

# 一株产共轭亚油酸瘤胃细菌 *Streptococcus infantarius* RB111 的筛选与鉴定

黄翠丽<sup>1,2</sup> 王敏<sup>2</sup> 成晓杰<sup>2</sup> 程敏<sup>2,3</sup> 仇天雷<sup>2</sup> 官春波<sup>3</sup> 陈强<sup>1\*</sup> 高俊莲<sup>2\*</sup>

(1. 四川农业大学资源环境学院微生物学系 四川 雅安 625014)

(2. 北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心 北京 100097)

(3. 青岛农业大学食品科学与工程学院 山东 青岛 266109)

**摘要:** 从内蒙古鄂尔多斯山羊瘤胃中分离筛选到 1 株产共轭亚油酸的瘤胃细菌 RB111, 该菌株的 *cis*9, *trans*11-CLA 和 *trans*10, *cis*12-CLA 总产量为 269.2 mg/L, 其中 *cis*9, *trans*11-CLA 占 52.64%, *trans*10, *cis*12-CLA 占 47.36%。对菌株 RB111 进行了形态学观察、生理生化鉴定、脂肪酸组成分析以及 16S rRNA 基因序列分析。16S rRNA 基因序列分析结果表明该菌株与婴儿链球菌 (*Streptococcus infantarius*) 的模式菌株 NCDO 599 的序列相似性为 99%, 该菌株的形态特征及生理生化特性与文献报道的 *Streptococcus infantarius* 一致。脂肪酸组成分析结果显示, 菌株 RB111 的细胞脂肪酸主要成分是 C16:0、C18:1  $\omega$ 9c 和 C18:0, 3 种脂肪酸占脂肪酸总量的 60.64%。综合以上结果, 菌株 RB111 被鉴定为婴儿链球菌 *Streptococcus infantarius*。

**关键词:** 共轭亚油酸, 瘤胃细菌, 婴儿链球菌, 气相色谱

## Screening and identification of a *Streptococcus infantarius* RB111 that produces conjugated linoleic acid

HUANG Cui-Li<sup>1,2</sup> WANG Min<sup>2</sup> CHENG Xiao-Jie<sup>2</sup> CHENG Min<sup>2,3</sup> QIU Tian-Lei<sup>2</sup>  
GONG Chun-Bo<sup>3</sup> CHEN Qiang<sup>1\*</sup> GAO Jun-Lian<sup>2\*</sup>

(1. College of Resources and Environment Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)  
(2. Agricultural Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry, Beijing 100097, China)  
(3. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

**Abstract:** A bacterial strain producing conjugated linoleic acid was isolated from the goat rumen in Er-dos, Inner Mongolia, the strain was designated as RB111. CLA production by the strain reached 269.2 mg/L,

基金项目: 北京市自然科学基金重点项目(No. 5081001); 北京市农林科学院青年科研基金(No. QNJ201014)共同资助

\* 通讯作者: 高俊莲: Tel: 86-10-51503834; ✉: gaojunlian@baafs.net.cn

陈强: Tel: 86-835-2885884; ✉: qiangchencq@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-07-30; 接受日期: 2010-09-26

in which the percentage content of *cis*9, *trans*11-CLA accounted for 52.64% and that of *trans*10, *cis*12-CLA accounted for 47.36%. The strain RB111 was identified using its morphological characteristics, fatty acid composition and physiological and biochemical properties, as well as its 16S rRNA gene sequence. The strain RB111 shares 99% sequence identity with the type strain NCDO 599<sup>T</sup> of *Streptococcus infantarius*. The result of fatty acid composition analysis revealed that the major fatty acids present in the strain RB111 were C16:0, C18:1  $\omega$ 9c and C18:0, the total account of the three kinds of fatty acids was 60.64%. The morphological characteristics and the results of physiological and biochemical properties of the strain were in well agreement with that of the type strain NCDO 599<sup>T</sup> of *Streptococcus infantarius*. On the basis of these data, the strain RB111 was defined to *Streptococcus infantarius*.

**Keywords:** Conjugated linoleic acid, Ruman bacteria, *Streptococcus infantarius*, Gas chromatography

共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, 简称 CLA)是含有共轭双键的十八碳二烯酸的多种位置异构体和几何异构体的总称,是一类具有重要生理功能的多不饱和脂肪酸。在共轭亚油酸的众多异构体中,最具生物活性的是 *cis*9, *trans*11-CLA 和 *trans*10, *cis*12-CLA。大量的研究表明,CLA 具有抗癌、抗粥样动脉硬化、增强免疫力、减少脂肪含量、降低胆固醇、预防心血管疾病等生理功能,对人体健康具有十分重要的意义<sup>[1-4]</sup>。另外,作为饲料添加剂应用于畜禽业,CLA 还具有改善动物机体代谢、重新分配营养素、减少脂肪沉积、增加瘦肉率、改善肉品质和提高免疫力等功能<sup>[5-9]</sup>。因此,CLA 越来越受到国内外研究者的关注。

天然的 CLA 来源十分局限,主要存在于牛、羊等反刍动物的肉和乳制品中,含量极低,每克脂肪只含 3-9 mg CLA,以 *cis*9, *trans*11-CLA 异构体为主,约占总 CLA 的 75%-90%<sup>[10-12]</sup>。CLA 市场需求量很大,而反刍动物乳脂和肌肉脂肪中的 CLA 含量很少,因此如何低成本、高纯度地制备 CLA 成为国内外的研究热点。CLA 的合成方法主要有化学合成法和微生物转化法,而微生物转化法具有化学合成法无法比拟的优点,因此许多学者致力于微生物转化法合成 CLA 的研究。近年来,国内外竞相研究微生物转化亚油酸生产 CLA 的方法和新菌株,主要以乳酸菌和丙酸菌的研究为主。国外对瘤胃细菌合成 CLA 的研究虽然早在 20 世纪 60 年代就开始,但由于瘤胃细菌多数是专性厌氧的,其生长所需营养因

子及其复杂,难以在体外培养,因此限制了瘤胃细菌合成 CLA 的研究发展。国内尚未见在这方面的研究报道。本研究旨在开展产共轭亚油酸瘤胃细菌的筛选鉴定研究,为我国共轭亚油酸的开发利用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 瘤胃样品来源:山羊瘤胃内容物,采自内蒙古鄂尔多斯。

1.1.2 培养基及试剂:分离培养基和保存培养基见文献[13],MRS 培养基见文献[14]。亚油酸(质量分数 99%,密度 0.9 g/mL)和共轭亚油酸甲酯(由 *cis*9, *trans*11-CLAME 和 *trans*10, *cis*12-CLAME 组成,质量分数 99%)购自 Sigma 公司;限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;DNA 提取试剂盒购自天根生物技术公司;T 载体克隆试剂盒(pGEM-T Easy System I Kit)购自 Promega 公司;PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 公司;细菌通用引物为上海生工生物工程技术服务有限公司合成,其他常规试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 瘤胃细菌的分离

屠宰后的山羊瘤胃内容物,经单层纱布过滤除去大的饲料残渣,将瘤胃液装满采样容器,24-48 h 内运回实验室,立即进行样品处理及培养分离。用灭菌的多层纱布过滤运回实验室的瘤胃液样品,滤液经 300 r/min 离心 5 min,以去除瘤胃液中的细小

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

饲料残渣;上清液以 8 000 r/min 离心 5 min, 以收集瘤胃液中的菌体, 用事先灭菌的无氧水重悬菌体, 制成菌悬液。采用 Hungate 厌氧滚管技术<sup>[15]</sup>进行瘤胃细菌的分离, 将菌悬液进行系列稀释后, 取 0.05 mL 菌悬液接入熔化的固体分离培养基, 用滚管机在冰水中滚管, 取出 37 °C 静置培养至菌落长出后, 挑取单菌落接种于液体分离培养基, 37 °C 静置培养。经重复几次滚管-挑菌得到的纯菌接种到保存培养基中, 培养后-80 °C 保存。

### 1.3 产共轭亚油酸瘤胃细菌的筛选

**1.3.1 紫外光谱扫描:** 共轭亚油酸在 232 nm-234 nm 的紫外区有特征吸收峰, 而亚油酸没有。因此用紫外分光光度计在 190 nm-250 nm 波长下扫描检测样品, 观察在 232 nm-234 nm 处有无特征吸收峰, 有特征吸收峰者表明其发酵液中有共轭亚油酸生成。

(1) 底物亚油酸的乳化。亚油酸与吐温 80 按 1:10 的质量比, 用水稀释至亚油酸浓度为 25 g/L, 用 0.22 μm 微孔滤膜的细菌过滤器除菌, -20 °C 保存。

(2) 菌种活化。将-80 °C 冰箱保存的菌种接种于 5 mL 液体 MRS 培养基中, 37 °C 静置培养 2 d 之后再转接到新鲜的 MRS 液体培养基中培养, 活化培养 2 次。

(3) 发酵培养。将活化过的菌株按 5%接种量接种于 5 mL 含有 15 g/L 胰蛋白酶解酪蛋白和 2 g/L 乳酸钠<sup>[13]</sup>的 MRS 液体培养基里, 加入底物亚油酸溶液, 使培养基中亚油酸浓度为 1 g/L。以不接入菌种、其他条件相同的发酵培养液为空白对照, 37 °C 静置培养 2 d。

(4) 脂肪酸的提取。取 2.5 mL 发酵培养液, 加 5 mL 异丙醇涡旋振荡, 静置 3 min 分层, 之后加入 3.75 mL 正己烷涡旋振荡, 萃取共轭亚油酸, 静置 3 min 分层后取上层检测。

(5) 共轭亚油酸的紫外分光光度计检测。用紫外分光光度计在 190 nm-250 nm 范围内扫描萃取液, 以不接种的空白培养基萃取液作为参比液, 观察在 232 nm-234 nm 有无吸收峰。空白培养基和发酵培养基的处理条件、萃取方法完全相同, 这样可消除底物亚油酸以及培养基其它组分在紫外测定时引起

的系统误差, 提高数据精确度和可靠性。

**1.3.2 气相色谱分析:** 紫外分光光度法检测到的共轭亚油酸是各种异构体的总和, 不能区分共轭亚油酸的不同异构体。因此, 要分析初步筛选出的瘤胃细菌所产共轭亚油酸中是否含有 *cis*9, *trans*11-CLA 和 *trans*10, *cis*12-CLA 这两种具有生物活性的异构体, 还需要进一步用气相色谱来分析测定。

(1) 菌种活化。将-80 °C 冰箱保存的菌种接种于 5 mL 液体 MRS 培养基中, 37 °C 静置培养 2 d, 之后再转接到新鲜的 MRS 液体培养基中培养, 活化培养 2 次。

(2) 发酵培养。将活化过的菌株接种 5%在 5 mL 含有 15 g/L 胰蛋白酶解酪蛋白和 2 g/L 乳酸钠的 MRS 液体培养基里, 加入底物亚油酸溶液, 使培养基中亚油酸浓度为 1 g/L。以不接入菌种、其他条件相同的为空白对照, 37 °C 静置培养 2 d。

(3) 脂肪酸提取及甲酯化。取 2 mL 发酵液, 加 4 mL 氯仿-甲醇溶液, 涡旋振荡后 2 500 r/min、4 °C 离心 5 min, 下层有机相转移到小试管中, 用约 0.5 g 无水硫酸钠干燥, 上清液用氮气吹干, 加入 4 mL NaOH-甲醇溶液, 涡旋振荡, 50 °C 水浴 15 min, 冷却至室温, 加 4 mL 盐酸-甲醇溶液, 涡旋振荡, 80 °C 水浴 60 min, 冷却至室温, 加 2 mL 蒸馏水, 涡旋振荡, 加 2 mL 正己烷萃取, 静置分层后取上层正己烷用约 0.5 g 无水硫酸钠干燥, 进行气相色谱测定或-20 °C 保存。

(4) CLA 气相色谱标准曲线测定。准确称取 11.2 mg 的 CLA 甲酯样品于 10 mL 容量瓶, 用正己烷定容, 配成浓度 1.12 g/L 的贮备液, 再分别取 0.05、0.10、0.15、0.20、0.50、1.00 和 1.50 mL 贮备液于 5 mL 容量瓶, 用正己烷定容, 配成浓度分别为 11.2、22.4、33.6、44.8、112.0、224.0 和 336.0 mg/L 的标准品。用气相色谱测定标样, 每个浓度重复进样 3 次, 取峰面积的平均值, 以 CLA 浓度为横坐标、峰面积为纵坐标建立 CLA 气相色谱标准曲线。

(5) CLA 气相色谱分析条件。仪器: Agilent 6890N 气相色谱仪, Agilent 7683 自动进样器, 氢火焰离子化检测器 FID, 聚硅氧烷聚合物色谱柱 DB-23 (60 m×0.25 mm×0.25 μm)。

分析条件:升温程序为 180 °C 保持 5 min, 然后以 10 °C/min 升温至 220 °C, 保持 30 min; 载气为氮气, 柱流速 0.8 mL/min, 进样量为 1 μL, 分流比为 10:1, 进样口温度 250 °C, 检测器温度 250 °C, 氢气流速 30 mL/min, 空气流速 400 mL/min, 尾吹流速 25 mL/min。

采用外标法, 以色谱峰面积计算 *cis9*, *trans11*-CLA 和 *trans10*, *cis12*-CLA 的含量。

#### 1.4 产共轭亚油酸瘤胃细菌的鉴定

**1.4.1 菌落及菌体形态观察:** 将筛选出的菌株接种于 MRS 固体培养基上滚管, 37 °C 培养 2–3 d, 观察固体培养基上菌落的形状和颜色等特征。然后, 挑取菌体进行革兰氏染色, 用普通光学显微镜观察染色结果。

另外, 将筛选出的菌株接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 2 d, 取菌液于 8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 做好标记, 将样品送至中国科学院微生物研究所电镜室, 采用扫描电子显微镜观察细胞的形态, 并测量细胞的大小。

**1.4.2 16S rRNA 基因序列分析:** 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取菌株的基因组 DNA(操作步骤见使用说明), 以基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物对<sup>[16]</sup>F27: 5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3'和 R1492: 5'-TACCTTGTTACG ACTT-3', 进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 10×buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μL, 引物(20 μmol/L)各 1 μL, *Taq* DNA polymerase (2.5 U/μL) 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL。PCR 扩增程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 54 °C 1.5 min, 72 °C 1 min, 31 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物用试剂盒回收纯化(操作步骤见使用说明, 纯化产物连接于 pEMG T-Easy 载体, 并转化入 *E. coli* TOP10 中, 在 Amp 平板中挑取白斑培养后提取质粒 DNA 酶切验证。将克隆成功的 PCR 扩增产物送上海生工测序, 获得菌株 16S rRNA 基因序列。克隆中的连接、转化、蓝白斑筛选及质粒的提取等均参照文献[17]。

测序结果用 NCBI-BLAST 软件在 GenBank 数据

库中进行同源性检索, 下载相似性高的相关菌株的模式菌株序列, 采用 ClustalX 1.81 软件进行多序列比对, 应用 MEGA 4.0 软件构建 16S rRNA 基因系统发育树。

**1.4.3 脂肪酸组成分析:** 将筛选出的产共轭亚油酸菌株用美国 MIDI 公司的 Sherlock Microbial Identification System (MIS) 微生物鉴定自动化系统测定其脂肪酸的组成和含量。具体方法见 MIDI 公司操作手册。

**1.4.4 生理生化特征测定:** 采用法国梅里埃 (bioMérieux) 公司的 API20 STREP 细菌鉴定试剂盒进行了生理生化特征测定, 具体方法按照产品操作说明进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 瘤胃细菌的分离结果

从山羊瘤胃内容物中分离出 14 株瘤胃细菌, 菌落颜色以白色为主, 少数为黄色; 菌落大小均较小, 菌落直径在 1 mm–5 mm 之间; 菌落形状以光滑的圆形为主, 也有少数为不规则形状。

### 2.2 产共轭亚油酸菌株的筛选结果

采用紫外分光光度计扫描法, 从分离到的 14 株瘤胃细菌中筛选到 1 株产共轭亚油酸的菌株, 其编号为 RB111。该菌株在波长为 233 nm 的紫外区有吸收峰(图 1), 吸收峰的 OD 值为 0.484 4。

运用气相色谱分析该菌株所产的共轭亚油酸中是否含有 *cis9*, *trans11*-CLA 和 *trans10*, *cis12*-CLA 这两种具有生理活性的异构体, 并测定其含量。结果显示, 菌株 RB111 具有产 *cis9*, *trans11*-CLA 和 *trans10*, *cis12*-CLA 的能力(图 2), 两者的总产量为 269.2 mg/L, 其中 *cis9*, *trans11*-CLA 占 52.64%, *trans10*, *cis12*-CLA 占 47.36%。

### 2.3 产共轭亚油酸菌株的鉴定结果

**2.3.1 菌落及菌体形态观察结果:** 菌株 RB111 在 MRS 固体培养基上为白色透明的圆形菌落, 菌落边缘整齐光滑, 菌落直径约为 2 mm–3 mm; 革兰氏染色结果为阳性; 电镜扫描结果显示菌株 RB111 的细胞形态为球状, 菌体直径约为 0.607 μm (图 3)。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

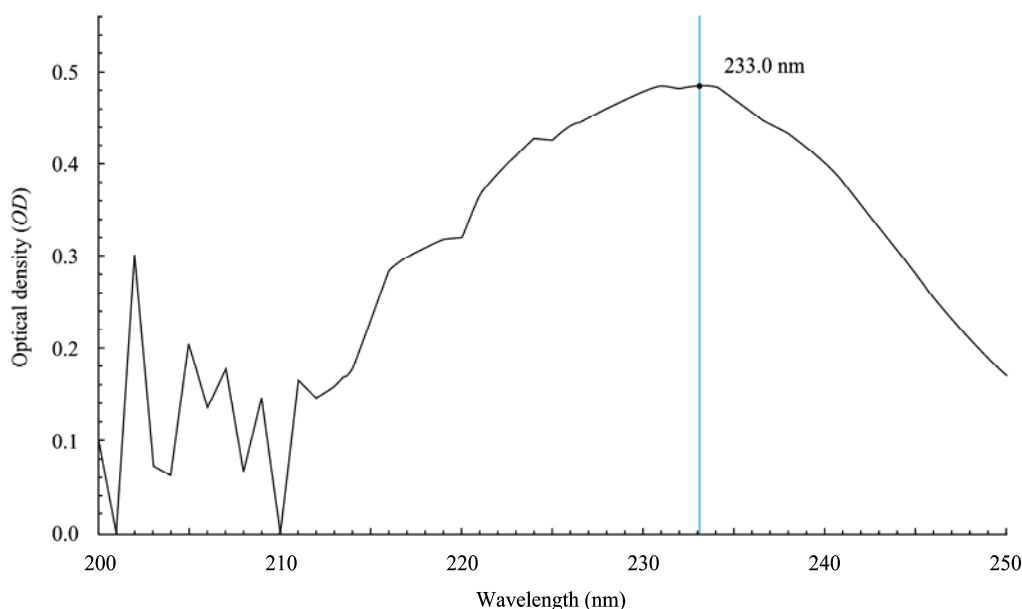


图 1 菌株 RB111 的 CLA 紫外吸收图谱  
Fig. 1 UV absorption of CLA of the strain RB111

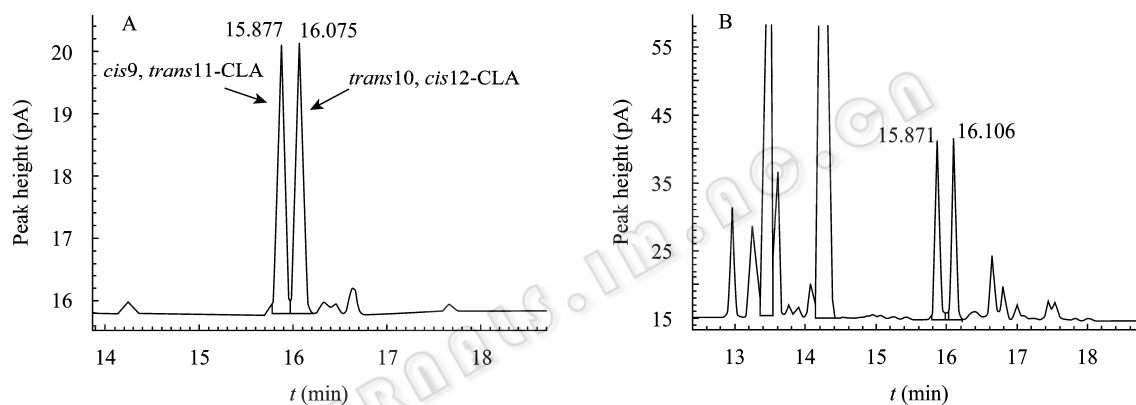


图 2 *cis9, trans11-CLA* 和 *trans10, cis12-CLA* 的气相色谱图  
Fig. 2 Gas chromatogram of *cis9, trans11-CLA* and *trans10, cis12-CLA*

注: A: *cis9, trans11-CLA* 和 *trans10, cis12-CLA* 标样; B: 菌株 RB111 产生的 CLA.

Note: A: Standard of *cis9, trans11-CLA* and *trans10, cis12-CLA*; B: CLA produced by the strain RB111.

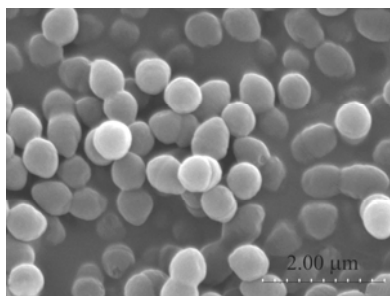


图 3 菌株 RB111 在扫描电子显微镜下的细胞形态 ( $\times 20\,000$ )

Fig. 3 Cell morphological of the strain RB111 in scanning electron microscopy ( $\times 20\,000$ )

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

**2.3.2 16S rRNA 基因序列分析结果:** 16S rRNA 基因 PCR 扩增得到约 1.5 kb 大小的片段(图 4)。DNA 经纯化连接于 pEMG T-Easy 载体后测序, 得到该菌株的 16S rRNA 基因序列, 序列全长为 1 507 bp。序列通过 NCBI 中的 BLAST 搜索后, 下载序列相似性较高菌株的模式菌株 16S rRNA 基因序列, 用 ClustalX 1.81 软件比对序列, 然后用 MEGA 4.0 软件构建系统发育进化树(图 5)。从图 5 中可见, 菌株 RB111 与已报道的 *Streptococcus infantarius* 模式菌株 NCDO 599 亲缘关系最近, 16S rRNA 基因序列相似性为 99.8%。

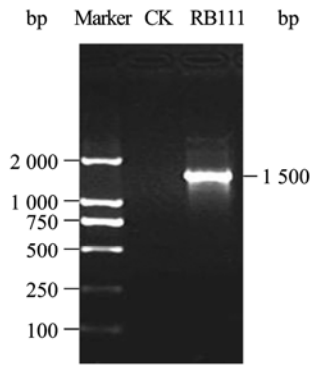


图4 菌株RB111的16S rRNA基因PCR扩增  
Fig. 4 16S rRNA gene PCR amplification of the strain RB111

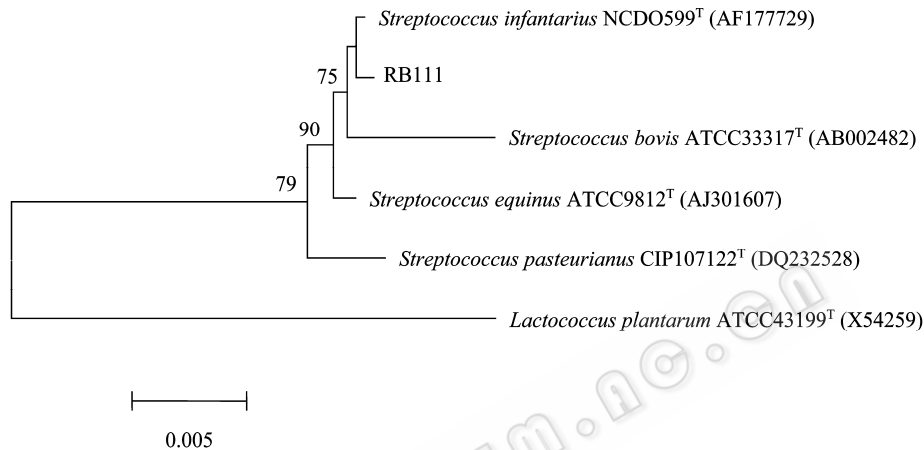


图5 菌株RB111的16S rRNA基因系统发育树图  
Fig. 5 Phylogenetic tree of the strain RB111 based on 16S rRNA gene sequences

表1 菌株RB111的细胞脂肪酸主要组成  
Table 1 Main cellular fatty acid composition of the strain RB111

脂肪酸成分 Fatty acid composition	脂肪酸百分含量 Fatty acid percentage content (%)
C14:0	2.30
C16:1 ω9c	1.81
C16:1 ω7c	1.53
C16:0	31.14
C16:0 DMA	1.28
C15:0 3OH	1.03
C18:2 ω6,9c	1.42
C18:1 ω9c	15.59
C18:0	13.91
C18:1 ω9c DMA	4.85
C18:1 ω7c DMA	1.33
C20:1 ω10c	2.23

2.3.3 脂肪酸组成分析结果：作为脂类和脂多糖的主要成分，脂肪酸主要分布在细胞膜上。不同的属、种，甚至不同的菌株之间其脂肪酸碳链的长度、双键的位置、取代基团等都存在差异<sup>[18-19]</sup>。据此原理进行的脂肪酸分析不仅可以进行大量菌株的比较分析，而且可以提供菌株的有关描述特征，广泛应用于细菌的分类鉴定中。

从表1中可以看出，菌株RB111的细胞脂肪酸主要成分是C16:0、C18:1 ω9c和C18:0，分别占脂肪酸总量的31.14%、15.59%和13.91%，3种脂肪酸占脂肪酸总量的60.64%。

2.3.4 生理生化特征测定结果：菌株RB111的生理生化测定结果为：V-P实验为阳性，水解七叶灵，不水解马尿酸，在含6.5% NaCl肉汤培养基中不生长，吡咯烷酮芳胺酶阴性，α-半乳糖苷酶阳性，β-葡萄糖醛酸酶阴性，β-半乳糖苷酶阴性，碱性磷酸酶阴性，亮氨酸氨肽酶阳性，精氨酸双水解酶阴性，发酵乳糖、淀粉、糖原等产酸，但不能发酵核糖、甘露醇、山梨醇、海藻糖、菊糖等产酸。这些结果与文献[20]报道的*Streptococcus infantarius*的生理生化特征一致。

综合以上形态特征、16S rRNA基因序列分析、脂肪酸组成分析及生理生化测定结果，可以确定菌株RB111的分类地位属于婴儿链球菌*Streptococcus infantarius*。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

### 3 讨论

已报道的产共轭亚油酸瘤胃细菌主要包括: 溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)、白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)、真杆菌(*Eubacterium* spp.)、梭尾菌(*Fusocillus* spp.)和埃氏巨型球菌(*Megasphaera elsdenii*)等种类。本文首次报道1株分离自山羊瘤胃的婴儿链球菌(*Streptococcus infantarius*) RB111 具有产共轭亚油酸能力, 本文研究结果拓宽了人们对产共轭亚油酸瘤胃细菌类群的新认识。在共轭亚油酸的众多异构体中, 具生物活性的异构体是 *cis*9, *trans*11-CLA 和 *trans*10, *cis*12-CLA, 菌株 RB111 所产生的 *cis*9, *trans*11-CLA 和 *trans*10, *cis*12-CLA 总量为 269.2 mg/L, 其中 *cis*9, *trans*11-CLA 占 52.64%, *trans*10, *cis*12-CLA 占 47.36%。已报道的产共轭亚油酸瘤胃细菌大多都属于严格厌氧菌, 由于严格厌氧菌的培养条件苛刻, 使其应用受到很大的限制。而本研究所筛选获得的产共轭亚油酸瘤胃细菌菌株 RB111 属于兼性厌氧菌, 既可在严格厌氧的条件下生长, 又可在好氧条件下生长(数据未显示), 因此该菌株具有很好的应用前景, 本研究为我国利用微生物发酵法生产共轭亚油酸奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] Parodi PW. Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat[J]. Aust J Dairy Technol. 1994, 49(2): 93-97.
- [2] Whigham LD, Cook ME, Atkinson RL. Conjugated linoleic acid: implications for human health[J]. Pharmacol Res, 2000, 42(6): 503-510.
- [3] Lee KN, Kritchevsky D, Pariza MW. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits[J]. Atherosclerosis, 1994, 108(1): 19-25.
- [4] Ha YL, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo (a) pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivaderivatives of linoleic acid[J]. Cancer Res, 1990, 50(4): 1097-1101.
- [5] 包海生, 左福元. 共轭亚油酸对动物免疫调节的研究[J]. 饲料研究, 2006(3): 13-15.
- [6] Hayek MG, Han SN, Wu DY, et al. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice[J]. Nutr, 1999, 129(1): 32-38.
- [7] Chouinard PY, Corneau L, Saebø A, et al. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows[J]. Dairy Sci, 1999, 82(12): 2737-2745.
- [8] Mackle TR, Kay JK, Auldist MJ, et al. Effects of abomasal infusion of conjugated linoleic acid on milk fat-concentration and yield from pasture-fed dairy cows[J]. Dairy Sci, 2003, 86(2): 644-652.
- [9] Corino C, Filetti F, Gambacorta M, et al. Influence of dietary conjugated linoleic acids (CLA) and age at slaughtering on meat quality and intramuscular collagen in rabbits[J]. Meat Science, 2004, 66(1): 97-103.
- [10] Dhiman TR, Anand GR, Satter LD, et al. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets[J]. Dairy Sci, 1999, 82(10): 2146-2156.
- [11] Catherine S, Paul RR, Oskar Z, et al. Conjugated linoleic acid isomerase and a process for the production of Conjugated linoleic acid[P]. United States Patent, US2004197790 (A1).
- [12] Boyaval P, Corre C, Dupuis C, et al. Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria[J]. Lait, 1995, 75(1): 17-29.
- [13] Kim YJ, Liu RH, Rychlik JL, 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(5): 976-982.
- [14] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999(3): 85-129.
- [15] Bryant MP. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1972, 25(12): 1324-1328.
- [16] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 276-282.
- [17] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW 著. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002: 27-30.
- [18] 吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 等. Sherlock MIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究[J]. 土壤学报, 2006, 43(4): 642-647.
- [19] Daneshvar MI, Douglas MP, Weyant RS. Cellular fatty acid composition of *Lautropia mirabilis*[J]. Clinical Microbiology, 2001, 39(11): 4160-4162.
- [20] Schlegel L, Grimont F, Collins MD, et al. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(4): 1425-1434.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>