

保加利亚乳杆菌 ND02 发酵乳清过程中的代谢特性

彭江英, 李丹阳, 刘洋硕, 张文弈, 孙天松*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 利用 *L. bulgaricus* ND02 对乳清进行发酵, 研究其在发酵乳清过程中的代谢特性。通过分析乳清发酵过程中代谢物的动态变化规律, 评估代谢产物对发酵乳清生理功效的影响。采用液质联用技术检测 *L. bulgaricus* ND02 发酵乳清过程中代谢物质, 并采用多变量统计方法对差异代谢物进行筛选与分析。通过数据库比对鉴定得到异亮氨酸、多肽、甲基-D-吡喃半乳糖苷、油酸、琥珀酸、黄嘌呤和胞嘧啶腺苷酸等 37 个显著差异代谢物 ($P<0.05$)。其中, 半胱氨酸、Tyr-Trp、苯乳酸和胞嘧啶核苷酸等 23 个代谢物在发酵乳清中的相对含量显著增加 ($P<0.05$)。 *L. bulgaricus* ND02 在发酵乳清过程中产生了大量的氨基酸、寡肽、有机酸和核苷酸, 这些物质赋予发酵乳清特殊的生理功效和营养价值。

关键词: 发酵乳清; 保加利亚乳杆菌 ND02; 液质联用; 代谢组学

中图分类号: TQ 92 文章编号: 1673-1689(2020)11-0025-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.11.004

Metabolic Characteristics of *L. bulgaricus* ND02 during Whey Fermentation

PENG Jiangying, LI Danyang, LIU Yangshuo, ZHANG Wenyi, SUN Tiansong*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: Fermented whey was prepared with *L. bulgaricus* ND02 in this study to investigate the metabolic characteristics of *L. bulgaricus* ND02 during fermentation. The effects of metabolites on the physiological functions of fermented whey was evaluated based on the dynamic changes of metabolites during whey fermentation. The metabolites in whey fermentation were detected by LC-MS. The screening and analysis of the differential metabolites were conducted through multivariate statistical method. Potential biomarkers were screened out according to database searching. A total of 37 metabolites, including isoleucine, peptides, methyl-D-galactopyranoside, oleic acid, amber acid, jaundice, cytosine adenosine and etc., were significantly identified ($P<0.05$). The relative content of 23 metabolites, such as homocysteine, Tyr-Trp, phenyllactic acid, cytidine monophosphate and etc., increased significantly in fermented whey ($P<0.05$). *L. bulgaricus* ND02 produced a large number of essential amino acids, oligopeptides, organic acids and nucleotides during fermentation, giving the special physiological functions and nutritional values of fermented whey.

Keywords: fermented whey, *L. bulgaricus* ND02, LC-MS, metabolomics

收稿日期: 2019-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771954)。

* 通信作者: 孙天松(1967—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事乳品微生物方面的研究。E-mail: sts9940@sina.com

代谢组学(metabolomics)是研究关于生物体受刺激或被扰动后,其代谢物变化规律的科学^[1]。目前,利用代谢组学技术分析发酵乳制品的营养成分,检测发酵过程中代谢物的变化并揭示代谢物产生机制的研究越来越多^[2]。

乳清是生产干酪和干酪素的副产品,富含大量的乳糖、乳清蛋白和其它微量成份,保留了牛奶中55%的营养成分^[3]。研究表明,利用乳酸菌发酵乳清,可分解乳清蛋白释放出免疫调节肽、抗氧化肽、抗高血压肽和必需氨基酸等,同时可将乳糖转化为乳酸,增加乳清产品的生物活性和营养价值^[4]。

保加利亚乳杆菌 ND02(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* ND02) 是分离自青海传统发酵酸牦牛奶中的乳酸菌,通过对其进行单菌发酵时间、发酵乳风味以及发酵乳脱水缩合能力等方面的研究,发现此菌株具有优良的发酵特性^[5]。*L.bulgaricus* ND02 基因组中含有 431 个独有的基因,其中包括乙酰转移酶、谷氨酸脱羧酶、多糖合成蛋白、多种糖基转移酶以及胞外多糖合成簇等^[6]。从基因角度表明了 *L.bulgaricus* ND02 在发酵过程中具有优良的凝乳特性且具有提高发酵乳制品营养价值的潜在特性,但还需对其代谢物进行进一步鉴定和研究。

目前,国内外利用代谢组学技术分析乳清在发酵过程中代谢物质变化的研究还较少。作者利用 *L. bulgaricus* ND02 发酵乳清,采用 UPLC-Q-TOF MSE 代谢组学技术,比较分析 *L.bulgaricus* ND02 发酵乳清过程中代谢物质的变化,并通过主成分分析(PCA)结合偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)研究 *L.bulgaricus* ND02 在发酵乳清过程中的代谢特性,评估代谢产物对发酵乳清生理功效的影响,为发酵乳清的生产开发以及乳清原料的合理利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

Waters Acquity UPLC-Q-TOF MS 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱仪;Waters Acquity UPLC® HSS T3 (1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm) 色谱柱; Waters MassLynx 4.1 及 Progenesis QI 工作站; 均购自美国 Waters 公司; Milli-Q 纯水仪: 购自美国密理博公司。

1.2 材料与试剂

试验菌株 *L. bulgaricus* ND02: 内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供; 乳清蛋白粉(蛋白质质量分数为 80%): 购自新西兰恒天然公司; 异亮氨酸-脑啡肽: 购自 Waters 公司; LC-MS 级乙腈、甲酸、氢氧化铵溶液: 均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 发酵乳清的制备

将乳清溶液(乳清蛋白粉 3.8%) 经 95 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 10 min, 冷却至 42 $^{\circ}\text{C}$ 后, 按 5×10^6 CFU/mL 接入 *L. bulgaricus* ND02, 于 42 $^{\circ}\text{C}$ 进行发酵, 发酵终点 pH 值为 4.5, 收集乳清溶液样本和发酵乳清样本, 并置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.4 样品前处理

吸取 3 mL 样本于 5 mL EP 管中, 加入 1 mL 乙腈, 充分混匀, 10 000 g 高速离心 10 min, 吸取 1 mL 上清液于新的 5 mL EP 管中, 加入 3 mL 乙腈, 充分混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h, 12 000 g 高速离心 5 min, 取上清液, 旋转蒸发浓缩 9 h, 加体积分数 40% 乙腈溶液复溶, 0.22 μm 微孔滤膜过滤于上样瓶中。将所有上样瓶中的样品各吸 100 μL , 加入同一上样瓶中, 作为质量监测(Quality control, QC)样本。每隔 6 个样本进行一次质控样本的采集, 用于评估在样本采集过程中仪器状态的稳定性。

1.5 发酵乳清 UPLC-Q-TOF MSE 测定条件

1.5.1 超高效液相色谱条件 色谱柱采用 Acquity UPLC® HSS T3 (1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm), 柱温 45 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 5 μL , 流量 0.45 mL/min。正离子模式扫描下: 流动相 A1 为 H_2O +0.1% 甲酸, B1 为乙腈+0.1% 甲酸, 梯度洗脱条件见表 1; 负离子模式扫描下: 流动相 A2 为 H_2O +0.1% 氢氧化铵溶液, B2 为纯乙腈, 梯度洗脱条件见表 2。

表 1 正离子模式下流动相梯度洗脱条件

Table 1 Mobile phase gradient program in positive ion mode

时间/ min	流量/ (mL/min)	流动相 A1 体积分数/%	流动相 B1 体积分数/%	线性梯度
0	0.45	98.0	2.0	6
0.25	0.45	98.0	2.0	6
12.00	0.45	2.0	98.0	6
14.00	0.45	2.0	98.0	6
14.10	0.45	98.0	2.0	6
17.00	0.45	98.0	2.0	6

表 2 负离子模式下流动相梯度洗脱条件

Table 2 Mobile phase gradient program in negative ion mode

时间/min	流量/ (mL/min)	流动相 A2 体积分数/ %	流动相 B2 体积分数/ %	线性梯度
0	0.45	98.0	2.0	0
0.25	0.45	98.0	2.0	6
12.00	0.45	2.0	98.0	6
14.00	0.45	2.0	98.0	6
14.10	0.45	98.0	2.0	6
17.00	0.45	98.0	2.0	6

1.5.2 质谱条件 质谱采用电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺)和负离子模式(ESI⁻)进行采集,以氮气作为雾化气,一级质荷比扫描范围为 50~1 200,对所有母离子选择 20~40 eV 的能量进行破碎,采集所有的碎片信息。毛细管电压 3 kV,锥孔电压 40 kV,离子源温度(Source Temperature)120 ℃,脱溶剂气温度(Desolvation Temperature)500 ℃,脱溶剂气流速(Desolvation Gas flow)800 L/h,锥孔气流量(Cone Gas flow)50 L/h,扫描时间(Scan Time)0.2 s。正离子模式下锁定质量数(Lock Mass)为 556.277 1,负离子模式下锁定质量数为 554.261 5,Lock Mass 扫描时间为 0.2 s,采集间隔为 20 s,使用质量浓度为 2 ng/mL 亮氨酸脑啡肽作为校正液进行实时质量校正,流量为 10 μ L/min。

1.6 统计学分析及代谢物的鉴定

UPLC-Q-TOF MSE 采集到的原始数据,包括相应物质的质核比 m/z 、保留时间和离子强度,通过 MassLynx 4.1 工作站和 Progenesis QI 软件进行峰提取、峰对齐、去卷积化等处理,得到所有标志物在各样本中的量化数据。将所得的量化数据导入 EZinfo (Waters, USA) 软件进行多元统计学分析,主要采用主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法—判别分析 (OPLS-DA) 来进行建模分析。采用化合物对分组的贡献程度 VIP 值 >1、 $P < 0.05$ 和差异倍数 ≥ 2 相结合的条件筛选乳清发酵过程中的显著差异代谢物。基于显著差异代谢物的质核比、保留时间以及碎片信息,通过搜索 Chempidder、HMDB、KEGG、METLIN、ECMDB 等数据库获得参考代谢物,完成鉴定。

2 结果与分析

2.1 发酵乳清 UPLC-Q-TOF MSE 色谱图分析

利用 UPLC-Q-TOF MSE 代谢组学技术研究 *L. bulgaricus* ND02 发酵乳清过程中代谢物质的变化。正、负离子模式下发酵乳清(FW)和乳清溶液(W)的代表性基峰强度色谱图 (basepeak intensity chromatograms, BPI) 见图 1。BPI 图是将每个时间点质谱图中最强的离子的强度连续描绘得到的图谱,它能反映样本的整体信息^[7]。从图 1 可看出,在正、负离子模式下,发酵乳清和乳清溶液在色谱峰的数量和基峰强度方面均存在明显差异。

2.2 发酵乳清代谢组学分析

为了进一步观察乳清发酵过程中代谢物的差异,将 Progenesis QI 软件所得的量化数据导入 EZinfo 软件进行多元统计学分析,通过主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法—判别分析 (OPLS-DA),得到 2 组样本间的聚集情况,结果见图 2—3。在 PCA 得分图上,每一个点代表一个样本,每个样本的位置由其自身的代谢决定,具有相似代谢物的样本在得分图上处于相近的地理位置。距离差距越大,也就表明样品间的代谢物差异越大。由图 2 可看出,两组平行样品间能够较好的聚集在一起,且组间显著区分。此外,QC 样本也能较好的聚集在一起,说明检测分析体系的稳定性和重复性较好。结果表明,经 *L. bulgaricus* ND02 发酵的乳清与乳清溶液中的代谢物质存在明显的差异。为了确定 *L. bulgaricus* ND02 发酵乳清过程中差异显著的代谢物,进一步生成 OPLS-DA 模型所对应两组样本分类的得分图(S-PLOT)。基于 S-PLOT 图选择 VIP 值 >1 的离子,将其看做是可能潜在的标志物,结果见图 4。在 S-PLOT 图中,离子对组间分类的贡献越大,其距离原点越远。图 4 中存在多个远离中心区域的离子,表明乳清发酵过程中存在差异代谢物。

2.3 潜在标志物的鉴定与分析

鉴定差异代谢物的方法是通过 MSE 数据采集方法得到母离子和相应的碎片离子信息,根据其保留时间、丰度值、质核比,经 Progenesis QI 软件筛选分析。基于变量重要性投影值 VIP 值 >1、 $P < 0.05$ 和差异倍数 ≥ 2 的代谢物确定标准,共鉴定出 37 种代谢物,包括氨基酸、多肽、碳水化合物及相关代谢物、脂肪酸及相关代谢物、有机酸、维生素中间产物

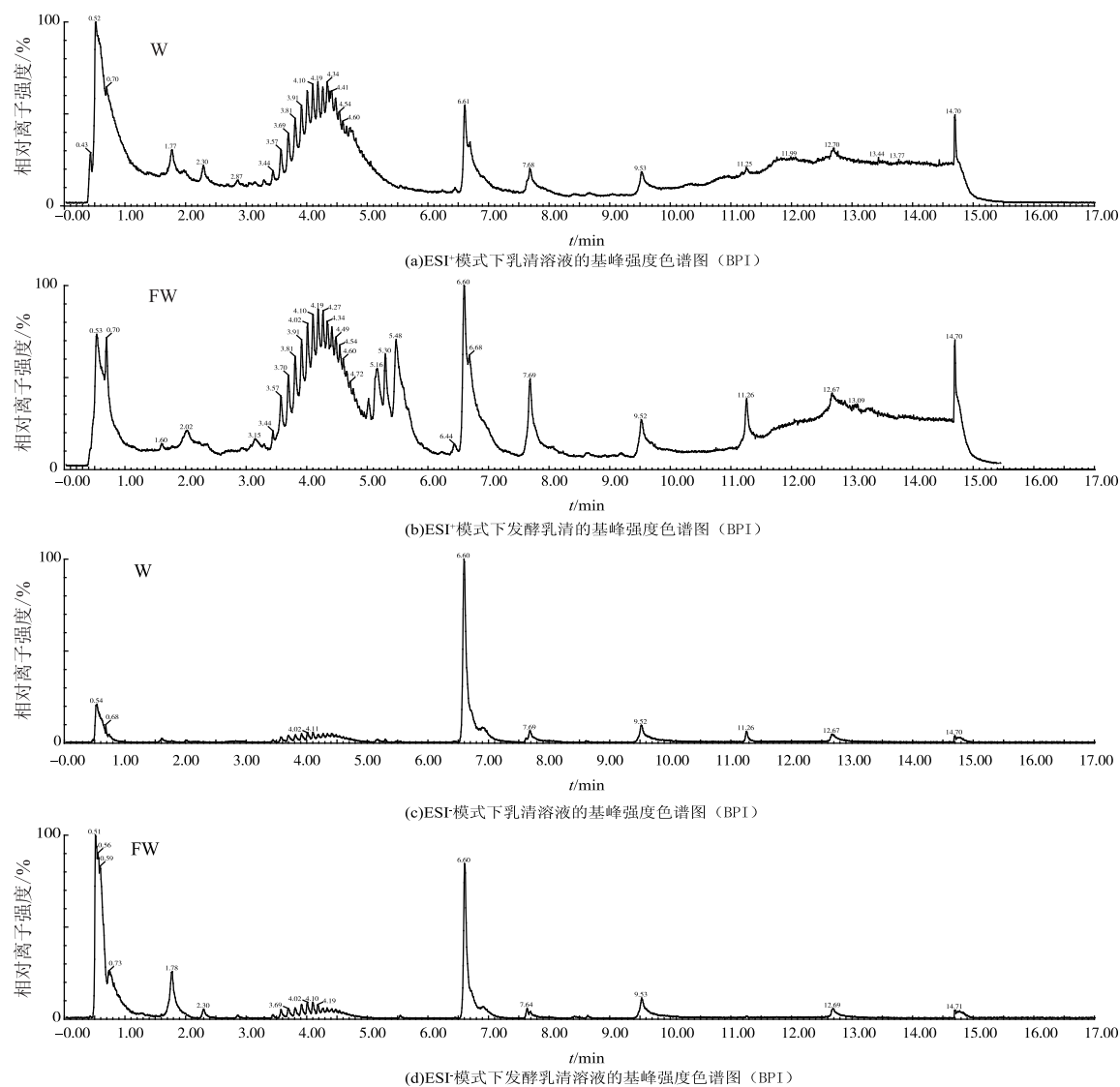


图1 乳清发酵过程中的基峰强度色谱 (BPI)

Fig. 1 Based peak intensity (BPI) chromatograms of whey during fermentation

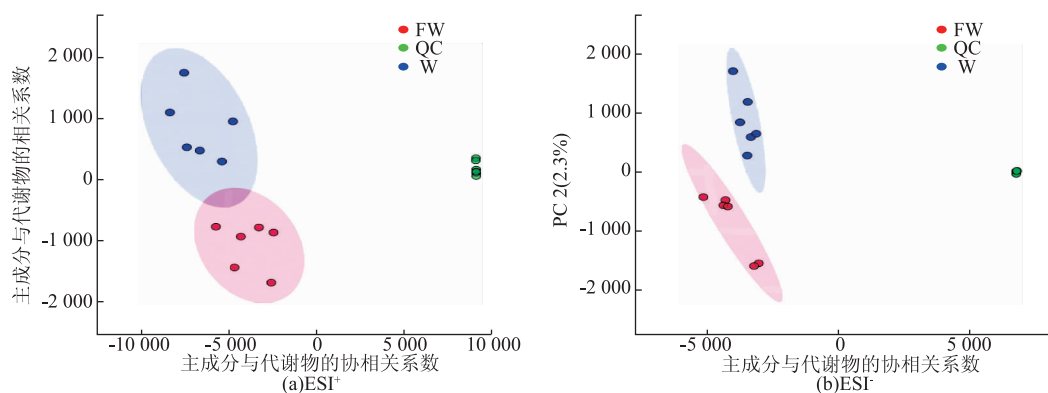


图2 乳清发酵过程中的 PCA

Fig. 2 PCA of whey during fermentation

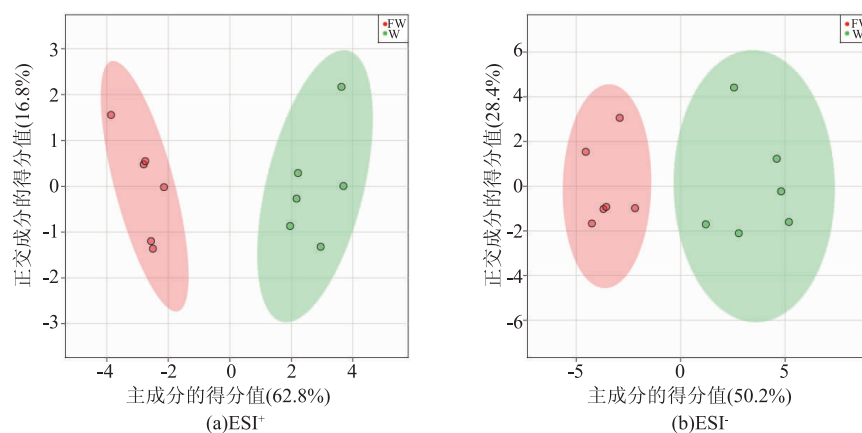


图3 乳清发酵过程中的 OPLS-DA

Fig. 3 OPLS-DA of whey during fermentation

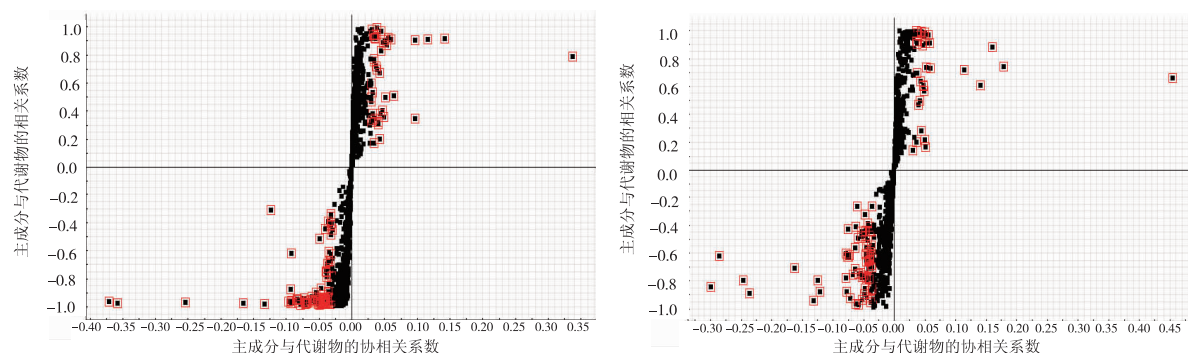


图4 乳清发酵过程中的 S-PLOT

Fig. 4 S-PLOTS of whey during fermentation

和核苷酸代谢物,见表3。

2.3.1 氨基酸和多肽 多肽和氨基酸的变化是由于 *L. bulgaricus* ND02 在发酵过程中将乳清中的蛋白质水解成多肽和氨基酸。由表3可知,与乳清溶液相比,发酵乳清中游离氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、缬氨酸、苏氨酸、半胱氨酸的相对含量显著增加。Micaela Pescuma 等人评估了德氏乳杆菌保加利亚亚种 CRL 454、嗜酸乳杆菌 CRL636 和嗜热链球菌 CRL 804c 水解乳清蛋白的能力,发现德氏乳杆菌保加利亚亚种 CRL 454 水解乳清蛋白能力最强,并可释放支链氨基酸亮氨酸和缬氨酸^[8]。之后,Micaela Pescuma 等人在研究功能性发酵饮料时发现,经德氏乳杆菌保加利亚亚种 CRL 656 发酵的乳清中有较高浓度的必需氨基酸,包括亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸和苏氨酸,从而提高了发酵乳清的营养价值^[9]。 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, BLG)是乳清蛋白的主要组成成分,但是它是引起牛乳过敏的主

要蛋白质之一,可诱发特异性 IgE 抗体介导的 I 型超敏反应。德氏乳杆菌保加利亚亚种在发酵过程中可将 BLG 水解为支链脂肪酸亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸,从而缓解过敏反应^[10]。这可以解释发酵乳清中支链氨基酸亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸相对含量显著增加的原因。研究表明,亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸在机体剧烈运动时为骨骼肌供能并促进丙氨酸和谷氨酸的合成,此外亮氨酸、赖氨酸、异亮氨酸和苏氨酸参与葡萄糖代谢和蛋白质代谢,对于体质量的控制有很大的作用^[11]。刘晶等人发现,利用保加利亚乳杆菌对乳清进行发酵可以提高抗氧化性,主要因为半胱氨酸、赖氨酸和脯氨酸具有较好的抗氧化作用^[12]。本研究中半胱氨酸和脯氨酸的相对浓度都显著增加,进一步验证了乳酸菌发酵的乳清饮料可以作为天然的抗氧化剂来改善食品的品质。保加利亚乳杆菌对营养需求比较苛刻,自身不能直接利用外源蛋白质^[13],因此, *L. bulgaricus* ND02 可能利

表 3 乳清发酵过程中的差异代谢物

Table 3 The potential biomarkers of whey during fermentation

编号	<i>m/z</i>	RT/min	加合离子	代谢物	分子式	<i>P</i> 值	变化趋势	
氨基酸	1	115.13	0.06	M+K-2H	L-Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	4.98×10 ⁻³	↑
	2	131.10	11.62	M+K-2H	L-Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	4.87×10 ⁻³	↑
	3	131.17	4.22	M-H	L-Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	4.76×10 ⁻³	↑
	4	135.18	2.22	M-H	Homocysteine	C ₄ H ₉ NO ₂ S	1.80×10 ⁻²	↑
	5	147.13	2.10	M+K-2H	L-Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	2.54×10 ⁻²	↓
	6	117.15	1.47	2M-H	L-Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	1.53×10 ⁻³	↑
	7	119.12	0.33	M+K-2H	L-Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	2.53×10 ⁻²	↑
	8	89.09	0.35	M+K-2H	L-Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	2.53×10 ⁻²	↓
	9	133.10	0.30	M+K-2H	L-Aspartic acid	C ₄ H ₇ NO ₂	2.53×10 ⁻²	↓
	10	181.07	0.52	M-H	L-Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	6.31×10 ⁻⁴	↓
	11	165.19	1.77	M-H	L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	1.56×10 ⁻³	↓
多肽	12	609.59	6.70	M+K-2H	L-Glutaminyl-L-Tyrosyl-L-Asparaginyl-L-Alanyl-L-Aspartic acid	C ₂₅ H ₃₅ N ₇ O ₁₁	2.34×10 ⁻³	↑
	13	653.27	6.70	M-H	Thr-Tyr-Trp-Trp	C ₃₅ H ₃₈ N ₆ O ₇	1.94×10 ⁻²	↑
	14	188.22	4.21	M-H	Valyl-Alanine	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	2.71×10 ⁻²	↑
	15	430.45	4.13	M-H	Ala-Leu-Pro-Met	C ₁₉ H ₃₄ N ₄ O ₃ S	2.75×10 ⁻²	↑
	16	188.22	1.58	M-H	Leu-Gly	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	3.23×10 ⁻²	↓
	17	217.27	0.51	M-H	Alanyl-Lysine	C ₉ H ₁₉ N ₃ O ₃	1.12×10 ⁻²	↓
	18	382.41	11.62	M+K-2H	Asn-Leu-His	C ₁₆ H ₂₆ N ₅ O ₅	4.95×10 ⁻³	↓
	19	259.35	4.57	M-H	Lysyl-Isoleucine	C ₁₂ H ₂₅ N ₃ O ₃	6.99×10 ⁻³	↑
	20	367.40	0.79	M-H	Tyr-Trp	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₄	4.38×10 ⁻⁴	↑
	21	186.21	4.49	M-H	L-Alanyl-L-Proline	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₃	4.65×10 ⁻⁴	↑
	22	188.22	4.61	M-H	Ala-Val	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	4.94×10 ⁻⁵	↓
	23	464.44	4.66	M-H	Tyr-Pro-Trp	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₅	5.35×10 ⁻⁴	↑
	24	352.43	4.72	M-H	Lys-Val-Ala	C ₁₄ H ₂₈ N ₄ O ₄	1.07×10 ⁻²	↑
碳水化合物及相关代谢物	25	180.16	4.64	M-H	Galactose	C ₆ H ₁₂ O ₆	2.85×10 ⁻²	↑
	26	132.11	2.30	M-H	2-Acetylactic acid	C ₅ H ₈ O ₄	4.93×10 ⁻⁵	↑
	27	342.30	12.67	M-H	Lactose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	5.51×10 ⁻⁵	↓
	28	180.16	0.32	M-H	Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	4.20×10 ⁻²	↓
脂肪酸及相关代谢物	29	282.46	4.54	M-H	Cis-9-Octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	4.22×10 ⁻²	↑
有机酸	30	118.09	0.51	M-H	Succinic acid	C ₄ H ₆ O ₄	1.29×10 ⁻²	↑
	31	192.12	12.67	M-H	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	4.14×10 ⁻²	↓
	32	90.08	2.22	2M-H	L-Lactic acid	C ₃ H ₆ O ₃	1.80×10 ⁻²	↑
	33	166.17	12.67	M-H	Phenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₃	2.53×10 ⁻⁴	↑
核苷酸及相关代谢物	34	152.11	11.94	2M-H	Xanthine	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	3.89×10 ⁻²	↑
	35	323.20	12.67	M-H	Cytidine monophosphate	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P	6.23×10 ⁻⁴	↑
	36	168.11	1.49	M-H	Uric acid	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	4.39×10 ⁻³	↑
维生素	37	138.12	10.00	M+K-2H	Nicotinamide-N-oxide	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	3.28×10 ⁻²	↓

注：“↑”代谢物在发酵乳清中的相对含量增加；“↓”代谢物在发酵乳清中的相对含量减少。

用乳清中存在的游离氨基酸来维持其生长与繁殖,这可解释在发酵乳清中苯丙氨酸、谷氨酸、酪氨酸、丙氨酸相对浓度减少的原因。

此外,发酵乳清中的多肽含量高于乳清溶液,本研究共鉴定了 13 种差异丰富的寡肽。其中在发酵乳清中 Valyl-Alanine、Tyr-Pro-Trp、Ala-Leu-Pro-Met、L-Glutaminyl-L-tyrosyl-L-asparaginy-L-alanyl-L-aspartic acid、Lysyl-Isoleucine、Tyr-Trp、L-alanyl-L-proline、Lys-Val-Ala 8 种寡肽的相对浓度相比于乳清溶液显著增高,相反 TThr-Tyr-Trp-Trp、Alanyl-Lysine、Leu-Gly、Asn-Leu-His、Ala-Val 5 种寡肽的相对浓度则降低。乳酸菌(LAB)是被广泛用于发酵乳制品生产的微生物,其拥有由细胞包膜蛋白酶(启动蛋白质降解)、运输系统和几种细胞内肽酶组成的有效蛋白质水解系统,能够降解乳蛋白^[14]。虽然本研究未对发酵乳清中肽链的功能进行探究,但国内外学者对此进行了大量研究。Saint-Sauveur D 等人通过小鼠试验表明,乳清蛋白发酵后产生的多肽可使未受大肠杆菌感染的小鼠体内的免疫球蛋白 A 含量增加^[15]。 α -乳白蛋白是生产天然抗氧化剂的良好原料, β -乳球蛋白经分解也可以释放出抗氧化肽^[16]。Micaela Pescuma 等人在德氏乳杆菌保加利亚亚种 CRL 454 水解 BLG 的代谢物中发现了具有抗氧化、抑制血管紧张素转化酶(ACE)、抗菌和免疫调节功能的多肽 Y102-R124、C121-L140 和 L149-I162^[17]。由此可知,乳清蛋白经乳酸菌发酵后会产生多种生物活性肽,这些活性肽不仅能提高人体的免疫功能,预防细菌、病毒和寄生虫的感染,而且具有抗氧化能力,可防止衰老。此外,乳清发酵产品中含有抑制血管紧张素转化酶(ACE)的多肽,可起到降压的作用^[18]。

2.3.2 碳水化合物及其相关代谢物 保加利亚乳杆菌对乳糖的代谢方式为同型乳酸发酵,产生葡萄糖和半乳糖,葡萄糖经 EMP 途径降解为丙酮酸,丙酮酸在乳酸脱氢酶的催化下被 NADH 还原为乳酸,而半乳糖不能被利用,被排除到细胞外^[9]。因此在发酵乳清中乳糖的相对含量减少而半乳糖的含量却增加。双乙酰一直被认为是构成发酵乳制品独特风味的主要成分之一,而 2-乙酰乳酸是乳酸菌合成双乙酰的前体物质,在乳酸菌中生成双乙酰的代谢途径主要有柠檬酸代谢途径和糖酵解代谢途径^[20]。由于乳清中柠檬酸的含量很低,所以发酵乳清中的双

乙酰可能主要通过糖酵解代谢途径生成。但是由于双乙酰是挥发性物质,一般用 GC-MS 才可以检测到,本研究只检测到了它的前体物质 2-乙酰乳酸。

2.3.3 脂肪酸及相关代谢物 本研究只鉴定到了不饱和脂肪酸油酸,其在发酵乳清中含量显著高于乳清溶液。油酸又叫顺-9-十八碳烯酸,乳酸菌在厌氧条件下通过脱饱和作用可以生成不饱和脂肪酸,不过这种脱饱和作用发生在脂肪酸合成的早期,通常是在合成 8~12 个碳原子的 β -羟脂酰基后,经脱水酶催化形成不饱和脂肪酸,之后在 β -酮脂酰-ACP 合成酶的催化下使碳链加长,最终形成油酸。油酸和硬脂酸对软化血管有一定的功效,且在人体的新陈代谢中发挥着很重要的作用^[21],因而发酵乳清中油酸的增加可以说明发酵乳清有益于人体健康。

2.3.4 有机酸 有机酸不仅赋予了发酵乳制品特殊的营养价值、口感风味和生物功能,而且还是天然的防腐剂^[22]。本研究在乳清发酵过程中鉴定到 4 种有机酸(乳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯乳酸)的相对含量发生了显著变化。其中,发酵乳清中柠檬酸相对含量减少,乳酸、琥珀酸和苯乳酸的相对含量增加。保加利亚乳杆菌是一种兼性厌氧的乳酸菌,在缺氧条件下具有很强的产酸能力和耐酸性,通过体内 H^+ -ATPase 酶的催化促进其对糖和氨基酸的利用,并生成代谢物质柠檬酸和乳酸^[23]。兼性厌氧乳酸菌在无氧的条件下,由于缺乏丙酮酸脱氢酶系和 α -酮戊二酸脱氢酶系,TCA 循环被改为两条分支的支路进行。氧化支路由柠檬酸脱氢生成 α -酮戊二酸, α -酮戊二酸在无氧条件下不能转换生成琥珀酸,只能生成谷氨酸;还原支路由草酰乙酸还原延胡索酸,最后还原为琥珀酸。因此保加利亚乳杆菌在无氧条件下发酵乳清的过程中,其利用乳糖生成乳酸,导致发酵乳清中乳酸含量增加,同时可能进行了分支 TCA 循环导致乳清中琥珀酸积累,而柠檬酸最终减少转化为谷氨酸^[24]。苯乳酸是一种天然的防腐剂,具有抗真菌的功效。Lavermicocca 等人从乳酸菌属 *Lactobacillus plantarum* 21B 代谢产物中分离得到苯乳酸,研究发现其具有较广的抑菌图谱,与其他生物防腐剂相比,具有较好的溶解性和稳定性^[25]。

2.3.5 维生素 在发酵乳清中 N-氧代烟酰胺的相对含量减少。烟酰胺-N-氧化物是乳酸菌合成维生素 B12 的一个中间产物^[26]。李俊芳等人对 16 株乳酸

菌进行产维生素 B12 的筛选, 结果发现 16 株菌中有 8 株产维生素 B12, 产维生素 B12 的量最高的 SE7-1 菌株被鉴定为乳杆菌^[27]。维生素 B12 是人体必需的惟一含有金属离子的水溶性维生素, 具有广泛的生理学作用, 它参与体内甲基转换及叶酸代谢, 促进神经髓鞘中脂蛋白的形成, 保持中枢神经和外周髓鞘神经纤维的功能完整, 并参与广泛的蛋白质及脂肪代谢, 是人体必需的维生素之一^[28]。目前, 由于对乳酸菌发酵过程中维生素 B12 变化方面研究较少, 尤其是在使用代谢组学的方法来监测其生物化学变化及代谢途径的研究更是寥寥无几, 需要进一步研究。

2.3.6 核苷及其相关代谢产物 本研究还发现乳清经 *L. bulgaricus* ND02 发酵后, 胞嘧啶核苷酸、黄嘌呤和尿酸这 3 种核苷酸代谢物的相对含量显著增加。核苷酸由碱基、戊糖和磷酸三部分组成, 在生物体内不是由三部分直接聚合而成的, 而是由糖代谢过程中的中间体, 通过一系列反应步骤逐步合成的。嘧啶核苷酸(CTP)是从 NH_3 、 CO_2 和 ATP 合成氨基甲酰磷酸开始, 在与天冬氨酸结合生成氨基甲酰天冬氨酸, 经闭环后生成二氢乳清酸, 从而形成嘧啶环。乳清酸进一步与 PRPP 反应生成乳清核苷-5'-UTP, 最终生成 5'-CTP。保加利亚乳杆菌可以利用嘌呤作为碳源、氮源和生长的能量来源。其在分解

嘌呤的过程中腺嘌呤在腺嘌呤脱氢酶的催化下分解为次黄嘌呤, 进一步被次黄嘌呤氧化酶转变成黄嘌呤。此外鸟嘌呤也可以在鸟嘌呤脱氢酶的催化下生成黄嘌呤。最终黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下生成尿酸。这就解释了发酵乳清中胞嘧啶、黄嘌呤和尿酸的含量升高的原因。核苷酸是生物体内一类重要含氮化合物, 其中乳中的核苷酸的生物功能主要有调节肠道菌群、促进生长发育、增强免疫能力、改善脂质代谢等^[29]。

3 结 语

采用 UPLC-Q-TOF MSE 代谢组学方法, 比较分析了 *L. bulgaricus* ND02 发酵乳清过程中代谢物的变化, 通过多变量统计分析对代谢物进行筛选后, 共鉴定出了异亮氨酸、Ala-Leu-Pro-Met、甲基-D-吡喃半乳糖苷、油酸、琥珀酸、黄嘌呤和胞嘧啶核苷酸等 37 个差异代谢物, 涉及氨基酸代谢、糖代谢、脂肪酸代谢以及核苷酸代谢等多条复杂代谢途径。*L. bulgaricus* ND02 发酵乳清中半胱氨酸、Tyr-Trp、胞嘧啶核苷酸以及苯乳酸等 23 个代谢物的相对含量显著增加, 这些代谢物不仅可以提高发酵乳清的营养价值, 而且具有抗氧化、抗高血压和抑制病原菌等特殊生理功效。

参考文献:

- [1] NICHOLSON J K, LINDON J C. Systems biology: metabonomics[J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1054-1056.
- [2] 赵丹, 杜仁鹏, 刘鹏飞, 等. 代谢组学在乳酸菌发酵食品研究中的应用[J]. *中国农学通报*, 2014, 31(8): 240-244.
- [3] 玄依凡, 王荣春. 乳清蛋白水解方法的比较研究[J]. *食品工业*, 2017, 38(3): 239-242.
- [4] 王昕, 侯聚敏, 朴珊善, 等. 发酵型乳清饮料的研究进展[J]. *农产品加工(创新版)*, 2011(8): 44-48.
- [5] SUN Z H, LIU W J, GAO W, et al. Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria from kurut: the naturally fermented yak milk in Qinghai, China[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2010, 56(1): 1-10.
- [6] 包维臣. 德氏乳杆菌保加利亚种 ND02 高密度培养及冷冻保护的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [7] 孙晓峰. 基于代谢组学技术的妊娠期糖尿病中医证候的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [8] PESCUA M, HEBERT E M, MOZZI F, et al. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content[J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(3): 442-451.
- [9] ADELPAIENT K, CREMINON C, BEMARD H, et al. Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine beta-lactoglobulin (BLG): development of sandwich immunoassays for total and allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a in BLG-sensitized mice[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 235(1): 21-32.
- [10] 韩雪, 孙冰. 乳清蛋白的功能特性及应用[J]. *中国乳品工业*, 2003, 31(3): 28-30.
- [11] ZEMEL M B. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 79(5): 907-912.

- [12] 刘晶,苗颖,韩清波,等. 保加利亚乳杆菌对乳清水解物抗氧化性的影响[J]. 中国乳品工业,2012,40(2):17-19.
- [13] PELTONIEMI K,VESANTO E,PALVA A. Genetic characterization of an oligopeptide transport system from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. **Archives of Microbiology**,2002,177(6):457-467.
- [14] DAS D,GOYAL A,et al. Lactic Acid Bacteria in Food Industry[M]. Netherlands:Springer,2012.
- [15] DIANE S S,SYLVIE F G,YVAN B,et al. Effect of feeding whey peptide fractions on the immune response in healthy and *Escherichia coli* infected mice[J]. **International Dairy Journal**,2009,19(9):537-544.
- [16] SADAT L,CELINE C K,N'NEGUE M A,et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin [J]. **International Dairy Journal**,2011,21(4):214-221.
- [17] PESMA M,HEBERT E M,HAERTLE T,et al. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 cleaves allergenic peptides of β -lactoglobulin[J]. **Food Chemistry**,2015,170:407-414.
- [18] AHN J E,PARK S Y,ATWAL A,et al. Angiotensin i-converting enzyme (ace) inhibitory peptides from whey fermented by *Lactobacillus* species[J]. **Journal of Food Biochemistry**,2009,33(4):587-602.
- [19] HICKEY M W,HILLIER A J,JAGO G R. Transport and metabolism of lactose,glucose,and galactose in homofermentative *Lactobacilli*[J]. **Applied & Environmental Microbiology**,1986,51(4):825-831.
- [20] 丹彤,包秋华,孟和毕力格,等. 发酵乳风味物质乙醛、双乙酰的合成途径及其调控机制[J]. 食品科技,2012(7):75-79.
- [21] 张伟敏. 单不饱和脂肪酸营养及其生理功能研究概况[J]. 粮食与油脂,2005(3):13-15.
- [22] BUFFA M,GUAMIS B,SALDO J,et al. Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw,pasteurized or high-pressure-treated goats' milk[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2004,37(2):247-253.
- [23] GUCHTE M V. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2006,103(24):9274-9279.
- [24] HUGENHOLTZ J,PERDON L,ABEE T. Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis biovar diacetylactis* during citrate metabolism[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1993,59(12):4216-4222.
- [25] LAVERMICOCCA P,VALERIO F,EVIDENTE A,et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2000,66(9):4084-4090.
- [26] MOORE S J,WARREN M J. The anaerobic biosynthesis of vitamin B12[J]. **Biochemical Society Transactions**,2012,40(3):581-586.
- [27] 李俊芳. 产维生素 B-(12)乳酸菌的筛选及生物学特性的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2007.
- [28] 程漫漫,王宝维,张廷荣,等. 叶酸和维生素 B(12)对五龙鹅肝脏中磷脂酸磷酸酯酶 1 基因表达量的影响及其与血清脂类代谢、脂肪沉积和肉品质指标的相关性分析[J]. 动物营养学报,2019,31(2):186-197.
- [29] 应国清,石陆娥,唐振兴. 核苷酸类物质的应用研究进展[J]. 现代食品科技,2004,20(2):126-128.

科技信息

欧盟批准肉桂醇等物质作为除海洋动物外所有动物的饲料添加剂

据欧盟官方公报消息,2020 年 10 月 16 日,欧盟委员会发布法规 (EU) 2020/1510 号条例,批准肉桂醇(cinnamyl alcohol)等 15 种物质作为除海洋动物外所有动物的饲料添加剂。

据条例,这 15 种物质分别为肉桂醇 (cinnamyl alcohol)、3-苯丙醇 (3-phenylpropan-1-ol)、2-苯基丙醛 (2-phenylpropanal)、3-(p-cumenyl)-2-methylpropionalde-hyde、 α -甲基肉桂醛 (alpha-methylcinnamaldehyde)、3-苯基丙醛 (3-phenylpropanal)、肉桂酸(cinnamic acid)、乙酸肉桂酯(cinnamyl acetate)、丁酸桂酯(cinnamyl butyrate)、3-苯基丙基异丁酸酯 (3-phenylpropyl isobutyrate)、肉桂酸异戊酸酯(cinnamyl isovalerate)、肉桂酸异丁酯(cinnamyl isobutyrate)、肉桂酸乙酯 (ethyl cinnamate)、肉桂酸甲酯(methyl cinnamate)和肉桂酸异戊酯(isopentyl cinnamate)。

这些添加剂所属添加剂类别为“感官添加剂”,功能组别为“调味化合物”。授权结束日期为 2030 年 8 月 11 日。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟批准肉桂醇等物质作为除海洋动物外所有动物的饲料添加剂[EB/OL]. (2020-10-20). <http://news.foodmate.net/2020/10/574531.html>