

共轭亚油酸高产菌株的分离与鉴定

王武^{1,2}, 章立新¹, 潘见²

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

(2. 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽合肥 230009)

摘要: 共轭亚油酸 (CLA) 因具有抗肿瘤、增强免疫力、抗动脉粥样硬化、减肥、抗氧化等功效, 在医药与保健食品领域显示了巨大的应用潜力。目前获得 CLA 的主要途径是化学合成法, 化学合成法产量高, 但产物异构体众多, 成分复杂, 分离提纯困难, 生物法因其反应条件温和, 产物成分较单一, 在食品医药领域展现出了良好前景。为筛选共轭亚油酸高产菌株, 本文在有氧条件下, 采用 MRS 培养基从泡菜环境中分离出 16 株产共轭亚油酸的菌株, 其中 PC-3 菌株具有较高的 CLA 转化率, 且能将亚油酸转化为具有生物活性的 c9, t11-CLA 和 t10, c12-CLA。经形态学特征 (扫描电子显微镜) 分析、生理生化试验分析 (API-50CHL) 及 16S rDNA 序列分析及同源性分析, PC-3 菌株被鉴定为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* PC-3), 其 16S rDNA 基因序列长度为 1460 bp, 该序列 GenBank 的登陆号为 JX270774.1。

关键词: 共轭亚油酸; 植物乳杆菌; 菌株鉴定; 有氧发酵; 泡菜环境

文章篇号: 1673-9078(2016)8-128-133

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.020

Isolation and Identification of Conjugated Linoleic Acid-producing *Lactobacillus* Strains from Fermented Pickle Brines

WANG Wu^{1,2}, ZHANG Li-xin¹, PAN Jian²

(1.School of Biology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China) (2.Engineering Research Centre of Bio-Process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Conjugated linoleic acid (CLA) has wide application potential in medicine, food, and health products, because of its anticancer, immune regulatory, anti-atherosclerosis, antiobesity, and antioxidant activities. Currently, commercial CLA is typically produced through alkali isomerisation using sunflower oil as raw material, generating a mixture of CLA with undesirable isomer by-products. Use of CLA for nutraceutical and medicinal purposes requires safe isomer-selective synthesis. Hence, CLA biosynthesis naturally attracted much attention because of its specificity and safety. The aim of the present study was to isolate and identify *Lactobacillus* strains from the fermented pickle brines, which can convert linoleic acid (LA) into CLA under aerobic conditions. Using serial dilutions and plate streaking in de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar medium under aerobic conditions, 16 CLA-producing *Lactobacillus* strains were isolated, among which PC-3 exhibited the highest production of CLA. Based on analyses using SEM, API-50CHL, and 16S rRNA gene sequencing, PC-3 was identified as *Lactobacillus plantarum*. The 16S rDNA gene sequence (1460bp) was submitted to GenBank under the accession number JX270774.1.

Key words: conjugated linoleic acid; *Lactobacillus plantarum*; identification; aerobic condition; fermented pickle brines

共轭亚油酸 (Conjugated linoleic acid, CLA) 是共轭双键位于 7, 9, 8, 10, 9, 11, 10, 12, 11, 13 位置的十八碳二烯酸的位置异构体和几何异构体的统称, 研究表明, 其 c9, t11-CLA 和 t10, c12-CLA 具有抗肿瘤、增强免疫力、抗动脉粥样硬化、减肥、抗氧化等功效^[1-3], 在医药与保健食品领域显示了巨大的

收稿日期: 2015-09-05

基金项目: 安徽省年度重点科研项目 (12070403077)

作者简介: 王武 (1968-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品生物化工
通讯作者: 潘见 (1955-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程

应用潜力。天然的 CLA 很少, 主要存在于瘤胃动物的乳、肉制品中, 且含量极低, 目前获得 CLA 的主要途径是化学合成法, 化学合成法制得的产物异构体众多, 成分复杂, 分离提纯困难, 制约了其在食品医药领域的应用。生物合成法因其反应条件温和, 产物成分较单一, 在食品医药领域展现出了良好应用前景。

最早被发现可以进行生物合成 CLA 的是溶纤维丁酸弧菌, 该菌主要存在于瘤胃动物的瘤胃中, 经过一系列的生化过程, 可以将 LA 转化成 CLA, 最终使其乳肉制品中含有少量天然 CLA, 随后大约有 250 余株菌株被发现, 主要属于丁酸弧菌属 (*Butyrivibrio*)、丙

酸菌属(*Propionibacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)等^[4], 这些菌株均可经底物亚油酸(LA)诱导产生亚油酸异构酶, 转化LA生产具有生物活性的CLA。但丁酸弧菌属厌氧菌, 需要严格的厌氧发酵条件, 应用受到限制。乳杆菌属于兼性厌氧菌, 且是益生菌, 其亚油酸异构酶的作用位点可以是脂肪酸的c12双键, 也可以是c9双键, 能把LA转化为c9, t11-CLA或和t10, c12-CLA, 产物可直接从细胞培养液中提取^[5], 乳杆菌发酵条件温和、易控制, 发酵设备简单, 具备较好的工程化应用潜力。从已知菌株出发诱变筛选和从环境中筛选新的菌株^[6-9]仍是目前生物合成研究的热点。

腌、泡菜是我国传统的乳酸菌发酵食品, 是乳杆菌的天然宝库, 从腌、泡菜卤汁中分离产CLA菌株是筛选目标菌株的有效途径, 国内外已有部分学者进行了这方面的研究, 其中Liu P等^[9]在厌氧条件下从腌菜中分离得到了43株产CLA的菌株, 并成功鉴定了其中高产的lp15菌株。本文在有氧条件下, 采用Man Rogosa Sharpe (MRS)培养基, 从黄瓜泡菜、萝卜泡菜、豇豆泡菜等环境中筛选较高CLA转化率的乳杆菌菌株, 并采用扫描电子显微镜(SEM)、API 50CHL生理生化试验和16S rDNA序列分析方法对其进行鉴定, 以期CLA生物合成提供更丰富的菌株资源。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

黄瓜泡菜、萝卜泡菜、豇豆泡菜, 合肥九华山路农贸市场; CLA甲酯(≥99%)、LA甲酯(≥99%)Sigma公司; 戊二醛, 国药集团化学试剂有限公司; 95%乙醇, 上海振企化学试剂有限公司; 无水乙醇, 天津市光复科技发展有限公司; API 50 CHL液体培养基与API 50 CH菌种鉴定试剂条, 北京宝杰罗生物科技有限公司; PCR引物7f: 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3'、1540r: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 仪器与设备

QP-2010气相色谱-质谱联用仪, 日本Shimadzu公司; CP-Sil88色谱柱 Varian公司; JSM-6490LV扫描电子显微镜, 日本电子制造; 3730测序列分析仪, 美国ABI公司; H6-1凝胶成像系统, Gene Genius公司; DYY-8型稳压稳流电泳仪, 上海琪特分析仪器有限公司; CT14RD台式高速冷冻离心机, 上海天美生化仪器设备工程有限公司; SW-CJ-1F超净工作台, 苏

净集团安泰公司; HQ45Z恒温摇床 中国科学院武汉科学仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的分离纯化

吸取1 mL泡菜汁接入MRS液体培养基, 37℃下培养24 h。然后用无菌水对培养液进行10倍梯度稀释, 选择 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 的稀释度, 取100 μL稀释后的菌液, 涂布于MRS固体培养基, 37℃恒温培养24-48 h。观察菌落形态并进行镜检, 对初步筛选出的菌株进行划线分离(圆形、表面光滑、乳白色菌落; 无芽孢杆菌), 反复纯化, 得纯菌株于斜面试管中保存备用。

1.3.2 菌株产物分析

1.3.2.1 诱导培养

菌株接种于MRS液体培养基活化2次后诱导培养, 40 mL MRS液体培养基, 1.50% (V/V)亚油酸, 2.5% (V/V)接种量, 37℃恒温摇床(120 r/min)培养36 h。

1.3.2.2 分离萃取

培养液经高速冷冻离心机(6000 r/min, 4℃)离心10 min, 取发酵液。采用正己烷萃取发酵液, 静置, 收集上面的正己烷层。在正己烷溶液中加入无水硫酸钠吸水干燥, 于30℃旋转蒸发, 去除有机溶剂, 得脂肪酸提取物收集在试管中, 备用。

1.3.2.3 脂肪酸甲酯的制备

加入25 μL的脂肪酸提取物和1 mL的2% H₂SO₄甲醇溶液于试管中, 在55℃下进行甲酯化(10 min), 随后用正己烷萃取, 蒸馏水洗涤2次, 静置, 取上层待测。

1.3.2.4 GC-MS检测条件

采用气质联用色谱法^[10]。CP-Sil88色谱柱(100 m×0.25 mm, 0.20 μm), 载气为氦气, 流速为1 mL/min; 升温程序为70℃(保持10 min)→5℃/min 170℃(保持15 min)→2℃/min 190℃→1℃/min 210℃(保持20 min)。进样口温度220℃, 检测器温度220℃; 柱前压182.2 kPa, 柱流速0.8 mL/min; 分流比1:30; 进样量1 μL。采用EI离子源, 离子阱温度250℃, 连接管温度220℃, 采用全离子扫描方式, 扫描质量数(m/z)范围为100~350。

1.3.2.5 CLA转化率的测定

采用外标法确定CLA含量, 根据底物LA的添加量计算出CLA的转化率(平行试验3次)。

$$\text{转化率(\%)} = \frac{\text{CLA的量}(\mu\text{L})}{\text{LA的量}(\mu\text{L})} \times 100\%$$

其中, CLA的量通过建立标准曲线计算得到。

标准曲线的制作方法为：吸取 200 μL 的 CLA 甲酯标准样品，正己烷定容于 25 mL 的容量瓶，配制浓度为 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ，分别移取 0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL 定容至 1 mL，转移至 7 个气相色谱自动进样瓶中，进行 GC-MS 分析。并以 CLA 的浓度 x ($\mu\text{L}/\text{mL}$) 为横坐标，峰面积 y ($\times 10^4$) 为纵坐标，建立得到线性回归方程为 $y=3.0246x-0.0604$ ($R^2=0.9989$)，线性相关范围为 0~4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

1.3.3 亚油酸异构酶高产菌株的鉴定

1.3.3.1 扫描电子显微镜 (SEM) 分析

样品经清洗、固定、干燥、导电处理后，在扫描电子显微镜下放大观察和拍摄菌株形态特征。菌悬液在 6000 r/m, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 条件下离心，弃上液，用无菌蒸馏水洗涤菌细胞 2 次，收集菌细胞，用无菌蒸馏水配制成不同梯度的菌细胞浓度，备用。盖玻片裁成均等的 4 片 (10 mm \times 10 mm)，洗净灭菌，加 3% 戊二醛固定过夜，再用 30%、50%、75%、90% 乙醇各脱水一次，每次脱水 15 min，再用 99.7% 乙醇脱水 3 次，每次脱水 15 min。将上述制备的样品在 -25 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中冷冻结晶 (3 小时) 后，于冷冻干燥机中 -60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 48 h。利用双面胶带把样品固定在样品托上，在样品以及样品托表面同时喷镀一层金属膜，备用。

1.3.3.2 API 50CHL 生理生化鉴定

API 50CHL 培养基是用来研究乳酸菌代谢作用的一种快速简便培养基。将分离出的菌株活化 2 次后接入 API 50CHL 液体培养基中，制成菌悬液后接入 API 50CH 菌种鉴定试剂条，用无菌液体石蜡封口，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h，检测菌株对 49 种碳水化合物的利用情况。采用 IBIS (Intelligent Bacteria Identification System, the Netherlands) 软件系统对菌株进行鉴定^[11]。

1.3.3.3 16S rDNA 序列分析鉴定

16S rDNA 在细菌碱基组成、核苷酸序列、高级结构及生物功能等方面表现出进化与保守的二重性，是微生物分类、鉴定研究中最有用和最常用的“分子计时钟”。16S rDNA 相对分子质量适中，约 1540 个核苷酸，在结构与功能上具有高度保守性，便于进行序列分析。16S rRNA 分子中既含有高度保守的序列区域 (恒定区域)，也含有高度变化的序列区域 (可变区域)，可变区域因细菌不同而异，可以利用恒定区域序列设计引物，将 16S rDNA 片段扩增出来，利用可变区域序列的差异来对不同菌属、菌种的细菌进行分类鉴定。

细菌基因组 DNA 的提取：采用 SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒。

PCR 反应体系 (50 μL)：Template (基因组)，1 μL ；Primer up (10 μM)，0.5 μL ；Primer down (10 μM)，0.5 μL ；NTP mix (10Mm each)，0.5 μL ；10 \times Taq reaction Buffer，2.5 μL ；Taq (5 U/ μL)，0.2 μL ；ddH₂O，25 μL 。通用引物为正向引物 7f (5'-CAGAGTTTGATCCTG GCT-3')，反向引物 1540r (5'-AGGAGGTGAT CCAGCCGCA-3')，均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

扩增条件：预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)；循环 94 $^{\circ}\text{C}$ (30 s)，55 $^{\circ}\text{C}$ (35 s)，72 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)，35 个循环；循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 末端延伸 8 min。

DNA 琼脂糖切胶纯化：由 PCR 产物电泳结果切割目的条带，纯化方式参照 SK1131-UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书进行。

PCR 产物由上海生工生物工程技术服务有限公司完成测序，测序结果提交至 GenBank。将菌株的 16S rDNA 序列进行 NCBI Blast 搜索，并对菌株进行同源分析。然后将筛选菌株序列与模式菌株序列一起经 ClustalX1.83 软件进行多序列比对，利用软件 MEGA5.05，分别使用 Neighbor Joining 和 Minimum Evolution 构建系统发育树^[12]。一般来说，在种分类等级上，如果 2 个分类单位间的 16S rDNA 序列同源性大于 97.5%，则可认为属于同一个种^[13]。

1.3.4 数据统计分析

试验结果以“平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)”表示。

2 结果与讨论

2.1 菌株转化产物分析

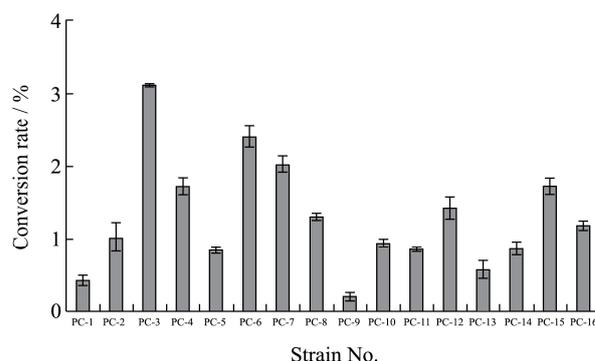


图 1 不同菌株的 CLA 转化率

Fig.1 Rates of conversion of linoleic acid to CLA by different strains

从 10 个泡菜汁样品中分离出 16 株 CLA 生成能力较强的菌株，CLA 浓度为 2.6~42.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，不同菌株的 CLA 转化率如图 1 所示。从图 1 可见，16 株菌株的 CLA 转化率范围为 0.19%~3.12%，其中 PC-3 菌

株最高, 因此选择 PC-3 进行菌株鉴定。

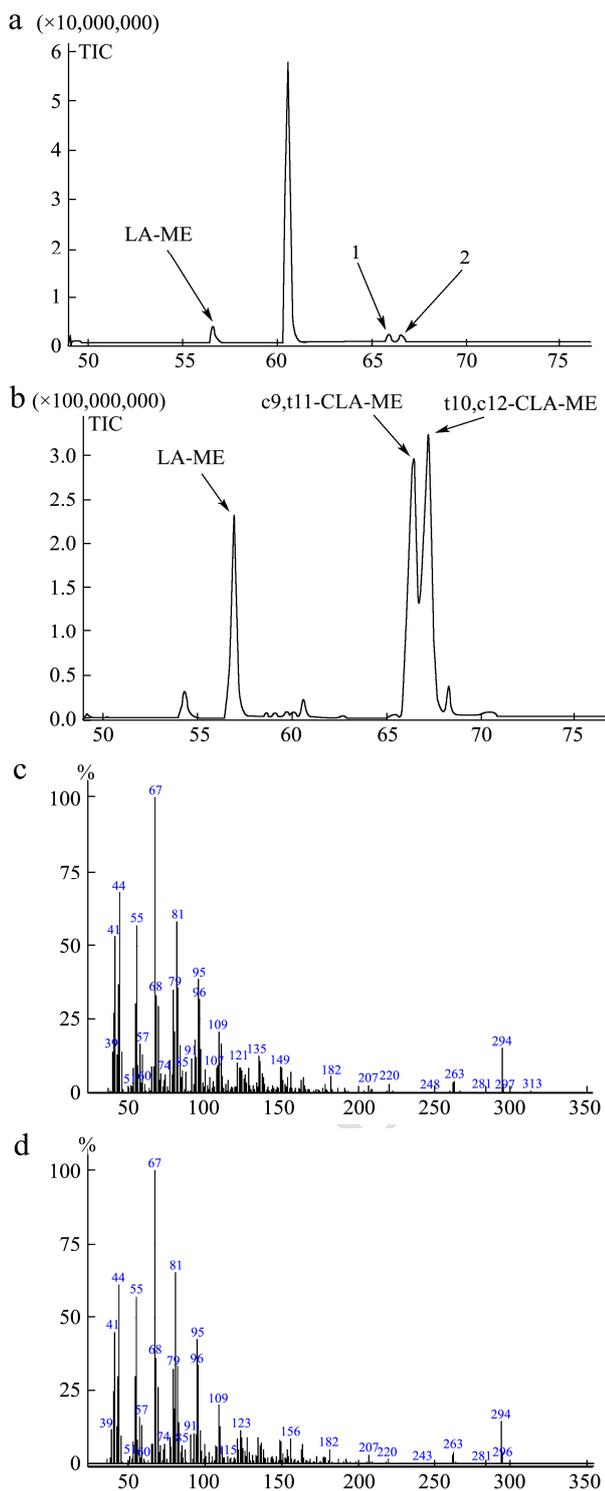


图2 气相色谱-质谱图

Fig.2 GC-MS spectra of CLA produced by the strain PC-3

注: (a)样品气相色谱图; (b)标品气相色谱图; (c) a 峰的质谱图; (d) b 峰的质谱图。

PC-3 菌株转化生产 CLA 的气质检测结果如图 2 所示。图 2a 是样品甲酯化后的样品气相色谱图, 峰 1 和峰 2 能较好地分离开, 出峰时间分别为 65.905 min、66.551 min, 与 c9, t11-CLA 甲酯、t10, c12-CLA 甲

酯的出峰时间相吻合, 并具有分子离子峰 m/z 为 294, 说明峰 1 为 c9, t11-CLA 甲酯, 峰 2 为 t10, c12-CLA 甲酯^[14], PC-3 菌株能将 LA 转化为具有生物活性的 CLA 异构体 c9, t11-CLA (54%) 和 t10, c12-CLA (46%)。PC-3 菌株转化产物与 lp15^[9]菌株在厌氧条件下的转化产物构成相同, 而 *L.acidophilus* AKU1137^[4]在微氧条件下的转化产物为 c9, t11-CLA 和 t9, t11-CLA, 其中 c9, t11-CLA 约占 23.2%, 这可能与不同菌体产生的亚油酸异构酶特性有关。

筛选实验条件下 PC-3 菌株的转化率为 3.12%, 属于较低水平, 主要是因为有氧环境下兼性厌氧菌的生长需要一个适应过程, 同时实验采用的是直接发酵法, 菌株培养过程中产酶诱导物 LA (同时也是反应底物) 抑制了菌体细胞的生长, 导致体系转化率偏低。若采用更加合理的形式, PC-3 菌株的转化率可以期望提高, 一方面有驯化菌株, 使 PC-3 菌株逐步适应有氧发酵, 另一方面采用培养→诱导→转化的分段模式, 可避免底物抑制。先在没有 LA 添加的情况下发酵培养, 在对数生长期时中途加入 LA 诱导产酶, 这样可以得到较多的生物量和产酶量, 然后使用洗涤细胞进行发酵转化, 或者利用静息细胞在缓冲液中转化, 都可以获得较高的转化率, 若进一步采用固定化洗涤细胞, CLA 的转化率可以达到直接发酵的十几倍甚至更高^[4]。

2.2 菌落及菌体的形态观察

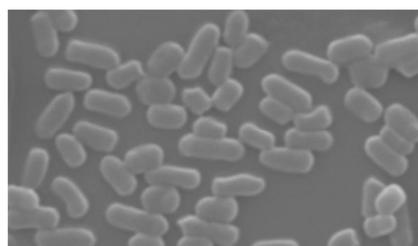


图3 PC-3 菌株的形态特征扫描电镜图(×10000)

Fig.3 Cell morphology of strain PC-3(×10000)

革兰氏染色镜检 PC-3 菌株为革兰氏阳性菌, PC-3 菌株在平板上呈圆形, 中央隆起, 表面光滑湿润, 乳白色, 边缘整齐, 其菌体形态特征如图 3 所示。由图 3 可以看出, PC-3 菌体呈短棒或长棒状, 两端顿圆, 单个或成对排列, 无鞭毛, 不产芽孢。

2.3 API 50CHL 生理生化测定结果

PC-3 菌株利用 49 种碳水化合物的发酵实验结果如表 1 所示。将实验结果输入梅里埃埃(BioMérieux)的 API 细菌鉴定系统, 结果显示 PC-3 菌株与植物乳杆菌的相似性为 99.9%, 表明 PC-3 菌株为乳杆菌属

的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

表 1 PC-3 菌株 API 生理生化反应结果

Table 1 API reaction results of strain PC-3

试验项目	结果	试验项目	结果	试验项目	结果	试验项目	结果	试验项目	结果
对照	-	D-半乳糖	+	α -甲基-D-甘露糖甙	-	蜜二糖	+	D-松二糖	+
甘油	-	D-葡萄糖	+	甲基-D-葡萄糖甙	+	蔗糖	+	D-来苏糖	-
赤藓醇	-	D-果糖	+	N-乙酰-葡萄糖胺	+	海藻糖	+	D-塔格糖	-
D-阿拉伯糖	w	D-甘露糖	+	苦杏仁甙	+	菊糖	+	D-岩藻糖	-
L-阿拉伯糖	+	L-山梨糖	+	熊果甙	+	松三糖	+	L-岩藻糖	-
D-核糖	+	L-鼠李糖	+	七叶灵	+	棉子糖	+	D-阿拉伯糖醇	+
D-木糖	-	卫茅醇	-	水杨苷	+	淀粉	-	L-阿拉伯糖醇	-
L-木糖	-	肌醇	-	纤维二糖	+	糖原	-	葡萄糖酸盐	+
阿东醇	-	甘露醇	+	麦芽糖	+	木糖醇	-	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
β -甲基-D-木糖甙	-	山梨醇	+	乳糖	+	龙胆二糖	+	5-酮基-葡萄糖酸盐	-

注：“+”为可利用此碳水化合物生长，反应呈阳性；“-”为不利用此碳水化合物生长，反应呈阴性；“w”为反应较弱。

2.4 16S rDNA 序列分析鉴定结果

16S rDNA序列测序结果表明，PC-3菌株的基因序列长度为1460 bp，将其与GenBank数据库中参考菌株进行比较，其与植物乳杆菌的相似性为99%~100%，采用Neighbor Joining法和Minimum Evolution法构建的系统发育树拓扑结构一致，其Neighbor Joining法构建的系统发育树如图4所示。

将PC-3菌株序列提交至GenBank登记，登陆号为JX270774.1。

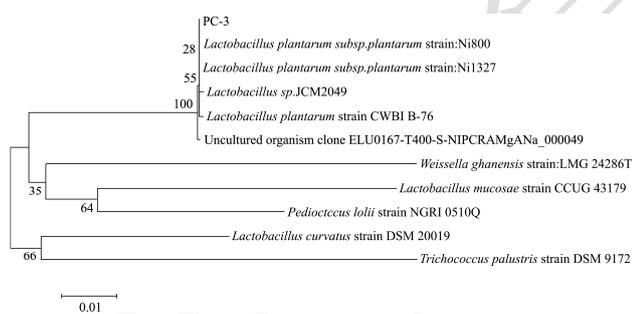


图 4 菌株的 16S rDNA 全序列系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of the strains based on 16S rDNA full-length sequence

3 结论

3.1 采用气质联用检测方法，从泡菜环境中分离出了16株具有CLA转化能力的菌株。其中PC-3菌株的CLA转化率最高，能将亚油酸转化为具有生物活性的c9，t11-CLA和t10，c12-CLA。

3.2 SEM、API 50CHL和16S rDNA序列分析等方法鉴定表明，PC-3菌株系乳杆菌属植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)，其基因序列长度为1460 bp，在GenBank的

登陆号为JX270774.1。

参考文献

- [1] Pariza M W, Hargraves W A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethyl-benz (a) anthracene [J]. Carcinogenesis, 1985, 6: 591-593
- [2] Koba K, Yanagita T. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA) [J]. Obes. Res. Clin. Pract., 2014, 8(6): e525-e532
- [3] 郭际,蔡长河,曾庆孝.共轭亚油酸与人体健康[J].现代食品科技,2006,22(4):271-273
GUO Ji, CAI Chang-he, ZENG Qing-xiao. The CLAs and their influence to human health [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(4): 271-273
- [4] Ogawa J, Kishino S, Ando A, et al. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria [J]. J. Biosci. Bioeng., 2005, 100: 355-364
- [5] 罗玉芬,徐尔尼,巫小丹.微生物生产功能性油脂-共轭亚油酸的研究进展[J].食品工业科技,2010,31(5):377-380
LUO Yu-fen, XU Er-ni, WU Xiao-dan. Study on the production of functional oil-conjugated linoleic acid by microbe [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(5): 377-380
- [6] Vela Gurovic M S, Gentili A R, Oliverac N L, et al. Lactic acid bacteria isolated from fish gut produce conjugated linoleic acid without the addition of exogenous substrate [J]. Process Biochem., 2014, 49: 1071-1077
- [7] Khaskheli A Ali, Talpur F N, Demir A S et al. A highly selective whole cell biocatalysis method for the production of two major bioactive conjugated linoleic acid isomers [J].

- Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, 2: 328-332
- [8] Li J Y, Zhang L W, Han X, et al. Effect of incubation conditions and possible intestinal nutrients on cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* F0221 [J]. INT. Dairy J., 2013, 29: 93-98
- [9] Liu P, Shen S R, Ruan H, et al. Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented Chinese pickles [J]. J. Zhejiang Univ.-Sci. B (Biomed & Biotechnol.), 2011, 11: 923-930
- [10] Luna P, Juarez M, Fuente M A. Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheeses protected with designation of origin [J]. Food Chem., 2007, 103: 1465-1472
- [11] Wutzes T, Bruggeman M R, Nout M J, et al. A computerised system for the identification of lactic acid bacteria [J]. INT. J. Food Microbiol., 1997, 38(1): 65-70
- [12] 薛庆中. DNA 和蛋白质序列数据分析工具[M]. 北京: 科学出版社, 2010
- XUE Qing-zhong. DNA and protein sequence data analysis [M]. Beijing: Science Press, 2010
- [13] 张刚. 乳酸细菌-基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007
- ZHANG Gang. Lactic acid bacteria-basic, technology and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007
- [14] Fuente M A, Luna P, Juárez M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers [J]. Trend Anal. Chem., 2006, 25(9): 917-926