

不同发酵方式的益生菌酸奶代谢组学的应用及探究

王越男, 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: 本文在分析了常用的微生物代谢组学研究方法的基础上, 采用 UPLC-Q-TOF MS^E 代谢组学技术结合主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 对不同发酵方式生产的益生菌酸奶进行了代谢组学的研究。结果表明, 采用单一益生菌 *L.Plantarum* P-8 发酵得到的样品 (p) 和采用益生菌 *L.Plantarum* P-8 与传统酸奶发酵剂 YC-X11 共同发酵得到的样品 (bp) 在 BPI 基峰图存在较大差异, 说明其代谢产物具有明显的不同。同时, 采用 UPLC-Q-TOF MS^E 的分析方法共鉴定亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、4-羟基苯乳酸、泛酸、4-吡哆酸、L-肉毒碱、2-羟基-2-甲基琥珀酸、组氨酸、Asp-Pro-Pro、Met-Ser-OH、L-prolyl-L-Proline、Ala-Ala-Ile-Trp、His-His、Ala-Gly-Asn-Asn、Asp-Met-Met-Gln、Ala-Glu-Pro-Cys 和 Tyr-Asp 等 38 个代谢物, 并具体分析出了两种发酵方式得到的代谢产物的变化, 为益生菌酸奶中代谢组学的应用提供新的思路。

关键词: 酸奶; 代谢图谱; 益生菌; 代谢组学

文章编号: 1673-9078(2017)4-82-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.013

Application of Metabolomics in Investigation of Probiotic Yogurt Fermented by Different Methods

WANG Yue-nan, SUN Tian-song

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

Abstract: Based on analysis of the commonly used microbial metabolomics research methods, UPLC-Q-TOF MS^E (ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometric) metabolomics technology combined with principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) was used to conduct a metabolomics study of probiotic yogurts produced using different fermentation methods. The results showed that the base peak intensity (BPI) of the sample “p” obtained by fermentation using probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* P-8 alone was significantly different to that of the sample “bp” obtained by fermentation using a combination of *L. plantarum* P-8 and the traditional starter culture YC-X11, indicating that their metabolites were significantly different. Further, the UPLC-Q-TOF MS^E analysis identified 38 metabolites, including leucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, 4-hydroxyphenyllactic acid, pantothenic acid, 4-pyridoxic acid, L-carnitine, 2-hydroxy-2-methylsuccinic acid, histidinol, aspartic acid-proline-proline, methionine-serine-hydroxyl, L-prolyl-L-Proline, alanine-alanine-isoleucine-tryptophan, histidine-histidine, alanine-glycine-asparagine-asparagine, aspartic acid-methionine-methionine-glutamine, alanine-glutamic acid-proline-cysteine, and tyrosine-aspartic acid. In addition, the differences in the metabolites obtained after fermentation by the two methods were specifically analyzed, providing new directions for the application of metabolomics in studying probiotic yogurt.

Key words: yogurt; metabolic profile; probiotics; metabolomics

目前, 各种发酵乳制品均是由微生物发酵而成, 乳酸菌是最常用的发酵剂, 其中 *Streptococcus thermophilus* 和 *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 最早应用于发酵乳制品的生产中^[1]。酸奶即

收稿日期: 2017-02-14

作者简介: 王越男 (1978-), 女, 博士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程

通讯作者: 孙天松 (1967-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 乳品微生物及生物技术

是将牛奶通过乳酸菌进行发酵制得, 成为世界上最古老的保存牛奶的方法之一^[2]。在酸奶的发酵过程中可产生各种代谢产物, 例如乳酸菌的作用使得乳糖转变为乳酸, 蛋白质的水解作用导致酪蛋白转变为肽和游离氨基酸, 脂肪也可通过水解作用转化为游离脂肪酸^[3,4], 从而直接影响酸奶的质构、色泽和风味等特性^[5]。

上世纪 90 年代初以来, 随着基因组学(genomics)、转录组学(transcriptomics)和蛋白质组学(proteomics)的发展, 代谢组学(metabonomics)作为一种检测生物体整

体水平代谢特征的组学技术应运而生^[6,7]。代谢组学能够高通量的鉴定和定量在代谢过程中代谢物的变化^[8]。代谢组学已经被广泛应用于药物科学^[9]、食品科学和营养科学^[10]等领域。目前最常用的代谢组学分析技术为高分辨率质子核磁共振(NMR),液相色谱-质谱联用(LC-MS)和气相色谱-质谱(GC-MS)^[11],其中MS和NMR技术已经成功的应用到发酵乳制品在发酵过程、成熟和贮藏过程中代谢物的测定^[12-15]。

益生菌是一类对宿主有益的活性微生物,能够在人类的肠道、生殖系统定植(FAO/WHO, 2002)。为了确保它们对健康有益,益生菌产品在整个货架期内活菌数至少为 10^6 CFU/g^[16]。近几年来,功能性乳制品日益吸引消费者,酸奶中添加益生菌就是一个典型的功能性乳制品,发酵乳制品常使用的益生菌为*Lactobacillus*和*Bifidobacterium*,这两个菌属的菌种在长期的发酵食品的生产中具有良好的安全性^[17]。尽管有关益生菌的菌株筛选、益生特性和安全性等已经研究报道很多,但利用代谢组学技术研究乳制品在发酵过程中益生菌活性的报道非常少^[18],因此关于益生菌在牛乳中生长的代谢机理并不完全清楚。

本文在简述代谢组学技术的研究方法基础上,利用UPLC-Q-TOF MS^E代谢组学技术结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)详细分析不同发酵方式,即单一采用益生菌*L. Plantarum* P-8发酵和益生菌*L. Plantarum* P-8与传统发酵剂YC-X11共同发酵两种方式引起的代谢物的差异,并对差异代谢物进行鉴定,进一步推动代谢组学技术在益生菌中的发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验菌株*L. plantarum* P-8由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;传统发酵剂(含*S. thermophilus*和*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*,科·汉森, YC-X11)以直投式发酵剂形式提供,脱脂乳粉(新西兰恒天然);甲酸、和乙腈(质谱纯,美国Fluka公司)。

1.2 样品的制备

1.2.1 酸奶样品的制备

将脱脂乳粉按11% (m/V)调配制成还原牛乳,再经95℃、5 min巴氏杀菌后,冷却至37℃,首先按接种量 1.0×10^7 CFU/mL接入单一的益生菌*L. plantarum* P-8,进行发酵,样品命名为p (n=18),接

着按同样的接种量接入益生菌*L. plantarum* P-8与0.0003%的传统发酵剂,进行发酵,样品命名为bp (n=18)。将两组样品(p和bp)于37℃恒温培养箱中培养至pH值为4.5终止发酵,并置于-80℃冰箱备用。

1.2.2 酸奶样品的预处理

将1.2.1中制备的两组酸奶样品(p和bp)分别置于室温下解冻,经4500 r/min离心10 min,取上清液1 mL,加入7 mL的乙腈溶液,漩涡震荡2 min后12000 r/min高速离心15 min。取上清液真空浓缩至干,加入500 μL、40% (V/V)的乙腈溶液复溶,经0.22 μm微孔滤膜过滤后置于-20℃保存备用,完成酸奶样品的预处理过程。

1.3 UPLC-Q-TOF MS^E条件确定

作为代谢组学研究的关键部分,其代谢物的分析和鉴定方式的选择尤为重要,其中,核磁共振和质谱分析技术是目前应用成熟的微生物代谢组学主要研究技术。

质谱分析技术的优势在于高灵敏度和高特异性,同时可根据物质的离子化类型,实现多种代谢物的同步分析。采用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-Q-TOF MS^E)对得到的样品进行代谢组学的分析,该方法具有超高灵敏度和超高分离度等特点,同时兼具高分辨率和高选择性等优势,可以得到精确的质谱图和相对分子质量。本文使用ACQUITY UPLC-Q-TOF MS^E (Waters, USA)对两组酸奶样品进行代谢组学分析, Q-TOF质谱仪采用ESI源和PDA检测器。

1.3.1 UPLC 色谱条件

色谱柱为BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 μm),样品进样量为10 μL,流速0.45 mL/min,柱温为40℃。正离子扫描模式下,流动相A为水和0.1%甲酸溶液,流动相B为乙腈溶液和0.1%甲酸溶液,洗脱条件见表1。

表1 益生菌酸奶的UPLC-Q-TOF MS^E的洗脱条件

Table 1 UPLC-Q-TOF MS^E mobile phase gradient program for probiotic yogurt

时间 /min	流速 /(mL/min)	流动相 A /%	流动相 B /%	线性梯度 (Curve)
	0.45	98	2	Initial
2.0	0.45	98	2	6
2.5	0.45	93	7	6
9	0.45	50	50	6
13	0.45	15	85	6
14.5	0.45	5	95	6
16.1	0.45	98	2	6

1.3.2 质谱条件

Q-TOF 质谱仪采用 ESI⁺扫描模式, 质谱条件为: 毛细管电压 3/2.5 kV(+/-); 锥孔电压 40 V; 离子源温度 100 °C; 去溶剂气温度 350 °C; 去溶剂气(氮气)流速 800/600 L/h(+/-); 进样锥气体(氮气)流速 50 L/h。质荷比扫描范围 50~1000 *m/z*, 低能量和高能量的碰撞能分别为 6 eV 和 20~45 eV。采用浓度为 2 ng/mL 亮氨酸脑啡肽 (*m/z* 556.2771 u [M+H]⁺/*m/z*) 作为质量校正液, 流速为 30 μL/min。

1.4 数据处理及代谢物的鉴定

UPLC-Q-TOF MS^E 获得的原始数据经 MarkerLynx 和 Progenesis QI 软件进行数据提取, 完成峰对齐、峰识别、去卷积化等数据预处理, 然后将此数据集导入 EZinfo 软件(Waters, USA)中进行处理, 并对数据进行 PCA 分析和 OPLS-DA 分析。结合 VIP 值≥1、差异倍数≥2 和 P 值≤0.05 确定酸奶样品之间的显著差异代谢物。

经筛选出的差异代谢物通过 Progenesis QI 软件在 HMDB(<http://www.hmdb.ca/>), ECMDDB(<http://www.ecmdb.ca/>), YMDB(<http://www.ymdb.ca/>)和 METLIN (<http://www.metlin.scripps.edu/>)等数据库进行结构的鉴定。

2 结果与分析

2.1 益生菌酸奶 UPLC-Q-TOF MS^E 色谱图分析

析

本研究采用了 UPLC-Q-TOF MS^E 代谢组学技术研究两组样品在发酵过程中代谢物变化。图 1 分别显示了单一益生菌 *L. Plantarum* P-8 发酵酸奶 (p)、益生菌 *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶 (bp) 在 ESI⁺扫描模式下的基峰图 (base peak intensity chromatograms, BPI chromatograms)。

从图 1 可知, 在该色谱条件下, 样品 p 与 bp 图谱之间存在较大差异, 出峰时间在 1.5 min 之内, 样品 p 中出现了 4 个可检测的峰型, 而样品 bp 只在 0.59 min 处出现一个较大的峰, 说明在该处样品 bp 与 p 相比较, 有代谢物种类的减少。样品 p 在 3.06 min 和 3.61 min 均出现了比 bp 更大的峰型, 说明混合发酵之后的样品在此处的物质含量有所减少。样品 p 在 9.22 min 处有一个很高的峰型, 而样品 bp 则相对较小, 说明在 9.22 min 处能检测到的物质含量也发生了较大的改变。而出峰时间在 10.30 min 和 13.01 min 处, 样品 bp 均出

现了比 p 更高的峰型, 显示出与单一益生菌发酵相比, 混合发酵的方式也带来了代谢物的增加。综上可知, 两种发酵方式得到的乳酸菌代谢物具有显著差异, 这也直接影响两种酸奶样品的风味等特性。

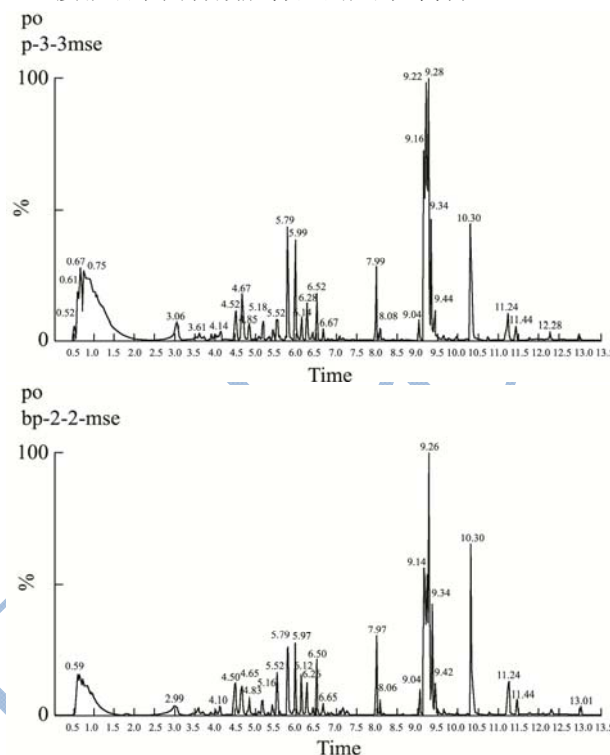


图1 益生菌 *L. plantarum* P-8 (p) 和 *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶 (bp) 的基峰图

Fig.1 BPI chromatograms of yogurts produced using *L. plantarum* P-8 (p) and co-culture of the traditional yogurt fermentation starter YC-X11 and *L. plantarum* P-8 (bp)

2.2 益生菌酸奶代谢组学分析

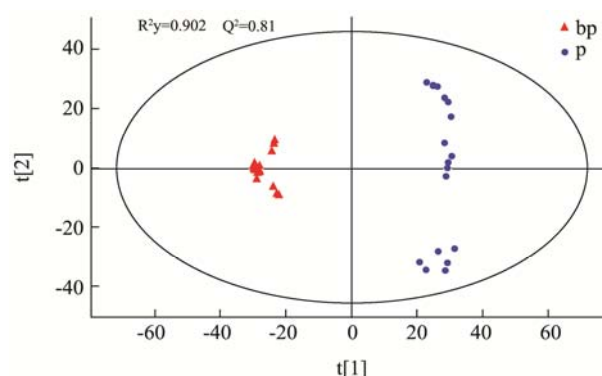


图2 两组益生菌酸奶样品的 PCA 得分图

Fig.2 PCA score plots of two probiotic yogurt groups

为了观察两组样品之间的代谢物的差异性, 通过 Progenesis QI 和 EZinfo (Waters, USA) 软件进行了 PCA 分析, 得出反映两组样品 (p 和 bp) 离散程度的得分图, 结果见图 2, 并完成了 OPLS-DA 多元统计分析, 结果见图 3。

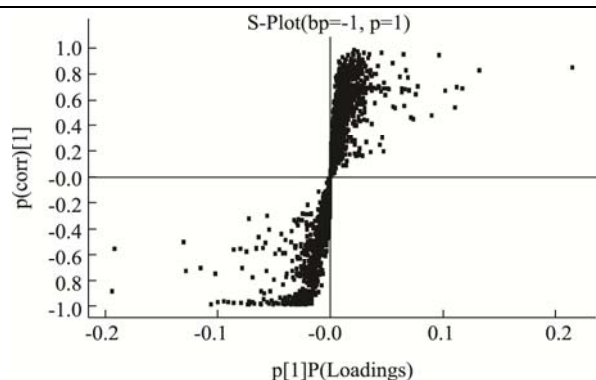


图3 两组酸奶样品的OPLS-DA得分图

Fig.3 OPLS-DA score plots of two probiotic yogurt

注: 益生菌 *L. plantarum* P-8, bp 为 *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶。

由 PCA 得分图可见, 两组样品 (p 和 bp) 组间能够完全区分, 组内具有一定的聚类作用。该模型的解释率和预测率 $R^2Y=0.902$, $Q^2=0.81$, R^2Y 和 Q^2 均

在 0.79 以上, 该模型的区分程度和预测度较好。

OPLS-DA 的得分图结合 P 值等参数能够更好解释在两种不同类型的酸奶中代谢物含量的变化。如图 3 所示, 图中 S 型曲线上的每一个点代表一个化合物, 靠近中间部分为两组样品 (p 和 bp) 中差异较小的成分, 靠近上下两侧部分为两组样品中差异较大的成分, 因此, 图 3 显示出两个样品的代谢物具有明显不同, 为进一步的分析鉴定提供依据。

2.3 代谢差异物的鉴定和分析

本研究采用 MS^E 数据采集方法得到母离子和相应的碎片离子信息, 应用 Progenesis QI 软件进行代谢物鉴定。在 ESI⁺ 模式下共检测到 2120 个代谢物, 根据 VIP 值 ≥ 1 、差异倍数 ≥ 2 和 P 值 ≤ 0.05 的筛选原则, 共 38 个代谢物被鉴定, 并通过相应的数据库对其结构进行了鉴定, 结果见表 2。

表 2 *L. plantarum* P-8 发酵与 *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶差异代谢物

Table 2 Significantly different metabolites in the yogurts produced using *L. plantarum* P-8 and co-culture of the traditional yogurt fermentation starter YC-X11 and *L. plantarum* P-8

m/z	Rt	P 值	差异倍数	代谢物	分子式	代谢途径
<i>L. plantarum</i> P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶增加的代谢物						
359.1871	14.04	7.58E-13	Infinity	Ala-Ala-Pro-Thr	C ₁₅ H ₂₆ N ₄ O ₆	PP
164.0817	2.34	1.31E-11	6.68	L-Histidinol	C ₆ H ₁₁ N ₃ O	AAs
132.1024	1.32	4.25E-11	15.2	L-Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	AAs
182.0671	2.22	2.56E-10	6.48	8-Hydroxy-7-methylguanine	C ₆ H ₇ N ₅ O ₂	AAs
166.0502	1.99	1.98E-09	6.9	4-Pyridoxic acid	C ₈ H ₉ NO ₄	Vit
330.0599	2.10	1.79E-09	28.50	cAMP	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P	NT
220.1176	3.48	6.45E-09	8.89	Pantothenic Acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	Vit
254.1613	2.88	3.40E-08	4.77	Pro-Arg	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ O ₃	PP
136.0761	1.39	5.78E-07	7.90	Dopamine	C ₈ H ₁₁ NO ₂	AAs/SM
166.08631	2.83	2.24E-06	6.78	L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	AAs
163.0604	1.52	1.58E-06	5.94	2-hydroxy-2-ethylsuccinic acid	C ₆ H ₁₀ O ₅	C/E
165.0547	1.36	1.37E-06	8.98	4-Hydroxyphenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	AAs/SM
205.0969	4.08	1.85E-06	3.58	L-Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	AAs
200.2009	11.19	2.65E-05	2.16	dodecanamide	C ₁₂ H ₂₅ NO	No
282.2778	14.17	3.58E-05	3.89	Oleamide	C ₁₈ H ₃₅ NO	No
204.1231	0.88	4.05E-05	6.87	Acetylcarnitine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	LLs
150.0553	3.37	2.86E-05	3.76	Methionine	C ₅ H ₁₂ NO ₂ S	AAs
353.2655	14.40	0.00078	4.69	MG(0:0/16:0/0:0)	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	LLs
199.0868	5.04	0.00062	2.17	Harmol	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O	No
381.0800	0.65	0.01781	5.35	O-Acetyls erine	C ₁₃ H ₂₁ N ₂ O ₇ PS	AAs
<i>L. plantarum</i> P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶减少的代谢物						
328.1515	3.46	1.48E-09	5.91	Asp-Pro-Pro	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₆	PP
345.0669	1.40	1.63E-09	16.73	Met-Ser-OH	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₇ S	PP

转下页

接上页

195.11279	2.89	1.04E-08	5.25	L-prolyl-L-Proline	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	PP
460.26839	10.35	1.53E-08	43.30	Ala-Ala-Ile-Trp	C ₂₃ H ₃₃ N ₅ O ₅	PP
257.11339	2.11	2.35E-08	45.20	His-His	C ₆ H ₁₆ N ₂ O ₆	PP
375.2498	12.74	4.98E-08	8.19	Ala-Gly-Asn-Asn	C ₁₃ H ₂₂ N ₆ O ₇	PP
524.1967	1.40	1.58E-07	43.56	Asp-Met-Met-Gln	C ₁₉ H ₃₃ N ₅ O ₈ S ₂	PP
419.2758	12.71	7.20E-07	15.32	Ala-Glu-Pro-Cys	C ₁₆ H ₂₆ N ₄ O ₇ S	PP
156.0773	0.88	3.15E-07	9.25	Histidine	C ₆ H ₁₀ N ₃ O ₂	AAs
256.2632	13.99	3.01E-06	4.95	Palmitic amide	C ₁₆ H ₃₃ NO	No
360.1498	0.89	2.54E-05	18.43	Tyr-Asp	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₆	PP
215.0165	0.93	3.67E-05	46.20	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	C/E
248.1494	1.26	2.80E-05	21.34	hydroxybutyrylcarnitine	C ₁₁ H ₂₁ NO ₅	LLs
302.3059	10.31	0.00016	4.56	Sphinganine	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	No
365.1060	0.64	0.00199	6.87	His-Ser-OH	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₇	PP
574.3651	11.74	0.00450	14.60	Arg-Arg-Arg-Ser	C ₂₁ H ₄₃ N ₁₃ O ₆	PP
162.1128	0.62	0.00438	12.14	L-Carnitine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	LLs
509.2771	13.86	0.00520	6.32	Ala-Lys-Gln-Tyr	C ₂₃ H ₃₆ N ₆ O ₇	PP

注: AAs-氨基酸代谢; PP-短肽; C/E-碳水化合物及能量代谢; LLs-脂质代谢; Vit-维生素代谢; NT-核酸代谢; SM-次级代谢产物的生物合成; No-未知代谢途径。

由表 2 可知,在两种类型的酸奶中,主要为氨基酸、有机酸、短肽和脂类的衍生物和维生素等代谢物。在益生菌 *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶中,亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和色氨酸在发酵过程中显著增加。组氨酸的合成前体组氨醇明显增加,这与许多学者的研究一致^[19-21]。8-羟基-甲基谷氨酸和乙基丝氨酸也明显增加。Kamalrul Azlan Azizan^[22]等研究了在不同培养温度(30℃和37℃)下 *L. lactis* 的代谢图谱,研究发现,在30℃和37℃(不搅拌的情况下),主要的代谢产物是伯醇、醛、酮和有机酸。在30℃搅拌的培养条件下,代谢产物最为丰富的是天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。4-吡哆酸是参与维生素 B₆ 代谢的主要产物,在在益生菌 *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶中明显增加。酸奶中水溶性的维生素的含量丰富,因此酸奶是这些微量营养素的主要来源之一。Fabian^[23]等人利用 HPLC 的方法测定食用一定周期含有益生菌的酸奶的年轻女性的血液和尿液中 B 族维生素的含量,发现和对照组相比,食用益生菌酸奶的女性整体 B 族维生素的含量明显增加,并可以提高身体的免疫功能和抗氧化功能。Elmadfa^[24]等人在酸奶中添加 *L. acidophilus* 和 *L. casei* GG 等益生菌,发现细菌总数并不影响 VB₁、B₂ 和 B₆ 的含量,只是和这些益生菌的种类有关。泛酸的含量也明显增加, Hoppner K^[25]等人研究了 13 种不同品牌的酸奶中总叶酸、泛酸和生物素的含量,其中泛酸的含量在 150~437 μg/100 g。

在益生菌 *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶中,4-羟基苯乳酸的含量是益生菌 *L. plantarum* P-8 发酵的酸奶的 6.78 倍。乳酸菌发酵过程中会产生具有抗真菌功能的小分子代谢产物,主要是一些有机酸,包括苯乳酸、3-羟基苯乳酸和 4-羟基苯乳酸等^[26]。Lavermicocca^[27]等人从 *L. plantarum* 21B 发酵液中分离纯化得到两种具有强烈抑制真菌作用的分子,分别鉴定为苯乳酸和 4-羟基苯乳酸。益生菌 *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶中,Ala-Ala-Pro-The、2-羟基-2-甲基琥珀酸和乙酰胆碱等代谢物也显著增加。

由表 2 可知,益生菌 *L. plantarum* P-8 发酵酸奶所产生的代谢物中,Asp-Pro-Pro、Met-Ser-OH、L-prolyl-L-Proline、Ala-Ala-Ile-Trp、His-His、Ala-Gly-Asn-Asn、Asp-Met-Met-Gln、Ala-Glu-Pro-Cys、Tyr-Asp 等短肽的数量和相对含量明显增加。通过乳酸菌的作用牛乳可以降解为各种代谢物,主要是芳香物质、肽和有机酸,这些代谢物影响酸奶是质构和风味,在发酵过程中,酪蛋白在蛋白酶和肽酶的作用下降解为短肽,研究者利用代谢组学的分析方法发现这些短肽可能对人体的健康有益,如降低胆固醇、缓解紧张和抗氧化等作用^[28]。Ghosh D^[29]等人研究 *S. thermophilus* 和 *L. plantarum* 混合发酵牛乳,能够提高酸奶的功能和益生特性,蛋白降解为大量的短肽和氨基酸,并且这些短肽具有一定的生物活性。Khalid N M^[30]等人通过 SDS-PAGE 的方法测定 *L. plantarum* 水解牛乳蛋白,

发现 *L. plantarum* 主要降解牛乳中的 β -酪蛋白, 产生游离氨基酸和短肽。和益生菌 *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶相比, L-肉毒碱在 *L. plantarum* P-8 发酵的酸奶的相对含量较高, 许多研究者发现, 在发酵制品中均含有一定数量的肉毒碱^[31,32]。Seline K G^[33]等人发现在发酵乳制品中, 胆碱的最大量为 8~530 mg/kg。Le Boucher C^[34]等人采用 UPLC-MS 和 GC-MS 代谢组学的分析技术研究干酪的代谢图谱, 共鉴定 45 个代谢物, 其中包括 12 种氨基酸、25 种芳香物质、4 种维生素、尿酸、肌酸和肉毒碱。代谢组学技术是一项综合、全面和灵敏度高的一项技术, 能够在酸奶的生产中的一些质量等方面的问题广泛的应用。

3 结论

3.1 本文采用超高效液相色谱-质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF MS^E) 对得到的样品进行代谢组学的分析, 得到的结果准确度高, 是一种高效的对微生物进行代谢组学分析的方法。ESI⁺扫描模式下的基峰图结果显示, 益生菌 *L. plantarum* P-8 发酵的酸奶 (p) 和益生菌 *L. plantarum* P-8 与传统发酵剂共同发酵的酸奶(bp)的 BPI 基峰图存在较大差异, 证明两种发酵方式得到的乳酸代谢物具有显著差异。

3.2 由 PCA 和 OPLS-DA 的得分图可见, 两组样品(p 和 bp)组间能够完全区分, 组内具有一定的聚类作用, 该模型的区分程度和预测度较好, 也得出两种不同类型的酸奶中代谢物具有明显不同。

3.3 在益生菌酸奶中, 采用 UPLC-Q-TOF MS^E 的分析方法共鉴定亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、4-羟苯乳酸、泛酸、4-吡哆酸、L-肉毒碱、2-羟基-2-甲基琥珀酸、组氨酸、Asp-Pro-Pro、Met-Ser-OH、L-prolyl-L-Proline、Ala-Ala-Ile-Trp、His-His、Ala-Gly-Asn-Asn、Asp-Met-Met-Gln、Ala-Glu-Pro-Cys 和 Tyr-Asp 等 38 个代谢物, 并从中分析出与单一 *L. plantarum* P-8 发酵剂发酵得到的酸奶 (p) 对比, *L. plantarum* P-8 和传统发酵剂共同发酵的酸奶 (bp) 在发酵过程中增加和减少的产物, 为 UPLC-Q-TOF MS^E 在益生菌发酵的代谢组学研究中奠定基础。

参考文献

[1] Ahmadi M, Boldura O M, Popescu S, et al. Traditional versus commercial yogurt by biochemistry and molecular biology analytical methods [J]. *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, 2015, 48(1): 5-14

[2] Tamime A Y, Robinson R K. Tamime and Robinson's yoghurt:

science and technology [M]. Elsevier, 2007

[3] Smit G, Smit B A, Engels W J M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(3): 591-610

[4] Settachaimongkon S, Nout M J R, Fernandes E C A, et al. The impact of selected strains of probiotic bacteria on metabolite formation in set yoghurt [J]. *International Dairy Journal*, 2014, 38(1): 1-10

[5] Iyer R, Tomar S K, Maheswari T U, et al. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria [J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(3): 133-141

[6] Goodacre R. Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(410): 245-254

[7] Keun H C, Ebbels T M D, Antti H, et al. Analytical reproducibility in 1H NMR-based metabolomic urinalysis [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2002, 15(11): 1380-1386

[8] German J B, Hammock B D, Watkins S M. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health [J]. *Metabolomics*, 2005, 1(1): 3-9

[9] Lindon J C, Holmes E, Nicholson J K. Metabolomics techniques and applications to pharmaceutical research & development [J]. *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(6): 1075-1088

[10] Wishart D S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2008, 19(9): 482-493

[11] Sundekilde U K, Larsen L B, Bertram H C. NMR-based milk metabolomics [J]. *Metabolites*, 2013, 3(2): 204-222

[12] Boudonck K J, Mitchell M W, Wulff J, et al. Characterization of the biochemical variability of bovine milk using metabolomics [J]. *Metabolomics*, 2009, 5(4): 375-386

[13] Piras C, Marincola F C, Savorani F, et al. A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2137-2147

[14] Mozzi F, Ortiz M E, Bleckwedel J, 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(1): 1152-1161

[15] Le Boucher C, Courant F, Jeanson S, et al. First mass spectrometry metabolic fingerprinting of bacterial metabolism in a model cheese [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2): 1032-1040

- [16] Vasiljevic T, Shah N P. Probiotics-from Metchnikoff to bioactives [J]. International Dairy Journal, 2008, 18(7): 714-728
- [17] Lourens-Hattingh A, Viljoen B C. Yogurt as probiotic carrier food [J]. International Dairy Journal, 2001, 11(1): 1-17
- [18] Rodrigues D, Santos C H, Rocha-Santos T A P, et al. Metabolic profiling of potential probiotic or synbiotic cheeses by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(9): 4955-4961
- [19] Delorme C, Godon J J, Ehrlich S D, et al. Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: histidine biosynthesis [J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(14): 4391-4399
- [20] Ho C C. Identity and characteristics of *Neurospora intermedia* responsible for oncom fermentation in Indonesia [J]. Food Microbiology, 1986, 3(2): 115-132
- [21] Bolen P L, Cihak P L, Scharpf Jr L G. Recombinant kid pregastric esterase and methods for its production and use: U.S. Patent 6,582,948 [P]. 2003-6-24
- [22] Azizan K A, Baharum S N, Mohd Noor N. Metabolic profiling of *Lactococcus lactis* under different culture conditions [J]. Molecules, 2012, 17(7): 8022-8036
- [23] Fabian E, Majchrzak D, Dieminger B, et al. Influence of probiotic and conventional yoghurt on the status of vitamins B1, B2 and B6 in young healthy women [J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2008, 52(1): 29-36
- [24] Elmadfa I, Heinzle C, Majchrzak D, et al. Influence of a probiotic yoghurt on the status of vitamins B1, B2 and B6 in the healthy adult human [J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2001, 45(1): 13-18
- [25] Hoppner K, Lampi B. Total folate, pantothenic acid and biotin content of yogurt products [J]. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 1990, 23(4): 223-225
- [26] Šušković J, Kos B, Beganović J, et al. Antimicrobial activity-the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria [J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48(3): 296-307
- [27] Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(9): 4084-4090
- [28] Hagi T, Kobayashi M, Nomura M. Metabolome analysis of milk fermented by γ -aminobutyric acid-producing *Lactococcus lactis* [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(2): 994-1001
- [29] Ghosh D, Chattoraj D K, Chattopadhyay P. Studies on changes in microstructure and proteolysis in cow and soy milk curd during fermentation using lactic cultures for improving protein bioavailability [J]. Journal of Food Science and Technology, 2013, 50(5): 979-985
- [30] Khalid N M, Marth E H. Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* [J]. Journal of Dairy Science, 1990, 73(11): 3068-3076
- [31] Ravyts F, Vuyst L D, Leroy F. Bacterial diversity and functionalities in food fermentations [J]. Engineering in Life Sciences, 2012, 12(4): 356-367
- [32] Prates J A M, Mateus C. Functional foods from animal sources and their physiologically active components [J]. Revue de Médecine Vétérinaire, 2002, 153(3): 155-160
- [33] Seline K G, Johein H. The determination of L-carnitine in several food samples [J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 793-804
- [34] Le Boucher C, Courant F, Jeanson S, et al. First mass spectrometry metabolic fingerprinting of bacterial metabolism in a model cheese [J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 1032-1040