲基胺甲烷緩衝液 (Triza)、亞麻油酸 (linoleic acid ; C<sub>18:2</sub>)、亞麻油酸甲基酯化物 ( linoleic acid methyl ester ; C<sub>18:2</sub>)、共軛亞麻油酸 (conjugated linoleic acid ; C<sub>18:2</sub>)、共軛亞麻油酸甲基酯化物 ( conjugated linoleic acid methyl ester ; C<sub>18:2</sub> )、珍珠酸 (heptadecanoic acid ; C<sub>17:0</sub>) 聚丙醯胺吸附凝膠 ( polyacrylamide absorbent gel)、幾丁聚糖 (chitosan)、1-乙烯-3-丙二甲基碳化二亞胺 ( 1-ethyl-3-( 3-dimethylamino propyl ) carbodiimide ; EDC) 購自美國 Sigma 公司, 無水硫酸鈉、氫甲烷、氯仿、甲醇、與正己烷購自美國 Tedia 公司,

磷酸氫鈉、磷酸二氫鈉、氯化鈉購自美國 J. T. Baker 公司。

#### (四) 標準品

亞麻油酸甲基酯 ( linoleic acid methyl ester ; C<sub>18:2</sub>)、共軛亞麻油酸甲基酯 ( conjugated linoleic acid methyl ester ; C<sub>18:2</sub> ) 與珍珠酸甲基酯 ( heptadecanoic acid methyl ester ; C<sub>17:0</sub>) 購自美國 Sigma 公司。

#### (五) 儀器

分光光度計 (Jasco 7800, Jasco Inc., Japan); 高效能液相色層分析儀 (Jasco Inc., Japan): 幫浦為 Jasco PU980, 紫外光偵測器為 Jasco 870-UV, 分析管柱為 Chromspher 5 lipids 銀離子管柱 ( Chrompack silver-impregnated column, 4.6 mm i.d. x250 mm stainless steel, 5 μm particle size ) (Chrompack, USA); 4 頻道 ISA 介面 24 位元數據擷取卡 (9724-4, 4 channels 5 triggers ISA interface databus) (訊華科技, 台北)。

### 二、方法

#### (一) 菌株之活化及保存

購自 CCRC 之 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 為雙層玻璃管, 於無菌操作臺下用 90% 酒精消毒後, 用酒精燈加熱瓶口, 在加入 1-2 滴無菌水使瓶口破裂, 將內玻璃管之乾燥菌體粉末覆水至均勻懸浮狀, 取一部分懸浮液於 MRS 培養基觀察純度及活化情形, 另一部分注入 MRS 培養液中, 於 37°C 進行恆溫培養; 經活化之菌株於 4°C 保存於滅菌 (121°C, 15min) MRS 培養液中, 每四週固定轉殖一次以確保菌種之活性。欲供試驗者先經 2~3 次之繼代培養之後, 取 1% 接種於培養液中, 經 37°C 恆溫培養 24 小時後備用。

#### (二) 菌株生長特性實驗

取已經過繼代培養之嗜酸乳桿菌株 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 以 1% (v/v) 之比例接種於 MRS 培養液中，每隔 6 小時取樣一乙次，連續 48 小時，計算乳酸菌數並觀察 OD<sub>595</sub> 之變化。

#### 1. 乳酸菌落數目

依 Macfaddin *et al.* (1985) 之 MRS agar 法測定。於指定時間取已接種之培養液 1mL，以無菌水 9mL 連續稀釋後，取適當稀釋倍數之稀釋液於已標示之培養皿中，倒入液態 MRS agar 15~20mL，以八字型充分混勻後靜置至培養基凝固，倒置培養皿於 37°C 恆溫培養 48 小時，計算個時間所計算出之菌數並乘以稀釋倍數即為乳酸菌數。

#### 2. OD<sub>595</sub> 光學密度變化

於指定時間取已接種之培養液直接以分光光度計測定之，設定波長為 595nm 之光學密度值變化 (OD<sub>595</sub>) 以得到較佳之靈敏度。

#### (三) 固定化菌元方式菌元之製備

取 1% (v/v) 之 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 活化菌元接種於 1000ml 的 MRS 培養液，於 37°C 恆溫培養箱培養至對數生長末期 (24 hr) 後取出，經 4°C，10000×g 離心 10 分鐘，取沉澱細胞用 0.85% 之氯化鈉溶液清洗後，離心取出細胞再分別用 0.1M 之醋酸亞鋅緩衝液 (pH 5; acetate buffer)、磷酸鈉緩衝液 (pH 6-7; phosphate buffer)、三甲基胺甲烷緩衝液 (pH 8; tris buffer)，配置 0.1% (wet cell, wt/vol) 菌液 (約 3.59×10<sup>7</sup>CFU/ml) 行固定化反應。

*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 固定化反應之最適方式與 pH 值

#### 1. 吸附法：固定化方式參考

Spagna *et al.* (2001) 取 0.5g 經研鉢磨碎之幾丁聚糖 (150-250μm)，置入 20ml 之試管中，再取已製備之 pH 5-8 之 0.1% *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 菌液 10ml 加入其中，分別於 4°C、2.5 hr 下進行固定化作用。反應後將其分別倒入 100ml 血清瓶，並加入 0.5ml 之亞麻油酸，用相同緩衝液定量總液體體積至 60ml，於 37°C、24 hr 下，進行 CLA 生產。最後過濾取出固狀之幾丁聚糖，再重複加入 0.2ml 之亞麻油酸反應二次，進行 CLA 生產，以探討其再回收利用性。

2. 包埋法：固定化方式參考 Cheng Chang *et al.* (1999) 取 0.5g 微粒狀聚丙醯胺吸附凝膠，置入 20ml 之試管中，再取已製備之 pH 5-8 之 0.1% *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 菌液 10ml 加入其中，分別於 4°C、2.5 hr 下進行固定化作用。反應後將其分別倒入 100ml 血清瓶，並加入 0.2ml 之亞麻油酸，用相同緩衝液定量總液體體積至 60ml，於 37°C、24 hr 下，進行 CLA 生產。

3. 交聯法：固定化方式參考 Spagna *et al.* (2001) 將 pH 5-8 之 0.1% *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 菌液 10ml，置入 20ml 之試管中，取 0.2ml 50% EDC 加入其中，分別於 4°C、2.5 hr 下進行固定化作用。反應後將其分別倒入 100ml 血清瓶，並加入 0.125ml 之亞麻油酸，用相同緩衝液定量總液體體積至 20ml，於 37°C、24 hr 下，進行 CLA 生產。

4. 對照組：將 pH 5-8 之 0.1% *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 菌液 10ml，置入 20ml 之試管中並加入 0.067ml 之亞麻油酸，用相同緩衝液定

量總液體體積至 20ml，於 37°C、24 hr 下，進行 CLA 生產。

固定化菌元之重覆使用

完成第一次反應之 chitosan 與 polycrylamide 固定化菌元以 Whatman#1 濾紙過濾後，上層固定化菌元重覆使用二次。

#### (四) 共軛亞麻油酸含量分析

##### 1. 標準品溶液之配製

亞麻油酸甲基酯標準品溶液：取亞麻油酸甲基酯 50mg，以正己烷定量至 50mL，即濃度為 1mg/mL 之內標準品；共軛亞麻油酸甲基酯標準品溶液：取共軛亞麻油酸甲基酯 100mg，以正己烷定量至 100mL，即濃度為 1mg/mL 之外標準品。

##### 2. 共軛亞麻油酸之萃取

以氯仿：甲醇為 2：1 之 120ml 混合液做為萃取液。取樣品 20 克先均質 15 分鐘，離心後吸取下層氯仿與脂肪混合液，經真空減壓濃縮後再加入再加入 1ml BF<sub>3</sub> 甲基酯化 30min，以 85% n-hexane 萃取上層液。最後以氮氣吹乾至 0.5-1 ml，並使用 0.45 μm Nylon film 過濾後冷凍儲存，則完成基礎樣品。

##### 3. 高效能液相色層分析法定量共軛亞麻油酸

高壓液相色層分析儀 (Jasco Inc., Japan) 之分析條件如下：幫浦 (Jasco PU980) 分析流速為 1 ml/min，移動相氬甲烷：85% 正己烷溶液為 99.9：0.1，紫外光偵測器 (Jasco 870-UV) 設定波長為 219 nm，以測定 HA；233 nm 以定量共軛亞麻油酸；分析管柱使用 Chromspher 5 lipids 銀離子管柱 (Chrompack silver-impregnated column, 4.6 mm i.d. ×250 mm stainless

steel, 5 μm partical size)，標準品注入體積為 1 μl，試樣注入體積為 20 μl，分析時間設為 60 分鐘。

高壓液相色層分析圖譜以配 SCSI 32 2.01 版訊華分析軟體蒐集數據並進行分析，總共軛亞麻油酸以所有異構物之波峰面積總合計算之；共軛亞麻油酸之定量先以內標準品於圖譜之波峰面積計算萃取效率，再進一步比對甲基酯化標準品於層析圖譜上之滯留時間定出共軛亞麻油酸各異構物波峰面積及百分比，計算出試樣中總共軛亞麻油酸含量。

#### (五) 統計分析與繪圖

以統計分析系統 (SAS Institute Inc., Ver. 8.0 for Windows, 2000) 進行分析，使用鄧肯氏多變域顯著性測驗 (Duncan's multiple range significant test) 以比較各處理組之間的差異。

### 結果與討論

有 8 種異構物：t8, t10-, t9, t11-, t10, t12-, t11, t13-, t8, c10-, c9, t11-, t10, c12-, and c11, t13-CLA 於控制組與處理組偵測出，cis9, trans11-, trans, trans-, 與 cis, trans/trans, cis-CLAs 在 HPLC 圖譜上之 retention times 分別為 23, 17-20, and 22-25 min。

吸附法較各技術之優點為可重複回收使用固定化細胞，所以本試驗將於 pH 8 有 CLA 最高總生成量 (84.27 μg) 之固化幾丁聚醣細胞 (吸附法)，過濾取出，再重複加入 0.2ml 之亞麻油酸反應二次，進行 CLA 生產，以探討其再回收利用性，結果如表一所示，重複使用第一次之 CLA 總生成量為 67.53 μg，為原來活性之 77.3%，效率



佳；重複使用第二次之 CLA 總生成量為 27.61 $\mu\text{g}$ ，為原來活性之 31.6%。使用過之 pH 7 聚丙醯胺吸附凝膠（包埋法），亦過濾取出，再重複加入 0.2ml 之亞麻油酸反應二次，進行 CLA 生產，結果發現，重複使用第一次之 CLA 總生成量為 67.53 $\mu\text{g}$ ，為原來活性之 26.9%；重複使用第二次之 CLA 總生成量為 16.39 $\mu\text{g}$ ，為原來活性之 18.9%，重複使用效率低

表二為未使用固定化技術與三種固定化方式於不同 pH 值之 CLA 總生成量。實驗證明以 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 生產 CLA 之最適生長約為 pH 7，所以此條件下之細胞有利於其生長與活性之維持，故有最佳之 CLA 生產效率。結果亦發現包埋法、交聯法、與未作固定化處理之對照組，其最大 CLA 生成量之 pH 值皆為 pH7，吸附法則為 pH 8，而此四種處理之 CLA 生成量則分別為 120.83、43.77、29.41、與 84.27 $\mu\text{g}$ 。

三種固定化方式之之總 CLA 比較異構物，皆以 9t,11t 生成量最高，最大生成量：吸附法 28.10 $\mu\text{g}$ ；交聯法 32.20 $\mu\text{g}$ ；包埋法 32.58 $\mu\text{g}$  與其他異構物差異顯著。此結果與陳（2002）比較豆漿、牛乳、發酵牛乳、發酵豆漿之 CLA 異構物含量，發現，9c,11t 含量為所有異構物之首（0.51 $\mu\text{g}$ ；0.26 $\mu\text{g}$ ；0.75 $\mu\text{g}$ ；1.91 $\mu\text{g}$ ）不同。乳製品之主要 CLA 與由生乳的菌元生產之 CLA 並不相同。

不同固定化方式之 CLA 總產量，使用鄧肯氏多變域顯著性（Duncan's multiple range significant test）比較得知，不同處理組之間皆有顯著差異，以包埋法可產生最大量之 CLA

（120.826 $\mu\text{g}$ ），其次分別為吸附法（87.351 $\mu\text{g}$ ）、交聯法（43.77 $\mu\text{g}$ ），以來固定化菌體之生產 CLA 其產量最低（29.41 $\mu\text{g}$ ）。

包埋法可以說是目前最有效的酵素或菌體固定方法之一，如本實驗所使用之吸附擔體聚丙醯胺，其吸收性量好，每一克最大可吸附 500ml 之菌液，且反應時因菌體被包埋於高分子中不易脫落，所以有最佳之固定化效果；吸附法使用之擔體為幾丁聚糖，其去乙醯化程度約為約為 85%，其雖具高吸收性與吸附力之特性，但反應時由於菌體吸附力較差，容易脫落所以 CLA 產量較包埋法差；以 EDC 直接將菌元作交聯反應，由於其分子量過大故無法生成穩定之架橋故 CLA 產量差；未經固定化之細胞由於未受擔體保護且無法提高反應時之局部濃度故 CLA 產量最差。

## 結論

*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 生產 CLA 之最適生長條件為 pH 7。三種固定化方式之最佳 pH 值分別為吸附法 pH 8、交聯法 pH 7、與包埋法 pH 7。包埋法可產生最大量之 CLA（120.83 $\mu\text{g}$ ），其次為吸附法（84.27 $\mu\text{g}$ ）、與交聯法（43.77 $\mu\text{g}$ ），未固定化菌體之 CLA 產量最低（29.41 $\mu\text{g}$ ）。因此，使用固定化技術確可提高 CLA 之產量。

## 計畫自評

以固定化菌體與酵素技術生產 CLA 以提高 CLA 之產量，為未來 CLA 之研發重點。後續研究應著重於不同菌元、菌元濃度、不同反應 pH 值與溫

度、與其他常用之固定化凝膠，對 CLA 生成之影響，及乳品菌元之亞麻油酸異構酶之純化，以研發出 CLA 生成效果最佳之固定化方式與反應條件。

### 參考文獻

- 汪玉貞。2001。不同乳品菌元之亞麻油酸異構酶活性研究。碩士論
- 林棟雍，。1999。甲基酯化方法與共軛亞麻油酸異構物之定量。科學農業 47: 288-292
- 陳伯翊。2002。富含共軛亞麻油酸之豆漿製品研發。碩士論文。中國文化大學生活應用科學研究所。
- Bailey J. E. and D. F. Ollil. 1986. Applied enzyme catalysis. pp.157-126. McGraw-Hill. Singapore.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Saebo, and D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. Am. J. Physiol. — Regulatory Integrative & Comparative Physiology 278 : R179–R184.
- Chin, S. F., W. Liu, J. M. Storkson, Y. L. Ha, and M. W. Pariza. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. J. Food Compos. Anal. 5(3) : 185-197.
- Chang, C. C., S. K. Tseng, and H. K. Huang.1999.Hydrogenotrophic denitrification with immobilized *Alcaligenes eutrophus* for drinking water treatment. Technol Bioresource, 69: 53-58.
- Chibata, I. 1978. Preparation of Immobilized enzymes and microbial cell. Halsted Press, New York. pp. 9-107.
- Hartmeier, W. 1988. Methods of immobilization. pp.9-107. Heidelberg, New York.
- Ha, Y. L., N. K. Grimm, and M. W. Pariza. 1989. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. J. Agric. Food Chem. 37 : 75–81.
- Ip, C., D.J. Lisk, and J.A. Scimeca.1994. Potential of food modification in cancer prevention. Cancer Res. 54:1957s-1959s.
- Jiang, J., L. Bjoerck, R. Fonden, and M.Emanuelson.1996.Occurrence of conjugated cis-9,trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk – effects of feed and dietary regimen. J. Dairy Sci. 79: 438-445.
- Stanton, C., F. Lawless, J. Murphy, and B. Connolly. 1997. Conjugated linoleic acid (CLA) -- a health promoting component of dairy fats. I. Biological properties of CLA. Farm & Food 7 : 19-20.
- Munday, J. S., K. G. Thompson, and K. A. C. James. 1999. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. Br. J. Nutr. 81 : 251–255.
- Nicolosi, R. J., T. A. Wilson, E. J.

Rogers, and D. Kritchevsky. 1998. Effects of fatty acids (8:0, 14:0, cis-18:1, trans-18:1) on plasma lipoproteins, early atherogenic potential, and LDL oxidative properties in the hamster. *J. Lipid Res.* 39 : 1972–1980.

Parodi, P. W. 1994. Conjugated linoleic acid : An anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Aust. J. Dairy Technol.* 45 : 93-97.

Lee, K. N., D. Kritchevsky, and M. W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108 : 19-25.

Sebedio, J. L., P. Juaneda, G. Dobson, I. Ramilison, J. C. Martin, J. M. Chardigny, and W. W. Christie. 1997. Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochem Biophys Acta* 1345 : 5-10.

Shantha, N. C., E. A. Decker, and Z. Ustunol. 1992. Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69 : 425-428.

Spagna, G., R.N.Barbagallo, D. Casarini,P.G. Pifferi.2001. A novel chotisan derivative to immobilize  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies *Enzyme . Microb Tech* 28: 427-438.

Werner, S. A., L. O. Luedecke, and T. D. Shultz. 1992. Determination of

conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three Cheddar-type cheeses : effects of cheese cultures, processing, and aging. *J. Agric . Food Chem.* 40 : 1817-1821.

表一 吸附法與包埋法重複回收使用之CLA生產效率

重複回收次數	0	1	2
吸附法			
Total	87.35 <sup>a</sup>	67.53 <sup>a</sup>	27.61 <sup>b</sup>
CLA			
CLA 生產效率(%)	100	77.3	31.6
包埋法			
Total	86.70 <sup>a</sup>	23.40 <sup>b</sup>	16.39 <sup>b</sup>
CLA			
CLA 生產效率(%)	100	26.9	18.9

表二 不同固定化方式與與 pH 值對 *Lactobacillus. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 總 CLA 生成量 (µg) 之影響

	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
控制組	23.58 <sup>b</sup>	19.35 <sup>b</sup>	29.41 <sup>a</sup>	1.75 <sup>c</sup>
吸附法	22.32 <sup>c</sup>	0.66 <sup>c</sup>	51.3 <sup>b</sup>	84.27 <sup>a</sup>
交聯法	0.98 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>	43.77 <sup>a</sup>	0.4 <sup>b</sup>
包埋法	26.58 <sup>b</sup>	30.7 <sup>b</sup>	120.82 <sup>a</sup>	48 <sup>b</sup>

## 可供推廣之研發成果資料表

可技術移轉

日期：92年10月22日

<b>國科會補助計畫</b>	計畫名稱：乳品菌元及其酵素應用於共軛亞麻油酸生產之研究(2/2) 計畫主持人：林棟雍 計畫編號：NSC 91-2313-B-034-009 學門領域：畜牧與獸醫
<b>技術/創作名稱</b>	以聚丙醯胺固定化菌元生產共軛亞麻油酸
<b>發明人/創作人</b>	林棟雍
<b>技術說明</b>	<p>中文：以聚丙醯胺為單體，於適當條件下進行乳酸菌元之固定化處理，其後加入亞麻油酸，使其與固定化菌元反應，以萃取並純化共軛亞麻油酸。</p> <p>英文：Lactic acid bacteria were immobilized with polyacrylamide at optimal condition. After addition of linoleic acid, the mixture was incubated at optimal condition, and conjugated linoleic acid produced was extracted and purified.</p>
<b>可利用之產業 及 可開發之產品</b>	保健食品
<b>技術特點</b>	提升共軛亞麻油酸產量
<b>推廣及運用的價值</b>	共軛亞麻油酸為新興健康成分，具市場潛力。

