

文章编号:1673-1689(2008)01-0090-05

玉米青贮中产共轭亚油酸菌的筛选与鉴定

杜波¹, 陈丽娟¹, 王力生¹, 王菊花¹, 蔡玉华², 高翔¹,
方华平¹, 刘莉君¹, 马广智¹, 程茂基^{*1}

(1. 安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 安徽农业大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:从玉米青贮中分离到一株共轭亚油酸生产菌(ANCLA01), 发酵液中共轭亚油酸生成量为 33.442 $\mu\text{g/mL}$; 菌株为革兰氏染色阳性杆菌且菌体短直、两端钝圆, 不产芽孢; 发酵时有乳酸生成, 属于同型发酵 B 型并对底物要求特殊的乳酸杆菌; 分子生物学鉴定结果表明, 该菌株与 *Lactobacillus plantarum* strain L5 的 16S rRNA 碱基序列相似性达 99.93%。兼顾该菌株传统鉴定方法, 确定其为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。结果表明: ANCLA01 菌株是青贮玉米中确产共轭亚油酸的植物乳杆菌。

关键词: 共轭亚油酸; 青贮; 植物乳杆菌; 鉴定

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria for Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid from Maize Silage

DU Bo¹, CHEN Li-juan¹, WANG Li-sheng¹, WANG Ju-hua¹, CHAI Yu-hua²,
GAO Xiang¹, FANG Hua-ping¹, LIU Li-jun¹, MA Guang-Zhi¹, CHENG Mao-ji^{*1}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Life Science College, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: A bacteria, ANCLA01, which could convert linoleic acid to conjugated linoleic acid, was screened from maize Silage. The CLA yield of the fermentation broth was 33.442 $\mu\text{g/mL}$; The germ was a Gram-positive rod while showed as short and straight, the beginnings and ends obtuse circle, no production of spore. Lactic acid was produced when it was been fermented. It's a kind of *Bacillus acidilactici* which belonged to type B of homofermentation as well had the special requirement of substrate in medium. Moreover, 16S ribosomal RNA gene had 99.93% sequence similarity with *Lactobacillus plantarum* strain L5. The results showed that the bacteria having the ability of bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid in silage.

Key words: conjugated linoleic acid; silage; *Lactobacillus plantarum*; identification

收稿日期: 2006-12-28.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671526).

作者简介: 杜波(1980-), 男, 安徽亳州人, 农学硕士. 主要从事饲料生物技术研究. Email: duboman@163.com

* 通讯作者: 程茂基(1968-), 男, 安徽六安人, 教授, 农学博士, 硕士生导师, 主要从事饲料生物技术研究. Email: cmj681212@sohu.com

共轭亚油酸(Conjugated Linoleic Acid, CLA)是由亚油酸衍生的共轭双烯酸的多种位置与几何异构体的总称,具有增强人体免疫、抗癌、抗动脉粥样硬化、降低胆固醇、改善骨组织代谢等多种功能^[1]。天然CLA是由亚油酸经微生物氢化而成。人们先后在反刍动物瘤胃、牛乳、婴儿粪便和酸泡菜中发现溶纤维丁酸弧菌、埃氏巨球菌^[2-3]、费氏丙酸杆菌^[4]和乳酸菌^[5]能够分泌亚油酸异构酶,可将亚油酸转化成为CLA。但家畜青贮饲料中是否存在产CLA的细菌尚不清楚。程茂基等^[6]首次在青贮饲料中检测到CLA,其含量为2~4 mg/g,表明青贮中确实存在一种能将亚油酸转化成为CLA的微生物,但其是否为乳酸菌也不清楚。为此,作者对青贮中产CLA的细菌展开筛选,并进行鉴定,旨在为利用发酵调控技术来提高青贮中CLA含量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米青贮采集于合肥市白帝乳业发展公司;培养基:pH 6.5~6.8, MRS肉汤培养基, PY培养基, MRS固体培养基, MRS半固体培养基, MRS液体培养基和补添0.1 g/dL LA的MRS液体培养基。培养基使用前均于121℃高压蒸汽下灭菌20 min。

1.2 主要试剂

LA和CLA:纯度≥99%,购自Sigma公司;细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR试剂盒和胶回收试剂盒,购自宝生物工程(大连)有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.3 菌种筛选

1.3.1 初筛 采集青贮后立即选取感官指标较好的青贮枝叶浸入37℃双蒸水中,浸泡10 min后去除枝叶,吸取新鲜均匀浸泡液10 mL加到500 mL装有300 mL MRS肉汤培养基的三角烧瓶中。37℃静置增菌96 h后,稀释涂布平板法倾倒入MRS琼脂平板,四区划线后于37℃厌氧培养48 h,挑取单菌落穿刺接种于MRS半固体培养基中,37℃培养后放于冰箱保存。

1.3.2 复筛 将初筛保存菌种于37℃活化后,按体积分数5%的接种量接种于装有10 mL MRS液体培养基的带螺帽试管(18 mm×160 mm)中,其中MRS液体培养基中亚油酸含量为0.1 g/dL。N₂驱除空气,厌氧发酵24 h后测定CLA,以筛选出产CLA细菌。

1.4 CLA测定

以正己烷为溶剂,将CLA标样配成不同浓度的溶液,以正己烷为参比,在233 nm处测定其吸光值,以CLA质量浓度(μg/mL)为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。发酵液中CLA的提取按Jiang等(1998)方法操作。将所获得脂肪酸提取物用5 mL正己烷溶解,以不接种的发酵液提取物为参比,用紫外分光光度计在200~350 nm范围内扫描,读取特征吸收峰233 nm处的吸光值,根据标准曲线计算发酵液中CLA的含量^[7]。对照样为培养基加入与样品同量的亚油酸,不接菌种,其它步骤同样品。

1.5 菌种鉴定

1.5.1 菌落及形态观察 将获得的高产菌株活化后,通过四区划线法接种于MRS平板培养基上,厌氧培养24 h后观察菌落特征。革兰氏染色后于光学显微镜下观察菌株形态特征,测定菌体的长度和宽度等。

1.5.2 生理生化鉴定 参照《伯杰细菌鉴定手册》(1994),对获得的共轭亚油酸高产菌株进行接触酶反应、明胶液化试验、产硫化氢反应、吲哚反应、温度生长范围等实验进行初步鉴定。从葡萄糖产酸、产气实验及甘露糖、棉子糖等生理和生化方面进行分类鉴定,实验参照乳酸细菌分类鉴定及实验方法,具体操作见文献[8-10]。

1.5.3 分子生物学鉴定 模板的制备、菌株16S rDNA的PCR扩增及琼脂糖凝胶电泳后目的片段的回收与纯化均按试剂盒说明步骤操作。然后将回收到的目的片段送由宝生物工程(大连)有限公司测序。将测序结果运用BLAST软件与Genebank中已登陆细菌的16S rRNA序列比较,找到与其相似性最高的登录菌株序列号并调出其登录序列,进行差异比较。

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

在厌氧条件下发酵培养时,共分离出17株生成CLA能力较强的菌株。由表1可知,分离出的菌株CLA生成量在4.316~33.442 μg/mL,其中12号菌株CLA产量最高为33.442 μg/mL。该菌株被命名为ANCLA01。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 菌种的菌落及形态观察 ANCLA01号菌株MRS固体培养后观察发现,菌落凸起、圆形、表面光滑并呈白色,见图1。革兰氏染色后油镜下观

察发现,ANCLA01 号菌株革兰氏染色呈阳性,菌体短直、两端钝圆,无芽孢,菌体宽为 0.9~1.1 μm 范围,长为 2~7 μm,呈单体、队列或短链状。ANCLA01 号菌落形态与《伯杰细菌鉴定手册》中所描述的植物乳杆菌形态特征较为一致。^[8]

表 1 不同菌株生物转化共轭亚油酸的能力
Tab.1 The ability of CLA biosynthesis by the various strains

编号	CLA 产量/ (μg/mL)	编号	CLA 产量/ (μg/mL)
1	13.342	10	7.315
2	11.269	11	12.005
3	23.013	12	33.442
4	25.867	13	24.023
5	15.009	14	9.16
6	17.301	15	4.316
7	9.213	16	9.323
8	10.532	17	21.537
9	11.663		

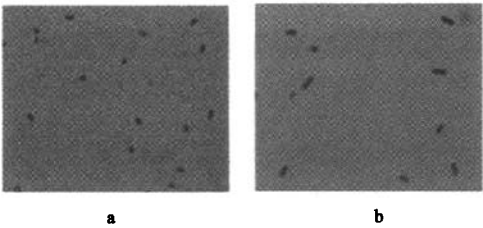


图 1 ANCLA01 号乳杆菌(22×100)
Fig.1 The morphology of ANCLA01 strain

2.2.2 生理生化检验 糖发酵试验表明,ANCLA01 号菌株发酵葡萄糖后无气体产生;生长温度测定后发现,菌株于 15℃能发育增殖,45℃基本不生长;乳酸生成检测试验发现,发酵液中有乳酸生成。兼顾上述菌株形态特征,提示该菌属同型发酵 B 型乳酸杆菌。

ANCLA01 号菌株的过氧化氢酶检验、明胶液化试验、硫化氢反应和吲哚反应,结果均呈阴性。由表 2 可以看出,ANCLA01 号菌株对甘露糖、棉子糖、甘露醇、核糖、纤维二糖、山梨醇、果糖、蔗糖、半乳糖、海藻糖、乳糖、木糖、麦芽糖、松三糖等发酵结果均呈阳性,而鼠李糖发酵结果呈阴性。图 2 表明,ANCLA01 号菌具有较强的耐酸性。以上结论均与《伯杰细菌鉴定手册》中所描述的植物乳杆菌

的生理生化特性完全一致。

表 2 菌株 ANCLA01 对发酵底物中碳水化合物的利用
Tab.2 Utilization of carbohydrate substrates to ANCLA01

底物	反应结果	底物	反应结果
甘露糖	+	棉子糖	+
甘露醇	+	鼠李糖	-
葡萄糖	+	核糖	+
纤维二糖	+	山梨醇	+
果糖	+	蔗糖	+
半乳糖	+	海藻糖	+
乳糖	+	木糖	+
麦芽糖	+	松三糖	+

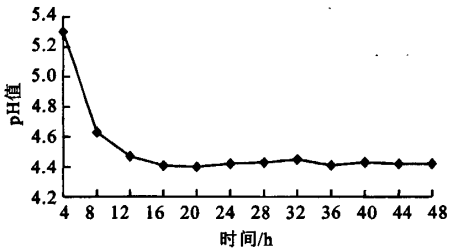


图 2 菌株 ANCLA01 发酵液中 pH 值随时间变化曲线
Fig.2 Time-course of pH value

2.2.3 分子生物学鉴定 由图 3 可见,PCR 扩增所得的 ANCLA01 菌株的 16S rDNA 目的片段,其扩增产物大小在 1 500 bp 左右,测序后该菌株的目的片段为 1 487 bp(EF185922)。将该菌株的 16S rRNA 序列应用 BLAST 程序与 GenBank 中的细菌数据库进行同源性比较,结果显示该菌株的 16S rRNA 全长序列和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* strain L5)的 16S rRNA 全长 1 532 bp 序列(DQ239698.1)相比,同源性达 99.93%;差异比较发现,ANCLA01 菌株 16S rRNA 序列的第 5 个碱基以后的 1 482 个碱基序列与 *Lactobacillus plantarum* strain L5 的第 26 个碱基后的 1 482 个碱基序列完全相同。由此,在细菌系统发育分类学上进一步证实 ANCLA01 菌株确系植物乳杆菌。

综合对该菌的菌落及形态观察、生理生化鉴定和分子生物学鉴定结果,可以确定 ANCLA01 号菌株为乳杆菌属植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

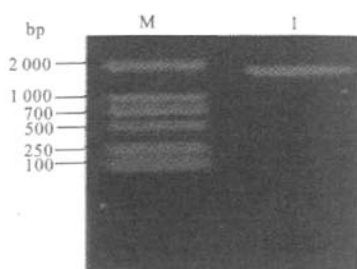


图3 ANCLA01号菌株PCR扩增条带

Fig. 3 The electrophoretogram of 16S rRNA after PCR amplification

3 结 语

微生物菌种鉴定方法有多种,其中常规生理生化分析和16S rRNA基因序列分析通常被用于杆菌鉴定。Vaneeschoutte等用CfoI、MboI、RsaI等3种限制性内切酶消化16S rRNA扩增产物,成功地对99株18种不同菌种的分枝杆菌进行鉴定^[10]。Avaniss-Aghajan等也用16S rRNA基因序列分析法和引物荧光标记法相结合准确地鉴定了13种分枝杆菌^[11]。作者分离出的乳酸菌先采用常规生理生化分析法确定其为植物乳杆菌,后又采用16S rRNA基因序列分析法进一步确定其为植物乳杆菌。结果也提示:常规生理生化分析和16S rRNA基因序列分析同样准确、有效。

共轭亚油酸生产主要以细菌为主,瘤胃细菌是研究最多的CLA生产菌。Kepler等首先发现c9, t11-CLA是瘤胃中溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)能够对亚油酸进行生物氢化,将亚油酸转化成为共轭亚油酸。Jiang等

研究发现以牛乳为培养基,费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)可以将亚油酸氢化生成CLA,并且在对数生长期CLA产量最高,亚油酸转化率超过80%。

近年来,乳酸菌发酵培养生产CLA备受关注。Lin等发现嗜酸乳杆菌在6种乳酸菌中CLA产量最高。随后,陆续在酸奶、酸泡菜和婴儿粪便中发现植物乳杆菌^[13]、路氏乳杆菌^[14]也可以将亚油酸转化成为CLA。

青贮是乳酸菌迅速增殖产生乳酸,使腐败菌生长受到抑制,进而长期保存青绿饲料的一种技术。程茂基等首次发现玉米青贮中含有微量CLA。本试验进一步证实,植物乳杆菌是青贮中产CLA的微生物之。青贮过程有多种微生物参与发酵,主要有乳酸菌(*Lactic acid bacteria*)、梭状芽孢杆菌(*Clostridia*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)、酵母菌(*Yeast*)和霉菌(*Mold*)等。除植物乳酸杆菌之外的其它杆菌、酵母和霉菌是否产CLA尚不清楚。

日粮中添加CLA后,家畜饲料报酬改善,脂肪硬度增加,脂肪含量降低,瘦肉率提高^[15]。日粮添加脂肪或改变脂肪组成,奶畜乳中CLA含量明显提高^[17-18]。因此,增加日粮CLA含量和调控日粮脂肪比例与结构迅速成为动物营养与饲料研究的热点。如将本试验筛选分离出的ANCLA01号乳酸菌选育批量扩培后,重新回接到青贮中可望生产出CLA功能性青贮。

参考文献(References):

- [1] Arunabh Bhattacharya, Jameela Banu, Mizanur Rahman, et al. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006, 17: 789-810.
- [2] Kepler C R, Hiron K P, Mcneill J J, et al. Tove intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1966, 241(6): 1350-1354.
- [3] Kim Y J, Liu R H, Bond D R, et al. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 5226-5230.
- [4] Jiang J, Bjorck L, Fonden R. Production of CLA by dairy starter culture[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 85(5): 95-102.
- [5] Lin H, Boylston T D. Conjugated linoleic acid content of cheddar-type cheeses as affected by processing[J]. *Journal of Food Science*, 1999, 64(5): 874-878.
- [6] 程茂基,杜波.玉米青贮饲料中共轭亚油酸的含量研究[J]. *畜牧与饲料科学*, 2006, 2: 23-24.

- CHENG Mao-ji, Du Bo. Studies on the content of conjugated linoleic acid in maize silage[J]. **Animal Husbandry and Feed Science**, 2006,2:23-24. (in Chinese)
- [7] Pariza M W, Yang X Y. Method of producing conjugated fatty acids[P]. USPatent:5856149,1999-07-02.
- [8] E Buchanan, N E Gibbons. 伯杰细菌鉴定手册(第九版)[M]. 中国科学院微生物研究所“伯杰细菌鉴定手册”翻译组译. 北京:科学出版社,1994.
- [9] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工出版社,1994,170-188.
- [10] Vaneechoutte M, Claey s G, Claey s G. Identification of *Mycobacterium* species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis[J]. **J Clin Microbiol**, 1993,31(8):2061-2065.
- [11] Avannis-Aghajan E, Holtzman A, Holtzman A. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria[J]. **J Clin Microbiol**, 1996,34:98-102.
- [12] Lin T Y, Lin C W, Wang Y J. Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*[J]. **Food Chemistry and Safety**, 2002,67(4):1502-1505.
- [13] Ham J S, Jeony S G, Jeony S G. Screening of conjugated linoleic acid producing lactic acid bacteria from fecal samples of healthy babies[J]. **Asian-Aust J Anim Sci**, 2002,15 (7):1031-1035.
- [14] Lee S O, Kim C S, Cho S K, et al. Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*[J]. **Biotechnology Letters**, 2003,25(12):935-938.
- [15] Averette Gatlin L, See M T, Larick D K, et al. Descriptive flavor analysis of bacon and pork loin from lean-genotype gilts fed conjugated linoleic acid and supplemental fat[J]. **J Anim Sci**, 2006,84(12):3381-3386.
- [16] Reynolds C K, Cannon V L, Loerch S C. Effects of forage source and supplementation to soybean and marine algal oil on milk fatty acid composition of ewes[J]. **Animal Feed Science and Technology**, 2006,131:333-357.
- [17] Bargo F, Delahoy J E, Schroeder G F, et al. Muller Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk[J]. **Animal Feed Science and Technology**, 2006,131:226-240.
- [18] Gillis M H, Duckett S K, Sackmann J R, et al. Effects of supplemental rumen-protected conjugated linoleic acid or linoleic acid on feedlot performance, carcass quality, and leptin concentrations in beef cattle[J]. **J Anim Sci**, 2004,82:851-859.

(责任编辑:李春丽)