

乳中共轭亚油酸异构体合成机制的研究进展

付金衡¹, 丁宜春², 李海星¹, 陈燕¹, 李超波¹, 曹郁生¹, 刘晓华^{1,*}

(1.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;

2.江苏省泰州市姜堰区兴泰镇畜牧兽医站, 江苏 泰州 225539)

摘要: 共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是一组十八碳共轭二烯酸的统称, 具有多种重要的生理活性, 其中*c9,t11*-CLA具有很强的抗癌作用, *t10,c12*-CLA具有减肥和防治II型糖尿病的功能。在自然界, CLA主要存在于牛羊的乳中, 通常包含*c9,t11*-CLA和*t10,c12*-CLA等异构体, 但含量很低。牛羊瘤胃中的一些微生物参与了不同CLA异构体的生物合成。本文综述了CLA的结构和功能、CLA异构体分析方法、乳中CLA的组成、乳中CLA的合成途径、提高乳中CLA含量的方法和瘤胃中合成CLA的微生物的研究进展, 为开展更深入的研究提供一些思路和参考。

关键词: 共轭亚油酸; 异构体; 生物合成; 乳

Research Progress in the Mechanism of the Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid Isomers in Milk

FU Jin-heng¹, DING Yi-chun², LI Hai-xing¹, CHEN Yan¹, LI Chao-bo¹, CAO Yu-sheng¹, LIU Xiao-hua^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-German Joint Research Institute, Nanchang 330047, China;

2. Xingtai Animal Husbandry & Veterinary Station of Jiangyan County, Taizhou 225539, China)

Abstract: Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective term for geometric and positional isomers of linoleic acid with conjugated double bonds. They have been found to be responsible for many biological properties that are related to human health. *c9,t11*-CLA has anti-carcinogenic activity, and *t10,c12*-CLA seems to be specifically responsible for reducing body fat and enhancing energy metabolism. CLA occurs naturally in milk fat in a relatively low level. Several CLA isomers such as *c9,t11*-CLA and *t10,c12*-CLA are detected in milk. These CLA isomers are mainly biosynthesized by some bacteria in the rumen. The structure and functions of CLA, analytical methods for CLA isomers, the composition and biosynthesis pathways of CLA in milk, methods of enhancing CLA content in milk and microorganisms involved in the biosynthesis of CLA in the rumen are reviewed in this paper.

Key words: conjugated linoleic acid; isomer; biosynthesis; milk

中图分类号: TS203.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0338-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323068

乳是牛羊等产子后从乳腺分泌的一种乳白色的不透明胶体性液体, 是人们日常生活中经常食用的一种食品。乳中物质组成复杂, 主要营养成分为蛋白质、脂肪、糖类、矿物质和维生素等。乳中蛋白质含有人体所需的各种必需氨基酸, 是一种完全蛋白质, 其消化、吸收率均高于肉、蛋和鱼类食品。乳脂中含有较多的低级挥发性脂肪酸, 消化性好, 易被人体消化吸收。乳所含糖类中乳糖占99%以上, 乳糖不仅有利于人体对钙的吸收, 还能促进肠道内益生菌的生长和B族维生素的合成。乳中钙和磷的含量也较高, 且比例适当, 是人体每日所需钙和磷的优质食物来源。其中的钙多以酪蛋白钙的形式存在, 易于人体吸收利用, 能有效预防婴幼儿佝偻病

和老年人骨质疏松症。此外, 乳中还含有一些能调节人体免疫功能的物质。因此, 乳是人类不可多得理想天然食品之一。

近年来的研究表明, 乳的乳脂中含有一些具有抗癌、改善胰岛素抵抗等活性的十八碳共轭二烯酸, 通常称之为共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)异构体, 且在自然界中, CLA主要存在于反刍动物的乳脂和体脂中。目前, 人们正在深入研究乳中共轭亚油酸异构体的合成机制, 希望能找到增加乳中CLA异构体含量的有效方法, 从而进一步提高乳的营养保健功能。本文综述了乳中CLA异构体合成机制的最新研究进展、存在问题和难点, 为开展更深入的研究提供一些思路和参考。

收稿日期: 2013-07-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260373); 江西省科技厅科技计划项目(20122BBE51007); 江西省教育厅科研计划项目(GJJ12019)

作者简介: 付金衡(1970—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为食品微生物。E-mail: fujinheng@ncu.edu.cn

*通信作者: 刘晓华(1974—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: liuxiaohua@ncu.edu.cn

1 CLA的结构和功能

CLA是一组十八碳共轭二烯酸的统称,共轭双键有4种位置异构(8,10; 9,11; 10,12; 11,13)和4种几何异构(*cis,cis*; *cis,trans*; *trans,cis*; *trans,trans*),共有多达16种异构体,如:*c9,t11*-CLA和*t10,c12*-CLA(图1)。CLA的生产方法有两种,一种是化学异构法,另一种是生物转化法。在高温下通过强碱可以将亚油酸异构成CLA,该产物是含有8,10-CLA、9,11-CLA、10,12-CLA和11,13-CLA多种异构体的复杂混合物^[1],再用特定的脂肪酶来选择性酯化CLA的不同异构体,经尿素包含富集,就可以获得纯度大于93%的*c9,t11*-CLA和*t10,c12*-CLA,但其得率低^[2]。生物转化法是目前研究的重点,利用乳酸菌等微生物中的亚油酸异构酶可以将亚油酸特异性合成*c9,t11*-CLA或*t10,c12*-CLA。

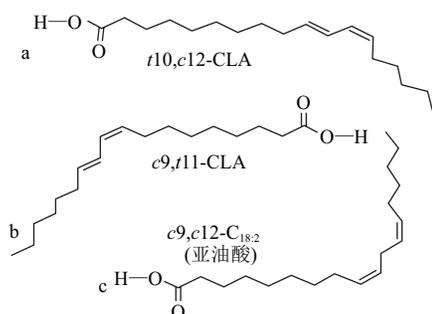


图1 两种CLA和亚油酸异构体的化学结构图

Fig.1 Chemical structures of two CLA and linoleic acid isomers

Pariza等^[3-4]通过艾姆氏实验发现牛肉提取物有抑制诱变作用,进一步研究发现该提取物具有抗癌活性,并在1987年确定其中的活性成分就是CLA。此后,开启了CLA活性研究的新方向。从已报道的文献看,CLA活性研究主要集中在动物和细胞模型。通过二甲基胍处理大鼠来诱导结肠癌,灌喂CLA混合物后,凋亡指数上升了251%。因此,CLA抑制二甲基胍诱导的结肠癌的机制可能和细胞凋亡有关^[5]。还有研究发现CLA异构体混合物通过降低小鼠体脂的含量来改善其脂肪组织的胰岛素敏感性^[6]。

近年来,越来越多的研究表明不同的CLA异构体具有不同的生理活性。胰岛素抵抗模型鼠经连续饲喂*t10,c12*-CLA,其葡萄糖耐受能力显著提高,同时肝脏脂肪含量降低,肝功能改善,但体质量没有改变^[7]。通过高浓度胰岛素来诱导肝细胞构建胰岛素抵抗模型,*t10,c12*-CLA处理后能显著提高胰岛素抵抗细胞的葡萄糖消耗量和磷酸蛋白激酶B的水平,而*c9,t11*-CLA没有改善细胞胰岛素抵抗的活性,表明*t10,c12*-CLA有改善胰岛素信号通道的作用^[8]。Huang Guidong等^[9]发现*c9,t11*-CLA比CLA混合物有更强的抑制人结肠癌细胞Caco-2增殖的活性,

并且这种抑制活性与其促细胞凋亡有关。另有研究发现*c9,t11*-CLA可抑制苯并芘诱导的小鼠前胃癌的发生^[10]。此外,*c9,t11*-CLA能降低化学致癌剂抑制间隙连接细胞间通讯作用,表明其可抑制肿瘤的恶性转化^[11]。因此,CLA异构体与其生理活性之间存在一定的构效关系,还需要通过细胞模型、动物模型和人体实验进行系统研究和确证,并从分子和基因水平了解其不同作用机制。

2 CLA异构体分析方法

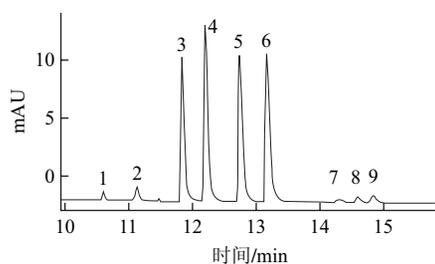
CLA中含有一对共轭双键,在紫外波长231nm处有强吸收,通过紫外分光光度计可以进行定性分析并测定CLA的总量^[12]。有报道通过核磁共振来定量分析牛肉中CLA的含量^[13],但该方法不能确定CLA异构体组成。乳中的CLA主要以三酰甘油酯的形式存在,目前,常用的CLA异构体分析方法有HPLC和GC两种,乳脂先要经过甲酯化衍生处理后才能进行测定。CLA在甲酯化衍生时因酯化试剂、酯化温度和时间不同而影响其分析结果。酸催化甲酯化适合游离脂肪酸和以甘油酯形式存在的脂肪酸,但是易于将*c/t*-异构体转变成*t,t*-异构体,并形成烯丙基甲氧基衍生物(AMD)。

HCl/MeOH和BF₃/MeOH酯化法随反应时间和温度增加,*c9,t11*-CLA和*t10,c12*-CLA都减少,而*t9,t11*-CLA和*t10,t12*-CLA增加,并有AMD形成。以三酰甘油酯形式存在的CLA用HCl/MeOH、BF₃/MeOH和NaOMe来甲酯化时,只有NaOMe不产生AMD^[14]。Ostrowska等^[15]发现酸和碱催化甲酯化两种方法均会导致CLA异构体组成和总量的变化,HCl和BF₃甲酯化方法显著增加了*t,t*-CLA的量,降低了*c/t*-CLA的量。用四甲基胍甲酯化时,CLA酯化不完全,并产生*t,t*-异构体。因此,CLA样品如能不经甲酯化衍生处理,直接进行分析的结果会更准确。

高效液相色谱(HPLC)和气相色谱(GC)在用于分析CLA异构体时,甲酯化衍生处理会改变异构体的组成,且每个样品的分析时间长达60min,操作十分繁琐费时,无法满足大量样品准确测定的要求。Liu Xiaohua等^[16]通过毛细管电泳(CE)成功实现了7种CLA异构体的完全分离,建立了CE分析CLA异构体的新方法。样品无需甲酯化衍生处理,每个样品的分析时间小于15min(图2),比HPLC和GC的分析时间缩短了3/4,实现了CLA异构体的快速、准确分析。已成功的用于分析乳中CLA异构体组成和含量^[17]。

通常乳样中各种CLA异构体的组成和含量差别很大,由于GC所用氢火焰检测器(FID)的灵敏度高于HPLC的紫外检测器,因此,当样品中CLA含量低于紫外检测极限时,应使用GC来分析。当GC难以对其中含量很少的异构体进行分析和鉴定时,采用气质联用法(GC-MS),通过高分辨

率质谱可以修正GC氢火焰检测器的非选择性,从而鉴定样品中微量的CLA异构体。



峰1~9分别是*c9,c11*-CLA、*c11,c13*-CLA、*c/t*-8,10-CLA、*c/t*-10,12-CLA、*c/t*-11,13-CLA、*c/t*-9,11-CLA、*t9,t11*-CLA、*t11,t13*-CLA和一个未知的*t,t*-CLA。

图2 毛细管电泳分离CLA混合物的色谱图

Fig.2 Separation of CLA mixture by capillary electrophoresis

3 乳中CLA的组成

早在1935年,人们就发现夏季产的牛乳比冬季产的在233nm波长处有更强的吸收峰^[18]。随后通过GC分析确定了乳中含有一些CLA异构体,如曾命名为瘤胃酸的*c9,t11*-CLA。随着现代化学分析技术的发展,气质联用(GC-MS)、液质联用(HPLC-MS)、傅里叶变换红外(FTIR)等方法已用于各种食物中CLA异构体组成和含量的测定。通过分析常见食物中CLA的含量,发现植物性食物中不含CLA,蛋类、鱼类和非反刍动物的肉中含有非常低的CLA,而反刍动物的乳和肉中的CLA含量较高,且乳中的CLA含量比肉中的高。

采用银离子充填色谱柱进行高效液相色谱(Ag^+ -HPLC)分析牛乳,发现其中的CLA异构体主要是*c9,t11*-CLA,少量的*t7,c9*-CLA和*t10,c12*-CLA,以及数种微量的未知CLA异构体,给乳牛加喂鱼粉饲料,乳脂中CLA异构体的含量和组成没有显著变化^[19]。羊乳中*c9,t11*-CLA也是最主要的CLA异构体,含量为4.491mg/g乳脂,另有*t9,t11*-CLA、*t11,t13*-CLA、*t10,c12*-CLA和*t8,c10*-CLA等9种异构体^[20]。

王腊梅等^[17]采用CE分析比较了牛乳、水牛乳和羊乳中CLA异构体的含量和组成,发现牛乳中的CLA总量最高,为9.281mg/g乳脂,3种乳中主要的CLA异构体均为*c9,t11*-CLA。热处理会降低乳中CLA的总量,且处理温度越高,CLA总量降低越显著。UHT牛乳在存贮6个月过程中其CLA总量和异构体的组成均无显著变化,表明在密闭不透光的环境下牛乳中的CLA性质稳定。有研究发现羊乳在3~6月间,鲜乳中*c9,t11*-CLA的含量从22mg/g乳脂降到11mg/g乳脂^[21]。这些研究均表明乳中的CLA以*c9,t11*-CLA为主,并含有多种其他异构体,它们的含量和组成常常受到动物品种、生产季节和加工方法等因素的影响。通过动物育种和改变饲养方法可以提高乳中CLA异

构体的含量,同时要注意加工过程对乳中CLA的影响,特别是热处理的不利影响。

4 乳中CLA的合成途径

现有研究表明,牛羊乳中的CLA与不饱和脂肪酸在瘤胃中的生物氢化有关,该氢化过程由一些瘤胃菌完成。CLA是生物氢化过程中的中间产物,其中一部分CLA异构体从瘤胃逸出,通过小肠吸收进入乳脂中。剩余部分在瘤胃中被继续生物氢化成反式油酸(trans vaccenic acid, TVA),当TVA到达乳腺时,被乳腺组织中的 Δ^9 -脱氢酶还原成*c9,t11*-CLA(图3)。

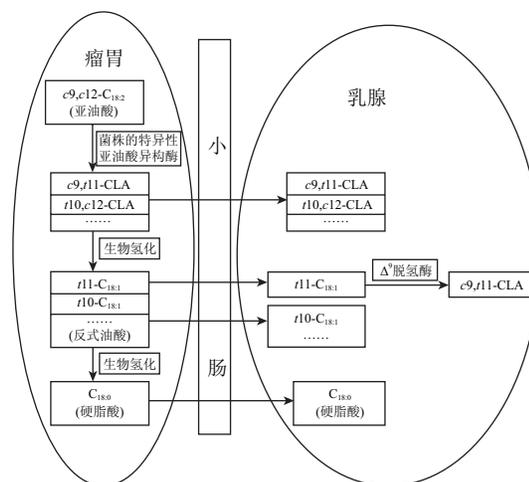


图3 乳中CLA的合成途径

Fig.3 Biosynthesis pathways of CLA in milk

人们在研究瘤胃微生物*Butyrivibrio fibrisolvens*生物氢化亚油酸时,就发现会形成*c9,t11*-CLA中间产物,并会进一步氢化成饱和脂肪酸^[22]。调控山羊瘤胃消化代谢可提高瘤胃中的TVA,羊乳中CLA的含量与TVA呈正相关^[23]。放射性同位素标记实验证实瘤胃菌可以将亚油酸异构化成*c9,t11*-CLA和*t10,c12*-CLA,并可继续氢化成TVA,在反应过程中还有*t9,c11*-CLA、*c9,c11*-CLA、*t9,t11*-CLA、*c10,t12*-CLA、*c10,c12*-CLA和*t10,t12*-CLA产生^[24],表明瘤胃菌的生物氢化过程很复杂。用富含TVA的部分氢化植物油灌注牛的皱胃,乳脂中*c9,t11*-CLA增加了17%,如乳腺中 Δ^9 -脱氢酶的活性被抑制,则*c9,t11*-CLA会降低65%左右,可见乳脂中大部分*c9,t11*-CLA是 Δ^9 -脱氢酶转化TVA而成^[25]。

山羊瘤胃细菌体外合成CLA时,瘤胃细菌可将亚油酸转化成*c9,t11*-CLA和*t10,c12*-CLA两种异构体,另有*t9,t11*-CLA等3种少量的异构体,由此可见,瘤胃中含有一些能特异性合成CLA异构体的微生物。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,这证明了CLA是瘤胃菌生物氢化亚油酸过程的

中间产物, 有氧条件抑制了瘤胃菌的生物氢化反应, 从而促进了CLA的累积^[26]。瘤胃中的生物体很复杂, 除了细菌外, 还有大量的真菌和原虫。有研究发现, 瘤胃中不仅细菌参与合成*c9,t11-CLA*和*t10,c12-CLA*, 原虫也能合成较多的*c9,t11-CLA*^[27]。

目前, 人们对乳中CLA的生物合成途径还只是一个初步的认识。瘤胃中参与亚油酸异构化的微生物种类和数量, 以及异构化和生物氢化之间的关系还有待更深入的研究。此外, 充分了解乳腺中脱氢酶的种类及其酶活的调控机理才能明晰乳中CLA的生物合成代谢途径。

5 提高乳中CLA含量的方法

牛羊的乳是人们获得*c9,t11-CLA*和*t10,c12-CLA*两种特殊生理活性CLA异构体的最主要天然食物来源, 但其含量很低, 无法满足保健功能的需要。为提高乳中CLA的含量, 国内外已进行了较多的研究。目前研究最多的方法是增加CLA合成所需的底物, 即给牛羊饲喂富含亚油酸的饲料。体外研究发现, 添加大豆油后, 山羊瘤胃液中*c9,t11-CLA*、*t10,c12-CLA*、*t10-C_{18:1}*和*t11-C_{18:1}*的含量始终显著高于对照组, *t10,c12-CLA*和TVA的含量随着培养时间的延长而逐渐增加, 表明添加富含亚油酸的大豆油有利于CLA和TVA的累积^[28]。

山羊体内研究发现, 饲喂富含亚油酸的葵花油后, 瘤胃中的pH值、NH₃-N、微生物粗蛋白浓度和挥发性脂肪酸(VFA)含量均无显著影响, 而TVA和*c9,t11-CLA*的含量均升高, 表明在饲料中添加一定量的葵花油不影响山羊瘤胃消化代谢, 可以提高瘤胃中CLA和TVA的积累^[29]。Tora等^[30]给羊饲喂富含多不饱和脂肪酸的鱼油和葵花籽油, 发现其对瘤胃pH值、VFA和营养消化都没有影响, 瘤胃中的TVA和*c9,t11-CLA*含量增加, 乳脂中的*c9,t11-CLA*含量显著提高, 其研究表明, 多不饱和脂肪酸抑制了瘤胃中亚油酸的完全氢化, 从而使TVA和*c9,t11-CLA*得以累积。经过比较葵花籽、亚麻籽和菜籽3种不同油料籽实, 发现饲喂葵花籽后, 乳牛乳脂和血浆中CLA和TVA的含量均显著高于菜籽和亚麻籽^[31]。这些体内研究结果均表明通过饲喂亚油酸可以提高乳中CLA的含量。

此外, 有研究通过改变瘤胃内环境来提高乳中CLA的含量。黄花蒿提取物在体外可以增加山羊瘤胃培养液中TVA的含量, 在体内会降低瘤胃NH₃-N和VFA的浓度, 羊乳中CLA和产乳量均有提高^[32]。将能生物合成CLA的*Bifidobacterium breve*与瘤胃菌共培养, 瘤胃培养液中CLA的含量升高^[33], 该研究为增加乳中特殊生理活性CLA异构体的含量提供了一种新的途径。通过不同饲料喂养乳牛, 获得CLA含量为

5.2mg/g和16.9mg/g乳脂的牛乳, 经专业人员对两种乳的口感、色、香、味进行品评, 发现没有显著差别, 表明富含CLA的牛乳易于被消费者所接受^[34]。目前, 研究较多的是通过添加富含亚油酸的底物来提高乳中CLA的含量, 由于亚油酸对瘤胃菌有一定毒性作用, 且产生非特异性的CLA异构体, 因此, 该方法在实际应用上有很大的局限性。通过向瘤胃中添加或调控能特异性合成CLA异构体的微生物将是提高乳中特定CLA异构体的有效方法之一。

6 瘤胃中合成CLA的微生物

牛羊瘤胃中的微生物, 特别是一些含有特殊亚油酸异构酶的菌株对乳中CLA异构体的特异性合成起着最基础和最根本的作用。无论是饲喂富含多不饱和脂肪酸的饲料, 还是饲喂一些植物源性的提取物, 这些方法都是通过改变瘤胃菌的活性来提高乳中CLA的含量。通过定量PCR和变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术研究, 发现不同牧草和鱼油均会引起瘤胃中微生物种类和数量的变化^[35]。因此, 为提高乳中特定生理活性CLA异构体的含量, 就必须先了解瘤胃中能合成CLA的主要微生物及其性质。

由于瘤胃菌群系统十分复杂, 加之菌株分离培养很困难, 目前人们对瘤胃中参与合成CLA的菌株及其代谢了解仍很少。最初人们在研究瘤胃细菌参与生物氢化反应时偶然发现了*B. fibrisolvens*能特异性合成*c9,t11-CLA*^[36]。现有的研究表明, *B. fibrisolvens*是瘤胃中合成*c9,t11-CLA*的最主要瘤胃菌, 其合成*c9,t11-CLA*的速率是其他瘤胃菌的数倍^[37]。Kim等^[38]从饲喂谷物的乳牛瘤胃中取样, 经富集培养, 分离到能合成*t10,c12-CLA*的巨型球菌, 经鉴定该菌株是*Megasphaera elsdenii*。但也有研究发现*M. elsdenii*并不能合成CLA^[39]。

同位素标记研究发现*B. fibrisolvens*和*Clostridium proteoclasticum*虽然主要合成*c9,t11-CLA*, 但是也会产生少量的*t9,t11-CLA*、*t9,c11-CLA*和*c9,c11-CLA*。此外, *Propionibacterium acnes*能合成*t10,c12-CLA*和少量*c10,c12-CLA*^[40]。*B. 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}*^[41]。孙国权^[42]、吴凌^[43]等通过16S rRNA鉴定, 分别从乳牛瘤胃中成功分离出*M. elsdenii*和*P. acnes*, 但他们只测定了这两株菌的瘤胃发酵特性, 并未检测它们是否能合成CLA。由此可见, 只有建立高通量的筛选方法, 才能从种类和数目十分庞大的瘤胃菌群中分离到能特异性合成不同CLA异构体的菌株, 通过研究这些菌株中亚油酸异构酶基因的差异, 将会进一步了解它们特异性合成CLA异构体的机理。

7 展 望

CLA异构体具有抗癌、抗II型糖尿病等生理活性,其活性的结构与效应关系还有待更深入的研究。乳是人们获得CLA的最主要食物来源,开发出富含特定CLA异构体的乳产品将会产生显著的社会效益和经济效益。目前,对乳中*c9,t11*-CLA和*t10,c12*-CLA两种生理活性异构体的特异性合成及机制还鲜有研究报道。随着高通量分析和筛选技术的应用,瘤胃中更多的能生物合成*c9,t11*-CLA和*t10,c12*-CLA的菌株将会被分离出来,通过限制性片段长度多态性分析等分子生物学技术可以深入了解这些菌株中亚油酸异构酶基因的多态性,从菌株的亚油酸异构酶基因水平认识乳中*c9,t11*-CLA和*t10,c12*-CLA的特异性合成机理。由于瘤胃菌群十分复杂,常规的微生物分离培养方法难以研究瘤胃菌群以及CLA合成菌株种类和数量的变化,PCR-DGGE技术可以用来研究瘤胃菌群对不同CLA异构体合成菌株生长和CLA合成代谢的影响。此外,着力研究乳腺中脱氢酶的种类及其酶活的调控机理,深入了解乳中CLA的生物合成代谢途径,为提高乳中特定生理活性的CLA异构体含量提供科学依据。

参考文献:

- CHRISTIE W W, DOBSON G, GUNSTONE F D. Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid[J]. *Lipids*, 1997, 32: 1231.
- NAGAO T, YAMAUCHI-SATO Y, SUGIHARA A, et al. Purification of conjugated linoleic acid isomers through a process including lipase-catalyzed selective esterification[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(6): 1429-1433.
- PARIZA M W, ASHOOR S H, CHU F S, et al. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger[J]. *Cancer Lett*, 1979, 7(2/3): 63-69.
- HA Y L, GRIMM N K, PARIZA M W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid[J]. *Carcinogenesis*, 1987, 8(12): 1881-1887.
- PARK H S, RYU J H, HA Y L, et al. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA[J]. *British Journal of Nutrition*, 2001, 86(5): 549-555.
- PARRA P, SERRA F, PALOU A. Moderate doses of conjugated linoleic acid isomers mix contribute to lowering body fat content maintaining insulin sensitivity and a noninflammatory pattern in adipose tissue in mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21: 107-115.
- STRINGER D M, ZAHRADKA P, DECLERCQ V C, et al. Modulation of lipid droplet size and lipid droplet proteins by *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid parallels improvements in hepatic steatosis in obese, insulin-resistant rats[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801: 1375-1385.
- LI Chengcheng, WANG Jihui, WANG Han, et al. Effect of *trans*10,*cis*12-conjugated linoleic acid on glucose consumption of insulin resistance Chang liver cells[J]. *J Food Biochem*, 2011, 35: 1593-1602.
- HUANG Guidong, ZHONG Xianfeng, CAO Yusheng, et al. Antiproliferative effects of conjugated linoleic acid on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2007, 16 (Suppl 1): 432-436.
- 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 Agr Food Chem*, 2010, 58(5): 3177-3183.
- RAKIB M A, KIM Y S, JANG W J, et al. Attenuation of 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced gap junctional intercellular communication (GJIC) inhibition in MCF-10A cells by *c9,t11*-conjugated linoleic acid[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 12022-12030.
- BARRETT E, ROSS R P, FITZGERALD G F, et al. Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures[J]. *Appl Environ Microbiol*, 200, 73: 2333-2337.
- MARIA R M, COLNAGO L A, FORATO L A, et al. Fast and simple nuclear magnetic resonance method to measure conjugated linoleic acid in beef[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 6562-6564.
- YEONHWA P, 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.
- OSTROWSKA E, DUNSHEA F R, MURALITHARAN M, et al. Comparison of silver-ion high performance liquid chromatographic quantification of free and methylated conjugated linoleic acids[J]. *Lipids*, 2000, 35(10): 1147-1153.
- LIU Xiaohua, CAO Yusheng, CHEN Yan. Separation of conjugated linoleic acid isomers by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1095: 197-200.
- 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.
- BOOTH R G, KON S A. A study of seasonal variation in butter fat: a seasonal spectroscopic variation in the fatty acid fraction[J]. *Biochem J*, 1935, 29(1): 133-137.
- KRAMER J K G, CRUZ-HERNANDEZ C, et al. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(Suppl1): 1137-1145.
- RODRIGUEZ-CASTANEDAS J L, PENA-EGIDO M J, GARCIA-MARINO M, et al. Quantitative determination of conjugated linoleic acid isomers by silver ion HPLC in ewe milk fat[J]. *J Food Compos Anal*, 2011, 24: 1004-1008.
- 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.
- 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.
- 王小静. 调控反刍动物消化代谢提高奶中共轭亚油酸及其机理的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007: 74-78.
- LEE Y J, JENKINS T C. Identification of enriched conjugated linoleic acid isomers in cultures of ruminal microorganisms after dosing with 1-¹³C-linoleic acid[J]. *The Journal of Microbiology*, 2011, 49(4): 622-627.
- CORL B A, BAUMGARD L H, DWYER D A, et al. The role of Δ^9 -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2001, 12: 622-630.
- 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.

- [27] OR-RASHID M M, ALZAHAL O, MEBRIDE B W. Comparative studies on the metabolism of linoleic acid by rumen bacteria, protozoa, and their mixture *in vitro*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89: 387-395.
- [28] 侯俊财, 刘艳平, 桂仕林, 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 尹福泉, 嘎尔迪, 刘瑞芳, 等. 不同油料籽实对奶牛瘤胃液、血浆脂肪酸组成及乳脂CLA含量的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(3): 1039-1046.
- [32] 王丽芳. 添加菊科植物黄花蒿提取物对奶山羊乳中CLA含量影响及机理研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010: 29-88.
- [33] PARK H G, HEO W, KIM S B, et al. Production of conjugated linoleic acid (CLA) by *Bifidobacterium breve* LMC520 and its compatibility with CLA-producing rumen bacteria[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(3): 984-988.
- [34] KHANAL R C, DHIMAN T R, URE A L, et al. Consumer acceptability of conjugated linoleic acid-enriched milk and cheddar cheese from cows grazing on pasture[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(5): 1837-1847.
- [35] HUWS S A, LEE M R F, MUETZEL S M, et al. Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2010, 73: 396-407.
- [36] HUGHES P E, HUNTER W J, TOVE S B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: purification and properties of *cis-9,trans-11-octadecadienoate* reductase[J]. J Biol Chem, 1982, 257(7): 3643-3649.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] LIU Xiaohua, LI Haixing, CHEN Yan, et al. Method for screening of bacterial strains biosynthesizing specific conjugated linoleic acid isomers[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60: 9705-9710.
- [40] WALLACE R J, MCKAIN N, SHINGFIELD K J, et al. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria[J]. Journal of Lipid Research, 2007, 48: 2247-2254.
- [41] 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.
- [42] 孙国权, 刘国文, 邢欣, 等. 奶牛瘤胃埃氏巨型球菌的分离鉴定及对乳酸发酵的影响[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(9): 1115-1119.
- [43] 吴凌, 赵明娟, 夏成, 等. 痤疮丙酸杆菌的分离鉴定及其对瘤胃微生物发酵的影响[J]. 微生物学报, 2009, 49(2): 168-173.