

## 产叶酸菌株的筛选及产量的优化

季亚栋<sup>1</sup>, 李先平<sup>2</sup>, 乔为仓<sup>2</sup>, 王琦<sup>1</sup>, 刘璐<sup>2</sup>, 赵军英<sup>2,3</sup>, 张春枝<sup>1\*</sup>, 陈历俊<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>大连工业大学生物工程学院 辽宁大连 116000

<sup>2</sup>北京三元食品股份有限公司 国家母婴乳品健康工程技术研究中心 北京市乳品工程技术研究中心  
母乳研究技术创新中心 北京 100163

<sup>3</sup>桂林理工大学 国家母婴乳品健康工程技术研究中心南亚分中心 广西桂林 541006)

**摘要** 本研究分别从母乳、婴儿粪便、乳制品和酸肉中筛选叶酸生产菌株,并通过培养基优化、代谢途径研究等方法提高叶酸的产量。结果表明,在 39 株产叶酸菌株中得到 4 株高产菌株,分别为鼠李糖乳杆菌 B2-14(39.56 ng/mL)、双歧杆菌 D020(32.56 ng/mL)、罗伊氏乳杆菌 B1-28(60.72 ng/mL)、格式乳杆菌 F020(61.22 ng/mL)。通过优化培养基条件,叶酸产量可提高 50%~70%。在经过条件优化的牛乳培养基中培养,叶酸产量可提高 6~10 倍。其中,菌株 B1-28 在牛乳培养基培养后产量达 910 ng/mL。分析产叶酸路径的一些指标及相关代谢基因,探究叶酸合成途径指标的变化及其机理,从而研制出有利于人群叶酸摄入的乳制品。

**关键词** 叶酸; 菌株筛选; 牛乳; 培养基优化; 罗伊氏乳杆菌

**文章编号** 1009-7848(2024)05-0202-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.016

叶酸(Folate, FA)是一种水溶性维生素,也称为蝶酰单谷氨酸(Pteroylmonoglutamate, PteGlu)。它由喋啶、对氨基苯甲酸和 L-谷氨酸组成。其分为人工合成的食品 FA 和天然食品 FA(Poly-谷氨酸盐,图 1 所示)。FA 具有蝶形核心结构和高代谢活性,这是因为它能够接受电子并与 O-、S-、N-、C-键反应,在向胆碱磷脂、肌酸、肾上腺素、DNA 提供甲基的基本单碳途径中作为辅助因子发挥作用。FA 是人体必需的维生素,它参与基础细胞代谢,如 RNA、DNA 和蛋白质的生物合成过程<sup>[1-3]</sup>。含 FA 食物摄入过少、甲酰类药物的摄入、小肠上皮细胞吸收异常和机体炎症都会掩盖 FA 吸收,进而导致 DNA 甲基化异常,癌症、贫血和同型半胱氨酸血症等疾病的发生。严重的 FA 缺乏症,常常在生命早期表现出来,常见于遗传性 FA 吸收不良和脑 FA 缺乏症。获得性 FA 缺乏症很常见,与饮食不良和吸收不良、饮酒、肥胖和肾衰竭有关<sup>[4]</sup>。充足的 FA 摄入,可以确保人体的正常生长和发育,并

降低患慢性病的风险,利于国民的健康。在中国,与 FA 相关的出生缺陷仍是一个主要的公共卫生问题,受 FA 缺乏饮食导致的慢性病发病率也在上升<sup>[5-7]</sup>。特别是对于孕妇,围产期补充 FA,不仅可以治疗和预防妊娠相关的 FA 缺乏症,还可以纠正 FA 代谢异常和轻度 FA 缺乏症,从而预防可能出现的胎儿发育异常<sup>[8-10]</sup>。目前为止,大多数关于 FA 补充剂和出生缺陷风险的研究都集中在神经管缺陷(Neural tube defects, NTDs)和心脏疾病上。NTDs 中最常见、最严重的类型是无脑畸形和脊柱裂<sup>[11]</sup>。就全球而言,NTDs 的发病率差异较大,在美国近 1 000 个新生儿中患有 1 例,而在中国则每 1 000 个新生儿中近 14 例患有 NTDs<sup>[12]</sup>。因此,有必要通过外源补充 FA。

食物中的 FA 含量可以通过多种途径来提高,比如强化食品,在特定植物中添加 FA 类物质和强化发酵剂等途径<sup>[13]</sup>。FA 补充剂在怀孕期间被广泛认可,是因为它对神经管缺陷具有保护作用。然而,有研究显示高含量的化学合成 FA 会降低维生

收稿日期: 2023-05-26

基金项目: 广西科技计划项目(AD20297088);国家自然科学基金项目(32072191)

第一作者: 季亚栋,男,硕士生

通信作者: 张春枝 E-mail: zhangcz@dlpu.edu.cn

陈历俊 E-mail: chenlijun@sanyuan.com.cn

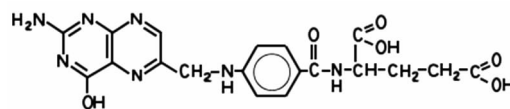


图 1 FA 结构式

Fig.1 Folate structure formula

素 B<sub>12</sub> 的临床效果、异常调节 Arg1-NOS3-AMPKa 通路进而导致后代的脂质代谢紊乱<sup>[14]</sup>,带来一些未知风险,甚至会引发癌症<sup>[15-16]</sup>。目前的研究将重点放在天然 FA 的生产以及通过基因编辑技术以提高 FA 的产量。一些研究表明乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)具有产活性 FA 的能力,如工业发酵菌乳酸乳球菌和乳杆菌,而乳杆菌具有更强的产活性 FA 的能力<sup>[17]</sup>。目前有文献称,生长因子、无机盐及生长环境,如温度、pH 值、前体及接种量等物理因素,均可对微生物的生长有一定的影响,使用不同的菌株、不同培养基成分和物理因素对细菌生长和活性 FA 合成均有显著影响<sup>[18]</sup>。本文通过单因素实验研究 pH 值、前体添加量、温度等对 FA 的影响,通过条件优化进一步提高 FA 产量。同时对活性 FA 代谢途径中的一些指标和代谢基因做初步的探索,为以后使用基因工程等手段提高活性 FA 产量提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

菌株由北京市志愿者提供的母乳、婴儿粪便、乳制品和酸肉中筛选得到;FACM 培养基,Difco 公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;细菌氨基酸脱氧分支酸合成酶检测试剂盒,上海双赢生物科技有限公司;对氨基苯甲酸、谷氨酸、溴甲酚紫、甲酸水等,美国 Sigma-Aldrich 公司;甲酸铵等,美国 ThermoFisher 公司。

### 1.2 仪器与设备

PCR 仪、高效液相色谱仪、超低温冷冻离心机、液相色谱质谱联用仪,美国 ThermoFisher 公司;紫外成像仪,美国 ProteinSimple 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 菌株初筛 收集志愿者样本并富集培养 1 d,梯度稀释后分别吸取 100  $\mu$ L 涂布于 MRS 固体培养基上,37  $^{\circ}$ C 培养 2 d<sup>[19]</sup>。通过平板观察法,随机选取具有典型乳酸菌菌落形态特征的单菌落,在 MRS 固体培养基上划线,37  $^{\circ}$ C 培养 2 d,重复该过程 2~3 次。将纯化后的菌株置于显微镜下观察,镜检完成之后将菌株接入 MRS 液体培养基,37  $^{\circ}$ C 培养 1 d。将培养后的菌株按 2% 的接种量添加到含有溴甲酚紫的 FA 酪蛋白(FACM)培养基上,37  $^{\circ}$ C

培养 2~3 d,通过观察培养基颜色变化来确定菌株是否产 FA<sup>[20]</sup>。然后将发生颜色变化且纯化好的菌株进行 DNA 提取,进行菌株鉴定和代谢基因分析。

1.3.2 复筛 选择 FACM 培养基中颜色发生变化的培养基,取 4 mL 菌液于 50 mL 塑料离心管内,调节 pH 值到 1.7,避光静置 2 min,再调节 pH 值到 4.7,避光放置 2 min 后用水定容至 10 mL,混匀,置于离心机内,4  $^{\circ}$ C 下 10 000 r/min 离心 20 min,上清液过 0.22  $\mu$ m 滤膜后上机分析,整个过程尽量避光,离心管用铝膜包裹。

超高效液相色谱条件:流动相 A 为 10 mmol 甲酸铵加 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈,色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm,1.8  $\mu$ m),柱温 30  $^{\circ}$ C,进样量 5  $\mu$ L。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源,扫描方式为正离子(ESI<sup>+</sup>)扫描,离子源温度:110  $^{\circ}$ C;脱溶剂温度:350  $^{\circ}$ C;脱溶剂气(N<sub>2</sub>)流量:700 L/h;锥孔反吹气流量:30 L/h;碰撞气(Ar):0.13 mL/min。

1.3.3 培养基条件优化 微生物中 FA 的合成主要受 pH 值的调节。pH 值的增加和降低可能会导致二氢 FA 还原酶(DHFR)等活性部分损失。微生物的 DHFR 特性与物种有关,最适 pH 值不同。因此,设置了不同 pH 值,研究其对罗伊氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和格式乳杆菌产 FA 能力的影响。

在 37  $^{\circ}$ C 下,不同初始 pH 值(5.0,5.5,6.0,6.5,7.0)下,培养 36~48 h,并通过 LC-MS/MS 定量分析每个培养基的 FA 产量<sup>[21-22]</sup>。

谷氨酸、对氨基苯甲酸作为 FA 合成的底物,是培养基必需的化合物,因此设置不同添加量的前体物质,研究前体添加量对 FA 产量的影响。在最适温度,最适 pH 值条件下,分别在含有 0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%谷氨酸(pABA)的培养基条件下培养 36~48 h,并利用 LC-MS/MS 定量分析培养液的 FA 产量。

根据菌的生长状态及特性,接菌量的多少会对其代谢产物产生一定的影响。因此,在最适 pH 值、最适温度等条件下,分别以 1%,2%,3%,4%,5%的接菌量接种至培养基中培养 36~48 h 后,利用 LC-MS/MS 定量分析培养液的 FA 产量。

1.3.4 FA 合成中谷氨酸变化 谷氨酸作为 FA 合

成过程中直接参与 FA 合成的物质<sup>[23]</sup>十分重要,为了验证谷氨酸在 FA 代谢过程中的消耗情况,有必要对谷氨酸产量进行阶段性的检测,通过检测其浓度的变化可为进一步 FA 生产提供帮助。

吸取 300  $\mu\text{L}$  样品,于 1.5 mL 离心管中,加入 20  $\mu\text{L}$  10%磺基水杨酸,涡旋混匀,4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 条件下离心 15 min,上清液通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,收集滤液于离心管中。向微量进样瓶中加入 70  $\mu\text{L}$  硼酸盐缓冲液,10  $\mu\text{L}$  样品滤液,20  $\mu\text{L}$  AccQflour 试剂,混匀,于 55  $^{\circ}\text{C}$  恒温干燥箱中衍生 10 min,冷却至室温,待色谱仪测定。向微量进样瓶中加入 70  $\mu\text{L}$  硼酸盐缓冲液,10  $\mu\text{L}$  标准工作液,20  $\mu\text{L}$  AccQflour 试剂,混匀,于 55  $^{\circ}\text{C}$  恒温干燥箱中衍生 10 min,冷却至室温,待色谱仪测定<sup>[24]</sup>。

色谱柱为氨基酸分析柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7  $\mu\text{m}$ )。柱温:49  $^{\circ}\text{C}$ 。流动相:A 相为 AccQ·TagUltra 洗脱液 A 浓缩液,B 相为 AccQ·TagUltra 洗脱液 B 和水 ( $V_{\text{洗脱液 B}}:V_{\text{水}}=1:9$ ),C 相为水,D 相为 AccQ·TagUltra 洗脱液 B。流速:0.7 mL/min。波长:260 nm。进样量:1  $\mu\text{L}$ 。

**1.3.5 FA 合成过程中酶活检测** 采用酶联免疫吸附测定试剂盒进行产 FA 过程酶活检测。从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出所需板条,剩余板条用自封袋密封放回 4  $^{\circ}\text{C}$ 。设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50  $\mu\text{L}$ ;样本孔先加待测样本 10  $\mu\text{L}$ ,再加样本稀释液 40  $\mu\text{L}$ ;空白孔不加。除空白孔外,随后标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体 100  $\mu\text{L}$ ,用封板膜封住反应孔,37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅或恒温箱温育 60 min。弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1 min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板 5 次(也可用洗板机洗板)。每孔加入底物 A、B 各 50  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50  $\mu\text{L}$ ,15 min 内,在波长 450 nm 处测定各孔的 OD 值。按照不同酶浓度绘制标准曲线后,检测样品酶活性<sup>[25]</sup>。

**1.3.6 牛乳培养基培养** 将所筛选的菌株按适宜的接种量、培养温度等接种于牛乳培养基中进行发酵培养,18 h 之后进行产量验证。

## 1.4 数据分析

每组试验平行测定 3 次,试验数据结果以平

均值 $\pm$ 标准偏差( $x \pm s$ )表示。采用 Microsoft Excel 软件绘图,运用 SPSS 26.0 数据分析软件对所有试验数据进行方差分析(ANOVA 中的 Tukey),在  $P < 0.05$  时认为有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株初筛

本试验所使用的菌株均为益生菌。其中母乳来源的有 41 株,婴儿粪便来源的有 17 株,乳制品来源的有 14 株,酸肉来源的有 9 株。在 FACM 中加入溴甲酚紫作指示剂,调节培养基 pH 值为 6.8,按 1%接种量接种,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 1~3 d,若培养基溶液由暗紫色变为浅黄色,则提示该菌株在试管中能生长繁殖,且该菌株能够合成 FA。经过试验发现 81 株菌株中有 39 菌株培养基颜色发生明显变化(见图 2)。

### 2.2 产 FA 菌株复筛

将 FACM 培养基样品和不同质量浓度的 FA 标准品进行处理,然后进行质谱分析,通过比较两者的出峰时间来验证用 FACM 培养基所筛选出的菌株是否产 FA。以 FA 标准品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标得出标准曲线( $y=212.41x-1287.4$ ,  $R^2=0.9932$ ,图 3)。对比每个 FA 标准品可知 FA 标准品的出峰时间基本维持在 4.25 min,待测样品的出峰时间也基本维持在 4.25 min,由此可以推断出 FACM 培养基筛选的可行性。通过将发生显色反应的 39 菌株进行上机检测后,发现这 39 菌株 FA 产量不一(图 4),得出 4 株较为高产的菌株 B2-14 (39.56 ng/mL)、D020 (32.56 ng/mL)、B1-28 (60.72 ng/mL)、F020 (61.22 ng/mL)用于后续的实验操作。

### 2.3 培养基条件优化

**2.3.1 pH 值对 FA 产量影响** pH 值通过改变菌株内环境影响其它一些反应的最适 pH 值来改变菌株 FA 产量<sup>[26]</sup>。如图 5 所示,不同种类的菌在不同 pH 值条件下 FA 产量存在差异。婴儿粪便来源格氏乳杆菌 F020 FA 产量随着 pH 值的增加先下降然后再增加,最大时可达 93.94 ng/mL,因此在培养时选择 pH 值为 5;母乳来源的鼠李糖乳杆菌 B2-14 产量随 pH 值的增加呈波动趋势,在 pH 值为 5.5 时 FA 产量达到 99.57 ng/mL 母乳来源罗

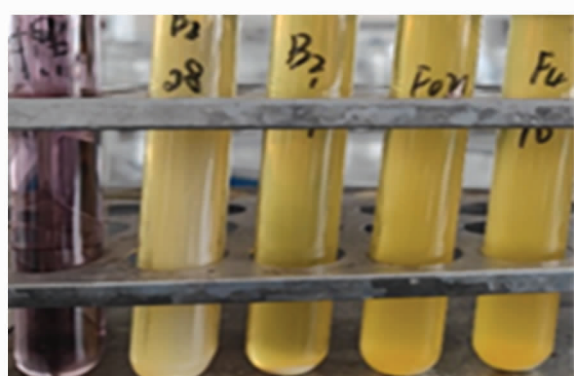


图 2 颜色反应

Fig.2 Color response

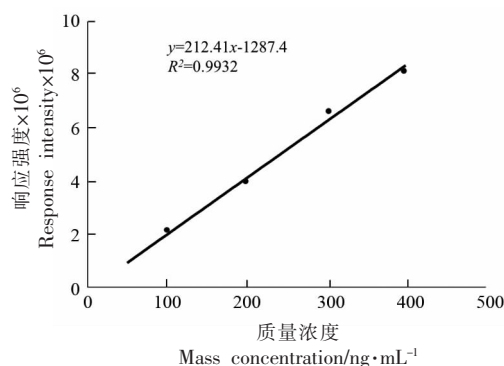


图 3 叶酸标准曲线

Fig.3 Standard curve of folic acid

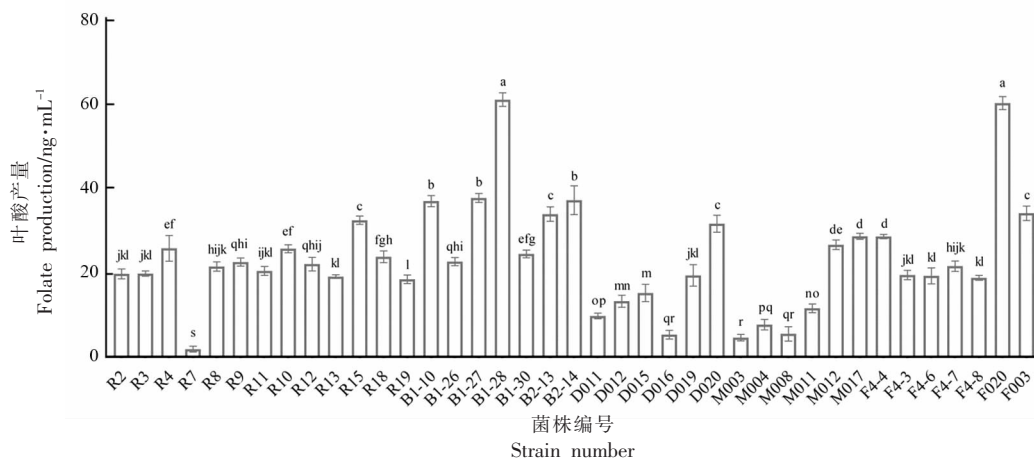


图 4 菌株叶酸产量

Fig.4 Folate production of strains

伊氏乳杆菌 B1-28 和乳制品来源双歧杆菌 D020 随着 pH 值的增加先下降后增加,前者最大产量为 pH=5 时的 86.22 ng/mL,后者最大产量为 pH=5 时的 86.87 ng/mL。因此,在选择产 FA 的菌株时应选择最佳的培养基条件来使产量最大化。

2.3.2 温度对 FA 产量的影响 FA 合成过程由 2 个主要通路组成:喋呤合成和 pABA 合成,二者分别在细胞质和叶绿体内合成然后转运至线粒体内合成 FA,合成过程所涉及的酶类超过 20 种,因此在 FA 合成时必须考虑酶的活性。温度作为一个可控指标,它影响 FA 代谢过程中的酶活性。如图 6 所示,罗伊氏乳杆菌 B1-28、鼠李糖乳杆菌 B2-14 随着温度升高其 FA 产量没有明显的变化,菌株 B1-28 在 42 °C 培养时 FA 产量最高可达 44.11 ng/mL,菌株 B2-14 在 32 °C 培养时可达 45.83 ng/

mL; 菌株 F020 随着温度的升高总体呈上升的趋势,在 37 °C 时 FA 产量可达 40.26 ng/mL; 菌株 D020 随着温度的升高 FA 产量先下降后上升,在 47 °C 培养时 FA 产量可达 50.78 ng/mL。这可能是由于微生物体内各种酶的最适温度不一,环境的改变引发一系列反应促进或制约着 FA 的产生<sup>[27]</sup>,具体影响过程还有待解决。

2.3.3 前体添加量对 FA 产量影响 在 FA 代谢途径中,谷氨酸作为其合成的主要前体物质,FA 的单谷氨酸分子与其共价结合形成稳定状态,与谷氨酸多肽的结合是形成 FA 代谢途径中功能性辅酶的必要步骤<sup>[28]</sup>。图 7 所示,随着谷氨酸添加量的上升,不同菌株受影响程度有明显的差异。B1-28 菌株产量没有明显变化,并且其产量较处理前被抑制,主要原因可能是受到反馈抑制或者是菌

株消耗 FA 的原因<sup>[29]</sup>;鼠李糖乳杆菌 B2-14 随着谷氨酸添加量的增加其 FA 产量呈波动状态,整体呈现上升趋势,在谷氨酸添加量为 0.4% 时 FA 产量最高,因此选择 0.4% 的谷氨酸作为鼠李糖乳杆菌产 FA 时培养条件。双歧杆菌 D020、格式乳杆菌 F020 二者培养时同样选择谷氨酸接种量为 0.4%。

对氨基苯甲酸作为糖降解途径合成的重要产物之一,它将糖降解途径和 FA 生物合成途径紧密的联系在一起。对氨基苯甲酸作为 FA 代谢途

径中的重要合成前体之一,Santos 等<sup>[30]</sup>的研究证实,在添加 pABA 的条件下能增加 FA 产量。由图 8 可知,除格氏乳杆菌 F020 在对氨基苯甲酸添加量为 0.2% 时 FA 产量最高外,为 42.17 ng/mL,其余 3 株菌均在对氨基苯甲酸添加量为 0.4% 时达到最高,分别是罗伊氏乳杆菌 B1-28 42.49 ng/mL、鼠李糖乳杆菌 B2-14 37.09 ng/mL、双歧杆菌 D020 46.04 ng/mL。因此,在选用不同菌株作为商业生产菌株时应对应选择合适的接种量。

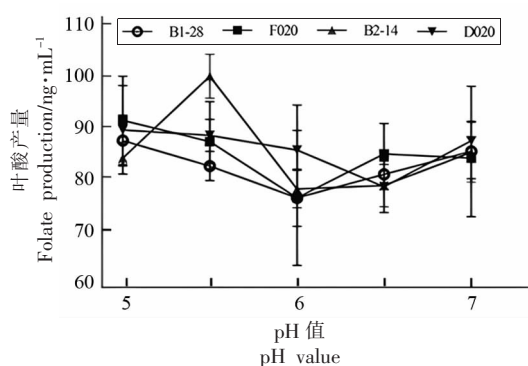


图 5 不同 pH 值对叶酸产量的影响

Fig.5 Effects of different pH value on folate yield

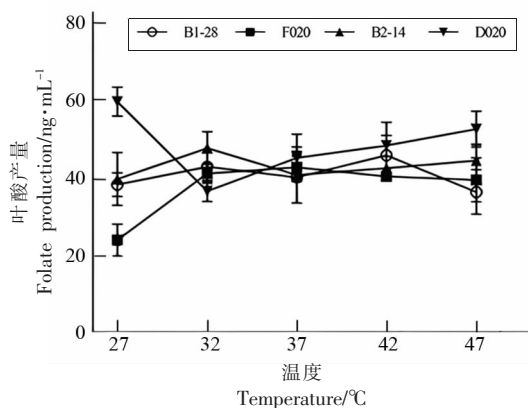


图 6 不同温度对叶酸产量的影响

Fig.6 Effects of different temperature on folate yield

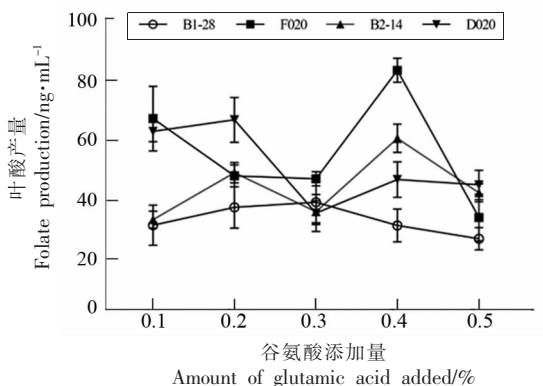


图 7 不同谷氨酸添加量对叶酸产量的影响

Fig.7 Effects of different amount of glutamic acid added on folate yield

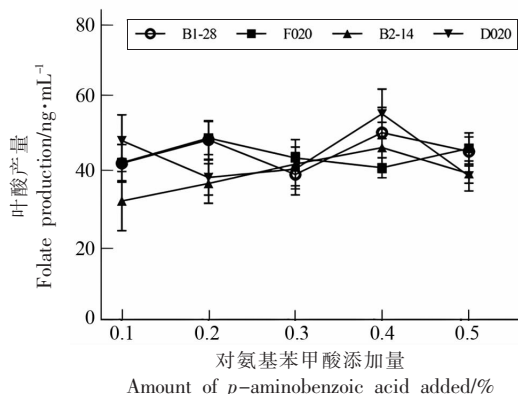


图 8 不同对氨基苯甲酸添加量对叶酸产量的影响

Fig.8 Effects of different amount of *p*-aminobenzoic acid added on folate yield

2.3.4 接种量对 FA 产量的影响 当培养基中营养物质充足时,其代谢物的产量受到接种量的影响<sup>[31]</sup>。在其它培养条件一致的情况下,菌株代谢物的产量随着培养基中菌株接种量的升高而升高。由图 9 可知,4 株菌的 FA 产量随着接菌量的升高呈现波动的趋势。菌株 B1-28、F020 在 4% 的接菌

量时 FA 产量可达到 57.03 ng/mL 和 37.66 ng/mL。菌株 B2-14、D020 在 5% 的接种量时 FA 产量可达 34.37 ng/mL 和 48.62 ng/mL。

2.3.5 牛乳培养基对 FA 产量影响 发酵乳,尤其是酸奶,是生物强化的合适选择和理想基质,有研究证实发酵乳制品可以在产 FA 微生物的帮助

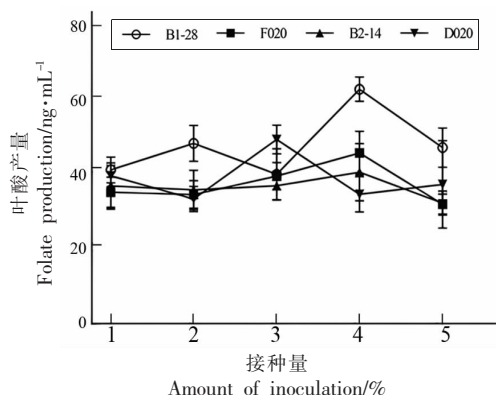


图 9 不同接种量对叶酸产量的影响

Fig.9 Effects of different amount of inoculation on folate yield

下通过发酵进行原位强化,从而显着提高活性 FA 产量<sup>[32]</sup>。同时,由于牛乳中存在 FA 结合蛋白,产 FA 微生物与牛乳混合可以使活性 FA 产量提高 10~15 倍<sup>[33-37]</sup>,由表 1 中可得到相似的结果,菌株 B1-28、F020 活性 FA 产量分别达到 800 ng/mL 和 720 ng/mL,较在培养基中分别增加了 13 倍和 12 倍。本试验中,将菌株在牛乳中培养后发现,F020、D020 产量基本检测不到,发生这种现象是由于在牛奶发酵过程中,大多数细菌都消耗 FA 并减少 FA 量。因此,后续选择菌株 B1-28 作为目标菌株。

## 2.4 菌株 B1-28 FA 合成中谷氨酸优化

谷氨酸作为 FA 合成过程中的主要前体物质,加入谷氨酸可以使 FA 的产生量在一定范围之内得到一定提升。谷氨酸在叶酸多聚谷氨酸合酶的作用下,二氢叶酸和谷氨酸反应形成四氢叶酸<sup>[38]</sup>,进一步反应生产多聚谷氨酸。由图 10a 可以看出谷氨酸的变化与 FA 产量成反比。12 h 之前培养基中 FA 产量是急剧下降的,谷氨酸浓度在 8 h 之前也是急剧下降的,这是因为培养基中菌的大量繁殖消耗培养基中的 FA,而使 FA 产量和谷氨酸都呈现下降趋势<sup>[39-41]</sup>。12 h 之后培养基中的菌生长基本处于稳定期(图 10)。此时 FA 产量的增长和谷氨酸浓度变化相反,20 h 左右培养基中 FA 产量维持相对稳定的状态,FA 开始富集,40 h 之后 FA 产量开始急剧下降主要是因为培养基中 FA 分解导致,因此生产过程中应严格避免这种现象发生。由此可知,在以后使用该 FA 生产菌生产 FA 的过程中在 12 h 之后添加谷氨酸可使 FA 产量得到进一步提升。

表 1 不同培养介质中叶酸产量

叶酸产量/ng·mL <sup>-1</sup>	B1-28	F020
FACM 培养基	60.72	61.22
牛乳培养基	803.73	720.54

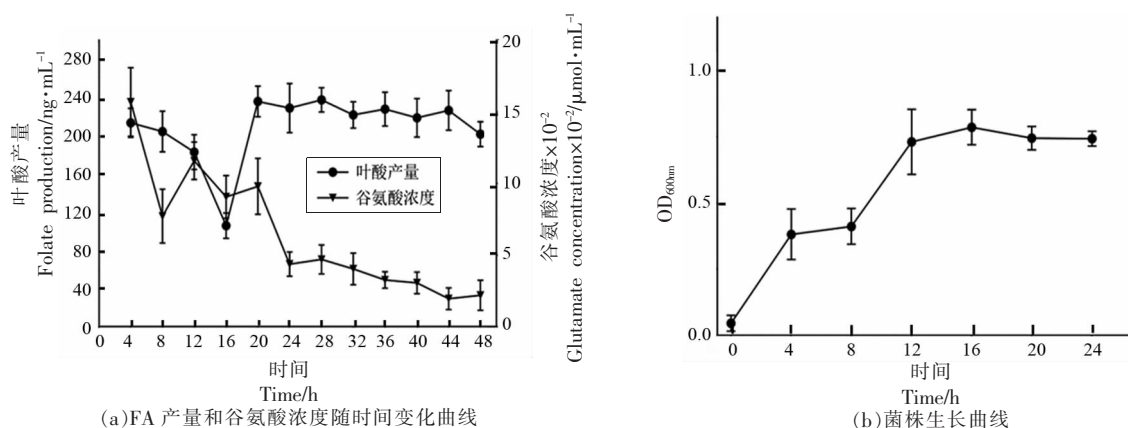


图 10 谷氨酸优化

Fig.10 Glutamate optimization

## 2.5 FA 合成过程中酶活检测

乳酸菌中活性 FA 的合成步骤已经被证实,且合成途径中的各种酶及其基因也已全部清楚,其

中有 10 个酶是该合成途径特异性酶<sup>[42]</sup>,它在一定的范围内可影响 FA 的产生。本试验通过对对氨基苯甲酸合成的关键酶——氨基脱氧分支酸合酶进

行检测来进一步明确叶酸合成过程。氨基脱氧分支酸合酶的活性上升可使生物体生成大量对氨基苯甲酸,氨基苯甲酸是活性FA合成的前体,其含量增加可以生成更多的活性FA<sup>[43]</sup>。由图11可知酶活性在20h时最高,培养基pH值也维持一个相对稳定的趋势,此时FA产量也达到最高。随着

时间的推移,由于培养基中FA的积累以及底物浓度的消耗,酶活性逐渐降低。因此,在后续使用菌株B1-28在产业化过程中可在20h后可通过添加底物,增加酶浓度,及时分离产物等方法来提高FA产量。

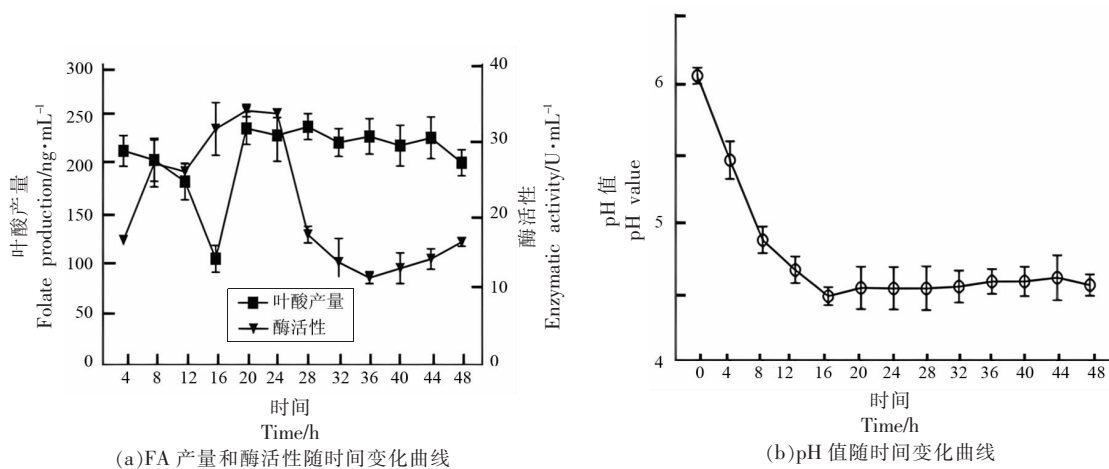


图11 叶酸合成过程酶活检测

Fig.11 Enzyme activity during folate synthesis was detected

## 2.6 代谢通路分析

通过将通路分析(KEGG,图12)和功能注释分析(COG,图13)数据与FA代谢基因进行相关性对比,发现该菌株中存在的FA相关代谢基因分别是 $folE$ (编码GTP环化水解酶)、 $folC$ (二氢叶酸合成酶)、 $folB$ (二氢新喋呤醛酸酶)等,通过基因组注释确定全基因组序列中所有基因的确切位置,可以更加充分地了解每个基因基本特征,方便后续进行基因编辑。已有研究证实,GTP环化水解酶是FA生物合成途径中的限速酶,由 $folE$ 编码。Sybesma等<sup>[44]</sup>通过基因工程手段过量表达 $folE$ 基因可将FA产量提高10倍,也有很多学者在拟南芥和番茄中通过表达代谢通路中不同的调节基因从而进一步提高FA产量<sup>[45-47]</sup>。 $folE$ 、 $folC$ 作为微生物合成活性叶酸的关键酶类,过表达 $folE$ 可使喋呤代谢途径中6-羟甲基-7,8-二氢喋呤-二磷酸(DHPPP)大量积累,生成大量喋呤; $folC$ 过表达可四氢叶酸进一步转化为稳定态的四氢叶酸聚谷氨酸,便于生物体内积累。已有研究证实通过在微生物体内过表达 $folE$ 、 $folC$ 可使活性叶酸产量提高

到原来10倍<sup>[13]</sup>。微生物体内特别是乳酸菌内关于基因工程手段优化产量的技术还不是很成熟,后续可以通过对该菌进行基因工程手段进行基因编辑进而优化产量。

## 3 讨论

本研究以母乳、婴儿粪便、乳制品、酸肉等来源的人源益生菌为主要目标,筛选出4株具有产FA能力的优良菌株,分别是罗伊氏乳杆菌B1-28、鼠李糖乳杆菌B2-14、格氏乳杆菌F020、双歧杆菌D020。其中,B1-28产量高达60.72 ng/mL,F020达到61.22 ng/mL,其产量略低于商业罗伊氏乳杆菌(73.83 ng/mL)。

从样本中共筛选出的81株菌株,其中有39株能有效产生FA,产量在1~61.22 ng/mL范围。先前研究表明乳酸菌FA产量很低,实际上是因为这些菌株体内缺乏编码参与FA生物合成或前体合成的酶<sup>[48]</sup>。随着时间推移,一些特定的产生FA的乳酸菌被分离出来并成功地应用在食品发酵过程中使之最大限度地产生FA,然而,只有很少的

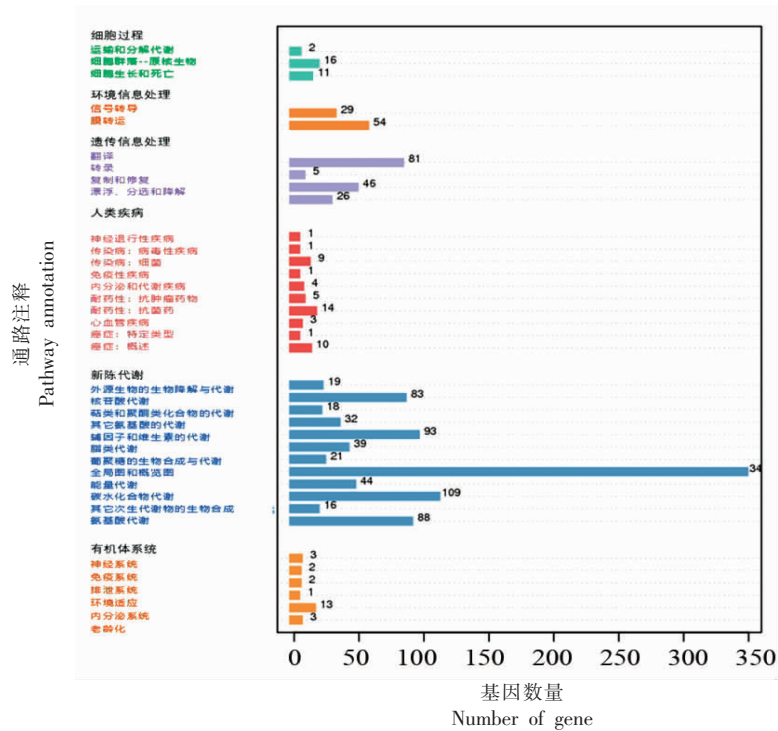


图 12 KEGG 通路注释

Fig.12 KEGG pathway annotation

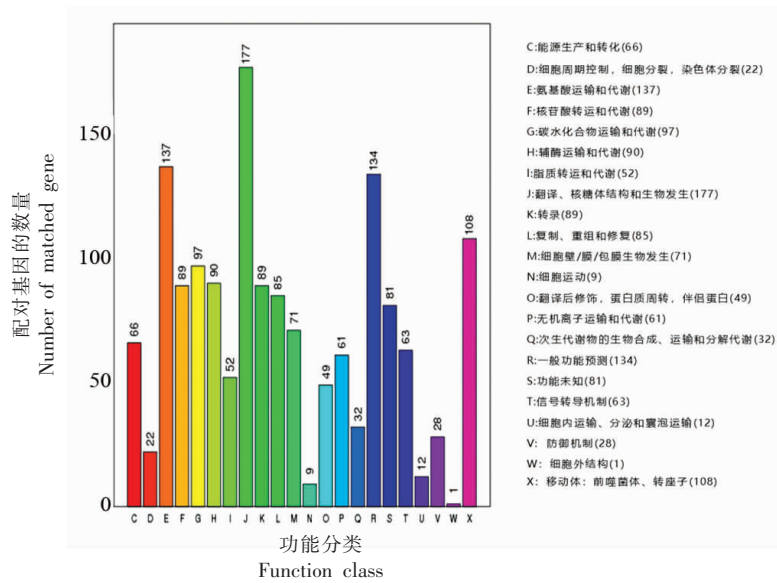


图 13 COG 功能分类

Fig.13 COG Functional classification

研究是关于人源益生菌的<sup>[41,48]</sup>。虽然难以与其它来源乳酸菌总 FA 含量进行比较,但是由于不同研究中使用方法以及培养基的差异,本研究中获得的总 FA 产量与先前报导过的其它来源筛选出的乳酸菌在无 FA 培养基上的 FA 产量,无明显差异<sup>[49]</sup>。

在筛选得到的菌株中,FA 生产菌株罗伊氏乳杆菌、格氏乳杆菌能够在 FACM 培养基中生长并产生 60.72 ng/mL、61.22 ng/mL 的 FA。乳酸菌 (LAB)是参与传统发酵过程的微生物。其中一些被认为是益生菌物种,它们在许多方面对宿主有



益,并且还以大量生产 FA 而闻名,这可能会改善发酵产品的营养成分。通常情况下益生菌发酵可提高 FA 产量,Rossi 等<sup>[48]</sup>证实,益生菌通过发酵可将 FA 含量从 29~138 ng/mL 提高到 760~1 484 ng/mL。在奶酪制作过程中,FA 含量可提高到 10.8~11  $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。本研究采用牛乳发酵,在发酵过程中保持除菌株外的其它变量一致,发酵的同时观察凝乳状态,待发酵结束进行 FA 产量鉴定<sup>[50]</sup>。菌株产量经过发酵后达到 800 ng/mL,将菌株与商业菌进行混合发酵后发现 FA 产量达到 910 ng/mL,关于混合发酵提高 FA 产量的研究,几乎没有文献涉及。对菌株进行代谢基因分析发现,该菌株中具有编码 FA 代谢途径相关酶的基因 *folE folB folC*<sup>[51]</sup>,后续可以通过基因工程手段优化 FA 产量,研制出适合商业用途的工程菌。为了进一步优化 FA 产量,Liu 等<sup>[52]</sup>通过检测 FA 代谢途径中相关的酶活性、pH 值、前体物质浓度等发现,在其最适条件下 FA 产量达到 150 ng/mL。本研究通过对 FA 代谢变化过程中谷氨酸浓度、pH 值、菌株生长曲线和酶活性进行检测发现菌株生长的变化和 FA 产量相一致,菌株在最适生长条件下添加前体可使产量增加到 230 ng/mL。FA 的产生依赖谷氨酸等前体物质的添加,同时 FA 产量曲线也显示出菌株在一定的时间内可以消耗 FA,这与 Armin 等<sup>[53]</sup>的研究基本一致。同时也证实,不同菌株在不同的培养基条件下 FA 产量不同。比如,罗伊氏乳杆菌在 pH 值为 7 时 FA 产量可达 86.22 ng/mL,而格氏乳杆菌在 pH 值为 5.5 时 FA 产量可达 93.94 ng/mL。因此,在选择不同菌株作为产 FA 菌株时应精准地选择最佳培养条件。然而,天然食物是叶酸的重要来源,如绿色蔬菜、新鲜水果。由于鼓励从天然食物中摄入叶酸,所以合成 FA 的量不能满足人体需要,不是很大的局限性。同时由于缺乏系统完整的比较基因组学、转录组学和代谢产物研究,严重制约着乳酸菌及其代谢产物在新型功能性食品的开发利用。

#### 4 结论

FA 作为人体所必须的微量维生素,对维持人体健康有至关重要的作用。目前市场多以化学合成的 FA 为主,化学合成的 FA 不但人体吸收困

难,而且还有一定的副作用。利用微生物合成的 FA 安全高效、人体利用率高,值得进一步去研究。本文通过对 FA 生产菌株进行多方位的筛选得到一株 FA 高产菌株,并对其进行全基因组学分析找到其与叶酸代谢的相关基因。后续可通过基因编辑技术来优化 FA 产量。

#### 参 考 文 献

- [1] GAZZALI A M, LOBRY M, COLOMBEAU L, et al. Stability of folic acid under several parameters[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 93(10): 419-430.
- [2] ONDICOVA M, IRWIN R E, THURSBY S J, et al. Folic acid intervention during pregnancy alters DNA methylation, affecting neural target genes through two distinct mechanisms[J]. *Clin Epigenetics*, 2022, 14(1): 63-71.
- [3] HOU Z, GANGJEE A, MATHERLY L H. The evolving biology of the proton-coupled folate transporter: New insights into regulation, structure, and mechanism[J]. *FASEB J*, 2022, 36(2): 221-233.
- [4] SHULPEKOVA Y, NECHAEV V, KARDASHEVA S, et al. The concept of folic acid in health and disease[J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 1-29.
- [5] SAINI R K, NILE S H, KEUM Y S. Folates: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability[J]. *Food Research International*, 2016, 89(11): 1-13.
- [6] ZHENG Y, CANTLEY L C. Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(2): 253-266.
- [7] DING Z, LUO L, GUO S, et al. Non-linear association between folate/vitamin B<sub>12</sub> status and cognitive function in older adults[J]. *Nutrients*, 2022, 14(12): 1-13.
- [8] HEALTH D O, SERVICES F H. Food standards: Amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid [J]. 1996, 18(4): 45-52.
- [9] BILLAH S M, RAYNES-GREENOW C, ALI N B, et al. Iron and folic acid supplementation in pregnancy: Findings from the baseline assessment of a maternal nutrition service programme in Bangladesh [J]. *Nutrients*, 2022, 14(15): 1-17.

- [10] YANG L P, WANG W, MAO B, et al. Maternal folic acid supplementation, dietary folate intake, and low birth weight: A birth cohort study[J]. *Front Public Health*, 2022, 10(20): 256–264.
- [11] EBARA S. Nutritional role of folate[J]. *Congenital Anomalies*, 2017, 57(5): 35–42.
- [12] HONEIN M A, PAULOZZI L J, MATHEWS T J, et al. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects [J]. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 2001, 285(23): 2981–2987.
- [13] MOSSO A L, JIMENEZ M E, VIGNOLO G, et al. Increasing the folate content of tuber based foods using potentially probiotic lactic acid bacteria [J]. *Food Res Int*, 2018, 109(38): 168–174.
- [14] LIU Z, ZHANG Y, LIU Z, et al. Folic acid over-supplementation during pregnancy disorders lipid metabolism in male offspring via regulating arginase 1-associated NOS3-AMPKalpha pathway[J]. *Clin Nutr*, 2022, 41(1): 21–32.
- [15] WRIGHT A J A, DAINITY J R, FINGLAS P M. Folic acid metabolism in human subjects revisited: Potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK [J]. *British Journal of Nutrition*, 2007, 98(4): 667–675.
- [16] KOK D E, STEEGENGA W T, SMID E J, et al. Bacterial folate biosynthesis and colorectal cancer risk: More than just a gut feeling[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(2): 244–256.
- [17] LEBLANC J G, LEVIT R, SAVOY DE GIORI G, et al. Application of vitamin-producing lactic acid bacteria to treat intestinal inflammatory diseases [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(8): 3331–3337.
- [18] 任文芳, 杨润强, 顾振新, 等. 植物源食品中叶酸的生物合成与调控及其提取与检测技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(9): 335–341.
- REN W F, YANG R Q, GU Z X, et al. Research progress on biosynthesis and regulation of folic acid in plant-derived foods and its extraction and detection technology[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2018, 39(9): 335–341.
- [19] YE K, LI P, GU Q. Complete genome sequence analysis of a strain *Lactobacillus pentosus* ZFM94 and its probiotic characteristics[J]. *Genomics*, 2020, 112(5): 3142–3149.
- [20] KOHASHI M, INOUE K, SOTOBAYASHI H, et al. Microdetermination of folate monoglutamates in serum by liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1986, 382(20): 303–307.
- [21] ZOHRA R R, AMAN A, ZOHRA R R, et al. Dextranase: Hyper production of dextran degrading enzyme from newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2): 2149–2153.
- [22] PLUNKETT M H, KNUTSON C M, BARNEY B M. Key factors affecting ammonium production by an *Azotobacter vinelandii* strain deregulated for biological nitrogen fixation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 107–116.
- [23] KHAN M Z, LIU L, ZHANG Z, et al. Folic acid supplementation regulates milk production variables, metabolic associated genes and pathways in perinatal Holsteins[J]. *J Anim Physiol a Anim Nutr*, 2020, 104(5): 1–10.
- [24] RAMANATHAN M, ABDUL K K, JUSTIN A. Low dose of L-glutamic acid attenuated the neurological dysfunctions and excitotoxicity in bilateral common carotid artery occluded mice[J]. *Behavioural Pharmacology*, 2016, 27(7): 615–623.
- [25] AMOROSI C J, CHIASSON M A, MCDONALD M G, et al. Massively parallel characterization of CYP2C9 variant enzyme activity and abundance[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2021, 108(9): 1735–1751.
- [26] ADI A, CHRISTANTO C, RACHMAWATI H, et al. Vitamin E-based folic acid nanoemulsion: Formulation and physical evaluation for oral administration[J]. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 2019, 7(4): 304–313.
- [27] MOHOLKAR D N, SADALAGE P S, HAVALDAR D V, et al. Engineering the liposomal formulations from natural peanut phospholipids for pH and temperature sensitive release of folic acid, levodopa and camptothecin[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2021, 123(11): 235–254.
- [28] SCHIRCH V, STRONG W B. Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1989, 269(2): 371–380.

- [29] IYER R, TOMAR S K. Folate: A functional food constituent[J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74(9): 114–122.
- [30] SANTOS F, WEGKAMP A, VOS W M D, et al. High-level folate production in fermented foods by the B<sub>12</sub> producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(10): 3291–3294.
- [31] ZHOU Z H, YANG Y, LI M, et al. New Tween-80 microbiological assay of serum folate levels in humans and animals[J]. *Journal of Aoac International*, 2012, 95(5): 1505–1510.
- [32] SAUBADE F, HEMERY Y M, GUYOT J P, et al. Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(18): 3894–3910.
- [33] SAUBADE F, HEMERY Y M, ROCHETTE I, et al. Influence of fermentation and other processing steps on the folate content of a traditional African cereal-based fermented food[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 266(2): 79–86.
- [34] RATAJCZAK A E, SZYMCZAK -TOMCZAK A, RYCHTER A M, et al. Does folic acid protect patients with inflammatory bowel disease from complications?[J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 4036–4048.
- [35] ALBUQUERQUE M A C, BEDANI R, LEBLANC J G, et al. Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk[J]. *Int J Food Microbiol*, 2017, 261(9): 35–41.
- [36] GREPPI A, SAUBADE F, BOTTA C, et al. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food [J]. *Food Microbiol*, 2017, 62(4): 169–177.
- [37] RAFAEL G, DEMINICE A R, ROBIN P, et al. Betaine supplementation prevents fatty liver induced by a high-fat diet: Effects on one-carbon metabolism[J]. *Amino Acids*, 2015, 237(11): 278–289.
- [38] CLAIRE M, IAN C, JACALYN G, et al. A bacterial route for folic acid supplementation[J]. *BMC Biology*, 2018, 16(1): 67–79.
- [39] ARMIN L, TARRAH T, JULIANA E, et al. *In vitro* probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing *Streptococcus thermophilus* strains[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 19(9): 2214–2221.
- [40] MAHARA F A, NURAIDA L, LIOE H N. Folate in milk fermented by lactic acid bacteria from different food sources[J]. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2021, 26(2): 230–240.
- [41] ALBANO C, SILVETTI T, BRASCA M. Screening of lactic acid bacteria producing folate and their potential use as adjunct cultures for cheese bio-enrichment[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2020, 367(9): 1–9.
- [42] BASSET G, QUINLIVAN E P, GREGORY J F, et al. Folate synthesis and metabolism in plants and prospects for biofortification[J]. *Crop Science*, 2005, 45(2): 449–453.
- [43] XIANG N, HU J G, WEN T X, et al. Effects of temperature stress on the accumulation of ascorbic acid and folates in sweet corn (*Zea mays* L.) seedlings [J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100(4): 1694–1701.
- [44] SYBESMA W, STARRENBURG M, KLEERE-BEZEM M, et al. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3069–3076.
- [45] RD D L G, QUINLIVAN E, KLAUS S, et al. Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(38): 20–25.
- [46] CHAUDHARY B, SINGH N, PANDEY D K. Bio-engineering of crop plants for improved tetrahydrofolate production[J]. *Bioengineered*, 2017, 9(1): 152–158.
- [47] LIAN T, WANG X, LI S, et al. Comparative transcriptome analysis reveals mechanisms of folate accumulation in maize grains[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 45–60.
- [48] ROSSI M, AMARETTI A, RAIMONDI S. Folate production by probiotic bacteria[J]. *Nutrients*, 2011, 3(1): 118–134.
- [49] DA L, NGUYEN T, HO P H, et al. Screening of lactic acid bacteria for their potential use as aro-

- matic starters in fermented vegetables[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 350(5): 222–242.
- [50] LIU F, EDELMANN M, PIIRONEN V, et al. The bioaccessibility of folate in breads and the stability of folate vitamers during *in vitro* digestion[J]. *Food Funct*, 2022, 13(6): 3220–3233.
- [51] YANG H, LIU Y, LI J, et al. Systems metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for efficient biosynthesis of 5-methyltetrahydrofolate [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(7): 2116–2130.
- [52] LIU C J, WU B, ZHANG S Y, et al. Transcriptional analysis of de novo folate biosynthetic genes in *Lactobacillus plantarum* strain 4\_3 in fermented soybean[J]. *Food & Function*, 2019, 10(4): 563–576.
- [53] ARMIN Z J, TARRAH A, JULIANA H E, et al. *In vitro* probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing *Streptococcus thermophilus* strains [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(2): 1–11.

### Screening and Yield Optimization of Folate-producing Strains

Ji Yadong<sup>1</sup>, Li Xianping<sup>2</sup>, Qiao Weicang<sup>2</sup>, Wang Qi<sup>1</sup>, Liu Lu<sup>2</sup>, Zhao Junying<sup>2,3</sup>, Zhang Chunzhi<sup>1\*</sup>, Chen Lijun<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116000, Liaoning

<sup>2</sup>National Engineering Center of Dairy for Maternal and Child Health, Beijing Engineering Research Center of Dairy, Beijing Technical Innovation Center of Human Milk Research, Beijing Sanyuan Foods Co. Ltd., Beijing 100163

<sup>3</sup>South Asia Branch Center of National Maternal and Infant Dairy Health Engineering Technology Research Center, Guilin University of Technology, Guilin 541006, Guangxi)

**Abstract** The study screened folic acid production strains from breast milk, infant feces, dairy products, and sour meat. The production of folic acid was increased through medium optimization and metabolic pathway study. Among 39 folate-producing strains, 4 high-yielding strains were obtained: *Lactobacillus rhamnosus* B2-14 (39.56 ng/mL), *Bifidobacterium* D020 (32.56 ng/mL), *Lactobacillus reuteri* B1-28 (60.72 ng/mL), and *Lactobacillus formans* F020 (61.22 ng/mL). By optimizing the medium conditions, folic acid production can be increased by 50%–70%. When cultured in milk medium, folic acid yield can be increased by 6–10 times. Among them, the yield of strain B1-28 reached 910 ng/mL after being cultured in milk medium. Some indexes of the folic acid production pathway and related metabolic genes were analyzed to explore changes in the synthesis pathway indexes and their mechanisms for developing dairy products conducive to folic acid intake.

**Keywords** folate; strain selection; milk; medium optimization; *Lactobacillus reuteri*