

冻干保护剂影响植物乳杆菌代谢途径的研究

赵延胜, 肖香, 周兴华, 苏萍, 董英

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 本文利用代谢组学方法, 对比研究了添加不同冻干保护剂对植物乳杆菌 dy-1 (*L.P dy-1*) 冻干菌粉发酵过程中代谢途径的影响。研究采用气质联用技术 (GC-MS) 分析菌体胞内代谢物, 通过偏最小二乘法 (PLS) 和模式识别分析不同冻干保护剂组的差异代谢物, 并结合 KEGG 等数据库对差异变量参与的代谢途径进行解析。结果表明, 分别添加 10% 菊粉、22.4% 菊粉、菊粉复合保护剂和脱脂乳复合保护剂, 对 *L.P dy-1* 冻干粉发酵过程中的能量代谢、氨基酸代谢和脂肪酸代谢的影响存在差异: 菊粉的添加量由 10% 增加至 22.4%, 冻干菌粉与直接活化菌体在发酵过程中的代谢特征差异缩小; 与脱脂乳复合保护剂相比, 菊粉复合保护剂能够使冻干菌体在代谢特征上更接近于直接活化菌体。贮藏温度对冻干菌粉的代谢影响显著: 与 4 °C 相比, -20 °C 贮藏冻干菌粉更有利于维持菌体在发酵过程中的正常代谢。

关键词: 植物乳杆菌; 发酵; 代谢; 代谢产物; 冻干保护剂; 气相色谱-质谱

文章编号: 1673-9078(2016)8-103-108

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.016

Influence of Cryoprotectants on the Metabolic Pathways of *Lactobacillus plantarum*

ZHAO Yan-sheng, XIAO Xiang, ZHOU Xing-hua, SU Ping, DONG Ying

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The effects of different cryoprotectants on the metabolic pathways of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* dy-1 (*L. P dy-1*) powder during fermentation were analyzed through a metabolomics study. The intracellular metabolites of *L. P dy-1* were separated and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The metabolites produced in the presence of the different cryoprotectants were identified and analyzed by using pattern recognition and partial least squares methods, and were employed to reconstruct the metabolic pathways using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database. The results indicated that 10% inulin, 22.4% inulin, inulin composite protective agent, or skim milk composite protective agent showed different impacts on the energy metabolism, amino acid metabolism, and fatty acid metabolism in the fermentation of freeze-dried *L. P dy-1*. When the inulin content was increased from 10% to 22.4%, the differences in metabolic characteristics between freeze-dried bacteria and directly activated bacterial cells decreased. The metabolic characteristics of freeze-dried *L. P dy-1* were closer to those of directly activated bacterial cells when using the inulin composite protective agent than when using the skim milk composite protective agent. Storage temperature had a significant effect on the metabolism of the freeze-dried bacteria; storage at -20 °C was more beneficial than storage at 4 °C to maintain the normal metabolism of *L. P dy-1* during fermentation.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; fermentation; metabolism; metabolite; cryoprotectant; gas chromatography-mass spectrometry

植物乳杆菌是发酵制品 (乳制品、泡菜、果蔬饮料等) 生产中不可缺少的菌种之一, 直投式发酵剂具有活菌数高, 发酵活力强, 使用方便等特点, 与自然发酵相比, 具有较为明显的优势, 是发酵食品工艺的

收稿日期: 2015-08-27

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程项目; 江苏大学高级人才专项 (1281360027)

作者简介: 赵延胜 (1985-), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向: 食品营养与安全

通讯作者: 董英 (1954-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品营养与安全

发展方向^[1]。真空冷冻干燥法是制备高效直投式乳酸菌发酵剂最常用的技术手段。但是, 冻干处理容易对菌体造成一定的生理损伤, 如机械损伤、溶质损伤、细胞膜损伤、蛋白质变性失活及细胞代谢调节作用损伤等, 从而降低菌体的存活率和细胞活力^[2], 影响其发酵性能^[3]。因此, 冻干保护剂的选择与使用是制备高活力直投式发酵剂的关键技术^[4]。

目前植物乳杆菌冻干工艺大多采用以脱脂乳或海藻糖为主的复合保护剂^[5,6], 其成分比较复杂且价格较高。本课题组以菊粉为主要基质研发了一种新型的冻干保护剂, 成分较为简单且价格低廉, 可获得较好的

保护效果^[7],但冻干保护剂的添加是否会影响冻干菌粉发酵过程中的代谢途径和水平尚不得而知。近年来,采用代谢组学分析技术研究食品微生物的代谢调控机制等是当前食品科学领域关注的热点^[8],通过代谢组学技术可考察微生物体系代谢产物图谱及其动态变化,识别微生物生理生化过程中的特征代谢物,研究微生物体系的代谢途径和代谢网络^[9]。因此,本研究拟采用代谢组学技术探索保护剂的添加、冻干处理以及贮藏温度对植物乳杆菌冻干菌粉代谢途径的影响,通过分析特征代谢物并推测其可能参与的代谢途径,从分子水平揭示不同保护剂对植物乳杆菌冻干菌体发酵过程中活力变化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本试验采用的乳酸菌菌株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, *L.P dy-1*),由江苏大学应用生物技术实验室分离,并由中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)保藏。菊粉购自甘肃宏星食品有限公司。

CH₃OH、(NH₄)₂CO₃、吡啶等试剂均为分析级,购自中国医药(集团)上海化学试剂有限公司;盐酸甲氧胺、BSTFA+1% TMCS 购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司。

1.2 主要仪器设备

全自动灭菌锅,上海三申医疗器械有限公司;7200型分光光度计,上海天达仪器有限公司;FD-8真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;5430R高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;DZF6050A真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;LNG-T83台式快速离心浓缩干燥器,江苏华美生化仪器厂;电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司;Ultral GC-ITQ 1100气质联用仪,美国Thermo Scientific公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备与胞内代谢物的提取

以4℃和-20℃贮藏2个月的*L.P dy-1*冻干菌粉为研究对象,参考程新等开发的方法优化菊芋浸汁培养基^[10],在34℃条件下,按以下方式发酵10%菊芋浸汁:

(1) *L.P dy-1* 扩培发酵(直接活化组):取-20℃条件下保存的菌种,按5%接种量接入MRS液体培养基,34℃、12h活化培养两次后(活菌数为2~3×10⁹ CFU/mL),以5%的接种量加入10%菊芋浸汁。

(2) *L.P dy-1* 直投式发酵:分别采用10%菊粉、22.4%菊粉、菊粉复合保护剂(包含22.4%菊粉、12.8%谷氨酸钠和4.7%山梨醇)^[6]和脱脂乳复合保护剂(包含10%脱脂乳、5%海藻糖、7%谷氨酸钠、3%山梨醇和3%Vc)制备的冻干菌粉(活菌数为2~6×10¹⁰ CFU/g),以0.5g/L的接种量加入10%菊芋浸汁。

分别取发酵对数期末期的细胞发酵液20mL,立即加入淬灭剂。细胞的淬灭及胞内代谢物的提取参考Faijes M.等的方法^[11]。

1.3.2 胞内代谢物的衍生化

植物乳杆菌胞内提取物中加入80μL浓度为20mg/mL的甲氧胺盐酸吡啶溶液,立即密封,涡旋震荡40s,于37℃反应90min,然后加入80μL BSTFA试剂(含1% TMCS),密封并混合均匀后,70℃反应60min后进行GC/MS分析。

1.3.3 GC/MS 分析条件

气相毛细管柱为TR-5MS(30m×0.25mm×0.25μm)。仪器参数设定为:进样口温度280℃,离子源温度230℃,载气为高纯氦气,不分流进样,进样量为1.0μL。升温程序为:初始温度80℃,保持2min,10℃/min升至300℃,保持6min。质谱扫描方式为全扫描模式,扫描范围为45~600(m/z)。

1.3.4 GC/MS 数据处理方法

将样品GC/MS总离子色谱流图(TIC图)转换为格式文件NetCDF,利用XCMS工具箱提取原始数据,进行保留时间校正、峰对齐和反卷积分析(质谱碎片归属)^[12],并在EXCEL软件中进行后期编辑。将分析结果组织整理为二维数据矩阵,包括变量(R.T., m/z)、观察量(样本)和积分面积。剔除硅烷化试剂碎片,将相同保留时间碎片默认为相同化合物,选择最高离子强度碎片代表这种化合物。

将编辑后的数据矩阵导入Simca-P软件中进行有监督的偏最小二乘分析(PLS),通过模式识别分析各组之间差异性代谢物。结合KEGG等数据库对差异变量参与的代谢途径进行分析,分析保护剂、冻干处理及贮藏温度对冻干植物乳杆菌代谢的影响。

1.3.5 数据统计分析

所有试验数据均重复三次,结果以X±SD(平均值±标准偏差)表示。采用SPSS 13.0对试验数据进行方差分析,处理间比较采用单因素方差分析(完全随机模型),(p<0.05)即认为存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 胞内代谢物的初步鉴定

胞内代谢物 GC-MS 总离子流图如图 1 所示。根据 NIST 08 谱库和细菌小分子代谢物数据库 (HMDB) 进行检索匹配, 共确定 52 种代谢物, 包括各种有机酸、氨基酸、脂肪酸、糖类物质。

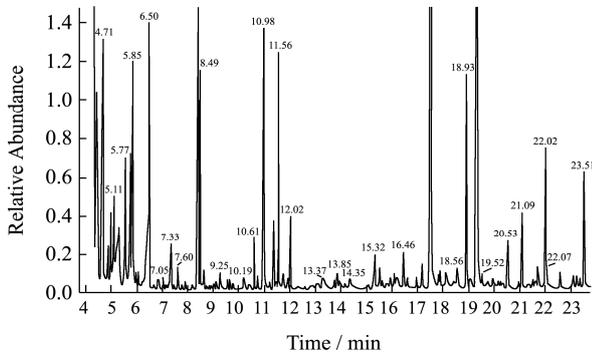


图 1 植物乳杆菌胞内代谢物的总离子流色谱图
Fig.1 TIC of intracellular metabolites in *L. P dy-1*

2.2 冻干保护剂对植物乳杆菌代谢的影响

2.2.1 PLS 模型分析

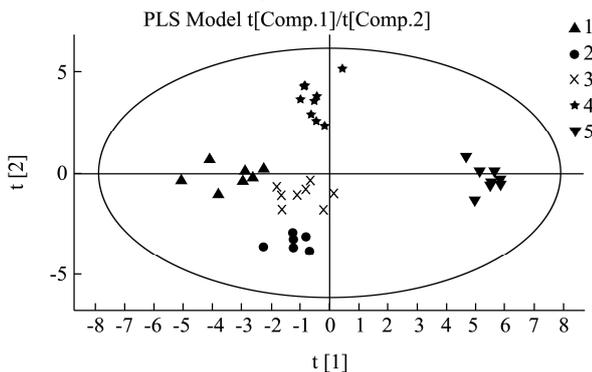


图 2 冻干前后添加不同保护剂发酵组胞内代谢物的 PLS 得分图
Fig.2 PLS-DA score plots of intracellular metabolites in *L. P dy-1* treated with different cryoprotectants before and after freeze-drying

注: 1: 直接活化组, 2~5: -20 °C 贮藏 2 个月; 2: 10% 菊粉组; 3: 22.4% 菊粉组; 4: 菊粉复合保护剂组; 5: 脱脂乳复合保护剂组)。

以 -20 °C 温度下贮藏的冻干菌粉 (添加不同保护剂) 为对象, 研究其发酵 10% 菊芋浸汁后菌体代谢的变化情况。从样品的 TIC 中提取数据并进行 PLS 分析, 得到 PLS 模型的得分图 (图 2)。

图 2 结果显示, 直接活化组 (1) 和添加保护剂的冻干菌粉发酵组 (2~5) 在得分图中明显分开, 表明保护剂的添加对菌粉在发酵过程中的代谢特征有显著影响; 而添加不同保护剂组在得分图中的分布不同, 表明不同冻干保护剂对冻干菌粉发酵过程中代谢的影响机制存在差异。与添加 10% 菊粉组 (2) 相比, 添加 22.4% 菊粉组 (3) 所在区域向得分图上方迁移, 与直接活化

组 (1) 更为接近, 说明菊粉含量对植物乳杆菌的代谢特征存在影响; 而添加脱脂乳复合保护剂组 (5) 与添加菊粉组 (2~4) 相比, 更为明显地偏离直接活化组 (1), 说明脱脂乳复合保护剂的添加对菌粉代谢特征的影响更为显著, 而菊粉保护剂的添加更能够维持植物乳杆菌的基本代谢特征; 尽管菊粉复合保护剂组 (4) 能够获得更高的发酵活力^[7], 但其与 22.4% 菊粉保护剂组相比, 稍稍偏离直接活化组, 表明复合保护剂中的其他物质可能对菌体的代谢特征产生了一定的干扰。结果分析表明, 菊粉的添加可明显调节冻干菌体的代谢, 使其代谢特征更接近于直接活化菌体, 这与菌体冻干后具有较高的发酵活力保持一致^[7]。

2.2.2 特征代谢物分析

通过分析不同发酵组样品所得差异变量, 共鉴定出 18 个 VIP>1 的代谢物。这些特征代谢物主要涉及能量代谢、氨基酸代谢和脂肪酸代谢 (表 1), 表明冻干处理和保护剂的添加对 *L. P dy-1* 菌体代谢的影响体现在多层次和多靶点的扰动。

与直接活化组相比, 添加 10% 菊粉组和 22.4% 菊粉组的特征能量代谢物总量减少, 主要表现在磷酸、葡萄糖、戊糖酸、半乳糖和甘油的含量显著下降; 添加菊粉复合保护剂组中大多数特征能量代谢物与直接活化组无显著性差异; 添加脱脂乳复合保护剂组中特征能量代谢物的含量则有不同程度的升高或降低。在微生物体内, 这些代谢物主要参与菌体的糖酵解、柠檬酸循环等代谢路径。结果表明, 纯菊粉保护剂和脱脂乳复合保护剂的添加可能会对菌体的糖酵解以及柠檬酸代谢造成一定的影响, 而添加菊粉复合保护剂后菌体的能量代谢可以得到较为明显地维持。

与直接活化组相比, 添加纯菊粉保护剂组的胞内脯氨酸、胱硫醚、缬氨酸和鸟氨酸的含量无显著差异, 而添加脱脂乳复合保护剂组中胞内脯氨酸、胱硫醚、缬氨酸和甘氨酸的含量降低。此外, 添加保护剂组中胞内 γ -氨基丁酸生物合成量均呈降低趋势。结果表明, 除 γ -氨基丁酸外, 含有菊粉的保护剂可以有效地维持菌体的氨基酸代谢, 其中添加菊粉复合保护剂的冻干菌粉发酵后胞内氨基酸含量与直接活化组最为接近。

细胞膜脂肪酸的成分和含量是影响细胞抗性的重要指标^[13]。表 1 结果显示, 与直接活化组相比, 添加纯菊粉保护剂组中特征饱和脂肪酸如癸二酸、硬脂酸和棕榈酸的含量升高, 亚麻酸含量降低; 添加脱脂乳复合保护剂组中癸二酸和亚麻酸的含量增加, 硬脂酸、棕榈油酸和棕榈酸的含量均降低; 添加菊粉复合保护剂组中, 仅癸二酸含量稍有变化。添加纯菊粉保护剂和脱脂乳复合保护剂组中胞内的硬脂酸、棕榈酸的

变化趋势恰恰相反, 说明菊粉和脱脂乳复合保护剂对菌体冻干后脂肪酸代谢的作用机制不同^[14]。结果表明,

菊粉复合保护剂的添加能够有效地维持冻干后植物乳杆菌菌体细胞膜脂肪酸的组成。

表 1 冻干前后添加不同保护剂发酵组的特征代谢物相对含量

Table 1 Characteristic metabolites (%) of *L. P dy-1* treated with different cryoprotectants before and after freeze-drying

代谢途径	特征代谢物	直接活化组	冻干后			
			10%菊粉组	22.4%菊粉组	菊粉复合保护剂组	脱脂乳复合保护剂组
能量代谢	磷酸	3.98±0.07 ^b	↓3.80±0.07 ^c	↓3.82±0.05 ^c	4.01±0.04 ^b	↑4.24±0.03 ^a
	葡萄糖	2.72±0.03 ^a	↓2.46±0.04 ^b	↓2.56±0.09 ^b	2.63±0.10 ^a	↓2.34±0.05 ^c
	戊糖酸	3.18±0.05 ^b	↓1.96±0.07 ^d	↓2.33±0.04 ^c	3.22±0.05 ^b	↑3.53±0.07 ^a
	半乳糖	2.22±0.09 ^a	↓1.69±0.04 ^c	↓1.83±0.05 ^b	2.17±0.05 ^a	↓1.59±0.06 ^d
	甘油	6.86±0.04 ^b	↓5.47±0.05 ^d	↓6.14±0.07 ^c	6.79±0.06 ^b	↑7.20±0.06 ^a
	乙酸	1.50±0.03 ^b	↑1.69±0.02 ^a	↑1.70±0.05 ^a	↑1.69±0.05 ^a	1.56±0.04 ^b
氨基酸代谢	γ-氨基丁酸	0.99±0.01 ^a	↓0.67±0.01 ^{cd}	↓0.63±0.03 ^d	↓0.72±0.04 ^b	↓0.69±0.03 ^{bc}
	脯氨酸	2.58±0.06 ^a	2.57±0.11 ^a	2.59±0.05 ^a	2.55±0.06 ^a	↓2.35±0.04 ^b
	胱硫醚	0.14±0.05 ^a	0.15±0.01 ^a	0.16±0.01 ^a	0.13±0.02 ^a	↓0.08±0.02 ^b
	缬氨酸	0.63±0.03 ^a	0.60±0.06 ^a	0.61±0.06 ^a	0.62±0.08 ^a	↓0.50±0.06 ^b
	鸟氨酸	0.33±0.01 ^{ab}	0.35±0.01 ^a	0.34±0.02 ^a	0.33±0.02 ^{ab}	0.31±0.02 ^b
	甘氨酸	0.71±0.03 ^a	↓0.58±0.03 ^b	↓0.58±0.04 ^b	0.66±0.03 ^a	↓0.57±0.02 ^b
脂肪酸代谢	癸二酸	0.10±0.05 ^b	↑0.20±0.03 ^a	↑0.23±0.02 ^a	↑0.23±0.03 ^a	↑0.24±0.05 ^a
	肉豆蔻酸	1.02±0.07 ^{ab}	1.08±0.07 ^a	1.02±0.14 ^{ab}	0.94±0.15 ^{ab}	0.87±0.02 ^b
	硬脂酸	18.78±0.22 ^b	↑20.61±0.67 ^a	↑19.91±0.68 ^a	18.65±0.89 ^b	↓17.17±0.67 ^c
	棕榈油酸	0.56±0.05 ^a	↓0.49±0.01 ^b	0.54±0.02 ^a	0.55±0.02 ^a	↓0.46±0.02 ^b
	棕榈酸	24.38±0.59 ^b	↑26.46±0.70 ^a	↑26.48±0.79 ^a	24.71±0.29 ^b	↓23.49±0.51 ^c
	亚麻酸	0.97±0.02 ^b	↓0.51±0.03 ^d	↓0.61±0.04 ^c	0.96±0.01 ^b	↑1.04±0.07 ^a

注: “↑”或“↓”表示添加保护剂的冻干组中代谢物相对于直接活化组的代谢物浓度上升或下降; 具有不同的字母标记则认为不同处理间具有显著差异 ($p < 0.05$)。

2.3 贮藏温度对植物乳杆菌代谢的影响

2.3.1 PLS 模型分析

植物乳杆菌 dy-1 的发酵活力试验结果表明, 贮藏温度对发酵活力的影响较大^[6]。本试验采用-20 °C和 4 °C下贮藏的直接投式植物乳杆菌发酵剂, 以直接活化的菌体作为对照, 发酵 10%菊芋浸汁, 研究贮藏温度对菌体代谢的影响。从分析样本的 TIC 中提取数据并进行 PLS 分析, 得到-20 °C和 4 °C贮藏温度下添加不同保护剂植物乳杆菌发酵组的 PLS 模型得分图(图 3)。

图 3 显示, 各发酵组在得分图中明显分开, 说明保护剂种类及贮藏温度对冻干菌粉在发酵过程中的代谢有显著影响; 添加不同保护剂组、不同贮藏温度组之间的分布也不一致。与-20 °C贮藏组(2 和 3)相比, 4 °C贮藏的样本(4 和 5)所在区域均向得分图右上迁移, 远离直接活化组(1), 说明-20 °C贮藏温度更有利于维持菌粉的正常代谢特征; 而菊粉复合保护剂组(2 和 4)与脱脂乳复合保护剂组(3 和 5)偏离直接活化组的方位有明显差异, 进一步证实二者对于冻干菌粉

的代谢特征的影响差异显著, 且菊粉复合保护剂组更能有效维持菌粉的正常代谢。结果表明, -20 °C和 4 °C贮藏温度对冻干菌粉发酵过程中的代谢影响差异明显, 且冻干菌粉更宜于在-20 °C下贮藏。

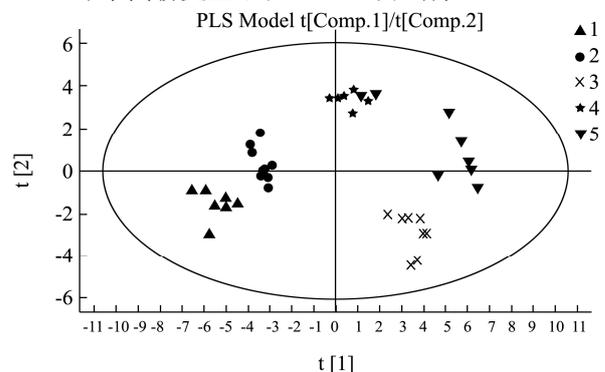


图 3 -20 °C和 4 °C贮藏 2 个月的乳酸菌的 PLS 得分图

Fig.3 PLS score (A) and loading (B) plots for LAB at the tested temperatures

注: 1: 活化组; 2、4: 菊粉复合保护剂组; 3、5: 脱脂乳复合保护剂组; 2、3: -20 °C贮藏; 4、5: 4 °C贮藏。

2.3.2 特征代谢物分析

通过分析不同 *L.P dy-1* 发酵组样品所得差异变量, 共鉴定 18 个 VIP>1 的代谢物 (表 2)。从表 2 中可以看出, *L.P dy-1* 对于冻干保护剂的种类和贮藏温

度产生的响应并非通过某种单一机制实现的, 而是涉及到多种代谢途径变化的复杂过程。

表 2 -20 °C 和 4 °C 贮藏温度下添加不同保护剂的植物乳杆菌特征代谢物相对含量

Table 2 Characteristic metabolites (%) of *L. P dy-1* treated with different cryoprotectants under storage at at -20 °C and 4 °C

代谢途径	特征代谢物	活化组	菊粉复合保护剂		脱脂乳复合保护剂	
			-20 °C	4 °C	-20 °C	4 °C
能量代谢	半乳糖	2.22±0.09 ^a	2.17±0.05 ^a	↓2.07±0.07 ^a	1.59±0.06 ^a	1.63±0.07 ^a
	己糖酸	0.23±0.04 ^a	0.13±0.02 ^b	0.12±0.01 ^b	0.11±0.01 ^b	0.11±0.01 ^b
	戊糖酸	3.18±0.05 ^b	3.22±0.05 ^b	↓3.08±0.16 ^c	3.53±0.07 ^a	↓1.83±0.05 ^d
	丙酮酸	1.44±0.02 ^{ab}	1.51±0.07 ^a	↓1.36±0.02 ^b	1.09±0.08 ^c	↓1.00±0.10 ^d
	乳酸	3.84±0.03 ^a	3.86±0.03 ^a	3.84±0.01 ^a	3.51±0.08 ^b	↓3.32±0.04 ^c
	甘油	6.86±0.04 ^{bc}	6.79±0.04 ^c	↑6.97±0.07 ^b	7.20±0.06 ^a	7.15±0.24 ^a
	丁酸	2.26±0.05 ^a	0.23±0.03 ^d	↑1.34±0.09 ^b	1.31±0.04 ^b	↓1.18±0.11 ^c
	乙酸	1.50±0.03 ^c	1.69±0.05 ^a	1.65±0.04 ^a	1.56±0.04 ^{bc}	1.63±0.07 ^{ab}
	乙酰胺	1.62±0.09 ^a	1.58±0.12 ^a	1.56±0.06 ^a	0.46±0.01 ^b	0.47±0.03 ^b
氨基酸代谢	γ-氨基丁酸	0.99±0.01 ^a	0.72±0.04 ^b	0.70±0.02 ^{bc}	0.69±0.03 ^{bc}	0.67±0.03 ^c
	丙氨酸	2.58±0.05 ^a	2.56±0.03 ^a	2.57±0.04 ^a	2.17±0.04 ^b	2.18±0.02 ^b
	脯氨酸	3.58±0.06 ^a	2.55±0.06 ^a	↓2.17±0.13 ^c	2.35±0.04 ^b	↓2.00±0.04 ^c
	鸟氨酸	0.33±0.01 ^a	0.33±0.02 ^a	0.30±0.03 ^{ab}	0.31±0.02 ^{ab}	0.28±0.04 ^b
脂肪酸代谢	癸二酸	0.10±0.05 ^c	0.23±0.03 ^b	0.38±0.05 ^a	0.24±0.05 ^b	0.25±0.03 ^b
	硬脂酸	18.78±0.22 ^a	18.65±0.37 ^a	↓15.86±0.40 ^c	17.17±0.67 ^b	17.17±0.73 ^b
	油酸	1.45±0.03 ^a	1.43±0.02 ^{ab}	1.40±0.04 ^{bc}	1.34±0.03 ^d	1.37±0.05 ^{cd}
	棕榈油酸	0.56±0.05 ^a	0.55±0.02 ^a	0.55±0.02 ^a	0.46±0.02 ^b	0.48±0.05 ^b
	棕榈酸	24.38±0.59 ^a	24.71±0.27 ^a	↓23.32±0.38 ^b	23.49±0.51 ^b	23.21±0.88 ^b

注: “↑”或“↓”表示添加保护剂的冻干菌粉 4 °C 贮藏组的代谢物相对于其 -20 °C 贮藏组的代谢物浓度上升; 具有不同的字母标记则认为不同处理间具有显著差异 ($p < 0.05$)。

与 -20 °C 贮藏的菊粉复合保护剂组相比, 4 °C 条件下贮藏的菊粉复合保护剂组参与能量代谢的特征代谢物戊糖酸、丙酮酸、甘油和丁酸有显著变化, 主要表现在戊糖酸和丙酮酸降低、甘油和丁酸含量增加。在微生物体内, 丙酮酸为甘油和丁酸合成的前体物质, 是糖酵解途径的重要中间体, 并有可能影响到糖酵解的代谢流, 进而影响其生长代谢。脯氨酸通过谷氨酸代谢生成, α-酮戊二酸为谷氨酸的生物合成前体物质, 并参与 TCA 循环, 在 4 °C 贮藏组的特征氨基酸中, 仅有脯氨酸的含量降低, 可能由于 4 °C 的贮藏条件影响了细胞的 TCA 循环所致。此外, 与 -20 °C 贮藏组相比, 4 °C 菊粉复合保护剂组中的硬脂酸和棕榈酸的含量显著降低。

与 -20 °C 贮藏的脱脂乳复合保护剂组相比, 4 °C 条件下贮藏的脱脂乳复合保护剂组特征代谢物戊糖酸、乳酸、丙酮酸、丁酸、脯氨酸变化显著, 表明 4 °C 贮藏会对添加脱脂乳复合保护剂的冻干菌粉发酵后的代谢产生影响, 可能表现在糖酵解和 TCA 循环等途径,

而对于其脂肪酸的生物合成影响不大。

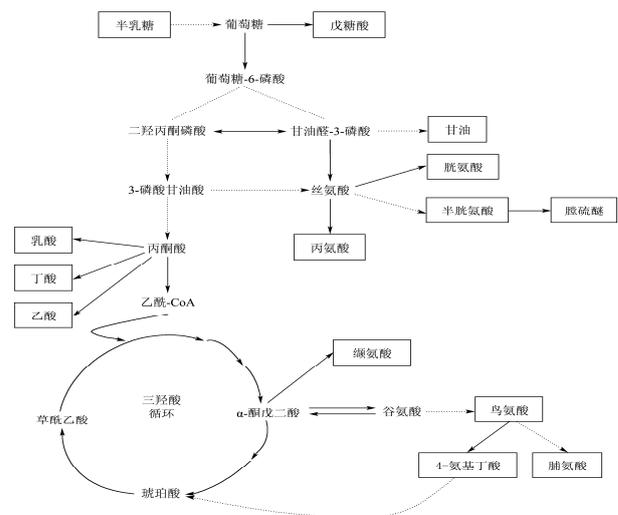


图 4 特征代谢物的代谢路径分析

Fig.4 Metabolic pathways involving the characteristic metabolites

注: 框中物质代表特征代谢物。

2.4 代谢路径分析

综合以上分析结果,冻干保护剂的种类和贮藏温度对 *L.P dy-1* 冻干菌粉的代谢均有不同程度的影响,图 4 绘制了特征代谢物(脂肪酸除外)参与的代谢路径,方框内物质为试验中分析鉴定出的特征代谢物。从图中可以看出,特征代谢物(如有机酸和氨基酸)的变化对糖酵解途径和三羧酸循环均存在直接或间接的影响,这表明保护剂的添加和贮藏温度可能通过糖酵解和 TCA 循环代谢流的调节,影响植物乳杆菌细胞冻干后代谢特征的变化,也说明 *L.P dy-1* 冻干后细胞代谢通路的变化与保护剂的种类以及贮藏温度密切相关。

3 结论

冻干保护剂的添加对植物乳杆菌冻干菌粉发酵过程中的代谢特征有显著影响,且不同冻干保护剂的影响机制存在差异。纯菊粉保护剂和脱脂乳复合保护剂的添加影响菌体的糖酵解及柠檬酸代谢,而添加菊粉复合保护剂后菌体的特征能量代谢物与直接活化组无显著性差异;保护剂的添加影响菌体的氨基酸代谢,主要体现在胞内 γ -氨基丁酸生物合成量均呈降低趋势,与脱脂乳复合保护剂相比,含有菊粉的保护剂可以更有效的维持菌体的氨基酸代谢,且添加菊粉复合保护剂的冻干菌粉发酵后胞内氨基酸含量与直接活化组最为接近;纯菊粉和脱脂乳复合保护剂对菌体冻干后脂肪酸代谢的作用机制不同,主要表现在菌体胞内的硬脂酸、棕榈酸的变化趋势相反,而添加菊粉复合保护剂组中,仅癸二酸含量稍有变化,表明其能够更有效地维持冻干后植物乳杆菌菌体细胞膜脂肪酸的组成。此外,贮藏温度对冻干菌粉在发酵过程中的代谢有显著影响,与 4℃ 相比, -20℃ 的贮藏温度更有利于维持冻干菌体的正常代谢特征。

参考文献

- [1] Hansen E B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78(1): 119-131
- [2] Han B, Bischof J C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing [J]. Cryobiology, 2004, 48(1): 8-21
- [3] Passot S, Cenard S, Trélea I C, et al. Freeze-drying of lactic acid bacteria: effect of process variables on cell injury [J]. Cryobiology, 2011, 63(3): 320
- [4] Prakash O, Nimonkar Y, Shouche Y S. Practice and prospects of microbial preservation [J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 339(1): 1-9
- [5] Nag A, Das S. Effect of trehalose and lactose as cryoprotectant during freeze-drying, in vitro gastro-intestinal transit and survival of microencapsulated freeze-dried *Lactobacillus Casei* 431 cells [J]. International Journal of Dairy Technology, 2013, 66(2): 162-169
- [6] 蒲丽丽,刘宁,张英华,等.乳酸菌冻干保护剂及保护机理的研究进展[J].现代食品科技,2005,21(1):147-153
PU Li-li, LIU Ning, ZHANG Ying-hua, et al. The Research Development of cryoprotector of lactic acid bacteria and its protective mechanism [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(1): 147-153
- [7] 苏萍,董英,程新,等.植物乳杆菌冻干保护剂的优化及其保护机制[J].中国食品学报,2014,14(11):56-63
SU Ping, DONG Ying, CHENG Xin, et al. Optimization and protective mechanisms for cryoprotectant of *Lactobacillus plantarum* CGMCC 6016 [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(11): 56-63
- [8] Yong-Jiang Xu, Cheng-shu Wang, Wan xing, et al. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2014, 56: 37-48
- [9] Fernanda Mozzi, Maria Eugenia Ortiz, Juliana Bleckwedel, et al. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria [J]. Food Research International, 2013, 54: 1152-1161
- [10] 程新,董英,苏萍等.以菊芋为主要营养基质的乳酸菌发酵及影响因素[J].食品与发酵工业,2013,39(11):91-96
CHENG Xin, DONG Ying, SU Ping, et al. Cultivation and influencing factors of *Lactobacillus plantarum* CX-15 in Jerusalem artichoke tuber extract without acidic or enzymatic inulin hydrolysis [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(11): 91-96
- [11] Fajjes M, Mars A E, Smid E J. Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum* [J]. Microbial cell factories, 2007, 6(1): 27
- [12] Smith C A, Want E J, O Maille G, et al. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(3): 779-787
- [13] Gombos Z, Wada H, Murata N. Unsaturation of fatty acids in membrane lipids enhances tolerance of the *cyanobacterium*

- Synechocystis* PCC6803 to low-temperature photoinhibition [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89(20): 9959-9963
- [14] Cacela, C, Hinch, D K. Monosaccharide composition, chain length and linkage type influence the interactions of oligosaccharides with dry phosphatidylcholine membranes [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2006, 1758(5): 680-691

现代食品科技