

# 响应面法优化重组亚油酸异构酶产酶条件

张斯璇, 刘瑛, 时旭, 史海粟, 杜阿楠, 武俊瑞, 岳喜庆, 乌日娜, 洛雪

(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866)

**摘要:** 共轭亚油酸 (CLA) 广泛存在于多种食物中, 具有减肥、抗癌、抗动脉粥样硬化和抗糖尿病等诸多生理活性。为了获得活性 CLA 高产, 本文将突变的亚油酸异构酶克隆到大肠杆菌中表达, 单因素试验确定最优产酶条件为发酵时间 18 h、IPTG 诱导浓度 0.2 mmol/L、20% 装液、培养基初始 pH7、诱导前菌体生物量  $OD_{600}=0.4$ 、LA 浓度 0.5 mg/mL、离子浓度 0.02%; 在此基础上采用响应曲面法优化重组大肠杆菌培养条件提高生产亚油酸异构酶的能力, 根据响应面法实验结果分析显示, 发酵时间、诱导前生物量和 LA 浓度对重组亚油酸异构酶的表达有显著影响且均为正效应。三个影响因素最佳组合为发酵时间 19.5 h、诱导前生物量  $OD_{600}=0.47$  和 LA 浓度 0.57 mg/mL, 此时预测亚油酸异构酶催化 LA 转化为 CLA 最大量为 143.33  $\mu\text{g/mL}$ 。验证显示, 发酵 CLA 的产量为  $141.75\pm 0.14$   $\mu\text{g/mL}$ , 与预测产量相符; 通过优化设计, 提高了 107.5%。

**关键词:** 共轭亚油酸; 亚油酸异构酶; 响应面法; 生物转化

文章编号: 1673-9078(2019)08-174-179

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.026

## Optimization of Linoleic Acid Isomerase Producing Conditions from Recombinant *E.coli* by Response Surface Method

ZHANG Si-xuan, LIU Ying, SHI Xu, SHI Hai-su, DU A-nan, WU Jun-rui, YUE Xi-qing, WU Ri-na, LUO Xue

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** Conjugated linoleic acid (CLA) is widely found in a variety of foods. In order to obtain high yield of active CLA, the mutant linoleic acid isomerase was cloned and expressed in *Escherichia coli* in this work. The single factor test determined that the optimal conditions for enzyme production were as follows: fermentation time 18 h, IPTG induced concentration 0.2 mmol/L, 20% liquid loading, initial pH7 of the medium, pre-induction bacterial biomass  $OD_{600}=0.4$ , LA concentration 0.5 mg/mL, and ion concentration 0.02%. The response surface method was used to optimize the culture conditions of recombinant *Escherichia coli* to improve the capacity of producing linoleic acid isomerase. According to the response surface method analysis results, the fermentation time, pre-induction biomass and LA concentration had significant effects on the expression of recombinant linoleic acid isomerase, and all of them were positive effects. The optimal combination of the three influencing factors was as follows: 19.5 h fermentation time, pre-induction biomass  $OD_{600}=0.47$ , and LA concentration 0.57 mg/mL. Under this condition, the maximum amount of LA to CLA catalyzed by linoleic acid isomerase was predicted to be 143.33  $\mu\text{g/mL}$ . The results showed that the yield of CLA was  $141.75\pm 0.14$   $\mu\text{g/mL}$ , which increased by 107.5%.

**Key words:** conjugated linoleic acid; linoleic acid isomerase; corresponding surface method; biotransformation

共轭亚油酸 (Conjugated Linoleic Acid, CLA) 是亚油酸 (Linoleic Acid, LA) 衍生的一类具有多种生理功能的十八碳二烯酸总称, 包含 4 种位置异构体 (8,10-、9,11-、10,12-和 11,13-位) 和 2 种几何异构体 (顺式、反式)。CLA 种类丰富, 但生物活性研究集中在 t10, c12-CLA 具有抑制脂肪细胞分化<sup>[1,2]</sup>、诱发脂肪细胞凋亡 c12-CLA 和 c9, t11-CLA。其中 t10, <sup>[3]</sup>、增强脂类分解速度<sup>[4,5]</sup>, 加快能量消耗<sup>[6]</sup>, 减少脂

收稿日期: 2019-04-03

基金项目: 国家自然科学基金-青年基金项目 (31701623; 31601493)

作者简介: 张斯璇(1999-), 女, 在读本科生, 研究方向: 乳制品

通讯作者: 洛雪(1984-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 乳品和食品微生物

肪积累的生理功能<sup>[7,8]</sup>; CLA 能抑制肿瘤生成, 有报道称 CLA 混合物可抑制小鼠前胃癌, 后发现高浓度的 c9, t11-CLA 抑制肿瘤效果更好<sup>[9]</sup>, Kim、Kuniyasu 和 Roberta 发现 CLA 能通过诱导癌细胞分化、调控粘膜细胞信号传导, 降低发生腹腔内癌转移点来抑制发生鼠结肠癌, CLA 还有抑制乳腺癌、前列腺癌细胞增生的作用<sup>[10-12]</sup>和促乳腺癌凋亡的作用<sup>[13]</sup>; CLA 还能降低大鼠发生动脉粥样硬化的概率, Mitchell 和 Langille 等发现, 当将大鼠饮食诱导成高胆固醇血症时, t10, c12-CLA 具有降低总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白胆固醇的作用, 减少体内脂肪含量增加肌肉含量, 而 c9, t11-CLA 没有类似作用<sup>[14]</sup>; CLA 还有抗人体免

疫力下降的功能<sup>[15]</sup>。

目前,生产CLA主要通过化学合成法,该法产率高、操作简单,但得到的CLA为混合物,且会产生有毒物质,分离组分成本高昂。生物合成法可合成单一CLA,如某些乳酸菌和丙酸菌可将LA转化生成c9,t11-CLA或t10,c12-CLA<sup>[16-18]</sup>; Yu Zhang等<sup>[19]</sup>人用固定化痤疮丙酸杆菌亚油酸异构酶(PAI)和米根霉脂肪酶(ROL)协同将植物油转化为特定CLA, Joana Ortega-Anaya等<sup>[20]</sup>人研究了植物乳杆菌生产CLA的方法,王庆山<sup>[21]</sup>用从东北酸菜汁中分离的乳杆菌生产CLA,优化了发酵条件。范相振<sup>[22]</sup>将三种不同乳酸菌的亚油酸异构酶酶学性质进行比较后发现,即使分子量相近,酶学性质差异依旧较大。虽然生物法合成的CLA组成单一,反应条件相对温和,得到的产物与食物中CLA类似,但仍存在产率较低的缺点,不同微生物合成CLA能力有差异,不同菌株生产CLA的动力学也不同<sup>[23,24]</sup>,催化机制不清晰<sup>[25]</sup>,因此科研人员希望优化亚油酸异构酶产酶条件,实现高产共轭亚油酸。

本文在单因素研究基础上利用响应面法优化重组大肠杆菌培养条件,提高生产亚油酸异构酶的能力,分析发酵时间、诱导前生物量和LA浓度对重组亚油酸异构酶的表达影响,预测亚油酸异构酶催化LA转化为CLA的最大量。旨在为纯化CLA应用于功能型发酵乳制品提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

IPTG(异丙基硫代半乳糖苷)、X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D半乳糖苷)、Amp(氨苄青霉素),购自北京索莱宝有限公司;Tryptone(胰蛋白胨)、Yeast Extract Powder(酵母提取物),购自OXOID公司;亚油酸、共轭亚油酸标准品购自美国Sigma公司等。

生化培养箱,上海一恒科技有限公司;立式恒温振荡培养箱,哈尔滨市东联电子有限公司;3-30K冷冻离心机,美国Sigma公司;超声波破碎仪,美国Sonic公司;超纯水仪,美国Millipore公司等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌种与质粒

大肠杆菌Rosetta(DE3-pCold-lai)(*Escherichia coli*),实验室保藏。

pCold-lai质粒,本实验室自行构建。

#### 1.2.2 亚油酸异构酶液的制备

重组菌培养24h后,取发酵液,4℃,10000 r/min离心10 min获得菌体,PBS重悬冲洗两次,将菌体转移至预冷的研钵中,加入液氮迅速研磨成粉末,加入PBS充分溶解菌体,冰浴下超声破碎菌体细胞,破碎后的菌液4℃,13000 r/min离心30 min,移取上清液,即为亚油酸异构酶粗酶液。

#### 1.2.3 紫外法测定CLA含量

参照Barrett等<sup>[18]</sup>描述的方法对重组菌中总CLA含量进行检测。取粗酶液2 mL加入一定浓度底物(LA),37℃震荡培养4 h,培养结束后加入8 mL氯仿和4 mL甲醇,剧烈震荡1 min,离心后转移上层有机相,使用氮吹仪吹干有机溶剂,加入正己烷溶解残余脂类物质,加入硫酸钠干燥,转移溶液至石英比色皿,用紫外法测定溶液吸光度,根据结果计算CLA含量。

采用Bradford法测定蛋白质质量浓度。

#### 1.2.4 Plackett-Burman (P-B) 实验设计

根据前期单因素优化试验结果,采用软件设计7因素2水平P-B实验<sup>[26]</sup>,比较7个单因素中对重组菌产酶具有显著性影响的因素。

#### 1.2.5 最陡爬坡实验设计

P-B试验结果显示,需要进行最陡爬坡实验,以P-B试验筛选出影响重组菌产酶的显著因素的零水平为实验起点,选择合适步长进行最陡爬坡试验<sup>[27]</sup>,寻找适合于中心组合试验的中心点。

#### 1.2.6 中心组合实验设计

根据前期实验结果筛选出显著因子和中心组合实验中心点,设计中心组合实验优化重组菌产酶条件。用Design-Expert软件进行回归分析<sup>[28]</sup>,探究重组菌株的最佳产酶条件。

#### 1.2.7 模型的验证

根据中心组合实验结果提示的最优条件进行发酵,验证模型预测的准确性<sup>[29,30]</sup>,共进行3组重复实验,测定重组菌CLA的产量,确定最终的优化结果。

#### 1.2.8 数据统计分析

采用SPSS 13.0软件对实验数据进行统计学分析。采用独立样本T检验分析比较2组数据,采用单因素方差分析法分析比较3组或3组以上数据,显著性水平平均设定为 $p < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 P-B 设计

通过单因素实验分析确定,重组菌发酵18 h、IPTG浓度0.2 mmol/L进行诱导、20%装液、培养基初始pH 7、诱导前菌体生物量 $OD_{600} = 0.4$ 、LA浓度0.5 mg/mL、

离子浓度0.02%时产酶活最高。根据这一结果设计P-B实验。对11个因素（包括4个虚拟变量）利用摇瓶发酵

进行综合考察。各因素所代表的参数和水平见表1，实验设计及响应值见表2。

表1 P-B设计水平

Table 1 Levels of the variables for P-B design

变量	因子符号	水平		贡献度/%	影响率	P值	Prob>F
		低水平(-1)	高水平(+1)				
诱导时间/h	X <sub>1</sub>	15	21	7.03	12.94	0.0399	
IPTG/(mmol/L)	X <sub>2</sub>	0.1	0.3	0.19	2.13		
诱导前生物量/(OD <sub>600</sub> )	X <sub>3</sub>	0.2	0.6	11.72	16.70	0.0245	
LA 浓度/(mg/mL)	X <sub>4</sub>	0.3	0.7	70.44	40.95	0.0042	
初始 pH	X <sub>5</sub>	6	8	0.41	-3.11		
金属离子/(%, V/V)	X <sub>6</sub>	0.01	0.03	1.59	-6.15	0.1474	
装液量/mL	X <sub>7</sub>	25	75	2.89	-8.29	0.0897	

表2 P-B设计

Table 2 P-B design

序号	编码水平												CLA 含量/(μg/mL)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>		
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	97.66	
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	39.97	
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	97.80	
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	66.51	
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	51.11	
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	67.20	
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	48.67	
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	40.37	
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	67.55	
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	106.91	
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	99.33	
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	42.05	

表3 最陡爬坡设计和结果

Table 3 Experimental design and response values of steepest ascent

序号	诱导时间/h	生物量	LA/(mg/mL)	CLA 含量/(μg/mL)
1	18	0.4	0.5	80.81
2	18.5	0.425	0.525	98.25
3	19	0.45	0.55	110.91
4	19.5	0.475	0.575	123.43
5	20	0.5	0.6	113.74
6	20.5	0.525	0.625	96.04
7	21	0.55	0.65	63.21
8	21.5	0.575	0.675	57.90
9	22	0.6	0.7	39.18
10	22.5	0.625	0.725	19.77

采用 Design-Expert. V8.0.6 软件进行统计分析, 计

算各因素的贡献度、影响率和 p 值, 以 CLA 含量为响应值, 结果见表 1。根据分析结果, 获得重组菌株发酵产 CLA 的多元一次回归方程:  $Y(\mu\text{g/mL})=68.76+6.47X_1+8.35X_3+20.47X_4-3.07X_6-4.14X_7$

所建模型的相关系数  $R^2=0.9940$ , 说明该一阶模型可以解释大约 99%的变异性。由于 IPTG 诱导浓度为 0.19, 培养基初始 pH=0.41, 对亚油酸异构酶表达的影响较低, ANOVA 分析时可以忽略。由 1 中 p 值规律可知发酵时间、诱导前生物量和 LA 浓度显著影响重组亚油酸异构酶的表达, 且为正效应, 因此最陡爬坡试验中应增加其添加量。

## 2.2 最陡爬坡实验

P-B 试验确定发酵时间、诱导前生物量和 LA 浓度是影响重组亚油酸异构酶表达的主要因素均为正效应, 所以应增加其添加量。以 P-B 试验的中心点为最

陡爬坡试验的起始点, 结合实际情况设计三个因素的变化方向和步长, 其它各因素分别取单因素试验的最佳值, 实验设计及结果见表 3。

由表 3 因素的变化结果可以看出, 第 4 组实验 CLA 产量最高为 123.43  $\mu\text{g/mL}$ , 所以以该组的产酶条件为 CCD 试验的中心点。

### 2.3 中心组合实验结果

表 4 CCD 水平

Table 4 Levels of the variables for CCD

变量	编码	变量水平				
		-1.682	-1	0	+1	+1.682
诱导时间/h	X <sub>1</sub>	16.98	18	19.5	21	22.02
诱导前生物量	X <sub>2</sub>	0.18	0.3	0.475	0.65	0.77
LA 浓度/(mg/mL)	X <sub>3</sub>	0.28	0.4	0.575	0.75	0.87

表 5 CCD 实验设计和结果

Table 5 Experimental design and response values of CCD

序号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	CLA 含量/( $\mu\text{g/mL}$ )
1	-1	-1	-1	136.95
2	1	-1	-1	87.09
3	-1	1	-1	32.11
4	1	1	-1	22.44
5	-1	-1	1	41.79
6	1	-1	1	44.05
7	-1	1	1	29.49
8	1	1	1	38.13
9	-1.682	0	0	68.12
10	1.682	0	0	41.74
11	0	-1.682	0	85.22
12	0	1.682	0	17.84
13	0	0	-1.682	84.37
14	0	0	1.682	22.74
15	0	0	0	144.16
16	0	0	0	142.77
17	0	0	0	141.10
18	0	0	0	146.49
19	0	0	0	145.44
20	0	0	0	142.41

在 P-B 设计和最陡爬坡试验的中心点的基础上, 对发酵时间、诱导前生物量和 LA 浓度三个因素进行中心组合设计验证其对重组亚油酸异构酶表达的影响, 每个因素取 5 个水平, 自变量及其编码见表 4。

实验设计及结果见表 5 和 6。以 CLA 含量为响应

值, 利用软件对表 5 的结果进行分析, 得到二阶回归方程:

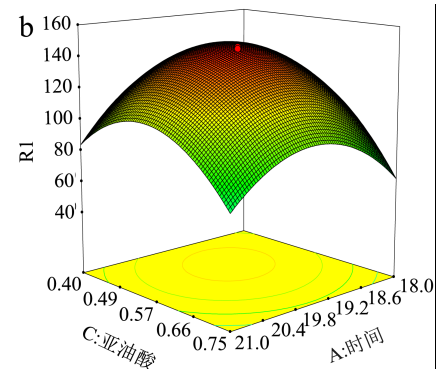
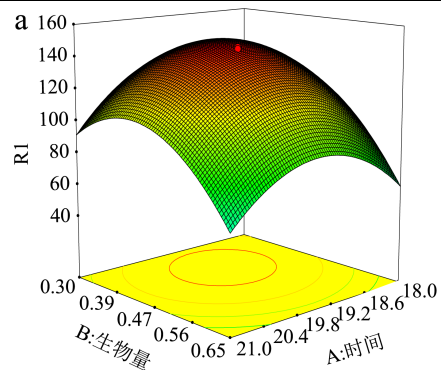
$$Y/(\mu\text{g/mL}) = -4550.38 + 487.34X_1 + 57.45X_2 + 105.78X_3 + 22.18X_1X_2 + 33.52X_1X_3 + 617.37X_2X_3 - 13.38X_1^2 - 1022.03X_2^2 - 998.65X_3^2$$

通过方差分析可知, 模型 F 值=151.65, 拟合不足  $p=16.60$  说明模型失拟不显著, 回归显著。该模型方程的  $R^2$  为 0.99273, 说明模型的可信度较高, 回归方程的拟合程度良好, 模型可以解释 99.273% 的实验所得重组亚油酸异构酶活性的变化, 可用于分析和预测发酵过程中重组亚油酸异构酶的表达量。

表 6 亚油酸异构酶的二阶多元回归方程分析结果

Table 6 Results of regression analysis of the second-order polynomial equation for linoleic acid isomerase production

编码	平方和	中位数修正值	F 值	P 值 Prob>F
模型	48771.8	5419.089	151.65	<0.0001
X <sub>1</sub>	633.0775	5419.089	17.72	0.0018
X <sub>2</sub>	6634.863	633.0775	185.68	<0.0001
X <sub>3</sub>	3833.363	6634.863	107.27	<0.0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	271.2335	3833.363	7.59	0.0203
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	619.4518	271.2335	17.34	0.0019
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	2859.764	619.4518	80.03	<0.0001
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	13054.57	2859.764	365.33	<0.0001
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	14118.43	13054.57	395.10	<0.0001
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	13479.7	14118.43	377.23	<0.0001
Lack of Fit	337.0381	67.40762	16.60	0.0039





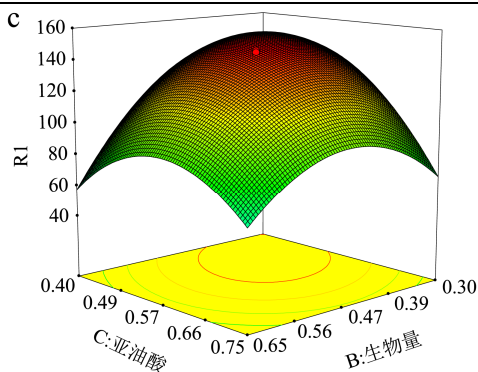


图1 各变量相互作用的响应面图

**Fig.1 Surface plot of interaction effect of different variables on linoleic acid isomerase production**

注: a: 诱导前菌体生物量和时间的相互作用图; b: 亚油酸浓度和时间的相互作用图; c: 亚油酸浓度和诱导前菌体生物量的相互作用图。

利用 Design-Expert V8.0.6 绘制响应面曲线图, 实验结果见图 1, 每个曲线图代表两个因素的相互作用。

由图 1 可知, 三个因素两两交互作用显著。通过分析对各响应面图得知, 回归模型存在稳定点, 在发酵 19.5 h、诱导前生物量  $OD_{600}=0.47$ , LA 浓度 0.57 mg/mL 时, 亚油酸异构酶催化 LA 转化为 CLA 最大量为 143.33  $\mu\text{g/mL}$ 。

在优化诱导培养基成分及诱导参数下进行 3 组重复发酵实验, 验证模型预测的准确性。结果显示 CLA 的平均产量 141.75  $\mu\text{g/mL}$ , 与预测相符。通过优化设计, CLA 产量从 68.3  $\mu\text{g/mL}$  提高到 141.75  $\mu\text{g/mL}$ , 提高了 107.5%, 与原始基因(CLA 产量  $13.1\pm 1.7 \mu\text{g/mL}$ )<sup>[30]</sup>相比产量提高了 10.8 倍。

### 3 结论

3.1 本研究以携带重组亚油酸异构酶的大肠杆菌为研究对象, 通过单因素实验确定响应面实验因素水平, 统计分析确定发酵时间、诱导前生物量和 LA 浓度是影响重组亚油酸异构酶的表达的显著因素且均为正效应, 获得重组菌株发酵产 CLA 的多元回归方程:  $Y(\mu\text{g/mL})=-4550.38+487.34X_1+57.45X_2+105.78X_3+22.18X_1X_2+33.52X_1X_3+617.37X_2X_3-13.38X_1^2-1022.03X_2^2-998.65X_3^2$

3.2 分析显示该方程的  $R^2=0.99273$ , 说明模型可信度较高, 回归方程拟合程度良好, 该模型回归显著, 可以解释 99.273% 的实验所得重组亚油酸异构酶活性的变化, 在发酵 19.5 h、诱导前生物量  $OD_{600}=0.47$  和 LA 浓度 0.57 mg/mL 时, 亚油酸异构酶催化 LA 转化为 CLA 最大量为 143.33  $\mu\text{g/mL}$ 。本研究为提高 CLA 产量及 CLA 在发酵食品中的应用提供一定的理论基础。

### 参考文献

- [1] Obsen T, Faergeman N J, Chung S, et al. Trans-10, Cis-12 conjugated linoleic acid decreases De Novo lipid synthesis in human adipocytes [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012, 23(6): 580-590
- [2] Brown J M, Mcintosh M K. Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity [J]. *Journal of Nutrition*, 2003, 133(10): 3041-3046
- [3] Murphy E F, Hooiveld G J, Müller M, et al. The Effect of Trans-10, Cis-12 conjugated linoleic acid on gene expression profiles related to lipid metabolism in human intestinal-like Caco-2 cells [J]. *Genes & Nutrition*, 2009, 4(2): 103-112
- [4] Bouthegourd J C, Even P C, Grippo D, et al. A cla mixture prevents body triglyceride accumulation without affecting energy expenditure in syrian hamsters [J]. *Journal of Nutrition*, 2002, 132(9): 2682-2689
- [5] Shen W, Chuang C C, Martinez K, et al. Conjugated linoleic acid reduces adiposity and increases markers of browning and inflammation in white adipose tissue of mice [J]. *Journal of Lipid Research*, 2013, 54(4): 909-922
- [6] Li S L, Ma S Y, Xu B R, et al. Effects of Trans-10, Cis-12-conjugated linoleic acid on mice are influenced by the dietary fat content and the degree of murine obesity [J]. *European Journal of Lipid Science & technology*, 2016, 117(12): 1908-1918
- [7] Larosa P C, Riethoven J J, Chen H, et al. Trans-10, Cis-12 conjugated linoleic acid activates the integrated stress response pathway in adipocytes [J]. *Physiological Genomics*, 2007, 31(3): 544-553
- [8] Yu J, Yu B, Jiang H L, et al. Conjugated linoleic acid induces hepatic expression of fibroblast growth factor 21 through ppar-A [J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 107(4): 461-465.
- [9] Chen B Q, Xue Y B, Liu J R, et al. Inhibition of conjugated linoleic acid on mouse forestomach neoplasia induced by benzo (a) pyrene and chemopreventive mechanisms [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2003, 9(1): 44-49
- [10] Kim K H, Park H S. Dietary supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in dmh-treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers [J]. *Nutrition*, 2003, 19(9): 772-777
- [11] Kuniyasu H, Yoshida K, Sasaki T, et al. Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells [J]. *International Journal of Cancer*, 2006, 118(3):

- 571-576
- [12] Roberta M Maria, Wanessa F Altei, Napoleão F Valadares, et al. Effect of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (CLA) on the metabolism profile of breast cancer cells determined by <sup>1</sup>H HR-MAS NMR spectroscopy [J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2019, 30(1): 3-7
- [13] 孙丽婷,刘萍,李加肖,等.共轭亚油酸异构体对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制和促凋亡作用[J].中国药理学通报,2016,32(3):443-444
- SUN Li-ting, LIU Ping, LI Jia-xiao, et al. Inhibitory and pro-apoptotic effects of conjugated linoleic acid isomers on MCF-7 cell proliferation in human breast cancer [J]. Chinese Journal of Pharmacology, 2016, 32(3): 443-444
- [14] Mitchell P L, Langille M A, Currie D L, et al. Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the syrian golden hamster [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2005, 1734(1734): 269-276
- [15] Nagao K, Inoue N, Wang Y M, et al. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (Fa/Fa) rats [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 310(2): 562-566
- [16] 熊文珂,蒋瑜,黄昕焄,等.共轭亚油酸异构体生理功能的差异[J].粮食与油脂,2017,30(11):8-11
- XIONG Wen-ke, JIANG Yu, HUANG Xin-tian, et al. Differences in physiological functions of conjugated linoleic acid isomers [J]. Food and fat, 2017, 30(11): 8-11
- [17] Mengnan Huang, Xinyao Lu, Hong Zong, et al. Bioproduction of trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid by a highly soluble and conveniently extracted linoleic acid isomerase and an extracellularly expressed lipase from recombinant Escherichia coli strains [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 28(5): 739-747
- [18] Barrett E, Ross R P, Fitzgerald G F, et al. Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(7): 2333-2337
- [19] Yu Zhang, Huaxiang Gu, Hao Shi, et al. Green synthesis of conjugated linoleic acids from plant oils using a novel synergistic catalytic system [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2017, 65: 5322-5329
- [20] Joana Ortega Anaya, Alejandra Hernández Santoyo. Production of bioactive conjugated linoleic acid by themultifunctional enolase from *Lactobacillus plantarum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 524-535
- [21] 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 Qing-shan. Biosynthesis of conjugated linoleic acid from lactobacillus [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2016
- [22] 范相振,徐尔尼.不同乳酸菌亚油酸异构酶学性质的比较[J].安徽农业大学学报,2016,43(2):190-195
- FAN Xiang-zhen, XU Er-ni. Comparison of enzymatic properties of linoleic acid isomerase from different lactic acid bacteria [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2016, 43(2): 190-195
- [23] Lara Gorissen, Luc De Vuyst, Katleen Raes, et al. Conjugated linoleic and linolenic acid production kinetics by bifidobacteria differ among strains [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155: 234-240
- [24] 张珂.亚油酸异构酶高产菌株的诱变选育及其催化性能的研究[D].芜湖:安徽工程大学,2018
- ZHANG Ke. Mutagenesis, breeding and catalytic performance of linoleic acid isomerase producing strain [D]. Wuhu:Anhui Engineering University, 2018
- [25] 李垚,徐尔尼,杨欣,等.微生物合成共轭亚油酸机理和方法的研究进展[J].食品科学,2014,35(1):271-276
- LI Yao, XU Er-ni, YANG Xin, et al. Research progress on the mechanism and method of conjugated linoleic acid synthesis by microorganisms [J]. Food Science, 2014, 35(1): 271-276
- [26] 马鸿飞,崔宝凯,员瑗,等.响应面法优化褐腐真菌竹生薄孔菌产纤维素酶的液体培养基[J].生物技术通报,2018,34(4): 91-101
- MA Hong-fei, CUI Bao-kai, YUAN yuan, et al. Liquid medium for optimization of cellulase production by RSM in bamboo mycetes with brown rot fungi [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(4): 91-101
- [27] 吕小京,操德群,徐年军.响应面试验优化酶解法制备海洋微藻微拟球藻抗氧化肽工艺[J].食品科学,2018,39(6):183-188
- LYU Xiao-jing, CAO De-qun, XU Nian-jun. Optimal enzymatic hydrolysis method for the preparation of antioxidant peptides from microalgae and micrococcus [J]. Food science, 2018, 34(4): 91-101

(下转第 330 页)