

## 基于非靶向代谢组学技术筛选植物乳植杆菌 P9 抑黄曲霉物质

陈佳敏, 张文羿, 孟和毕力格\*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室 呼和浩特 010018)

**摘要** 为解析共培养下植物乳植杆菌 P9 代谢产生的抑黄曲霉物质,本研究将植物乳植杆菌 P9 与黄曲霉进行共培养处理,分析植物乳植杆菌 P9 单菌及共培养中活菌数的差异,依据活菌数差异,分别在共培养 9 h 和 13 h 取样,进行非靶向代谢组学分析,并对取样点的差异代谢物及其通路富集情况进行研究。结果显示:共培养下植物乳植杆菌 P9 可以显著抑制黄曲霉,共培养产生的差异代谢物主要集中在能量代谢途径,包括:糖酵解/糖异生途径,柠檬酸循环,丙酮酸代谢途径,氨基酸代谢途径,叶酸生物合成途径及有机酸代谢途径。与已报道的植物乳植杆菌产生的抑菌物质进行比对,鉴定到的差异代谢物中可能对黄曲霉起拮抗作用的物质主要为 2-氨基-3-羟基丁酸、十六烷酸、2,3-二羟基苯甲酸等有机酸,以及杆菌肽等氨基酸类物质,本研究为深入探寻植物乳植杆菌抑黄曲霉物质提供参考。

**关键词** 植物乳植杆菌 P9; 黄曲霉; 液体共培养; 非靶向代谢组学; 代谢差异

**文章编号** 1009-7848(2023)05-0087-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.010

黄曲霉菌可侵染面包<sup>[1]</sup>、奶酪、干肉制品<sup>[2]</sup>等多种食物,而伴随产生的黄曲霉毒素是天然致癌化合物之一<sup>[3]</sup>。为防止黄曲霉污染,研究人员进行了大量研究,研究方向主要集中在利用微生物的次级代谢产物进行生物控制。植物乳植杆菌因益生特性及产生一系列抗菌代谢产物的能力而备受关注,研究发现从发酵橄榄中分离出的植物乳植杆菌可以抑制黄曲霉的生长,并能使橄榄中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 解毒(降解)<sup>[4]</sup>。来自发酵谷物<sup>[5]</sup>及泡菜<sup>[6]</sup>的植物乳植杆菌菌株可完全抑制黄曲霉的生长。为寻找抑制黄曲霉的关键物质,研究人员对植物乳植杆菌无细胞上清液进行了大量研究,鉴定到多种抗真菌代谢物,包括苯甲酸<sup>[7]</sup>、3-羟基-5-十二烯酸<sup>[8]</sup>、5-氧代癸酸<sup>[9]</sup>、十五烷酸<sup>[10]</sup>等。

目前研究集中在植物乳植杆菌单菌培养的发酵上清液上,很少有关于植物乳植杆菌与黄曲霉共培养代谢方面的研究。有关细菌与有害真菌共培养的文章指出,共同培养会改变菌株代谢,同时对真菌有较好的抑菌效果,如:Benoit 等<sup>[11]</sup>将枯草芽孢杆菌与黑曲霉在液体培养基中进行共培养,发现枯草芽孢杆菌和黑曲霉代谢均发生改变。

Strom 等<sup>[12]</sup>将植物乳植杆菌和构巢曲霉共同培养后构巢曲霉菌丝干重降至对照组的 36%。为了解析在共培养中植物乳植杆菌代谢的差异,以及这种差异对黄曲霉的抑制作用,本试验对具有较好抑菌能力的植物乳植杆菌 P9 与黄曲霉进行共培养处理。

植物乳植杆菌 P9 是分离自内蒙古巴彦淖尔酸粥的 1 株益生菌,具有较高的农药降解活性<sup>[13]</sup>,拮抗食源性致病菌和抑制农业致病霉菌活性<sup>[14]</sup>。作者初步试验发现,植物乳植杆菌 P9 对黄曲霉也具有良好的抑制活性。为了探讨共培养下植物乳植杆菌 P9 代谢产生的抑黄曲霉物质,分别采集植物乳植杆菌 P9 单菌培养及与黄曲霉共培养的无细胞上清液。依据在不同培养条件下植物乳植杆菌 P9 活菌数差异,分别在相互作用的初始阶段和剧烈阶段取样<sup>[11]</sup>。采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱技术研究样本间的差异代谢物,并对显著差异代谢物进行通路富集及抑菌性分析,从代谢角度分析植物乳植杆菌与黄曲霉的相互作用,为探究植物乳植杆菌抑黄曲霉物质提供依据,同时为植物乳植杆菌 P9 在农业上的广泛应用提供技术支持。

收稿日期: 2022-05-22

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31660450)

第一作者: 陈佳敏,女,硕士

通信作者: 孟和毕力格 E-mail: mhblg@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

试验菌株植物乳植杆菌 P9 由“乳品生物技术

与工程”教育部重点实验室乳酸菌菌种资源库提供。黄曲霉由中国工业微生物菌种保藏管理中心购买,菌株编号为 CICC2219。

## 1.2 主要试剂与仪器

甲酸(色谱纯级)、乙腈(色谱纯级)、氨水(色谱纯级),Sigma 公司。MRS 培养基、PDA 培养基,广东环凯微生物科技有限公司,PBS 缓冲液,天津市大茂化学试剂厂。

ACQUITY UPLC-Xevo G2 QTOF MS 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪,Waters 公司;旋转蒸发氮气发生器,Peak 公司;Milli-Q 纯水仪,Millipore 公司;电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;高速控温离心机,Eppendorf 公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 植物乳植杆菌 P9 菌株活化及活菌数检测

将保藏菌株接种于已灭菌的 5 mL MRS 液体培养基中,37 °C 恒温培养 24 h,接着在 MRS 液体培养基中 37 °C,12 h 连续传代 2 次,使其恢复菌株活力。将活化好的菌株用无菌 PBS 缓冲液进行倍比稀释,采用 MRS 固体培养基平板倾注法对植物乳植杆菌 P9 进行活菌数检测。

1.3.2 黄曲霉 CICC2219 孢子的制备及孢子数检测 用接种环从斜面上挑取孢子在已备好的 PDA 斜面上划线,30 °C 恒温培养 72 h,用已灭菌的 PBS 缓冲液冲洗孢子并收集于已灭菌的试管中。倍比稀释后,采用 PDA 固体培养基平板倾注法对黄曲霉孢子进行计数。

### 1.3.3 植物乳植杆菌 P9 抑制黄曲霉活性测定

采用双层平板点接法(Double layer method)测定植物乳植杆菌 P9 抑制黄曲霉活性。在直径约为 90 mm 的培养皿中,倾注已灭菌的融化 MRS,制成 MRS 固体培养基,待水气消失后,使用微量移液器将 5  $\mu$ L 已恢复菌株活力的植物乳植杆菌 P9 菌液点接于固体培养基上,37 °C 培养 24 h 至圆形菌斑形成。将 0.15 mL 黄曲霉孢子悬液与 15 mL 熔化的 PDA 培养基充分混合后倾注在 MRS 培养基上,30 °C 培养 3 d,观察抑菌效果<sup>[15]</sup>。

1.3.4 植物乳植杆菌 P9 与黄曲霉孢子共培养 将黄曲霉 CICC2219 孢子按  $1 \times 10^4$  孢子/mL 接种在 MRS 液体培养基中 37 °C,200 r/min 预培养 12 h 后,接种植物乳植杆菌 P9 进行共培养记为试验组,接

种量为  $5 \times 10^6$  CFU/mL。将仅培养植物乳植杆菌 P9 和黄曲霉的处理分别作为阳性对照与阴性对照。共培养过程中取样,测定植物乳植杆菌单菌及共培养处理中植物乳植杆菌 P9 的活菌数。依据活菌数差异在相互作用的初始阶段和剧烈阶段取样。

## 1.4 UPLC-QTOF MS 分析

取 1.3.4 节采集的无细胞上清液与乙腈按体积比 1:1 的比例混合均匀,4 °C 静置 20 min 后,振荡 15 s,室温  $10\,000 \times g$  离心 15 min,取上清液使用 0.22  $\mu$ m 有机滤膜过滤后作为待测样本。从所有样品瓶中分别吸取 40  $\mu$ L 至同一样品瓶中混匀,作为质量检测样本(Quality control, QC),具体分析条件如下:

色谱柱选用 Waters BEH C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7  $\mu$ m),进样体积为 5  $\mu$ L,流速 0.32 mL/min。正离子模式下流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1%甲酸乙腈溶液。负离子模式下,流动相 A 为 0.1%的氨水水溶液,流动相 B 为纯乙腈溶液。采用梯度洗脱,正负离子模式下洗脱时间均为 15 min。洗脱梯度为:0~3 min,98% A;3~9.5 min,90% A;9.5~11 min,30% A;11~13 min,10% A;13~14 min,50% A;14~15 min,98% A。

质谱条件:离子源为 ESI 电喷雾电离,数据采集模式为正、负离子模式(ES+/-),质荷比扫描范围 50~1 000  $m/z$ 。毛细管电压为 3.0 kV(+/-),去溶剂气温度 450 °C,去溶剂气(氮气)流量 600 L/h。

## 1.5 数据采集与分析

采用 MassLynx 工作站对获得的原始数据进行采集,采集后由 Progenesis QI 软件完成峰提取,峰对齐、保留时间校正等处理,导出数据矩阵.csv 文件。处理过程使用默认优化的参数。

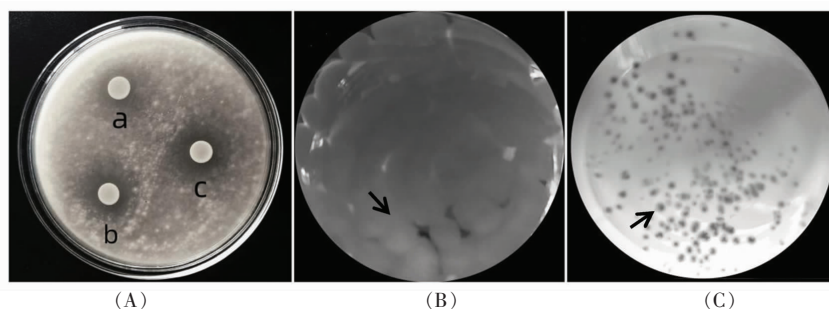
将数据矩阵导入 MetaboAnalyst 5.0(<http://www.metaboanalyst.ca>)<sup>[16]</sup>,进行统计分析与通路分析。结合 OPLS-DA 的变量投影重要性(Variable importance in the projection, VIP) $\geq 1$ 、两组间差异倍数 $\geq 2$ 和  $P \leq 0.05$  相结合的方法找出两组样品中显著差异性代谢物。将标准化后的数据导入 Simca 14.1 软件,进行主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 植物乳植杆菌 P9 抑制黄曲霉活性

如图 1 所示,植物乳植杆菌 P9 能够显著抑制

黄曲霉。同时,对试验组中黄曲霉孢子形态进行观察,发现植物乳植杆菌 P9 抑制黄曲霉孢子正常生长。



注:A为双层平板点接法抑菌圈图,其中a表示植物乳植杆菌P9活菌数为 $1 \times 10^3$  CFU/mL抑菌情况、b表示植物乳植杆菌P9活菌数为 $1 \times 10^5$  CFU/mL抑菌情况、c表示活菌数为 $1 \times 10^6$  CFU/mL抑菌圈图;B、C为阴性对照组及试验组中黄曲霉孢子生长情况图,箭头所指均为黄曲霉孢子。

图 1 植物乳植杆菌 P9 抑制黄曲霉图

Fig.1 Effect of *Lactiplantibacillus plantarum* P9 inhibiting *Aspergillus flavus* growth

### 2.2 植物乳植杆菌 P9 纯培养与和黄曲霉共培养的活菌数对比

为更深入了解植物乳植杆菌 P9 与黄曲霉的相互作用,对试验组和阳性对照组中的植物乳植杆菌 P9 进行活菌计数,结果显示(图 2)培养 9~10 h 时,与阳性对照组相比试验组中的植物乳植杆菌 P9 菌株生长较慢,为相互作用的最早阶段;培养 13~14 h,共培养中植物乳植杆菌 P9 活菌数快速增长,为相互作用剧烈阶段,分别在这两个时间点取样进行代谢组相关分析。

### 2.3 代谢组学结果与分析

2.3.1 主成分分析 为分析黄曲霉存在与否对植物乳植杆菌 P9 代谢物的影响,对代谢组数据进行 PCA 分析,得到 2 组样本在正、负离子模式下的聚集情况,结果如图 3 所示。由图可知,2 组样本中试验组与对照组发酵上清液差异明显,可以显著区分,且组内距离较小,结果重复性较好。

2.3.2 发酵上清液的正交偏最小二乘判别法分析(OPLS-DA) 对发酵上清液的代谢产物进行 OPLS-DA 分析。在 OPLS-DA 得分图中,横坐标表示正交信号校正(Orthogonal signal correction, OSC)过程中主要成分的得分值( $T_p$ ),从横坐标的方向可以看到组间样本的差异;纵坐标表示 OSC 过程中正交成分的得分值( $T_O$ ),从纵坐标上看出

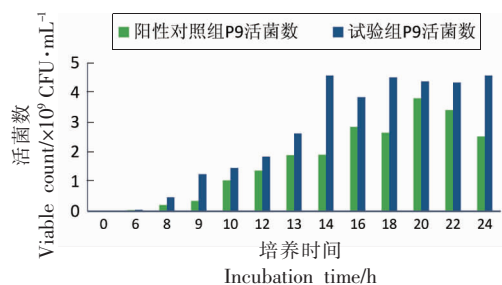
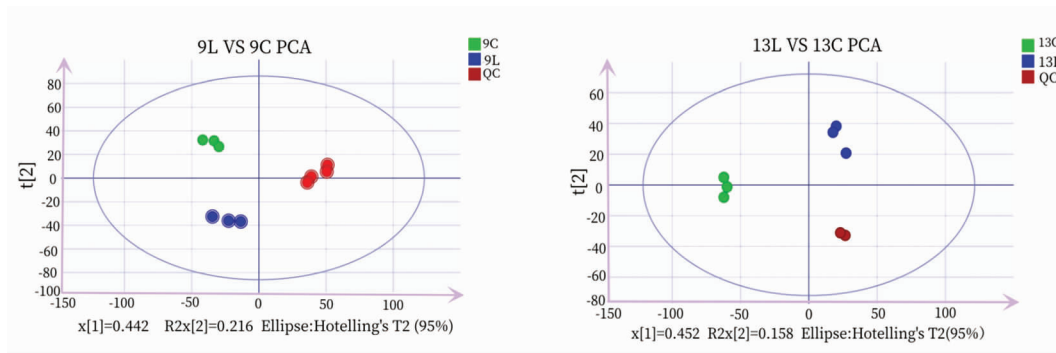


图 2 试验组与阳性对照组中植物乳植杆菌 P9 活菌数对照

Fig.2 Comparison of the viable count of *Lactiplantibacillus plantarum* P9 between the experimental and the positive control group

组内样本间的差异<sup>[17]</sup>。由图 4 可知,在 ESI-和 ESI+模式下两组样品均能明显分离,表明 2 个样本组的代谢物发生明显改变,其中 ESI+模式下 2 组样品组间差异较大。

2.3.3 差异代谢物分析及通路富集情况 对 2 组样本的代谢数据进行分析,将符合  $FDR < 0.05$  且  $FC \geq 2$  的变量筛选为显著差异代谢物,结果如图 5 所示。在相互作用的最早阶段,正离子模式下共检测到 3 376 个代谢物,其中 40 个差异代谢物显著上调,82 个显著下调;负离子模式下共检测到 313 个代谢物,其中 5 个差异代谢物显著上调,7 个显



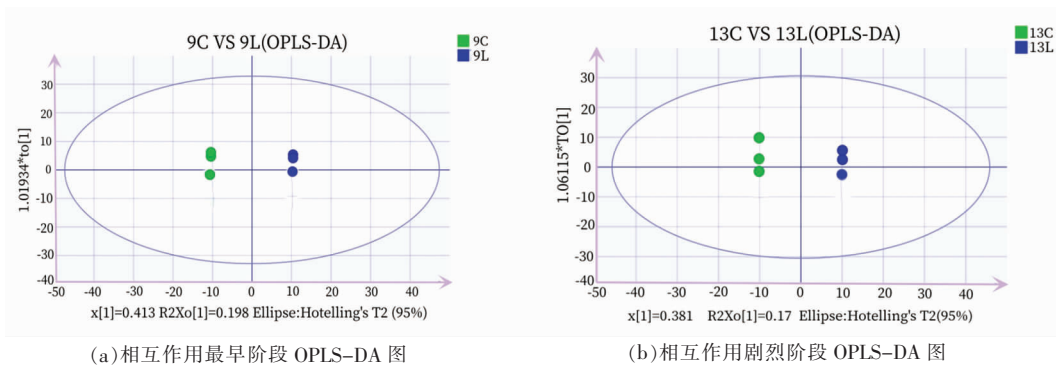
(a) 相互作用最早阶段的主成分分析图

(b) 相互作用剧烈阶段下的主成分分析图

注:9C表示培养9~10 h 试验组代谢组数据的PCA散点,9L表示培养9~10 h 对照组代谢组数据的PCA散点,QC表示混合相同体积的所有待检测样本的主成分分析图的PCA散点,13C表示培养13~14 h 试验组代谢组数据的PCA散点,13L表示培养13~14 h 对照组代谢组数据的PCA散点。

图3 两组样本发酵上清液主成分分析图(PCA)

Fig.3 Principal component analysis diagram (PCA) of fermentation supernatant of the two groups of samples



(a) 相互作用最早阶段 OPLS-DA 图

(b) 相互作用剧烈阶段 OPLS-DA 图

注:9C表示培养9~10 h 试验组代谢产物的OPLS-DA得分散点,9L表示培养9~10 h 对照组代谢产物的OPLS-DA得分散点,13C表示培养13~14 h 试验组代谢产物的OPLS-DA得分散点,13L表示培养13~14 h 对照组代谢产物的OPLS-DA得分散点。

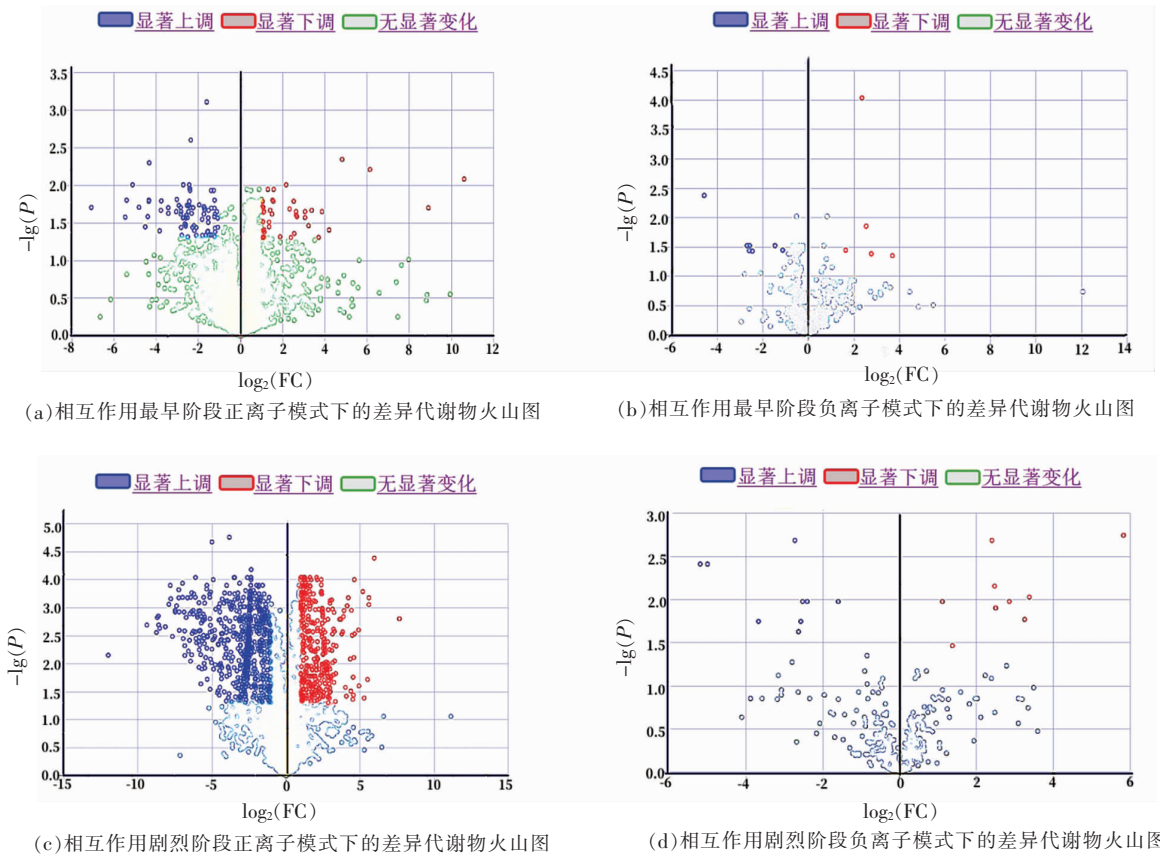
图4 2组样本发酵上清液 OPLS-DA 得分图

Fig.4 The OPLS-DA scores of the fermentation supernatants of the two groups of samples

著下调。在相互作用的剧烈阶段,正离子模式下共检测到3 420个代谢物,其中353个差异代谢物显著上调,691个差异代谢物显著下调,表明黄曲霉存在使植物乳植杆菌P9代谢物发生巨大改变。

同时使用Mummichog对显著差异代谢物进行通路富集分析,得到图6富集情况。通过富集结果可知,在植物乳植杆菌P9与黄曲霉相互作用最早阶段,差异代谢物主要富集在糖酵解/糖异生途径,花生四烯酸代谢途径,氨基酸代谢及合成过程;主要包括甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸,牛磺酸和亚牛磺酸代谢,叶酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和赖氨酸的生物合成途径;在相互作用剧烈阶段,差

异代谢物聚集途径较多,主要富集能量代谢途径,包括:糖酵解/糖异生途径,柠檬酸循环(TCA循环)途径,丙酮酸代谢途径;多种氨基酸代谢及合成过程:包括叶酸生物合成途径,丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸等代谢途径,缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸降解途径;以及乙醛酸和二羧酸代谢途径,丙酸、丁酸代谢途径。将筛选得到的物质结合已报道乳酸菌产生的抑菌物质对差异代谢物进行指认,共鉴定到20种(表1)可能与抑制黄曲霉活性相关的物质,主要为有机酸,氨基酸及其衍生物。



注:红色圆圈代表显著上调的差异代谢物,蓝色代表显著下调的差异代谢物。

图 5 发酵上清液差异代谢物火山图

Fig.5 Differential metabolite volcano plot of fermentation supernatant

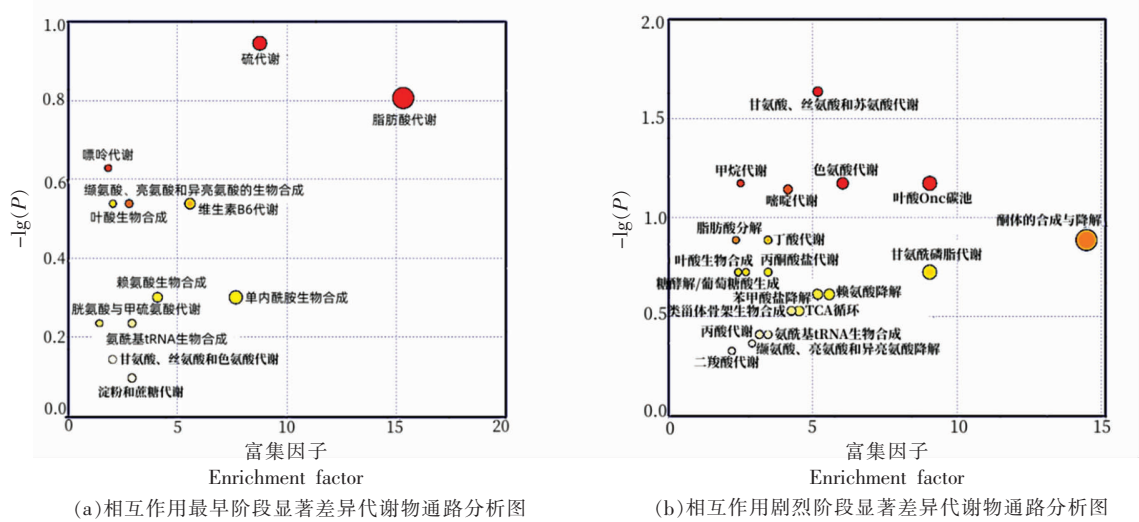


图 6 两组样本显著差异代谢物通路富集分析

Fig.6 Metabolite pathway enrichment analysis of significant differences between the two groups of samples

表1 植物乳植杆菌 P9 与黄曲霉共培养差异代谢物

Table 1 Differential metabolites of *Lactiplantibacillus plantarum* P9 co-cultured with *A. flavus*

编号	质核比	保留时间/min	KEGG 编号	英文名	化合物名称
1	134.05	0.92	C00188	2-Amino-3-hydroxybutyric acid	2-氨基-3-羟基丁酸
2	96.96	0.68	C00094	Sulfurous acid	亚硫酸
3	163.04	0.85	C00166	Phenylpyruvate	苯丙酮酸
4	255.23	14.22	C00249	Hexadecanoic acid	十六烷酸
5	259.13	0.95	C00864	Pantothenic acid	泛酸
6	173.04	0.82	C05984	2-Hydroxybutanoic acid	2-羟基丁酸
7	149.02	11.82	C00026	Oxoglutaric acid	酮戊二酸
8	199.11	0.81	C20942	Bacilysin	杆菌肽
9	132.03	0.73	C00049	L-Aspartate	L-天冬氨酸
10	122.99	11.55	C05823	3-Mercaptolactate	3-巯基乳酸
11	194.93	0.68	C00122	Fumaric acid; trans-Butenedioic acid	反式丁烯二酸
12	164.07	1.52	C02265	D-Phenylalanine	D-苯丙氨酸
13	163.04	0.72	C00166	Phenylpyruvate	苯丙酮酸
14	118.09	0.81	C00183	2-Amino-3-methylbutyric acid	2-氨基-3-甲基丁酸
15	374.16	4.81	C00101	Tetrahydrofolate	四氢叶酸
16	127.04	0.84	C00196	2,3-Dihydroxybenzoic acid	2,3-二羟基苯甲酸
17	157.01	12.05	C00158	Citrate	柠檬酸
18	133.09	5.9	C02656	Pimelate	庚二酸
19	129.06	11.04	C00671	(S)-3-Methyl-2-oxopentanoic acid	(S)-3-甲基-2-氧代戊酸
20	129.02	0.91	C00026	2-Oxoglutarate	2-氧戊二酸

2.3.4 代谢组结果分析与讨论 糖酵解途径和 TCA 循环为机体活动提供大量能量,是机体利用糖或其它物质氧化而获得能量的最有效方式<sup>[18]</sup>。在植物乳植杆菌 P9 与黄曲霉相互作用阶段,糖酵解/糖异生作用及 TCA 循环途径差异显著,可能是植物乳植杆菌与黄曲霉相互拮抗,相互竞争营养和空间促使代谢增强的原因。

差异代谢物多富集在氨基酸代谢途径,在共培养中糖酵解产生丙酮酸,丙酮酸继续分解产生缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸等氨基酸。天冬氨酸是联系糖代谢和氨基酸代谢的桥梁,其作为天冬氨酸族生物合成的原料,可以促进天冬氨酸向蛋氨酸、苏氨酸、赖氨酸的转化<sup>[19]</sup>。代谢产生的氨基酸既可以转化为常见的代谢中间体,如丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸等,还可以作为代谢产生能量的底物燃料<sup>[18]</sup>,不断为微生物的生命活动提供能量。泛酸即维生素 B<sub>5</sub>,其生物合成途径为抗真菌治疗的靶点<sup>[20]</sup>,因此推测泛酸的生物合成有助于植物乳植杆菌 P9

抑制黄曲霉。叶酸(Folic acid)是生物体内一种重要的维生素,与 DNA、RNA 及蛋白质的合成密切相关,同时在机体内代谢过程发挥重要作用<sup>[21]</sup>,而相互作用过程中叶酸生物合成途径显著差异表达,表明在共培养过程中细胞合成加快且代谢变化显著。

在筛选出的显著差异代谢物中以酸性物质为主,其中十六烷酸、2-羟基丁酸、2-氨基-3-甲基丁酸、2-氨基-3-羟基丁酸、2,3-二羟基苯甲酸,与目前已报道的乳酸菌产生的具有抑菌活性物质 2-羟基-3-甲基丁酸、十六烷酸、苯甲酸<sup>[9-10]</sup>等物质结构一致或类似,这些物质可能对抑制黄曲霉起重要作用。有研究发现花生四烯酸可在白色念珠菌感染期间掺入酵母磷脂中,影响酵母细胞膜的饱和度和流动性,从而达到抑制效果<sup>[22]</sup>。因此,推测花生四烯酸有助于植物乳植杆菌 P9 抑制黄曲霉。

上清液中检测到的亚硫酸为 SO<sub>2</sub> 溶于水形成,目前有关 SO<sub>2</sub> 抑制黄曲霉的相关报道甚少,可

能其通过营造酸性环境来辅助抑菌。有机酸乙酸、乳酸、丁酸对真菌有抑制作用已被多次证实<sup>[23-24]</sup>, 在上清液中鉴定到的 3-巯基乳酸、5-氨基戊酸、(S)-3-甲基-2-氧代戊酸可能与抑菌相关, 其作用需要进一步证实。杆菌肽的抑菌作用已被多次报道, 研究发现植物乳植杆菌 LR/14 产生的抗菌肽 (amps-lr14) 对黑曲霉等腐败真菌有抑菌作用, 且能抑制孢子萌发和菌丝生长<sup>[25]</sup>, Muhialdin 等<sup>[26]</sup>从印尼豆豉中分离的植物乳植杆菌 IS10 产生的多肽对黄曲霉有良好的抑菌活性, 因此在拮抗过程中杆菌肽可能起关键作用。

### 3 结论

植物乳植杆菌 P9 可显著抑制黄曲霉生长, 其与黄曲霉液体共培养产生的差异代谢物主要集中在能量代谢途径, 包括: 糖酵解/糖异生途径, 柠檬酸循环(TCA 循环), 丙酮酸代谢途径; 多种氨基酸代谢途径, 主要包括: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸等代谢途径及叶酸生物合成途径; 花生四烯酸、丙酸、丁酸等有机酸代谢途径。通过与已报道的乳酸菌产生的抑菌物质比较, 鉴定到可能与抑制黄曲霉活性相关的物质主要为 2-氨基-3-羟基丁酸、十六烷酸、2, 3-二羟基苯甲酸等有机酸, 及杆菌肽等氨基酸类物质。

### 参 考 文 献

- [1] PASQUAL R, CLARA F, ANGELE L, et al. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity as a protective starter culture for bread production[J]. *Foods* (Basel, Switzerland), 2017, 6(12): 110.
- [2] PEROMINGO B, ANDRADE M J, DELGADO J, et al. Biocontrol of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* by native *Debaryomyces hansenii* in dry-cured meat products[J]. *Food Microbiology*, 2019, 82: 269-276.
- [3] RUDRAMURTHY S M, PAUL R A, CHAKRABERTI A, et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management[J]. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 2019, 5(3): 55.
- [4] KACHOURI F, KSONTINI H, HAMDY M. Removal of aflatoxin B<sub>1</sub> and inhibition of *Aspergillus flavus* growth by the use of *Lactobacillus plantarum* on olives[J]. *Journal of Food Protection*, 2014, 77(10): 1760-1767.
- [5] OLONISAKIN O, ADEFUNKE Y, OLUSOLA C, et al. Isolation of antifungal lactic acid bacteria (LAB) from 'Kunu' against toxigenic *Aspergillus flavus* [J]. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2017, 22(2): 138-143.
- [6] ZHAO Y J, ZHANG C X, FOLLY Y M E, et al. Morphological and transcriptomic analysis of the inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production[J]. *Toxins*, 2019, 11(11): 636.
- [7] QUATTRINI M, BERNARDI C, STUKNYTE M, et al. Functional characterization of *Lactobacillus plantarum* ITEM 17215: A potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products[J]. *Food Research International*, 2018, 106: 936-944.
- [8] SYM A, SKK A, ERW B, et al. Purification and characterization of an antimicrobial compound produced by *Lactobacillus plantarum* EM showing both antifungal and antibacterial activities[J]. *LWT - Food Science & Technology*, 2019, 114: 108403.
- [9] RYU E H, YANG E J, WOO E R, et al. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi[J]. *Food Microbiology*, 2014, 41: 19-26.
- [10] BUKHARI S A, SALMAN M, NUMANB M, et al. Characterization of antifungal metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* isolated from rice rinsed water[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(3): 1871-1881.
- [11] BENOIT I, ESKER M H, PATYSHAKULIYEVA A, et al. *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism [J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(6): 2099-2113.
- [12] STROM K, SCHNURER J, MELIN P. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 246(1): 119-124.
- [13] LI C K, MA Y Z, MI Z H, et al. Screening for

- Lactobacillus plantarum* strains that possess organophosphorus pesticide-degrading activity and metabolomic analysis of phorate degradation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2048.
- [14] 张和平, 陈永福, 李常坤. 一种具有农药降解活性的植物乳植杆菌、其制备方法及应用: CN201910800400.3[P]. 2019-10-25[2021-11-22]. ZHANG H P, CHEN Y F, LI C K. *Lactiplantibacillus plantarum* with pesticide degradation activity, preparation method and application: CN201910800400.3[P]. 2019-10-25[2021-11-22].
- [15] 李康宁. 植物乳杆菌抑制真菌特性及其比较基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020. LI K N. Studies on antifungal properties and comparative genomics of *Lactobacillus plantarum*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [16] PANG Z Q, CHONG J, ZHOU G Y, et al. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights[J]. *Research*, 2021, 49(W1): W388-W396.
- [17] 陈荣锋. 食用菌中烟碱类化合物含量及其它代谢物的研究[D]. 漳州: 闽南师范大学, 2020. CHEN R F. Study on the variation of nicotine compounds metabolism in edible fungi by based on mass spectrometry analysis[D]. Zhangzhou: Minnan Normal University, 2020.
- [18] 赵圣明. 植物乳杆菌素 JLA-9 的鉴定及其对芽孢杆菌抑菌机制的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016. ZHAO S M. Study on identification of plantaricin JLA -9 and its antibacterial mechanism against *Bacillus*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.
- [19] 徐婷婷. 皮寒药对金黄色葡萄球菌的抑制作用及其抑菌机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017. XU T T. Antibacterial effects and mechanism of a traditional Chinese herb drug *Gueldenstaedtia delavayi* franch on *Staphylococcus aureus*[D]. Chongqing: Southwest University, 2017.
- [20] MEIR Z, OSHEROV N. Vitamin biosynthesis as an antifungal target[J]. *Journal of Fungi*, 2018, 4(2): 72.
- [21] 赵宏飞. 产叶酸乳酸菌的筛选及生物学特性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009. ZHAO H F. Screening of lactic acid bacteria producing folic acid and study on its biological characteristics[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2009.
- [22] RUAN E J, WYK P V, BOTES P J, et al. Arachidonic acid increases antifungal susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 63(1): 124-128.
- [23] LGA B, MP A, AT B, et al. Antifungal activity of fermented dairy ingredients: Identification of antifungal compounds[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 322: 108574.
- [24] LI S H, LIU C, REN B, et al. Comparison of antibacterial activity and major organic acids in fermentation broths of different *Lactobacillus plantarum* strains[J]. *Food Science*, 2020, 322: 108574.
- [25] GUPTA R, SRIVASTAVA S J. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage[J]. *Food Microbiology*, 2014, 42: 1-7.
- [26] MUHIALDIN B J, HASSAN Z, BAKAR F A, et al. Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth[J]. *Food Control*, 2016, 59: 27-30.

### Analysis of the Inhibitory Effect of *Lactiplantibacillus plantarum* P9 on *Aspergillus flavus* Using Non-targeted Metabonomics

Chen Jiamin, Zhang Wenyi, Menghe Bilige\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

**Abstract** To analyze the inhibitory effect of *Aspergillus flavus* on the metabolism of *Lactiplantibacillus plantarum* P9 under co cultivation, this study co cultured *L. plantarum* P9 with *A. flavus*. The differences in viable counts between *L.*



*plantarum* P9 monoculture and co-culture were analyzed, and based on the differences in viable counts, samples were taken at 9 h and 13 h of co-culture for non-targeted metabolomic analysis, and the enrichment of differential metabolites and their pathways at the sampling sites were investigated. The results showed that *L. plantarum* P9 could significantly inhibit *A. flavus*, and the differential metabolites produced by co-culture were mainly in the energy metabolism pathway, including: glycolysis/gluconeogenesis pathway, citric acid cycle, pyruvate metabolism pathway, amino acid metabolism pathway, folate biosynthesis pathway and organic acid metabolism pathway. In comparison with the reported inhibition substances produced by *L. plantarum*, the identified differential metabolites that may play an antagonistic role against *A. flavus* are mainly organic acids such as 2-amino-3-hydroxybutyric acid, hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid, and amino acid substances such as bacillus peptides, and this study provides a reference for further research on the inhibition substances of *A. flavus* by *L. plantarum*.

**Keywords** *Lactiplantibacillus plantarum* P9; *Aspergillus flavus*; liquid co-culture; non-targeted metabolomics; metabolic differences