

文章编号:1673-1689(2011)06-0822-05

西农萨能奶山羊乳和荷斯坦牛乳挥发性游离脂肪酸组成比较及分子机理分析

李林强, 咎林森^{*2}

(1. 陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以西农萨能奶山羊和荷斯坦牛为对象,研究山羊乳和牛乳挥发性游离脂肪酸组成的差异,并分析其分子机理。采用固相微萃取/GC-MS分析二者挥发性游离脂肪酸组成,对西农萨能奶山羊脂肪酸合成酶乙酰-CoA/丙二酰-CoA转移酶区域(AT-MT)cDNA克隆,对其AA序列及蛋白二级结构与荷斯坦牛进行比较。结果表明西农萨能奶山羊奶中癸酸(40.89 g/100 g)是影响其风味的主效成分。西农萨能奶山羊AT/MT AA序列、蛋白二级结构与荷斯坦牛存在明显差异。西农萨能奶山羊脂肪合成与代谢相关酶基因应是羊奶膻味形成的关键因素,传统育种和分子育种方法将是提高山羊乳品质的有效途径。

关键词:乳;西农萨能奶山羊;荷斯坦牛;挥发性游离脂肪酸;分子机理

中图分类号:S 87

文献标识码:A

A Comparison of Milk Volatile Free Fatty Acids from Xinong Saanen Goat and Holstein Cattle and the Molecular Mechanism Analysis

LI Lin-qiang¹, ZAN Lin-sen^{*2}

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In this manuscript, the milk from Xinong Saanen goat and Holstein cattle was used as the research model to investigate the volatile free fatty acid composition and to elucidate the molecular mechanism. Volatile free fatty acids were extracted by solid-phase microextraction (SPME), were analyzed by gas chromatograph combination with mass spectrophotometer (GC-MS). The AT-MT gene sequence of fatty acid synthase from Xinong Saanen goat was cloned, and the AA sequence and protein secondary structure distribution were compared with that of Holstein cattle. The results showed that n-Decanoic acid was the main effect flavor component (40.89%) in Xinong Saanen goat, there were significant differences in AA sequence and protein

收稿日期:2010-11-22

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划重大专项(2006BAD04A11);教育部“长江学者与创新团队发展支持计划”(2010 ZDGC-01)。

作者简介:李林强(1971—),男,陕西扶风人,理学博士,主要从事畜产品加工、动物资源的开发与利用研究。

Email: liling@snnu.edu.cn

***通信作者:**咎林森(1963—),男,陕西扶风人,教授,博士研究生导师,主要从事肉牛、奶牛遗传改良与生长发育调控研究。Email: zanls@yahoo.com.cn

secondary structure distribution between Xinong Saanen goat and the cattle. It demonstrated that fat enzyme gene of synthesis and metabolism was responsible for goatly flavor, and breeding methods of tradition and molecular could be effective ways to improve goat milk quality.

Key words: milk, xinong saanen goat, holstein cattle, volatile free fatty acid, molecular mechanism

山羊乳具有较高的营养价值,接近人乳^[1]。与牛奶相比,山羊乳的膻味(Goaty flavour)不为消费者所接受。关于山羊乳的膻味研究很多,报道结果并不一致。山羊奶中短、中链的游离脂肪酸(C_4 – C_{10})和一些支链脂肪酸含量较高是造成羊奶和羊奶制品膻味的主要原因^[2–3],有推测认为认为膻味是 C_6 与 C_8 脂肪酸共同作用的结果,还有人认为己酸、辛酸和癸酸似乎使山羊奶制品具有特殊膻味,其中特别是癸酸($C_{10:0}$,又名欧米茄癸酸和羊蜡酸)和辛酸($C_{8:0}$,又名羊脂酸)含量远高于牛乳。脱膻的研究也很多,但尚未形成成熟的技术。以西农萨能奶山羊(Saanen goat)和荷斯坦奶牛(Holstein cattle)乳为研究对象,通过 SPME/GC-MS 对二者挥发性游离脂肪酸组成比较分析,确认形成山羊乳膻味的主效成份,并进行分子机理研究,为开发优质山羊乳提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

羊奶和牛奶分别采自西北农林科技大学原种场西农萨能奶山羊(Saanen goat)和国家肉牛改良中心荷斯坦奶牛(Holstein cow)。采集西农萨能奶山羊新鲜皮下脂肪组织,液氮中速冻,–80℃超低温冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 羊奶和牛奶挥发性脂肪酸测定

1) GC-MS 条件 TRACE DSQ GC-MS 联用仪;美国 Finnigan 公司产品;弹性石英毛细管柱 DB-WAX(30 m×0.25 mm×0.25 μm);美国 Agilent 公司产品;程序升温 40℃,保持 2.5 min,以每分钟 5℃升至 200℃,再以 10℃升至 240℃,保持 5 min;进样口 250℃;传输线 230℃;载气为 He 气,体积流量 1.0 mL/min;不分流进样。电离方式 EI,70 eV;离子源温度 250℃,质量扫描范围 35~400 amu;发射电流 100 μA,检测电压 1.4 kV。

2) 样品处理 采用顶空固相微萃取法,取奶样品 3 g 置于 20 mL 密封顶空样品瓶,在 65~70℃条件下进行水溶,固相微萃取分别采用(100 μm)

PDMS 和 DVB/CAR/PDMS(50 μm),萃取富集 30 min,在 220℃条件下脱附 3 min,挥发性化合物的测定采用美国 Finnigan Trace 气质联用设备,以 1 mol/L 的巴豆酸液作为内标。

1.2.2 数据处理 根据定性分析检测结果与美国国家标准与技术局(The National Institute of Standards and Technology, NIST)化学数据库(Cheical Web Books)储存标准图谱对照,当匹配度大于 800 时予以标示,组分相对含量根据峰面积归一化法。

1.2.3 萨能奶山羊脂肪酸合成酶(FAS)乙酰-CoA/丙二酰-CoA 转移酶区域(AT/MT)cDNA 克隆、AA 序列及蛋白二级结构相关分析

1) 总 RNA 提取和目标基因 RT-PCR 扩增 采用 Trizol 法提取萨能奶山羊皮下组织基因组 mRNA,DNA 酶处理后,1%琼脂糖凝胶电泳检测核糖体 RNA 28 S 和 18 S 带的完整性(紫外分光光度计测定波长 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值为 1.8~2.0)。用 Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas Life Science)反转录得到 cDNA。RT-PCR 获得目标基因,引物序列见表 1。RT-PCR 条件:95℃ 3 min,1 cycle;94℃ 20 s;55℃ 20 s;72℃ 1 min 40 s,35 cycles;72℃ 10 min,1 cycle。

表 1 RT-PCR 引物

Tab.1 Sequences of the primer sets used for PCR

基因	引物序列	产物长度/bp	退火温度/℃
AT-MT	F: 5'-ACGTGCACGT CATCCTCCAG126755 R: 5'-TGGTCCTTCT TCATCAGGGG	1 267	55

2) 克隆载体的构建和 AA 序列及蛋白二级结构相关分析 回收纯化 PCR 产物,将获得的 1 267 bp 的 AT/MT 基因 cDNA 序列连接 T-Vector(pMD18-T 载体),4℃连接过夜,热击转化大肠杆菌 DH5α,挑 12 个克隆进行 PCR 鉴定插入方向,然后进行质粒抽提,酶切鉴定插入片段。取阳性克隆菌液进行再培养,提取质粒测序,测序结果翻译后

用 DNA Star 软件进行 AA 序列及蛋白二级结构相关分析。

2 结果与分析

2.1 羊奶和牛奶挥发性脂肪酸比较

图 1 和图 2 分别为羊奶、牛奶和挥发性脂肪酸总离子图。经过图谱解析结果见表 2。

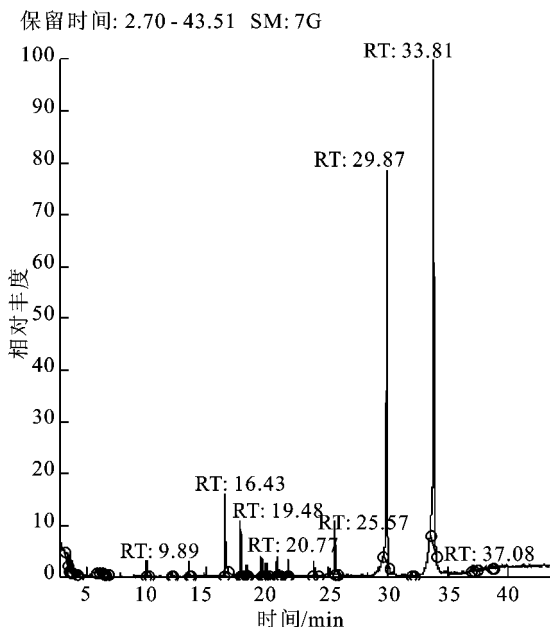


图 1 羊奶挥发性脂肪酸总离子图

Fig. 1 The ion chromatogram of volatile fatty acids prepared from fresh goat milk

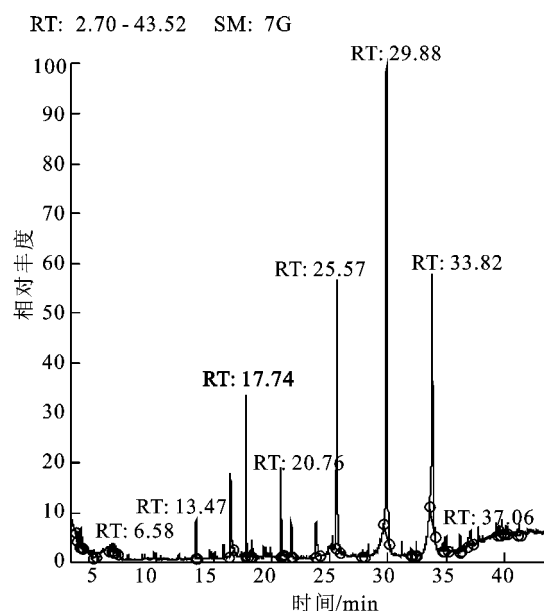


图 2 牛奶挥发性游离脂肪酸总离子图

Fig. 2 The ion chromatogram of volatile free fatty acids prepared from fresh cattle milk

由表 2 可见羊奶中草酸(2.36%),牛奶中未检

测到;羊奶中丁酸(1.55%)、己酸(4.63%)、和十二烷酸(1.24%)质量分数分别远低于牛奶中三者质量分数(4.73%、14.68%和 2.32%);羊奶中癸酸(40.89%)质量分数远高于牛奶(21.89%);羊奶和牛奶辛酸(27.15%和 26.92%)和醋酸(7.52%和 5.97%)质量分数接近。结果表明羊奶中癸酸可能是影响其风味的主效成分。

表 2 羊奶和牛奶主要挥发性游离脂肪酸

Tab. 2 Main volatile free fatty acids prepared from fresh milk of goat and cattle

保留时间/min	脂肪酸	相对分子质量	分子式	质量分数/%	
				山羊	牛
3.54	草酸	90	$C_2H_2O_4$	2.36	—
16.43	醋酸	60	$C_2H_4O_2$	7.52	5.97
20.77	丁酸	88	$C_4H_8O_2$	1.55	4.73
25.57	己酸	116	$C_6H_{12}O_2$	4.63	14.68
29.87	辛酸	144	$C_8H_{16}O_2$	27.15	26.92
33.81	欧米茄癸酸	172	$C_{10}H_{20}O_2$	40.89	21.89
37.08	十二烷酸	200	$C_{12}H_{24}O_2$	1.24	2.32

2.2 目标基因扩增结果

RT-PCR 克隆脂肪酸合成酶 AT/MT 产物电泳检测结果见图 3。

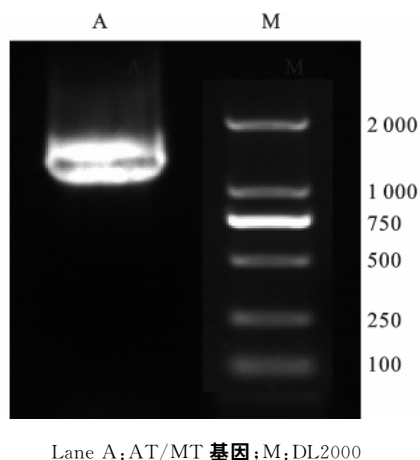


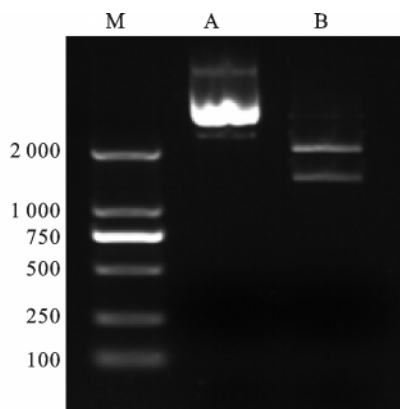
图 2 RT-PCR 克隆脂肪酸合成酶 AT/MT 产物电泳

Fig. 2 Agarose electrophoresis of RT-PCR product of AT/MT gene

由图 3 可见所获基因在 1 200 bp 附近,与预测结果一致。

2.3 酶切鉴定插入片段鉴定

连接产物转化大肠杆菌后,选择白色菌落进行 PCR,提取阳性菌落质粒用 NdeI 和 XhoI 进行双酶切鉴定,结果见图 3。结果表明 AT/MT 基因插入 pMD18-T 克隆载体。



M:DL2000 DNA 分子量标准;A:质粒;B:AT/MT 原核表达质粒

图 3 AT/MT 原核表达质粒双酶切鉴定胶图

Fig. 3 Identification of AT/MT prokaryotic expression plasmids

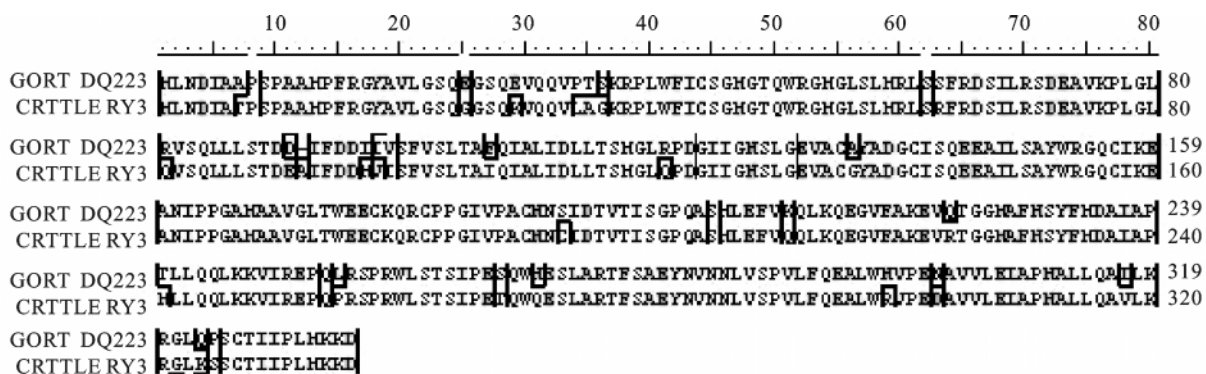


图 4 山羊和牛 FAS 基因 AT-MT 区域氨基酸序列比较

Fig. 4 AA sequence comparison of AT-MT from FAS gene between goat and cattle

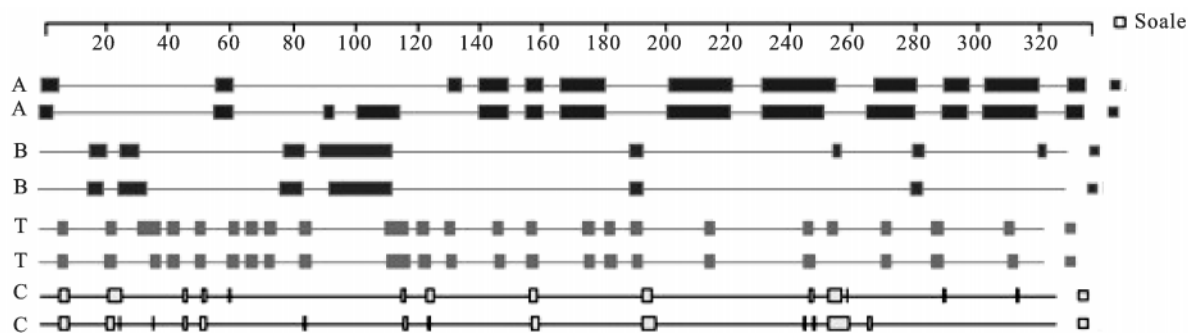


图 5 FAS 基因 AT-MT 区域蛋白质二级结构分布

Fig. 5 Distribution of protein secondary structure of AT-MT area from FAS gene between goat and cattle

3 结 语

根据文献报道,羊奶中的中链($C_{10:0}$ - $C_{14:0}$)和短链($C_{4:0}$ - $C_{8:0}$)脂肪酸含量高^[4],容易消化吸收,且具有独特的保健药用价值^[5-6],同时中、短链脂肪酸也是形成羊奶膻味的主要组分^[6]。这与本文研究

2.4 脂肪酸合成酶 AT/MT 区域 AA 序列与牛比较

取阳性克隆菌液培养,利用质粒提取试剂盒提取质粒、测序。将山羊 FAS 基因 AT-MT 区域的核酸序列用标准密码子翻译成 AA 序列,与牛的 AA 序列(NP-776535.1)利用 DNAMAN 软件进行蛋白质序列比较。结果表明,山羊 AA 序列在 8、25、36、81、97、98、99、106、120、193、205、218、241、254、267、299、303、318、323、324 等处与牛的不同。氨基酸序列二级结构预测结果表明,山羊 90-120、130-140 α 螺旋(α -helix),250-260 β 折叠(β -sheet)、240-250 β 转角(β -Turn)、50-60 无规则卷曲(Coil)结构与牛的不同。

结果不尽一致,本文研究结果表明羊奶中丁酸(1.55%)、己酸(4.63%)和十二烷酸(1.24%)质量分数分别远低于牛奶中三者质量分数(4.73%、14.68%和 2.32%);羊奶和牛奶中辛酸(27.15%和 26.92%)和醋酸(7.52%和 5.97%)的质量分数接近,但羊奶中癸酸(40.89%)质量分数远高于牛奶

(21.89%),表明羊奶中癸酸可能是影响其风味的主要成分。与现有文献报道结果不一致这可能是由于山羊品种不同所致,也可能与饲养管理有关^[7]。本文西农萨能奶山羊 FAS AT/MT cDNA 克隆,AA 序列及蛋白二级结构相关分析结果表明山羊 AA 序列、二级结构与牛存在明显差异,这可

能是导致山羊奶形成膻味的主要原因之一,其他的脂肪酸合成酶^[8-9]和脂肪酸代谢酶^[11-12]也可能影响山羊奶膻味的形成的重要因素,这还需进一步研究。因此,山羊脂肪合成与代谢相关酶基因应是羊奶膻味形成的关键因素,传统育种和分子育种方法相结合将是提高山羊乳品质的有效途径。

参考文献(References):

- [1] Haenlein W G F. Goat milk in human nutrition[J]. **Small Ruminant Research**, 2004, 51(2): 155—163.
- [2] Attiaie R, Richter R L. Formation of volatile free fatty acids during ripening of cheddar-like hard goat cheese[J]. **Journal of Dairy Science**, 1996, 79(5): 717—724.
- [3] Chilliard Y, Ferlay A, Rouel J, et al. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis[J]. **Journal of Dairy Science**, 2003, 86(5): 1751—1770.
- [4] Soryal K A, Zeng S S, Min B R, et al. Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk Domiati cheese[J]. **Small Ruminant Research**, 2004, 52(1-2): 109—116.
- [5] Babayan V K. Medium chain length fatty acid esters and their medical and nutritional applications[J]. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 1981, 58(1): 49—51.
- [6] Ha J K, Lindsay R C. Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases[J]. **Journal of dairy science**, 1993, 76: 677—690.
- [7] Sanudo C, Enser M E, Campo M M, et al. Fatty acid composition and sensory characteristics of lamb carcasses from Britaion and Spain [J]. **Meat Science**, 2000, 54: 339—346.
- [8] Moioli B, D'Andrea M, Pilla F. Candidate genes affecting sheep and goat milk quality [J]. **Small Ruminant Research**, 2007, 68(1-2): 179—192.
- [9] Moioli B, Napolitano F, Orrù L, et al. Single nucleotide polymorphism detection in promoter I of the acetyl-CoA carboxylase- α gene in sheep[J]. **Small Ruminant Research**, 2005, 59(1): 49—53.
- [10] Bernard L, Leroux C, Hayes H, et al. Characterization of the caprine stearoyl-CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon[J]. **Gene**, 2001, 281(1-2): 53—61.
- [11] Yahyaoui M H, Sanchez A, Folch J M. Rapid communication: partial nucleotide sequence of the goat stearoyl coenzyme A desaturase cDNA and gene structure[J]. **Journal of animal science**, 2002, 80: 866—867.
- [12] Reh W A, Maga E A, Collette N M B, et al. Hot topic: Using a stearoyl-coA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition[J]. **Journal of dairy**, 2004, (87): 3510—3514.