

# 瘤胃中干酪乳杆菌的亚油酸异构酶基因的克隆与表达

刘晓华, 李慧美, 柯颖笑, 张凯强, 李响敏, 李欣, 付金衡, 李海星\*  
(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:** 以从黄牛瘤胃中分离到的一株具有将亚油酸转化为 $c9,t11$ -共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) Fx 为出发菌株, 提取其基因组DNA, 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增得到1 700 bp大小的亚油酸异构酶 (linoleic acid isomerase, LAI) 基因片段, 将该基因片段纯化后进行TA克隆, 得到重组质粒pUCm-T-LAI, 将重组质粒pUCm-T-LAI和表达质粒pET-DsbA同时进行双酶切, 连接得到重组表达载体pET-DsbA-LAI, 经PCR鉴定和酶切后, 将重组表达载体转化到大肠杆菌BL21中, 得到具有LAI活性的重组菌株, 能将亚油酸转化为 $c9,t11$ -CLA, 表明从*Lactobacillus casei* Fx成功克隆LAI, 该研究将有助于深入了解不同瘤胃细菌特异性合成不同CLA异构体的LAI基因差异。

**关键词:** 共轭亚油酸; 亚油酸异构酶; 干酪乳杆菌; 克隆; 表达

## Cloning and Expression of the Linoleic Acid Isomerase Gene of *Lactobacillus casei* Isolated from Cattle Rumen

LIU Xiaohua, LI Huimei, KE Yingxiao, ZHANG Kaiqiang, LI Xiangmin, LI Xin, FU Jinheng, LI Haixing\*  
(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-German Joint Research Institute,  
Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** *Lactobacillus casei* Fx was isolated from cattle rumen for its ability to transform linoleic acid into  $c9,t11$ -conjugated linoleic acid (CLA). Genomic DNA was extracted and a 1 700-bp linoleic acid isomerase (LAI) gene fragment was amplified from the strain by PCR. The gene fragment was purified and cloned into the plasmid pUCm-T-LAI to obtain recombinant plasmid pUCm-T-LAI by TA cloning. The recombinant plasmid and the expression plasmid pET-DsbA were subjected to double enzyme digestion and ligated to the recombinant expression vector pET-DsbA-LAI. After identification by PCR and enzymatic digestion, the recombinant expression vector was transformed into *E. coli* BL21. The recombinant strain, having LAI activity, possessed the ability to specifically transform linoleic acid into  $c9,t11$ -CLA isomer. The results showed that the LAI gene from *L. casei* Fx was successfully cloned. This work makes it possible to understand the difference among the LAI genes in different rumen bacteria.

**Key words:** conjugated linoleic acid; linoleic acid isomerase; *Lactobacillus casei*; cloning; expression

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706001

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 06-0001-05

引文格式:

刘晓华, 李慧美, 柯颖笑, 等. 瘤胃中干酪乳杆菌的亚油酸异构酶基因的克隆与表达[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 1-5.  
DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706001. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Xiaohua, LI Huimei, KE Yingxiao, et al. Cloning and expression of the linoleic acid isomerase gene of *Lactobacillus casei* isolated from cattle rumen[J]. Food Science, 2017, 38(6): 1-5. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706001. <http://www.spkx.net.cn>

共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 是一组十八碳共轭二烯酸的统称, 主要存在于反刍动物牛和羊的肉、奶制品中<sup>[1]</sup>。已经有许多文献报道CLA含有丰富的

营养价值和药用价值<sup>[2-4]</sup>, 比如抗癌变<sup>[5-7]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[8]</sup>、预防糖尿病<sup>[9-10]</sup>、增强免疫力<sup>[11]</sup>、抗炎反应<sup>[12]</sup>、减肥<sup>[13-14]</sup>等。毒理学研究表明其对人体无毒<sup>[15]</sup>。因此, CLA

收稿日期: 2016-06-30

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31260373); 江西省重点研发计划项目 (20161BBF60094)

作者简介: 刘晓华 (1973—), 男, 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: 李海星 (1978—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为微生物。E-mail: hxli@ncu.edu.cn

在药品、食品和保健品领域都具有很好的生产和应用价值。由于化学合成CLA异构体的组成复杂<sup>[16]</sup>,生物合成CLA单体正受到广泛关注<sup>[17]</sup>。亚油酸异构酶(linolenic acid isomerase, LAI)是生物合成CLA的关键酶,能够将亚油酸转化为CLA<sup>[18]</sup>。人们最早发现LAI存在于溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)中<sup>[19]</sup>,后来发现一些兼性厌氧微生物也具有将亚油酸转化为CLA的能力,如嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌和干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)等,并对植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌的LAI基因进行了相关研究<sup>[20-21]</sup>。

研究发现瘤胃中*Butyrivibrio fibrisolvens*的LAI能将亚油酸转化成*c9,t11*-CLA<sup>[19]</sup>,而埃氏巨球形菌(*Megasphaera elsdenii*)的LAI却将亚油酸转化为*t10,c12*-CLA<sup>[22]</sup>,但不同菌株中LAI基因的同源性和差异却不清楚。因此,本研究以从黄牛瘤胃中分离到的能特异性合成*c9,t11*-CLA的*Lactobacillus casei* Fx为材料,拟构建其LAI的重组表达菌株,找到能特异性合成*c9,t11*-CLA的LAI基因,以期了解不同瘤胃微生物合成不同CLA异构体的基因差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

*Lactobacillus casei* Fx为中德联合研究院食品生物技术实验室从黄牛瘤胃中分离鉴定并保存;*E. coli* BL21、pET-DsbA质粒载体为课题组保存;*E. coli* DH5 $\alpha$ 和pUCm-T质粒载体均购自上海生工生物工程有限公司。

#### 1.1.2 培养基

MRS培养基:植物蛋白胨5 g、胰蛋白胨5 g、牛肉提取物10 g、酵母提取物5 g、葡萄糖5 g、乙酸钠5 g、柠檬酸二胺2 g、磷酸氢二钾2 g、硫酸镁0.2 g、硫酸锰0.05 g、乳酸钠5 g,加蒸馏水至1 L,调节pH值至6.8。

LB培养基:胰蛋白胨10 g、氯化钠10 g、酵母提取物5 g,加蒸馏水至1 L,用5 mol/L氢氧化钠调节pH值至7.2。

#### 1.1.3 试剂

RNase A溶液(20 mg/mL)、限制性内切酶(*Bam*H I、*Hind*III)、T4 DNA连接酶、DNA Marker宝生物大连有限公司;溶菌酶、Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒、即用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增试剂盒、SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒、Sanrep柱式DNA胶回收试剂盒、SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒、T-载体PCR产物克隆试剂盒 上海生工生物工程有限公司。

### 1.2 仪器与设备

电热恒温培养箱 上海智城分析仪器制造有限公司;

PB-10精密pH计 德国Sartorius公司;3K18高速冷冻离心机 德国Sigma公司;PB602-E电子分析天平 美国Mettler Toledo公司;PCR仪 美国Applied Biosystems公司;1200高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪(配有可变波长紫外检测器和色谱工作站) 美国Agilent公司;XO-1000D超声波细胞粉碎仪 南京先欧仪器制造有限公司;FR-2000凝胶成像系统 上海复日科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 引物的合成和设计

实验所用引物是以GenBank(CP002391.1)的LAI基因片段为基础,通过Primer Premier 5软件自行设计,并且分别在上游和下游引物5'末端加入与pET-DsbA载体相同的*Bam*H I、*Hind*III酶切位点,由上海生工生物工程有限公司合成,上游引物碱基序列为5'-CGCGGATCCCTTATTCAAACATTTTTTTCAT-3'(下划线为*Bam*H I酶切位点),下游引物碱基序列为5'-CCCAAGCTTTTAATGATCAAGCATAAGG-3'(下划线为*Hind*III酶切位点)。

#### 1.3.2 *Lactobacillus casei* Fx基因组的提取

将实验室冻存的*Lactobacillus casei* Fx菌种接种于MRS培养基中,经活化后按5%的接种量接种到MRS培养基中,30℃培养24 h,冷冻离心(5 000 $\times$ g, 5 min)收集菌体。采用Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒提取*Lactobacillus casei* Fx的基因组。

#### 1.3.3 LAI基因的扩增

PCR扩增条件为:94℃预变性4 min;94℃变性45 s,45℃退火45 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃10 min。1%琼脂糖凝胶电泳验证PCR扩增结果。

#### 1.3.4 LAI基因的克隆及鉴定

LAI基因的PCR扩增产物用SanPrep柱式试剂盒纯化后与pUCm-T载体进行连接,得到pUCm-T-LAI克隆质粒,将其转化到*E. coli* DH5 $\alpha$ 中进行PCR鉴定及酶切鉴定。

#### 1.3.5 LAI基因重组表达载体的构建及鉴定

用*Bam*H I、*Hind*III限制性内切酶对pUCm-T-LAI克隆质粒和大肠杆菌表达载体pET-DsbA进行双酶切,LAI基因和pET-DsbA切胶回收后,T4 DNA连接酶作用下进行连接反应,将重组表达载体pET-DsbA-LAI转化到*E. coli* DH5 $\alpha$ 中进行PCR鉴定及酶切鉴定。

#### 1.3.6 重组菌LAI的表达

将构建成功的重组菌在LB培养基中于37℃条件下培养12 h,添加异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)至终质量浓度为100  $\mu$ g/mL,诱导表达5 h,冷冻离心(5 000 $\times$ g, 5 min)收集菌体,重悬于磷酸缓冲盐溶液中,用超声波细胞破碎仪对菌体进行破碎后,分别取破碎液和离心后的上清液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl

sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 检测LAI的表达情况。

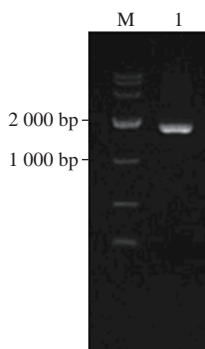
### 1.3.7 重组菌合成CLA的异构体及LAI的酶活力测定

将亚油酸超声乳化, 得到质量分数0.1%的亚油酸乳液, 取250  $\mu$ L乳化油加入到5 mL经超声破碎的重组菌粗酶液中, 37  $^{\circ}$ C条件下振荡培养3 h, 取500  $\mu$ L的反应液, 添加500  $\mu$ L的无水乙醇终止反应, 再加入200  $\mu$ L的正己烷进行振荡萃取, HPLC法测定CLA异构体及含量<sup>[23]</sup>。酶活力定义: 在37  $^{\circ}$ C、pH 6.8条件下, 以亚油酸为底物, 反应1 h生成1  $\mu$ g CLA的酶量为1个酶活力单位(U)。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAI基因的扩增

在自然界中, CLA主要存在于反刍动物的乳脂和体脂中。乳脂中的CLA异构体主要是c9,t11-CLA、t10,c12-CLA和t9,t11-CLA<sup>[24]</sup>。研究发现, 反刍动物瘤胃中的微生物参与了CLA的合成, 其中*B. fibrisolvens*能合成c9,t11-CLA, *M. elsdenii*能合成t10,c12-CLA<sup>[22]</sup>。但是, 现今人们仍对菌体中LAI基因了解甚少。课题组前期对瘤胃细菌生物合成CLA的累积特性进行了研究, 并从瘤胃微生物中分离到能特异性合成c9,t11-CLA的*Lactobacillus casei* Fx<sup>[25]</sup>。



M. DNA Marker; 1. *Lactobacillus casei* Fx的PCR结果。

图1 LAI基因的PCR扩增结果

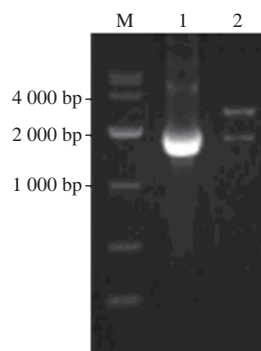
Fig. 1 PCR amplification of LAI gene

为研究*Lactobacillus casei* Fx中与c9,t11-CLA合成相关的LAI基因, 以提取得到的该菌基因组为模板, 进行PCR扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果如图1所示, 得到一条大小约为1 700 bp的条带, 经测序并与GenBank (CP002391.1) 的序列进行比对, 两者基因的同源性为98.0%, 其编码的氨基酸序列的同源性达到99.5%, 由此可见*Lactobacillus casei* Fx中的LAI基因与文献相一致。

### 2.2 LAI基因的克隆及鉴定

将纯化后的LAI基因与pUCm-T (2 773 bp) 载体进行连接反应, 提取pUCm-T-LAI克隆质粒进行双酶切分析及

PCR鉴定, 进一步判断插入的片段是否为目的条带, 结果如图2所示。泳道2得到约1 700 bp和2 700 bp左右的2个片段, 与插入的LAI基因片段和质粒pUCm-T大小一致。以提取的克隆质粒为模板, 进行PCR扩增, 泳道1出现一条约为1 700 bp的条带, 与LAI基因相符。由此进一步证明重组质粒是pUCm-T载体和LAI基因重组后的阳性克隆子。

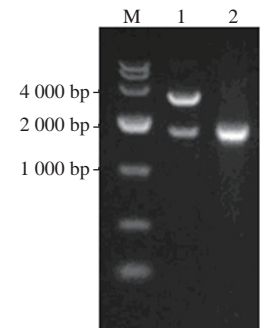


M. DNA Marker; 1. PCR结果; 2. 双酶切结果。

图2 克隆质粒的PCR鉴定及酶切鉴定

Fig. 2 PCR identification of the recombinant cloned plasmid after enzymatic digestion

### 2.3 LAI基因重组表达载体的构建及鉴定



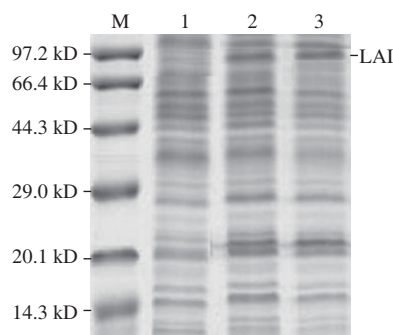
M. DNA Marker; 1. 双酶切结果; 2. PCR结果。

图3 重组表达载体的PCR鉴定及酶切鉴定

Fig. 3 PCR identification of the recombinant expression vector after enzymatic digestion

将pUCm-T-LAI克隆质粒和pET-DsbA表达载体进行双酶切, 经连接反应, 得到重组表达载体pET-DsbA-LAI, 对其进行PCR鉴定及酶切鉴定, 结果如图3所示。用BamH I、HindIII进行双酶切后, 泳道1出现2个条带, 大小分别约为3 600 bp和1 700 bp, 分别符合pET-DsbA表达载体 (3 600 bp) 和LAI基因大小。以提取的重组表达载体为模板, 特异性PCR扩增LAI基因, 泳道2得到大小约为1 700 bp的单一一条带, 与LAI基因大小相符, 说明得到的重组表达载体正确插入了目的条带。表明本研究不仅成功构建了pET-DsbA-LAI的重组载体, 而且成功将其转化到DH5 $\alpha$ 中。

## 2.4 重组菌LAI的表达



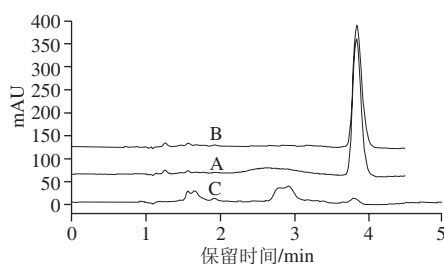
M. 蛋白Marker; 1. *E. coli* BL21诱导表达;  
2. 重组菌破碎液; 3. 重组菌破碎后上清液。

图4 重组菌株细胞中蛋白质的SDS-PAGE电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of proteins derived from the recombinant strain

将重组表达载体pET-DsbA-LAI转化到*E. coli* BL21中, 得到重组菌株BL21 (pET-DsbA-LAI), 对其进行诱导表达后, 用超声波细胞粉碎仪对菌体进行超声波破碎, 分别取破碎液和离心后的上清液进行SDS-PAGE, 如图4所示。*E. coli* BL21经过诱导并没有表达LAI蛋白, 而重组菌株表达了大小在66.4~97.2 kD之间的蛋白, 已知表达载体上融合的DsbA蛋白的分子质量约为21 kD, 而目的蛋白的分子质量约为64 kD, 它们融合表达后的融合蛋白的分子质量约为85 kD。因此, 可以确定重组菌株经过诱导不仅成功表达了融合蛋白而且还实现了LAI基因在*E. coli* BL21中的可溶性表达。

## 2.5 重组菌合成CLA的异构体及LAI的酶活力



A. *c9,t11*-CLA标准品; B. 样品; C. 阴性对照。

图5 HPLC图

Fig. 5 HPLC chromatograms

目前, CLA异构体常用的分析方法有HPLC和气相色谱 (gas chromatography, GC), 在GC分析时, CLA先要经过甲酯化衍生处理后才能进行测定。研究发现, CLA在甲酯化时易于将*c,t*-CLA转变成*t,t*-CLA, 从而影响分析结果的准确性。本研究采用银离子填充柱, 通过HPLC来分析CLA, 样品无需甲酯化衍生处理, 可以准确分析CLA异构体<sup>[19]</sup>。*Lactobacillus casei* Fx能特异性合成*c9,t11*-CLA, 为验证其LAI基因被正确的克隆到重组菌中, 将重组菌超声破碎, 向粗酶液中添加乳化的亚油

酸, 反应后用Ag<sup>+</sup>-HPLC来测定CLA的异构体组成和含量, 结果如图5所示, 重组菌中LAI能特异性合成*c9,t11*-CLA, 表明从*Lactobacillus casei* Fx中正确的克隆到能特异性合成*c9,t11*-CLA的LAI基因。经定量分析测定, 当重组菌株诱导后继续培养15 h, 其酶活力达到最大值为206 U/mL。瘤胃微生物中还有能特异性合成*t10,c12*-CLA的LAI基因, 为深入了解不同瘤胃微生物合成不同CLA异构体的原因, 还需对能特异性合成*t10,c12*-CLA的LAI基因进行比较研究。

## 3 结论

本研究从黄牛瘤胃微生物中能特异性合成*c9,t11*-CLA的*Lactobacillus casei* Fx中成功克隆到LAI基因, 重组菌株BL21 (pET-DsbA-LAI) 诱导表达后的融合蛋白的分子质量约为85 kD, 且能特异性合成*c9,t11*-CLA单体, 表明合成不同CLA异构体的LAI存在特异性, 还需对瘤胃微生物中能特异性合成*t10,c12*-CLA的LAI基因进行比较研究, 才能深入了解不同瘤胃微生物合成不同CLA异构体的原因。

## 参考文献:

- [1] RODRIGUEZ-CASTAÑEDA J L, PEÑA-EGIDO M J, GARCÍA-MARINO M, et al. Quantitative determination of conjugated linoleic acid isomers by silver ion HPLC in ewe milk fat[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24(7): 1004-1008. DOI:10.1002/1438-9312(200011)102:11<667::AID-EJLT667>3.0.CO;2-N.
- [2] 董贵成, 曹丽霞, 那日苏, 等. 共轭亚油酸对癌的抗性及其机制探索[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 448-451. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.04.101.
- [3] 刘佩, 沈生荣, 阮晖, 等. 共轭亚油酸的生理学功能及健康意义[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(6): 161-165.
- [4] KRITCHEVSKY D, TEPPER S A, WRIGHT S, et al. Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: growth and regression of lesions[J]. Lipids, 2004, 39(7): 611-616. DOI:10.1007/s11745-004-1273-8.
- [5] PARK S J, KIM B H, KIM H G, et al. Anti-proliferative efficacy comparison of conjugated linoleic acid on human cancer cell lines[J]. Journal of Biomedical Research, 2013, 14(4): 240-248. DOI:10.12729/jbr.2013.14.4.240.
- [6] KIM K J, LEE J, PARK Y, et al. ATF3 mediates anti-cancer activity of *trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid in human colon cancer cells[J]. Biomolecules and Therapeutics, 2015, 23(2): 134-140. DOI:10.4062/biomolther.2014.107.
- [7] ROZ E A, BARD J M, HUVELIN J M, et al. The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the *trans*9, *trans*11 conjugated linoleic acid isomer on MCF-7 breast cancer cells are associated with LXR activation[J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 2013, 88(4): 265-272. DOI:10.1016/j.plefa.2012.12.006.
- [8] CHEN Z Y, MA K Y, LIANG Y, et al. Role and classification of cholesterol-lowering functional foods[J]. Journal of Functional Foods, 2011, 3(2): 61-69. DOI:10.1021/jf801566r.

- [9] BARALDI F G, VICENTINI T M, TEODORO B G, et al. The combination of conjugated linoleic acid (CLA) and extra virgin olive oil increases mitochondrial and body metabolism and prevents CLA-associated insulin resistance and liver hypertrophy in C57Bl/6 mice[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2016, 28(56): 147-154. DOI:10.1016/j.jnutbio.2015.10.008.
- [10] CASTRO-WEBB N, RUIZ-NARVÁEZ E A, CAMPOS H. Cross-sectional study of conjugated linoleic acid in adipose tissue and risk of diabetes[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2012, 96(1): 175-181. DOI:10.3945/ajcn.111.011858.
- [11] WIEGAND B R, POMPEU D, THIEL-COOPER R L, et al. Immune response and blood chemistry of pigs fed conjugated linoleic acid[J]. Journal of Animal Science, 2011, 89(5): 1588-1594. DOI:10.2527/jas.2009-2722.
- [12] BORNIQUEL S, JADERT C, LUNDBERG J O. Dietary conjugated linoleic acid activates PPAR $\gamma$  and the intestinal trefoil factor in SW480 cells and mice with dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. The Journal of Nutrition, 2012, 142(12): 2135-2140. DOI:10.3945/jn.112.163931.
- [13] MAŁDZY E, CHUDZICKA-STRUGALA I, GRABAŃSKA-MARTYŃSKA K, et al. Twelve weeks CLA supplementation decreases the hip circumference in overweight and obese women. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial[J]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2016, 15(1): 107-113. DOI:10.17306/J.AFS.2016.1.11.
- [14] MARTINS S V, LOPES P A, ALVES S P, et al. Dietary CLA combined with palm oil or ovine fat differentially influences fatty acid deposition in tissues of obese Zucker rats[J]. Lipids, 2012, 47(1): 47-58. DOI:10.1007/s11745-011-3626-1.
- [15] 凌利, 章达礼, 徐焱, 等. 共轭亚油酸食品安全性毒理学试验研究[J]. 粮油食品科技, 2003, 11(4): 4-7.
- [16] CHRISTIE W W, DOBSON G, GUNSTONE F D. Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid[J]. Lipids, 1997, 32: 1231. DOI:10.1007/s11745-997-0158-1.
- [17] LIU X H, LI H X, CHEN Y, et al. Method for screening of bacterial strains biosynthesizing specific conjugated linoleic acid isomers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(38): 9705-9710. DOI:10.1021/jf3032843.
- [18] 张浩, 曹健, 常共宇, 等. 亚油酸异构酶研究进展[J]. 中国油脂, 2004, 29(10): 38-42.
- [19] KIM Y J. Partial inhibition of biohydrogenation of linoleic acid can increase the conjugated linoleic acid production of *Butyrivibrio fibrisolvens* A38[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(15): 4258-4262. DOI:10.1021/jf034057r.
- [20] 董理. 嗜酸乳杆菌共轭亚油酸异构酶基因的表达研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2006: 45.
- [21] 张镇, 孙君社. 植物乳杆菌亚油酸异构酶基因在大肠杆菌中的表达和功能鉴定[J]. 河南农业科学, 2006, 10(12): 52-55.
- [22] KIM Y J, LIU R H, 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. DOI:10.1046/j.1365-2672.2002.01610.x.
- [23] 刘晓华. 共轭亚油酸的生物转化和异构体分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2006: 36.
- [24] 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.
- [25] 刘晓华, 李海星, 陈燕, 等. 瘤胃细菌生物合成共轭亚油酸的累积特性[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 254-257.