

# 痤疮丙酸杆菌亚油酸异构酶在毕赤酵母中的异源表达及其静息细胞催化合成共轭亚油酸

李秀清, 陈海琴, 唐鑫, 赵建新, 张灏, 陈卫

(江南大学食品学院, 江苏无锡214122)

**摘要:**来源于痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)的亚油酸异构酶(PAI)是一种能够通过单酶催化,生成共轭亚油酸(*t*10,*c*12-CLA)的亚油酸异构酶。为实现PAI的高效表达,以pPink为表达载体,毕赤酵母(*PichiaPink*<sup>TM</sup> Strain2)为宿主菌,构建毕赤酵母重组菌株(*Pichia*-pPink-His-opai),实现了PAI在毕赤酵母中的异源表达。对毕赤酵母重组菌进行初步筛选获得蛋白表达量最高的转化子,通过单因素实验优化毕赤酵母重组菌的诱导条件。毕赤酵母重组菌最佳诱导条件为:诱导时间24 h,诱导剂甲醇体积分数2%。在最佳诱导条件下,将毕赤酵母重组菌制成静息细胞催化剂催化合成*t*10,*c*12-CLA。在28℃、200 r/min、亚油酸质量浓度4 g/L、反应时间6 h条件下,*t*10,*c*12-CLA产量为2.12 g/L,转化率可达53%。

**关键词:**毕赤酵母;亚油酸异构酶;异源表达;共轭亚油酸;静息细胞催化

中图分类号:Q786;TQ645.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)09-0087-05

## Heterologous expression of linoleate isomerase from *Propionibacterium acnes* in *Pichia pastoris* and its catalytic synthesis of conjugated linoleic acid by resting cells

LI Xiuqing, CHEN Haiqin, TANG Xin, ZHAO Jianxin, ZHANG Hao, CHEN Wei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** Linoleate acid isomerase (PAI) from *Propionibacterium acnes* was a linoleate acid isomerase that could generate conjugated linoleic acid (*t*10, *c*12-CLA) through single enzyme catalysis. In order to realize the efficient expression of PAI, pPink was used as the expression vector and *Pichia pastoris* (*PichiaPink*<sup>TM</sup> Strain2) was used as the host strain to construct a *Pichia pastoris* recombinant strain (*Pichia*-pPink-His-opai). Finally, the heterologous expression of PAI in *Pichia pastoris* was realized. The *Pichia pastoris* recombinant strain was initially screened to obtain the transformant with the highest protein expression. The single factor experiment was used to obtain the best induction conditions for the *Pichia pastoris* recombinant strain as follows: volume fraction of the inducer methanol 2%, and induction time 24 h. Under these induction conditions, the *Pichia pastoris* recombinant strain was made into a resting cell catalyst to catalyze the synthesis of *t*10, *c*12-CLA. Under the conditions of 28℃, 200 r/min, mass concentration of linoleic acid 4 g/L, and reaction time 6 h, the productivity of *t*10, *c*12-CLA was 2.12 g/L, and the conversion rate reached 53%.

**Key words:** *Pichia pastoris*; linoleate isomerase; heterologous expression; conjugated linoleic acid; resting cell catalysis

收稿日期:2020-09-15;修回日期:2020-10-19

基金项目:国家自然科学基金优秀青年基金(31722041)

作者简介:李秀清(1996),女,在读硕士,研究方向为食品生物技术(E-mail)6180111038@stu.jiangnan.edu.cn。

通信作者:陈海琴,教授(E-mail)haiqinchen@jiangnan.edu.cn。

共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid,CLA)是一类具有共轭双键的十八碳二烯酸的总称,是亚油酸(Linoleic acid,LA)的立体几何异构体。由于共轭双键位置不同且双键具有顺式及反式两种几何结构,因此存在多种CLA同分异构体。在CLA的众多异

构体中, *c9, t11* - CLA 和 *t10, c12* - CLA 被证实生理活性较高, 具有抗炎、降低血脂、减肥等生理功能<sup>[1-3]</sup>。2008年, 上述这两种 CLA 同分异构体获得了美国 FDA 安全认证, 因此其在食品、医药等领域具有广阔的应用前景。

来源于痤疮丙酸杆菌的亚油酸异构酶 (PAI) 的晶体结构及催化机理已经被解析, 实验证实 PAI 能够单酶催化 LA 生成 *t10, c12* - CLA<sup>[4]</sup>, 但痤疮丙酸杆菌是一种致病菌, 不适用于食品工业生产。因此, 国内外对 PAI 的研究主要集中在异源表达上, 其中在大肠杆菌表达系统中重组蛋白表达量相对较高, 但是 Deng<sup>[5]</sup>、Hornung<sup>[6]</sup>、李迅<sup>[7]</sup> 等研究均表明 PAI 在大肠杆菌表达系统中易形成大量无催化活性的包含体, 难以进一步实现高水平的可溶性表达, 从而影响了 PAI 的工业化应用进程。Hornung 等<sup>[6]</sup> 将 PAI 在酿酒酵母中进行异源表达, 但蛋白表达量极低。张白曦<sup>[8]</sup>、李敏<sup>[9]</sup> 等将 PAI 在耶氏解脂酵母中进行异源表达、发酵优化, 经优化后重组耶氏解脂酵母蛋白表达量仍远低于大肠杆菌表达系统。相比上述表达系统, 毕赤酵母表达系统具有适当的蛋白质折叠结构、能有效减少包含体的形成、可高密度发酵等优点。同时, PAI 在分离纯化过程中很容易失活, 而静息细胞催化合成 CLA 具有一定优势: ①静息细胞作为全细胞催化剂免去了酶分离纯化的过程; ②产物与静息细胞易于分离, 能够重复利用菌体, 提高利用效率; ③与发酵法相比, 可以达到很高的菌体密度。目前已有利用静息细胞催化生产 CLA 的报道, 如 Zhao 等<sup>[10]</sup> 以植物乳杆菌静息细胞为催化剂, 在细胞质量浓度 150 g/L, LA 质量浓度 1.5 g/L 的条件下反应 2 h, *c9, t11* - CLA 产量最高可以达到 0.27 g/L。尽管目前一些植物乳杆菌<sup>[11]</sup>、丙酸杆菌<sup>[12]</sup> 等静息细胞可以合成 CLA, 但产量较低, 不能满足生产要求。

因此, 本实验采用毕赤酵母作为宿主菌株, 将痤疮丙酸杆菌来源的亚油酸异构酶 PAI 在毕赤酵母 (*PichiaPink*<sup>TM</sup> Strain2) 中进行异源表达, 通过优化蛋白诱导表达条件, 提高 PAI 的蛋白表达水平, 在此基础上, 利用毕赤酵母重组菌制成静息细胞催化剂催化合成 *t10, c12* - CLA, 为进一步促进 CLA 在我国食品工业中的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株

大肠杆菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$ , 由本实验室保存。毕赤酵母 *PichiaPink*<sup>TM</sup> Strain2、质粒 pPink $\alpha$  - HC, Invitrogen 公司; 用于构建重组表达载

体的质粒 pPink - HC - 3CZHEK (该质粒是多拷贝整合型质粒, 是在 pPink $\alpha$  - HC 质粒的基础上改造后得到的质粒, 携带 10  $\times$  His 标签), 保藏于江苏无锡江南大学食品生物技术中心菌库。

#### 1.1.2 试剂

DNA 限制性内切酶、PCR 产物回收试剂盒, Thermo Fisher 公司; DNA T4 连接酶, 日本 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; 无氨基酸酵母氮源 (YNB), 上海生物工程有限公司; 亚油酸 (纯度  $\geq 99\%$ )、酸洗玻璃珠、内标十五烷酸 (C15:0), Sigma - Aldrich 公司。

#### 1.1.3 培养基及主要试剂配制

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L。

YPD 培养基: 鱼粉蛋白胨 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 调节 pH 至 6.5。

PAD 选择培养基: 无氨基酸酵母氮源 (YNB) 13.4 g/L, 补充氨基酸混合物 - 不含腺嘌呤 (CSM - ADE) 1.25 g/L, 生物素 5 mg/L, 葡萄糖 20 g/L。

BMGY 培养基: 酵母提取物 10 g/L, 鱼粉蛋白胨 20 g/L, 无氨基酸酵母氮源 (YNB) 13.4 g/L, 甘油 10 g/L, 1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0)。

BMMY 培养基: 酵母提取物 10 g/L, 鱼粉蛋白胨 20 g/L, 无氨基酸酵母氮源 (YNB) 13.4 g/L, 甲醇体积分数 0.5% ~ 3%, 1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0)。

蛋白裂解液: 50 mmol/L 磷酸钠, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA, 5% 甘油, 调节 pH 至 7.4。

LA 母液: 将 LA 与吐温 80 按质量比 3:2 混合, 加入无菌水至质量浓度为 30 g/L, 涡旋振荡至溶液呈均匀的乳液, 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤除菌。

磷酸钾缓冲液: 分别配制 0.1 mol/L 的  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  溶液和 0.1 mol/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液, 按一定比例混合, 调整 pH 至 7.0。

#### 1.1.4 主要仪器

T100 PCR 仪、Geldoc2000 凝胶成像系统, 美国 Bio - Rad; G - GP2010 Plus 气相色谱仪, 日本岛津; ND100 - 2 氮气吹扫仪, 杭州瑞诚。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 PAI 基因的克隆及表达载体的构建

以张白曦<sup>[8]</sup> 构建的重组载体 pINA 1312 - spopai - d12 为模板, 以 KOD 高保真酶为延伸酶, 通过 PCR 反应扩增目的基因。PCR 引物由 Oligo7 软件设计, 引入酶切位点 *Sma*I 和 *Swa*I 以及保护碱基。引物 P1、P2 如下: P1 为 5' - TCCCCCGGGAATGT

CTATTTCTAAGGACTCT - 3'; P2 为 5' - CCCATTTAAATTTACACGAAGAATCGGGTGAC - 3'。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s; 55 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 90 s, 共 34 个循环; 72 °C 延伸 10 min。分别对 PCR 产物和 pPink 载体进行双酶切、纯化、T4 连接酶过夜连接, 将产物转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。对转化子进行菌落 PCR 验证, 验证正确的转化子送至华大基因进行测序验证。

### 1.2.2 重组表达载体的转化及重组菌鉴定

测序正确的载体经 *SpeI* 线性化后, 与感受态细胞一起进行电击转化(2 500 V, 200  $\Omega$ , 4 ~ 6 ms)。电转液涂布于 PAD 筛选平板, 30 °C 培养 3 ~ 7 d。从 PAD 筛选平板上挑取白色菌落至 PAD 液体培养基, 在 28 °C、200 r/min 的摇床中振荡培养 24 h。用真菌基因组提取试剂盒提取毕赤酵母转化子的基因组, 以基因组为模板, 以 P3、P4 为通用引物, 进行 PCR 验证。其中 P3 为 5' - GACTGGTTCCAATTGACAAGC - 3', P4 为 5' - GGAGGGCGTGAATGTAAGCGT - 3'。

### 1.2.3 毕赤酵母重组菌蛋白诱导表达

挑选经 PCR 验证正确的不同转化子, 接种至 200 mL BMGY 培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 24 h; 将菌液转移至灭菌的 50 mL 离心管中, 3 000 g 离心 3 min 后去除培养基, 将沉淀重悬于 40 mL BMMY 培养基(加入了诱导剂甲醇)中, 于 28 °C、200 r/min 诱导培养一段时间。将诱导结束后的菌体于 8 000 g 离心 3 min, 弃上清, 将菌体重悬于蛋白裂解液中, 加入等体积玻璃珠, 通过振荡器振荡破碎、提取粗蛋白, 用于活性检测及 Western Blot 检测。

### 1.2.4 PAI 活性检测

取 100  $\mu$ L 粗蛋白, 加入 10  $\mu$ L 30 g/L LA 母液, 50  $\mu$ L 内标 C15:0, 于 28 °C、200 r/min 反应 3 h。反应结束后, 利用重氮甲烷甲酯化法<sup>[13]</sup>甲酯化后, 采用气相色谱法进行脂肪酸测定。向反应液中加入 1 mL 异丙醇, 充分振荡 30 s, 再加入 2 mL 正己烷并充分振荡 30 s, 吸取上清(含有脂质的正己烷层)至干净提脂瓶中, 氮气吹干后加入 400  $\mu$ L 甲醇, 添加 40  $\mu$ L 重氮甲烷进行甲酯化, 待黄色维持 15 min 不褪色后氮气吹干, 重悬于 1 mL 正己烷中, 将样品转入气相瓶, 进行气相色谱分析。

气相色谱条件: Rtx - wax 色谱柱(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m); 升温程序为初始温度 150 °C, 以 5 °C/min 升温至 200 °C, 保持 10 min, 然后以 4 °C/min 升温至 240 °C, 保持 10 min; 分流进样, 进样量 1  $\mu$ L, 分流比 10:1; 载气为氮气; 进样器温度和检测器温度均为 240 °C。

以 LA 转化生成 *t10, c12* - CLA 的转化率作为 PAI 活性检测指标(转化率 = *t10, c12* - CLA 含量 / (*t10, c12* - CLA 含量 + LA 含量)  $\times$  100%)。

### 1.2.5 毕赤酵母重组菌静息细胞的制备及 *t10, c12* - CLA 的合成

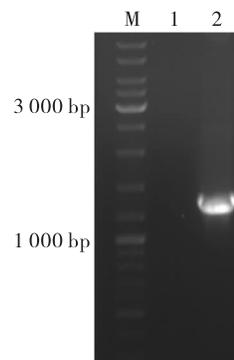
毕赤酵母重组菌在最佳诱导条件下诱导后, 于 4 °C、8 000 g 离心 3 min, 并用无菌生理盐水洗涤 2 次, 收集酵母菌泥, 作为全细胞催化剂。转化体系如下: 转化介质为 0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液(pH 7.0), 全细胞催化剂质量浓度 150 g/L(菌体湿重), LA 质量浓度 4 g/L。置于摇床中, 于 28 °C、200 r/min 催化反应 6 h, 然后按 1.2.4 方法测定转化率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 目的基因扩增及表达载体的构建

#### 2.1.1 目的基因的扩增

Hornung 等<sup>[6]</sup>将密码子优化后的 PAI 基因在酿酒酵母中进行异源表达, 优化后菌株产 CLA 能力是优化前的 8 倍。张白曦<sup>[8]</sup>对 PAI 进行密码子优化后在解脂酵母中进行异源表达, 蛋白表达量较优化前有明显提高。因此, 对外源基因进行密码子优化, 可在一定程度提高重组蛋白的表达水平。以张白曦<sup>[8]</sup>构建的经过密码子优化后的 pINA 1312 - spopai - d12 为模板, P1/P2 为引物, 通过 PCR 扩增获得目的基因 *opai*。PCR 扩增结果如图 1 所示。



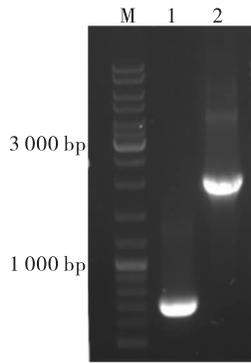
注: M. Marker; 1. 空质粒 pINA 1312; 2. PCR 扩增产物。

图 1 目的基因 PCR 扩增结果

由图 1 可知, 目的条带大小与理论值 1 297 bp 一致。

#### 2.1.2 亚油酸异构酶基因表达载体的构建

按照 1.2.1 的方法进行亚油酸异构酶表达载体的构建, 将构建的表达载体 pPink - His - opai 进行 PCR 验证, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, PCR 产物大小与理论值 1 989 bp 一致, 说明已经成功将目的基因导入表达载体中。经过进一步测序验证, 验证正确的表达载体用于毕赤酵母重组菌的构建。

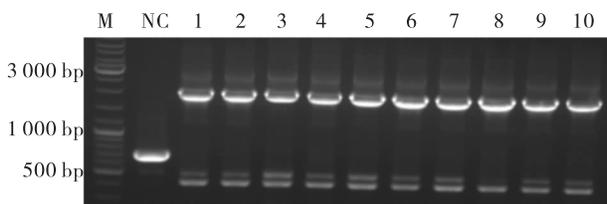


注: M. Marker; 1. 空质粒 pPink; 2. pPink-His-opai 质粒。

图2 表达载体 pPink-His-opai PCR 验证

## 2.2 毕赤酵母重组菌的筛选鉴定

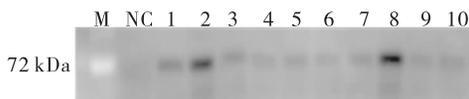
毕赤酵母转化后,挑取在 PAD 选择培养基上长出的不同白色毕赤酵母转化子,提取基因组,以基因组为模板,用引物 P3/P4 进行扩增,PCR 结果如图 3 所示。由图 3 可知,PCR 产物大小与理论值 1 989 bp 一致,说明成功构建了毕赤酵母重组菌。



注: M. Marker; NC. 空质粒 pPink; 1~10. 不同转化子。

图3 毕赤酵母重组菌不同转化子 PCR 验证

由于不同转化子之间蛋白表达水平有所差异,因此挑选不同转化子进行 Western Blot 检测以筛选出蛋白表达量最高的转化子,结果如图 4 所示。由图 4 可知,在相对分子质量为 72 kDa 左右有特异性条带,这与 PAI 蛋白的理论值一致,而空载体无目标条带,说明毕赤酵母重组菌成功表达出 PAI,且其中 8 号转化子蛋白表达量最高。



注: M. Marker; NC. 空质粒 pPink; 1~10. 不同转化子。

图4 毕赤酵母重组菌不同转化子 Western Blot 验证

对不同转化子进行体外 PAI 活性检测,结果如图 5 所示。

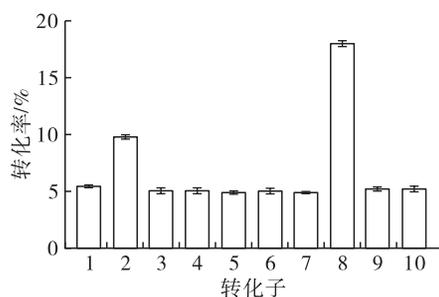


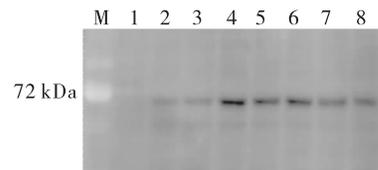
图5 毕赤酵母重组菌不同转化子转化亚油酸活性验证

由图 5 可知,不同转化子都具有催化活性,其中 8 号转化子活性最高,这与 Western Blot 结果中蛋白表达量相对应。因此,从中挑选表达量最高且对应活性最高的 8 号转化子用于后续实验。

## 2.3 毕赤酵母重组菌蛋白表达条件优化

### 2.3.1 诱导时间对重组菌表达效果的影响

按 1.2.3 方法,在甲醇体积分数为 1% 的 BMMY 培养基中分别诱导 0、6、12、24、36、48、60、72 h,考察诱导时间对 PAI 表达量的影响,结果见图 6。



注: M. Marker; 1~8. 诱导时间分别为 0、6、12、24、36、48、60、72 h。

图6 不同诱导时间对 PAI 表达量的影响

由图 6 可知:在 6~24 h 范围内,随着诱导时间的延长,PAI 蛋白表达量逐渐增大;在 24~72 h 内,PAI 表达量略有减少。因此,为获得最佳的蛋白表达量,确定最佳诱导时间为 24 h。

### 2.3.2 甲醇体积分数对重组菌表达效果的影响

按 1.2.3 方法,在甲醇体积分数分别为 0%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3% 的 BMMY 培养基中,诱导培养 24 h,研究诱导剂甲醇体积分数对 PAI 表达量的影响,结果见图 7。



注: M. Marker; 1~7. 甲醇体积分数分别为 0%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%。

图7 不同甲醇体积分数对 PAI 表达量的影响

在毕赤酵母诱导蛋白表达阶段,甲醇同时作为碳源和诱导剂影响毕赤酵母生长及外源蛋白的表达。由图 7 可知,随着甲醇体积分数的增加,PAI 表达量不断增加,甲醇体积分数增至 2% 时,蛋白表达量达到最大,当甲醇体积分数超过 2% 时,蛋白表达量有所下降,说明 2% 的甲醇已能满足毕赤酵母生长和诱导外源蛋白表达的需要,过高反而会影响到目的蛋白的表达。因此,诱导剂甲醇体积分数选定为 2%。

## 2.4 毕赤酵母重组菌静息细胞催化生成 *l*10,*c*12-CLA

毕赤酵母重组菌经优化的发酵条件发酵后,重组蛋白表达量与酿酒酵母<sup>[6]</sup>、耶氏解脂酵母<sup>[8]</sup>类似,均远低于大肠杆菌表达系统。而目前国内外研

究均报道,PAI在大肠杆菌表达系统中绝大部分以不具活性的包含体形式存在,加入促溶标签如SUMO<sup>[14]</sup>、GST<sup>[15]</sup>后PAI的可溶性仍然没有显著提高,由此可见利用PAI酶法生产 $t10,c12$ -CLA的难点在于酶产量较低且分离纯化较为困难。因此,本文选用静息细胞催化生产CLA的方法。按照1.2.5的方法制备静息细胞进行催化反应,结果见图8。由图8可以看出,相比转入空质粒的对照菌株,在转入PAI基因的静息细胞中有大量 $t10,c12$ -CLA生成,产量为2.12 g/L,且 $t10,c12$ -CLA的转化率高达53%,这说明毕赤酵母重组菌静息细胞具有生产 $t10,c12$ -CLA的潜力。

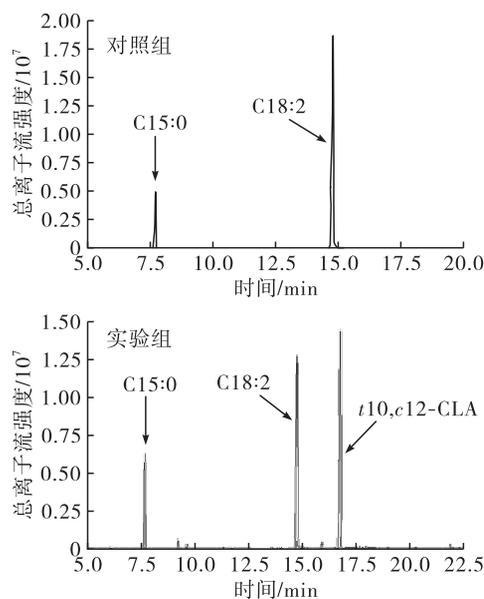


图8 对照组及静息细胞催化生成CLA的GC谱图

### 3 结论

本研究成功将痤疮丙酸杆菌来源的亚油酸异构酶PAI在毕赤酵母中异源表达,通过Western Blot及体外活性检测筛选出一株蛋白表达量最高且活性最高的转化子。在此基础上,通过对诱导时间、诱导剂甲醇体积分数进行优化,确定了在诱导时间24 h、诱导剂甲醇体积分数2%条件下,毕赤酵母重组菌蛋白表达量最高。在最佳诱导条件下,将毕赤酵母重组菌制成静息细胞催化剂,在磷酸盐作为介质的反应体系中,加入游离态底物LA至质量浓度4 g/L,反应6 h后, $t10,c12$ -CLA的产量为2.12 g/L,转化率可达53%。因此,本研究为PAI的异源表达及其静息细胞催化生成CLA方向的研究提供了技术基础。

#### 参考文献:

[1] RISERUS U. Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein; a potential link to fatty acid-induced insulin resistance [J]. *Circulation*, 2002, 106(15):

1925-1929.  
 [2] STECK S E, CHALECKI A M, PAUL M, et al. Conjugated linoleic acid supplementation for twelve weeks increases lean body mass in obese humans [J]. *J Nutr*, 2007, 137(5):1188-1193.  
 [3] PENEDO L A, NUNES J C, GAMA M A S, et al. Intake of butter naturally enriched with *cis9,trans11* conjugated linoleic acid reduces systemic inflammatory mediators in healthy young adults [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(12): 2144-2151.  
 [4] LIIVONCHANKA A, HORNUNG E, FEUSSNER I, et al. Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8):2576-2581.  
 [5] DENG M D, GRUND A D, SCHNEIDER K J, et al. Linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes*: purification, characterization, molecular cloning, and heterologous expression [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 143(3):199-211.  
 [6] HORNUNG E, KRUEGER C, PERNSTICH C, et al. Production of (10*E*,12*Z*)-conjugated linoleic acid in yeast and tobacco seeds [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1738(1/3):105-114.  
 [7] 李迅,顾华祥,王飞,等. 痤疮丙酸杆菌亚油酸异构酶的克隆表达及酶学性质研究 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2014,38(6):105-109.  
 [8] 张白曦. 亚油酸异构酶基因在产油真菌中的异源表达及产物的生物合成 [D]. 江苏 无锡:江南大学, 2013.  
 [9] 李敏. 重组耶氏解脂酵母合成反-10,顺-12-共轭亚油酸影响因素的研究 [D]. 江苏 无锡:江南大学, 2014.  
 [10] ZHAO H W, LÜ J P, LI S R. Production of conjugated linoleic acid by whole-cell of *Lactobacillus plantarum* A6-1F [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2011, 25(1): 2266-2272.  
 [11] 许庆炎. 植物乳杆菌 ZS2058 生物转化共轭亚油酸反应体系的研究 [D]. 江苏 无锡:江南大学, 2008.  
 [12] RAINIO A, VAHVASELKÄ M, SUOMALAINEN T, et al. Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* [J]. *Can J Microbiol*, 2001, 47(8):735-740.  
 [13] 杨波. 乳酸菌生物转化共轭亚油酸的研究 [D]. 江苏 无锡:江南大学, 2014.  
 [14] LUO X, ZHANG L W, LI H B, et al. Comparison of enzymatic activity of two linoleic acid isomerases expressed in *E. coli* [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(10): 5913-5919.  
 [15] LIIVONCHANKA A. Structure and biochemistry of polyunsaturated fatty acid double bond isomerase from *Propionibacterium acnes* [D]. Germany: Georg August University Göttingen, 2007.