

透性化嗜酸乳杆菌细胞转化亚油酸为共轭亚油酸的反应动力学

魏明, 崔玮, 薛正莲

安徽工程科技学院生物化学工程系 微生物发酵安徽省工程技术中心, 芜湖 241000

摘要: 本实验旨在研究透性化嗜酸乳杆菌细胞生物转化共轭亚油酸的反应动力学。探讨了细胞浓度、底物浓度、反应体系 pH 值和温度等因素对生物转化共轭亚油酸反应速度的影响; 建立了透性化嗜酸乳杆菌细胞生物转化共轭亚油酸的动力学模型。结果表明, 透性化嗜酸乳杆菌细胞有利于共轭亚油酸的生物转化, 最适细胞浓度、pH 值和反应温度分别为 10×10^{10} ufc/mL、4.5 和 45°C; 生物转化共轭亚油酸存在底物抑制现象, 当亚油酸的浓度为 0.6 mg/mL 时, 反应速度达到最大值 17.8 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。在低亚油酸浓度下, 反应初始阶段的反应规律与经典米氏方程相符, 而在高亚油酸浓度下, 存在底物抑制现象。在最适反应条件下建立了动力学模型, 模型基本反映了共轭亚油酸的生物转化特性。

关键词: 嗜酸乳杆菌, 透性化, 生物转化, 共轭亚油酸, 动力学

Kinetics of bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by permeabilized *Lactobacillus acidophilus* cells

Ming Wei, Wei Cui, and Zhenglian Xue

Anhui Engineering Technology Research Center of Microbial Fermentation, Department of Biology and Chemistry, Anhui University of Technology and Science, Wuhu 241000, China

Abstract: In this study, we analyzed the kinetics of bioconversion of conjugated linoleic acid (CLA) by permeabilized *Lactobacillus acidophilus* cells. The effects of cell mass, linoleic acid (LA) concentration, reaction pH and temperature on the bioconversion of CLA by permeabilized cells were investigated and the model system of bioconversion of CLA was established. The results showed that the production of CLA was increased by permeabilized cells. The optimal cell mass, pH and temperature of bioconversion of CLA were 10×10^{10} ufc/mL, 4.5 and 45°C, respectively. A marked LA inhibition phenomenon existed, and the early reaction rate of producing CLA reached the maximum (17.8 $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{min}$) when LA concentration was 0.6 mg/mL. Michaelis constant was obtained by double-reciprocal plot and Hanes-Woolf plot. The reaction rate equation followed the classic Michaelis-Mentent equation at the low LA concentration, while there was a marked LA inhibition phenomenon at the high LA concentration. With the evaluated model parameters, the model system appeared to provide a description for the bioconversion of CLA by permeabilized *Lactobacillus acidophilus* cells.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, permeabilized cells, bioconversion, conjugated linoleic acid, kinetics

Received: November 9, 2009; **Accepted:** March 10, 2010

Supported by: Natural Science Research Program of the Educational Office of Anhui Province (No. KJ2008B205), Talent Recruitment Program of Anhui University of Technology and Science (No. 2007YQQ008).

Corresponding author: Ming Wei. E-mail: wmrainbow@yahoo.com.cn

安徽省教育厅自然科学基金项目 (No. KJ2008B205), 安徽工程科技学院人才引进基金 (No. 2007YQQ008) 资助。

共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, CLA) 是亚油酸(Linoleic acid, LA) 的共轭双烯酸的多种位置和几何异构体的总称^[1], 其中顺-9/反-11 和反-10/顺-12 两种异构体被证实具有很强的生理活性^[2]。共轭亚油酸具有降血压、抑制肿瘤、调节脂质代谢、抑制脂肪积累沉积、抗动脉粥样硬化、抗氧化、抗糖尿病、抗霉变、调节机体免疫力等功能^[3-5]。目前主要用化学方法合成共轭亚油酸, 但得到的是一系列位置和几何异构体的混合物, 而用酶法合成能专一性地得到具有较高活性的共轭亚油酸的异构体^[2]。

乳酸菌含有亚油酸异构酶^[6], 能把亚油酸转化为共轭亚油酸^[7]。亚油酸异构酶属于胞内酶, 通常采用超声波破碎提取粗酶进行催化反应。由于超声波破碎不彻底或者破碎过程中造成酶的损失, 导致酶法转化亚油酸为共轭亚油酸的产率较低^[8]。完整的细胞是酶催化反应的天然环境, 能够保持酶的较高活性; 利用菌体转化时, 虽然能够增加酶的耐受性, 但细胞膜成为亚油酸和共轭亚油酸进出细胞的障碍, 亚油酸异构酶的表现活力较低, 共轭亚油酸的产率不高^[9]。透性化处理可以提高细胞内酶的表现活力加速产物的合成, Gough 等利用透性化技术提高了细胞内葡萄糖氧化酶的活力^[10], Abraham 和 Bhat 用透性化酵母生产十二烷基肌氨酸取得了很好的效果^[11]。目前, 利用透性化嗜酸乳杆菌细胞转化亚油酸为共轭亚油酸的研究尚未见报道。通过研究透性化嗜酸乳杆菌细胞转化亚油酸为共轭亚油酸的动力学过程, 为共轭亚油酸的生物转化开辟了新途径。

1 材料和方法

1.1 实验材料

嗜酸乳杆菌产亚油酸异构酶突变株: 对嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* (购于中国科学院微生物研究所) 进行激光诱变和筛选得到。具体方法如下: 在添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 亚油酸的 MRS 固体培养基上接种嗜酸乳杆菌, 激光照射 10 min, 功率 20 mW, 距离 25 cm, 得到一株亚油酸异构酶高产菌株, 突变菌株经传代实验产酶稳定。

1.2 培养基及培养条件

以 MRS 为基本培养基, 以 1% (V/V) 接种量接入到一定体积的 MRS 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 (5 $\mu\text{g/mL}$ 亚油酸诱导) 36 h, 培养结束后离心 (5000 $\times g$, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 收集菌体, 并用 0.1 mmol/L 的磷酸二氢钾缓冲液 (pH 6.5) 洗涤 2 次。

1.3 细胞的透性化处理

把收集到的菌体加入到磷酸二氢钾缓冲液中, 添加渗透剂溴化十六烷三甲基铵 (CTAB) 至终浓度为 1%, 渗透时间为 20 min, 然后离心收集菌体用磷酸二氢钾缓冲液洗涤备用。

1.4 共轭亚油酸的检测方法

共轭亚油酸(CLA) 在波长 233~234 nm 之间有特殊吸收峰, 而亚油酸(LA) 却没有。在 50 mL 三角瓶中加入一定量的透性化细胞、LA 和吐温 80, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应一段时间, 然后加入正己烷 20 mL 萃取 CLA; 离心之后取正己烷层, 在 233 nm 处用紫外分光光度计测其吸光值, 对照 CLA 标准曲线可求得 CLA 的含量, CLA 标准品购于 Sigma 公司, CLA 标准曲线为: $y=10.2x-0.69$, $R^2=0.998$ 。

1.5 透性化细胞、非透性化细胞及粗酶液转化共轭亚油酸的比较实验

分别取 10 mL 细胞悬浮液 (细胞浓度 10×10^{10} ufc/mL), 分别进行透性化处理 (添加 CTAB 于细胞悬浮液中至终浓度为 1%, 渗透 20 min)、不处理和研磨超声处理获得粗酶液 (首先用石英砂在冰浴中研磨, 然后用超声波处理, 功率为 300 W, 超声时间 10 min, 离心后获得粗酶液), 然后分别加入等量的 LA 至终浓度 0.5 mg/mL, 反应体系的 pH 值为 4.0, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下反应 3 h, 提取脂肪酸测定 CLA 的含量。

1.6 对生物转化速度的影响实验

1.6.1 细胞浓度对生物转化速度的影响

将透性化细胞用磷酸二氢钾缓冲液稀释成不同浓度的细胞悬浮液 (1×10^{10} 、 3×10^{10} 、 5×10^{10} 、 7×10^{10} 、 9×10^{10} 、 10×10^{10} 、 12×10^{10} 、 15×10^{10} ufc/mL), 取 10 mL 菌悬液于 50 mL 三角瓶中, 添加 LA 至终浓度为 0.5 mg/mL, 反应体系 pH 值为 4.0, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下反应, 每隔一段时间提取 CLA 进行分析。

1.6.2 底物浓度对生物转化速度的影响

分别取 10 mL 透性化处理的细胞悬浮液 (细胞浓度为 10×10^{10} ufc/mL) 置于 50 mL 三角瓶中, 添加不同浓度的 LA (0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 mg/mL), 反应体系 pH 值为 4.0, 于 37°C 、150 r/min 条件下反应, 每隔一段时间提取 CLA 进行分析。

1.6.3 反应缓冲液的 pH 值对生物转化速度的影响

将透性化处理的细胞用不同 pH 值 (pH 3、pH 4、pH 4.5、pH 5、pH 6、pH 7、pH 8) 的磷酸盐缓冲液悬浮, 分别取 10 mL 悬浮液 (细胞浓度为 10×10^{10} ufc/mL) 放入 50 mL 三角瓶中, 添加 LA 至终浓度 0.5 mg/mL, 于 37°C 、150 r/min 条件下反应, 每隔一段时间提取 CLA 进行分析。

1.6.4 反应温度对生物转化速度的影响

分别取透性化处理的细胞悬浮液 (细胞浓度为 10×10^{10} ufc/mL) 10 mL 于 50 mL 三角瓶中, 添加 LA 至终浓度为 0.5 mg/mL, 反应体系 pH 值为 4.5, 分别在不同温度 (20°C 、 30°C 、 40°C 、 45°C 、 50°C 、 55°C 、 60°C 、 70°C) 150 r/min 下反应, 每隔一段时间提取 CLA 进行分析。

1.7 模型建立及动力学参数测定

取 10 mL 透性化细胞悬浮液加入不同浓度 (0~4 mg/mL) 的 LA, 在 45°C 、150 r/min 下反应, 每隔一段时间提取 CLA 进行分析, 以双倒数 (Double-reciprocal plot) 和 Hanes-Woolf 法作图, 得到反应的动力学参数并建立不同底物浓度范围的速度方程, 对拟合的速度方程进行验证。

2 结果与分析

2.1 透性化细胞、非透性化细胞及粗酶液转化 CLA 的比较

从表 1 可以看出, 透性化处理的嗜酸乳杆菌细胞 CLA 转化率和反应速度都最大。经过透性化处理的嗜酸乳杆菌细胞, 底物 LA 可以顺利进入细胞被酶催化生成 CLA, 因而大大缩短反应时间, 加快了反应速度; 未经透性化处理的细胞, 由于细胞膜阻碍了底物与酶的有效结合, 细胞内亚油酸异构酶的表现活力较低, 因而 CLA 的转化率也较低^[9,12]; 而

经过研磨及超声等步骤提取粗酶液会引起酶的损失或降低酶活, 因而在同等条件下催化能力降低^[7]。

2.2 细胞浓度对生物转化速度的影响

酶催化反应的速度与酶浓度有关, 在透性化嗜酸乳杆菌细胞催化反应中, 可以通过改变细胞浓度来调节参与反应的酶量, 进而影响催化反应的速度。从图 1 中可以看出, 当细胞浓度较低时, 反应速度增加缓慢, 当细胞浓度在 $4 \times 10^1 \sim 10 \times 10^{10}$ ufc/mL 时, 随着细胞浓度的增加, 反应速度快速增加; 当细胞浓度达到 10×10^{10} ufc/mL 以后, 反应速度趋于平稳, 所以细胞浓度为 10×10^{10} ufc/mL 时为饱和浓度。这种现象是由于在低细胞浓度下存在底物抑制, 因此反应速度上升较慢, 随着细胞浓度的增加, 相对底物的抑制作用减弱, 反应速度呈线性增加, 当细胞浓度达到一定值时, 反应速度最大^[9]。

2.3 亚油酸浓度对生物转化速度的影响

由图 2 可知, 底物浓度对初始反应速度影响很大, 初始反应速度随 LA 浓度的增加而增加, 当 LA 的浓度为 0.6 mg/mL 时, 反应速度达到最大值为 $17.8 \mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$; 当 LA 浓度大于 0.6 mg/mL 时,

表 1 透性化细胞、非透性化细胞及粗酶液转化 CLA 的比较

Table 1 Comparison of bioconversion of LA to CLA by permeabilized cells, control cells and crude enzyme

Activator	Reaction rate ($\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$)	Conversion to CLA (%)
Permeabilized cells	15.6	84.2
Control cells	3.4	28.6
Crude enzyme	9.2	42.8

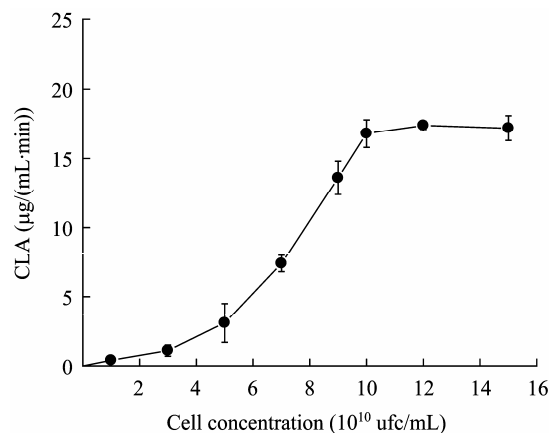


图 1 细胞浓度对反应初速度的影响

Fig. 1 Effect of cell concentration on the early reaction rate.

反应速度随着 LA 浓度的增加而下降。由此可知, 在 LA 浓度大于 0.6 mg/mL 时, 反应存在明显的底物抑制现象, 结果与 Peng 等^[13]从梭状芽孢杆菌中分离到的亚油酸异构酶的酶反应动力学相似。

2.4 反应体系的 pH 值对生物转化速度的影响

酶促反应的速度受反应介质的 pH 值影响, pH 值影响酶的活性, 由图 3 可知, 嗜酸乳杆菌透性化细胞生物转化 CLA 的最适 pH 值在 4.5 左右。

2.5 反应温度对生物转化速度的影响

温度越高酶促反应的速度越快, 同时温度又影响细胞内酶的活性, 由图 4 可知, 酶催化初始反应速度随着温度的升高而加快, 当温度为 45°C~50°C 时, 反应速度较大, 继续升高温度反应速度反而下降。高温使酶分子的构象发生变化, 从而导致酶的活性降低, 因此透性化嗜酸乳杆菌细胞生物转化共轭亚油酸的最适温度为 45°C 左右。

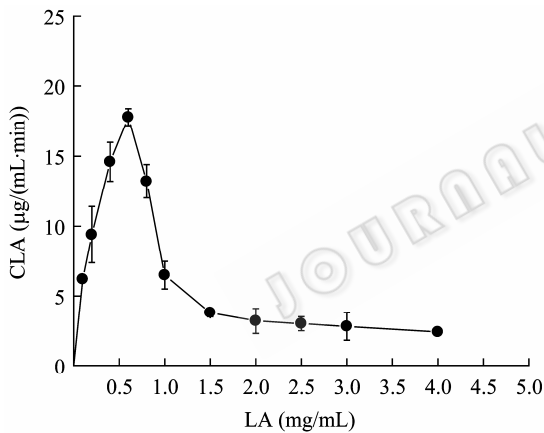


图 2 亚油酸浓度对反应初速度的影响

Fig. 2 Effect of LA concentration on the early reaction rate.

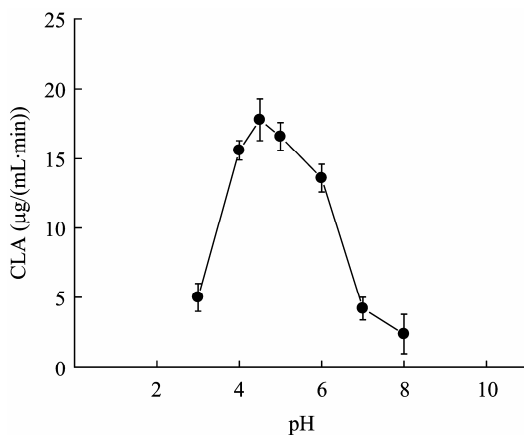


图 3 反应 pH 值对反应初速度的影响

Fig. 3 Effect of pH value on the early reaction rate.

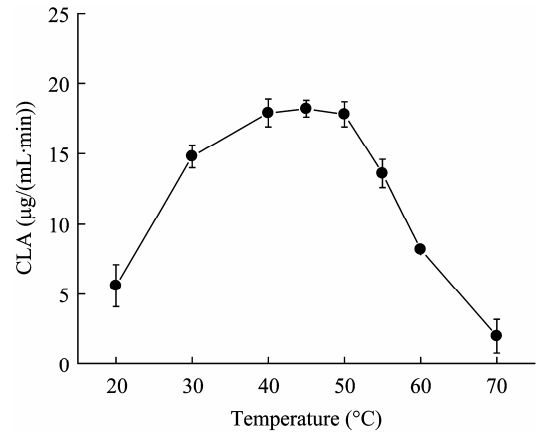


图 4 反应温度对反应初速度的影响

Fig. 4 Effect of reaction temperature on the early reaction rate.

2.6 生物转化共轭亚油酸的动力学模型建立

由于透性化嗜酸乳杆菌转化 CLA 存在明显的底物抑制现象, 因此对速度方程分两段考察: 底物非抑制浓度范围和底物抑制浓度范围内的速度方程。当 LA 浓度在 (0~0.6 mg/mL) 时, 透性化细胞反应规律遵循经典米氏方程:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

(V_{\max} 为最大反应速度, K_m 为米氏常数)。

对式 (1) 进行变形为:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

采用双倒数作图法对 $1/V$ 与 $1/S$ 作图, 拟合出一条线性方程 $y=0.0115x+0.042$ 。将直线延长与坐标轴相交, 在横轴上截距为 $-1/K_m$, 在纵轴上截距为 $1/V_{\max}$, 从而求得米氏常数和最大反应速度分别为: $K_m=0.27$ mg/mL, $V_{\max}=23.81$ µg/(mL·min)。所以, 在低底物浓度范围内, 透性化嗜酸乳杆菌细胞反应规律可用米氏方程来描述:

$$V = \frac{23.81[S]}{0.27 + [S]} \quad (0 < S < 0.6 \text{ mg/mL}) \quad (3)$$

当亚油酸浓度大于 0.6 mg/mL 时, 由 2.3 可知, 底物抑制明显, 可用经典的底物抑制速率方程来描述:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S] + \frac{S^2}{K_i}} \quad (4)$$

(K_i 是底物抑制的解离常数)

对式 (4) 进行变形得下式:

$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{S}{V_{\max}} + \frac{S^2}{V_{\max} K_i} \quad (5)$$

采用 Hanes-Woolf 作图法对 S/V 与 S 作图, 拟合出一条非线性回归方程: $y = 0.0811x^2 + 0.0887x - 0.048$ 对照式 (5) 可以求得 $K_m = 0.54 \text{ mg/mL}$; $V_{\max} = 11.27 \text{ } \mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$; $K_i = 1.09 \text{ mg/mL}$ 。因此, 在高底物浓度范围内, 透性化嗜酸乳杆菌细胞反应速度方程为:

$$V = \frac{11.27[S]}{\frac{S^2}{1.09} + [S] - 0.54} \quad (S > 0.6 \text{ mg/mL}) \quad (6)$$

2.7 模型的验证

对非底物抑制范围内的速度方程式 (3) 进行验证, 结果如图 5A 所示, 亚油酸浓度在 0~0.6 mg/mL 之间时, 实验值与模拟值相对偏差低于 5%, 反应速度方程与经典的米氏方程相吻合, 方程拟合较好。

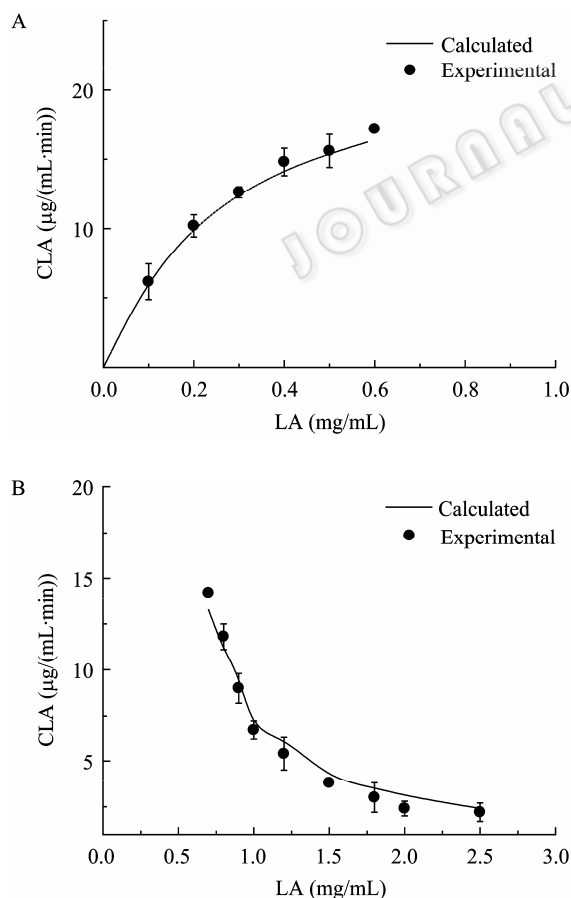


图 5 实验值与模型值的对比

Fig. 5 Comparison of experimental result with model result. (A) At low LA concentration. (B) At high LA concentration.

对底物抑制范围内的速度方程式 (6) 进行验证, 结果如图 5B 所示, 亚油酸浓度在 0.6~3 mg/mL 之间实验值与模拟值相对偏差低于 5%, 这与底物抑制方程相吻合。

3 结论

经过透性化处理的嗜酸乳杆菌细胞, 细胞膜的通透性增加, 底物亚油酸可以顺利进入细胞被酶催化, 大大缩短了反应时间, 同时透性化细胞内酶比提取液中酶的热稳定性有所提高^[6], 加快了反应速度。透性化嗜酸乳杆菌生物转化共轭亚油酸的最佳底物浓度为 0.6 mg/mL, 最佳细胞浓度为 $10 \times 10^{10} \text{ ufc/mL}$, 最佳 pH 值为 4.5, 最佳温度为 45°C 。通过透性化嗜酸乳杆菌转化亚油酸为共轭亚油酸的动力学研究, 建立了不同底物浓度范围的速度方程, 建立的模型较好地反映了透性化嗜酸乳杆菌生物转化共轭亚油酸的特性, 为利用透性化嗜酸乳杆菌大规模生物转化共轭亚油酸提供了依据。

REFERENCES

- [1] Adolf R, Lammt T. Fractionation of cis-oleic and tran-oleic, linoleic, and conjugated linoleic fatty acid methyl esters by silver ion high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1998, **799**(1/2): 329-332.
- [2] Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res*, 2001, **40**(4): 283-298.
- [3] Park Y, Albright KJ, Storkson JM, *et al.* Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, 1997, **32**(8): 853-858.
- [4] Hur SJ, Park GB, Joo ST. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Sci*, 2007, **110**(3): 221-229.
- [5] Hubbard NE, Lim D, Erickson KL. Effect of separate conjugated linoleic acid isomers on murine mammary tumorigenesis. *Cancer Lett*, 2003, **190**(1): 13-19.
- [6] Cao J, Wei M, Zeng S, *et al.* Purification and characterization of linoleate isomerase from *Lactobacillus acidophilus*. *Food Ferm Ind*, 2004, **30**(2): 48-52. 曹健, 魏明, 曾实, 等. 一株嗜酸乳杆菌突变株亚油酸异构酶的纯化及性质. *食品与发酵工业*, 2004, **30**(2): 48-52.
- [7] Lin TY, Lin CW, Wang YJ. Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus*

- CCRC14079. *Food Chem*, 2003, **83**(1): 27–31.
- [8] Lin TY. Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with additions of different fatty acids. *Food Chem*, 2006, **94**(3): 437–441.
- [9] Lee SO, Kim CS, Cho SK, *et al.* Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(12): 935–938.
- [10] Gough S, Deshpande M, Scher M, *et al.* Permeabilization of *Pichia pastoris* for glycolate oxidase activity. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**(18): 1535–1537.
- [11] Abraham J, Bhat SG. Permeabilization of baker's yeast with N-lauroyl sarcosine. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, **35**(8): 799–804.
- [12] Wang LM, Lv JP, Chu ZQ, *et al.* Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Chem*, 2007, **103**(2): 313–318.
- [13] Peng SS, Deng MD, Gund AD, *et al.* Purification and characterization of a membrane-bound linoleic acid isomerase from *Clostridium sporogenes*. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **40**(4): 831–839.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

全球气候变化对亚高山针叶林树木的影响

刘庆 林波 等著

978-7-03-027042-9 ¥96.00 2010年3月出版

全球气候变化对生态系统，包括对森林生态系统带来的一系列影响，已经成为当今国际社会关注的焦点。本书为近年来有关全球气候变化对亚高山针叶林主要树木影响的最新成果总结，共10章，主要内容包括光照、干旱、紫外线B辐射(UV-B)、增温、氮沉降、脱落酸(ABA)、森林凋落物浸提液等单因素或几种因素联合作用对树木形态、解剖、生长、光合生理、抗氧化酶系统等方面的影响。本书90%以上的内容以实验数据为编写基础，不是纯理论与概念的介绍。研究结果有助于深入认识气候变化对森林的影响，有助于森林的保护和可持续管理，对于推动全球气候变化的植物生理生态响应与适应研究具有重要意义。

本书可供从事森林生态学和全球气候变化研究和管理的高等院校、科研单位的师生和林业科技工作者等参考。



伏牛山药用植物志 (第二卷)

尹卫平 王忠东 等著

978-7-03-000000-0 ¥98.00 2010年3月出版

本书是第一卷伏牛山区的原产地保护品种(道地药材篇)之后的大宗药材篇的继续，列为第二卷，其中收录了伏牛山区分布的大宗药材共94种，编写顺序统一按照笔画排列。本书是作者根据多年的研究调查和实地考察结果，并借鉴了前人的文献积累编著而成。书中每个药用植物的描述包括：药材名称、汉语拼音、英语名称、概述、商品名、别名(药材的别名)、基原、原植物(基原中收录的植物)、药材性状、种质来源、生长习性及其基地自然条件(只描述适合本品种的植物生长的土壤情况或土壤类型)、种植方法(包括种植繁育标准和病虫害防治)、采收加工(包括分级标准)、化学成分、鉴别与含量测定、附注(收录一些伏牛山区习用药用植物)和参考文献。所以本卷记载的伏牛山区大宗药用植物，材料丰富，内容翔实，有着重要的科学价值和实用价值。

本书是一个具有高度综合利用价值的数据库，可供相关学科的研究生和科技工作者参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：周文字 (010-64031535)

网上订购：www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目