

添加富含乳脂肪球膜乳清蛋白粉对发酵乳代谢组学的影响

刘菲帆^{1,2}, 罗梦帆¹, 赵佳园¹, 赵轩¹, 孔维梅¹, 王孝治¹, 谭东虎¹, 杨靖鹏¹,
苏雅¹, 罗海波¹, 郭宇星^{1*}

(¹南京师范大学 南京 210000

²江苏农牧科技职业技术学院 江苏泰州 225300)

摘要 目的:研究添加富含乳脂肪球膜(MFGM)乳清蛋白粉(M-WPI)前、后的保加利亚乳杆菌发酵乳中保加利亚乳杆菌存活率,发酵乳风味及抗氧化能力。采用代谢组学分析添加 M-WPI 前、后保加利亚乳杆菌发酵乳的显著差异代谢标志物及其作用通路。方法:通过样本主成分分析、偏最小二乘判别分析、热图分析和 KEGG 富集分析等方法确定加入 M-WPI 前、后发酵乳代谢过程中的差异性代谢产物,并以此分析 M-WPI 对发酵乳产生的影响。结果表明:在脱脂乳中加入 M-WPI,可以提高保加利亚乳杆菌存活率,增加发酵乳的风味及抗氧化活性。采用主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)共确定 77 种显著差异代谢物,涉及的主要代谢通路为 19 条。加入 M-WPI 后葡萄糖、半乳糖等,代谢物上调,提高了保加利亚乳杆菌存活率;癸酸、苹果酸等有机酸上调,能提高发酵乳的口感及改善发酵乳风味。保加利亚乳杆菌发酵乳中上调的代谢物以氨基酸类较多,其中丙氨酸、天冬氨酸和泛酸等参与 β -丙氨酸代谢,与发酵乳抗氧化活性提高有关。本研究为加入 M-WPI 发酵乳营养评价以及相关加工技术和产品开发提供参考。

关键词 富含乳脂肪球膜乳清蛋白粉;保加利亚乳杆菌;代谢组学;抗氧化;发酵乳

文章编号 1009-7848(2024)05-0428-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.036

发酵乳是原料乳通过乳酸菌发酵制成的酸性乳制品,具有较高的营养价值^[1]。目前,“美味+健康+功能”是发酵乳开发的主流元素^[2],添加功能性乳配料成为发酵乳研究的热点。乳清蛋白粉为制备发酵乳常用的乳配料,可改善酸乳质构,提高乳酸菌存活率^[3],同时附加酸乳功能价值,如增强免疫力^[4],促进钙质吸收等。乳清蛋白粉的种类较多,其中富含乳脂肪球膜(Milk fat globule membrane, MFGM)的乳清蛋白粉(简称 M-WPI)是一种新型的乳配料,目前已在婴幼儿配方乳粉中使用^[5]。MFGM 是由蛋白质和磷脂构成的三层膜结构^[6],主要位于甘油三酯核心的周围,含有 25%~60%的乳脂肪球膜蛋白(Milk fat globule membrane protein, MFGMP)。MFGMP 主要包括有嗜

乳脂蛋白、黄嘌呤氧化还原酶、黏蛋白等,具有抗癌、抗病毒和调节机体自身免疫力,增强酸乳的功能和营养特性^[7-8]。磷脂主要为磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰乙醇胺(PE)等,主要分布在乳脂肪球双层膜上^[9],可促进婴幼儿肠道发育,抑制炎症^[10]。M-WPI 具有应用于发酵乳的潜能。

代谢组学是对各种代谢路径的底物和产物的小分子代谢物进行定性、定量分析和数据整合的研究方式,在各个领域发展迅速,如生物学、临床医学、食品等^[11-13]。目前,利用代谢组学技术研究发酵乳发酵前、后代谢物差异已有报道。Peng 等^[14]利用代谢组学研究了发酵乳在美拉德褐变过程中产生的代谢物差异性。Hatsuro 等^[15]采用液相色谱-质谱联用仪代谢组学方法,发现乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)发酵乳产生独特差异代谢物且具有抗高血压活性。

保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)是革兰氏阳性菌,无芽孢,具有较强的蛋白水解能力、耐酸特性,可在发酵过程中产生乳酸、胞外多糖和一些特殊风味物质^[16],为发酵乳中普遍使用的发酵菌种。本研究以保加利亚乳杆菌为发酵菌

收稿日期: 2023-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(32372355);江苏省林业科技创新与推广专项基金项目(LYKJ[2022]12);中国食品科学技术学会食品科技基金-雅培食品营养与安全专项科研基金项目(2021-F02)

第一作者: 刘菲帆,女,硕士

通信作者: 郭宇星 E-mail: guoyuxing1981@163.com

种,比较了添加 M-WPI 前、后保加利亚乳杆菌发酵乳的发酵性能、质构及抗氧化能力,并采用代谢组学分析添加 M-WPI 后保加利亚发酵乳的特征差异代谢产物、相关代谢通路,解析相关代谢产物与发酵乳风味、抗氧化特性的关系,以期对发酵乳产品开发和优化以及 M-WPI 的进一步应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 原料

富含乳脂肪球膜的乳清蛋白粉(M-WPI,蛋白含量 73%,脂肪含量 15%,磷脂含量 6.6%,乳糖含量 4%),美国 Hilmar 公司;乳清蛋白粉(WPC-80,蛋白含量 80%,脂肪含量 7%,磷脂含量 2.0%,乳糖含量 6%),丹麦阿拉食品原料有限公司;酪乳粉(蛋白含量 34%,脂肪含量 6%,磷脂含量 1.5%,乳糖含量 43%),美国鲍勃红磨坊公司;脱脂乳粉(蛋白含量 33%,脂肪含量 1%),新西兰 Anchor 公司。

1.2 菌种与试剂

保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) GYX-4, 保存于南京师范大学国家乳制品加工技术研发分中心;德运脱脂牛奶,莎普托乳液(中国)有限公司;MRS 培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH)、羟自由基测定试剂盒、总抗氧化能力测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;分析纯级甲氧胺盐酸盐、色谱级吡啶($\geq 99.9\%$),美国 Sigma-Aldrich 公司;N,O-双(三甲基硅基)三氟乙酰胺(BSTFA),德国默克生命科学技术有限公司。

1.3 仪器与设备

Spectra MAX M5 酶标仪,美国 Molecular Devices;真空冷冻干燥机,赛飞(中国)有限公司;GC-MS 气相质谱联用仪,安捷伦科技有限公司;DB-5MS 色谱柱(内径 30 mm \times 0.32 mm \times 0.25 μ m, J&W Scientific),美国安捷伦科技有限公司;生化培养箱,上海捷呈实验仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 保加利亚乳杆菌 GYX-4 培养及活化 将冻存保加利亚乳杆菌 GYX-4 在灭菌 MRS 固体平板上划线分离纯化,37 $^{\circ}$ C 在恒温培养箱培养 24~

48 h。挑取单菌落至灭菌液体 MRS 培养基中活化 2 次,将活化好的保加利亚乳杆菌培养液按 2% 接种量接入灭菌液体 MRS 培养基中,培养至对数期。

1.4.2 M-WPI、WPC-80、酪乳粉和脱脂乳粉对保加利亚乳杆菌冻干存活率的影响 将不同的乳配料(M-WPI、WPC-80、酪乳粉和脱脂乳粉)按照 10 g/L 的终质量浓度分别添加于脱脂乳中,混匀后进行巴氏热杀菌处理,冷却至室温备用。将保加利亚乳杆菌以 5% 接种量分别接种于巴氏杀菌乳配料脱脂乳培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至凝乳,凝乳后进行冷冻干燥,利用活菌计数法测定冷冻干燥酸乳样品的活菌数,按公式(1)计算保加利亚乳杆菌活菌数。

将 M-WPI 按照终质量浓度为 0, 5, 10, 15, 20 g/L 分别添加于脱脂乳中,混匀后进行巴氏热杀菌处理,冷却至室温备用。将保加利亚乳杆菌以 5% 接种量分别接种于巴氏杀菌热处理 M-WPI 的脱脂乳培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至凝乳,同上方法计算存活率。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\lg N_t}{\lg N_0} \times 100 \quad (1)$$

式中, N_t ——添加乳配料培养后的活菌数; N_0 ——未添加乳配料培养后的活菌数。

1.4.3 添加 M-WPI 保加利亚乳杆菌发酵乳制备及发酵特性比较

1.4.3.1 发酵乳制备 将 5% 保加利亚乳杆菌分别接种于含有 10 g/L M-WPI 的脱脂乳灭菌培养基(样品组)中和未添加 M-WPI 的脱脂乳灭菌培养基(对照组)中,每组试验设置 3 个平行。样品组与对照组凝乳之后,进行感官评定和质构测定。其中 pH 值低于 4.6 且滴定酸度在 70 $^{\circ}$ T 以上即可判断为凝乳终点^[7]。

1.4.3.2 感官评定 参考杨淑娟等^[8]的感官评定标准。待样品组发酵乳发酵结束,由 12 位感官评定小组成员进行评定,对组织状态、口感、色泽和风味进行评价。

1.4.3.3 质构的测定 参考杜慧敏^[9]的方法,使用质构仪测定。测定探头:TA-4 圆柱形探头;测定参数:测试速度 1.0 mm/s;目标值 30 mm;触发点复数 4.5 g。

1.4.4 M-WPI 保加利亚乳杆菌发酵乳抗氧化活性测定

1.4.4.1 预处理 用 1 mol/L HCl 溶液将样品组与对照组 pH 值调节至 3.4~3.6, 于 4 °C, 8 000×g 离心 15 min 取上清液; 再用 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 值调至 8.3, 同上述条件离心, 收集上清液作为待测样品, 测定其抗氧化能力。

1.4.4.2 DPPH 自由基清除能力测定 参考 Li 等^[20]的方法并作适当改进。以无水乙醇为溶剂, 配制 0.1 mmol/L DPPH 溶液。分别取 2 mL 的 0, 1.5, 3, 4.5, 6 h 样品组发酵乳和对照组发酵乳并稀释 10 倍为稀释液, 以 0.5 mg/mL VC 溶液作为阳性对照。室温下避光静置反应 30 min, 于波长 517 nm 处测定吸光值并计算清除率, 每组样品平行测量 3 次取平均值。DPPH 自由基清除率计算方式见式(2)。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

式中, A_i ——2 mL 稀释液与 2 mL DPPH 溶液的吸光值; A_j ——2 mL 稀释液与 2 mL 无水乙醇吸光值; A_0 ——2 mL 无水乙醇与 2 mL DPPH 溶液的吸光值。

1.4.4.3 羟自由基测定 按照羟自由基测定试剂盒说明书进行操作, 以 0.5 mg/mL VC 溶液作为阳性对照。

1.4.4.4 总抗氧化能力(T-AOC)测定 根据总抗氧化活性试剂盒说明书步骤进行测定, 其中 Trolox 是 0.5 mg/mL VE 的一种类似物, 具有相近的抗氧化能力, 将其抗氧化活性视为 1, 结果表示为 1 mmol/mL。

1.4.5 W-MPI 添加于保加利亚乳杆菌发酵乳后的代谢组分析

1.4.5.1 代谢产物的提取 样品组与对照组发酵乳经 8 000×g 离心 15 min 取上清液 200 mL 置于 EP 管中, 加入 800 μL 甲醇和 10 μL 内标(2-氯苯丙氨酸)涡旋混匀, 11 000×g 离心 10 min, 取上清液进行氮吹。加入 20 μL 甲氧铵盐酸吡啶溶液, 涡旋振荡 10 s 充分混匀, 于 37 °C、1 200×g 的金属浴中孵育 90 min; 然后加入 40 μL BSTFA 快速混匀, 置于 70 °C 烘箱中, 孵育 60 min 进行衍生化处

理。

1.4.5.2 GC-MS 分析

1) GC 条件^[21] 使用 DB-5MS 色谱柱, 分流进样, 载气进样体积为 1 μL(载气为 99.9996% 高纯氦气)。进样口温度 280 °C, 程序升温条件: 起始柱温 70 °C, 维持 3 min, 最后以 4 °C/min 升至 280 °C, 维持 7 min。进样量 1 μL 分流比为 10:1。

2) MS 条件^[22] 电子轰击电离源(EI), 离子化电压为 70 eV, 传输线温度 280 °C, 离子源温度 230 °C, 低速扫描方法质量扫描范围 33~600 *m/z*, 溶剂延迟时间为 5 min。

1.4.6 数据处理与统计分析 利用 Origin 2019 软件数据分析, 取平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 每组 3 个平行, Graphpad prism 软件绘图。采用 Fiehn 气质数据库对代谢物质进行鉴定, 在 SPSS statistics 中进行单元统计分析, Abf converter 结合 MS-DIAL 软件(<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>)对数据进行代谢组学分析^[23]。利用 PCA 和 PLS-DA 模型进行差异代谢产物的筛选, Multiexperiment Viewer 4.9.1 绘制热图。

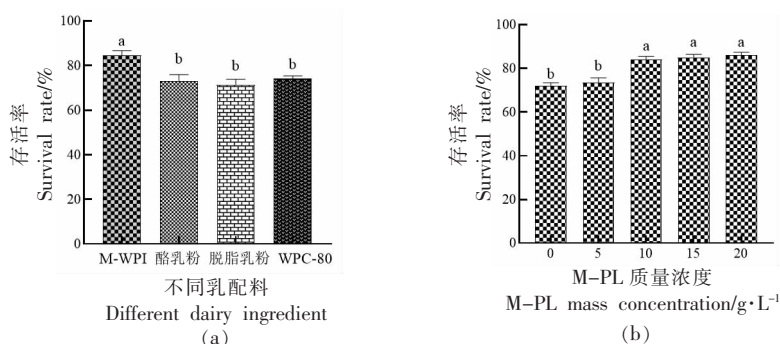
2 结果与分析

2.1 M-WPI 对保加利亚乳杆菌冻干存活率影响

如图 1a 所示, 在脱脂乳培养基中加入 M-WPI 显著提高了保加利亚乳杆菌的存活能力, 且优于添加 WPC-80、酪乳粉和脱脂乳粉。M-WPI 中可能富含乳脂肪球膜蛋白, 对乳酸菌的生产具有益生作用, 目前的一些研究也显示在培养基中添加 MFGM 可以提高乳酸菌在酸胁迫环境下的存活率^[3]。因此, 添加 M-WPI 的保加利亚乳杆菌冻干粉具有发酵剂的使用潜能。考察其对保加利亚乳杆菌的存活率影响。当 M-WPI 添加质量浓度为 10 g/L 时, 发酵后乳酸菌的存活率达到 84.5%, 是空白组的 1.17 倍; 质量浓度为 20 g/L 时, 存活率是空白组的 1.4 倍, 与添加质量浓度为 10 g/L 的 M-WPI 对菌的影响无显著性差异(图 1b)。

2.2 M-WPI 对保加利亚乳杆菌发酵乳品质的影响

发酵时间为 6 h 时, 添加 10 g/L M-WPI 的保加利亚乳杆菌发酵乳 pH 值为 4.49±0.03, 发酵时间的延长导致乳清析出, 发酵乳的硬度、黏性和咀



注:不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

图 1 M-WPI 对保加利亚乳杆菌存活率影响

Fig.1 Effects of M-WPI on the survival rate of *Lactobacillus bulgaricus*

嚼性有下降趋势(表 1)。发酵乳中滴定酸度控制在 70~110 °T 范围口感更好^[24]。此外,通过感官评

价得知在发酵 6 h 时,添加 M-WPI 的保加利亚乳杆菌发酵乳香味浓郁,风味协调(表 2)。

表 1 发酵时间对发酵乳质构的影响

Table 1 Effects of fermentation time on texture of fermented milk

发酵时间/h	硬度/g		黏性/Pa·s		弹性		咀嚼性	
	样品组	对照组	样品组	对照组	样品组	对照组	样品组	对照组
2	1.78 ± 0.50	1.72 ± 0.31	1.11 ± 0.19	1.15 ± 0.23	2.09 ± 0.42	1.54 ± 0.23	0.98 ± 0.28	1.02 ± 0.09
4	5.98 ± 1.23	4.21 ± 0.98	0.76 ± 0.81	0.81 ± 0.06	2.17 ± 0.66	1.78 ± 0.11	2.36 ± 0.32	2.42 ± 0.21
6	7.93 ± 0.13	6.83 ± 0.27	0.11 ± 0.05	0.23 ± 0.07	2.61 ± 0.31	2.09 ± 0.21	5.58 ± 0.21	5.37 ± 0.33
8	6.52 ± 0.16	6.23 ± 0.07	0.28 ± 0.12	0.35 ± 0.04	1.98 ± 0.28	1.68 ± 0.18	3.09 ± 0.37	3.01 ± 0.25

表 2 添加 M-WPI 的保加利亚乳杆菌发酵乳感官评分表

Table 2 Sensory scale of *Lactobacillus bulgaricus* fermented milk with M-WPI additive

项目	评分标准	平均得分/分	
		样品组	对照组
组织状态(30分)	凝乳均匀结实,无气泡,不分层,无层析析出	29	29
口感(30分)	酸甜,口感细腻	28	24
色泽(20分)	色泽均匀,表面呈乳白色	19	17
风味(20分)	无异味,香味浓郁,有浓浓的奶香味,风味协调,具有产品特有的风味	18	15

2.3 M-WPI 对保加利亚乳杆菌发酵乳抗氧化活性的影响

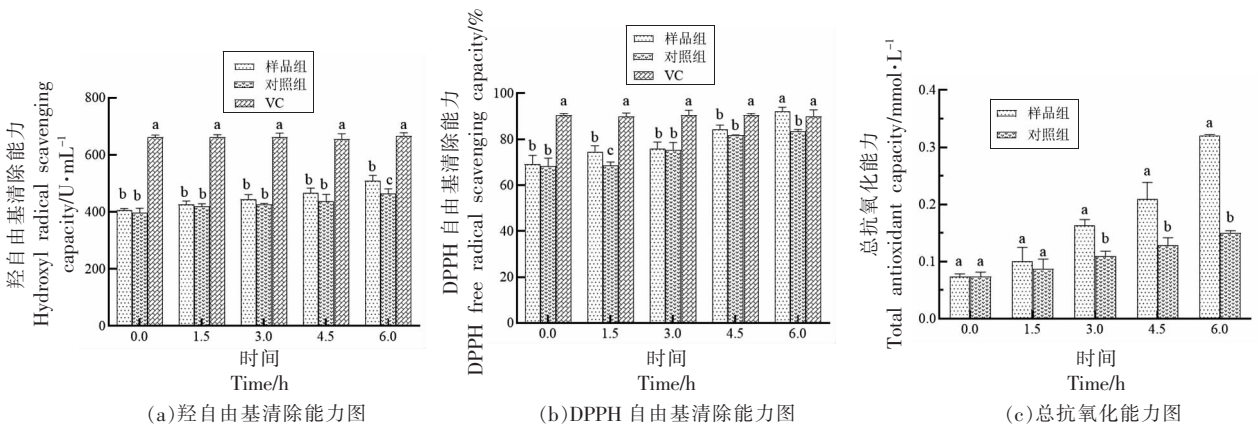
与对照组相比,样品组羟自由基清除能力升高了 44.48 U/mL(图 2a),DPPH 自由基清除能力升高了 7.89%(图 2b),总抗氧化能力提高了 0.0208 mmol/L(图 2c),添加 M-WPI 提高了保加利亚乳杆菌发酵乳抗氧化活性。

2.4 M-WPI 对保加利亚乳杆菌发酵乳代谢组学分析

2.4.1 主成分分析(PCA) 图 3 中 PCA 整体得分

为 71.4%,各组别内样本能较好的聚类在一起,表明同一水平下保加利亚乳杆菌发酵乳代谢特征相似。两组样本在图中分离程度好,反应出 M-WPI 对保加利亚乳杆菌发酵乳有明显的代谢特征差异。

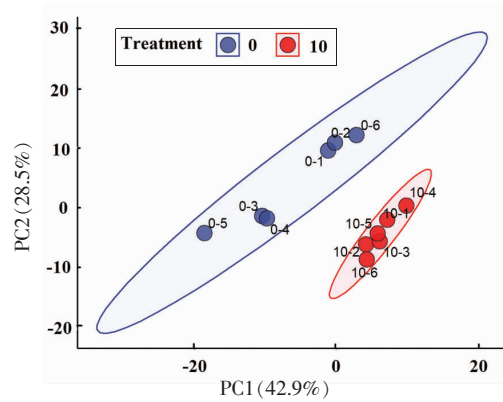
2.4.2 偏最小二乘判别分析 图 4a 看出两组之间呈现出一定的分离程度,表明 M-WPI 对保加利亚乳杆菌发酵乳产生了明显的影响。如图 4b 所示,置换检验得到 $R^2Y=0.949$, $Q^2Y=0.887$,值均大于 0.5 表明该组间代谢特征有显著性差异,且 R^2



注:不同字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)。

图2 M-WPI对发酵乳抗氧化能力的影响

Fig.2 Effects of M-WPI on antioxidant capacity of fermented milk



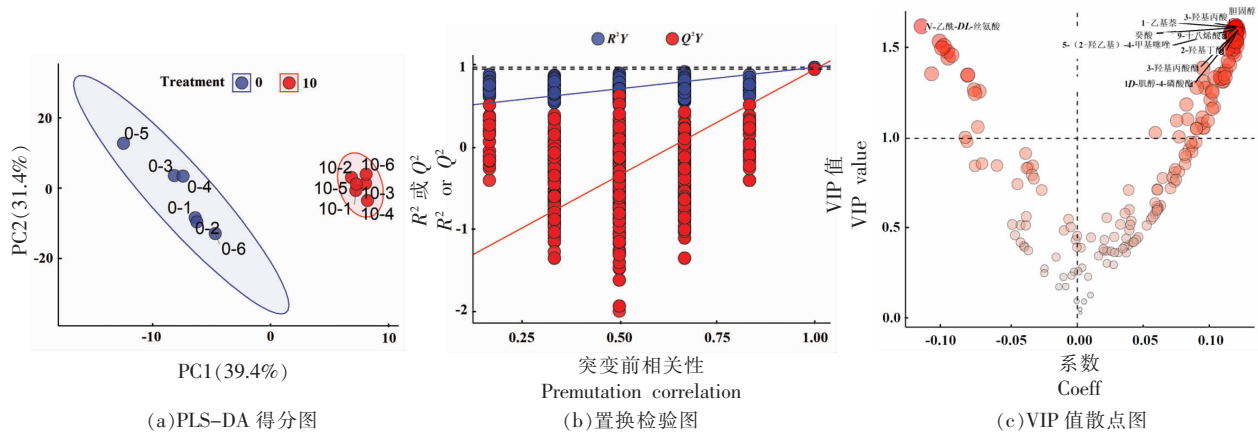
注:图例为组别;0. 对照组;10. 添加10 g/L M-WPI的发酵乳组。

图3 主成分分析得分图

Fig.3 Principal component analysis

趋势高于 Q^2 , 两者最右侧均高于其它点, 表明该模型具有较好的预测能力。VIP 值大于 1.0 在预测模

型中呈显著性差异, 如图 4c 表明代谢物能较好区分样品组与对照组。



注:a 图例为组别;0. 对照组;10. 添加10 g/L M-WPI的发酵乳组。

图4 PLS-DA分析

Fig.4 PLS-DA analysis

2.5 差异代谢物分析

通过差异倍数分析(FC)和火山图,显著性代谢物($P < 0.05$)共有 77 种(图 5a)。 $\log_2(FC) > 1$ 或者 < -1 的代谢物中样品组下调较为显著的有 *N*-乙酰基-*DL*-丝氨酸、6-氨基烟酸等;上调代谢物包括天冬氨酸、蜜二糖、胆固醇、油酸酰胺、谷氨酸、马来酰亚胺、9-十八碳烯酸、1-乙基萘、3-苯乳酸等(图 5b)。选取差异倍数 > 1.5 或 < 0.5 , $P < 0.05$, 且 VIP 值 > 1 的 33 种显著性差异代谢物质如表 3, 涉及碳水化合物、氨基酸、短链脂肪酸及有机酸类物质,部分差异代谢物丰度如图 6。

添加 M-WPI 后保加利亚乳杆菌发酵乳中乳糖的水解产物半乳糖和葡萄糖上调,M-WPI 中含有乳糖,可为保加利亚乳杆菌额外提供碳源,是提

高保加利亚乳杆菌存活率的原因之一; 癸酸作为短链脂肪酸类挥发性化合物, 可以为发酵乳增加香气^[25], 苹果酸可以提高发酵乳风味^[26], 这些可能是 M-WPI 保加利亚乳杆菌发酵乳香味浓郁的原因; 天冬氨酸、丙氨酸和谷氨酸上调, 乳脂肪球膜蛋白中的嗜乳脂蛋白中谷氨酸和丙氨酸含量较高, 水解后相关氨基酸含量上调, 可为保加利亚乳杆菌生长提供营养, 从而提高菌体的存活率^[27], 天冬氨酸、丙氨酸可以调控抗氧化酶活性, 从而提高抗氧化和免疫功能^[28-29], 可以提高保加利亚乳杆菌酸乳抗氧化活性, 同时, β -丙氨酸是泛酸和辅酶 A 等的重要组成成分, 是肌肽合成的重要前提物质, 具有抗疲劳和增强机体运动能力^[30]; *D*-天冬氨酸可以调节小鼠炎症细胞因子, 调控抗氧化酶活性,

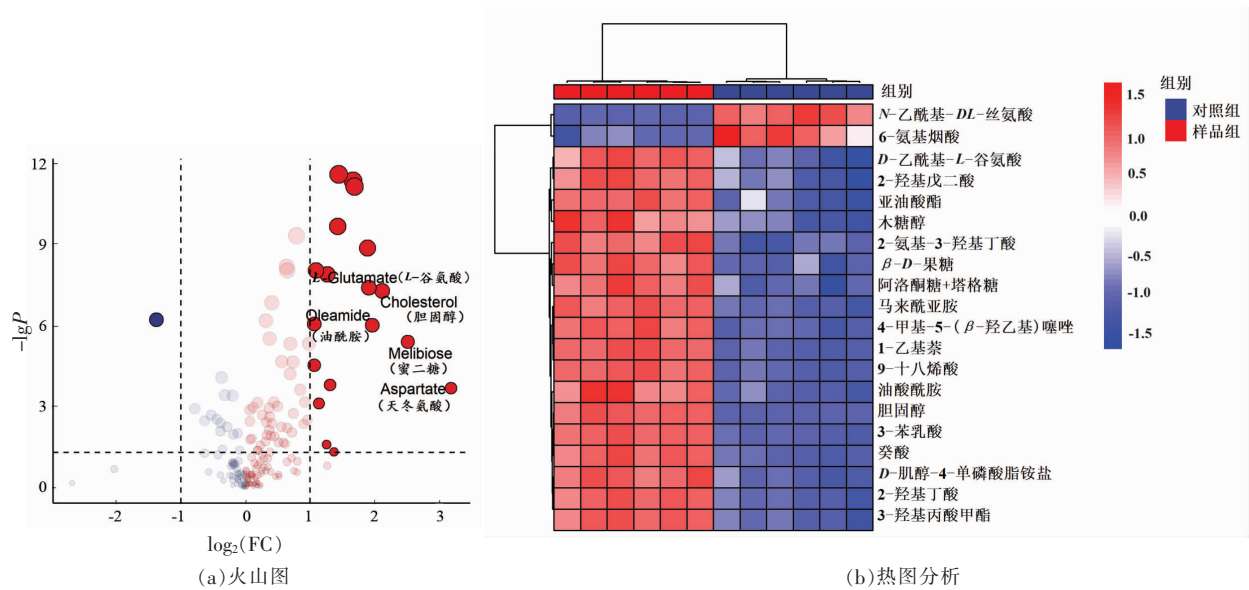
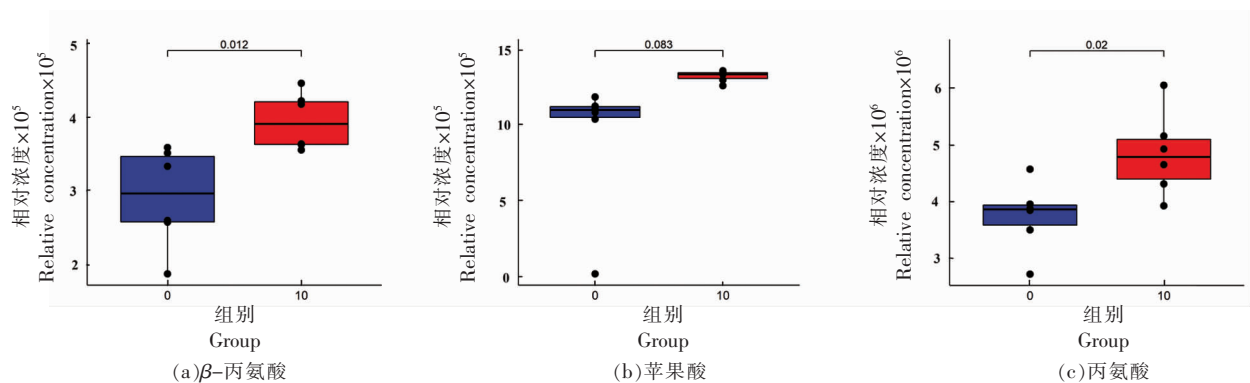
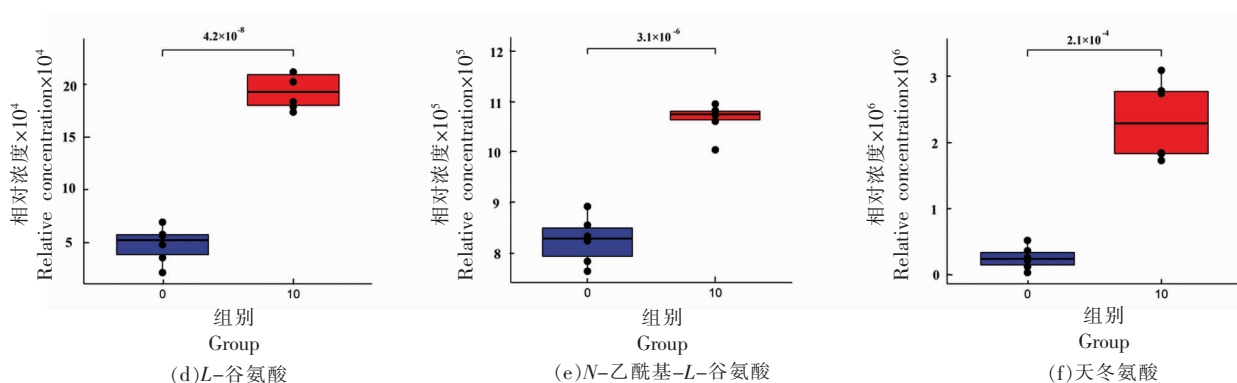


图 5 差异代谢物筛选

Fig.5 Differential metabolite screening





注: 0. 对照组; 10. 添加 10 g/L M-WPI 的发酵乳组。

图 6 部分差异代谢物丰度变化

Fig.6 Abundance changes of some differential metabolites

从而提高小鼠肠道的免疫功能^[29]; M-WPI 中磷脂含量较高, 本身可作为天然的抗氧化剂, 也可能与保加利亚乳杆菌发酵乳抗氧化活性增加有关; 3-苯基乳酸是一种天然抗菌物质, 对于延长发酵乳

的保质期有一定的作用^[31]; 酪氨酸含量增加, 其作为多巴胺和去甲肾上腺素的前体, 可以作为膳食补充剂给药, 具有增强记忆等作用^[32], 具有进一步研究的潜能。

表 3 差异代谢物筛选

Table 3 Differential metabolites screening

代谢物名称	$\log_2(\text{FC})$	$-\lg P$	VIP 值	代谢物类型
1,3-二羟基丙酮二聚体	0.4395	3.1631	1.3748	其它
2-甲基马来酸	-0.5311	2.6807	1.4477	支链脂肪酸类
丙氨酸	0.3093	1.7051	1.0828	氨基酸类
L-谷氨酸	1.9111	7.3806	1.5151	氨基酸类
3-羟基丁酸	-0.1969	3.3855	1.4847	其它、羟基酸(有机酸)
6-氨基烟酸	-0.3658	4.0576	1.5411	其它、吡啶羧酸
肌醇半乳糖苷二水合物	0.0718	2.4390	1.3176	碳水化合物类
阿洛糖+甘露糖	0.1247	2.9520	1.3349	碳水化合物类
天冬氨酸	3.1865	3.6762	1.4663	氨基酸类
β -D-果糖	0.4092	6.8175	1.5917	碳水化合物类
胆固醇	2.1189	7.2632	1.6284	脂类
马来酰亚胺	1.8930	8.8494	1.5805	其它
D-乙内酯	0.4117	2.3648	1.1882	其它、内酯
D-蔗糖醇	0.2664	2.6818	1.3185	碳水化合物类
D-木糖	0.3221	2.4196	1.2806	碳水化合物类
9-十八烯酸	1.6907	11.1172	1.6171	长链脂肪酸
半乳糖+葡萄糖	0.0735	2.8591	1.4087	碳水化合物类
十六烷酸	0.3698	2.9337	1.3571	长链脂肪酸
己酸	-0.6294	2.4646	1.4637	其它、羟基酸(有机酸)
羟胺	-0.4448	2.5280	1.3592	其它、非金属类化合物
苹果酸	-0.7822	2.9134	1.5152	其它、羟基酸(有机酸)
蜜二糖	2.5181	5.3767	1.4302	碳水化合物类
N-乙酰基-DL-丝氨酸	-1.3762	6.1912	1.6236	氨基酸类

(续表 3)

代谢物名称	log ₂ (FC)	-lgP	VIP 值	代谢物类型
N-乙酰基-L-谷氨酸	0.3737	5.5030	1.5478	氨基酸类
辛酸	-0.3188	3.4147	1.5028	中链脂肪酸
1-乙基萘	1.6673	11.3124	1.6180	其它
乳清酸	-0.3810	2.3866	1.3532	其它、嘧啶羧酸
丝氨酸	0.7384	4.6331	1.4966	氨基酸类
甘油醛	0.5672	4.6430	1.4976	碳水化合物类
油酸酰胺	1.9653	5.9968	1.5819	其它、脂肪酰胺类
蔗糖+塔格糖	0.3215	6.1578	1.5759	碳水化合物类
利比妥	0.1883	3.1364	1.3582	碳水化合物类
酪氨酸	0.3750	2.6211	1.2561	氨基酸类

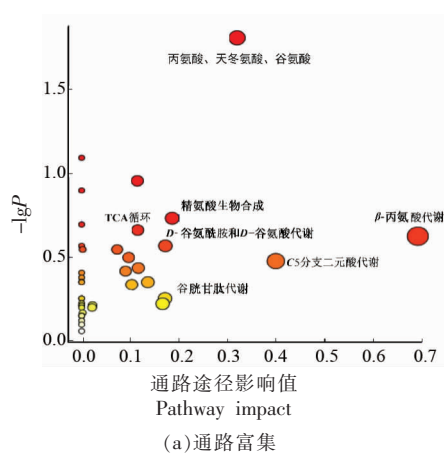
注:正、负值表示代谢物在试验组与对照组之间的变化趋势。正值表示试验组代谢物浓度升高,负值表示试验组代谢物浓度降低。

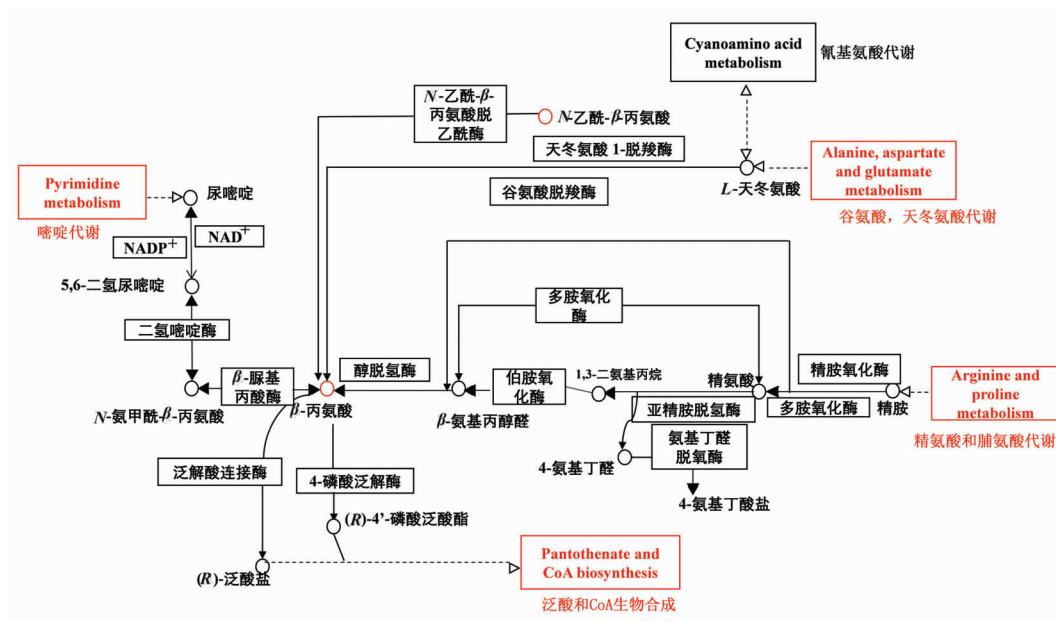
2.6 代谢通路研究

如表 4 所示,KEGG 富集了 19 条影响值大于 0 的代谢通路,主要包括氨基酸代谢途径、能量代谢途径以及酸类代谢途径。 β -丙氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,C5-分支二元酸代谢,精氨酸生物合成,D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢,谷胱甘肽代谢和三羧酸循环是主要的 7 个代谢途径(图 7a),其影响值分别为 0.69231,0.32000,0.40000,0.18641,0.17241,0.17162,0.11538。

β -氨基酸代谢是影响 M-WPI 保加利亚乳杆菌发酵乳的主要通路,通路中包含谷氨酸和天冬氨酸代谢、泛酸和 CoA 生物合成及其它代谢通路(如图 7b)。研究表明,精氨酸代谢主要路径是精氨酸酶催化产生精氨酸,从而进一步促进谷氨酸的生成,谷氨酸能够进一步代谢产生谷胱甘肽、脯氨酸、鸟氨酸及葡萄糖等,为乳酸菌提供营养物质

以满足自身需要^[33],半乳糖代谢为保加利亚乳杆菌提供碳源,从而为乳酸菌存活率提高提供依据^[34];糖酵解/糖异生、TCA 循环和丙酮酸代谢与大部分风味物质的形成有关^[35],从代谢通路角度说明 M-WPI 发酵乳口感和风味更佳;泛酸通过提高还原型谷胱甘肽含量提高抗氧化能力^[36],另外,王雨亭等^[37]表明谷胱甘肽和抗坏血酸不仅能降低膜脂过氧化带来的损害,而且还能决定蛋白质稳定性;丙氨酸和天冬氨酸等上调的代谢物具有增强机体免疫力、抗氧化、抗炎和抗衰老等功能^[38],进一步阐明 M-WPI 与保加利亚乳杆菌发酵乳抗氧化活性增强有关;嘧啶代谢产生的代谢物具有一定的抗肿瘤活性^[39],D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢通路中谷氨酰胺脱氨可以促进发酵乳产生功能性代谢物,并增强耐酸性,可为功能性发酵乳的开发提供理论基础^[40]。





(b)β-丙氨酸代谢

图 7 代谢通路

Fig.7 Metabolic pathway

表 4 代谢通路富集结果

Table 4 Metabolic pathway enrichment results

通路名称	总数	预期值	阳性数	原始 P 值	-lgP	霍尔姆调整	调整后 P 值	影响值
β-丙氨酸代谢	6	0.26305	1	0.23640	0.62636	1	1	0.69231
C5-分支二元酸代谢	9	0.39457	1	0.33317	0.47734	1	1	0.40000
丙氨酸,天冬氨酸和谷氨酸代谢	23	1.00840	4	0.01541	1.81220	1	1	0.32000
精氨酸生物合成	18	0.78914	2	0.18463	0.73371	1	1	0.18641
D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢	7	0.30689	1	0.27009	0.56850	1	1	0.17241
谷胱甘肽代谢	18	0.78914	1	0.55709	0.25408	1	1	0.17162
氨酰基-tRNA 的生物合成	45	1.97290	2	0.59886	0.22268	1	1	0.16667
乙醛酸和二羧酸的代谢	34	1.49060	2	0.44549	0.35116	1	1	0.13636
甲烷代谢	29	1.27140	2	0.36642	0.43602	1	1	0.11667
柠檬酸盐循环(TCA 循环)	20	0.87683	2	0.21729	0.66296	1	1	0.11538
半乳糖代谢	27	1.18370	3	0.11034	0.95728	1	1	0.11466
嘧啶代谢	35	1.53440	2	0.46069	0.33659	1	1	0.10314
磷酸戊糖途径	26	1.13990	2	0.31712	0.49877	1	1	0.09687
糖酵解/糖异生	30	1.31520	2	0.38259	0.41726	1	1	0.09037
精氨酸和脯氨酸代谢	24	1.05220	2	0.28383	0.54694	1	1	0.07317
泛酸和 CoA 生物合成	21	0.92067	1	0.61390	0.21190	1	1	0.02235
缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的生物合成	22	0.96451	1	0.63121	0.19983	1	1	0.02145
硫胺素代谢	25	1.09600	1	0.67871	0.16832	1	1	0.00211
丙酮酸代谢	24	1.05220	2	0.28383	0.54694	1	1	0.00207

3 结论

本研究发现 M-WPI 添加于保加利亚乳杆菌发酵乳,可以提高保加利亚乳杆菌的存活率,改善发酵乳质构及风味,并提高发酵乳的抗氧化活性。通过代谢组学初步分析,添加 M-WPI 后,引起主要的氨基酸代谢途径、能量代谢途径及酸类代谢途径等 7 条代谢途径的变化。半乳糖、葡萄糖等碳水化合物化合物的上调可能为保加利亚乳杆菌提供一定的营养物质,提高其存活率;苹果酸、癸酸等的上调可能与提高保加利亚发酵乳的口感、赋予发酵乳芳香等特性相关;丙氨酸、天冬氨酸等的上调能够促进丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸及 β -丙氨酸等代谢通路,从而调节谷胱甘肽代谢,与 M-WPI 保加利亚乳杆菌发酵乳抗氧化能力相关。因此 M-WPI 具有可应用于发酵乳的潜能,具有进一步开发研究的价值。

参 考 文 献

- [1] MARIA G, JORGE M, MARIA J, et al. New perspectives in fermented dairy products and their health relevance [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 72: 104059.
- [2] HANY E, AHMED A M, ASHWAA H. Texture, microstructure, and antioxidant characteristics of bio-fermented milk fortified with buttermilk nano-powder[J]. *International Dairy Journal*, 2022, 126: 105248.
- [3] 杨玉洁. 乳脂肪球膜蛋白对嗜酸乳杆菌 CICC 6074 胁迫条件下的保护机制[D]. 南京: 南京师范大学, 2021.
YANG Y J. Protection mechanism of milk fat globule membrane protein against acid stress in *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2021.
- [4] 孟维彬. 添加乳蛋白水解物配方奶粉及发酵乳的免疫功能评价[D]. 天津: 天津商业大学, 2011.
MENG W B. Evaluation of the immune function of milk formula and fermented milk with added milk protein hydrolysate[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2011.
- [5] 中国食品科学技术学会. 乳脂肪球膜及其配料的科学共识[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(4): 471-476.
Chinese Institute of Food Science and Technology. Scientific consensus on milk fat globule film and its ingredients[J]. *Journal of Chinese Institute Of Food Science and Technology*, 2022, 22(4): 471-476.
- [6] TANG H, SHENGHUA H, FANGSHUAI P, et al. The effects of milk fat globule membrane and its individual components on dough properties and bread quality[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(104): 102617-102625.
- [7] RHODES D, REITH W, TROWSDALE J. Regulation of immunity by butyrophilins[J]. *Annual Review of Immunology*, 2016, 34(1): 151-172.
- [8] ET-THAKAFY O, GUYOMARCH F, LOPEZ C. Lipid domains in the milk fat globule membrane: Dynamics investigated in situ in milk in relation to temperature and time[J]. *Food Chemistry*, 2017, 220(4): 352-361.
- [9] ZHENG H, JIMENEZ-FLORES R, EVERETT D W. Lateral lipid organization of the bovine milk fat globule membrane is revealed by washing processes [J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(10): 5964-5974.
- [10] TANG Y, SUN X C, HOU H Y, et al. Investigation of alterations in phospholipids during the production chain of infant formulas via HILIC-QTOF-MS and multivariate data analysis[J]. *Food Chemistry*, 2021, 364: 130414.
- [11] 富天昕, 冯玉超, 张丽媛, 等. 基于 GC-MS 技术对不同产地稻米的代谢组学分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(12): 176-181.
FU T X, FENG Y C, ZHANG L Y, et al. Metabolomic analysis of rice from different origins based on GC-MS technique[J]. *Food Science*, 2019, 40(12): 176-181.
- [12] 方贤胜, 吴涛, 肖良俊. 基于广泛靶向代谢组学的浅黄色和紫色核桃内种皮成分差异分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(12): 215-221.
FANG X S, WU T, XIAO L J. Differential analysis of inner seed coat composition of light yellow and purple walnuts based on extensive targeted metabolomics[J]. *Food Science*, 2021, 42(12): 215-221.
- [13] 周小理, 张欢, 周一鸣, 等. 基于代谢组学研究苦荞蛋白对高脂血症小鼠的干预作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 149-155.

- ZHOU X L, ZHANG H, ZHOU Y M, et al. Metabonomic study of the intervention effect of tartary buckwheat protein on hyperlipidemic mice [J]. Food Science, 2019, 40(5): 149–155.
- [14] PENG J, MA L, KWOK L, et al. Untargeted metabolic footprinting reveals key differences between fermented brown milk and fermented milk metabolomes [J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(4): 2771–2790.
- [15] HATSURO H, HIROYUKI N, HIDEYUKI O, et al. Characterization of unique metabolites in γ -aminobutyric acid-rich cheese by metabolome analysis using liquid chromatography–mass spectrometry [J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(11): 13039.
- [16] 余芳, 吕嘉桢, 张军蒙, 等. 几株乳酸菌的抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(4): 32–35.
- YU F, LÜ J L, ZHANG J M, et al. Research on antioxidant activity of several lactic acid bacteria strains [J]. China Condiment, 2017, 42(4): 32–35.
- [17] DONKOR O N, HENRIKSSON A, VASILJEVIC T, et al. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(10): 1181–1189.
- [18] 杨淑娟, 苗壮壮, 史嘉琪, 等. 乳双歧杆菌 Probio-M8 对发酵乳风味的影响及应用评价 [J]. 中国食品学报, 2022, 22(7): 256–266.
- YANG S J, MIAO Z Z, SHI J Q, et al. Effect of *Bifidobacterium lactis* Probio-M8 on fermented milk flavor and its application evaluation [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(7): 256–266.
- [19] 杜慧敏. 浓缩乳清蛋白发酵乳制品的制备研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2021.
- DU H M. Study on preparation of fermented dairy products by concentrated whey protein [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2021.
- [20] LI X M, LI X L, ZHOU A G. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits *in vitro* [J]. European Polymer Journal, 2007, 43(2): 488–497.
- [21] 于润众, 宗恩祥, 张丽媛, 等. 基于 GC-MS 分析不同品种小米代谢产物及代谢途径 [J]. 食品科学, 2021, 42(24): 199–205.
- YU R Z, ZONG E X, ZHANG L Y, et al. Analysis of metabolites and metabolic pathways in different varieties of foxtail millets (*Setaria italica* L.) based on gas chromatography–mass spectrometry [J]. Food Science, 2021, 42(24): 199–205.
- [22] 黄沁沁, 樊凤娇, 李彭, 等. GC-MS 和 LC-MS/MS 分析麦粉中烷基间苯二酚同系物组成 [J]. 食品科学, 2021, 42(14): 187–194.
- HUANG Q Q, FAN F J, LI P, et al. Analysis of alkylresorcinol homologues in wheat flour by GC-MS and LC-MS/MS [J]. Food Science, 2021, 42(14): 187–194.
- [23] LIU R, BAO Z X, ZHAO P J, et al. Advances in the study of metabolomics and metabolites in some species interactions [J]. Molecules, 2021, 26(11): 3311.
- [24] DONKOR O N, HENRIKSSON A, VASILJEVIC T, et al. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(10): 1181–1189.
- [25] SONG J X, CHEN Q Q, BI J F, et al. GC/MS coupled with MOS e-nose and flash GC e-nose for volatile characterization of Chinese jujubes as affected by different drying methods [J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127201.
- [26] 黄慧敏, 张伟国. 反相高效液相色谱法测定苹果酸发酵液中的有机酸 [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(5): 180–184.
- HUANG H M, ZHANG W G. Determination of organic acids in malic acid fermentation liquor by reversed phase HPLC method [J]. Food and Fermentation Industry, 2012, 38(5): 180–184.
- [27] CHENG Z Y, YAN X, WU J Y, et al. Effects of freeze drying in complex lyoprotectants on the survival, and membrane fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum* L1 and *Lactobacillus fermentum* L2 [J]. Cryobiology, 2022, 105: 1–9.
- [28] HILL C A, HAARIS R C, KIM H J, et al. Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity [J]. Amino Acids, 2007, 32(2): 225–233.
- [29] 胡鲜, 王晨昱, 刘娣, 等. D-天冬氨酸对葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎小鼠抗氧化和炎症反应的影响 [J]. 动物营养学报, 2021, 33(8): 4708–4718.
- HU X, WANG C Y, LIU D, et al. Effects of D-aspartic on antioxidant and inflammation of dextran sodium sulfate induced colitis of mice [J]. Journal of

- Animal Nutrition, 2021, 33(8): 4708–4718.
- [30] HILL C A, HAARIS R C, KIM H J, et al. Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity[J]. Amino Acids, 2007, 32(2): 225–233.
- [31] XU J J, SUN J Z, SI K L, et al. 3-Phenyllactic acid production by *Lactobacillus crustorum* strains isolated from naturally fermented vegetables[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 149: 111780.
- [32] CHRISTIAN F, GREGOR D, MAXIMILIAN A F, et al. Food for your mind? The effect of tyrosine on selective attention[J]. Journal of Cognitive Enhancement, 2020, 4: 285–295.
- [33] 张凯凯. 大菱鲆幼鱼几种功能性氨基酸营养代谢的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- ZHANG K K. Studies on nutritional metabolism of several functional amino acids for juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [34] SVENSSON M, WAAK E, SVENSSON U, et al. Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10): 6398–6400.
- [35] LAO-ON U, ATTWOOD P V, JITRAPAKDEE S. Roles of pyruvate carboxylase in human diseases: From diabetes to cancers and infection[J]. Journal of Molecular Medicine, 2018, 96(1): 1–11.
- [36] WANG B W, ZHANG X Y, YUE B, et al. Effects of pantothenic acid on growth performance, slaughter performance, lipid metabolism, and antioxidant function of Wulong geese aged one to four weeks[J]. Animal Nutrition, 2016, 2(4): 312–317.
- [37] 王雨亭, 李元敬, 楚福英, 等. 肠道菌群参与黑木耳黑色素改善小鼠 IDA 的代谢组学研究[J]. 食品科学, 2023, 44(11): 124–133.
- WANG Y T, LI Y J, CHU F Y, et al. Metabonomic study of the involvement of the intestinal microflora in the improvement of iron deficiency anemia (IDA) by *Auricularia auricula* Melanin in mice [J]. Food Science, 2023, 44(11): 124–133.
- [38] CRUZAT V F. Glutamine and skeletal muscle[M]. Western: Nutrition and Skeletal Muscle, 2019: 279–293.
- [39] CHEN Y, SIL T, ZHANG J H, et al. Uncovering the antitumor effects and mechanisms of shikonin against colon cancer on comprehensive analysis [J]. Phytomedicine, 2021, 82: 153460
- [40] LI Q, TAO Q Y, TEIXEIRA J S, et al. Contribution of glutaminases to glutamine metabolism and acid resistance in *Lactobacillus reuteri* and other vertebrate host adapted *Lactobacilli*[J]. Food Microbiology, 2020, 86: 103343.

Effects of Adding Whey Protein Powder Rich in Milk Fat Globule Membrane on the Metabolomics of Fermented Milk

Liu Feifan^{1,2}, Luo Mengfan¹, Zhao Jiayuan¹, Zhao Xuan¹, Kong Weimei¹, Wang Xiaozhi¹, Tan Donghu¹, Yang Jingpeng¹, Su Ya¹, Luo Haibo¹, Guo Yuxing^{1*}

(¹Nanjing Normal University, Nanjing 210000

²Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, Jiangsu)

Abstract Objective: To study the survival of *Lactobacillus bulgaricus* in *Lactobacillus fermented* milk before and after the addition of milk fat globule membrane (MFGM) enriched whey protein powder (M-WPI), the flavour of the fermented milk and the antioxidant capacity of the fermented milk. Metabolomics was used to analyse significantly different metabolic markers and their pathways of action in *Lactobacillus bulgaricus* fermented milks before and after addition of M-WPI. Methods: Differential metabolites in the metabolism of fermented milk before and after the addition of M-WPI were identified by means of principal component analysis of the samples, partial least squares discriminant analysis, heatmap analysis and KEGG enrichment analysis, and in this way the effects produced by M-WPI on the fermented milk were analysed. The results showed that the addition of M-WPI to skim milk increased the survival rate of *Lactobacillus bulgaricus* and increased the flavor and antioxidant activity of fermented milk. Principal component analysis (PCA) and

partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used to determine a total of 77 significantly different metabolites, involving 19 major metabolic pathways. Among them, glucose, galactose, and other metabolites were up-regulated, which improved the survival rate of *Lactobacillus bulgaricus*; capric acid and malic acid could effectively improve the taste and flavor of fermented milk. Alanine, aspartic acid and pantothenic acid were involved in β -alanine metabolism, which was related to the increase of antioxidant activity of fermented milk. This study provides a reference for the nutritional evaluation of the inclusion of M-WPI fermented milk as well as the development of related processing technologies and products.

Keywords milk fat globule membrane enriched whey protein concentrate; *Lactobacillus bulgaricus*; metabolomics; antioxidant; fermented milk