

环二肽Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌的促生长作用

谭旭¹, 吴忠坤², 夏迪¹, 高宁¹, 王丽¹, 高瑶¹, 郭新梅³, 刘学聪³, 王远亮^{1*}

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128) (2. 澳优乳业(中国)有限公司, 湖南长沙 410005) (3. 锦乔生物科技有限公司, 江苏淮安 223200)

摘要: 研究旨在探讨环二肽 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌生长的影响。该研究以植物乳杆菌 (*Lactobacillus Plantarum* T1) 为研究对象, 采用高效液相色谱法初步定性定量植物乳杆菌 T1 发酵液中的 Cyclo (Leu-Pro), 然后将植物乳杆菌 T1 分别接种于不含或含不同质量浓度 (0.5、1、5、10 μg/mL) Cyclo (Leu-Pro) 的 MRS 肉汤培养基中培养 18 h, 采用 96 孔法和平板计数法测定不同培养条件下植物乳杆菌 T1 的生长曲线和活菌数。结果表明: 不同质量浓度的 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 的生长均有明显的促生长作用, 其中, 1 μg/mL Cyclo (Leu-Pro) 的促生长效果最佳, 可将活菌数提高到 8.73×10^{10} CFU/mL, 相比于对照组提高了一个数量级。在不同胁迫条件下, 1 μg/mL Cyclo (Leu-Pro) 能使植物乳杆菌 T1 的延滞期缩短、生长速度提高, 其活菌数和生物量显著增加 ($P < 0.05$)。综上所述, Cyclo (Leu-Pro) 促进了植物乳杆菌 T1 的生长, 增强了其抗胁迫能力。这将有利于植物乳杆菌 T1 作为发酵剂在食品发酵领域的应用。

关键词: 环二肽 Cyclo (Leu-Pro); 植物乳杆菌; 促生长; 增殖

文章编号: 1673-9078(2025)01-81-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1514

Growth-promoting Effect of Cyclic Dipeptide Cyclo (Leu-Pro) on *Lactobacillus plantarum*

TAN Xu¹, WU Zhongkun², XIA Di¹, GAO Ning¹, WANG Li¹, GAO Yao¹, GUO Xinmei³, LIU Xuecong³,
WANG Yuanliang^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China) (2. Ausnutria Dairy (China) Limited, Changsha 410005, China) (3. Jinqiao Biotechnology Company Limited, Huai'an 223200, China)

Abstract: In this study, it's the effect of Cycle (Leu Pro) on the growth of *Lactobacillus plantarum* was investigated. *Lactobacillus Plantarum* T1 was used as the research object, and high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to preliminarily characterize and quantify the Cyclo (Leu-Pro) in the fermentation broth of *Lactobacillus Plantarum* T1. *Lactobacillus Plantarum* T1 was respectively inoculated in the MRS broth medium without or with different mass concentrations (0.5, 1, 5, 10 μg/mL) of Cyclo (Leu-Pro) for 18 h. The growth curves and viable bacterial counts of *Lactobacillus plantarum* T1 under different culture conditions were determined by the 96-well method and plate counting
引文格式:

谭旭, 吴忠坤, 夏迪, 等. 环二肽 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌的促生长作用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(1): 81-88.

TAN Xu, WU Zhongkun, XIA Di, et al. Growth-promoting effect of cyclic dipeptide cyclo (Leu-Pro) on *Lactobacillus plantarum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 81-88.

收稿日期: 2023-12-16

项目基金: 国家自然科学基金项目 (31701606); 淮安市重点实验室项目 (HA202310)

作者简介: 谭旭 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: tanxu0360@163.com

通讯作者: 王远亮 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: wangyuanliang@hunan.edu.cn

method. The results showed that Cyclo (Leu-Pro) at different mass concentrations had significant growth-promoting effects on the growth of *Lactobacillus plantarum* T1, among which, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cyclo (Leu-Pro) had the greatest growth-promoting effect and could increase the viable counts to 8.73×10^{10} CFU/mL, which was an order of magnitude higher than the control. Under different stress conditions, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cyclo (Leu-Pro) could shorten the lag period and increase the growth rate of *Lactobacillus plantarum* T1, and its viable count and biomass increased significantly ($P < 0.05$). In summary, Cyclo (Leu-Pro) promoted the growth of *Lactobacillus plantarum* T1 and enhanced its stress resistance. This will favor the application of *Lactobacillus plantarum* T1 as a starter in the field of food fermentation.

Key words: cyclo (Leu-Pro); *Lactobacillus plantarum*; growth promotion; proliferation

乳酸菌 (Lactic Acid Bacteria, LAB) 是一种可以利用碳水化合物生成大量乳酸的革兰氏阳性细菌的通称^[1]。它们具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、促进营养物质消化吸收、调节宿主免疫和维持肠道菌稳态等益生功能^[2,3]。目前, 乳酸菌已被广泛应用于食品加工、医药研发和新型饲料开发等领域^[4]。由于乳酸菌对生长条件较为苛刻, 又需要达到一定生物量才能发挥其益生功能^[5]。所以, 挖掘能够提高乳酸菌的增殖和维持菌体活性稳定性的有效物质成为了研究热点。并且, 乳酸菌在实际应用过程中也会面临的多种环境胁迫, 例如: 温度胁迫、酸胁迫、盐胁迫等, 其生理特性、代谢产物、细胞活性等都会受到影响^[6]。如何提高乳酸菌对环境胁迫的耐受能力也是人们关注的研究方向。

环二肽 (Cyclodipeptides, CDPs) 又称 2,5-二酮哌嗪, 是由二肽及其酰胺环化而成的一类相对简单的化合物^[7]。它们是细菌、真菌和动物蛋白质代谢的次级功能代谢物或副产物^[8]。近年来, 研究者从植物乳杆菌^[9]、短乳杆菌^[10]、副干酪乳杆菌^[11]等乳酸菌发酵培养液中分离鉴定出多种 CDPs。其中也包括 Cyclo (Leu-Pro)。Cyclo (Leu-Pro) 是由亮氨酸和脯氨酸环化而成的产物, 呈现白色或无色的结晶或粉末, 分子量为 210.3 u, 熔点在 163~165 $^{\circ}\text{C}$ 之间。如图 1 所示, Cyclo (Leu-Pro) 含有稳定的六元环结构、具有一定的构象约束作用, 使其稳定性强于其他的肽类化合物。由于 Cyclo (Leu-Pro) 在机体内易吸收、与游离氨基酸的吸收无竞争、无药物残留和耐药性等优势成为了目前药品研发和食品工程领域的研究热点^[12]。

关于 Cyclo (Leu-Pro) 的研究主要集中于抗癌、抗肿瘤、抗白血病、抗氧化和群体感应等方面^[8]。Cyclo (Leu-Pro) 对乳酸菌生长的影响未见文献报道。现有研究表明, 在乳酸菌的培养基中添加生物活性肽可以影响其发酵过程, 促进乳酸菌的生长和

繁殖^[13]。Ding 等^[14]发现核桃寡肽不仅能促进植物乳杆菌的生长和繁殖, 还能减少死亡细胞的数量。Zhang 等^[15]发现罗伊氏乳杆菌能够更好利用小分子大豆肽进行生长与繁殖, 使其活菌数维持在较高水平。任静等^[16]发现蛋清肽能够显著提高保加利亚乳杆菌的活菌数, 并且随着肽分子质量的减小, 促生长作用越显著。所以, 乳酸菌在生长过程中会优先利用多肽或寡肽作为氮源, 且小分子肽比大分子肽更易于吸收和利用。

基于前期试验摸索, 发现 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 的生长有积极影响。因此, 本研究以植物乳杆菌 T1 为研究对象, 探究了外源添加 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 生长的影响, 提高了植物乳杆菌 T1 的生长活性及抗逆能力, 这将有利于其作为发酵剂在食品发酵中的应用。

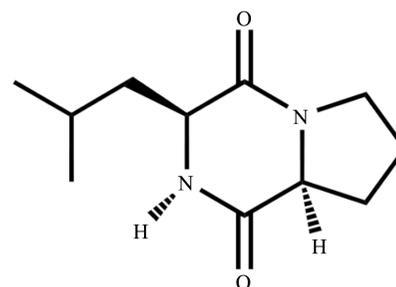


图 1 Cyclo (Leu-Pro) 结构式

Fig.1 Structural formula of Cyclo (Leu-Pro)

1 材料与试剂

1.1 试验菌株与材料

1.1.1 菌株和试剂

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*), 从腊肉中分离纯化、鉴定所得, 菌株命名为 T1, 保存于湖南农业大学食品微生物实验室。Cyclo (Leu-Pro), 购自南京源肽生物有限公司; 乙腈 (色谱级), 购自美国天地试剂公司; 三氟乙酸, 购自上海麦克林生

化科技股份有限公司; MRS 肉汤培养基、MRS 培养基均购自广东环凯微生物科技有限公司; 氯化钠、氢氧化钠、盐酸、乙酸乙酯均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 培养基

对照组 (CK) 培养基为 MRS 肉汤培养基; 试验组 (CLP) 培养基为含有 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 环二肽 Cyclo (Leu-Pro) 的 MRS 肉汤培养基。

1.1.3 仪器与设备

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; SW-CJ-2D 双人单面垂直净化工作台, 上海沪净医疗器械有限公司; 生化培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; LDZM-80-I 高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 电热鼓风干燥器, 天津市泰斯特仪器有限公司; PHS-3C pH 计, 济南欧莱博科学仪器有限公司; SpectraMax ABS Plus 酶标仪, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化

将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中甘油保藏的植物乳杆菌 T1 取出置于室温解冻, 取适量接种于 MRS 肉汤培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h, 活化两代以恢复菌体活力。

1.2.2 高效液相测定 Cyclo (Leu-Pro)

1.2.2.1 标准曲线的制作

准确称取 Cyclo (Leu-Pro) 标准品 100 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入超纯水定容, 得到质量浓度为 10 mg/mL 的标准储备液。吸取标准储备液稀释, 得到质量浓度为 1、5、10、50、100、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。将不同质量浓度的标准溶液过 0.22 μm 滤膜后, 上机测定。以浓度作为横坐标, 峰面积均值为纵坐标, 绘制标准曲线, 通过回归计算求得回归方程 $y=9.734\ 8x+24.777$, 相关系数 $R^2=0.999\ 8$ 。

1.2.2.2 样品提取及测定

参照 Lhem 等^[17]的方法, 稍作修改。将活化后的植物乳杆菌 T1 按照 $\varphi=1\%$ 接种量接种于 100 mL MRS 肉汤培养基中, 放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 18 h, 最终得到植物乳杆菌 T1 发酵液。将发酵液通过 10 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 处理得到无细胞上清液。将上清液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次。丢弃水相, 并使有机相通过无水硫酸钠以除去多余的水, 然后使用旋转真空蒸发器在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下蒸发至干,

超纯水定容到 5 mL, 获得粗肽。粗肽过 0.22 μm 滤膜后, 上机测定。

1.2.2.3 高效液相色谱条件

色谱柱: SHIMADZU C18-AQ (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm); 流动相 A: 0.1% 三氟乙酸; 流动相 B: 乙腈; 进样量 20 μL ; 流速 1 mL/min; 紫外检测波长 220 nm。具体梯度洗脱程序如下表 1 所示。

表 1 HPLC测定Cyclo (Leu-Pro) 梯度洗脱程序

Table 1 Determination of Cyclo (Leu-Pro) gradient elution procedure by HPLC

时间/min	A/%	B/%
0	85	15
20	75	25

1.2.3 活菌数测定

将活化二代的菌液以 $\varphi=1\%$ 的接种量接入对照组和试验组培养基中 (初始活菌数 $1\times 10^6\sim 5\times 10^6$ CFU/mL), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h, 采用混菌平板法测定菌株的活菌数。

1.2.4 生长曲线测定

参照罗成莹等^[18]的方法, 稍作修改。将活化二代的菌液以 $\varphi=1\%$ 接种量接入对照组和试验组对应的培养基中混匀, 分别取 200 μL 注入 96 孔板中, 利用全自动酶标仪动态监测吸光度 600 nm 下植物乳杆菌 T1 的吸光度值。横坐标为培养时间, 纵坐标为吸光度, 绘制植物乳杆菌 T1 的生长曲线。

1.2.5 培养方法

1.2.5.1 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 生长的影响

将活化后的菌液按 $\varphi=1\%$ 接种量分别接种于对照组和含有 0.5、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度 Cyclo (Leu-Pro) 的 MRS 肉汤培养基中, 放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 18 h。测定其生长曲线和活菌数。

1.2.5.2 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 抗胁迫能力的影响

(1) 温度胁迫: 参照韦瑛等^[19]的方法, 稍作修改。将活化后的菌液按 $\varphi=1\%$ 接种量分别接种于对照组培养基和试验组培养基中, 分别放置于不同温度 (17 、 27 、 37 、 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$) 条件下培养 18 h。测定其生长曲线和活菌数。

(2) 盐胁迫: 参照陈杜岚等^[20]的方法, 稍作修改。将活化二代的菌液按 $\varphi=1\%$ 接种量分别接种于含有 2%、4%、6%、8% NaCl (质量分数) 的对照组培养基和试验组培养基中, 放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培

养箱培养 18 h。测定其生长曲线和活菌数。

(3) 酸胁迫: 参照杨莲等^[21]的方法, 稍作修改。将活化二代的菌液按 $\phi=1\%$ 接种量分别接种于不同 pH 值 (3、4、5、6) 的对照组培养基和试验组培养基中, 放置于 37 °C 恒温培养箱培养 18 h。测定其生长曲线和活菌数。

注: 除以上标注以外的“%”, 均为体积分数。

1.3 数据处理

采用 Excel 和 SPSS 进行数据分析, Origin 2021 和 Prism 8.0.2 进行图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 高效液相色谱初步鉴定 Cyclo (Leu-Pro)

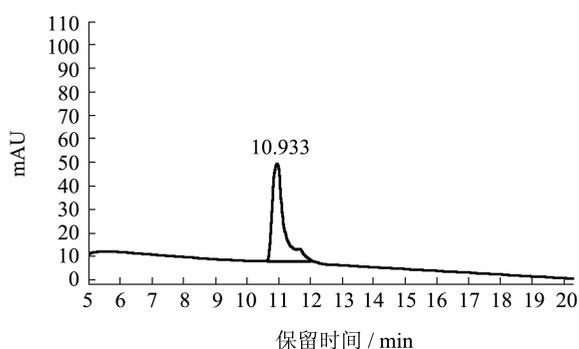


图 2 Cyclo (Leu-Pro) 的 HPLC 图

Fig.2 HPLC chromatogram of Cyclo (Leu-Pro)

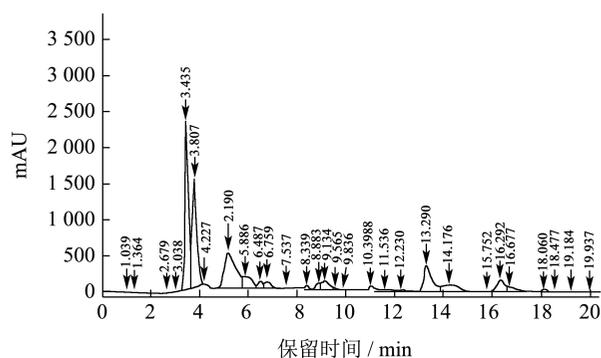


图 3 样品的 HPLC 图

Fig.3 HPLC chromatogram of the sample

由图 2 和图 3 可知, Cyclo (Leu-Pro) 标准品的保留时间为 10.93 min, 植物乳杆菌 T1 发酵液在保留时间为 10.98 min 处出峰, 其峰面积为 1 252.63。根据回归方程计算得出植物乳杆菌 T1 发酵液中 Cyclo (Leu-Pro) 的质量浓度为 6.31 $\mu\text{g/mL}$, 说明植物乳杆菌 T1 自身能够合成 Cyclo (Leu-Pro)。并且, Min-Kyu 等^[22]从植物乳杆菌 LBP-K10 发酵液中鉴定出了多种含脯氨酸的环二肽。其中也包括 Cyclo

(Leu-Pro)。所以, 植物乳杆菌 T1 可以作为微生物发酵法制备 Cyclo (Leu-Pro) 的生产菌株。这也为研究外源 Cyclo (Leu-Pro) 对自身能合成该肽的乳酸菌生长的影响奠定了前期基础。

2.2 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 生长的影响

由图 4 可知, 各组植物乳杆菌 T1 的生长趋势相似, 在 0~6 h 生长速度缓慢, 为生长延缓期; 在 6~14 h $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值变化速度较快, 为生长对数期; 在 14 h 后生物量的增加速度变慢, 植物乳杆菌 T1 逐渐进入稳定期, 吸光度基本保持不变。各试验组与对照组相比, 生物量在 12 h 后均高于对照组, 这说明 Cyclo (Leu-Pro) 在 12 h 后对植物乳杆菌发挥明显的促生长作用。与对照组相比, 各试验组的活菌数显著增加 ($P<0.05$)。当 Cyclo (Leu-Pro) 含量为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时, 培养 18 h 后活菌数达到最高值, 可将植物乳杆菌 T1 的活菌数由 2.82×10^9 CFU/mL 提高到 8.73×10^{10} CFU/mL。这说明 Cyclo (Leu-Pro) 能提高植物乳杆菌 T1 的增殖速度并且将其活菌数维持在较高水平。但是随着 Cyclo (Leu-Pro) 浓度的不断增加, 5 $\mu\text{g/mL}$ 组和 10 $\mu\text{g/mL}$ 组的活菌数和生物量低于 1 $\mu\text{g/mL}$ 组, 高于对照组。这可能是因为植物乳杆菌 T1 在对数期时, 5 $\mu\text{g/mL}$ 组和 10 $\mu\text{g/mL}$ 组的生长速度高于 1 $\mu\text{g/mL}$ 组, 菌体快速生长会利用葡萄糖不断生成乳酸, 导致发酵液中的 pH 迅速下降, 同时营养物质的消耗和代谢物不断积累, 发酵环境变得恶劣, 从而导致稳定期活菌数低于 1 $\mu\text{g/mL}$ 组^[23]。

不同浓度的环二肽 Cyclo (Leu-Pro) 均能提高植物乳杆菌 T1 的活菌数和生物量, 促进植物乳杆菌 T1 的生长繁殖, 表明 Cyclo (Leu-Pro) 可以减少菌体在发酵过程中由于营养物质的损耗和代谢产物的积累而导致的死亡。由于某些乳酸杆菌在生长过程中会产生特定的肽酶, 这些肽酶能够水解富含脯氨酸且难以裂解的活性肽^[24]。植物乳杆菌可能分泌相关肽酶将这种小分子的肽作为营养物质吸收利用, 加快自身生长速度和增殖速度。也有文献报道, 当培养基中含有促生长因子时, 促生长因子可以为植物乳杆菌提供更适的碳氮组合, 能够增强其利用营养物质的效率, 使其生长速度加快, 提前进入增殖稳定期^[25]。因此, Cyclo (Leu-Pro) 也有可能作为一种潜在的促生长因子促进了植物乳杆菌 T1 的生长繁殖。

目前, 大量研究者证实部分低聚糖、多糖、蛋

白水解物、天然植物和中草药提取物等具有促进乳酸菌增殖和生长的作用^[26]。但是这些物质大都需要经过复杂、繁琐的分离和纯化过程才能够应用于乳酸菌的培养,并且添加量大,提取不易,操作困难。除此之外,这些物质中发挥增殖作用的有效成分不明确,某些成分在不同胁迫条件中不稳定,容易失活变性,实际应用范围受限。Cyclo (Leu-Pro) 相比于现有增植物物质而言,化学性质稳定,微量高效,投入生产成本低易操作,实际应用范围广。

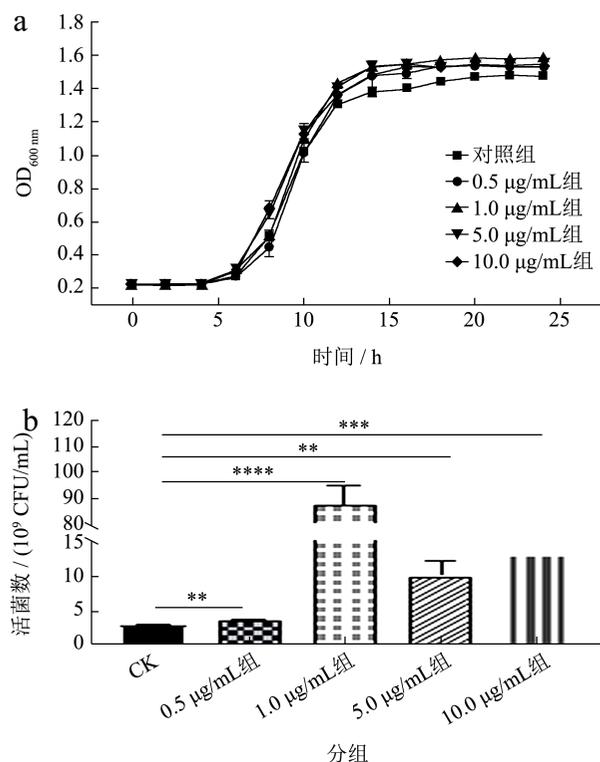


图4 不同质量浓度 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 生长的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of Cyclo (Leu-Pro) on the growth of *Lactobacillus plantarum* T1

注:(a) 生长曲线,(b) 活菌数。*代表 $P<0.05$, **代表 $P<0.01$, ***代表 $P<0.001$, ****代表 $P<0.0001$ 。下图同。

2.3 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 抗胁迫能力的影响

2.3.1 温度胁迫

由图 5 可知,随着温度的增加,植物乳杆菌 T1 的活菌数和生物量呈现先增加后下降的趋势。在 27 °C 和 37 °C 培养条件下,Cyclo(Leu-Pro) 的添加能够使植物乳杆菌 T1 的生长速度加快,延滞期缩短,提前进入对数期。培养 18 h 后,试验组的活菌数在

27 °C 和 37 °C 培养条件显著高于对照组 ($P<0.05$)。其中,37 °C 时,植物乳杆菌 T1 的活菌数可由 3.40×10^9 CFU/mL 提高到 1.17×10^{10} CFU/mL; 比对照组提高了 2.44 倍。综上所述,在 17 °C 和 47 °C 培养条件下,植物乳杆菌 T1 的生物量显著增加 ($P<0.05$); 在 27 °C 和 37 °C 培养条件下,植物乳杆菌 T1 的生长速度加快,活菌数和均显著提高 ($P<0.05$)。这说明在 17~47 °C 培养条件下,Cyclo (Leu-Pro) 能够促进植物乳杆菌 T1 的代谢,增强植物乳杆菌 T1 的抗温度胁迫能力。

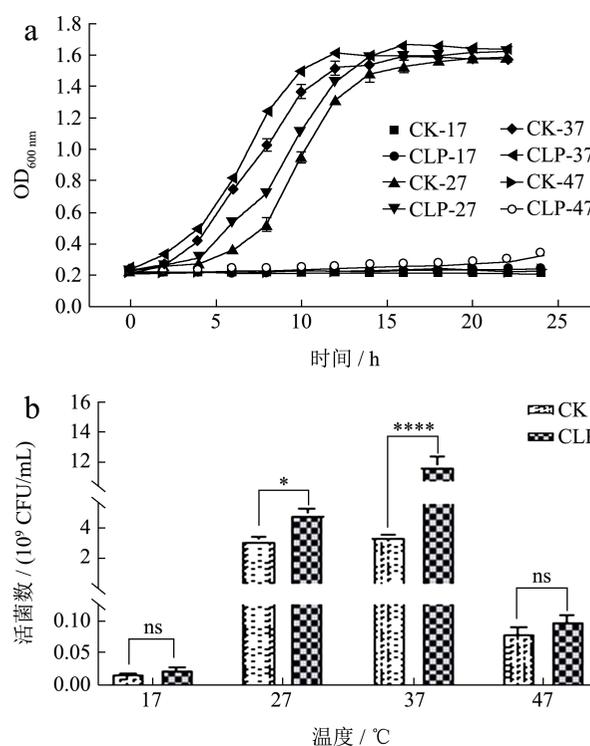


图5 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 耐热能力的影响

Fig.5 Effect of Cyclo (Leu-Pro) on heat resistance of *Lactobacillus plantarum* T1

2.3.2 盐胁迫

如图 6 所示,随着盐质量分数不断增加,植物乳杆菌 T1 的生长代谢受到了不同程度的抑制。但在对数期和稳定期时,试验组的 OD_{600 nm} 值始终高于对照组。在 2%~6% 盐条件下,试验组的活菌数显著高于对照组 ($P<0.05$)。其中,盐质量分数为 4% 时,植物乳杆菌 T1 的活菌数由 2.27×10^9 CFU/mL 提高到 3.27×10^9 CFU/mL; 比对照组提高了 0.44 倍。综上所述,当盐为 2%~6% 时,植物乳杆菌 T1 延滞期缩短,对数期提前,各试验组生物量和活菌数均显著高于对照组 ($P<0.05$)。这说明 Cyclo(Leu-Pro) 能够帮助植物乳杆菌 T1 快速适应恶劣环境,促进

植物乳杆菌 T1 的生长与代谢, 增强植物乳杆菌 T1 在盐胁迫条件下的抗性。

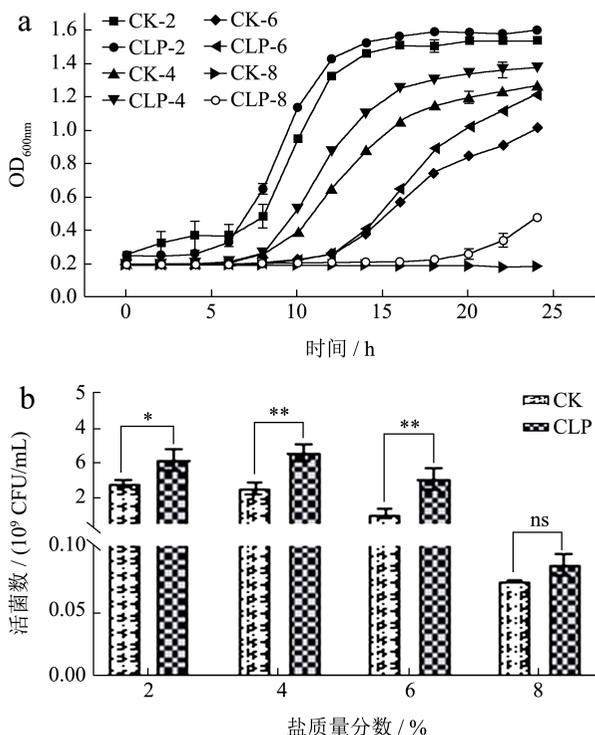


图6 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 耐盐能力的影响
Fig.6 Effect of Cyclo (Leu-Pro) on the salt tolerance of *Lactobacillus plantarum* T1

2.3.3 酸胁迫

如图 7 所示, 随着 pH 值的不断降低, 植物乳杆菌 T1 的生长受到不同程度的抑制, 其 OD_{600 nm} 值呈现下降趋势。但在对数期和稳定期时, 试验组的 OD_{600 nm} 值始终高于对照组。其中, pH 值为 4 时, Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 生长的影响最明显; 但当 pH 值为 3 时, 试验组与对照组无显著变化。在 pH 值为 4~6 条件下培养 18 h 后, 各试验组的生物量和活菌数均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。当 pH 值为 6 时, 植物乳杆菌 T1 的活菌数由 2.74×10^9 CFU/mL 提高到 5.65×10^9 CFU/mL; 比对照组提高了 1.06 倍。综上所述, 当 pH 值为 4~6 时, 植物乳杆菌 T1 对数期生长速度加快, 各试验组生物量和活菌数均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 这说明 Cyclo (Leu-Pro) 增强了植物乳杆菌 T1 的抗酸胁迫能力。

Cyclo (Leu-Pro) 在不同胁迫条件下对植物乳杆菌 T1 的生长代谢起到积极的促进作用, 能够提高活菌数和生物量, 缩短植物乳杆菌 T1 适应恶劣环境的时间。这表明 Cyclo (Leu-Pro) 能够改善植物乳杆菌 T1 在不同胁迫条件下的生长状况, 增强

其对温度胁迫、酸胁迫、盐胁迫的抗性。相关研究表明, Cyclo (Leu-Pro) 也是 AI 信号的一种, 它能够调控细菌种内及种间的群体感应^[27-29]。细菌可以通过信号分子浓度感知菌群密度和外界环境, 当胞外信号分子的浓度达到阈值时, 就会进入胞内, 激活特定基因的转录来调控细菌的生物膜形成、毒力因子的表达、次级代谢产物的产生和应激适应机制等多种生理过程^[30,31]。Qian 等^[32]通过代谢组学和转录组学分析, 证明 AI-2/LuxS 系统对植物乳杆菌 SS-128 的生长具有正向调节作用。E 等^[33]在植物乳杆菌 LIP-1 中, 诱导植物乳杆菌 LIP-1 的 Lux S 基因表达, 增加 AI-2 的合成, 有助于生物被膜的形成, 提高冷冻干燥过程中细菌的存活率。外源添加信号分子 AI-2 可能会对乳酸菌的应激耐受性产生影响^[32]。Gu 等^[34]在乳酸菌中加入了体外合成的外源信号分子 AI-2, 结果显示不同浓度的信号分子对实验菌株的生长均有一定促进作用, 60 μmol/L 的 AI-2 对实验菌株的耐酸性具有一定促进作用。因此, Cyclo (Leu-Pro) 可能是作为一种类似于 AI-2 的信号分子激活了植物乳杆菌 T1 的群体感应调节系统, 调控其抗胁迫基因的表达, 使其抗逆能力增强。

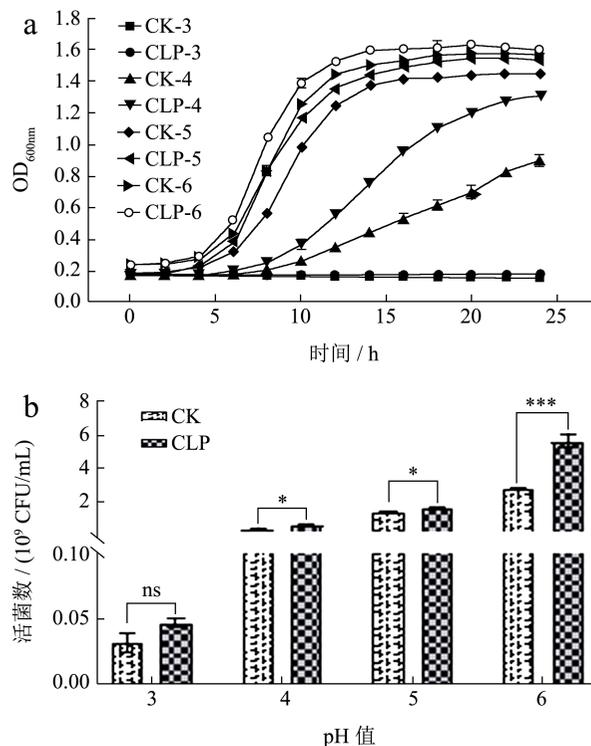


图7 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 耐酸能力的影响
Fig.7 Effect of Cyclo (Leu-Pro) on acid tolerance of *Lactobacillus plantarum* T1

3 结论

本文研究了环二肽 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 的生长影响。结果表明, Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 有明显的促生长作用。当 Cyclo (Leu-Pro) 质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时, 植物乳杆菌 T1 的活菌数可达 8.73×10^{10} CFU/mL, 相比于对照组, 提高了一个数量级。进一步探究 Cyclo (Leu-Pro) 对植物乳杆菌 T1 抗胁迫能力的影响, 发现添加 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cyclo (Leu-Pro) 能够缩短植物乳杆菌 T1 在恶劣环境中的适应时间, 加快其生长速度, 从而提高植物乳杆菌 T1 的抗胁迫能力。本文首次发现 Cyclo (Leu-Pro) 具有促进植物乳杆菌的生长与增殖的生理功能, 补齐了 Cyclo (Leu-Pro) 对乳酸菌生长影响的空白。但关于其发挥促生长作用的机制尚不清楚, 后续将进一步探究其作用机制。

参考文献

- [1] 吴兴壮, 李潇, 王琛, 等. 乳酸菌在食品加工中的研究进展[J]. 辽宁农业科学, 2023, 1: 60-63.
- [2] AHMAD N, SAMIRA M, MORTEZA K, et al. Antifungal preservation of food by lactic acid bacteria [J]. Foods, 2022, 11(3): 395.
- [3] JIANG J, LI K, WANG Y, et al. Screening, identification and physiological characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* M3 (1) against intestinal inflammation [J]. Foods, 2023, 12(8): 1628.
- [4] WANG Y Y, ZHANG C H, LIU F S, et al. Ecological succession and functional characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented foods [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(22): 5841-5855.
- [5] 欧阳佳, 宋晓燕, 李清明, 等. 淮山活性物质对嗜热链球菌的促生长作用研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(13): 129-35.
- [6] 顾悦. 环境胁迫及酵母菌对乳酸菌LuxS/AI-2群体感应系统的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- [7] ILARIA B, MATTHEW J. P, ALBA M. Cyclic dipeptides: from bugs to brain [J]. Trends in Molecular Medicine, 2014, 20(10): 551-558.
- [8] MISHRA A K, CHOI J, CHOI S J, et al. Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity [J]. Molecules, 2017, 22(10): 1796.
- [9] LI J, ZHANG Q, ZHAO J, et al. *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilm inhibitors produced by *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM8724 [J]. Current Microbiology, 2022, 79(5): 143.
- [10] CLAUDIA A, EMANUELE Z, ELKE K. A, et al. Quantification of cyclic dipeptides from cultures of *Lactobacillus brevis* R2 Δ by HRGC/MS using stable isotope dilution assay [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(9-10): 2433-2444.
- [11] 郑璇. 副干酪乳杆菌CFS抗真菌活性应用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2023.
- [12] 杨玉增, 颜国华, 胡晓悦, 等. 环二肽的生物学活性及在畜禽养殖领域的应用前景[J]. 北方牧业, 2022, 4: 20.
- [13] 刘园秋. 胶原蛋白水解物促进益生菌增殖及其益生特性研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2023.
- [14] DING T, LI Y. Beneficial effect and mechanism of walnut oligopeptide on *Lactobacillus plantarum* Z7 [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(2): 672-681.
- [15] ZHANG C, XIA S, ZHANG Y, et al. Identification of soybean peptides and their effect on the growth and metabolism of *Limosilactobacillus reuteri* LR08 [J]. Food Chemistry, 2022, 369: 130923.
- [16] 任静, 孙波, 赵晓, 等. 蛋清肽的制备及其对保加利亚乳杆菌促生长的作用[J]. 食品科学, 2014, 35(7): 170-175.
- [17] LLHEM S, IMENE Z E, EMNA T, et al. Isolation, characterization and chemical synthesis of large spectrum antimicrobial cyclic dipeptide (l-leu-l-pro) from *Streptomyces misionensis* V16R3Y1 bacteria extracts. A Novel (1) H NMR metabolomic approach [J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9(5): 270.
- [18] 罗成莹, 何秀, 徐美余, 等. 五株乳酸菌和三株芽孢杆菌的生物学特性和功能[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 172-88.
- [19] 韦珏, 刘金凤, 覃绍敏, 等. 发酵酸鱼中乳酸菌的鉴定及特性分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(3): 95-100.
- [20] 陈杜岚, 陈倩茹, 孙滔, 等. 耐受微酸性次氯酸水乳酸菌的分离鉴定、耐受特性及益生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4544-4556.
- [21] 杨莲, 彭芍丹, 马俊杰, 等. 干酪乳杆菌LK-1的发酵特性及其在菠萝果汁中的应用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 199-207.
- [22] MIN-KYU K, RUI L, SA-OUK K. Antimicrobial activity of cyclic dipeptides produced by *Lactobacillus plantarum* LBP-K10 against multidrug-resistant bacteria, pathogenic fungi, and influenza A virus [J]. Food Control, 2018, 85: 223-234.
- [23] 张蓓蓓. 谷物蛋白肽对嗜酸乳杆菌的促生长作用及其抗氧化活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2016.
- [24] KVETOSLAVA R, DANA U. Potential of *Lactobacillus plantarum* ccm 3627 and *Lactobacillus brevis* ccm 1815 for fermentation of cereal substrates [J]. Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences, 2017, 11(1): 544-549.
- [25] L M, J. R P, D J H. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals [J].

- Animal Feed Science and Technology, 2003, 108(1-4): 95-117.
- [26] 郑华杰,王青云,王新,等.乳酸菌增菌物质的研究进展[J].乳业科学与技术,2020,43(6):46-50.
- [27] SUN S J, LIU Y C, WENG C H, et al. Cyclic dipeptides mediating quorum sensing and their biological effects in *hypsizyguis marmoreus* [J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 298.
- [28] CHINTAN K, RINKAL K, SUSHEEL S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits quorum-sensing mechanisms of soft rot pathogen *Lelliottia amnigena* RCE to regulate its virulence factors and biofilm formation [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 977669.
- [29] 励建荣,国竞文,李婷婷.细菌共培养及其系统中群体感应现象的研究进展[J].食品工业科技,2016,37(23):377-382.
- [30] 李婷婷,崔方超,马艳,等.不同培养条件下大菱鲆温和气单胞菌群体感应AHLs产生规律及影响因素[J].中国食品学报,2018,18(11):191-197.
- [31] 胡秀玲,熊利洋,魏云林.革兰氏阳性菌群体感应系统研究进展[J].中国生物工程杂志,2023,43(Z1):165-73.
- [32] QIAN Y, LI Y, XU T, et al. Dissecting of the AI-2/LuxS mediated growth characteristics and bacteriostatic ability of *Lactiplantibacillus plantarum* SS-128 by integration of transcriptomics and metabolomics [J]. Foods, 2022, 11(5): 638.
- [33] E J J, MA R Z, CHAN Z C, et al. Improving the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 by increasing biofilm formation based on adjusting the composition of buffer salts in medium [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 128134.
- [34] GU Y, WU J, TIAN J, et al. Effects of exogenous synthetic autoinducer-2 on physiological behaviors and proteome of lactic acid bacteria [J]. ACS Omega, 2020, 5(3): 1326-1335.