

doi:10.12301/spxb202300226

文章编号:2095-6002(2024)02-0084-09

引用格式:刘天仪,张文静,廖强,等.植物乳杆菌1-9代谢水苏糖机制研究[J].食品科学技术学报,2024,42(2):84-92.

LIU Tianyi, ZHANG Wenjing, LIAO Qiang, et al. Study on mechanism for stachyose metabolism by *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024,42(2):84-92.

植物乳杆菌1-9代谢水苏糖机制研究

刘天仪, 张文静, 廖强, 毛咏荷, 刘军*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:从发酵羊乳中筛选分离得到1株乳酸菌,经分子生物学鉴定为植物乳杆菌1-9,且该菌株对水苏糖具有优异的代谢效果。为研究植物乳杆菌1-9代谢水苏糖机制,以水苏糖为唯一碳源绘制生长曲线并通过高效液相色谱法分析代谢产物短链脂肪酸含量变化,采用薄层层析法探究植物乳杆菌1-9代谢水苏糖历程,在监控水苏糖关键代谢酶基因表达的基础上分析发酵液中相关酶活变化。结果表明:植物乳杆菌1-9代谢水苏糖产生的主要短链脂肪酸为乙酸和戊酸,发酵液中最高质量浓度分别为28.64 mg/mL和2.74 mg/mL;短链脂肪酸的积累导致发酵液pH值显著降低至4.00左右。结合水苏糖代谢历程、基因表达及酶活变化,推断植物乳杆菌1-9基因组中5-359可编码 α -半乳糖苷酶,其作用于水苏糖末端 α -半乳糖苷键,生成半乳糖、少量乳糖和蔗糖并被植物乳杆菌1-9代谢。研究结果旨在为基于植物乳杆菌与水苏糖的合生元的合理设计及相关产品开发提供理论参考。

关键词:植物乳杆菌1-9;水苏糖;代谢机制; α -半乳糖苷酶;基因组分析

中图分类号:TS201.3

文献标志码:A

植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)是一类在自然界中广泛分布的乳酸杆菌^[1],其中多种菌均可食用^[2]。植物乳杆菌常见于肠道中,可改善肠道微生物结构及组成,调节丙酮酸代谢能力,降低肠道pH值,提高机体免疫力,具有体内益生特性^[3-4]。目前,植物乳杆菌代谢碳水化合物的机制研究表明,植物乳杆菌基因组中含有丰富的编码碳水化合物代谢过程相关的酶类和所需蛋白的基因,在发酵过程中植物乳杆菌能够充分利用碳水化合物,产生短链脂肪酸等有机酸^[5-6]。植物乳杆菌对碳水化合物的利用具有菌株特异性及底物结构选择性^[7-8]。目前植物乳杆菌代谢功能性低聚糖的研究主要集中在低聚糖对植物乳杆菌的增殖作用以及其

益生活性的应用,而益生菌和益生元的组合需要进行大量的筛选。因此,探究植物乳杆菌对碳水化合物代谢机制,有利于迅速寻找特异性底物结构,发掘性能优异的益生菌与益生元组合。

水苏糖由2分子半乳糖、1分子葡萄糖和1分子果糖组成,这3种单糖均是常见的功能性低聚糖(低聚半乳糖、低聚果糖等)的单体,因此水苏糖可作为探究植物乳杆菌代谢碳水化合物的底物结构的特异性底物。此外,水苏糖本身也是一种具有良好益生特性的益生元,在人体胃肠道中可发挥多种生物活性:水苏糖不能被人体胃肠道消化吸收,可完整到达大肠部位进而被肠道菌群代谢;水苏糖具有润肠通便、增强肠道屏障功能并参与免疫缓解肝脏损

收稿日期:2023-04-18

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31701549)。

Foundation: National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation Project (31701549).

第一作者:刘天仪,女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术。

*通信作者:刘军,男,副教授,博士,主要从事食品酶工程方面的研究。

伤^[9-13]等功效。目前尽管已有对1株植物乳杆菌代谢水苏糖机制的相关报道^[14],但是由于微生物底物代谢的菌株特异性及结构选择性差异,对于其代谢机制的相关研究仍需进一步补充和完善。

本研究从发酵羊乳中筛选分离得到1株植物乳杆菌1-9,拟通过监控其以水苏糖为唯一碳源条件下的生长曲线并分析代谢产物,观察该菌株对水苏糖的特异性代谢能力;并进一步采用薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)监测发酵液中水苏糖的代谢历程,分析植物乳杆菌1-9代谢水苏糖的关键酶基因表达及酶活变化,探究植物乳杆菌1-9代谢水苏糖分子机制。研究旨在合理设计基于植物乳杆菌与水苏糖的益生组合及为相关产品开发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物乳杆菌ST-3,植物源功能食品北京市重点实验室保藏菌株。水苏糖,食品级,山东亿宝莱食品配料有限公司;牛肉浸粉、蛋白胨、酵母浸粉,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;四水合硫酸锰、七水合硫酸镁、磷酸氢二钾、乙醚、正丁醇、甲醇、乙酸,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;葡萄糖(glucose, Glu)、果糖(fructose, Fru)、半乳糖(galactose, Gal)、 α -乳糖(α -lactose, α -lac)、无水乙酸钠、硫酸、磷酸、无水碳酸钠,分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;柠檬酸三铵、无水乙酸钠、吐温-80,分析纯,西陇化工股份有限公司;对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷(*p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, *p*NPG),分析纯,北京索莱宝科技有限公司;对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, *p*NP),分析纯,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;琼脂糖,分析纯,北京百瑞极有限公司。水溶性脂肪酸混合标准溶液,色谱纯,北京北方伟业计量技术研究院;DNA提取试剂盒、RNA提取试剂盒,天根生化科技有限公司;qPCR预混试剂、Master qPCR Mix (SYBR Green I)试剂盒,北京擎科生物科技有限公司;MRS肉汤,生物试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司。无糖MRS肉汤(g/L):牛肉浸粉8.0、蛋白胨10.0、酵母浸粉4.0、无水乙酸钠5.0、磷酸氢二钾2.0、柠檬酸三铵2.0、七水合硫酸镁0.2、四水合硫酸锰0.05、吐温-801.0, pH值为6.6,121℃灭菌15 min;薄层层析板、GF254

硅胶板,青岛海洋化工有限公司。

1.2 仪器与设备

Multiskan FC型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;PTC-200型PCR仪、CFX96型荧光定量PCR仪,美国伯乐(Bio-Rad)公司;DYCP-31CN型电泳仪,北京六一生物科技有限公司;Nano-300型超微量分光光度计,杭州奥盛仪器有限公司;DGU-20A型高效液相色谱仪,日本岛津(Shimadzu)公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株分子生物学的鉴定

取实验室以牛奶-甘油保藏的植物乳杆菌ST-3菌液及3株未知菌株菌液,在MRS肉汤中以5%接种量接种,37℃培养24 h,重复2次后作为种子液备用。对从发酵羊乳中通过MRS平板划线分离得到的菌株(记为菌株1-9、1-1-1、1-k-1)进行分子生物学鉴定。取活化后的种子液,采用DNA提取试剂盒法提取并获得细菌全基因组。使用细菌16S通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')对菌株序列进行扩增,获得长度约为1600 bp的细菌16S rDNA,委托北京擎科生物科技有限公司进行16S rDNA测序。

1.3.2 植物乳杆菌代谢碳水化合物的菌株差异性及底物差异性测定

配制以葡萄糖、水苏糖为唯一碳源的MRS液体培养基,将活化的植物乳杆菌ST-3、菌株1-9、1-1-1、1-k-1以5%接种量接种,37℃恒温静置培养,在0、3、5、7、9、12、24、27、30、36、48 h测定发酵液在595 nm波长下的吸光度(OD_{595})。以时间为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制4株菌代谢葡萄糖、水苏糖的生长曲线。

以相同的方式补充绘制菌株1-9以半乳糖、果糖、 α -乳糖为唯一碳源的生长曲线。

1.3.3 菌株1-9代谢水苏糖产物测定

菌株1-9代谢水苏糖的过程中定时(0、3、5、7、9、12、24、27、30、36、48 h)取培养液并测定pH值,绘制pH值在代谢过程中的变化曲线。

参考李咏如等^[15]的方法并稍加修改,测定菌株1-9代谢水苏糖过程中发酵液中短链脂肪酸含量。使用无水乙醚萃取不同时间点发酵液中短链脂肪酸,采用高效液相色谱法分析短链脂肪酸种类和含量的变化。色谱条件:紫外检测器,Agilent ZORBAX 300SB-C18色谱柱(4.6 mm × 250 mm × 5 μ m),流动相A为甲醇,B为5 mmol/L磷酸盐溶液(pH =

2.8),梯度洗脱程序为0~8 min,5% A;8~13 min,38% A;13~20 min,40% A;20~40 min,60% A;40~45 min,5% A。初始甲醇柱温40℃,流速1.0 mL/min,进样量10 μL,检测波长210 nm。

采用薄层色谱法分析菌株1-9代谢水苏糖过程中糖种类变化。取0.5 mL各时间点发酵液至离心管,12 000 r/min离心10 min后收集上清液。采用微量进样针吸取上清液(4 μL)后点样于薄层层析板,点样完成后将薄层层析板置于展开剂中展开2次,晾干后显色剂浸润,吹风机吹干后115℃条件下显色5 min。采用水苏糖、葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖、乳糖标准品以及无糖MRS培养基作为对照。展开剂中正丁醇、乙酸、水体积比为3:2:1,显色剂中硫酸、甲醇体积比为5:95。

1.3.4 菌株1-9代谢水苏糖关键酶的基因表达情况测定

采用试剂盒提取并获得菌株1-9全基因组,委托上海派森诺生物科技有限公司进行细菌基因组框架构建及分析。通过NR、eggNOG、KEGG、Swiss-Prot、GO这5个数据库,对菌株1-9的蛋白编码基因进行功能注释,预测菌株1-9代谢水苏糖关键酶α-半乳糖苷酶的基因^[16]。

采用实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative PCR,qRT-PCR)检测预测代谢关键酶基因在代谢水苏糖过程中的表达情况。采用试剂盒提取菌株1-9在代谢水苏糖0、3、6、12、24 h时培养液的总RNA。采用qPCR预混试剂对菌株1-9 RNA进行反转录,合成cDNA第1条链,冻存于-80℃待用。利用Primer Premier 6设计内参基因与目的基因的引物序列,委托北京擎科生物科技有限公司进行合成。以该菌表达16S rRNA加工蛋白RimM的序列为内参基因。引物序列见表1。

表1 qPCR反应引物

Tab.1 Primer of qPCR

目的基因编号	上/下游序列	序列(5'-3')
16SRimM	F	ACAAGTTGTGACGACCGCTGAC
	R	CCATGATCCCGTTTGACCACCC
5-359	F	GCTGCTGTCCGTGACCACTTAG
	R	CGTGTGCTGCCAACCTGTGTAA
33-1497	F	GGATCGGGTTCCGACTTTFGTT
	R	ACGTTCGGCCACGATCTGGTA
34-1513	F	GGTCCCTGTCCATTGGGGATG
	R	CTTGAGCCCGATCAGCAAGTGT

通过qPCR试剂盒法检测目的基因表达情况。反应条件:预变性95℃1 min;循环反应95℃10 s,60℃采集荧光信号30 s,循环40次;熔解曲线65℃5 s,至95℃。反应结束后记录循环数并进行计算分析,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算表达差异量,其中 $\Delta Ct_1 = Ct_{空白目的} - Ct_{空白内参}$, $\Delta Ct_2 = Ct_{实验目的} - Ct_{实验内参}$, $\Delta\Delta CT = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$ 。当 $2^{-\Delta\Delta CT} \geq 2$ 时,认为基因是过量表达。空白组为使用MRS肉汤培养24 h的菌株1-9的总RNA。

1.3.5 菌株1-9代谢水苏糖上清液酶活力的测定

取0.5 mL各时间点发酵液至离心管,10 000 r/min离心10 min后收集上清液。滤膜(0.22 μm)过滤后测定上清液中α-半乳糖苷酶活力。96孔板中分别加入10、20、30 μL浓度为15 mmol/L pNPG底物,依次加入40、30、20 μL不同时间点过滤除菌的上清液并充分混匀,37℃恒温培养箱中孵育120 min后加入150 μL 2 mol/L Na₂CO₃溶液终止反应,405 nm波长条件下测定反应液的吸光度。配置浓度梯度为0、0.6、0.7、0.8 mmol/L的pNPG溶液,测定各标准溶液405 nm波长条件下的吸光度。以pNPG溶液浓度为横坐标,OD₄₀₅为纵坐标,绘制pNPG标准溶液浓度-吸光度的标准曲线($OD_{405} = 0.2286c + 0.0017, R^2 = 0.9962$)。以先加入2 mol/L Na₂CO₃溶液,后加入过滤除菌的上清反应液为空白组。

α-半乳糖苷酶酶活力的计算见式(1)。

$$\text{酶活力} = \frac{(OD_{405} - 0.0017) \times \text{稀释倍数}}{0.2286 \times 120} \quad (1)$$

式(1)中,酶活力为1 mL发酵上清液中含有的酶活力单位,1 min水解产生1 μmol pNPG所需要的酶量为1个酶活力单位,μmol/(min·mL)。120为测定条件下的反应时间,min。

2 结果与分析

2.1 菌株1-9分子生物学鉴定结果

采用分子生物学方法对实验室筛选分离的编号为1-9的菌株进行鉴定。16S rDNA测序后进行NCBI数据库BLAST序列比对并构建系统发育树,见图1。由图1可知,菌株1-9与植物乳杆菌2877(GenBank: MT611839.1)位于同一支,且16S rDNA序列相似度最高,达到99.93%。因此,鉴定菌株1-9为植物乳杆菌。其余实验所用菌株经16S rDNA测序

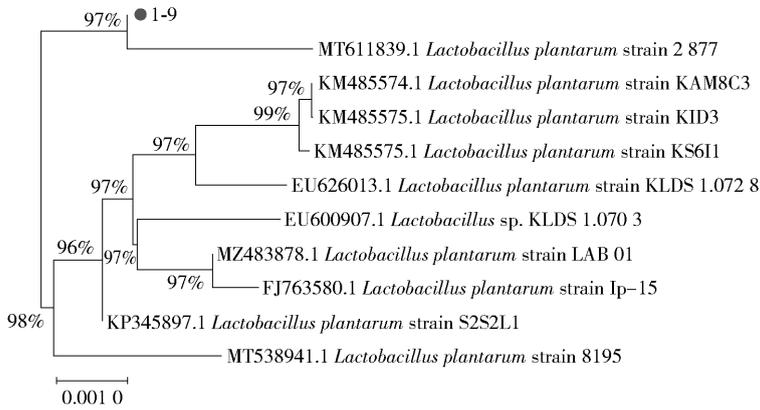


图1 菌株 1-9 的 16S rDNA 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of strain 1-9 based on 16S rDNA

比对后均鉴定为植物乳杆菌。

2.2 植物乳杆菌 1-9 生长情况分析

在相同糖为唯一碳源的情况下,不同植物乳杆菌表现出不同的增殖情况,见图2。由图2可知,植物乳杆菌 1-9 表现出优异的碳水化合物特别是水苏糖代谢能力。发酵 0~3 h,植物乳杆菌 1-9 在不同碳源上的生长均处于延滞期;发酵 3 h 后,以单糖(葡萄糖、半乳糖、果糖)为唯一碳源的发酵液中植物乳杆菌 1-9 进入对数生长期,以水苏糖为唯一碳源的植物乳杆菌 1-9 于发酵 9 h 后进入对数期,而植

物乳杆菌 1-9 对于 α -乳糖的代谢能力显著弱于单糖及水苏糖;发酵 48 h 后,以水苏糖为唯一碳源的植物乳杆菌 1-9 发酵液在 595 nm 波长下吸光度与单糖(葡萄糖、半乳糖、果糖)无显著差异,且显著高于 α -乳糖。有研究表明, α -乳糖溶于水后构象发生改变,溶液中的乳糖为 α -构象与 β -构象的平衡,不利于植物乳杆菌 1-9 分泌 α -半乳糖苷酶^[17]。

2.3 植物乳杆菌 1-9 代谢水苏糖过程中发酵液 pH 值的变化分析

在水苏糖为唯一碳源条件下,对植物乳杆菌 1-9

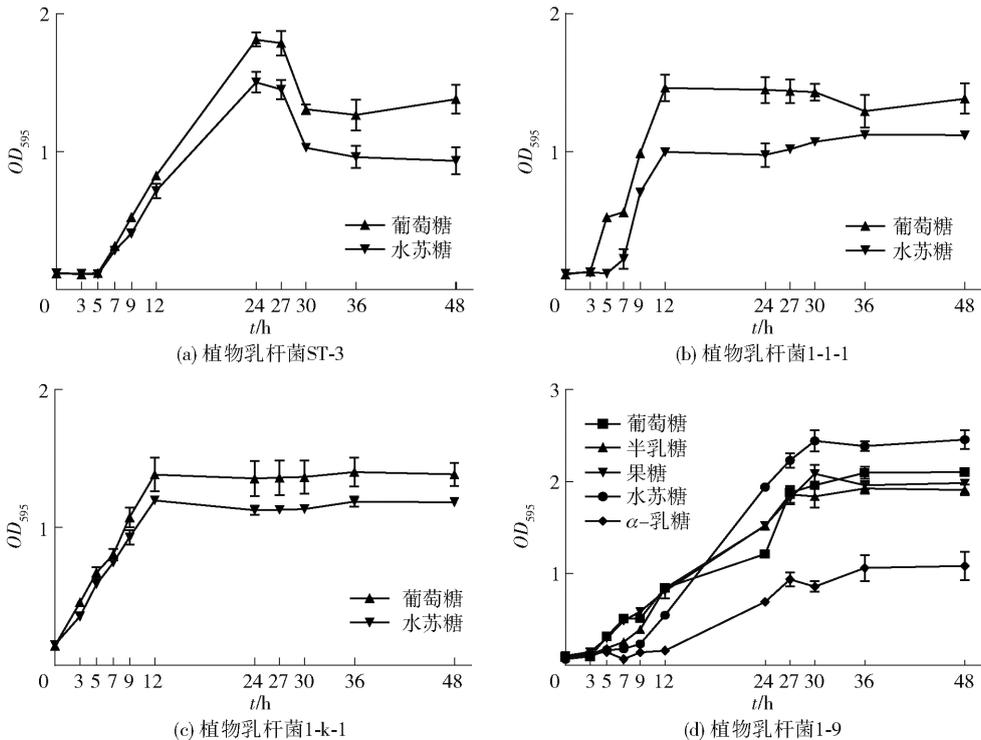


图2 不同碳源的植物乳杆菌生长情况

Fig.2 Growth of *Lactiplantibacillus plantarum* on different carbon sources

发酵液 pH 值变化进行监测,见图 3。随着发酵时间的延长,发酵液 pH 值逐渐降低并最终趋于平稳。发酵 0~9 h,发酵液 pH 值由 6.84 ± 0.10 降低至 6.24 ± 0.07 ;发酵 9~24 h,发酵液 pH 值迅速降低至 4.00 ± 0.03 ;24 h 后至发酵结束,pH 值始终保持平稳。植物乳杆菌 1-9 代谢水苏糖发酵液 pH 值变化与生长曲线变化相吻合,表明植物乳杆菌 1-9 发酵 9 h 后进入对数生长期,迅速代谢水苏糖,产生乳酸及短链脂肪酸等代谢产物,从而降低发酵液 pH 值。随着发酵时间的继续延长,植物乳杆菌 1-9 生长进入平台期,培养基中残余水苏糖逐渐减少。

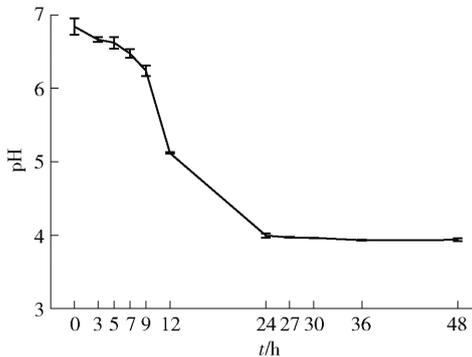


图3 植物乳杆菌 1-9 代谢水苏糖过程中发酵液的 pH 值

Fig.3 pH of fermentation broth during stachyose metabolism by *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9

2.4 植物乳杆菌 1-9 代谢水苏糖产短链脂肪酸的变化分析

短链脂肪酸是微生物代谢碳水化合物产生的主要产物,体外实验和体内实验都揭示了植物乳杆菌可代谢碳水化合物产生乙酸、丙酸、丁酸、戊酸等短链脂肪酸^[18-19]。以水苏糖为唯一碳源,采用 HPLC 法分析植物乳杆菌 1-9 发酵液中短链脂肪酸组成及含量的变化,见图 4。由图 4 可知,植物乳杆菌 1-9 代谢水苏糖主要产生乙酸、丙酸及戊酸。由于发酵

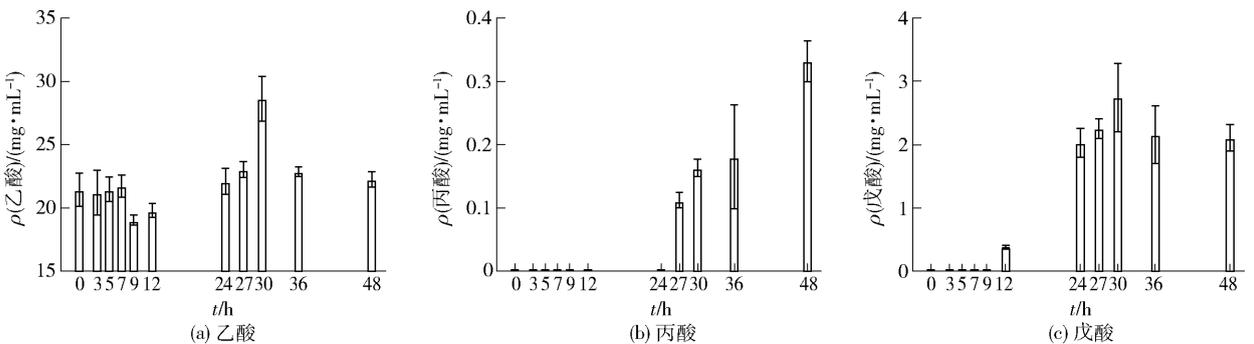


图4 植物乳杆菌 1-9 代谢水苏糖产生的短链脂肪酸变化

Fig.4 Changes of short chain fatty acids produced by *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9 during stachyose metabolism

培养基中存在乙酸钠,导致发酵前期(0~7 h)植物乳杆菌 1-9 发酵液中乙酸维持在较高水平;发酵 12 h 时,发酵液中乙酸含量逐渐上升,至发酵 30 h 时达到最高质量浓度(28.64 mg/mL)。发酵液中丙酸含量由发酵 27 h 时开始积累,至发酵 48 h 时达到最高质量浓度(0.33 mg/mL)。而发酵液中戊酸由发酵 12 h 时即开始积累,至发酵 30 h 时质量浓度达到最大(2.74 mg/mL)。可见,植物乳杆菌 1-9 代谢水苏糖产短链脂肪酸可能是导致发酵液 pH 值降低的重要原因。肠道中的植物乳杆菌通常由于产短链脂肪酸使肠道 pH 值降低,从而可以抑制致病性肠道细菌并调节免疫系统^[5]。

2.5 植物乳杆菌 1-9 发酵水苏糖的糖代谢历程分析

采用 TLC 法对植物乳杆菌 1-9 发酵水苏糖的糖代谢历程进行监测,见图 5。泳道 5 中水苏糖样品显示为 2 个条带,表明水苏糖样品中除含水苏糖外,还含有一定杂质,经比对推断为 α -乳糖。由 TLC 分析结果可知,随着发酵的进行,0~9 h 时发酵液中蔗糖含量逐渐上升,推测是由于植物乳杆菌 1-9 表达的 α -半乳糖苷酶首先作用于水苏糖的 2 个 α -1,6-糖苷键,但由于空间位阻,优先选择作用于末端 α -半乳糖苷键,生成半乳糖、少量乳糖和蔗糖,而生成的半乳糖可作为碳源被植物乳杆菌快速代谢。发酵 12 h 后,样品中的水苏糖被水解完毕,发酵液中存在残留的蔗糖及尚未被代谢完全的乳糖;植物乳杆菌 1-9 可能少量表达 β -果糖苷酶和 α -葡萄糖苷酶水解蔗糖生成葡萄糖与果糖后进一步作为碳源进行代谢;待蔗糖被消耗完毕后,植物乳杆菌 1-9 可能表达 β -半乳糖苷酶对乳糖进行水解代谢;24 h 至发酵结束,发酵液中无残存糖,此结果与植物乳杆菌 1-9 生长曲线吻合。

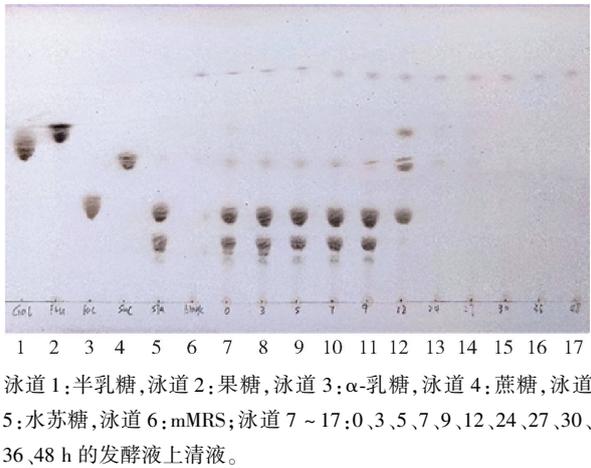


图5 植物乳杆菌1-9水苏糖代谢过程的薄层色谱分析

泳道1:半乳糖,泳道2:果糖,泳道3: α -乳糖,泳道4:蔗糖,泳道5:水苏糖,泳道6:mMRS;泳道7~17:0、3、5、7、9、12、24、27、30、36、48 h的发酵液上清液。

Fig. 5 TLC analysis of stachyose metabolization processes by *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9

2.6 植物乳杆菌1-9代谢水苏糖关键酶基因表达及酶活力分析

研究表明,乳酸杆菌中通常不存在低聚糖的特异性转运系统^[20],因此在代谢功能性低聚糖时,植物乳杆菌可通过糖苷水解酶初步降解低聚糖,再通过单糖或二糖的转运系统进入细胞质,进行糖酵解。例如植物乳杆菌在菊粉代谢过程中,通过 *fosE* 基因编码的 β -果糖苷酶将菊粉进行初步水解后,通过蔗糖的磷酸转移酶转运系统(PTS)中的关键基因 *pts1BCA* 或果糖PTS转运系统进入细胞进行进一步代谢^[21-23]。根据低聚糖的结构不同,植物乳杆菌可分泌不同的糖苷水解酶,例如低聚半乳糖的水解关键酶 β -半乳糖苷酶^[20]、短链低聚果糖的水解酶 β -果糖呋喃糖苷酶^[24]。有研究证实,植物乳杆菌中聚集着参与半乳糖苷代谢的基因^[25-28],特别是对大豆低聚糖(例如棉子糖和水苏糖)的 α -Gal 结构具有独特的代谢及转运系统基因簇,其编码 α -半乳糖苷酶的基因在转录水平上受部分具有 α -Gal 结构的糖

调节^[27]。因此,通过构建植物乳杆菌1-9基因组框架及预测与注释关键代谢酶基因,结合水苏糖的 α -Gal 结构分析,从植物乳杆菌1-9基因组中预测到3个编码 α -半乳糖苷酶的基因(5-359、33-1497、34-1513)可能为关键酶基因。采用 qRT-PCR 对预测的3个编码 α -半乳糖苷酶的基因的相对表达量进行分析,结果见图6。由图6可知,植物乳杆菌1-9在代谢水苏糖时,基因5-359在发酵6 h时高表达,发酵12 h相对表达量降低;基因33-1497及34-1513相对表达量无显著变化,说明预测编码 α -半乳糖苷酶的基因5-359可能为植物乳杆菌1-9代谢水苏糖过程中的关键酶。对植物乳杆菌1-9代谢水苏糖过程中培养基上清液 α -半乳糖苷酶活力进行监测发现,发酵上清液中 α -半乳糖苷酶活力在5~12 h时不断增高,发酵24 h至发酵结束时基本保持稳定。推测植物乳杆菌1-9以水苏糖为唯一碳源时,在生长延滞期与对数期前期主要表达 α -半乳糖苷酶水解水苏糖生成半乳糖并被植物乳杆菌1-9代谢;而在对数生长期后期植物乳杆菌1-9可能继续编码 β -果糖苷酶和 α -葡萄糖苷酶等糖苷水解酶水解残留的乳糖和少量蔗糖。这与水苏糖诱导植物乳杆菌 RB1 增殖机制的研究结果相符^[16]。

由实验结果可知,植物乳杆菌1-9可以通过表达 α -半乳糖苷酶基因5-359,在以水苏糖为唯一碳源的情况下,分泌 α -半乳糖苷酶,将水苏糖水解为半乳糖、葡萄糖等,进而促进植物乳杆菌1-9增殖。推测代谢过程见图7^[23]。

3 结论

本研究从发酵羊乳中筛选分离得到1株乳酸菌菌株1-9,经分子生物学鉴定为植物乳杆菌。植物

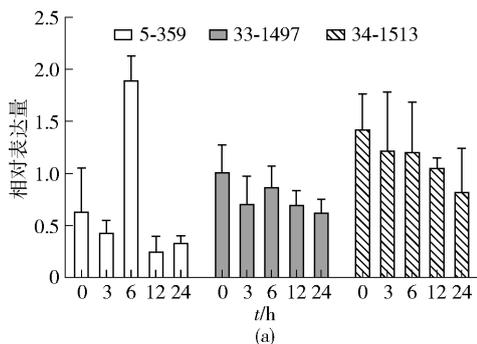


图6 植物乳杆菌1-9编码 α -半乳糖苷酶的基因表达情况

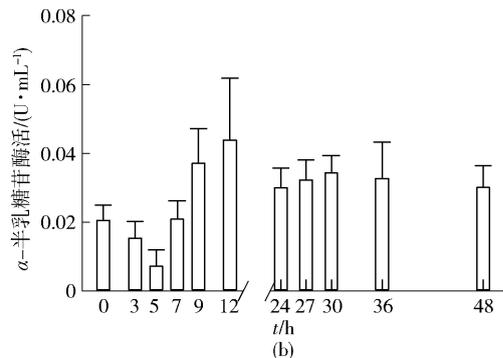


Fig. 6 Expression of gene encoded α -galactosidase in *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9

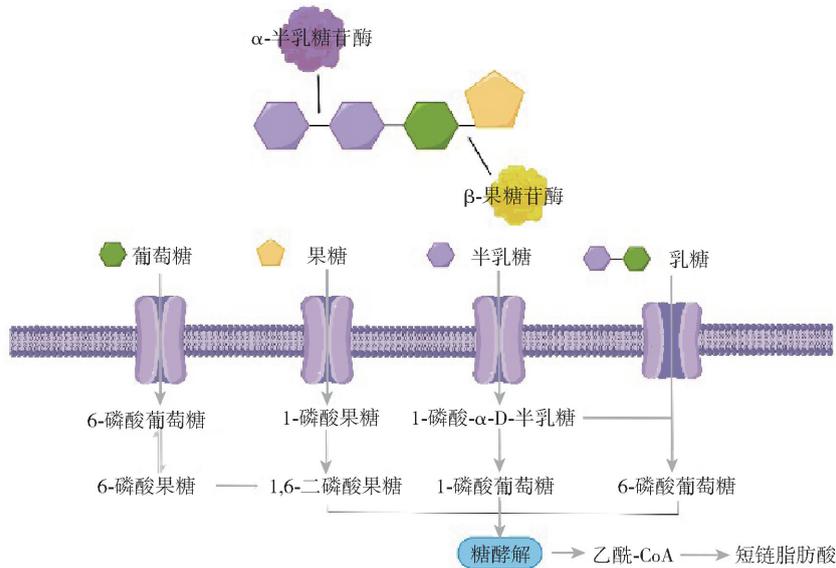


图7 植物乳杆菌1-9代谢水苏糖历程

Fig. 7 Metabolic procedure of stachyose by *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9

乳杆菌1-9对于水苏糖具有优异的代谢能力,发酵液在595 nm波长条件下吸光度与单糖(葡萄糖、半乳糖、果糖)无显著差异。植物乳杆菌代谢水苏糖可产生乙酸和戊酸,发酵30 h后乙酸及戊酸分别达到最高质量浓度,28.64 mg/mL和2.74 mg/mL;短链脂肪酸的积累导致了发酵液pH值显著降低。TLC分析植物乳杆菌代谢水苏糖历程表明,植物乳杆菌1-9优先表达 α -半乳糖苷酶作用于水苏糖末端 α -半乳糖苷键^[26-27],生成半乳糖、少量乳糖和蔗糖。通过对发酵液中 α -半乳糖苷酶活力监测发现,植物乳杆菌1-9代谢水苏糖过程中可分泌 α -半乳糖苷酶。qRT-PCR分析了植物乳杆菌1-9基因组中3个可能编码 α -半乳糖苷酶的关键基因5-359、33-1497及34-1513的表达,结果表明,5-359可能表达 α -半乳糖苷酶并参与植物乳杆菌代谢水苏糖。

参考文献:

- [1] 蔚晓敏. 长寿老人源植物乳杆菌改善小鼠衰老的益生性评价及其机制探究[D]. 南昌: 南昌大学,2020:1-2.
WEI X M. Exploration of probiotic properties and mechanism of *Lactobacillus plantarum* from longevity elderly to improve senescence in mice[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020:1-2.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部公告2008年第20号[J]. 中国食品卫生杂志,2008,20(6):560-563.
- [3] WANG J, JI H F, WANG S X, et al. Probiotic *Lactoba-*

cillus plantarum promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota[J]. *Frontiers in Microbiology*,2018,9:1953.

- [4] 刘颖颖,卢艳波,杨小雁,等. 植物乳杆菌DY6的生理特性及代谢机制分析[J]. 食品与发酵工业,2022,48(18):11-19.
LIU Y Y, LU Y B, YANG X Y, et al. Physiological characteristics of *Lactobacillus plantarum* DY6 and its metabolic mechanisms analysis[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(18):11-19.
- [5] 汪攀,易敢峰,朱胜男,等. 植物乳杆菌FJR分离鉴定及益生特性研究[J]. 中国畜牧杂志,2023,59(2):274-278.
WANG P, YI G F, ZHU S N, et al. Isolation, identification and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* FJR[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2023, 59(2):274-278.
- [6] 孙杰,沈敏,吴恬菲,等. 人肠源植物乳杆菌PUM1785全基因组测序分析与功能挖掘[J]. 微生物学杂志,2021,41(5):69-79.
SUN J, SHEN M, WU T F, et al. Whole genome sequencing analysis and function mining of *Lactobacillus plantarum* PUM1785 from human intestine[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 41(5):69-79.
- [7] 张欢畅,段云峰,徐黎明,等. 两株母乳源植物乳杆菌的全基因组测序分析[J]. 微生物学通报,2020,47(6):1876-1887.
ZHANG H C, DUAN Y F, XU L M, et al. Whole genome sequencing of two *Lactobacillus plantarum* strains

- isolated from human milk [J]. *Microbiology China*, 2020, 47(6):1876-1887.
- [8] 刘文君, 吕瑞瑞, 李伟程, 等. 基于比较基因组学揭示不同植物乳杆菌的遗传特征及菌株差异:以 *Lactobacillus plantarum* P9 和 Lp-6 研究为例[J]. *微生物学报*, 2021, 61(8):2370-2381.
- LIU W J, LÜ R R, LI W C, et al. Comparative genomics revealed genetic characteristics of different *Lactobacillus plantarum* strains: using P9 and Lp-6 strains as examples [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(8):2370-2381.
- [9] HE L W, ZHANG F R, JIAN Z Y, et al. Stachyose modulates gut microbiota and alleviates dextran sulfate sodium-induced acute colitis in mice. [J]. *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 2020, 26(3): 153-159.
- [10] XI M L, LI J, HAO G, et al. Stachyose increases intestinal barrier through Akkermansia muciniphila and reduces gut inflammation in germ-free mice after human fecal transplantation [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109288.
- [11] XI M L, YAO Q, GE W P, et al. Effects of stachyose on intestinal microbiota and immunity in mice infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103689.
- [12] ZHU S Y, LI X P, SONG L Q, et al. Stachyose inhibits vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization and affects gut microbiota in mice [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 159: 105094.
- [13] 李丽秋, 桂金秋. 中药提取物水苏糖对实验性肝硬化大鼠血浆内毒素及肠道菌群的影响 [J]. *中国微生物生态学杂志*, 2006, 18(2):107-109.
- LI L Q, GUI J Q. Study of the stachyose, an extract of Chinese herbal medicine, on pasm lipopolysaccharide endotoxin (LPS) and intestinal microflora in experimental liver cirrhosis rats [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2006, 18(2):107-109.
- [14] 魏艳. 水苏糖—乳酸菌合生元的免疫调节功效及增菌机制研究 [D]. 宁波: 宁波大学, 2013:35-49.
- WEI Y. Study on immunomodulation efficacy of stachyose-lactic acid bacteria synbiotics and proliferation mechanism [D]. Ningbo: Ningbo University, 2013: 35-49.
- [15] 李咏如, 李徐, 陶胜男, 等. 反相高效液相色谱法测定 Rancimat 测量池水中的短链脂肪酸 [J]. *中国油脂*, 2017, 42(9):126-128.
- LI Y R, LI X, TAO S N, et al. Determination of short-chain fatty acids in Rancimat measuring cell water by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *China Oils and Fats*, 2017, 42(9):126-128.
- [16] PAN Q, ZENG X Q, PAN D D, et al. The proliferation mechanism of *Lactobacillus plantarum* RB1 stimulated by stachyose [J]. *Current microbiology*, 2017, 74(6): 732-738.
- [17] 朱丹丹. 乳品加工技术 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2013, 8:11-12.
- ZHU D D. Dairy processing technology [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2013, 8:11-12.
- [18] MA Y, FEI Y Q, HAN X B, et al. *Lactobacillus plantarum* alleviates obesity by altering the composition of the gut microbiota in high-fat diet-fed mice [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 947367.
- [19] BERGILLOS-MECA T, COSTABILE A, WALTON G, et al. *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential probiotic activity of *Lactobacillus plantarum* C4 in batch culture systems [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 60(1): 420-426.
- [20] SCHWAB C, GÄNZLE M. Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 315(2): 141-148.
- [21] 郑彦坤. 植物乳杆菌 LP-F1 基因组和糖代谢研究及在发酵乳中的应用 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021:8-9,55-59.
- ZHENG Y K. Study on genome and carbohydrate metabolism of *Lactiplantibacillus plantarum* LP-F1 and its application in fermented milk [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021:8-9,55-59.
- [22] BUNTIN N, HONGPATTARAKERE T, RITARI J, et al. An inducible operon is involved in inulin utilization in *Lactobacillus Plantarum* strains, as revealed by comparative proteogenomics and metabolic profiling [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(2): e02402-16.
- [23] 陈臣. 植物乳杆菌 ST-III 全基因组序列分析及其对低聚果糖代谢通路的解析 [D]. 无锡: 江南大学, 2014: 77-98.
- CHEN C. Characterization of the complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* ST-III and its pathways for fructooligosaccharides metabolism [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014: 77-98.
- [24] SAULNIER D M A, MOLENAAR D, DE VOS W M, et al. Identification of prebiotic fructooligosaccharide

- metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS₁ through microarrays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(6): 1753 – 1765.
- [25] DELGADO-FERNANDEZ P, DE LAS RIVAS B, MUÑOZ R, et al. Biosynthesis of nondigestible galactose-containing hetero-oligosaccharides by *Lactobacillus plantarum* WCFS₁ MeIA α -Galactosidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(3): 955 – 965.
- [26] DELGADO-FERNANDEZ P, PLAZA-VINUESA L, HERNANDEZ-HERNANDEZ O, et al. Unravelling the carbohydrate specificity of MeIA from *Lactobacillus plantarum* WCFS₁: an α -galactosidase displaying regioselective transgalactosylation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 153: 1070 – 1079.
- [27] SILVESTRONI A, CONNES C, PIARD J, et al. Characterization of the meIA locus for α -galactosidase in *Lactobacillus plantarum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5464 – 5471.
- [28] SANNI I A, AHRNE S, ONILUDE A A. Production of α -galactosidase by *Lactobacillus plantarum* isolated from diverse sources [J]. Journal of Basic Microbiology, 1995, 35(6): 427 – 432.

Study on Mechanism for Stachyose Metabolization by *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9

LIU Tianyi, ZHANG Wenjing, LIAO Qiang, MAO Yonghe, LIU Jun*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: A strain of *Lactobacillus* was successfully isolated from fermented goat milk and identified as *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9, which could efficiently utilize stachyose as the carbon source. In order to investigate the mechanism for stachyose metabolization by *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9, the growth curve was established with stachyose as the only carbon source. The production of short chain fatty acids was monitored by high performance liquid chromatography, while thin-layer chromatography were used to monitor the metabolic procedures of stachyose by *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9. Besides, on the basis of monitoring the gene expression of key stachyose metabolizing enzyme, the changes of related enzyme activity in fermentation broth were analyzed. The results showed that *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9 metabolized stachyose and produced acetic acid and valeric acid as the major short chain fatty acids, which reached the highest concentration of 28.64 mg/mL and 2.74 mg/mL, respectively. The accumulation of short-chain fatty acids resulted in a significant decrease of pH to 4.00. Based on the results of metabolic procedure of stachyose and changes of gene expression and enzyme activity, gene 5-359 in the genome of *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9 might encode α -galactosidase. This segment could hydrolyze the α -galactoside bond at the end of stachyose and produce galactose and small amount of lactose and sucrose, thus facilitating the utilization of stachyose by *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9. This study aimed to provide theoretical reference for the reasonable design of symbiotics based on *Lactiplantibacillus plantarum* and stachyose, and the development of related products.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum* 1-9; stachyose; metabolic mechanism; α -galactosidase; genome analysis