

## 酶法生产共轭亚油酸的研究进展

张艳禾<sup>1</sup> 王春来<sup>1</sup> 刘思国<sup>1</sup> 张兰威<sup>2\*</sup>

(1. 中国农科院哈尔滨兽医研究所 黑龙江 哈尔滨 150001)

(2. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院 黑龙江 哈尔滨 150009)

**摘要:** 共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, CLA)具有抗癌、抗动脉粥样硬化、减肥和免疫调节等生理活性。共轭亚油酸可以通过酶法异构化获得,将底物亚油酸异构形成具有生物活性物质-共轭亚油酸的异构酶称为亚油酸异构酶。因此,通过介绍亚油酸异构酶的来源、作用机制、酶学性质和基因工程菌生产等方面的研究进展,结合不断发展的基因工程技术,旨在提高亚油酸异构酶的活性、产量和异构化效率,以扩大反应底物范围,降低生产成本,从而推进共轭亚油酸的规模化、可持续性的工业生产。

**关键词:** 共轭亚油酸, 亚油酸异构酶, 工业生产

## Development of linoleate isomerase catalyzes for production of conjugated linoleic acid

ZHANG Yan-He<sup>1</sup> WANG Chun-Lai<sup>1</sup> LIU Si-Guo<sup>1</sup> ZHANG Lan-Wei<sup>2\*</sup>

(1. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

(2. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150009, China)

**Abstract:** CLA (Conjugated linoleic acid, CLA) possesses a wide range of biological activities including anti-cancer activity, anti-atherosclerosis activity, capability of helping reduce weight fat and regulate immune system. The fatty acid isomerase from bacteria, which catalyzes the isomerization of linoleic acid (LA) to CLA production, is a promising candidate for other approaches. This paper introduces the source of linoleate isomerase, the mechanism of its function as well as reviewing recent advances regarding the key property of this important enzyme. The preparation of linoleate isomerase and how to use it to produce high yield of isomers of conjugated linoleic acid with high purity are also demonstrated, which will help to realize sustainability and industrial scale production of conjugated linoleic acid.

**Keywords:** Conjugated linoleic acid, Linoleate isomerase, Industrial production

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30871816/C120108); 国家 863 计划项目(No. 2007AA10Z354); 国家科技“十一五”支撑项目(No. 2006BAD04A09)

\* 通讯作者: Tel: 86-451-86282901; ✉: lanweizhang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-04-29; 接受日期: 2010-11-05

共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, CLA)是必需脂肪酸亚油酸(Linoleic acid, LA)衍生的具有共轭双键的所有位置和几何异构体的统称。在众多 CLA 的异构体中 *cis*-9, *trans*-11 CLA 和 *trans*-10, *cis*-12 CLA 被认为是主要的生物活性单体。大量试验表明, CLA 具有抗癌、抗动脉粥样硬化、减肥和免疫调节等生理功效<sup>[1]</sup>。膳食均衡摄入 CLA 可以帮助我们自身机体降低脂肪沉积并能良好的促进肌肉塑形<sup>[2]</sup>。天然 CLA 主要存在于反刍动物的肉和乳中, 而以乳和肉制品为主的德国居民平均每日的摄入量仅为 350 mg<sup>[3]</sup>, 这对于专家建议每日 CLA 摄入量 3 500 mg 是远远不够的, 因此向食品中强化 CLA 含量不乏是一种有效摄取途径<sup>[4]</sup>。

CLA 可以来源于化学有机合成、微生物发酵、生物酶法和遗传工程改造。传统的化学有机合成法生产 CLA 制得的产物往往是多种 CLA 异构体的混合物, 并存在环化的副产物, 从而影响 CLA 产品在食品中的应用。微生物发酵法最终获得的是 CLA 混合物<sup>[5]</sup>。因此, 从食品安全角度出发并有利于环境保护的 CLA 生产方法被认为是生物酶法, 在获得具有异构酶活性产物的前提下, 通过此酶的异构作用可获得单一的 CLA 活性异构体。这种方法具有反应条件温和、生产设备简单的特点。研究证实<sup>[6-8]</sup>, 在某些微生物细胞内能够合成这种特殊的蛋白质产物——亚油酸异构酶(Linoleic acid isomerase, LAI), 可将这些微生物工业化培养后经分离、纯化获得酶产物, 同样还可以通过基因工程菌高产量生产亚油酸异构酶基因工程产物, 这些方式为 CLA 的食品应用提供了物质保障。

本文在对亚油酸异构酶的来源、分离纯化、作用机制、酶学性质和基因工程菌生产等方面进行详细、全面阐述的基础上, 结合不断发展的基因工程技术, 旨在提高亚油酸异构酶的活性、产量和催化效率, 以扩大反应底物范围, 进一步推进生物酶法生产 CLA 规模化工业生产技术的发展, 解决 CLA 摄入量不足的现实问题, 继而开发创新性、功能性食品, 为带动食品产业的多元化、可持续性发展开拓广阔的应用空间<sup>[9]</sup>。

## 1 亚油酸异构酶的微生物来源

亚油酸异构酶可来源于多种微生物<sup>[8,10-11]</sup>, 如儒士乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、梭状芽孢杆菌(*Clostridium sporogenes*)、痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)、溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)等, 其中 *Clostridium*、*Butyrivibrio* 和 *Lactobacillus* 等微生物具有 *cis*-9, *trans*-11 CLA 异构酶活性, 而 *Propionibacterium* 有 *trans*-10, *cis*-12 CLA 异构酶活性。所以, 将这些微生物规模化培养可以从培养物的发酵液中萃取、纯化获得天然亚油酸异构酶产物。

研究者从 *L. reuteri*、*P. acnes* 和 *L. plantarum* L-29 发酵液中分离得到亚油酸异构酶的粗酶液, 为了保持酶的活性, 并尽可能减少杂质获得高产量、高纯度的亚油酸异构酶, 研究者对不同实验菌株和不同分离纯化步骤又进行了详细的实验研究。*L. plantarum* 发酵液经  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 、DEAE 和 Sephadex G-100 步骤纯化的亚油酸异构酶的比活力为 115.92 U/mg, 是粗酶液比活力 3.06 U/mg 的 35 倍; *L. reuteri* 发酵液经 DEAE、聚焦色谱纯化步骤得到的亚油酸异构酶的比活力为 92.5 U/mg, 是粗酶液比活力 1.93 U/mg 的 47 倍; *P. acnes* 发酵液经 DEAE、聚焦色谱和凝胶过滤层析(1.6 cm×55 cm Supetdex-200 色谱柱)纯化步骤得到的亚油酸异构酶的比活力为 478 U/mg, 是粗酶液比活力 3.26 U/mg 的 160 倍。因此, 这些有关亚油酸异构酶的分离、纯化等实验室操作步骤和结果可以为工业生产中酶的提纯和萃取提供借鉴意义, 从而更有效地保持酶的生物活性。

## 2 亚油酸异构酶的主要性质

亚油酸异构酶的最适底物是不饱和脂肪酸亚油酸, 而硬脂酸、油酸、醇化的亚油酸和酯化的亚油酸均不能作为亚油酸异构酶的底物<sup>[12]</sup>。Rosson 进行了脂肪酸及其衍生物对亚油酸异构酶异构转化底物亚油酸的影响实验, 结果表明, 饱和脂肪酸不影响亚油酸异构酶的活性, 但高浓度不饱和脂肪酸会抑

制亚油酸异构酶的活性; 另外亚油酸碳链的酯类衍生物、亚油酸甲酯和亚油酸烯醇也是亚油酸异构酶的抑制剂。当底物亚油酸的浓度大于 20  $\mu\text{mol/L}$  时底物表现对异构酶的抑制作用, 随着亚油酸浓度的增加, 异构酶活性迅速下降; 当亚油酸浓度达 70  $\mu\text{mol/L}$  时, 异构酶活性几乎完全消失<sup>[11]</sup>。Kepler 等发现 *C. sporogenes* 和 *L. reuteri* 的亚油酸异构酶的最适 pH 均为 7.5, *P. acnes* 的最适 pH 为 7.3, *B. fibrisolvens* 的最适 pH 为 7.2, 故亚油酸异构酶的最适 pH 一般在 7.0–8.0 之间。*P. acnes* 的亚油酸异构酶产物为 *trans*-10, *cis*-12 CLA, 该酶的米氏常数最大为 17.2  $\mu\text{mol/L}$ , 最大反应速度为 478  $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ , *L. reuteri* 的亚油酸异构酶产物为 *cis*-9, *trans*-11 CLA, 最大反应速度为 880  $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ , 米氏常数为 8.1  $\mu\text{mol/L}$ 。依据这些实验数据, 在实际生产中采取最适的亚油酸异构酶反应条件, 一定程度上仍可以最大化的提高酶的活性。

### 3 亚油酸异构酶的作用机制

为了在提高异构酶活性的同时, 能更高效的改善并提高亚油酸异构酶的生物异构化效率, 研究者对该酶的异构化作用机制进行了研究和推测。Stanton<sup>[13]</sup>推测, 亚油酸异构酶的异构化反应是在底物亚油酸本身所提供羧基的帮助下完成的。由于亚油酸转化为共轭亚油酸时长链中部双键的位置发生了变化, 而该位置远离亚油酸的化学活性基团—羧基, 为了准确完成发生在碳链中部的双键移位反应, 共轭亚油酸异构酶催化中心的空间结构必然要与其底物亚油酸保持一定的结构构型。因此认为, 反应过程中亚油酸碳链发生了弯曲, 使其羧基在空间位置上得以靠近双键的 $\pi$ 键体系, 从而完成催化反应。Ogawa<sup>[10]</sup>和 Wallace<sup>[14]</sup>持有相同的观点, 指出在 LA 转化 CLA 过程中, 不是由非共轭双键一步异构化为共轭双键, 异构过程至少包括两步反应, 首先将 LA 羟基化为 10-羟基-18:1 脂肪酸产物, 其次羟基脂肪酸脱水形成 CLA 产物。

亚油酸异构酶催化底物具有严格的专一性, 目前只能催化自由脂肪酸-亚油酸, 而对来源丰富、多

样、成本低廉的底物油脂却无能为力, 为了解决这个现实问题, 科研人员 Alena 以异构酶的蛋白结构为切入口, 研究亚油酸异构酶蛋白质的分子结构和活性功能<sup>[15]</sup>。首先获得来源于 *P. acnes* 的 *trans*-10, *cis*-12 亚油酸异构酶(PAI)的蛋白结晶体, 通过对分辨率为 1.95 埃的三维蛋白质晶体结构解析确定了异构酶的活性位点和底物结合区。PAI 结构中存在 1 个 FAD/NAD 结合区, 并有 3 个核黄素蛋白结构域包围在 FDA 结合位点的外侧, FAD/NAD 结合区在形成共轭双键的过程中起电子传递的重要作用。作者认为, 疏水通道上构型的改变可以直接影响酶与底物结合活性位点的特异性。通过实验证实, 位于疏水通道上的氨基酸位点 Arg-88 直接突变为 Phe-193, 这个疏水残基可以增强异构酶对油脂的亲水性, 甚至超过自由脂肪酸, 因此改变了异构酶底物专一的特性, 拓宽了底物的应用范围。由此看来, 在了解和认识亚油酸异构酶性质和结构的基础上, 可以有效的对亚油酸异构酶结构和功能进行改造, 从而扩大底物范围, 进一步降低生产成本, 加速了酶法催化 CLA 的工业生产进程。

### 4 基因工程菌生产亚油酸异构酶

酶工业发展需要生物技术的推动, 全球酶制剂龙头企业都利用基因工程手段不断改良菌株, 从而提高酶制剂的产量, 例如通过基因工程菌株大量制备酶制剂, 如果胶酶、木聚糖酶和谷酰胺酶已成功应用在纺织业、造纸业和酿造等工业中。同样, 利用基因工程手段筛选不同来源微生物寻找特定的亚油酸异构酶基因, 将基因移植到工程菌株(如大肠杆菌、酵母等)中, 进而高产量、高质量发酵制备亚油酸异构酶基因工程产物。

Rosson 首次从 *L. reuteri* 和 *P. acnes* 分别克隆 *cis*-9, *trans*-11 和 *trans*-10, *cis*-12 亚油酸异构酶基因, 亚克隆后分别表达了大小为 67 kD 和 55 kD 蛋白条带。经蛋白纯化、复性和免疫印迹分析, *L. reuteri cis*-9, *trans*-11 和 *P. acnes trans*-10, *cis*-12 亚油酸异构酶可以在异源宿主中表达, 并具有较强的特异性和良好的免疫活性。另外, 在大肠杆菌中表达的重组

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

*trans*-10, *cis*-12 亚油酸异构酶不仅具有相似天然酶活性, 还表现出较高的底物浓度不能抑制该重组酶活性的特点。Ellen<sup>[16]</sup>从 *P. acnes* 克隆得到 *trans*-10, *cis*-12 亚油酸异构酶基因, 分别在大肠杆菌、啤酒酵母和烟草中进行了表达。张艳禾等<sup>[17]</sup>将 *cis*-9, *trans*-11 亚油酸异构酶基因去掉部分疏水区域并携带组氨酸标签分别在 *E. coli* 和毕赤酵母中异源表达, 经过分离纯化得到酶的比活力为 5.18 U/mg 和 6.80 U/mg, CLA 的得率分别为 20.50 mg/L 和 26.91 mg/L。

根据上述的实验结果, 我们认为不同微生物来源的亚油酸异构酶基因可以在不同的基因工程菌体系中异源表达, 在此基础上构建带有极强可诱导性的表达启动子, 表达产物以分泌可溶形式存在或带有纯化标签并高密度培养, 完全可以实现理论需求的高效表达, 获得高产量的基因工程产物。这些高效表达体系构建的相关工作本实验室正在进行中。由此看来, 基因工程菌株生产能力强, 生产效率高, 发酵条件可控, 为工业生产中高产量制备亚油酸异构酶奠定了物质基础, 并可以大大改变 CLA 工业化生产的面貌。

## 5 展望

利用生物技术方法生产食物组成的营养成分, 尤其是天然食物中缺乏的特殊成分是食品工业可持续发展的方向之一<sup>[18]</sup>。CLA 作为功能性食品添加剂已在美国、日本等多个国家进行了销售。目前化学合成法生产 CLA 工艺制得的产物往往是多种 CLA 异构体的混合物, 并存在环化的副产物, 在生产过程中降低了 CLA 的产率和纯度, 加之化学合成法产生的一些副产物难以处理, 甚至有些化学原料会有一些的毒性, 影响了 CLA 在食品和医药保健品中的应用<sup>[20]</sup>。微生物作为“细胞加工厂”<sup>[19]</sup>, 可以以合成快速、产量高、成本低的加工方式生产基因工程产物——亚油酸异构酶, 在反应条件温和的情况下, 生物酶法将 LA 专一性催化为单一 CLA 异构体, 所产生的 CLA 与天然食物中的 CLA 功能相似。生物酶法催化避免了传统化学合成法中的不利因素, 但

是也存在一些实际应用中的问题。亚油酸异构酶主要应用在食品、医疗和饲料产业中, 在催化环境复杂的反应体系中面临着提高亚油酸异构酶在非天然环境中酶的活性、耐热稳定性、非天然底物的特异性等方面的功能问题。另外, 在细菌和植物中异源表达的亚油酸异构酶对脂肪酸的催化活性和效率一直令科研工作者不甚满意。因此利用遗传和化学的手段, 定点和专一的改造天然蛋白质结构, 从而创造出具有优良性状的亚油酸异构酶分子, 不仅可以催化不饱和脂肪酸的转化, 也可以对价格低廉、来源广泛的植物油进行直接转化, 扩大底物范围, 是进一步研究的重点和难点。

在亚油酸异构酶的生产中利用不断发展的基因工程技术手段, 多方面、多角度的提高产量和活性, 扩大底物应用范围, 降低生产成本。同时, 生物酶法制备高纯度、高产量的 CLA 单体在实际生产中已发挥出越来越重要的作用。我们有理由相信, 生物酶法制备 CLA 的生产方式不仅可以满足 CLA 的规模化工业生产和营养补充食品(Nutraceuticals)等领域的需求, 还将推动食品产业的多元化、可持续性的蓬勃发展。

## 参考文献

- [1] Moon HS, Lee HG, Chung CS, et al. Physico-chemical modifications of conjugated linoleic acid for ruminal protection and oxidative stability[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2008, 5: 16-19.
- [2] Nagao K, Yanagita T. Conjugated fatty acid in food and their health benefits[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(2): 152-157.
- [3] Lasa A, Simón E, Churrua I, et al. Effects of *trans*-10, *cis*-12 CLA on liver size and fatty acid oxidation under energy restriction conditions in hamsters[J]. *Nutrition*, 2010(1): 3-10.
- [4] Lock AL, Rovai M, Gipson TA, et al. A conjugated linoleic acid supplement containing *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating goats[J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(9): 3291-3299.
- [5] Lin TY. Conjugated linoleic acid production by cell and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgarius* with additions of different fatty acids[J]. *Food*

- Chemistry, 2006, 94(3): 437-441.
- [6] Kim YJ, Liu RH, Bond DR, et al. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5226-5230.
- [7] Lin TY, Hung TH, Cheng TSJ. Conjugated linoleic acid production by immobilized cell of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*[J]. Food Chemistry, 2005, 92(1): 23-28.
- [8] Deng MD, Grund AD, Schneider KJ, et al. Linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes*: purification, characterization, molecular cloning, and heterologous expression[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007, 143(3): 199-211.
- [9] Baldwin CJ. Sustainability in the Food Industry[M]. USA: Wiley-Blackwell, 2009.
- [10] Ogawa J, Matsumura K, Kishino S, et al. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(3): 1246-1252.
- [11] Wei M, Cui W, Xue ZL. Kinetics of bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by permeabilized *Lactobacillus acidophilus* cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(4): 503-508.
- [12] Liavonchanka A, Rudolph MG, Tittmann K, et al. On the mechanism of a polyunsaturated fatty acid double bond isomerase from *Propionibacterium acnes*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(12): 8005-8012.
- [13] Stanton C, Ross RP, Zelder O. Conjugated linoleic acid isomerase and a process for the production of conjugated linoleic acid. World Patent, WO 02/101056 A2 [P] 2002: 12-19.
- [14] Wallace RJ, McKain N, Shingfield KJ, et al. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria[J]. The Journal of Lipid Research, 2007, 48(10): 2247-2254.
- [15] Liavonchanka A, Hornung E, Feussner I, et al. Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase[J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(8): 2576-2581.
- [16] Hornung E, Krueger C, Pernstich C, et al. Production of (10E,12Z)-conjugated linoleic acid in yeast and tobacco seeds[J]. Biochimica et Biophysica acta, 2005, 1738(1/3): 105-114.
- [17] 张艳禾, 张兰威, 胡森, 等. *Lactobacillus reuteri* PYR8 亚油酸异构酶基因在大肠杆菌中的表达与活性检测[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 147-152.
- [18] Gebbers R, Adamchuk VI. Precision agriculture and food security[J]. Science, 2010, 327(5967): 828-831.
- [19] Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications[M]. USA: Wiley-Blackwell, 2010.
- [20] Pardue SL. Food, energy and the environment[J]. Poult Sci, 2010, 89(4): 797-802.

**编辑部公告****《微生物学通报》英文刊名变更**

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部

2009-12-25

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>