

10-羟基-12-十八碳烯酸的静息细胞合成

郭前婉¹, 彭舒悦¹, 王晨晨¹, 赵萌^{1*}, Michael G. Gaenzle^{1,2}

(¹ 发酵工程教育部重点实验室 湖北省工业微生物重点实验室 湖北工业大学 武汉 430068

² 阿尔伯塔大学农业、食品与营养科学系 加拿大埃德蒙顿 T6G 2P5)

摘要 10-羟基-12-十八碳烯酸(10-HOE)是一种典型的微生物源羟基不饱和脂肪酸,具有抑菌、抗炎、抗过敏等功效,在食品、药品、化工等行业具有很好的应用前景,因此,10-HOE的生物合成十分重要。本文以亚油酸为底物,以含10-亚油酸水合酶的重组大肠杆菌为催化剂,采用静息细胞法生物合成10-HOE,通过优化黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)浓度、溶剂种类及含量、甘油含量、氯化钠浓度、转化温度、溶液pH值、菌浓度、底物浓度和培养时间等9个单因素转化实验,来提高10-HOE的转化率。细胞转化生物合成的优化条件为:FAD浓度0.25 mmol/L,添加2%的正己烷,氯化钠浓度15 mmol/L,亚油酸底物质量浓度20 g/L,菌质量浓度200 g/L,溶液pH7.0,在37℃、200 r/min的摇床中培养24 h,获得的10-HOE转化率为(73.1±0.9)%,转化质量浓度为(16.3±0.2) g/L。该转化是目前为止10-HOE生物合成报道的最高转化浓度。本研究为大规模制备10-HOE提供了工艺路线,为工业化生产10-HOE提供参考。

关键词 10-羟基-12-十八碳烯酸(10-HOE); 生物合成; 静息细胞; 试验优化; 单因素实验

文章编号 1009-7848(2022)12-0144-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.015

10-HOE是一种典型的微生物源羟基不饱和脂肪酸,主要通过亚油酸水合酶催化亚油酸,对其顺9位双键进行羟基化而合成^[1-2]。据文献报道,10-HOE具有良好的真菌抑制效果^[3-5],添加在发酵面包中其抑菌效果堪比商业防腐剂^[6-7];对大脑炎症有潜在的调节和控制作用^[8-10];通过小鼠实验发现10-HOE还可有效预防过敏性皮炎^[11]。10-HOE在食品、生物医药等领域应用潜力巨大,其高效制备具有重要意义^[1,12]。

10-HOE是微生物合成共轭亚油酸的中间产物,主要是由含有10-亚油酸水合酶的野生菌或重组菌等进行生物合成^[13-14],因而可通过静息细胞法进行生物合成。静息细胞法生物合成的影响因素主要有pH、温度、辅酶及其浓度、底物及菌体浓度等^[15-17]。目前,有研究发现化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)^[18],短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)^[19],鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)^[20],植物乳杆菌(*L. plantarum*)^[20],嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)^[20],动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*)^[20],汉氏

乳杆菌(*L. hammesii*)^[21],罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)^[21],穗状左乳杆菌(*Levilactobacillus spicheri*)^[21]等菌具备合成10-HOE的能力。而与一般的野生菌相比,基因工程菌含有高活性、高特异性的胞内酶,可大量表达目标酶,应用到静息细胞转化中,不仅可以有效发挥酶的作用,维持酶的稳定性,而且其细胞转化效率高,产物杂质少,处理更简单^[22-23],是产业化生产10-HOE的有效途径。

目前,10-HOE生物合成研究较少^[24],尚未有重组静息细胞大量合成10-HOE的研究报道。10-HOE是近年来研究的一种新型功能性脂肪酸,为探索其各种生物活性,有必要大量生产10-HOE,而静息细胞法是10-HOE生物合成的有效途径。本文利用含有10-亚油酸水合酶的重组大肠杆菌(*E. coli*)BL21(DE3)/pET28a-ZS2058-*mcra*对底物亚油酸进行静息细胞转化合成10-HOE,通过单因素实验对转化温度、转化pH值、FAD浓度、氯化钠浓度、甘油浓度、酶浓度、底物浓度、转化时间等条件进行优化,建立可高效合成10-HOE的混合体系。

收稿日期: 2021-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972203);湖北省科技厅国际合作项目(DWHZ2017000010)

第一作者: 郭前婉,女,硕士生

通信作者: 赵萌 E-mail: 2001zhaomeng@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

甘油、乙酸、乙醇,国药集团化学试剂有限公

司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、十五烷酸, Sigma-Aldrich 公司;甲醇、正己烷、异丙醇、2-丙醇, Fisher Scientific 公司;卡那霉素, 广州赛国生物科技有限公司;FAD, 上海麦克林生化科技有限公司;亚油酸、三甲基硅重氮甲烷, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

7890A-5975C GC/MS 联用仪, 日本 Agilent 公司;TS-2102C 型恒温摇床, 常州金坛良友仪器有限公司;BOXUN 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业公司医疗设备厂;AIRTECH 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司;XW-80A 旋涡混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 重组大肠杆菌的构建、培养和诱导表达

重组大肠杆菌的构建:质粒来源于江南大学,质粒名称为 pET28a-ZS2058-mcra (GenBank: JF747255.1)^[25]。通过大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3)感受态细胞转化,最终获得可成功表达 10-亚油酸水合酶的大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a-ZS2058-mcra^[24]。

LB 液体培养基:氯化钠 10 g/L,酵母浸膏 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,pH 7.4~7.6。LB 固体培养基:在上述 LB 液体培养基中加入琼脂粉 15 g/L。

将在-80℃冷冻保藏的 2 mL 大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a-ZS2058-mcra 接种于 100 mL LB 液体培养基中,加入 50 mg/L 卡那霉素,37℃、200 r/min 培养 12 h;按 4.0%的接种量转接到新的 LB 液体培养基中,加入 50 mg/L 卡那霉素,37℃、200 r/min 培养 100 min (OD_{600nm} 0.6~0.8),加入 0.5 mmol/L IPTG (IPTG 溶液为诱导剂,诱导重组细胞对 10-亚油酸水合酶基因的表达),继续放入摇床中 18℃、120 r/min 培养 24 h。将诱导培养结束的重组细胞培养液在 4℃、6 000 r/min 离心 30 min,倒掉上清液,获得菌泥,将菌泥分装在 2 mL 离心管中,于-20℃下冷冻保藏。

1.3.2 静息细胞转化试验 在 8 mL 白盖瓶瓶内滴加 3 mg 亚油酸液体作为反应底物,沿瓶壁加入 50 mg 菌泥,再加入 1 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 6.5, 20 mmol/L),用旋涡混合器震荡至菌泥混合均匀后,分别在 30, 35, 37, 40, 45, 50℃, 200 r/min 摇

床中培养 6 h, 研究温度对 10-HOE 转化率的影响。在确定温度的基础上,研究 pH 值(pH=5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 的磷酸盐缓冲溶液)对 10-HOE 转化率的影响,其余条件不变。在确定温度、pH 值的基础上,加入(0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 mmol/L)FAD, 研究 FAD 浓度对 10-HOE 转化率的影响,其余条件不变。在确定温度、pH、FAD 浓度的基础上,分别加入不同质量分数(2%, 5%, 10%)的甲醇、乙醇、正己烷、异丙醇、乙酸乙酯,研究有机溶剂种类及浓度对 10-HOE 转化率的影响,其余条件不变。在确定温度、pH 值、FAD 浓度、有机溶剂种类及浓度的基础上,加入 0, 2%, 5%, 10%, 15%, 20% 甘油, 研究甘油质量分数对 10-HOE 转化率的影响,其余条件不变。在确定温度、pH 值、FAD 浓度、有机溶剂种类及浓度、甘油的基础上,加入 0, 15, 50, 100, 150, 200 mmol/L 氯化钠,研究氯化钠浓度对 10-HOE 转化率的影响,其余条件不变。在确定温度、pH 值、FAD 浓度、有机溶剂种类及浓度、甘油、氯化钠浓度的基础上,改变菌质量浓度(0, 20, 50, 100, 150, 200, 250 g/L),研究菌浓度对 10-HOE 转化率的影响,其余条件不变。在确定温度、pH 值、FAD 浓度、有机溶剂种类及浓度、甘油、氯化钠、菌浓度的基础上,改变亚油酸质量浓度(4, 10, 20, 30, 40, 50 g/L),研究亚油酸浓度对 10-HOE 转化率的影响,其余条件不变。在确定最优条件后,在该条件下转化 6, 12, 24, 72 h, 研究 10-HOE 转化率随时间的变化。

1.3.3 10-HOE 的提取和甲酯化处理 脂肪酸的提取:培养结束后,在转化样品中加入 2 mg 十五烷酸作内标,充分混匀,加入 1 mL 异丙醇,旋涡震荡仪充分震荡 30 s,再加入 1 mL 正己烷,充分震荡 30 s,在 4℃、6 000 g 条件下离心 30 min,吸取正己烷层氮气吹干,获得脂肪酸样品。

甲酯化:在脂肪酸样品中加入 0.2 mL 重氮甲烷,剧烈振荡后,在室温反应 30 min,加入 50 μ L 乙酸,2 mL 正己烷,2 mL 超纯水和 100 μ L 0.5 mol/L NaOH 溶液,离心取正己烷层,过 0.22 μ m 有机滤膜后装入 2 mL 气质瓶中。

1.3.4 气-质谱检测 10-HOE 含量 气-质谱检测:安捷伦 7890A-5975C。柱型:Agilent 19091S-433, 0.25 μ m \times 250 μ m \times 30 m。初始 150℃, 保持 2

min,以5℃/min升温至200℃,保持10min,再以4℃/min升温至240℃,保持10min,分流比10:1,溶剂延迟3min,进样器和检测器温度均为240℃,载气为高纯氦气。

内标法定量:称取10mg十五烷酸标样(内标物)、10mg亚油酸标样、10mg 10-HOE,加入1mL磷酸盐缓冲溶液(20mmol/L,pH 6.5),用上述脂肪酸提取,甲酯化的方法处理,然后进行气-质谱检测。

1.4 转化率和相对转化率的计算

响应因子 f 的计算:

$$f = \frac{\frac{A_s}{m_s}}{\frac{A_r}{m_r}} \quad (1)$$

式中, A_s ——内标物十五烷酸的峰面积($mV \times min$); m_s ——内标物的质量(mg); A_r ——对照物的峰面积($mV \times min$); m_r ——对照物的质量(mg)。

根据含内标物待测物的色谱峰响应值,计算其含量 $m_i(mg)$:

$$m_i = f \times \frac{A_i}{\frac{A_s}{m_s}} \quad (2)$$

式中, f ——校正因子; A_i ——待测物质的峰面

积($mV \times min$); A_s ——内标物十五烷酸的峰面积($mV \times min$); m_s ——加入内标物的质量(mg)。

10-HOE转化率 α_i 的计算:

$$\alpha_i = (m_i / m_0) \times 100 \quad (3)$$

式中, m_i ——试样 i 中10-HOE的甲酯衍生物的质量(mg); m_0 ——试样 i 中所含的亚油酸质量(mg)。

相对转化率 α_{ri} 的计算:

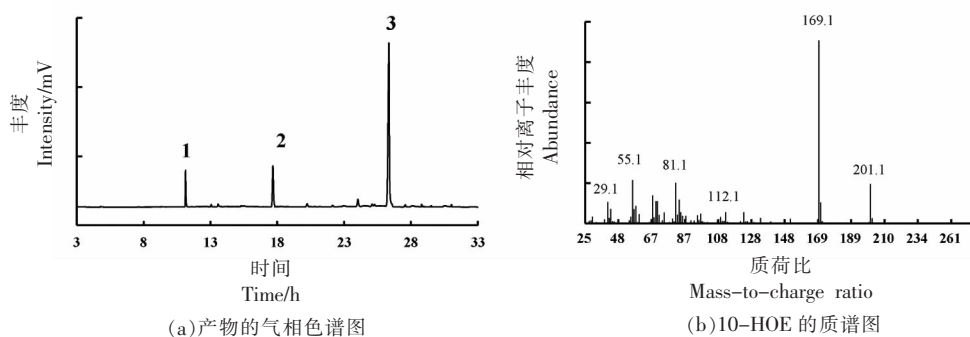
$$\alpha_{ri} = (\alpha_i / \alpha_1) \times 100 \quad (4)$$

式中, α_1 ——每组试验中第1个试样(对照组)中亚油酸的转化率(%)。

2 结果与分析

2.1 10-HOE的气-质谱鉴定结果

静息细胞转化产物的气-质谱测定结果如图1a所示。通过谱库匹配,除内标十五烷酸及底物亚油酸外,有新物质的生成,新物质的质谱图如图1b所示。其特征碎片169 m/z 及201 m/z 同文献[24],[26]中报道的10-HOE质谱图结果相同,与理论碎片值一致。因而,可以确定该新物质为10-HOE。在图1a中,10-HOE的色谱峰很高,说明大肠杆菌重组细胞对亚油酸有很好的转化能力,可高效合成10-HOE。



注: 1. 内标十五烷酸($t=11.142$ min); 2. 底物亚油酸($t=17.676$ min); 3. 产物10-HOE($t=26.348$ min)。

图1 重组大肠杆菌生物合成产物的鉴定

Fig.1 Identification of the biosynthesis products of the recombinant *E. coli*

2.2 转化温度对转化率的影响

图2显示不同温度下静息细胞转化合成10-HOE的相对转化率。以30℃时转化率为100%,当转化温度37℃时,转化率最高,其转化率是30℃的1.5倍。35,37,40℃下的转化率无明显差异。

当温度大于45℃时,转化率急剧下降,仅为最高转化率的10%左右。最适温度的选择对静息细胞转化至关重要,含有13-亚油酸水合酶的重组菌在40℃时转化率最高^[27],而对于含有油酸水合酶的重组菌则在30℃时达到最高转化率^[28]。温度对

生物合成具有重要意义,可以通过影响细胞的生长代谢而影响产物合成^[15],也可直接影响产物的转化合成。最终选择 37 °C 进行后续静息细胞转化实验。

2.3 pH 值对转化率的影响

静息细胞合成 10-HOE 的转化率随 pH 值变化如图 3 所示。随着 pH 值偏向中性,转化率逐渐升高,当 pH 6.5, 7.0 时,转化率达到最大值。pH 值继续增加,转化率明显降低,这有可能是由于 10-亚油酸水合酶的活性受到抑制,使转化率降低。不同 pH 值条件下酶的活性会有所差异,pH 值直接影响重组菌的生长及酶的催化活性、稳定性。当 pH 7.0 时,静息细胞转化仍保持高活性,这是由于重组菌的最适生长 pH 范围为 7.4~7.6。与本试验结果相似的:含有油酸水合酶的重组菌转化油酸合成 10-羟基硬脂酸的最适 pH 值为 7.5^[29],接近大肠杆菌的最适生长 pH 值。最终静息细胞转化的最适 pH 值为 7.0。

2.4 优化的辅酶因子 FAD 浓度

如图 4 所示,随着 FAD 浓度的增加,菌体对亚油酸的转化率增加,当 FAD 浓度达 0.25 mmol/L 后转化率趋于稳定,相比于未添加 FAD 时转化率增加了 5 倍。这是因为 10-亚油酸水合酶具有辅酶因子依赖性,在静息细胞转化过程中,添加辅酶因子 FAD 有利于 10-HOE 的合成。来源于溶酪大球菌(*Macrococcus caseolyticus*)的油酸水合酶具有更明显的 FAD 依赖性,当转化体系不含 FAD 时,含油酸水合酶的重组菌不具有催化活性,随着 FAD 浓度的增加,其催化活性增加,当 FAD 浓度在 0.2 mmol/L 以上时含油酸水合酶的重组菌催化活性达到稳定^[30]。辅酶因子可与酶结合,刺激酶的活性,促进酶对产物的催化合成,参与电子、基因等的传递,合适的辅酶因子浓度可以增加细胞的转化效率^[17]。最终最适 FAD 浓度为 0.25 mmol/L。

2.5 优化的有机溶剂及其浓度

图 5 显示不同有机试剂对菌体转化的影响。在 2% 添加量的情况下,添加甲醇、乙醇对转化有抑制作用,而添加乙酸乙酯、异丙醇及正己烷有利于菌体转化,且正己烷效果最好,其转化率约为未添加有机试剂的 3.8 倍。然而,有机试剂浓度增加到一定值后,菌体的转化率明显降低。对于静息细

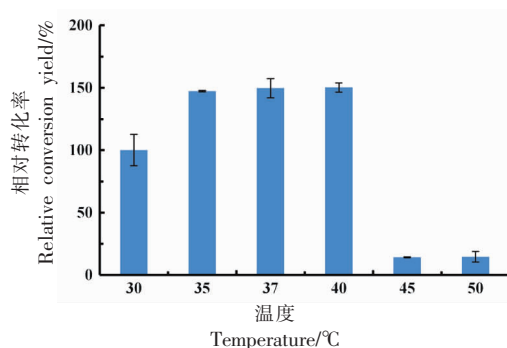


图 2 转化温度对相对转化率的影响

Fig.2 The effect of temperature on the conversion yield

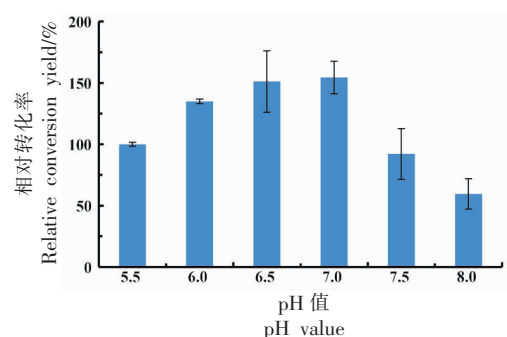


图 3 pH 值对相对转化率的影响

Fig.3 The effect of pH on the conversion yield

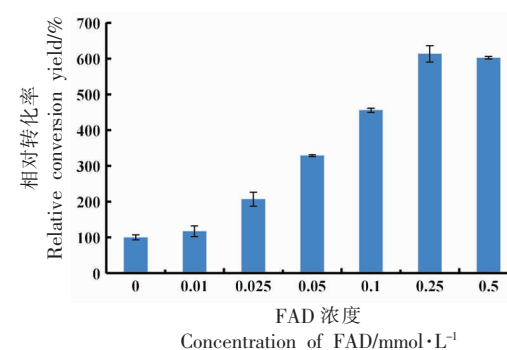
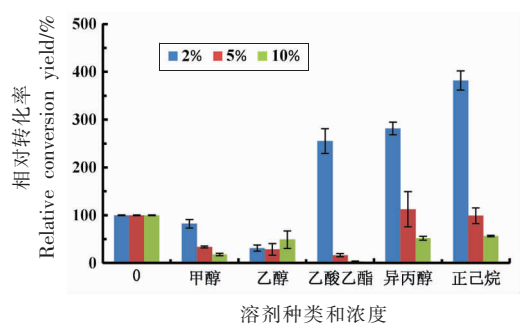


图 4 FAD 浓度对相对转化率的影响

Fig.4 The effect of the FAD concentration on the conversion yield

胞转化而言,有机溶剂不仅作为助溶剂提高底物的溶解度,还对细胞进行透性化处理来促进细胞转化^[27]。细胞透性化处理主要是在改变细胞膜通透性的同时,不破坏细胞整体有机体系,使得一些小分子和较大分子物质能够自由进出细胞,使胞内酶在相对稳定的细胞环境中充分发挥作用,提高菌体的催化效率^[31]。与赵伟睿等^[32]的研究结果相同,正己烷具有低介电系数,且疏水性较高,对酶



The type and concentration of solvent

图5 有机试剂对转化率的影响

Fig.5 The effect of organic reagent on the conversion yield

分子的稳定性影响较小,有助于提高酶的催化活性,从而提高了转化率。最终选择2%的正己烷添加到菌体转化体系。

2.6 优化的甘油浓度

据报道,有机溶剂存在时,甘油对生物细胞具有一定的保护作用,还可为生物细胞提供一定的热稳定性^[33-34]。甘油浓度对转化率的影响如图6所示。随着甘油含量的增加,转化率均略有降低,未有明显的抑制作用。甘油的作用是在冷冻过程中保护菌体,不一定有利于菌体的转化。转化率降低可能是由于甘油增加了转化体系的黏度,阻碍了振荡过程中菌体与底物的结合。另一个原因可能是甘油浓度升高造成高渗透压环境,抑制细胞内10-亚油酸水合酶的活性,从而降低菌体合成10-HOE的转化率。选择不添加甘油做后续试验。

2.7 优化的氯化钠浓度

不同浓度的氯化钠对静息细胞转化合成10-HOE转化率的影响如图7所示。当氯化钠浓度为15 mmol/L时,能够增加转化率,当其浓度过高时,转化率无明显变化。Gandhi等^[35]研究发现当氯化钠质量分数超过临界值2.5%时,会抑制大肠杆菌的生长,从而会影响其催化活性。添加适量的氯化钠可以维持细胞内、外渗透压,渗透压过高或过低均不利于菌的存活及内、外物质交换^[36]。在后续试验中选择氯化钠最适浓度15 mmol/L。

2.8 优化的菌浓度

菌浓度对静息细胞转化合成10-HOE转化率的影响如图8所示。转化率随菌浓度的增加而增加,当菌质量浓度达200 g/L后,转化率无明显变

化。这是由于参与细胞转化的菌浓度越高,含有10-亚油酸水合酶越多,合成10-HOE的能力越强,而当菌浓度与底物达到饱和状态时,转化率不再明显上升。这与13-LHT全细胞催化亚油酸合成13-HOE的结果相似,13-HOE浓度随细胞浓度的增加而增加,当细胞质量浓度在25 g/L以上时趋于稳定,转化率约为70.0%^[27]。选择菌质量浓

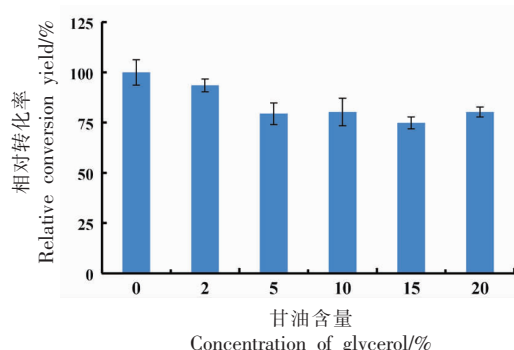


图6 甘油浓度对相对转化率的影响

Fig.6 The effect of the glycerol concentration on the conversion yield

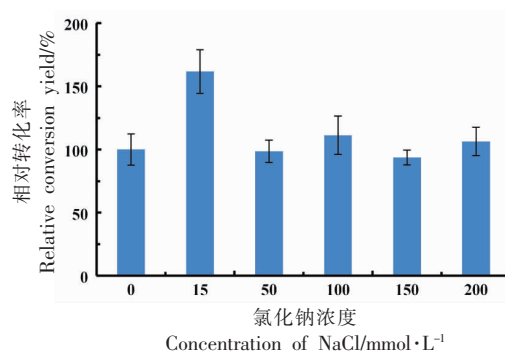


图7 氯化钠浓度对相对转化率的影响

Fig.7 The effect of the NaCl concentration on the conversion yield

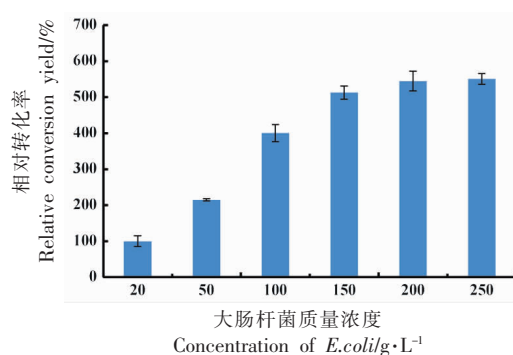


图8 菌浓度对转化率的影响

Fig.8 The effect of the *E. coli* concentration on the conversion yield

度为 200 g/L 进行后续试验。

2.9 优化底物浓度

细胞转化结果如图 9 所示。随着亚油酸浓度的增加,10-HOE 的转化率呈先增大后减小的趋势。当亚油酸质量浓度为 10 g/L 时,10-HOE 转化率为 $(68.3 \pm 3.9)\%$; 当亚油酸浓度增加至 20 g/L 时,转化率迅速降低,说明此时亚油酸达到饱和。与 13-LHT 细胞转化亚油酸的结果类似,产物 13-HOE 的浓度随底物亚油酸浓度的增加而增加,当亚油酸质量浓度为 250 g/L 时达到饱和,13-HOE 转化率随亚油酸浓度的增加而慢速减小^[27]。据报道,底物和产物浓度对全细胞催化合成脂肪酸有很大的影响,胞内、外的浓度过高,对合成有一定的抑制作用^[17]。以 10 g/L 的亚油酸为底物时转化率最高,而以 20 g/L 的亚油酸为底物时,其转化率仍有 $(50.7 \pm 1.6)\%$ 。为了提高生产效率,选择 20 g/L 亚油酸为底物进行后续实验。

2.10 转化进程曲线

混合体系静息细胞合成 10-HOE 的转化率随时间的变化如图 10 所示。以 20 g/L 亚油酸为底物,加入的细胞质量浓度为 200 g/L,随着转化时间的增加,转化率增加,而转化速率先增大后减小。催化反应 12 h 内转化率增长最快,转化 12 h 时,转化率达 $(62.2 \pm 1.7)\%$,此后转化速率增加速度明显减小;24 h 时转化率为 $(73.1 \pm 0.9)\%$,10-HOE 质量浓度为 $(16.3 \pm 0.2)\text{g/L}$;转化 72 h 时,转化率达 $(81.5 \pm 1.3)\%$ 。Kishimoto 等^[27]利用野生菌副干酪乳杆菌副干酪亚种 (*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 1111),以 2 g/L 亚油酸为底物,在 pH 6.5、30 °C 条件下转化 148 h,10-HOE 的合成转化率达 91%,是目前生物合成 10-HOE 产量最高的报道。本研究利用重组大肠杆菌以 20 g/L 的底物质量浓度在 24 h 内合成率达 73.1%,极大地提升了 10-HOE 的生物合成效率。

3 结论

通过气相色谱-质谱联用仪对混合体系静息细胞合成 10-HOE 的条件进行优化。经单因素优化,得到混合体系静息细胞合成 10-HOE 的最佳条件为:20 g/L 亚油酸、pH 7.0 的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液、200 g/L 菌泥、0.25 mmol/L FAD、2%

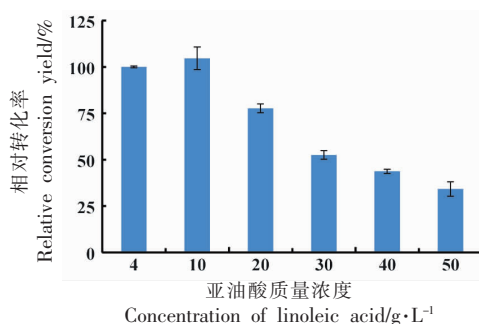


图 9 亚油酸质量浓度对转化率的影响

Fig.9 The effect of linoleic acid concentration on the conversion yield

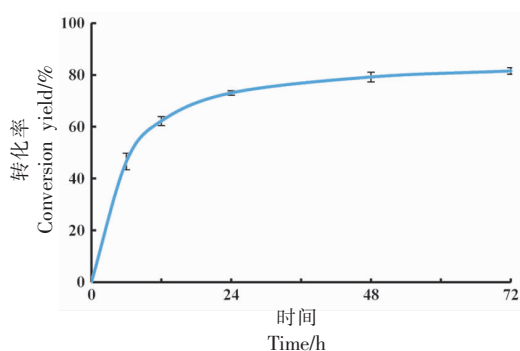


图 10 最优条件下大肠杆菌静息细胞法合成 10-HOE 的时间曲线

Fig.10 Time-course reaction of 10-HOE biosynthesis using *E. coli* resting cell system under optimal conditions

正己烷、15 mmol/L 氯化钠,恒温摇床 37 °C、200 r/min 转化 24 h,最优转化率为 $(73.1 \pm 0.9)\%$ 。与初始条件相比,优化的静息细胞合成 10-HOE 的转化率得到很大提升。本文基于混合体系的重组菌静息细胞转化法合成 10-HOE,方法操作简单,生产效率高,10-HOE 的纯度高,为静息细胞合成 10-HOE 的工业生产提供技术参考。

参 考 文 献

- [1] VANGAVETHI V, SHASHIDHAR V, COLLIER F, et al. 9- and 13-HODE regulate fatty acid binding protein-4 in human macrophages, but does not involve HODE/GPR132 axis in PPAR- γ regulation of FABP4[J]. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 2018, 9(5): 137-150.
- [2] CHOI J H, SEO M J, LEE K T, et al. Biotransformation of fatty acid-rich tree oil hydrolysates to

- hydroxy fatty acid-rich hydrolysates by hydroxylases and their feasibility as biosurfactants[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2017, 22(6): 709–716.
- [3] BLACK B A, SUN C, ZHAO Y Y, et al. Antifungal lipids produced by lactobacilli and their structural identification by normal phase LC/atmospheric pressure photoionization-MS/MS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(22): 5338–5346.
- [4] PABIŚ S, KULA J. Synthesis and bioactivity of (R)-ricinoleic acid derivatives: A Review[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2016, 23(35): 4037–4056.
- [5] QUATTRINI M, LIANG N, FORTINA M G, et al. Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 302: 8–14.
- [6] BLACK B A, ZANNINI E, CURTIS J M, et al. Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(6): 1866–1873.
- [7] 晏石娟, 黄文洁, 刘春明. 脂肪酸及其氧化物对曲霉属真菌菌丝生长、产孢和黄曲霉毒素合成的影响[J]. *微生物学报*, 2017, 57(1): 24–32.
- YAN S J, HUANG W J, LIU C M. Effects of fatty acids and oxylipins on fungal growth, sporulation and aflatoxin production in *Aspergillus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(1): 24–32.
- [8] BERGAMO P, LUONGO D, MIYAMOTO J, et al. Immunomodulatory activity of a gut microbial metabolite of dietary linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, associated with improved antioxidant/detoxifying defences[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 11(1): 192–202.
- [9] IKEGUCHI S, IZUMI Y, KITAMURA N, et al. Inhibitory effect of the gut microbial linoleic acid metabolites, 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid and 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, on BV-2 microglial cell activation[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2018, 138(1): 9–15.
- [10] IKEGUCHI S, IZUMI Y, KITAMURA N, et al. Inhibitory effect of the gut microbial linoleic acid metabolites, 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid and 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, on BV-2 microglial cell activation[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 138(1): 9–15.
- [11] KAIKIRI H, MIYAMOTO J, KAWAKAMI T, et al. Supplemental feeding of a gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, alleviates spontaneous atopic dermatitis and modulates intestinal microbiota in NC/nga mice[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2017, 68(8): 945–951.
- [12] 彭舒悦, 梁暖意, 张延镇, 等. 亚油酸水合酶生物合成微生物源羟基不饱和脂肪酸的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(22): 8.
- PENG S Y, LIANG N Y, ZHANG Y Z. Research progress in biosynthesis of microbial hydroxyl unsaturated fatty acids by linoleic acid hydratase [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(22): 8.
- [13] GAO H, YANG B, STANTON C, et al. Characteristics of bifidobacterial conjugated fatty acid and hydroxy fatty acid production and its potential application in fermented milk[J]. *LWT*, 2020, 120(7): 108940.
- [14] GAO H, YANG B, STANTON C, et al. Role of 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid in transforming linoleic acid into conjugated linoleic acid by bifidobacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(17): 7151–7160.
- [15] SIRIPHONGPHAWE A, PISNUPONG P, WONG-KONGKATEP J, et al. Development of a whole-cell biocatalyst co-expressing P450 monooxygenase and glucose dehydrogenase for synthesis of epoxyhexane [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2012, 95(2): 357–367.
- [16] CHEN R R. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(4): 730–738.
- [17] YING H, WANG J, WANG Z, et al. Enhanced conversion of *L*-lysine to *L*-pipercolic acid using a recombinant *Escherichia coli* containing lysine cyclodeaminase as whole-cell biocatalyst [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 117: 75–80.
- [18] VOLKOV A, LIAVONCHANKA A, KAMNEVA O,

- et al. Myosin cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* M49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(14): 10353-10361.
- [19] ROSBERG-CODY E, LIIVONCHANKA A, GÖBEL C, et al. Myosin-cross-reactive antigen (MCRA) protein from *Bifidobacterium breve* is a FAD-dependent fatty acid hydratase which has a function in stress protection[J]. *BMC Biochemistry*, 2011, 12(9): 9.
- [20] YANG B, CHEN H, SONG Y, et al. Myosin-cross-reactive antigens from four different lactic acid bacteria are fatty acid hydratases[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(1): 75-81.
- [21] CHEN Y Y, LIANG N Y, CURTIS J M, et al. Characterization of linoleate 10-Hydratase of *Lactobacillus plantarum* and novel antifungal metabolites[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7(9):1561.
- [22] LIN T Y, HUNG T H, CHENG T S J. Conjugated linoleic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Food Chemistry*, 2005, 92(1): 23-28.
- [23] ISHIGE T, HONDA K, SHIMIZU S. Whole organism biocatalysis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(2): 174-180.
- [24] 杨波. 乳酸菌生物转化共轭亚油酸的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- YANG B. Study of conjugated linoleic acid bioconversion in lactic acid bacteria.[D]. Wu xi: Jiangnan University, 2014.
- [25] KIM K-R, OH H J, PARK C S, et al. Unveiling of novel regio-selective fatty acid double bond hydratases from *Lactobacillus acidophilus* involved in the selective oxyfunctionalization of mono- and di-hydroxy fatty acids[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(11): 2206-2213.
- [26] ORTEGA-ANAYA J, HERNANDEZ-SANTOYO A. Functional characterization of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus plantarum* and its interaction with biosynthetic membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1848(12): 3166-3174.
- [27] PARK J Y, LEE S H, KIM K R, et al. Production of 13S-hydroxy-9 (Z)-octadecenoic acid from linoleic acid by whole recombinant cells expressing linoleate 13-hydratase from *Lactobacillus acidophilus* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 208: 1-10.
- [28] JEON E Y, LEE J H, YANG K, et al. Bioprocess engineering to produce 10-hydroxystearic acid from oleic acid by recombinant *Escherichia coli* expressing the oleate hydratase gene of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(6): 941-947.
- [29] LIU Y, HAMA H, FUJITA Y, et al. Production of S-lactoylglutathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with alcohols[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2015, 64(1): 54-60.
- [30] JOO Y C, JEONG K W, YEOM S J, et al. Biochemical characterization and FAD-binding analysis of oleate hydratase from *Macrococcus caseolyticus* [J]. *Biochimie*, 2012, 94(3): 907-915.
- [31] 周帅, 王凤山. 细胞透性化技术及其应用[J]. *生命的化学*, 2008, 4(28): 481-484.
- ZHOU S, WANG F S. Cell permeabilization and its application[J]. *CHEMISTRY of Life*, 2008, 4(28): 481-484.
- [32] 赵伟睿, 柯丕余, 胡升, 等. 有机溶剂透性化处理谷氨酸脱羧酶工程菌制备 γ -氨基丁酸的研究[J]. *高校化学工程学报*, 2015, 1(29): 138-144.
- ZHAO W R, KE P Y, HU S, et al. Biosynthesis of γ -aminobutyric acid using organic solvent-permeabilized and glutamate decarboxylase expressing recombinant *Escherichia coli* cells[J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2015, 1(29): 138-144.
- [33] 孙佳, 王普, 章鹏鹏, 等. 甘油在微生物代谢合成及生物催化中的应用[J]. *化学进展*, 2016, 28(9): 1426-1434.
- SUN J, WANG P, ZHANG P P, et al. Application of glycerol in microbial biosynthesis and biocatalysis [J]. *Progress in Chemistry*, 2016, 28(9): 1426-1434.
- [34] BHAGANNA P, BIELECKA A, MOLINARI G, et al. Protective role of glycerol against benzene stress: insights from the *Pseudomonas putida* proteome [J]. *Current Genetics*, 2016, 62(2): 419-429.
- [35] GANDHI A, CUI Y, ZHOU M, et al. Effect of KCl substitution on bacterial viability of *Escherichia coli* (ATCC 25922) and selected probiotics[J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(10): 5939-5951.

- [36] JIANG W, SUN D, REN H, et al. Isolation, purification and characterization of a salt-active and organic-solvent-thermostable phenylalanine dehydrogenase from *Bacillus nanhaiensis* DSF-15A2 [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 133: 12-19.
- [37] KISHIMOTO N, YAMAMOTO I, TORAISHI K, et al. Two distinct pathways for the formation of hydroxy FA from linoleic acid by lactic acid bacteria [J]. Lipids, 2003, 38(12): 1269-1274.

Resting Cell Biosynthesis of 10-Hydroxy-12-Octadecenoic Acid

Guo Qianwan¹, Peng Shuyue¹, Wang Chenchen¹, Zhao Meng^{1*}, Michael G. Gaenzle^{1,2}

¹Key Laboratory of Fermentation Engineering Ministry of Education, Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068

²Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, T6G 2P5, Canada

Abstract 10-Hydroxy-12-octadecenoic acid (10-HOE), one microbial hydroxy unsaturated fatty acid, was recently reported to have the bioactivities of the anti-fungi, anti-inflammatory, and anti-allergic effects. It has the potential to be used in food, pharmaceutical, chemical, and other industries. Thus, the biosynthesis of 10-HOE is worthy of investigation. In this work, 10-HOE was biosynthesized using the resting cell system with linoleic acid as the substrate and the recombinant *Escherichia coli* as the catalyst. After the single-factor experiment, the optimum conditions for the 10-HOE biosynthesis using resting cells were obtained, eg. 0.25 mmol/L flavin adenine dinucleotide (FAD), 2% hexane, 15 mmol/L sodium chloride, 20 g/L linoleic acid, and 200 g/L cells at pH 7.0. The mixture was incubated at 37 °C and 200 r/min after a thorough mixing with a vortex mixer, and a conversion yield of (73.1±0.9)% with the 10-HOE concentration of (16.3±0.2) g/L was achieved at 24 h. Within our knowledge, this is the highest concentration for the 10-HOE biosynthesis. This work provided one method of the 10-HOE biosynthesis, which might be helpful for the industrial production.

Keywords 10-hydroxy-12-octadecenoic acid (10-HOE); biosynthesis; resting cell; experimental optimization; single-factor experiment