

优化乳杆菌高产共轭亚油酸的研究进展

成晓艳, 张丁洁, 田艾迪, 刘 瑛, 陈佳璐, 陈莹莹, 洛 雪*

(沈阳农业大学食品学院 沈阳 110866)

摘要 共轭亚油酸(CLA)是亚油酸(LA)的一组位置和空间异构体的总称,其中具有生理活性的异构体是 *c9,t11*-CLA 和 *t10,c12*-CLA,它们具有丰富的营养价值和医药价值。在乳球菌属和链球菌属等乳酸菌、丙酸杆菌、瘤胃细菌以及其它菌属中,分离纯化得到的亚油酸异构酶,可催化 LA 异构化为 CLA,利用酶法合成 CLA 可以有效弥补传统化学合成法的缺陷。本文概述了近年来国内外利用紫外、微波、等离子体诱变、离子注入等物理或化学方法诱变、改造亚油酸异构酶,优化产酶条件和酶学特性,还阐述利用定点突变、基因敲除等基因工程方法,对生产菌株进行改造和培养条件优化,提高 CLA 产量的相关研究,为进一步筛选出高产共轭亚油酸菌株和 CLA 的产业化应用提供理论依据。

关键词 共轭亚油酸; 亚油酸异构酶; 诱变; 基因敲除; 优化

文章编号 1009-7848(2022)10-0391-15 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.10.040

共轭亚油酸 (Conjugated linoleic acid,CLA) 是亚油酸(Linoleic acid,LA)的一组位置和空间异构体的总称,近年来,大量研究报道 CLA 具有抗癌、抗动脉硬化症、减肥、提高机体免疫等功效^[1-2]。人们最早了解亚油酸异构酶(LAI)是通过反刍动物瘤胃溶纤丁酸弧菌 (*Butyfvibrio flbfisolvens*) 中的 LAI 将 LA 催化为 CLA^[3-4]。在 CLA 异构体中,真正具有生理活性的只有顺-9,反-11 和反-10,顺-12-CLA 两种^[5-6],其结构式如图 1 所示。由于瘤胃溶纤丁酸弧菌在多不饱和脂肪酸生物氢化的过程中产生的 *cis*-9,*trans*-11 CLA 较少,因此探究如何提高 CLA 的产量成为研究重点。

工业上合成 CLA 的方法大多采用化学合成法和生物合成法。化学合成法操作简捷,产量较高,然而生产得到的产物多为混合物,存在多种 CLA 的异构体,分离纯化相对困难,且含有有毒物质,对食品工业造成负面影响^[7]。许多科学家致力于研究生物合成法生产 CLA。LAI 具有专一性,在 LAI 催化下,LA 的转化程度远高于其它脂肪酸。动物瘤胃溶纤丁酸弧菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、德氏乳杆菌、保加利亚乳杆菌及痤疮丙酸杆菌等细菌能够使游离的 LA 转化为 CLA,在培养基中加入底物 LA,可显著提高 CLA 的转化率。如表

1 所示,不同类型菌种的底物及其添加量各不相同,合成 CLA 的能力也不同。

虽然生物法能够合成单一的 CLA,作用条件温和,但是其产量还是比较低,而且不同的菌株对应不同的反应机制,因此优化产 LAI 的条件是高产 CLA 的重要途径^[8]。本文概述了近年来利用诱变技术及基因工程技术生产和改造 LAI,进而提高 CLA 含量的相关研究。

1 利用物理方法提高 CLA 的产量

在多数研究中,通过自然方法筛选获得的菌株,产 LAI 能力有限,因此利用如诱变技术来提高菌株产酶能力是常用的方法^[9]。紫外诱变(Ultraviolet mutagenesis,UV mutagenesis)、低温等离子体诱变(Low temperature plasma mutagenesis)、常温常压等离子体诱变 (Atmospheric and room temperature plasma,ARTP)等技术,可诱变 LAI 产生菌,促使菌株高产 LAI,从而提高 CLA 的转化率,并对该诱变菌株产酶条件进行相应优化,提高 CLA 产量。

1.1 紫外或微波诱变

紫外线在 260 nm 波长下的辐射致死量最优,紫外诱变在微生物菌种的诱变研究中较常见,也是应用较为广泛的方法^[10]。紫外辐射可以引起碱基转换、颠倒互换、移码突变或缺失。紫外线能量低,对遗传物质造成的伤害小,同时,操作方法简单安全,诱变效率较高,而且诱变后产生的突变性

收稿日期: 2021-10-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701623)

作者简介: 成晓艳(1997—),女,硕士生

通信作者: 洛雪 E-mail: luoxue@syau.edu.cn

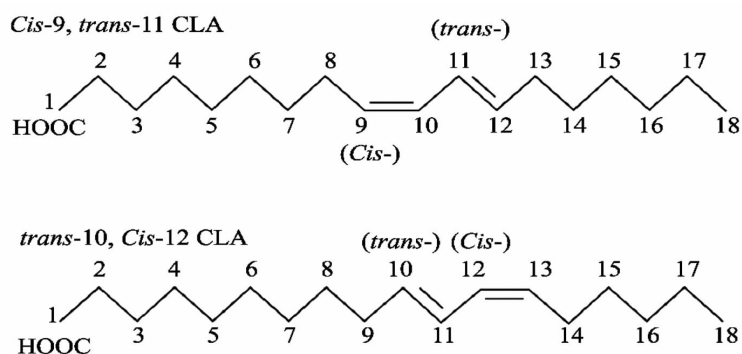


图1 c9,t11-CLA和t10,c12-CLA结构式

Fig.1 Structures of c9, t11-CLA and t10, c12-CLA

表1 不同类型菌种合成CLA的能力

Table 1 The ability of different types of strains to synthesize CLA

来源	菌种	底物	底物添加量/mg·mL ⁻¹	CLA产量/μg·mL ⁻¹
泡菜	植物乳杆菌	LA	1.61	34.55
东北酸菜汁	植物乳杆菌 sp.SC-05	-	-	98.96
泡菜	植物乳杆菌 ZS2058	LA	0.5	312.4
泡菜	明串珠菌 Q ₁₂	LA	0.4	288.74
	嗜酸乳杆菌 CGMCC	菜籽油	7.5	230.12 ± 7.52
黄牛瘤胃	干酪乳杆菌	LA	0.5	394.1
婴儿粪便	短双歧杆菌 CCFM683	LA	0.5	90.3±6.91
	短双歧杆菌 FFJND12M6	葵花籽油	0.1897	27.219
鱼肠	戊糖乳杆菌	LA	1.8	1360
牛乳	乳酸菌 M9	LA	0.7	67.53
	嗜酸乳杆菌 CICC6015	-	-	964.4
	耶氏酵母菌	油酸	5	1560
	嗜酸乳杆菌+植物乳杆菌	LA	3	319.26
	鼠李糖 UV3-4	LA	0.76	37.28

注：“-”表示该菌种在生产CLA过程中不添加LA。

状在无光照条件下不容易恢复，因此紫外诱变技术较广泛地应用于菌种诱变研究^[11]。微波诱变是一种低能电磁辐射，它能够对生物体产生热效应和非热效应，引起生物体局部温度上升，产生生化反应的便是热效应；而非热效应产生的生理生化反应与温度无关^[12]。

近些年，关于紫外线诱变，崔玮等^[13]以嗜酸乳杆菌为出发菌株，经15W紫外线2次诱变，得到1株CLA高产菌株，对其发酵条件进行优化后，诱变菌株酶活比原始菌株提高了1.51倍；对培养基的产酶条件进行优化后，酶活提高了1.1倍。曹健等^[14]采用紫外诱变，在35℃、pH4.0条件下，保温

48h，CLA的产率达38.1%，之后用超声波处理细胞后，CLA的产率也有显著提高。此外，柯薇等^[15]采用微波间歇诱变的物理诱变方法以乳酸杆菌为出发菌株，经诱变后，筛选得到5株正突变菌株，其中CLA产量最高为L4，较诱变前提高了41.4%。

综上，经过适当条件的紫外线诱变，可有效提高出发菌株产CLA，LAI酶活也相对提高，并且利用超声波、微波进行微生物诱变，对LAI活性也有较明显的提高效果。

1.2 等离子体诱变

等离子体诱变是近年来新兴的诱变技术，在诱变育种过程中采用等离子体诱变的方法，既解

决了化学诱变高污染和突变单一等缺点,又弥补了物理诱变遗传不稳定,突变率不高等缺陷。而且与离子注入诱变法相比,等离子体诱变技术不会因真空产生的低温或由离子束产生的高温而使细胞失活,该诱变技术可以在较大程度上提高细胞存活率及诱变效率^[16]。在微生物的诱变应用中,主要有低温等离子诱变和常温常压等离子诱变^[17-18]。

1.2.1 低温等离子体诱变 低温等离子体诱变技术是通过中性活性粒子来改变微生物遗传特性的,可直接改变核苷酸水平的分子结构,也可作用于细胞而间接影响胞内遗传物质^[19-20]。如孙丽慧等^[21]从东北酸菜汁中获得菌株 SC-05,经低温等离子体处理后,筛选得到突变株 A-08,其 CLA 产量达到 119.24 $\mu\text{g/mL}$,比出发菌株增加了 83.0%,经传代培养后突变株 A-08 的遗传性状具有较好的稳定性。随后王庆山^[22]将突变株 A-08 的培养基利用单因素及响应面法进行发酵条件优化,产量增加了 64.60%,发酵罐采用批式发酵和批式流加发酵的方式进行培养,CLA 的产量达到了 213.26 $\mu\text{g/mL}$ 。由此可见,采用 LTP 诱变出发菌株,改变其遗传特性,并将其培养条件进行优化,最终得到的 CLA 产量显著提高。

1.2.2 常温常压等离子体诱变 ARTP 诱变作为新的诱变技术,已经被广泛应用于真菌、细菌、微藻等微生物的基因改良^[23-25],ARTP 工作温度低、操作简单、成本低、安全无毒,而且诱变效率高于常见的诱变方法,比如紫外线辐射或化学诱变剂诱变。与其它诱变方法相比,ARTP 突变具有更大的 DNA 损伤和更高的突变率,且突变菌株遗传稳定性好、无污染^[26-27],ARTP 诱变的基本流程如图 2

所示。

ARTP 技术在其它菌种诱变应用比较广泛,如 Liu 等^[28]为获得高产碱性蛋白酶菌株,对枯草芽孢杆菌进行了 ARTP 处理,结果表明,该菌株在诱变时间为 50 s 时,有较高的正突变率,最终经 ARTP 反复诱变获得高产突变株 A59,酶活力由 6 835 U/mL 提高到 8 433 U/mL,提高了 23.38%,最终 A59 菌株的酶活达 14 026 U/mL,是原菌株的 2.05 倍; Qiu 等^[29]利用 ARTP 技术诱变蜡样芽胞杆菌以提高 QCG 菌株的 1-萘酚产量,经诱变后该菌株比原菌株增产 47.32%。Cheng 等^[30]利用 ARTP 诱变得到了高产 L-苏氨酸的抗噬菌体大肠杆菌突变株,其 L-苏氨酸转化率较出发菌株提高 10.9%。而在 ARTP 诱变提高 LAI 产量的研究中,张珂等^[31]对嗜酸乳杆菌进行 ARTP 多轮诱变处理,筛选出 1 株 LAI 高产突变菌株 B5,经单因素实验结合响应面试验对其突变株生长条件进行优化后,LAI 产量达到 1 214.1 U/mL,是原始菌株的 2.84 倍。

除了单一利用 ARTP 诱变技术来诱变微生物之外,近年来科研人员还将 ARTP 与其它技术相结合^[32],以复合诱变的方法应用于微生物生产中,如 EMS-ARTP 技术结合诱变选育高产 DHA 裂殖壶菌^[33]、ARTP-NTG 联合选育得到高产中性蛋白酶菌株^[34]、ARTP 与微生物微滴培养(MMC)技术培养筛选几丁质脱乙酰基酶高产菌株^[35]、ARTP-DES 结合连续诱变选育高产 ϵ -聚赖氨酸突变株^[36]、ARTP-EMS 联合多重诱变有效地提高了草酸青霉粗淀粉降解酶的产量^[37]、ARTP-UV 复合诱变选育高性能绿僵菌菌株^[38]、ARTP 与 5-溴尿嘧啶复合诱变选育腺苷高产菌株^[39]等。复合诱变相应的出

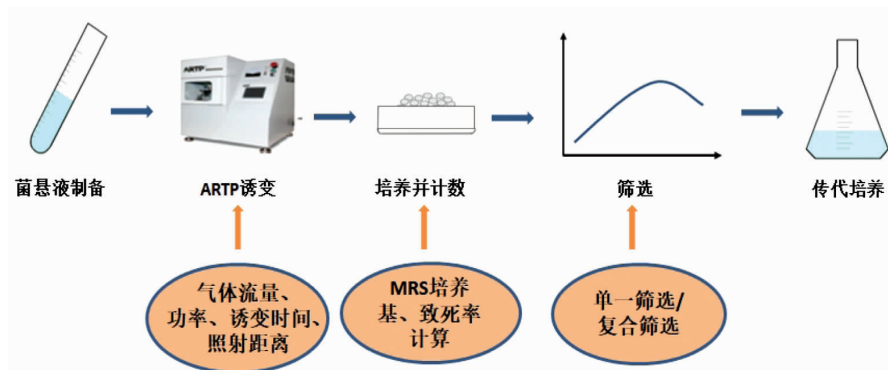


图 2 ARTP 诱变基本流程图

Fig.2 Basic flow chart of ARTP mutation

发菌株,最终得到的正突变率远远大于负突变率,且高于运用单一诱变方法的突变率,经过多次传代培养后,其突变菌株的遗传性状也是稳定的。由此可知,复合诱变能够形成更丰富的突变位点,为以后产生研究所需要的基因性状提供有效、快捷的方法。

2 利用化学方法提高 CLA 的产量

2.1 化学诱变

化学诱变是对菌株使用某些化学试剂处理,使其直接与菌株 DNA 分子链上的碱基发生作用,从而使菌株产生可遗传的变异,提高菌株突变率。常用的诱变剂主要有烷化剂、碱基类似物和无机化合物。而烷化剂在微生物变异中应用最为广泛^[40],常见为甲基磺酸乙酯(EMS)^[41]、亚硝基胍(NTG)^[42]、乙烯亚胺(EI)^[43]、硫酸二乙酯(DES)^[44]等,其中 NTG 作为一种超强诱变剂,是公认效果显著的化学超诱变剂^[34]。

科研人员利用化学诱变剂,以及物理与化学方法结合的方式对菌种进行诱变,然而多数研究表明,物理化学复合诱变获得 CLA 突变菌株的效果更好。如甄妮^[45]以德氏乳杆菌为出发菌株,采用紫外和 DES 复合诱变的方法,获得 D-2-2 CLA 高产菌株的突变菌株,产量达 0.210 mg/mL,经过培养基优化后达 0.267 mg/mL,再将 CLA 菌株生长条件优化后,其产量提高到 0.292 mg/mL,且突变菌株高产特性能够稳定遗传。而在之前相关研究中,王璟等^[46]以植物乳杆菌为出发菌株,利用紫外和 DES 复合诱变的方法,加入 0.1% 的高浓度 LA 初筛后,再进行摇瓶复筛,最终得到 *L. pian* H3-1 突变株,其 CLA 产量高达 0.3067 mg/mL,较出发菌株提高 264.5%。吴荣荣等^[47]利用 2 株嗜酸乳杆菌 HS111 和 HS112 经紫外和 NTG 复合诱变处理后,HS111 的 CLA 产量共提高了 19 $\mu\text{g/mL}$,而 HS112 提高了 27.7 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明,2 株嗜酸乳杆菌经复合诱变 CLA 产量都明显提高,然而不同种类的嗜酸乳杆菌,产 CLA 的能力也有差异。

采用单一的物理诱变或者单一的化学诱变可能得到比较单一的突变体,最终产 CLA 的效果也不好,而采用物理与化学复合诱变的方法^[48],能够有效弥补单一诱变的缺陷,从而有效提高菌株

的突变率,进而提高 CLA 产量。

2.2 离子注入

离子注入诱变法是离子在真空环境中被加速和筛选,带有相同能量的离子被导入反应室,离子和目标物开始一系列的物理和化学的相互作用^[49],其中 N-离子束诱变是其最常见的方法。N-离子束诱变技术具有突变谱宽、突变率高、重复性好、易于获得理想变异菌株等特点^[50-52]。

在多数研究中,研究人员以植物乳杆菌作为出发菌株,利用 N-离子束将其诱变,以达到菌株高产 CLA 的目的。如蔡玉华^[53]以植物乳杆菌为出发菌株,经 N-离子束注入并反复诱变,得到突变菌株 ANLP 的 CLA 量由出发菌株的 33.04 $\mu\text{g/mL}$ 提高到 103.26 $\mu\text{g/mL}$,而且突变株遗传性状稳定。慈志敏等^[54]对植物乳杆菌 P8 采用 N-离子束注入法进行诱变处理,结果表明,P8 经 N-离子束诱变,得到产 CLA 正突变菌株共 36 株,最高 CLA 质量浓度为 0.2751 mg/mL,转化率为 27.51%;负突变菌株共 66 株,最低 CLA 质量浓度为 0.0330 mg/mL,转化率为 3.30%。之后陈丽娟等^[55]对植物乳杆菌 ANCLA01 进行 N-离子注入,结果显示,N-离子注入使其 CLA 产量从 33.44 $\mu\text{g/mL}$ 提高到 66.67 $\mu\text{g/mL}$,且经 5 次传代培养后突变菌株产 CLA 也很稳定。王婧波^[56]以植物乳杆菌 LL-ZS-DS001 菌株为原始菌株,进行铯 137 γ -射线辐照和 N-离子束诱变共同处理,最终诱变得到的 CLA 产量为 118.921 $\mu\text{g/mL}$,比原始菌株 54.234 $\mu\text{g/mL}$ 提高了 119.27%。

通过以上研究发现,离子注入诱变技术能够有效提高乳杆菌 CLA 的产量,而单一利用离子注入法提高的程度有限,将辐照或其它方法与离子注入相结合,进行出发菌株的诱变,其产 CLA 的能力也会有所改变。

3 利用基因工程技术提高 CLA 的产量

为提高出发菌株 CLA 的产量,随着生物合成及诱变技术的不断发展,近几年通过基因工程技术对生产菌株进行改造^[57],例如菌株能够通过基因重组获得新的遗传型及具有优良性状的高产工程菌株,或者通过微生物间的转基因而获得新菌种。基因工程育种是按照人们意愿,对目的菌株的

基因进行设计以得到所希望的性状,是真正意义上的理性选育^[58]。

3.1 基因定点突变

基因定点突变是指通过 PCR 等方法向目的

DNA 片段中引入所需变化^[59],包括碱基的增加、删除、易位、点突变等,其原理图如图 3 所示。定点突变能快速筛选目的蛋白所表达的性状,将定点突变技术应用于 LAI 基因构建中是有效的手段^[60-61]。

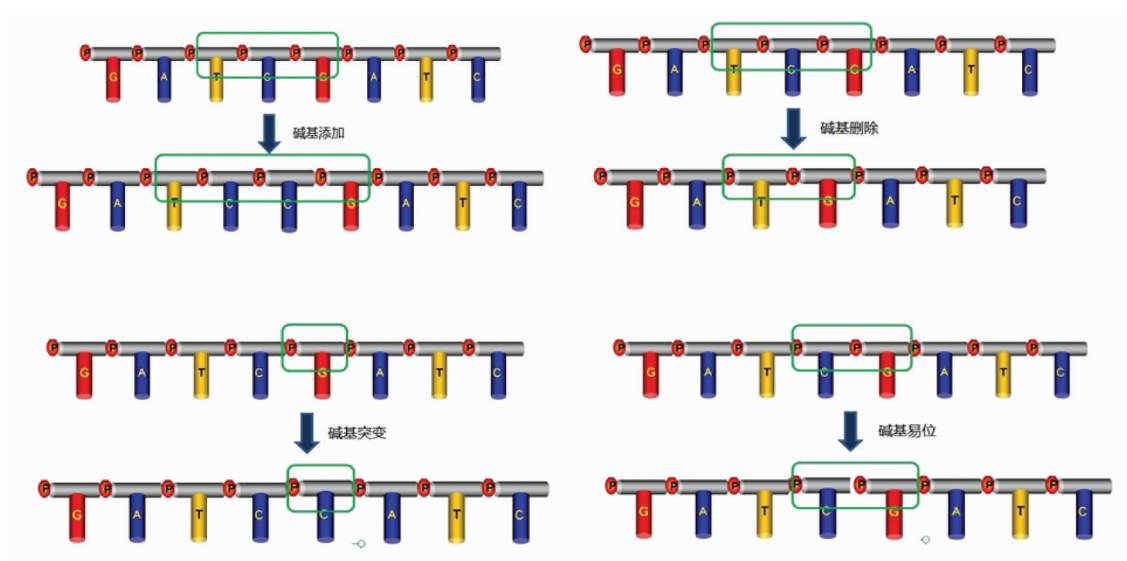


图 3 定点突变原理示意图

Fig.3 Schematic diagram of mutation principle

研究表明 LAI 可以催化 LA 转化为 CLA,然而在研究过程中发现有些菌种属于厌氧菌或兼性厌氧菌,不利于大规模产酶培养且生长缓慢,于是构建基因工程菌来表达 LAI 就成为生产 CLA 的又一重要途径^[62]。黄亮等^[63]对嗜酸乳杆菌的 LAI 基因进行体外定向进化,成功构建基因突变文库后,通过 IPTG 诱导基因表达后,最终筛选出 1 株重组菌 LI-mut2,测定其 LAI 活力为 8.2 U,嗜酸乳杆菌 LAI 活力为 17.3 U,可见测得的酶活性并不高,还需进一步探索 LAI 活力快速测定的方法。刘海霞^[64]以植物乳杆菌 P8 基因组为模板,构建重组菌 pQE30-LAI,经过 LAI 基因序列比对分析,将 193 位苯丙氨酸定为突变位点,改变 578 位碱基 T 为 C,成功构建了突变体 pQE30-F193LAI,结果表明突变体表现出了酶活被破坏的特性,然而将表达的野生型和突变型的酶提取后检测发现两者有相同的条带,说明 LAI 均得到表达。贾丽^[65]对 5 个 LAI 活性位点进行定点突变研究,且都能够成功构建突变体,最终结果表明,与野生型 LAI 相比,突变体 G68A-LAI 几乎丧失酶活力,突变体

R107L-LAI 的酶活力上升,而突变体 H172P-LAI 的酶活力下降,从而初步确定第 68 位、第 107 位和 172 位均为 LAI 的必需氨基酸。时旭^[66]将植物乳杆菌 HAC01 和痤疮丙酸杆菌的 LAI 基因成功克隆,结果显示 pCold-gfp-yelai-p 重组菌产量最高的为 39 号菌,CLA 产量为 $(11.6186 \pm 0.0036) \mu\text{g}/\text{mL}$,较未突变株提高了 3.99 倍。

通过以上研究发现,改变引物中的某些碱基而改变基因序列,进行定点突变,而以 PCR 为介导的体外定点突变为基因修饰、改造提供了另一条途径^[67],进而得到 LAI 重组菌株,同时较有效地提高了 LAI 的酶活力。

3.2 基因重组

基因重组法也称体外重组 DNA 方法,经过体外剪切、拼接,再将菌株的遗传物质重新组合在一起,然后转入受体细胞内,进行无性繁殖,并使目的基因在受体中表达,生产人类所需要的物质或生物种类,以达到定向改变生物性状的目的^[68],其原理图如图 4 所示。体外重组 DNA 方法广泛应用于生物界的遗传工程中,在生物制药、植物抗病虫

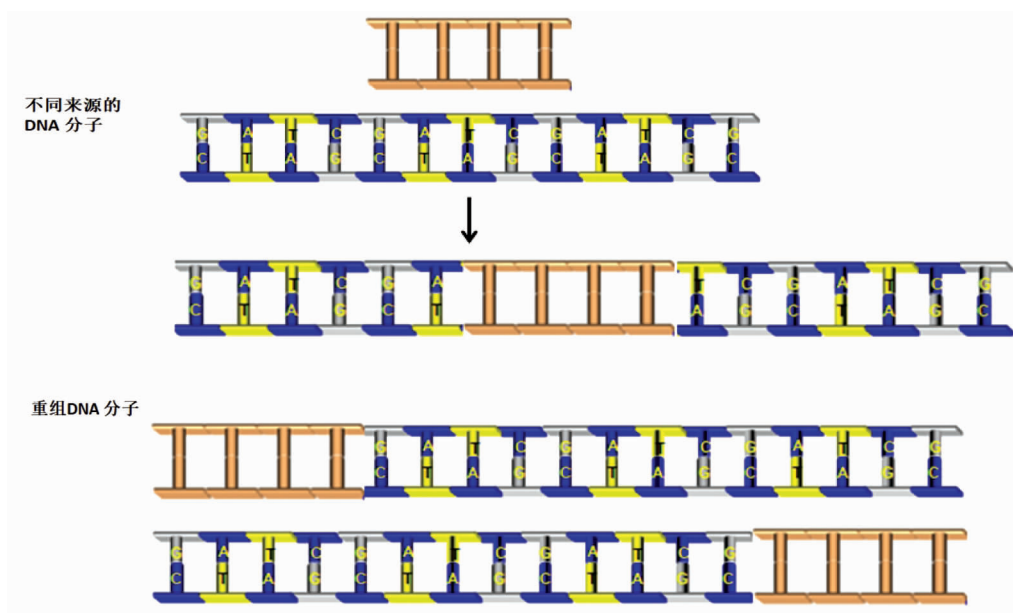


图4 基因重组原理图

Fig.4 Schematic diagram of gene recombination

害以及各理论研究方面都有广泛的应用，是一项新潮技术^[69]。

基因重组技术广泛应用于细菌基因的改造，以期获得具有优良遗传特性的新菌株，其获得的重组菌株经过相应分离、纯化，进而提高 LAI 的酶活。李晨曦^[70]通过 PCR 扩增得到植物乳杆菌 P-8 来源的 LAI 基因，连接至表达载体 pKLAC1 上，转化至乳酸克鲁维酵母菌 CICC 中，测序鉴定，成功构建了表达 LAI 的酵母基因工程菌，经 SDS-PAGE 为单一条带，测得酶活为 $(9.10 \pm 0.01) \times 10^3$ U/mL，并对影响酶活的各因素进行优化，其中影响最大的为 pH、时间、温度。刘晓华等^[71]提取了从黄牛瘤胃中分离得到的 1 株干酪乳杆菌 Fx 的基因组 DNA，经扩增及克隆后将得到的重组质粒与表达质粒同时进行双酶切，得到重组表达载体 pET-DsbA-LAI，经 PCR 鉴定和酶切后转化至大肠杆菌 BL21 中，得到具有 LAI 活性的重组菌株，且能够特异性合成 c9、t11-CLA，表明从出发菌株 Fx 成功克隆 LAI，且合成不同 CLA 异构体的 LAI 存在特异性，经定量测定，酶活力最大可达 206 U/mL。洛雪等^[72]将痤疮丙酸杆菌的 LAI 基因扩增到大肠杆菌中表达，分离纯化上清液中的 LAI 后检测到该蛋白分子质量为 55 ku，电泳得到的条带大小与 LAI 大小相符，气相色谱检测该蛋白催化生

成 t10、c12-CLA，且酶活为 (34.775 ± 0.07) U/mL。

经过基因重组技术能够成功构建具有 LAI 活性的重组菌株，且能特异性合成 CLA 异构体 c9、t11-CLA、t10、c12-CLA，进而有效提高 LAI 酶活，并对影响酶活的各因素进行优化，最终能够较好达到提高 CLA 产量的效果，是一直以来研究的重要方向。

3.3 基因敲除

基因敲除技术是建立在基因同源重组技术和胚胎干细胞技术基础上的一种新分子生物学技术，是用含有一定已知序列的 DNA 片段与受体细胞基因组中序列相同或相近的基因发生同源重组，整合至受体细胞基因组中并得到表达的一种外源 DNA 导入技术^[73]。CRISPR-Cas9 是基因编辑的主要表现形式，它能够通过 DNA 剪接技术选择性敲除特定蛋白的基因，是对靶向基因进行特定 DNA 修饰的技术，其原理图如图 5 所示。基因敲除针对某个序列已知而功能未知的序列，通过改变生物的遗传基因，进而对生物体造成影响，最终推测出该基因的生物学功能，是微生物功能基因组研究的有力工具之一^[75]。

基因敲除技术采用逆向思维，利用同源重组的方法敲除目的基因，使被研究的基因功能完全失活，从而推测该基因在整个过程中所起的作

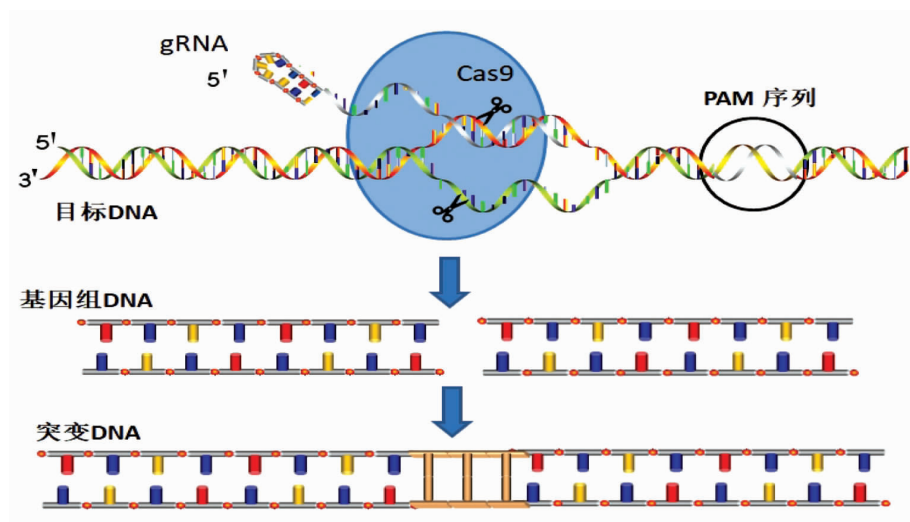


图 5 CRISPR-Cas9 基因敲除原理图

Fig.5 Schematic diagram of CRISPR-Cas9 gene knockout

用^[76],李娅妮等^[77]在植物乳杆菌 P8 的基础上,分别在 LAI 基因的上游和下游序列设计了 2 对引物,扩增出 LAI 基因上下游序列的同源臂,成功构建敲除载体 pUC18 Δ LAI 以敲除 LAI 基因,同时添加抗性筛选标记来快速筛选缺失菌株。倪丽娟^[78]成功构建了 LAI 单基因敲除菌株和双基因敲除菌株,对比其 t10,c12-CLA 降解率,PEX10 降解率最低,稳定 CLA 产量效果最佳。随即以 PEX10 为出发菌株,构建 LAI 多拷贝整合菌株,并筛选得到 1 株高产 t10,c12-CLA 的菌株 PEX10/1292,产量为 22.3 mg/L。之后添加红花籽油优化培养,结果显示 t10,c12-CLA 总产量提高到 7.6 g/L,是单拷贝菌株的 2 倍,且降解率为 23.0 mg/L/h,敲除菌株对稳定 CLA 产量非常有效。

由此看出,基因敲除在一定程度上避免了质粒整合产生的影响,也能够对底物 LA 的降解起到缓解作用,同时也将有效地提高 CLA 产量提供帮助,为工业化生产 CLA 提供一定的理论基础。

4 通过优化培养条件提高 CLA 产量

在 CLA 的生产与应用中,其菌株产酶条件及培养基的优化必不可少。通过优化菌株的产酶条件及培养菌株的培养基条件来提高 CLA 的产量是最基本的,也是最便捷的方法。除此之外,一些金属离子也对 CLA 的合成有显著影响。

罗玉芬^[79]在泡菜中筛选得到 1 株 CLA 产量较高的明串珠菌 Q₁₂,对其发酵培养基成分进行优化后,发酵液中 CLA 产量由原来的 23.263 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高到 37.831 $\mu\text{g}/\text{mL}$,LA 转化率提高到 6.31%,是未优化前的 1.63 倍。接着对菌株的发酵条件进行优化,CLA 产量达到 40.953 $\mu\text{g}/\text{mL}$,LA 转化率提高到 6.83%,是先前的 1.08 倍。Zeng 等^[80]采用尿素一步络合法对黄油中 c9,t11-CLA 的富集条件进行了优化,最终测定生产中 c9,t11-CLA 的纯度为 22.55%,c9,t11-CLA 和 t10,c12-CLA 的浓度由原来的 17.8 mg/g 和 1.02 mg/g FA 分别提升到 225.5 mg/g 和 13.11 mg/g FA。许媛等^[81]采用尿素包合法和响应面优化法对 CLA 的 2 种异构体进行分离,结果显示所得样品中 t10,c12-CLA 与 c9,t11-CLA 的比值高达 2.47,且共轭亚油酸总量为 97.3%,有效提高了 CLA 的产量。刘华甯等^[82]利用响应面优化茶籽油制备 CLA 的生产工艺条件,分离纯化后茶油的 CLA 纯度从 53.45% 提高到了 90.4%。Saber 等^[83]采用 Box-Behnken 和组合设计,建立了乳酸双歧杆菌 BB12、嗜酸乳杆菌 LA5 及其共培养物转化 CLA 的预测模型。结果表明,在最佳条件下,乳酸双歧杆菌 BB12 和嗜酸乳杆菌 LA5 生物合成 CLA 的量分别为 (110.03 \pm 4.58) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 (82.42 \pm 3.66) $\mu\text{g}/\text{mL}$,可见纯乳酸双歧杆菌 BB12 和嗜酸乳杆菌 LA5 具有良好的产生活性 CLA 的能力,而乳酸双歧杆菌 BB12 产生的

CLA能力要高于嗜酸乳杆菌 LA5。Özer 等^[84]在植物乳杆菌 AB20-961 和植物乳杆菌 DSM 2601 生产的半干发酵香肠中优化其发酵条件, 以此获得最高含量的 CLA, 发酵后植物乳杆菌 AB20-961 和 DSM2601 生产的香肠中 CLA 含量分别为 4.15 mg/g 脂肪和 7.54 mg/g 脂肪, 且用植物乳杆菌 DSM2601 生产的香肠, 发酵后的 CLA 含量比之前测定的 CLA 含量增加了 121%。曹健等^[14]研究发现, Na^+ 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 有助于提高 CLA 的产量, 相反 Hg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 不利于共轭亚油酸的合成。苗世达等^[85]由植物乳杆菌 L-29 分离纯化得到 LAI, 分子质量达 43 ku; 对其酶学性质进行研究,

结果表明, 温度在 37 °C, pH 6.0 时, 酶活性较高; Co^{2+} 、 Fe^{2+} 可提高酶的活性, 而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 则对酶活力有抑制作用。

由此可见, 将培养菌株的培养基成分, 如碳源、氮源等比例进行调节优化, 其 CLA 产量会明显提高, 在此基础上, 若将菌株的产酶条件, 如发酵温度、初始 pH、发酵时间以及底物添加量等加以优化, 及添加 Na^+ 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等化学元素也能够有效提高 LAI 的活性, 显著提高了 CLA 产量。根据相关文献, 对不同乳杆菌产 CLA 的优化条件进行了对比总结, 如表 2 所示。

表 2 不同菌种产 CLA 的基本优化条件对比

Table 2 Comparison of basic optimization conditions for CLA production by different strains

菌种	反应时间/h	最适温度/°C	最适 pH	LA 添加量/%
嗜酸乳杆菌 CICC6075	36	36.4	5.0	1.5
植物乳杆菌 P8	22	37	5.5	1.5
保加利亚乳杆菌	36	36	5.0	1.5
乳酸菌 M9	28	30	6.0	0.2
罗伊氏乳杆菌	30	37	7.0	0.06
植物乳杆菌 L-29	28	37	6.0	-
德氏乳杆菌乳酸亚种	20	47	8.0	1.1
耶氏酵母	40	28	7.0	0.3
鼠李糖 UV3-4	23.4	38	6.5	0.5
嗜酸乳杆菌+植物乳杆菌	48	36.5	6.5	5
德氏乳杆菌+嗜热链球菌+植物乳杆菌	32	38	7.5	0.125

注:“-”表示优化该菌种产 CLA 的条件时不添加 LA。

5 总结与展望

随着人们生活水平的日益提高及健康意识的逐渐提高, 由于 CLA 具有抗癌、抗动脉硬化症、减肥、提高机体免疫等重要的生理功能, 其市场需求量将会持续增加, 天然来源的 CLA 远远满足不了人们的需求^[86], 而传统获取 CLA 的方法缺陷较多, 如化学合成法生产得到的产物存在 CLA 的异构体种类较多, 分离纯化相对困难, 而且可能存在有毒物质; 生物合成法较化学合成法能够单一合成 CLA, 然而其产量不高, 故传统方法不是长期稳定生产 CLA 的最优途径。于是研究人员近年来利用新兴技术, 例如: 物理诱变、化学诱变、离子注入和等离子体诱变等诱变技术, 以及利用基因工程的方法对原菌株的 LAI 基因组进行改造, 重新构建

LAI 基因整合菌株来提高 CLA 的产量。通过研究发现, 诱变技术可以有效提高 CLA 的产量, 然而采用单一的诱变方法可能得到的突变体比较单一, 最终产 CLA 的效果也不够理想, 而采用复合诱变的方法, 能够有效弥补这一的缺陷, 从而有效提高菌株的突变率, 进而提高 CLA 产量。基因工程技术通过重新构建 LAI 基因突变文库, 改造菌株的性能, 使菌株能够高产 CLA。在此基础上, 将得到诱变或重新构建的菌株的培养基条件或者产酶条件加以优化, 其 CLA 产量会得到更大的提高。在今后 CLA 的研究中应顺应时代发展, 提高生产 CLA 过程的安全性, 着重研究通过提高 LAI 的活性来提高 CLA 的产量, 同时也要注重生产 CLA 的新技术的开发与研究。

参 考 文 献

- [1] 陈宇涛, 王鸿超, 陆文伟, 等. 基于多视图学习构建人体肠道菌群衰老时钟[C]//第十六届益生菌与健康国际研讨会摘要集, 2021: 4-5.
CHEN Y T, WANG H C, LU W W, et al. Construction of human intestinal flora aging clock based on multi-view learning [C]// Summary of the 16th International Symposium on Probiotics and Health, 2021: 4-5.
- [2] 刘海霞. 植物乳杆菌亚油酸异构酶基因的定点突变研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011.
LIU H X. Targeted mutagenesis of linoleic acid isomerase gene in *Lactobacillus plantarum*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2011.
- [3] 刘晓华, 李慧美, 柯颖笑, 等. 瘤胃中干酪乳杆菌的亚油酸异构酶基因的克隆与表达[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 1-5.
LIU X H, LI H M, KE Y X, et al. Cloning and expression of linoleic acid isomerase gene from *Lactobacillus casei* in rumen[J]. Food Science, 2017, 38(6): 1-5.
- [4] 陈佳, 邓源喜, 许晖, 等. 共轭亚油酸的生物合成以及在食品业中的应用[J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2017, 33(11): 1-9.
CHEN J, DENG Y X, XU H, et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its application in the food industry[J]. Journal of Chifeng College (Natural Science Edition), 2017, 33(11): 1-9.
- [5] OLIVEIRA D E, URIO M, SANDRI E C. Effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) on expression of lipogenic genes is related to amount of trans-10, cis-12 CLA per unit of metabolic weight in lactating dairy ewes[J]. Small Ruminant Research, 2018, 169: 42-45.
- [6] QI X L WANG J, YUE H Y, et al. Trans10, cis12-conjugated linoleic acid exhibits a stronger antioxidant capacity than cis9, trans11-conjugated linoleic acid in primary cultures of laying hen hepatocytes[J]. Poultry Science, 2018, 97(12): 4415-4424.
- [7] 赵微, 张峰, 张和平, 等. 植物乳杆菌 p-8 转化亚油酸为共轭亚油酸的研究[J]. 食品科学, 2020, 42(10): 94-103.
ZHAO W, ZHANG F, ZHANG H P, et al. Conversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* p-8[J/OL]. Food Science, 2020, 42(10): 94-103.
- [8] 张斯璇, 刘瑛, 时旭, 等. 响应面法优化重组亚油酸异构酶产酶条件[J]. 现代食品科技, 2019, 35(8): 174-180.
ZHANG S X, LIU Y, SHI X, et al. Optimization of recombinant linoleic acid isomerase enzyme production conditions by response surface methodology [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(8): 174-180.
- [9] 李豪, 白光剑, 吴静, 等. 紫外-常压室温等离子体复合诱变高产纤维素酶真菌[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 81-86.
LI H, BAI G J, WU J, et al. UV-Atmospheric pressure room temperature plasma complex mutagenesis of high cellulase producing fungi[J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(15): 81-86.
- [10] 曹礼, 王晓琴, 李彩霞, 等. 酿酒酵母菌的紫外诱变及其突变株的性能测定[J]. 中国酿造, 2009, 32(4): 66-68.
CAO L, WANG X Q, LI C X, et al. UV mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* and performance determination of its mutant strains[J]. China Brewing, 2009, 32(4): 66-68.
- [11] 陈亚兰, 陈德刚, 张冰莹, 等. 泰妙菌素高产菌的紫外诱变选育[J]. 农业与技术, 2013, 1(1): 1689-1699.
CHEN Y L, CHEN D G, ZHANG B Y, et al. UV mutagenesis selection of high yielding bacteria of Taimycin[J]. Agriculture and Technology, 2013, 1(1): 1689-1699.
- [12] 朱莉娜, 程殿林, 尹明浩, 等. 微波诱变选育低产高级醇啤酒酵母菌株[J]. 青岛大学学报(工程技术版), 2011, 26(2): 79-84.
JU L N, CHENG D L, YIN M H, et al. Microwave mutagenesis breeding low-yield high-grade alcohol beer yeast strains[J]. Journal of Qingdao University (Engineering and Technology Edition), 2011, 26(2): 79-84.
- [13] 崔玮, 魏明, 薛正莲. 亚油酸异构酶高产菌株的选育及产酶条件的优化[J]. 安徽工程科技学院学报, 2010, 25(2): 10-13.
CUI W, WEI M, XUE Z L. Selection and breeding of high yielding strains of linoleic acid isomerase

- and optimization of enzyme production conditions[J]. Journal of Anhui College of Engineering Science and Technology, 2010, 25(2): 10-13.
- [14] 曹健, 魏明, 曾实, 等. 一株嗜酸乳杆菌突变株转化亚油酸为共轭亚油酸条件的研究[J]. 食品科学, 2013, 24(1): 6-8.
- CAO J, WEI M, ZENG S, et al. Study on the conversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by a mutant strain of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Food Science, 2013, 24(1): 6-8.
- [15] 柯薇, 张楚. 产共轭亚油酸菌株的微波诱变[J]. 现代食品, 2019, 177(4): 13-19.
- KE W, ZHANG C. Microwave mutagenesis of conjugated linoleic acid-producing bacterial strains [J]. Advanced Materials and Processes, 2019, 177(4): 13-19.
- [16] 李翔. 微生物诱变育种技术[J]. 现代商贸工业, 2017(34): 185-187.
- LI X. Microbial mutagenesis breeding technology [J]. Modern Business Industry, 2017(34): 185-187.
- [17] LIANG J, LI L, SONG W. Improved Eu (III) immobilization by *Cladosporium sphaerospermum* induced by low-temperature plasma [J]. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2018, 316(3): 963-970.
- [18] ZHANG C, LI Y, ZHANG T, et al. Increasing chitosanase production in *Bacillus cereus* by a novel mutagenesis and screen method [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 266-277.
- [19] 李先艳, 李茹, 张晴, 等. 低温等离子体诱变耐高温氧化亚铁硫杆菌的试验研究[J]. 当代化工, 2019, 48(4): 712-715.
- LI X Y, LI R, ZHANG Q, et al. Experimental study of low-temperature plasma mutagenesis of high-temperature-resistant ferrous oxide *Thiobacilli* [J]. Contemporary Chemical Industry, 2019, 48(4): 712-715.
- [20] CHEN Z, CHEN J, LIU J, et al. Transcriptomic and metabolic analysis of an astaxanthin-hyperproducing *Haematococcus pluvialis* mutant obtained by low-temperature plasma (LTP) mutagenesis under high light irradiation [J]. Algal Research, 2020, 45: 101746.
- [21] 孙丽慧, 王庆山, 赵淑艳, 等. 产共轭亚油酸菌株的筛选及其等离子体诱变[J]. 工业微生物, 2016, 46(5): 50-54.
- SUN L H, WANG Q S, ZHAO S Y, et al. Screening of conjugated linoleic acid-producing strains and their plasma mutagenesis [J]. Industrial Microbiology, 2016, 46(5): 50-54.
- [22] 王庆山. 乳杆菌生物制备共轭亚油酸的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2016.
- WANG Q S. Study on the biopreparation of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus sp.* [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2016.
- [23] GAO X, LIU E, YIN Y, et al. Enhancing activities of salt-tolerant proteases secreted by *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room-temperature plasma mutagenesis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(9): 2757-2764.
- [24] 刘芳, 廖先清, 周荣华, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 CY30 菌株的常压室温等离子体诱变育种研究[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(10): 77-80.
- LIU F, LIAO X Q, ZHOU R H, et al. Atmospheric pressure room temperature plasma mutagenesis breeding study of *Bacillus cereus* CY30 strain [J]. Hubei Agricultural Science, 2020, 59(10): 77-80.
- [25] QIU L, NIE S X, HU S J, et al. Screening of *Beauveria bassiana* with high biocontrol potential based on ARTP mutagenesis and high-throughput FACS [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 171: 104732.
- [26] NYABAKO B A, FANG H, CUI F J, et al. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus acidophilus* by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) coupled with adaptive laboratory evolution (ALE) [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 191(4): 1499-1514.
- [27] 季亚美, 王立梅, 齐斌. 常压室温等离子体诱变选育高产脂肪酶解脂耶氏酵母[J]. 食品与机械, 2020, 36(11): 10-15.
- JI Y M, WANG L M, QI B. Atmospheric pressure room temperature plasma mutagenesis for the selection and breeding of high yielding lipase solubilized *Yersinia pestis* [J]. Food and Machinery, 2020, 36(11): 10-15.
- [28] LIU Y, LI S. Breeding of high-yield alkaline protease producing strain by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, 453(1): 10-15.
- [29] QIU C, ZHANG A, TAO S, et al. Combination of

- ARTP mutagenesis and color-mediated high-throughput screening to enhance 1-naphthol yield from microbial oxidation of naphthalene in aqueous system [J]. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2020, 14(5): 793-801.
- [30] CHENG L, WANG J, ZHAO X, et al. An antiphage *Escherichia coli* mutant for higher production of L-threonine obtained by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis [J]. *Biotechnology Progress*, 2020, 36(6): 793-801.
- [31] 张珂, 魏明, 崔晓峰, 等. ARTP 诱变选育亚油酸异构酶高产菌株及其发酵条件优化[J]. 徐州工程学院学报(自然科学版), 2018, 33(4): 55-59.
- ZHANG K, WEI M, CUI X F, et al. Selection of high-yielding strains of linoleic acid isomerase by ARTP mutagenesis and optimization of their fermentation conditions [J]. *Journal of Xuzhou Engineering College (Natural Science Edition)*, 2018, 33(4): 55-59.
- [32] 王茹. 常压室温等离子体诱变技术结合 CRISPR/Cas9 系统选育胞苷高产菌株的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2020.
- WANG R. Atmospheric pressure room temperature plasma mutagenesis combined with CRISPR/Cas9 system for the selection of high cytosine producing strains[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2020.
- [33] 赵彝, 王武, 李昌灵, 等. EMS-ARTP 复合诱变选育高产 DHA 裂殖壶菌[J]. 食品与机械, 2018, 34(2): 19-24.
- ZHAO B, WANG W, LI C L, et al. EMS-ARTP compound mutagenesis for the selection of high-yielding DHA lytic potentilla [J]. *Food and Machinery*, 2018, 34(2): 19-24.
- [34] 钱娟娟, 王克芬, 宋静静, 等. Artp-ntg 复合诱变选育高产中性蛋白酶菌株[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(21): 5-7.
- QIAN J J, WANG K F, SONG J J, et al. Selection of high neutral protease producing strains by Artp-ntg compound mutagenesis [J]. *Anhui Agricultural Science*, 2019, 47(21): 5-7.
- [35] 马钦元, 申雁冰, 丁盼盼, 等. 常压室温等离子体诱变与微生物微滴培养选育几丁质脱乙酰基酶高产菌株[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 170-174.
- MA Q Y, SHEN Y B, DING P P, et al. Atmospheric pressure room temperature plasma mutagenesis and microbial microdrop culture for the selection of high yielding strains of chitinous deacetylase [J]. *China Brewing*, 2020, 39(8): 170-174.
- [36] 席志文, 黄林娜, 翟一畅, 等. Artp-des 连续诱变选育高产 ϵ -聚赖氨酸突变株[J]. 食品科学, 2020, 41(14): 131-137.
- XI Z W, HUANG L N, ZAI Y C, et al. Successive mutagenesis of Artp-des to select high-yielding ϵ -polylysine mutant strains [J]. *Food Science*, 2020, 41(14): 131-137.
- [37] GU L S, TAN M Z, LI S H, et al. ARTP/EMS-combined multiple mutagenesis efficiently improved production of raw starch-degrading enzymes in *Penicillium oxalicum* and characterization of the enzyme-hyperproducing mutant [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 1-12.
- [38] 黄玉, 尼玛扎西, 薛正莲, 等. Artp 与紫外线复合诱变选育高性能绿僵菌菌株[D]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 60-70.
- HUANG Y, NIMA Z X, XUE Z L, et al. Selection of high performance strains of *S. aeruginosa* by Artp and UV mutagenesis [D]. *Food Industry Science and Technology*, 2021, 42(4): 60-70.
- [39] 杨心萍, 宋词, 张伟豪, 等. 常压室温等离子体与 5-溴尿嘧啶复合诱变及快速选育腺苷高产菌株[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 73-77.
- YANG X P, SONG S, ZHANG W H, et al. Atmospheric pressure room temperature plasma and 5-bromouracil complex mutagenesis and rapid selection of adenosine high yielding strains [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2020, 46(9): 73-77.
- [40] 程明, 崔承彬, 李长伟, 等. 化学诱变技术在微生物育种研究中的应用[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(6): 412-417.
- CHENG M, CUI C B, LI C W, et al. Application of chemical mutagenesis in microbial breeding research [J]. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 2009, 36(6): 412-417.
- [41] CHEN T T, HUANG L P, WANG M M, et al. Ethyl methyl sulfonate-induced mutagenesis and its effects on peanut agronomic, yield and quality traits [J]. *Agronomy*, 2021, 10(5): 1-13.
- [42] LV Y, LI J, CHEN Z, et al. Species identification and mutation breeding of silicon-activating bacteria isolated from electrolytic manganese residue [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(2): 1491-1501.

- [43] ENGLERT C, TAUHARDT L, HARTLIEB M, et al. Linear poly(ethylene imine)-based hydrogels for effective binding and release of DNA[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(4): 1124-1131.
- [44] GUO J, LIU C, ZHANG C, et al. Nitrous acid and diethyl sulfate, as chemical mutagenic agents, to improve the biomass, metabolites, enzyme activity, and antioxidant activity of wild *Phellinus igniarius*[J]. *Food Science and Technology Research*, 2019, 25(3): 459-466.
- [45] 甄妮. 共轭亚油酸高产菌株的诱变选育及培养基和发酵条件的优化[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2014.
- ZHEN N. Mutagenic selection of high yielding strains of conjugated linoleic acid and optimization of culture medium and fermentation conditions[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, 2014.
- [46] 王璟, 吴祖芳, 翁佩芳. 高产共轭亚油酸植物乳杆菌的诱变选育[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2008(2): 174-177.
- WANG J, WU Z F, WENG P F. Mutagenic selection of *Lactobacillus plantarum* for high yield of conjugated linoleic acid[J]. *Journal of Ningbo University (Science and Technology Edition)*, 2008(2): 174-177.
- [47] 吴荣荣, 魏淑珍, 李辉. 产共轭亚油酸嗜酸乳杆菌菌株的诱变育种[J]. *现代农业科技*, 2014(5): 62-63.
- WU R R, WEI S Z, LI F. Mutagenesis breeding of conjugated linoleic acid producing *Lactobacillus acidophilus* strains[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2014(5): 62-63.
- [48] LAKSHMI E S, NARASINGA R M R, SUDHAMANI M. Response surface methodology-artificial neural network-based optimization and strain improvement of cellulase production by *Streptomyces sp.*[J]. *Bioscience Journal*, 2020, 36(4): 1390-1402.
- [49] 李翔. 等离子体诱变微生物育种[J]. *现代商贸工业*, 2017(35): 195-196.
- LI X. Plasma mutagenesis microbial breeding[J]. *Modern Commerce Industry*, 2017(35): 195-196.
- [50] 刘国生, 李金鑫, 刘磊, 等. N离子束注入与DES复合诱变选育腺苷高产菌株[J]. *河南农业科学*, 2017, 46(4): 143-146.
- LIU G S, LI J X, LIU L, et al. Selection of adenosine high-yielding strains by N ion beam injection and DES compound mutagenesis[J]. *Henan Agricultural Science*, 2017, 46(4): 143-146.
- [51] 李强, 任立凯, 陈凤, 等. 小麦N离子束注入诱变育种的应用研究[J]. *山东农业科学*, 2016, 48(7): 18-22.
- LI Q, REN L K, CHEN F, et al. Application study of N ion beam injection mutagenesis breeding in wheat[J]. *Shandong Agricultural Science*, 2016, 48(7): 18-22.
- [52] CAO Z, HU Y, LI J, et al. The effect of N⁺ ion implantation mutagenesis on the *Streptomyces aureochromogenes* NJYHWG 66832[C]. *International Conference on Materials, Architecture and Engineering Technology*, 2013: 555-560.
- [53] 蔡玉华. N⁺注入选育产CLA乳酸菌及其发酵条件的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- CAI Y H. Study on the selection of CLA-producing lactic acid bacteria and their fermentation conditions by N⁺ injection[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2008.
- [54] 慈志敏, 赵国芬, 陈剑, 等. 产CLA植物乳杆菌P8的离子束诱变与筛选[J]. *内蒙古农业大学学报*, 2011, 32(3): 207-210.
- CI Z M, ZHAO G F, CHEN J, et al. Ion beam mutagenesis and screening of CLA-producing *Lactobacillus plantarum* P8[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 2011, 32(3): 207-210.
- [55] 陈丽娟, 徐玉霞, 张云华, 等. 离子注入诱变选育高产共轭亚油酸植物乳杆菌及RAPD分析[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(2): 34-36.
- CHEN L J, XU Y X, ZHANG Y H, et al. Selection of *Lactobacillus plantarum* for high yield of conjugated linoleic acid by ion injection mutagenesis and RAPD analysis[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2013, 41(2): 34-36.
- [56] 王婧波. 高产共轭亚油酸的菌种诱变选育及酶学特性研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2014.
- WANG J B. Selection and enzymatic characterization of strains with high yield of conjugated linoleic acid[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology and Business, 2014.
- [57] MACOUAET M, LEE B H, ROBERT N. Genetic and structural comparison of linoleate isomerases from selected food-grade bacteria[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(6): 2128-2134.

- [58] 邱小明, 刘志琼. 庆大霉素产生菌的基因工程育种[J]. 漳州职业技术学院学报, 2010, 12(3): 69-73.
QIU X M, LIU Z Q. Genetic engineering breeding of gentamicin producing bacteria [J]. Journal of Zhangzhou Vocational and Technical College, 2010, 12(3): 69-73.
- [59] 马晟. 甲基营养菌 MB200 中与 *L*-丝氨酸反馈抑制相关的 *serA* 基因研究[D]. 南宁: 广西大学, 2014.
MA S. Study on *serA* gene associated with *L*-serine feedback inhibition in methylotrophic bacteria MB200 [D]. Nanning: Guangxi University, 2014.
- [60] 洪浩, 詹姆斯·盖吉, 肖毅, 等. 酯酶突变体及其应用; CN113308450B[P]. 2021-11-12.
HONG H, JAMES G, XIAO Y, et al. Esterase mutants and their applications: CN113308450B [P]. 2021-11-12.
- [61] FANG R, CHANDER S J, AIRHUNMWUNDE O, et al. Improving the enzyme property of ornithine transcarbamylase from *Lactobacillus brevis* through site-directed mutation[J]. Lwt, 2020, 133: 109953.
- [62] 郎建华. 亚油酸异构酶基因的克隆及表达[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
LANG J H. Cloning and expression of linoleic acid isomerase gene[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010.
- [63] 黄亮, 宋鹏, 尹艳丽, 等. 嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶基因定向进化研究[J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2010, 31(2): 55-58.
HUANG L, SONG P, YIN Y L, et al. Directed evolution of the linoleic acid isomerase gene of *Lactobacillus acidophilus*[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2010, 31(2): 55-58.
- [64] 刘海霞. 植物乳杆菌亚油酸异构酶基因的定点突变研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011.
LIU H X. Targeted mutagenesis of linoleic acid isomerase gene in *Lactobacillus plantarum*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2011.
- [65] 贾丽. 植物乳杆菌 p-8 亚油酸异构酶点突变体的构建和活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
JIA L. Construction and activity of p-8 linoleic acid isomerase point mutants of *Lactobacillus plantarum* [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [66] 时旭. 亚油酸异构酶定向进化研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
SHI X. Directed evolution of linoleic acid isomerase [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
- [67] 贾丽, 赵国芬, 李晨曦, 等. 利用 PCR 介导的基因定点突变技术构建 *L.plantarum* P-8 亚油酸异构酶突变体[J]. 农产品加工, 2015(15): 5-8.
JIA L, ZHAO G F, LI C X, et al. *Plantarum* P-8 linoleic acid isomerase mutant was constructed by PCR-mediated gene site-directed mutagenesis [J]. Processing of Agricultural Products, 2015(15): 5-8.
- [68] 徐悦, 周明旭, 朱纯, 等. 产低毒性脂多糖大肠杆菌 J5 基因重组株的构建[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(17): 54-58.
XU Y, ZHOU M X, ZHU C, et al. Construction of a recombinant strain of low toxicity lipopolysaccharide-producing *Escherichia coli* J5 gene [J]. Jiangsu Agricultural Science, 2020, 48(17): 54-58.
- [69] WANG Y, CHENG H J, LIU Y, et al. In-situ generation of large numbers of genetic combinations for metabolic reprogramming via CRISPR-guided base editing[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 54-58.
- [70] 李晨曦. 重组亚油酸异构酶在乳酸克鲁维酵母中表达条件的优化及微囊化[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
LI C X. Optimization of expression conditions and microencapsulation of recombinant linoleic acid isomerase in lactic acid Kruvic yeast [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016.
- [71] 刘晓华, 李慧美, 柯颖笑, 等. 瘤胃中干酪乳杆菌的亚油酸异构酶基因的克隆与表达[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 1-5.
LIU X H, LI H M, KE Y X, et al. Cloning and expression of linoleic acid isomerase gene from *Lactobacillus casei* in rumen [J]. Food Science, 2017, 38(6): 1-5.
- [72] 洛雪, 李越, 张爽, 等. 亲和层析法纯化重组大肠杆菌表达的亚油酸异构酶[J]. 中国食品学报, 2018, 18(1): 88-94.
LUO X, LI Y, ZHANG S, et al. Purification of linoleic acid isomerase expressed by recombinant *Escherichia coli* by affinity chromatography [J]. Chinese Journal of Food Science, 2018, 18(1): 88-94.
- [73] 张飞, 杨代刚, 马雄风, 等. 基因 GhSWEET42 在防治棉花黄萎病中的应用; CN113637678A[P]. 2021-

- 11-12.
ZHANG F, YANG D G, MA X F, et al. Application of GhSWEET42 gene in the prevention and control of *Verticillium* wilt in cotton: CN113637678A [P]. 2021-11-12.
- [74] 万军, 陈倩倩, 陈崢, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术制备 PI3K γ 全身敲除模式小鼠方法及其应用和试剂盒: CN109694885B[P]. 2021-03-02.
WAN J, CHEN Q Q, CHEN Z, et al. Preparation of PI3K γ knock-out mouse model based on CRISPR/ Cas9 technology and its application and kit: CN109694885B[P]. 2021-03-02.
- [75] RUSSELL A L, MILLER L, YI H, et al. Knockout of the circadian gene, *Per2*, disrupts corticosterone secretion and results in depressive-like behaviors and deficits in startle responses [J]. *BMC Neuroscience*, 2021, 22(1): 1-11.
- [76] LI J Z, GE W. Zebrafish as a model for studying ovarian development: Recent advances from targeted gene knockout studies[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020, 507: 110778.
- [77] 李娅妮, 赵国芬, 包秋华, 等. 植物乳杆菌 *lai* 基因同源重组敲除载体的构建与鉴定[J]. *农产品加工*, 2014(3): 51-59.
LI Y N, ZHAO G F, BAO Q H, et al. Construction and characterization of a homologous recombinant knockout vector for *Lactobacillus plantarum lai* gene[J]. *Agricultural Product Processing*, 2014(3): 51-59.
- [78] 倪丽娟. 基于脂肪酸氧化途径调控解脂耶氏酵母积累反-10, 顺-12-共轭亚油酸的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
NI L J. Study of fatty acid oxidation pathway-based regulation of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid accumulation in lipolytic yeast[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [79] 罗玉芬. 共轭亚油酸高产菌株的筛选、鉴定、培养基和发酵条件优化及紫外诱变研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2011.
LUO Y F. Screening, identification, optimization of medium and fermentation conditions and UV mutagenesis of conjugated linoleic acid high-yielding strains[D]. Nanchang: Nanchang University, 2011.
- [80] ZENG Y H, LIU P, YANG X H, et al. The dietary c9,t11-conjugated linoleic acid enriched from butter reduces breast cancer progression *in vivo* [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(4): 1-10.
- [81] 许媛, 沈俊平, 周军, 等. 响应面优化法尿素包合法分离共轭亚油酸 2 种异构体[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(19): 7030-7036.
XU Y, SHEN J P, ZHOU J, et al. Separation of two isomers of conjugated linoleic acid by urea inclusion method with response surface optimization[J]. *Journal of Food Safety and Quality Testing*, 2020, 11(19): 7030-7036.
- [82] 刘华甯, 张萌, 唐小月, 等. 茶籽油制备共轭亚油酸的工艺优化及分离纯化研究[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(11): 51-55.
LIU H N, ZHANG M, TANG X Y, et al. Process optimization and separation and purification of conjugated linoleic acid from tea seed oil[J]. *Grain and Oil*, 2020, 33(11): 51-55.
- [83] SABER A, REZA R M, MAHMOUD S K, et al. In situ production of conjugated linoleic acid by *Bifidobacterium lactis* BB12 and *Lactobacillus acidophilus* LA5 in milk model medium[J]. *Lwt*, 2020, 132: 109933.
- [84] ÖAER C O, KILIÇ B. Utilization of optimized processing conditions for high yield synthesis of conjugated linoleic acid by *L. plantarum* AB20-961 and *L. plantarum* DSM2601 in semi-dry fermented sausage[J]. *Meat Science*, 2020, 169: 108218.
- [85] 苗士达, 张中义, 刘萍, 等. 植物乳杆菌亚油酸异构酶的分离纯化及其性质研究[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(3): 12-15.
MIAO S D, ZHANG Z Y, LIU P, et al. Isolation and purification of linoleic acid isomerase from *Lactobacillus plantarum* and its properties[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2005, 31(3): 12-15.
- [86] 郭小婧, 张东辉. 乳酸菌合成共轭亚油酸及其应用研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(9): 182-189.
GUO X J, ZHANG D H. Progress in the synthesis of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria and its application[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(9): 182-189.

Research Progress on Optimization of *Lactobacillus* for High Yield of Conjugated Linoleic Acid

Cheng Xiaoyan, Zhang Dingjie, Tian Aidi, Liu Ying, Chen Jialu, Chen Yingying, Luo Xue*
(College of Food, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866)

Abstract Conjugated linoleic acid is a general term for a group of positional and spatial isomers of linoleic acid, among which the physiologically active isomers are *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid, which has rich nutritional and medicinal values. The isomerase of linoleic acid obtained by isolation and purification in *Lactococcus spp.* and *Streptococcus spp.* and other *Lactobacillus*, *Propionibacterium* and *Rumen bacteria* as well as other genera can catalyze the isomerization of linoleic acid to conjugated linoleic acid, and the synthesis of conjugated linoleic acid by enzymatic method can overcome the shortcomings of the traditional chemical synthesis method. This article has reviewed the recent research on the use of UV, microwave, plasma mutagenesis, ion injection and other physical or chemical methods to mutate and modify linoleic acid isomerase, optimize enzyme production conditions and enzymatic properties at home and abroad, and also described the related research on the use of targeted mutation, gene knockout and other genetic engineering methods to genetically modify the production strain and optimize the culture conditions to improve the yield of conjugated linoleic acid, so as to further screen the high yield. This study provides a theoretical basis for further screening of high-yielding conjugated linoleic acid strains and industrial application of conjugated linoleic acid.

Keywords conjugated linoleic acid; linoleic acid isomerase; mutagenesis; gene knockout; optimization