

瘤胃细菌生物合成共轭亚油酸的累积特性

刘晓华, 李海星, 陈 燕, 曹郁生*

(南昌大学中德联合研究院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 为了解瘤胃细菌生物合成共轭亚油酸(CLA)的特性, 通过毛细管电泳(CE)分析, 发现瘤胃细菌生物合成 CLA 的主要异构体有 *c9,t11*-CLA、*t10,c12*-CLA 和 *t9,t11*-CLA 3 种。在厌氧和有氧条件下, 瘤胃细菌均能合成 CLA, 且氧气有利于 CLA 的累积, 随反应时间的延长, CLA 的量呈现先增加后减少的变化趋势。结果表明瘤胃细菌参与了反刍动物体内 CLA 异构体的生物合成与代谢, 瘤胃细菌生物合成 CLA 异构体的特异性还有待更深入的研究。

关键词: 瘤胃细菌; 生物转化; 共轭亚油酸; 异构体; 毛细管电泳

Accumulation Properties of Conjugated Linoleic Acid Isomers Biosynthesized by Ruminant Bacteria

LIU Xiao-hua, LI Hai-xing, CHEN Yan, CAO Yu-sheng*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In order to understand accumulation properties of conjugated linoleic acid (CLA) biosynthesized by ruminal bacteria, capillary electrophoresis (CE) was used to analyze CLA isomers. Three main isomers including *c9, t11*-CLA, *t10, c12*-CLA and *t9, t11*-CLA were synthesized by ruminal bacteria under both anaerobic and aerobic conditions. Aerobic environment was more beneficial for the accumulation of CLA than anaerobic environment. The yield of CLA exhibited a trend of initial increase and final decrease. Therefore, ruminal bacteria play key roles in the biosynthesis and metabolism of CLA in rumen.

Key words: ruminal bacteria; biosynthesis; conjugated linoleic acid; isomer; capillary electrophoresis

中图分类号: TS203.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0254-04

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是亚油酸的共轭异构体, 理论上有多达 16 种位置和几何异构体。大量的研究表明 CLA 可抑制皮肤癌、胃癌、乳腺癌和结肠癌, 具有增强免疫功能、减肥和抗 2 型糖尿病等重要生理活性^[1]。在美国, CLA 已被开发成减肥保健品。近来的研究表明, CLA 的生理活性具有异构体特异性^[2], 如 *c9,t11*-CLA 具有较强的抑制人结肠癌细胞(Caco-2)增殖的活性^[3], 而 *t10,c12*-CLA 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖有显著的抑制作用^[4]。因此, CLA 异构体单体的特殊生理活性正日益受到人们的关注。

在自然界, CLA 主要存在于反刍动物奶和肉的脂肪中, 主要包括 *c9,t11*-CLA、*t10,c12*-CLA 和 *t9,t11*-CLA 等几种异构体, 通常每克脂肪中 CLA 的总含量为 10mg 左右^[5]。反刍动物中的 CLA 主要来源于两方面: 一是瘤胃细菌的亚油酸异构酶将亚油酸转变成 CLA, 经肠道

吸收后进入组织; 二是瘤胃细菌生物氢化亚油酸产生的反式油酸(*t11*-C_{18:1}), 经肠道吸收进入组织后, 被组织内的 Δ^9 -脱氢酶脱氢, 内源性合成 *c9,t11*-CLA。

反刍动物的奶和肉是人们获得 CLA 的最主要天然食物来源, 但其含量较低, 王腊梅等^[6]测定牛奶、水牛奶和羊奶中 CLA 的含量为 3.0~9.2mg/g 乳脂, 主要异构体为 *c9,t11*-CLA, 以及少量的 *t10,c12*-CLA。有报道牛肉中的 CLA 含量为 1.2~6.8mg/g 脂肪^[7]。为提高反刍动物奶和肉中的 CLA 含量, 国内外均进行了较多的研究。其中最多的方法是饲喂富含亚油酸的饲料, 杨俊花等^[8]发现给山羊饲喂葵花油和丙酮酸钙可以提高瘤胃内反式油酸(TVA)和 *c9,t11*-CLA 的积累; 侯俊财等^[9]发现大豆油可以增加山羊瘤胃培养液中 *c9,t11*-CLA、*t10,c12*-CLA 和 TVA(*t10*-C_{18:1}、*t11*-C_{18:1})的累积; 国外报道添加鱼油也可以提高羊奶中 *c9,t11*-CLA 的含量^[10]。为了解瘤胃细菌

收稿日期: 2011-06-29

基金项目: 江西省教育厅科研项目(赣教技字[2007]38 号)

作者简介: 刘晓华(1973—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: liuxiaohua@ncu.edu.cn

* 通信作者: 曹郁生(1945—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: yssccc@hotmail.com

生物合成 CLA 异构体的种类以及变化规律, 提高反刍动物乳脂和体脂中 CLA 的含量, 以及利用瘤胃细菌合成特定的 CLA 异构体, 本实验对瘤胃细菌生物合成 CLA 的特性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

瘤胃液采集于南昌市某山羊屠宰场。

亚油酸(LA, 纯度>95%) 自制; *c9,t11*-CLA、*t10,c12*-CLA、*t9,t11*-CLA(纯度>98%) 南昌华兴生物科技有限公司惠赠; 十二烷基硫酸钠(SDS)、 β -环状糊精(β -CD)、硼酸、硼酸钠、甲醇、乙醇、盐酸、氢氧化钠、尿素、正己烷均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

P/ACE MDQ 高效毛细管电泳仪 美国 Beckman 公司; 电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂; 3K18 高速冷冻离心机 美国 Sigma 公司; 超纯水制备器 美国 Millipore 公司; PB10pH 计 北京赛多利斯公司; 超声波脱气机 德国 Bandelin 公司; 电子天平 上海梅特勒-托利多公司; 分析天平 日本 A&D 公司; 旋涡混合器 上海跃进医疗器械厂。

1.3 方法

1.3.1 瘤胃液的培养

取刚屠宰的山羊瘤胃, 用无菌注射器抽取瘤胃液, 注入到密闭无氧、无菌、充二氧化碳的玻璃瓶中, 采集到的样品迅速送至实验室。将瘤胃液分别分装于 Hungate 试管(厌氧)和普通试管(有氧), 每管 10mL, 同时加入体积分数 0.05% 的亚油酸溶液, 混匀, 在 39℃ 恒温培养 32h。

1.3.2 CLA 的提取

取 1mL 瘤胃液, 加入 0.5mL 正己烷, 经旋涡混合器混合均匀, 用高速冷冻离心机于 $8000 \times g$ 离心 5min, 吸出上层溶液, 用氮气吹干, 即得瘤胃细菌合成的 CLA 混合物。

1.3.3 CLA 异构体的毛细管电泳分析

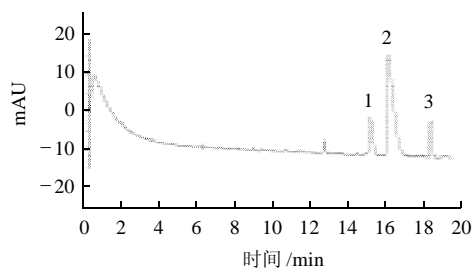
新毛细管柱依次用甲醇、超纯水、1mol/L 盐酸和超纯水洗柱 5min, 再用 1mol/L 氢氧化钠和超纯水分别洗柱 30min。在每个样品电泳之前, 用甲醇、0.1mol/L 氢氧化钠、超纯水和运行缓冲液依次洗柱 2min。

紫外检测波长 230nm; 紫外扫描 190~300nm; 进样方式: 压力进样, 0.5psi.(1psi.=6894.76Pa), 5s; 阳极进样, 阴极检测。电泳缓冲液按 Liu 等^[11]的方法配制。毛细管电泳谱图的记录和处理通过 32 Karat 软件进行。CLA 异构体的定量分析采用外标法。

2 结果与分析

2.1 瘤胃细菌合成 CLA 的主要异构体

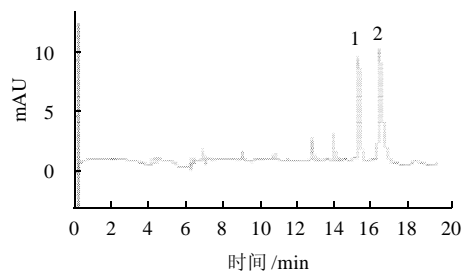
CLA 异构体共有 16 种之多, 反刍动物奶和肉中的 CLA 通常由多种异构体组成, 有报道牛奶中含有多达 14 种 CLA 异构体^[12]。受分析水平和条件的制约, 通常只能测出其中的几种主要异构体。尽管高效液相色谱(HPLC)和气相色谱(GC)法已被广泛用于分析 CLA 异构体的组成^[13-14], 但样品需要甲酯化处理, 且分析时间长(40~60min), 十分费时耗工, 不能满足大量样品测定的要求。本课题组在前期工作中建立了毛细管电泳快速准确分析 CLA 异构体的新方法^[11], 样品无需甲酯化衍生, 分析时间短, 该方法实现了 3 种 *c9,t11*-CLA、*t10,c12*-CLA 和 *t9,t11*-CLA 异构体标准品的完全分离(图 1), 结果表明毛细管电泳可用于 CLA 异构体的快速、准确分析。



峰 1~3. 依次为 *t10,c12*-CLA、*c9,t11*-CLA 和 *t9,t11*-CLA 标准品。

图 1 毛细管电泳分析 CLA 异构体标准品

Fig.1 CE chromatogram of CLA standard



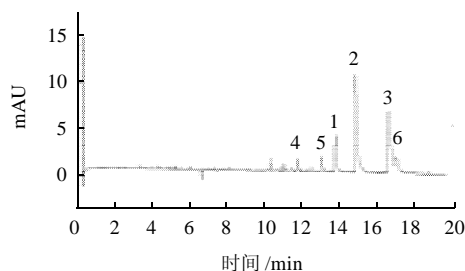
峰 1 和 2. 分别为 *t10,c12*-CLA 和 *c9,t11*-CLA。

图 2 瘤胃细菌厌氧生物转化亚油酸 8h 的毛细管电泳图谱

Fig.2 CE chromatogram of CLA synthesized by ruminal bacteria under anaerobic condition for 8 h

瘤胃液与亚油酸厌氧反应 8h 时, 亚油酸被转化成 *t10,c12*-CLA 和 *c9,t11*-CLA 两种 CLA 异构体(图 2), 表明瘤胃液中的瘤胃细菌具有生物合成 *t10,c12*-CLA 和 *c9,t11*-CLA 的能力。随着反应时间的延长, 当瘤胃液与亚油酸厌氧反应至 12h 时, 亚油酸被转化成 *t10,c12*-CLA、*c9,t11*-CLA 和 *t9,t11*-CLA 3 种主要 CLA 异构体(由于换了新

的毛细管柱,样品的保留时间有所改变)(图3),并有少量的其他3种未知CLA异构体。当反应时间达到32h时,瘤胃液中的CLA异构体均低于检测限,说明转化形成的 $t10,c12$ -CLA、 $c9,t11$ -CLA和 $t9,t11$ -CLA异构体被瘤胃细菌进一步代谢,可能形成一些反式或饱和脂肪酸。



峰1~3,依次为 $t10,c12$ -CLA、 $c9,t11$ -CLA和 $t9,t11$ -CLA;峰4~6,未知CLA异构体。

图3 瘤胃细菌厌氧生物转化亚油酸12h的毛细管电泳图谱
Fig.3 CE chromatogram of CLA synthesized by ruminal bacteria under anaerobic condition for 12 h

2.2 瘤胃细菌合成CLA异构体的产量

瘤胃细菌是厌氧菌,为了解瘤胃细菌在体外条件下生物合成CLA异构体的水平,将新鲜瘤胃液分装于Hungate试管进行厌氧培养,每隔一段时间测定 $c9,t11$ -CLA、 $t10,c12$ -CLA和 $t9,t11$ -CLA 3种主要异构体的产量(表1)。结果发现瘤胃细菌具有很强的合成CLA的能力,反应4h时 $c9,t11$ -CLA和 $t10,c12$ -CLA的产量分别为48.1、40.5 $\mu\text{g/mL}$;反应至8h时, $c9,t11$ -CLA和 $t10,c12$ -CLA的产量均达到最高值;反应至12h时, $c9,t11$ -CLA和 $t10,c12$ -CLA的产量呈现下降趋势,同时形成 $t9,t11$ -CLA异构体;随反应时间的延长,至24h时, $c9,t11$ -CLA、 $t10,c12$ -CLA和 $t9,t11$ -CLA 3种异构体的量均呈现下降趋势;当反应至32h时, $c9,t11$ -CLA、 $t10,c12$ -CLA和 $t9,t11$ -CLA 3种异构体的量均低于检测限。厌氧培养结果表明,瘤胃液中确实存在一些能生物合成 $c9,t11$ -CLA和 $t10,c12$ -CLA的特殊细菌,其中一些细菌能继续将 $c9,t11$ -CLA异构化成 $t9,t11$ -CLA,这些合成的CLA异构体会被瘤胃细菌进一步代谢、分解,那些被吸收进入组织的CLA异构体则进入反刍动物的乳脂和体脂中。

表1 瘤胃细菌厌氧转化亚油酸时的CLA异构体产量
Table 1 CLA yield synthesized by ruminal bacteria in anaerobic environment

产量/ $(\mu\text{g/mL})$	时间/h				
	4	8	12	24	32
$c9,t11$ -CLA	48.1	110.3	89.1	25.2	ND
$t10,c12$ -CLA	40.5	87.6	35.4	10.4	ND
$t9,t11$ -CLA	ND	ND	48.3	11.5	ND

注:ND,未检测到。下同。

本实验结果表明,瘤胃细菌在厌氧条件下所合成的 $t10,c12$ -CLA量只比 $c9,t11$ -CLA略低些,先前本课题组测定的牛奶、羊奶和水牛奶样品中CLA异构体主要为 $c9,t11$ -CLA,而 $t10,c12$ -CLA的含量小于3%^[6]。这说明反刍动物体内的CLA除了来源于瘤胃细菌的生物合成,还可能存在其他的合成CLA途径。Corl等^[15]研究发现乳腺组织的 Δ^9 -脱氢酶脱氢能够将 $t11$ -C_{18:1}转化成 $c9,t11$ -CLA,其合成 $c9,t11$ -CLA的量约达到乳脂中CLA的78%。由于乳腺能特异性的合成 $c9,t11$ -CLA,可能最终造成了乳脂中 $c9,t11$ -CLA的量远高于 $t10,c12$ -CLA。

瘤胃菌群系统十分复杂,加之分离培养困难,目前对其中参与合成CLA的菌株以及代谢途径了解仍很少。现有的研究表明,*Butyrivibrio fibrisolvens*是最主要的合成 $c9,t11$ -CLA的瘤胃细菌,其合成 $c9,t11$ -CLA的速率是其他瘤胃菌的数倍^[16],*Megasphaera elsdenii*能够合成 $t10,c12$ -CLA^[17]。有研究发现*Butyrivibrio proteoclasticus*能够将合成的 $c9,t11$ -CLA转化成 $t11$ -C_{18:1},并可以进一步转化为C_{18:0}^[18],这可能是厌氧培养8h后, $c9,t11$ -CLA产量呈现降低的原因。本研究结果同时也表明瘤胃液中可能还存在其他能分解和代谢 $t10,c12$ -CLA的细菌。

为比较瘤胃细菌在厌氧和有氧条件下合成CLA的差异,本实验同时也在有氧普通试管中测定3种主要CLA异构体的产量(表2)。结果发现,在有氧条件下, $c9,t11$ -CLA和 $t10,c12$ -CLA的初始合成速率要高于厌氧反应,特别是 $c9,t11$ -CLA的产量在4h时就达到101.4 $\mu\text{g/mL}$ 。Kepler等^[19]研究表明,一些含有亚油酸异构酶的瘤胃细菌能将亚油酸异构化成CLA,在瘤胃的厌氧环境中,瘤胃细菌会继续将CLA生物氢化成饱和脂肪酸。因此,有氧条件抑制了瘤胃细菌的生物氢化反应,从而促进了CLA异构体的累积,同时也表明氧气对亚油酸异构酶的活性没有影响。

表2 瘤胃细菌有氧转化亚油酸时的CLA异构体产量
Table 2 CLA yield synthesized by ruminal bacteria in aerobic environment

产量/ $(\mu\text{g/mL})$	时间/h				
	4	8	12	24	32
$c9,t11$ -CLA	101.4	152.3	110.5	31.7	ND
$t10,c12$ -CLA	53.7	79.4	67.1	20.2	ND
$t9,t11$ -CLA	ND	ND	30.4	19.5	ND

3 结论

本实验通过快速、准确的毛细管电泳分析方法,发现瘤胃细菌生物合成CLA的主要异构体有 $c9,t11$ -CLA、 $t10,c12$ -CLA和 $t9,t11$ -CLA 3种。瘤胃细菌参与了反刍动物体内CLA异构体的生物合成与代谢。氧气抑

制了瘤胃细菌的生物氢化反应,且氧气对瘤胃细菌的亚油酸异构酶活性没有影响,因此,有氧条件可以提高3种主要CLA异构体的累积总量。本课题组将对瘤胃液中的瘤胃细菌进行分离纯化,进一步了解生物合成CLA异构体的特异性和代谢途径。

参考文献:

- [1] BOTELHO A P, SANTOS-ZAGO L F, OLIVEIRA A C. Effect of conjugated linoleic acid supplementation on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocyte culture[J]. *Brazilian J Nutr*, 2009, 22(5): 767-771.
- [2] KIM Y S, KIM S J, OH T W, et al. Differential inhibitory effects of conjugated linoleic acid isomers on mouse forestomach neoplasia induced by benzo(a)pyrene[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(5): 3177-3183.
- [3] HUANG Guidong, ZHONG Xianfeng, CAO Yusheng, et al. Antiproliferation effects of conjugated linoleic acid on human colon adenocarcinoma cell line caco-2[J]. *Asia Pacific J of Clinical Nutrition*, 2007, 16(Suppl 1): 432-436.
- [4] 刘华, 曹郁生. 共轭亚油酸对前脂肪细胞增殖分化的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(1): 8-11.
- [5] NUDDA M, MCGUIRE M A, BATTACONE G, et al. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and ricotta[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(4): 1311-1319.
- [6] 王腊梅, 陈燕, 刘晓华, 等. 胶束电动色谱法分析奶中两种主要的共轭亚油酸异构体[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(1): 15-19.
- [7] DHIMANT T R, NAM S H, URE A L, et al. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, 45(6): 463-482.
- [8] 杨俊花, 沈向真, 王喜乐, 等. 葵花油和丙酮酸钙对山羊瘤胃消化代谢与瘤胃内反式油酸积累的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2009, 32(3): 164-168.
- [9] 侯俊财, 刘艳平, 霍贵成, 等. 大豆油对瘤胃培养液中共轭亚油酸及氢化中间产物累积规律的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(4): 449-454.
- [10] TORA P G, SHINGFIELD K J, HERVAS G, et al. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet[J]. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(10): 4804-4817.
- [11] LIU Xiaohua, CAO Yusheng, CHEN Yan. Separation of conjugated linoleic acid isomers by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1095: 197-200.
- [12] ALEXANDRA S, MARIUS C, GIUSEPPE B, et al. Effect of dietary alpine butter rich in conjugated linoleic acid on milk fat composition of lactating sows[J]. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100: 54-60.
- [13] EULITZ K, YURAWECZ M P, SEHAT N, et al. Preparation, separation, and confirmation of the eight geometrical *cis/trans* conjugated linoleic acid isomers 8,10-through 11,13-18:2[J]. *Lipids*, 1999, 34(8): 873-877.
- [14] PARK Y, ALBRIGHT K J, CAI Z Y, et al. Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl)diazomethane[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(3): 1158-1164.
- [15] CORL B A, BAUMGARD L H, DWYER D A, et al. The role of *D9*-desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2001, 12: 622-630.
- [16] MAIA M R G, CHAUDHARY L C, FIGUERES L, et al. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, 91: 303-314.
- [17] KIM Y J, LIU Ruihai, RYCHLIK J L, et al. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92: 976-982.
- [18] MOON C D, PACHECO D M, KELLY W J, et al. Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate-producing ruminal bacterium[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58: 2041-2045.
- [19] KEPLER C R, HIRONS K P, MCNEILL J J, et al. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1966, 241: 1350-1354.