

乙醇胁迫提高植物乳杆菌 p-8 的共轭亚油酸 (CLA) 转化率和相关酶转录水平

秦雅丽¹, 赵国芬^{1*}, 王丹¹, 张和平², 赵微³

(1. 内蒙古农业大学生命科学学院, 内蒙古呼和浩特 010000) (2. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古呼和浩特 010000) (3. 山西师范大学食品科学学院, 山西临汾 041004)

摘要: 该文研究了在 MRS 培养基中添加 0.05 mg/mL LA (Linoleic acid, LA) 和不同浓度的乙醇时植物乳杆菌 p-8 的 CLA (Conjugated linoleic acid, CLA) 转化率和 CLA 合成相关酶转录水平的差异情况。结果显示, 发酵液中的三种 CLA 异构体转化率都是在添加 0.50% 乙醇时最高, 其中转化 cis9,trans11-CLA (t9,t11-CLA) 异构体最高, 为 2.49%, 比不添加乙醇增加 2.37 倍。添加不同浓度乙醇的发酵液中 trans10,cis12-CLA (t10,c12-CLA) 转化率都是最低的。菌体中产生的 CLA 非常少, 但规律与发酵液的基本一致。添加 0.50% 乙醇菌体中 t9,t11-CLA 转化率最高, 其转化率仅为 0.05%, 比不添加乙醇增加了 5 倍。当乙醇浓度高于 0.50% 时, 各种不同 CLA 异构体的转化率却都减少。结果表明 CLA 是在胞液内产生后再被运转到胞外的, 一定浓度范围内的乙醇胁迫通过提高 CLA 合成相关的酶基因转录水平, 进而促进了 CLA 的转化, 可见 CLA 合成相关酶基因转录水平是造成 CLA 转化率差异的主要原因。结果为阐明植物乳杆菌 p-8 产 CLA 的分子机制和寻找有效提高 CLA 生成的调控手段奠定了基础。

关键词: 共轭亚油酸; 植物乳杆菌 p-8; 产共轭亚油酸相关酶

文章篇号: 1673-9078(2021)11-25-33

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0478

Increase in the CLA Conversion Rate and Transcription Level of CLA-Related Enzymes in *Lactobacillus plantarum* p-8 Following Ethanol Stress

QIN Yali¹, ZHAO Guofen^{1*}, WANG Dan¹, ZHANG Heping², ZHAO Wei³

(1. College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010000, China)

(2. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010000, China)

(3. College of Food Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

Abstract: The effects of the presence of linoleic acid (LA) and ethanol on the conjugated linoleic acid (CLA) conversion rates and the transcription level of CLA synthesis-related enzymes of *Lactobacillus plantarum* p-8 (*L. plantarum* p-8) were studied. For this, 0.05 mg/mL LA and ethanol at different concentrations were added to MRS media. The results showed that the conversion rates of the three CLA isomers were the highest when 0.50% ethanol was added to the fermentation broth. More specifically, the conversion rate of the cis9, trans11-CLA (c9,t11-CLA) isomer was the highest, reaching up to 2.49%, which was 2.37 times higher than that observed without ethanol. The conversion rate of the trans10, cis12-CLA (t10,c12-CLA) isomer in the fermentation broth was the lowest, regardless of the concentration of ethanol added.

引文格式:

秦雅丽,赵国芬,王丹,等.乙醇胁迫提高植物乳杆菌 p-8 的共轭亚油酸(CLA)转化率和相关酶转录水平[J].现代食品科技,2021,37(11): 25-33

QIN Yali, ZHAO Guofen, WANG Dan, et al. Increase in the CLA conversion rate and transcription level of CLA-related enzymes in *Lactobacillus plantarum* p-8 following ethanol stress [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 25-33

收稿日期: 2021-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31560443); 内蒙古自然科学基金项目 (2017MS0306)

作者简介: 秦雅丽 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 微生物分子生物学, Email: 974676883@qq.com

通讯作者: 赵国芬 (1972-), 女, 教授, 研究方向: 微生物分子生物学, Email: guofenzhao@126.com

The CLA conversion rates were much higher in the fermentation broths compared to those observed in the bacteria, and the CLA conversion rates in the bacteria were very low, but the variations in the CLA conversion rates following ethanol addition were consistent between the fermentation broths and the bacteria. The conversion rate of the c9,t11-CLA isomer was the highest (0.05%) in the bacteria following 0.50% ethanol treatment. This rate is five times higher than that obtained without ethanol treatment. When the ethanol concentration was higher than 0.50%, the conversion rates of all CLA isomers were reduced. The results indicate that CLA is produced in the cytosol and then transferred to the extracellular environment. Meanwhile, the transcription levels of the genes encoding CLA synthesis-related enzymes increased following ethanol stress within a certain concentration range, and accordingly, the CLA conversion rates increased. It is confirmed that the variation in the transcription levels of the CLA synthesis-related enzyme genes is the main reason for the differences in the CLA conversion rates. The results provide a foundation for elucidating the molecular mechanism of CLA production by *Lactobacillus plantarum* p-8 and for exploring effective regulation methods to improve CLA production.

Key words: conjugated linoleic acid; *Lactobacillus plantarum* p-8; conjugated linoleic acid-related enzymes

共轭亚油酸 (Conjugated linoleic acid, CLA) 是含有共轭双键的十八碳二烯酸的总称, 是亚油酸的几何异构体, 并由亚油酸 (Linoleic acid, LA) 衍生而来, 其中 c9,t11-CLA 和 t10,c12-CLA 是最主要的同分异构体^[1]。CLA 具有多种生理功能, 例如抗癌, 预防心血管疾病, 增强免疫力, 抗糖尿病等, 对人体健康有积极作用^[2,3], 已成为医学、化学、食品科学和营养学等领域的研究热点^[4,5]。

天然 CLA 在很多反刍动物食品中存在, 主要是反刍动物肠胃中瘤胃微生物把动物饲料中的亚油酸 (Linoleic acid, LA) 进行异构化而来的^[6]。因此, 反刍动物的肉制食品及其乳制品是摄入 CLA 的主要来源^[7]。而以乳和肉制品为主的德国居民平均每日的摄入量仅为 350 mg^[8], 这对于专家建议每日 CLA 摄入量 3500 mg 是远远不够的, 因此向食品中强化 CLA 含量是一种有效的摄取途径^[9], 而 CLA 的合成通常使用化学合成法和生物合成法来制备^[10]。

乳酸菌是生物转化生成 CLA 的最佳微生物。其在 LA 转化为 CLA 的过程中涉及脂肪酸水合酶 (Fatty acid hydratase, CLA-HY)、羟基脂肪酸脱氢酶 (Hydroxy fatty acid dehydrogenase, CLA-DH)、乙酰乙酸脱羧酶 (Acetoacetate decarboxylase, CLA-DC)、烯酮还原酶 (Enone reductase, CLA-ER) 和烯醇化酶 (Enolase, Eno), 其中 CLA-HY 与肌球蛋白交叉反应抗原 (Myosin cross reactive antigen, MCRA) 的同源性高, 所以前期研究中 MCRA 就是 CLA-HY。杨波^[11]发现多个乳酸菌属由 *cla-hy*、*cla-dh* 和 *cla-dc* 表达亚油酸异构酶的三组分体系, 且 *cla-dh* 和 *cla-dc* 为一个转录单位, *cla-hy* 为另一个转录单位, 显然 2 个转录单位的调控机制是不同的。据报道, 降低氧的浓度, 添加胆盐、有机溶剂 (如吐温-80)、乳酸钠和一些辅助因子, 增加细胞膜的通透性和疏水性都可以提高 CLA 转化率^[12,13], 但其调控的分子机制尚不明确。

前期研究表明, *L. plantarum* p-8 也产 CLA, 该菌还有提高奶牛的产奶量、肉鸡的免疫能力, 和缓解成年人压力、焦虑等功能^[14-16]。基于 *L. plantarum* p-8 在食品、畜牧业的应用以及其产有益生活性 CLA 的能力^[17], 本文以该菌株为材料, 拟进行不同浓度乙醇胁迫下 CLA 转化及其合成相关酶基因转录水平差异的研究, 为揭示乳酸菌产 CLA 的分子调控机制来提高 CLA 产量和拓展 *L. plantarum* p-8 在食品畜牧业的应用空间奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器、材料与试剂

仪器: 气相色谱仪, 气相色谱仪为岛津 GC-2010; qPCR 仪, 德国耶拿 qTOWER2.2; 恒温摇床, 上海福玛实验设备有限公司; 单面净化工作台 (W-CJ-2FD), 苏州净化公司; 超低温冰箱 (707 REVCO), 美国 Thermo 公司; 高温高压灭菌锅, 日本 Hirayama 公司; 高速冷冻离心机, 德国 EPPENDORF 公司; 分析天平, 上海精密仪器仪表有限公司。

菌株: 本实验中所用 *L. plantarum* p-8 由本实验室保存。

试剂: 亚油酸、十七烷酸、DEPC 购置于美国 Sigma-Aldrich 公司; DNA Marker 购置于天根生化科技(北京)有限公司; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钠、甲醇、乙醇、正己烷、冰乙酸、异丙醇、丙三醇、葡萄糖、胰蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、乙酸钠、柠檬酸氢二铵、吐温 80、硫酸镁、硫酸锰购置于国药集团化学试剂有限公司; 吐温 20、Tris 购置于美国 AMRESCO 公司; 细菌 RNA 提取试剂盒购置于瑞士 omega 公司; 一步式反转录试剂盒购置于 TaKara 公司。

1.2 方法

1.2.1 LA 对 *L. plantarum* p-8 生长的影响

将亚油酸加入 MRS 培养基中, 至最终浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mg/mL, 等量无菌蒸馏水作为对照。将植物乳杆菌 p-8 按照 1% 的接种量加入, 缓慢混匀后 37 °C 静置厌氧培养。检测 6、12、18、24 h 的活菌数量, 通过活菌计数法来确定选取 LA 浓度。

1.2.2 引物设计

在 NCBI 上查阅 *L. plantarum* p-8 五种 CLA 合成相关酶以及 16S rRNA 的基因序列, 利用 Primer 5.0 设计了 6 对特异性引物, 交付华大基因公司合成。

6 对引物序列分别是:

16S rRNA-F: GATAACACCTGGAAACAGATG
C, 16S rRNA-R: GACCATCCAAAAGTGATAGCC;

cla-hy-F: CAACGATGGGTGATTACAACA,
cla-hy-R: CCCTAAGTTATAGAACCGCTCAG;

cla-dh-F: ACTGAAGCGACCGCCTAT, cla-dh-R:
GGTTTCCCGTTGGTAATG;

cla-dc-F: GACAACAGTGCGACAGCC, cla-dc-R:
TGGTTCGTCCCATCTTCA;

cla-er-F: GGCAAAGGCTAAGTTCAA, cla-er-R:
CATAATGCGACTGGGTGT;

cla-eno-F: GCAAAGGGTATCAAGATG, cla-eno-
R: TAAGTCAGCAATGGTCGT。

1.2.3 *L. plantarum* p-8 培养

挑取 *L. plantarum* p-8 单菌落在 MRS 液体中连续培养两代后, 按 1% 的接种量 (活菌数为 1.43×10^9 CFU/mL) 接种至 21 个 50 mL MRS 液体培养基中, 每个瓶添加浓度为 0.05 mg/mL 的 LA, 然后分别以 0、0.50%、1%、1.50%、2%、2.50% 和 3% 的添加量添加乙醇, 每种浓度 3 瓶, 37 °C 静置培养至对数期, 无菌操作取出发酵液 5 mL, 提取 RNA, 分析不同乙醇胁迫下 *cla-hy*、*cla-dh*、*cla-dc*、*cla-er* 和 *cla-eno* 的 mRNA 水平差异。将剩余菌液继续培养 3 d 后测定脂肪酸, 分析不同乙醇胁迫下 CLA 转化率差异。

1.2.4 CLA 的检测

将经 LA 诱导和乙醇胁迫培养 3 d 的 *L. plantarum* p-8 5000 r/min 离心 10 min, 分别收集菌体和发酵上清液。用 KPB 缓冲液悬浮并清洗菌体, 超声破碎 (条件为: 功率 400 W; 间歇 4 s, 破碎 2 s, 共 30 min), 对破碎液和离心之后的发酵上清液和菌体进行脂肪酸抽提, 具体的步骤如下:

(1) 发酵液脂肪酸抽提: 取 4 mL 发酵液于洁净的试管中, 取已添加十七碳烷酸的异丙醇 2 mL, 充分混匀 1 min 后加入 4 mL 的正己烷, 再次混匀 1 min,

5000×g 离心 10 min。吸取上层的透明正己烷层, 转移到干净试管中, 然后用氮气将其吹干。

(2) 菌体脂肪酸抽提: 菌体离心后使用菌体洗涤液进行洗涤, 向 10 mL 菌液离心后的菌体加入 2 mL 的菌体洗涤液, 充分混匀 1 min, 5000 ×g 离心 10 min。重复洗涤两次后将菌体悬于洗涤液中, 再按照发酵液的抽提方法进行抽提。

以十七烷酸做内标, 使用盐酸-甲醇法对抽提后的脂肪酸进行甲酯化处理, 准确吸取 1 μL 甲酯化样品进样^[11]。定量方法为内标法, 进行转化率的计算, 计算方法如下:

$$f = \frac{\frac{A_s}{m_s}}{\frac{A_r}{m_r}}$$

$$m_i = f \times \frac{A_i}{\frac{A_s}{m_s}}$$

式中:

A_s ——内标物的峰面积;

A_r ——对照品的峰面积;

m_s ——加入内标物的量;

m_r ——加入对照品的量;

A_i ——待测物的峰面积。

色谱操作条件: 色谱柱为 CP-WAX 52CB。载气流量 2 mL/min, 分流比 15:1 分流进样, 进样口温度为 240 °C。采用程序升温: 120 °C 保温 3 min, 然后以每分钟升 5 °C 至 190 °C, 再每分钟升 1 °C 至 210 °C, 保温 3 min, 总时间为 56 min。

1.2.5 产 CLA 相关酶转录水平分析

按照 omega 公司的细菌 RNA 提取试剂盒提取培养至对数期各菌的 RNA。用 1.20% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测后, 用 TaKara 公司反转录试剂盒进行反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qPCR, qPCR 反应体系 20 μL, 包括 SYBR Premix Ex Taq13 μL, 引物 1 (10 μmol/L) 和引物 2 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 cDNA 1 μL, dd H₂O 7 μL。95 °C 变性 30 s 后进行 30 个循环, 每个循环 95 °C 变性 5 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min。然后 72 °C 再延伸 10 min。每个条件重复三次, 记录每个样品 Ct 值。

RT-qPCR 数据分析: 以不添加乙醇的菌为对照, 其他添加不同乙醇浓度的菌为实验组, 各组的 16S rRNA 为内参基因, 根据 RT-qPCR 所得 Ct 值, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析对数期不同乙醇浓度下 5 个基因相较于不添加乙醇的相对表达量。

以添加一定浓度乙醇下对数期的 *cla-hy* 基因为

例:

$$\Delta Ct_0(c\text{la} - \text{hy}) = Ct_0(c\text{la} - \text{hy}) - Ct_0(16S\ rRNA)$$

$$\Delta Ct_1(c\text{la} - \text{hy}) = Ct_1(c\text{la} - \text{hy}) - Ct_1(16S\ rRNA)$$

$$\Delta\Delta Ct(c\text{la} - \text{hy}) = \Delta Ct_1(c\text{la} - \text{hy}) - \Delta Ct_0(c\text{la} - \text{hy})$$

式中:

ΔCt_0 ——无乙醇;

ΔCt_1 ——添加一定浓度乙醇。

最后按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式进行计算,即得到对数期的添加一定浓度乙醇的 *cla-hy* 基因相比不添加乙醇的 *cla-hy* 基因的相对表达水平。

1.2.6 不同乙醇浓度下 CLA 相关基因转录水平和 CLA 转化率之间的相关性

分析不同乙醇浓度下,CLA 相关基因转录水平和 CLA 转化率之间的相关性。

1.2.7 CLA 合成相关酶的系系统进化树

通过 MEGA 7.0 绘制不同来源的 CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC、CLA-ER 和 Eno 的系统发育树,来进一步分析 *L. plantarum* p-8 与哪一种乳酸菌的 CLA 生成的相关酶系更接近。

1.2.8 数据处理

所有实验平行三次,采用 Excel 2010 和 SPSS 18.0 软件对数据进行分析处理,结果均以“平均值±标准误”(X±SD)表示,各组间的比较采用单因素方差分析,采用 LSD 法分析差异显著性, $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 LA 对 *L. plantarum* p-8 生长的影响

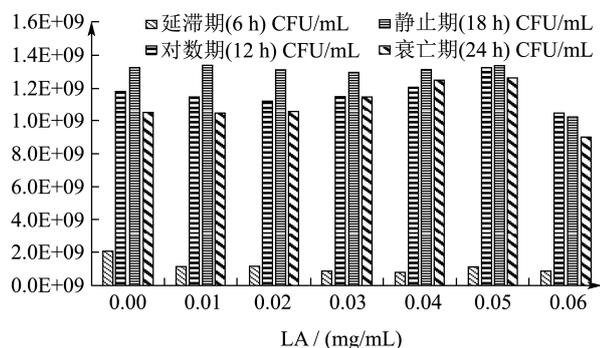


图1 不同 LA 浓度时植物乳杆菌 p-8 不同生长期的菌落数
Fig.1 Colony number of *Lactobacillus plantarum* p-8 at different growth stages under different LA concentrations

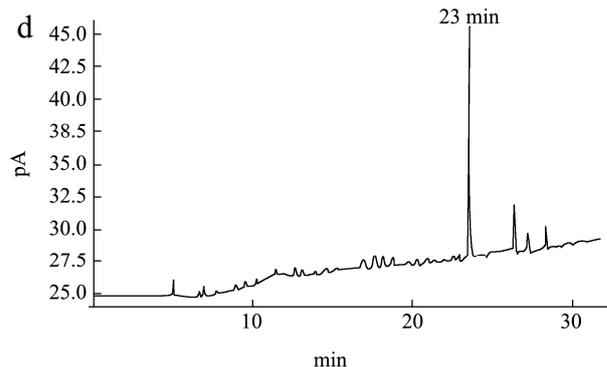
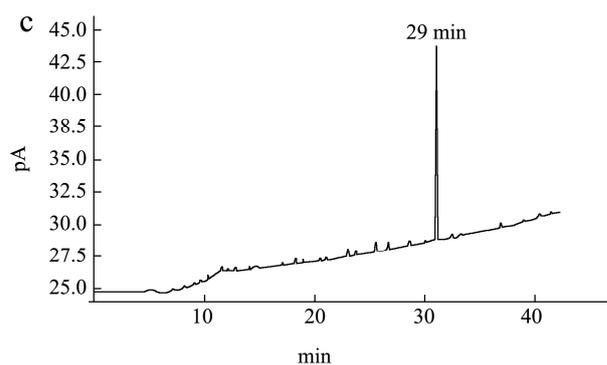
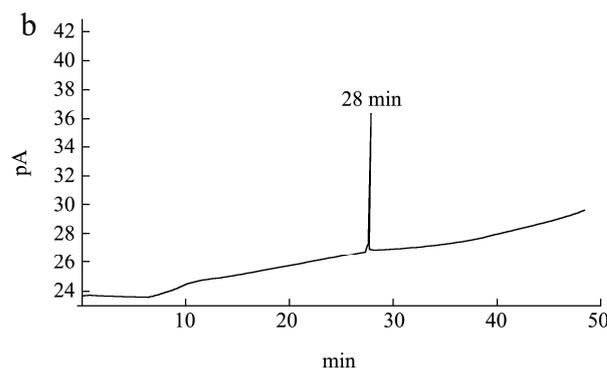
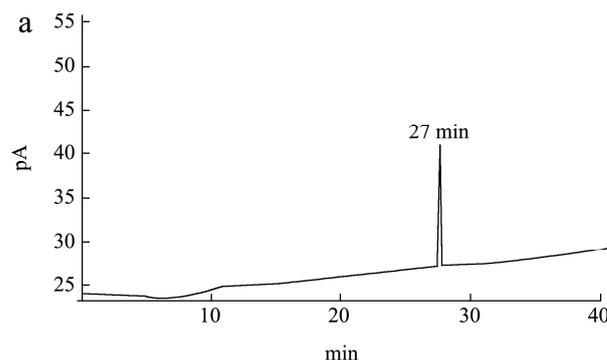
采用活菌计数法对培养不同时期的植物乳杆菌 p-8 进行菌落计数,所得实验数据结果如图 1 所示。

植物乳杆菌 p-8 在 LA 浓度为 0 mg/mL~0.04 mg/mL 时,随着 LA 浓度的升高,活菌数量波动较小,

活菌数量基本未受到抑制,而 LA 浓度大于 0.05 mg/mL 时,活菌数量收到抑制,因此 LA 浓度选取为 0.05 mg/mL。

2.1.2 标准样品和待测样品的色谱图

各标样和待测样品 GC 图谱如图 2 所示,检测到标准样品 c9,t11-CLA、t10,c12-CLA、t9,t11-CLA、LA、十七碳酸分别在 27 min、28 min、29 min、23 min 和 20 min 左右出峰,待测样品中 CLA 的转化率并不高。



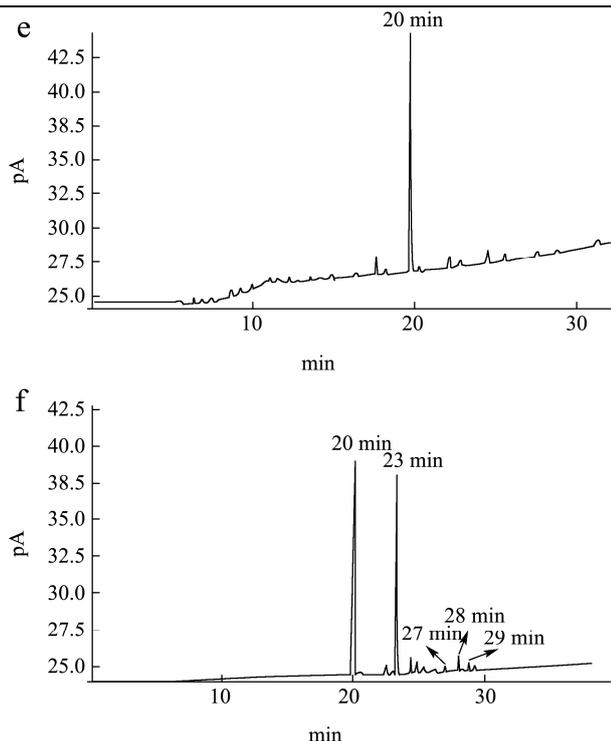


图2 各标准脂肪酸和转化产物气相色谱图

Fig.2 Gas chromatograms of various standard fatty acids and conversion products

注: a-f 分别为 c9,t11-CLA、t10,c12-CLA、t9,t11-CLA、LA、十七碳烷酸、样品 CLA 的气相色谱图。

2.1.3 不同乙醇浓度胁迫下 *L. plantarum* p-8 的 CLA 转化率差异性

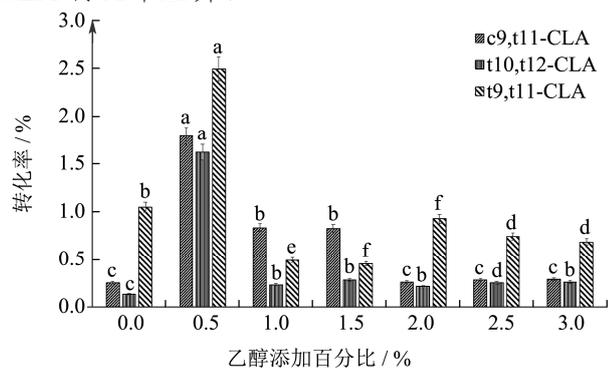


图3 不同浓度乙醇胁迫下发酵液中三种 CLA 的转化率

Fig.3 Three CLA conversion rates in fermentation broth with different concentration ethanol stress

注: 不同乙醇浓度下同种异构体转化率, 不同字母表示差异显著 $p < 0.05$ 。

7 个不同浓度乙醇胁迫下 *L. plantarum* p-8 发酵液中不同 CLA 异构体的转化率结果如图 3。三种 CLA 异构体转化率都是在添加 0.50%乙醇时最高, 其中转化 t9,t11-CLA 异构体最高, 为 2.49%。是不添加乙醇的 2.37 倍。添加不同浓度乙醇的发酵液中 t10,c12-CLA 转化率都是最低的。这与赵微等^[18]报道的菌体催化发酵液中

CLA 是 c9,t11-CLA 最高 (转化率 2%) t9,t11-CLA (转化率 0.90%) 最低不一致, 原因有待于进一步研究。

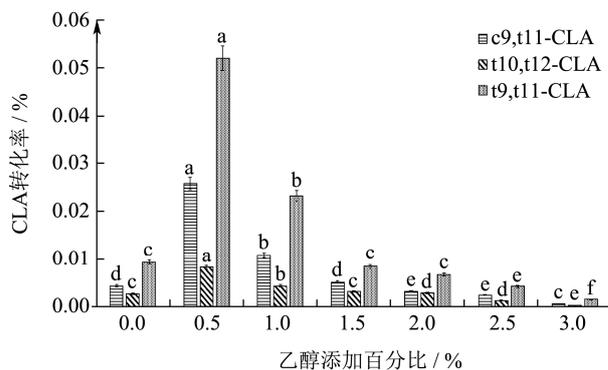


图4 乙醇胁迫下菌体中三种 CLA 的转化率

Fig.4 Three CLA conversion rates in bacteria under different concentrations ethanol stress

注: 不同乙醇浓度下同一种异构体转化率, 不同字母表示差异显著 $p < 0.05$ 。

7 个添加不同乙醇浓度的菌体中不同 CLA 异构体的转化率如图 4, 总体来看, 菌体中产生的 CLA 非常少, 但规律与发酵液的基本一致。添加 0.50%乙醇菌体中 c9,t11-CLA 转化率最高, 仅为 0.05%, 但比不添加乙醇的高 5 倍。当乙醇浓度高于 0.50%时, 随着乙醇浓度增加, 各种不同 CLA 异构体的转化率逐渐减少。比较同种处理发酵液和菌体中 CLA 各异构体的转化率, 可以看出由 LA 转化生成的 CLA 主要分布在发酵液中。Kishino 等^[18]发现催化 LA 转化为 CLA 的亚油酸异构酶系的三个酶中 CLA-HY 在细胞膜上, CLA-DH 和 CLA-DC 都分布在细胞液中, 说明 CLA 是在胞液内产生后再被运转到胞外的。

2.1.4 不同乙醇浓度胁迫下 *L. plantarum* p-8 的 RNA 提取结果

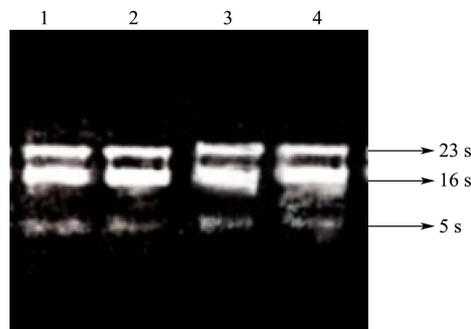


图5 不同浓度乙醇胁迫下植物乳杆菌 p-8 RNA 电泳检测

Fig.5 The RNA agarose gel electrophoresis of *L. plantarum* p-8 under different ethanol concentrations stress

注: 1-4: 0、0.50%、1.50%和 3%乙醇。

L. plantarum p-8 在添加乙醇浓度分别为 0、0.50、1.50 和 3%四个浓度胁迫下培养到对数期, 提取 RNA 经电泳检测的结果如图 5, 四个样品均出现清晰的三

条带,符合 RT-qPCR 的要求。

2.1.5 *L. plantarum* p-8 在四种乙醇浓度胁迫下 CLA 合成相关酶基因的转录水平差异性

乙醇胁迫影响了 CLA 的转化率,为了探明其原因,根据四种乙醇浓度胁迫下 16S rRNA 内参基因及 *cla-hy*、*cla-dh*、*cla-dc*、*cla-er* 和 *cla-eno* RT-qPCR 的扩增曲线,分别得到它们的 Ct 值,结果如表 1。根据 Ct 值计算各基因的 mRNA 相对表达量并进行比较,发现四种乙醇浓度胁迫下,*cla-hy*、*cla-dh*、*cla-dc*、*cla-er* 和 *cla-eno* 的 mRNA 相对表达情况如图 6,在 0.05 mg/mL LA 诱导下 *cla-hy*、*cla-dh* 和 *cla-dc* 的 mRNA 相对表达量分别为 2.54、0.89 和 0.77,乙醇浓度在 0.50%时,*cla-hy* 的 mRNA 相对表达量最大为 2.54。这与杨波^[11]报道的植物乳杆菌 ZS2058 为代表的高产 CLA 乳酸菌对数期(10 h)与 CLA 合成相关的几个酶基因表达都在 7 以上,相对较高;*Lactobacillus plantarum* ST-III 等低产 CLA 菌株对数期(10 h)*cla-hy* 表达量在 4 以上,而 *cla-dh* 和 *cla-dc* 相对表达量不足 2,说明亚油酸异构酶系的几个酶基因表达水平高,CLA 生成量就高。乙醇浓度在 1.50%和 3%时,基因

表达量均下降。LA 对细菌有毒性,是一种毒力因子,通过转变 LA 为 CLA 可解除毒性。本文这种 CLA 低转化率可能与 *L. plantarum* p-8 细胞膜的脂肪酸组成有关,可能饱和脂肪酸偏高,细胞膜的通透性差,LA 不易进入细胞内,对细胞毒害相对较低,也就不会大量诱导 *cla-hy* 的表达催化 LA 转化为 CLA 来解毒。

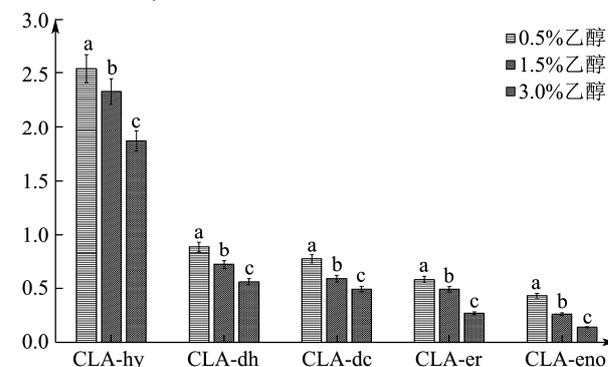


图 6 四种乙醇浓度胁迫下相关酶基因的表达水平

Fig.6 Expression level of related enzyme genes under three ethanol concentration stress

注:同种基因不同浓度乙醇胁迫下,不同字母表示差异极显著 $p < 0.05$ 。

表 1 *L. plantarum* p-8 在四种乙醇浓度胁迫下 CLA 合成相关酶基因及 16S rRNA RT-qPCR 的 Ct 值

Table 1 Ct value of RT-qPCR for related enzyme gene to CLA synthesis and 16S rRNA in *L. plantarum* p-8 under four ethanol concentration stress

乙醇浓度/%	16S rDNA	<i>cla-hy</i>	<i>cla-dh</i>	<i>cla-dc</i>	<i>cla-er</i>	<i>cla-eno</i>
0	23.32±0.32 ^c	25.72±0.07 ^d	24.43±0.14 ^d	23.65±0.13 ^d	24.58±0.12 ^c	24.49±0.26 ^d
0.50	28.31±0.05 ^c	33.25±0.12 ^c	32.85±0.10 ^c	32.84±0.31 ^c	34.35±0.13 ^c	34.69±0.15 ^c
1.50	29.26±0.06 ^b	33.99±0.21 ^b	33.42±0.09 ^b	33.23±0.25 ^b	34.65±0.22 ^b	34.82±0.17 ^b
3.00	30.42±0.13 ^a	34.60±0.09 ^a	33.96±0.07 ^a	33.67±0.17 ^a	34.87±0.11 ^a	34.92±0.08 ^a

表 2 不同乙醇浓度下 CLA 相关基因转录水平和 CLA 转化率之间的相关性

Table 2 The difference between the transcription level of CLA-related genes and the conversion rate of CLA under different ethanol concentrations

项目		<i>cla-hy</i>	<i>cla-dh</i>	<i>cla-dc</i>	<i>cla-er</i>	<i>cla-eno</i>
0.50%乙醇发酵液 CLA 转化率	Pearson 相关性	1.000**	1.000**	-1.000**	0.500	-1.000**
	显著性(双侧)	0.000	0.000	0.000	0.667	0.000
	N	3	3	3	3	3
1.50%乙醇发酵液 CLA 转化率	Pearson 相关性	-0.870	-1.000**	0.866	0.500	-0.500
	显著性(双侧)	0.328	0.000	0.333	0.667	0.667
	N	3	3	3	3	3
3%乙醇发酵液 CLA 转化率	Pearson 相关性	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**
	显著性(双侧)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	3	3	3	3	3

注: **表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关。

在相同浓度乙醇胁迫下 *cla-dh* 和 *cla-dc* 的 mRNA 相对表达量都基本接近,与从 genebank 上 *L. plantarum* p-8 的基因组序列中查到的 *cla-dh* 和 *cla-dc* 为一个转

录单位的信息相吻合。而 *cla-hy* 在相同乙醇浓度胁迫下要高出 *cla-dh* 和 *cla-dc* 的 mRNA 相对表达量 1.53 倍,说明 *cla-hy* 首先对乙醇作出反映的,如同首先对

LA 做出反映一样。*cla-dh* 和 *cla-dc* 必须在有较高浓度的 *cla-hy* 催化产物 10-羟基十八碳烯脂肪酸作用下才可以被诱导大量表达。

2.1.6 不同乙醇浓度下 CLA 相关基因转录水平和 CLA 转化率之间的相关性

将不同乙醇浓度下 CLA 相关基因转录水平和 CLA 转化率之间的相关性进行比较,如表 2,在 0.50% 乙醇浓度下:除了 *cla-er* 与 CLA 转化率不显著相关外其余基因都呈显著相关;在 1.50%乙醇浓度下:只有 *cla-dh* 与 CLA 转化率呈显著相关,其余基因均呈不显著相关;在 3%乙醇浓度下:多有基因与 CLA 转化率均呈显著相关。

2.1.7 亚油酸异构酶系相关酶蛋白的系统进化

树分析

进化树可反映出各物种的进化与亲缘关系。分布在进化树同一分支,亲缘关系较近。利用 MEGA 软件构建了 *L. plantarum* p-8 菌株以及其他菌株的五个 CLA 合成相关酶的进化树如图 7~11,比较发现 *L. plantarum* p-8 与 ST-III 亲缘关系最接近,所以, *L. plantarum* p-8 也应为低产 CLA 菌株,而本文与 CLA 合成相关酶的表达水平 CLA 转化率也较低,规律与杨波报道的 *Lactobacillus plantarum* ST-III 相吻合,其中 c9,t11-CLA 的转化率为 0.34, t10,t12-CLA 的转化率为 0.92, t9,t11-CLA 的转化率为 0.35; *cla-hy* 相对表达量为 4.50, *cla-dh* 相对表达量为 1, *cla-dc* 相对表达量为 1.40, *cla-er* 相对表达量为 1.40^[11],也与前期杜美婷报道的结果一致^[9]。

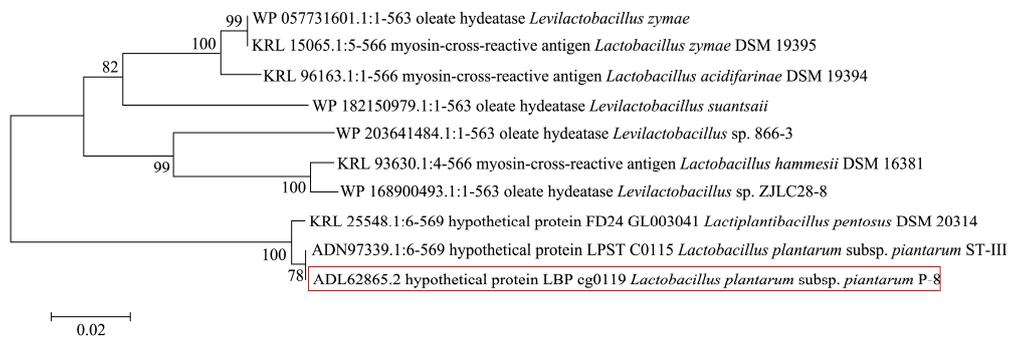


图 7 不同物种 CLA-HY 的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of CLA-HY from different species

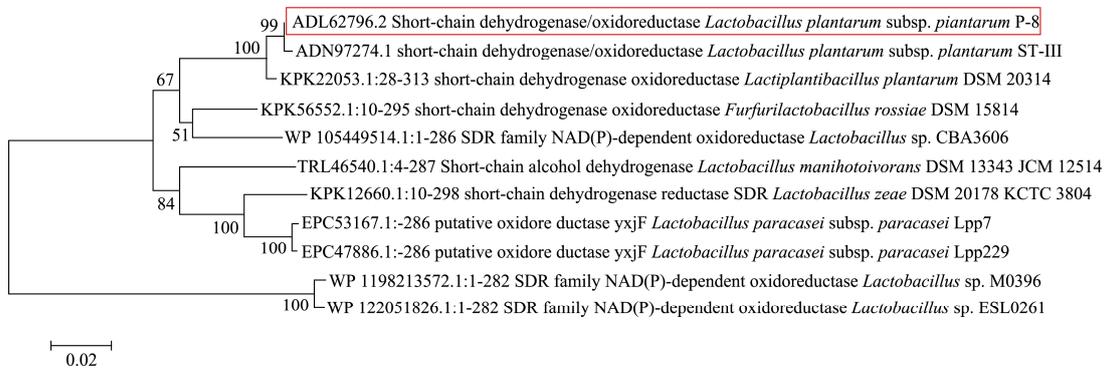


图 8 不同物种 CLA-DH 的系统进化树

Fig.8 Phylogenetic tree of CLA-DH from different species

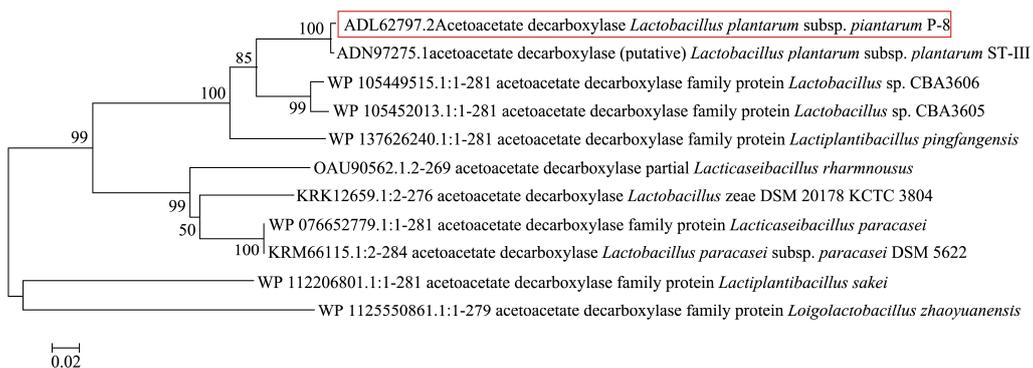


图 9 不同物种 CLA-DC 的系统进化树

Fig.9 Phylogenetic tree of CLA-DC from different species

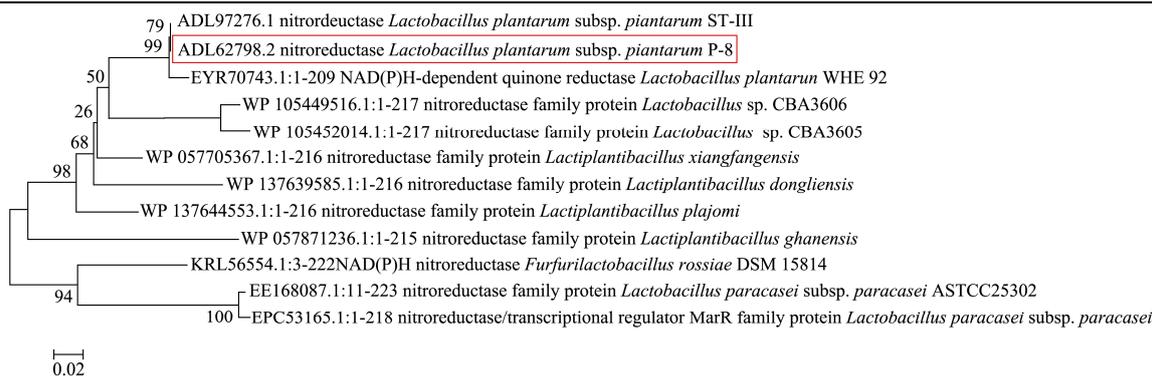


图 10 不同物种 CLA-ER 的系统进化树

Fig.10 Phylogenetic tree of CLA-ER from different species

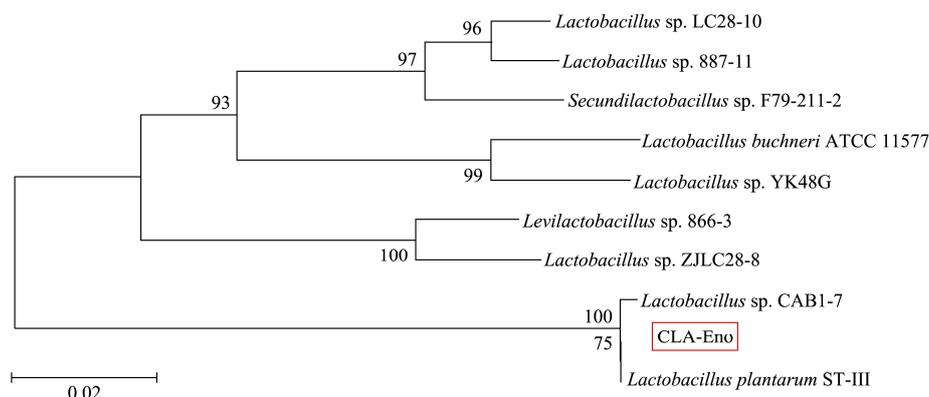


图 11 不同物种 Eno 的系统进化树

Fig.11 Phylogenetic tree of Eno from different species

3 结论

同一条件下发酵液中 CLA 各异构体的转化率远比菌体中 CLA 各异构体的转化率高,说明 CLA 是在胞液内产生后再被运转到胞外的。*cla-hy* 的 mRNA 相对表达在四种乙醇浓度下都最高的,是其他四个基因的 1.50 倍之多,乙醇浓度在 0.50% 时,相对表达量最大为 2.54。低浓度的乙醇胁迫可以提高 CLA 合成相关酶基因的转录水平,原因是低浓度的乙醇只增加与细胞膜的亲和力,不使细胞死亡,容易使得细胞膜的透性增加,导致 LA 容易进入细胞内,而 LAI 是诱导酶,进入胞内的 LA 浓度高,诱导 CLA 合成相关酶基因的表达增加。CLA 合成相关酶基因转录水平是造成 CLA 转化率差异的主要原因。

参考文献

[1] 冯有胜,丁红梅.共轭亚油酸的结构与性质[J].中国粮油学报,2005,20(5):93-97
 FENG Yousheng, DING Hongmei. The structure and properties of conjugated linoleic acid [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2005, 20(5): 93-97
 [2] Yeonhwa Park. Conjugated linoleic acid (CLA): good or bad

trans fat? [J]. Food Composition and Analysis, 2008, 22(6): S4-S12
 [3] Bo Yang, Haiqin Chen, Catherine Stanton, et al. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease [J]. Functional Foods, 2015, 15: 314-325
 [4] Arunabh Bhattacharya, Jameela Banu, Mizanur Rahman, et al. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease [J]. Nutritional Biochemistry, 2006, 17(12): 789-810
 [5] Michael W, Pariza, Yeonhwa Park, et al. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid [J]. Progress in Lipid Research, 2001, 40(4): 283-298
 [6] Kepler C R, Hirons K P, McNeill J J, et al. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens* [J]. Biological Chemistry, 1966, 241(6): 1350-1354
 [7] Xiao Q Z, Xuan J, Ye W, et al. Enzymatic synthesis of structured lipids enriched with conjugated linoleic acid and butyric acid: strategy consideration and parameter optimization [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(8): 273-282
 [8] Lasa A, Simón E, Churruga I, et al. Effects of trans-10, cis-12

- CLA on liver size and fatty acid oxidation under energy restriction conditions in hamsters [J]. *Nutrition*, 2010, 1: 3-10
- [9] Lock A L, Rovai M, Gipson T A, et al. A conjugated linoleic acid supplement containing trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating goats [J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(9): 3291-3299
- [10] 孙英侠.天然活性物质共轭亚油酸的化学合成与生物转化[J].*食品研究与开发*,2004,25(4):107-110
- SUN Yingxia. Chemical synthesis and biotransformation of conjugated linoleic acid, a natural active substance [J]. *Food Research and Development*, 2004, 25(4): 107-110
- [11] 杨波.乳酸菌生物转化共轭亚油酸的研究[D].无锡:江南大学,2014
- YANG Bo. Study on the biotransformation of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014
- [12] Rosberg-Cody E, Liavonchanka A, Gobel C, et al. Myosin-cross-reactive antigen (MCRA) protein from *Bifidobacterium breve* is a FAD-dependent fatty acid hydratase which has a function in stress protection [J]. *Bmc Biochem*, 2011, 12(9): 2-12
- [13] Li J Y, Zhang L W, Du M, et al. Effect of tween series on growth and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid production of *Lactobacillus acidophilus* F0221 in the presence of bile salts [J]. *Molecular Sciences*, 2011, 12(12): 9138-9154
- [14] Gao P F, Hou Q C, Kwok L Y, et al. Effect of feeding *Lactobacillus plantarum* p-8 on the faecal microbiota of broiler chickens exposed to lincomycin [J]. *Sci Bull*, 2017, 62(2): 105-113
- [15] Lew L C, Hor Y Y, Yusoff N A A, et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* p-8 alleviated stress and anxiety while enhancing memory and cognition in stressed adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 2019, 38(5): 2053-2064
- [16] Wang Z L, Bao Y, Zhang Y, et al. Effect of soymilk fermented with *Lactobacillus plantarum* p-8 on lipid metabolism and fecal microbiota in experimental hyperlipidemic rats [J]. *Food Biophys*, 2013, 8(1): 43-49
- [17] Li H, Liu Y, Bao Y, et al. Conjugated linoleic acid conversion by six *Lactobacillus plantarum* strains cultured in MRS broth supplemented with sunflower oil and soymilk [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(6): M330-336
- [18] 赵微.植物乳杆菌 p-8 合成 CLA 及 CLA-HY 和 CLA-DH 结构和功能关系的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学, 2017
- ZHAO Wei. Study on the structure and function of CLA synthesized by *Lactobacillus plantarum* p-8 and CLA-HY and CLA-DH [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017
- [19] 杜美婷.不同培养条件对植物乳杆菌 p-8 产共轭亚油酸及 LAI 基因 mRNA 表达水平的影响[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2012
- DU Meiting. The effect of different culture conditions on the conjugated linoleic acid production and LAI gene mRNA expression level of *Lactobacillus plantarum* p-8 [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012

(上接第 49 页)

- [26] Kubota H, Senda S, Nomura N, et al. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(4): 381-386
- [27] Piwat S, Sophatha B, Teanpaisan R. An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 61(1): 98-105
- [28] Golowczyc M A, Mobili P, Garrote G L, et al. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar enteritidis [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 118(3): 264-273