研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.05.006

高产叶酸植物乳杆菌的筛选及应用研究

张海燕， 柳陈坚， 何树芬， 李晓然*

（昆明理工大学 生命科学与技术学院，云南 昆明 650500）

摘要：人类自身不能合成叶酸，主要从食物中摄取。植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*，*Lb. plantarum*）能够产生叶酸，且是公认的肠道益生菌。本研究利用高效液相色谱检测方法，从 34 株分离自云南传统发酵食品的植物乳杆菌中筛选出高产叶酸植物乳杆菌，结果显示，34 株植物乳杆菌均具有合成叶酸的能力，其中 *Lb. plantarum* SP8–7，JH–M1–6–30 和 YML4–3 三株菌的叶酸产量最高，分别为 1.492，1.360 μg/mL 和 1.312 μg/mL。将其作为发酵菌株制作酸奶和发酵大豆，*Lb .plantarum* JH–M1–6–30 与 *Lb. plantarum* YML4–3 可以联合用于富含叶酸酸奶的制作，而 *Lb. plantarum* SP8–7 可以用于制作富含叶酸的发酵大豆。

关键词：植物乳杆菌；叶酸；高效液相色谱法；酸奶；发酵大豆

中图分类号：Q 939.99　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2018)05—0487—08

Screening of *Lactobacillus plantarum* with High Level Folate and Their Application Researches

ZHANG Haiyan， *LIU Chenjian*， *HE Shufen*， *LI Xiaoran**

（Faculty of Life Science and Technology，Kunming University of Science and Technology，Kunming 650500，China）

Abstract：The human being can not synthesize folate by themselves，mainly from food. *Lactobacillus plantarum* （*Lb. plantarum*） can produce folate，and recognized as an intestinal probiotics. Studying higher-yield folate *Lb. Plantarum*，which isolated from Yunnan traditional fermented food，totaled 34 strains，combining high performance liquid chromatography（HPLC）. Through comparing，the 34 *Lb. Plantarum* also have the ability to synthesize folate，and the three highest yields are *Lb. plantarum* SP8-7，JH-M1-6-30 and YML4-3，1.492，1.360 μg/mL and 1.312 μg/mL respectively. In the aspect of applied research，*Lb. plantarum* JH-M1-6-30 and *Lb. plantarum* YML4-3 can be used in producing yoghurt which containing higher-yield folate，and *Lb. plantarum* SP8-7 can be used in producing acid douchi which containing higher-yield folate.

Keywords：*Lactobacillus plantarum*，folate，high performance liquid chromatography，yoghurt，fermented soybean

收稿日期：2015–09–17

基金项目：国家自然科学基金项目(31471716)。

* **通信作者**：李晓然(1984—)，女，河北邯郸人，副教授，理学博士，硕士研究生导师，主要从事微生物分子生态学研究。

E–mail：starkeyran@163.com

引用本文：张海燕，柳陈坚，何树芬，等. 高产叶酸植物乳杆菌的筛选及应用研究[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(05)：487–494.

叶酸是一种由喋啶、对氨基苯甲酸（p-aminobenzoic acid,pABA)和1个或多个谷氨酸结合而成的水溶性B族维生素[1],由H.K. Mitchell等首次从菠菜叶中分离纯化而来,并由此得名[2]。对人类而言,益生菌来源的叶酸,有着安全性高、吸收效果好、无毒副作用等优势，植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)是人体胃肠道的益生菌群,不仅具有维持肠道菌群平衡,降低胆固醇水平,提高机体免疫力等多种功能[3-6],且具有很强的产叶酸能力[7-10]。植物乳杆菌可以作为开发富含叶酸功能性食品的理想菌种,但是相关的应用研究仍然较少。

叶酸的检测方法众多,最早使用的是传统的微生物法,该法是在1943年Stokstad等发现富含叶酸的肝脏和酵母浸提物对鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*）和乳酸链球菌（*Streptococcus lactis*,*S. lactis*)的生长状况产生影响的情形下诞生的,具有实验周期长,工作量大,重复性差等缺点[11-12]。其他的一些检测方法,如同位素放射免疫法,气相色谱-质谱连用检测,克隆酶供体免疫测定法(CEDIA)[13]等,也因存在着各种缺陷,均未得到广泛的应用。高效液相色谱法(HPLC),能较好地检测不同形式的叶酸,且不会受到食品中酶类的影响[14-15]。

筛选高产叶酸的植物乳杆菌,用于酸奶和发酵大豆的制作,进而选出富含叶酸的发酵食品。这样的发酵食品在为机体提供益生菌和叶酸的同时,也能抑制其他潜在致病菌的生长、延长食品储存时间;发酵食品可以不需烹饪直接食用,降低了叶酸的损失率[16-17]。本研究选用高效液相色谱法,对34株植物乳杆菌的叶酸合成能力进行检测,从中挑选出三株高产叶酸的菌株,对这三株菌株参与发酵的酸奶、发酵大豆的叶酸含量进行评定,选出能够实际推广应用的富含叶酸的发酵食品,为植物乳杆菌发酵叶酸的工业化开发提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

34株植物乳杆菌均是由本课题组从云南省传统发酵食品中分离获得(见表1),按1.0×10^9 cfu/mL浓度保存于-80 ℃冰箱中,作为实验菌种[16,18-20]。

表1 34株乳杆菌来源

Table 1 Sources of 34 LAB

菌株	采集地	来源
QB3-1	丘北	豆豉
QB3-3	丘北	酸奶
QBLT3-1	丘北	豆豉
YML-2	易门	豆豉
YML-4-3	易门	豆豉
YML-4-5	易门	豆豉
YMBLT-3-1	易门	豆豉
KY6-3L	开远	豆豉
KY6-2L	开远	豆豉
SP8	石屏	豆豉
SP8-7	石屏	豆豉
LC5-1	绿春	豆豉
LC5-2	绿春	豆豉
HH4-1	红河	豆豉
HH4-2	红河	豆豉
HH4-7	红河	豆豉
HH09-3-1	红河	豆豉
JH-M1-6-4	景洪	香肠
JH-M1-6-7	景洪	香肠
JH-M1-6-8	景洪	香肠
JH-M1-6-9	景洪	香肠
JH-M1-6-22	景洪	香肠
JH-M1-6-23	景洪	香肠
JH-M1-6-24	景洪	香肠
JH-M1-6-27	景洪	香肠
JH-M1-6-28	景洪	香肠
JH-M1-6-29	景洪	香肠
JH-M1-6-30	景洪	香肠
JH-M1-6-31	景洪	香肠
JH-M1-6-32	景洪	香肠
JH-M1-6-33	景洪	香肠
YY-2-6	原阳	水腌菜
YY-2-8	原阳	水腌菜
YY-2-10	原阳	水腌菜

MRS肉汤培养基(g/L):葡萄糖 20.0;蛋白胨10.0;牛肉膏 8.0;酵母浸膏 4.0;Tween-80 1 mL;KH_2PO_4 2.0;CH_3COONa 5.0;$C_6H_5O_7(NH_4)_3$ 2.0;$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.2;$MnSO_4\cdot4H_2O$ 0.05,蒸馏水定容,调pH至6.5±0.2。

NB培养基(g/L):结晶乙酸钠 5;牛肉粉 3;蛋白胨 10,蒸馏水定容。

FACM 培养基:Folic Acid Casei Medium,叶酸酪蛋白培养基,BD,英国。

去 pABA FACM 培养基:活性炭处理酪蛋白胰酶消化物 10.0 g;右旋糖 40.0 g;乙酸钠 40.0 g;磷酸氢二钾 1.0 g;磷酸二氢钾 1.0 g;DL-色氨酸 0.2 g;L-门冬酰胺 0.6 g;L-盐酸半胱氨酸 0.5 g;硫酸腺嘌呤 10.0 mg;盐酸鸟嘌呤 10.0 mg;尿嘧啶 10.0 mg;黄嘌呤 20.0 mg;聚山梨醇 80 0.1 g;谷胱甘肽(还原型) 5.0 mg;硫酸镁 0.2 g;氯化钠 20.0 mg;硫酸亚铁 20.0 mg;硫酸锰 15.0 mg;核黄素 1.0 mg;维生素 b6 4.0 mg;维生素 b1 400.0 μg;泛酸钙 800.0 μg;烟酸 800.0 μg;生物素 20.0 μg;抗坏血酸钠 500 mg;加适量蒸馏水溶解后,定容至 1 L。

1.2 主要仪器

LC-15C 高效液相色谱(HPLC),日本岛津国际贸易公司产品;Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱,5 μm,4.6×250 μm,安捷伦公司产品;SK5200HP 超声波清洗器 ,上海科导超声仪器有限公司产品。

HPLC 仪器条件:色谱柱(Agilent Eclipse XDB-C18,5 μm,4.6×250 μm);检测波长:254 nm;流速:1 mL/min;进样量:10 μL;柱温:30 ℃;洗脱条件:0~30 min,100%磷酸缓冲液,30~70 min,50%的甲醇水溶液。

1.3 方法与步骤

1.3.1 产叶酸植物乳杆菌的初步筛选

将-80 ℃冷冻保存的植物乳杆菌取出并迅速解冻,将细胞浓度为1×10^9 cfu/mL 的菌液接种至灭菌 MRS 肉汤培养基中,置于 37 ℃恒温静止培养 18 h 后,吸取 1 mL 菌液于 2 mL 离心管中,5 000 r/min、4 ℃,离心 25 min 后,弃上清液,往离心管中先加 1 mL 的生理盐水,漩涡震荡混匀后再离心,如此反复 3 次离心洗涤,最后将菌体稀释 100 倍,按每 5 mL FACM 培养基中接种 50 μL 菌液比例,将菌体的 100 倍稀释液接种于 5 mL FACM 培养基中,静置培养 18 h,反复 5 次洗涤与接种工作。

1.3.2 HPLC 法检测植物乳杆菌叶酸产量

1)样品前处理。将长势良好菌株的 FACM 培养液,于 50 mL 的离心管中,5 000 r/min、4 ℃,离心 25 min,取上清液,冷冻干燥后作为叶酸检测用。

2)叶酸的 HPLC 检测

(1)标准曲线的制作

准确称取 0.01 g 叶酸标准品(纯度>97%,精确到小数点后四位),加入 10 mL 氢氧化钾溶液,充分溶解后,加蒸馏水定容至 1 L 得 10 μg/mL 标准溶液。分别配制成质量浓度为 0.25、0.5、1.0、2 μg/mL 的标准溶液。将这 4 个标准溶液上机分析,以叶酸质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,在 0~2 μg/mL 质量浓度范围内绘制叶酸标准曲线。

(2)叶酸标准品的 HPLC 检测

向每个冷冻干燥样品管中加 1 mL 无菌水,充分溶解后,0.45 μm 水系滤膜过滤除去杂质,用于上机分析,所用流动相及有机溶剂需在上机前超声脱气 30 min,以除去溶液内的气体,防止溶剂内的气泡堵塞管道和色谱柱。

1.3.3 pABA 对植物乳杆菌叶酸产量的影响

配制不同 pABA 质量浓度的 FACM 培养基,研究 pABA 质量浓度对 *Lb. Plantarum* JH-M1-30 叶酸产量的影响。选取 6 个 pABA 质量浓度的 FACM 培养基(分别为 0,10,20,30,40,60 mg/L),将 *Lb. Plantarum* JH-M1-30 37 ℃静置培养 24 h。取 1 mL 菌液,12 000 r/min,4 ℃,离心 15 min,取上清液,经 0.45 μm 滤膜过滤后上机检测。

1.3.4 高产叶酸植物乳杆菌的应用研究

1)植物乳杆菌的菌种活化及洗涤

各取 30 μL *Lb. plantarum* SP8-7,*Lb. plantarum* JH-M1-6-30 和 *Lb. plantarum* YML4-3 的菌液,接种至 5 mL MRS 肉汤培养基中,37 ℃恒温静置培养 48 h;按每 5 mL MRS 肉汤培养基中接种 50 μL 菌液比例,将 3 株植物乳杆菌菌液分别接种于 5 mL MRS 肉汤培养基中,37 ℃静置培养 24 h。按同样的比例将培养液分别接种到 50 mL MRS 肉汤培养基中,37 ℃静置培养 24 h,7 000 r/min、4 ℃,离心 20 min,弃上清液,往离心管中先加少量生理盐水吹打菌体悬浮后,再定容至 50 mL,漩涡震荡混匀后再离心,如此反复 3 次离心洗涤,最后加 5 mL 生理盐水,悬浮菌体待用。

2)酸奶、发酵大豆的制作

(1)酸奶的制作

取上述菌悬液 1 mL 分别接种于 100 mL 的纯奶中,37 ℃恒温培养 24 h 后,置于 4 ℃冰箱后发酵。

(2)发酵大豆的制作

将 4 份温水浸泡过夜的 120 g 大豆,在高压蒸汽灭菌锅中 121 ℃灭菌 40 min,取出一份作为空白对照,各取 1 mL 的上述菌悬液分别接种于另外 3

份大豆中,搅拌均匀后,37 ℃培养 24 h,置于 4 ℃冰箱后发酵。

3)酸奶和发酵大豆叶酸产量检测

(1)样品前处理

酸奶前处理:分别称取 5 g 经 *Lb. plantarum* SP8-7,*Lb. plantarum* JH-M1-6-30 和 *Lb. plantarum* YML4-3 发酵前后的纯奶和酸奶,置于 50 mL 离心管中,加 5 mL 磷酸盐保护液和 5 mL 甲醇,150 r/min 震荡 4 h 后,100 ℃煮沸 5 min,离心后取上清液于烧杯中,70 ℃水浴 15 min,使甲醇挥发完全,最后冷冻干燥备用。

发酵大豆前处理:Lin 等[21]用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液作为保护剂添加人类血浆之后煮沸 15 min 来处理牛奶样品后检测叶酸含量。本试验在上述方法的基础上对样品进行处理。具体步骤如下:分别取适量的发酵前后的大豆样品,液氮研磨成粉末状,各取 1 g 粉末于 50 mL 的离心管中,分别加 5 mL 磷酸盐保护液和 5 mL 甲醇,150 r/min 震荡 4 h 后,100 ℃煮沸 5 min,离心后取上清液于烧杯中,70 ℃水浴 15 min,使甲醇挥发完全,随后冷冻干燥备用。

(2)HPLC 上机检测

往上述冷冻干燥后的样品中各加 1 mL 蒸馏水,溶解均匀后,用 0.45 μm 水系膜过滤,过滤后上机检测,流动相为体积分数 8%甲醇水溶液。样品上机检测完成后,换用体积分数 8%甲醇水溶液将管道以及色谱柱中原有磷酸盐缓冲液置换出来,再用 100%甲醇溶液冲柱子,待基线平行后,换 100%乙腈冲柱子(30 min 以上),以保护色谱柱。

1.3.5 *数据统计分析* 所有样品上机检测 3 次,将所得峰面积作为 *Y* 值代入叶酸标准曲线方程式中计算 *X* 值,所得 *X* 值即为叶酸值,每个样品得到 3 个叶酸值,求平均值后即是样品的叶酸质量浓度。绘图并标出相应的误差线或标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 产叶酸菌株的初步筛选

34 株植物乳杆菌在 FACM 培养基上培养 18 h 后,观察植物乳杆菌的生长情况,若长势良好,初步认定其具有叶酸合成能力,用于后续实验。反之,则不具备叶酸合成能力,因为 FACM 是严格的去叶酸培养基,培养基中没有叶酸,而细菌生长需要叶酸,只有自身能合成叶酸的菌株才能在 FACM 中生长,无叶酸合成能力的植物乳杆菌不能在 FACM 培养基上生长。结果显示,34 株植物乳杆菌均能很好地生长,初步判断这 34 株植物乳杆菌都能产生叶酸。迄今为止,曾报道过的能产叶酸的乳酸菌并不多,主要属于双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和乳球菌属(*Lactococus*),其中乳球菌属中 *L. lactisssp cremoris* CM22 和 *L. lactisssp lactis* CM28 是最早发现具有叶酸合成能力的乳酸菌,但产量较低[22-25]。

2.2 叶酸的 HPLC 检测

2.2.1 *色谱行为* 叶酸 HPLC 分析结果如图 1 和 2 所示,图 1 为质量浓度 2 μg/mL 标准品 HPLC 色谱图,出峰时间为 21.08 min,峰形均匀且分离程度良好。图 2 为样品 HPLC 色谱图。从图 2 可以看出这种检测方法可用于叶酸的检测。

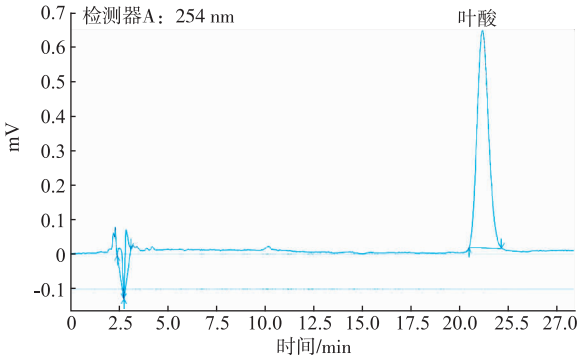


图 1 HPLC 法检测叶酸标准品色谱

Fig. 1 Chromatogram of folate standard by HPLC

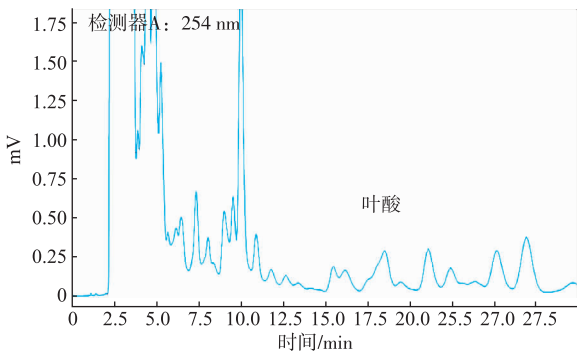


图 2 HPLC 法洗脱样品中叶酸色谱

Fig. 2 Chromatogram of sample by HPLC

2.2.2 *叶酸标准曲线的绘制* 通过对 4 个标准溶液进行 HPLC 检测分析,以叶酸质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制叶酸标准曲线,并标出叶酸的

定量直线方程和 R^2 值,如图 3 所示。如图所示 R^2=0.999,R=0.999 49,达到了 R 大于 3 个 9 的要求,定量直线方程为 y=12.688x−0.035 8。

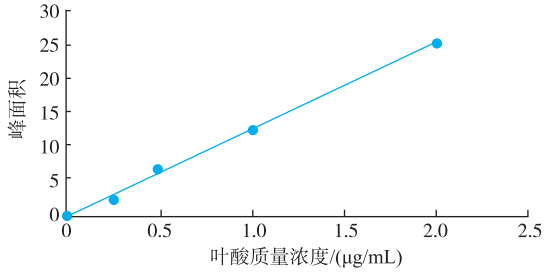


图 3　叶酸标准曲线

Fig. 3　Standard curve of folate by HPLC

2.2.3　FACM 培养植物乳杆菌的叶酸产量的 HPLC 检测　将 34 株植物乳杆菌的培养液离心后取上清液,用于 HPLC 检测,检测结果见图 4,植物乳杆菌叶酸质量浓度在 0.2~1.5 μg/mL 之间,其中 LC5−1 菌株的叶酸质量浓度最低,为 0.264 μg/mL;*Lb. plantarum* SP8−7 的叶酸质量浓度最高,达到 1.492 μg/mL,此外,*Lb. plantarum* JH−M1−6−30 和 *Lb. plantarum* YML4−3 的叶酸产量仅次于 SP8−7,分别达到 1.36 μg/mL 和 1.312 μg/mL。上述 3 株植物乳杆菌均具有高产叶酸的能力,故将其应用于富含叶酸发酵食品的研究中。

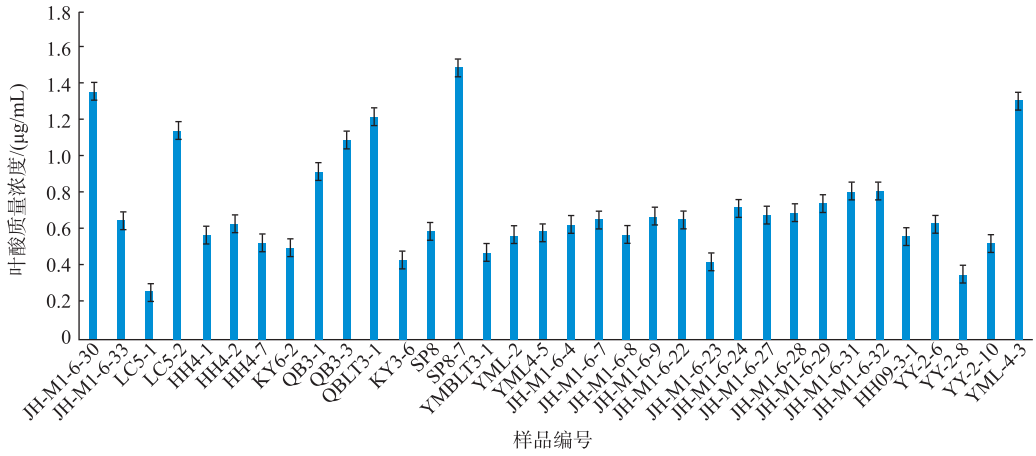


图 4　样品叶酸质量浓度

Fig. 4　Folate content of sample

2.3　底物 pABA 对 *Lb. plantarum* JH−M1−6−30 叶酸产量的影响

Lb. plantarum JH−M1−6−30 经不同 pABA 质量浓度浓度的 FACM 培养后,所得上清液叶酸含量见图 5,当 pABA 质量浓度为 0 时,*Lb. plantarum* JH−M1−6−30 叶酸产量最低,pABA 质量浓度为 20 mg/L 时,叶酸产量达到最大值,为 1.203 μg/mL。总体来看,叶酸产量呈先上升后下降的趋势。*Lb. plantarum* JH−M1−6−30 叶酸产量随 pABA 增加而先增加,到达峰值后降低,说明在一定范围内添加 pABA 能有效增加叶酸产量,过量的 pABA 反而会抑制植物乳杆菌产叶酸。

2.4　纯奶和大豆发酵前后叶酸含量的测定结果

2.4.1　纯奶发酵前后叶酸含量的测定结果　利用 HPLC 检测方法对 *Lb. plantarum* SP8−7,*Lb. plantarum* JH−M1−6−30 和 *Lb. plantarum* YML4−3 发酵的酸奶和未发酵的纯奶的上清液中的叶酸进行检测,检测结果以叶酸质量浓度(μg/mL)为纵坐标,以纯奶和酸奶编号为横坐标作图,得出 3 株菌发酵纯奶前后的叶酸变化,如图 6 所示。从图 6 中可以看出纯奶经发酵后叶酸质量浓度比发酵前高出很多。原料奶中叶酸质量浓度为 0.021 2 μg/mL,

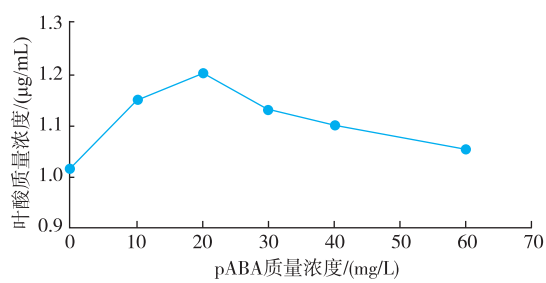


图 5　pABA 对 *Lb. plantarum* JH−M1−6−30 叶酸产量的影响

Fig. 5　Influence of pABA on folate production by *Lb. plantarum* JH−M1−6−30

经YML4-3 发酵的酸奶中叶酸质量浓度较高，是发酵前的 30 多倍，其次是*Lb. plantarum* JH-M1-6-30,虽然 *Lb. plantarum* SP8-7 是 3 株菌中叶酸产量最低的,但和发酵前的纯奶相比,仍能高出 20 倍以上。Crittenden 等[26]利用 *B.animalis* CSCC1941 和 *S. thermophiles* CSCC 2000 发酵脱脂乳后其叶酸产量提高了 6 倍。与之相比,*Lb. plantarum* 在高产叶酸的乳酸菌发酵酸奶的应用中,具有更加广阔的市场前景。

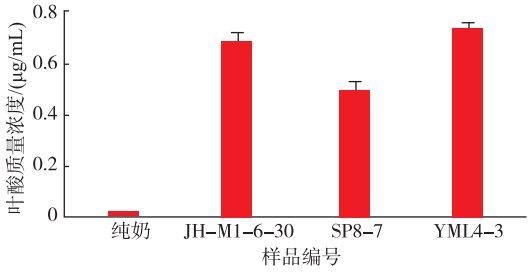


图 6　植物乳杆菌发酵前后奶的叶酸质量浓度

Fig. 6　Folate content of milk before and after *Lb. plantarum* fermentation

2.4.2　大豆发酵前后叶酸质量分数测定结果　通过对使用 *Lb. plantarum* SP8-7,*Lb. plantarum* JH-M1-6-30 和 *Lb. plantarum* YML4-3 发酵大豆和原料大豆中叶酸含量进行检测,检测结果中以叶酸浓度(μg/g)为纵坐标,以原料大豆和发酵大豆编号为横坐标作图,从而得出原料大豆发酵前后的叶酸变化,如图 7 所示。*Lb. plantarum* JH-M1-6-30 和 *Lb. plantarum* YML4-3 发酵后叶酸质量分数反而显著低于原料大豆,原料大豆叶酸质量分数为 7.375 μg/g,原料大豆经 *Lb. plantarum* JH-M1-6-30 发酵后,叶酸质量分数几乎减少了一半。经 *Lb. plantarum* YML4-3 发酵后叶酸质量分数也减少了近 1/3,而经 *Lb. plantarum* SP8-7 发酵后的发酵大豆，其叶酸质量分数是原料大豆的 3 倍左右。Mo 等[27]研究了不同工艺制作的豆酵饼和豆腐,并对其叶酸、维生素 B12 和大豆异黄酮的含量进行测定,得出的结论是大豆经乳酸菌发酵后叶酸含量下降了。原因可能是样品大豆中有充足的叶酸，而 *Lb. plantarum* JH-M1-6-30 和 *Lb. plantarum* YML4-3 在叶酸存在的情况下,自身不产生叶酸，而是先利用原材料中的叶酸,在没有叶酸存在的情况下菌株自身才能利用其它底物合成叶酸以供自身生命活动所需。而 *Lb. plantarum* SP8-7 发酵大豆后,叶酸含量增加至原料大豆的 3 倍,可能是这株植物乳杆菌在叶酸存在的情况下也能自身合成叶酸,其合成叶酸不受原材料中叶酸存在与否的影响,具体原因还需对本株菌的叶酸代谢途径做进一步分析。综上,*Lb. plantarum* SP8-7 是发酵大豆高产叶酸的最佳菌株。

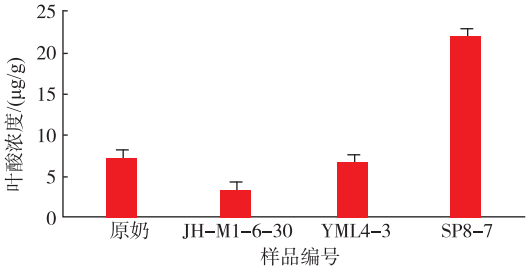


图 7　植物乳杆菌发酵前后大豆的叶酸质量分数

Fig. 7　Folate content in soybean before and after *Lb. plantarum* fermentation

3 结　语

选用 3 株高产叶酸菌株,*Lb. plantarum* SP8-7,*Lb. plantarum* JH-M1-6-30 和 *Lb. plantarum* YML4-3 来发酵纯奶和大豆,*Lb. plantarum* JH-M1-6-30 发酵纯奶后,叶酸产量增加了 20 多倍,因此,实际生产可以选用 *Lb. plantarum* JH-M1-6-30 制作富含叶酸的酸奶。经 *Lb. plantarum* JH-M1-6-30 发酵的大豆,口感和整体感官性能都很好,但发酵后叶酸产量下降了很多,因此不适合将其开发为叶酸补充食品。选用 *Lb. plantarum* YML4-3 发酵纯奶和发酵大豆整体效果不错，纯奶经发酵后叶酸的产量增加,但是大豆经发酵后叶酸的产量仍然较低,因此也可将 *Lb. plantarum* JH-M1-6-30 与 YML4-3 联合用于富含叶酸酸奶的制作。经 *Lb. plantarum* SP8-7 发酵获得的酸奶,不仅凝固性和口感都较差,而且叶酸产量也不高,但是由其发酵而得的发酵大豆,整体感官评价很好,叶酸产量也明显增加,因此,可以选用 *Lb. plantarum* SP8-7 制作富含叶酸的发酵大豆。

虽然在所有的乳酸菌中,植物乳杆菌是叶酸产量最高的菌种,但总体而言,远没有达到大规模生产的要求,仍要解决诸多的问题。由于菌体自身的生命活动也需要叶酸的参与,叶酸的产生和消耗并存，因此如何在保持菌体基本生命活动的同时,还能大量产生叶酸,是将来研究的重点。要解决这一难题,掌握发酵时间,选择合适的发酵条件和发酵基质相当重要,也可以利用基因工程对菌株产叶酸的相关基因进行改造。

参考文献:

[1] GHAOUTH A E,ARUL J,PONNAMPALAM R,et al. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries[J]. **Journal of Food Science**,1991,56(6):1618-1620.

[2] MITCHELL H K,SNELL E E,WILLIAMS R J. The concentration of "folic acid" [J]. **Journal of the American Chemical Society**,1941,63(8):2284-2284.

[3] GUO Feng,FAN Lei,LIAO Yuxin,et al. Degradation of cholesterol with *Lactobacillus plantarum* M1-UVs29 in vitro[J]. **Chinese Journal of Biologicals**,2014,27(6):803-806.(in Chinese)

[4] ZHANG Zhongyi,GUO Yanqiang,LIU Xiaojun,et al. Increasing conjugated linoleic acid concentration in fermented milk by using *Lactobacillus plantarum* LT 2-6[J]. **Transactions of The Chinese Society of Agricultural Engineering**,2005,21(6):130-134.(in Chinese)

[5] JENSEN H,DROMTORP S M,AXELSSON L,et al. Immunomodulation of monocytes by probiotic and selected lactic Acid bacteria[J]. **Probiotics Antimicrob Proteins**,2015,7(1):14-23.(in Chinese)

[6] MAZZOLI R,BOSCO F,MIZRAHI I,et al. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries[J]. **Biotechnology Advances**,2014,32(7):1216-1236.

[7] MASUDA M,IDE M,UTSUMI H,et al. Production potency of folate,vitamin B (12),and thiamine by lactic acid bacteria isolated from Japanese pickles[J]. **Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry**,2012,76(11):2061-2067.

[8] HUGENSCHMIDT S,SCHWENNINGER S M,GNEHM N. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate[J]. **International Dairy Journal**,2010,20(12):852-857.

[9] SUN-YOUNG P,JEONG-RYONG D,YOUNG-JIN K,et al. Physiological characteristics and production of folic acid of *Lactobacillus plantarum* JA71 isolated from jeotgal,a traditional korean fermented seafood[J]. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**,2014,34(1):106-114.

[10] KARILUOTO S,AITTAMAA M,KORHOLA M,et al. Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs[J]. **Int J Food Microbiol**,2006,106(2):137-143.

[11] ARCOT A,SHRESTHAB A. Folate:methods of analysis[J]. **Trends in Food Science & Technology**,2005,16:6-7.

[12] CHANG Naning,JIANG Ling,PU Xun,et al. Research progress on methodology for folate detection in crops [J]. **Journal of Agricultural Science and Technology**,2010,12(2):44-49.(in Chinese)

[13] HAO Ling,TANG Yi,LI Zhu. Research progress on methodology for folate detection [J]. **Chinese Journal of Preventive Medicine**,1999,33(3):177-179.(in Chinese)

[14] RUGGERI S,VAHTERISTO L T,AGUZZI A,et al. Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography[J]. **J Chromatogr A**,1999,855(1):237-245.

[15] LIU Lizhi,LUO Xiaoyan,ZHOU Hongwei. Determination of folic acid in infantile food by HPLC with post-column derivatization [J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**,2007,17(7):1179-1180.(in Chinese)

[16] LI Jie,LUO Yiyong,LIU Chenjian. Study on the main organic acids and antimicrobial activity of Pediococcus acidilactici fermentation[J]. **Food and Fermentation Industries**,2014,40(5):124-129.(in Chinese)

[17] ZHANG Zhonghua,LI Xiaoran,LIU Chenjian,et al. Development of HPLC method to assay DL-3-phenyllactic acid in culture supernatant from lactic acid bacteria [J]. **Journal of Kunming University of Science and Technology (Science and Technology)**,2013,38(2):80-84.(in Chinese)

[18] GONG Lulu,LIU Chenjian,GONG Fuming,et al. Screening of high-yield lactic acid bacteria from 'douchi' and optimization of its lactic acid producing conditions[J]. **Chinese Journal of Microecology**,2013,5:516-520.(in Chinese)

[19] XIONG Jun,LIU Chenjian,HAN Ruina,et al. Screening of Lactic acid bacteria strains with high antibacterial activity from Douchi and it's research of bacteriostatic[J]. **Chinese Journal of Microecology**,2011,23(6):485-489.(in Chinese)

[20] JIANG Liming,LUO Yiyong,LIU Chenjian. Optimization of production conditions and separation methods for plantaricin modern food science and technology,2014,10:218-225.(in Chinese)

[21] LIN M Y,YOUNG C M. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria[J]. **International Dairy Journal**,2000,10(5-6):409-413.

[22] DHANYA G S,PANDEY A,NAMPOOTHIRI KM. Folate- producing lactic acid bacteria from cow's milk with probiotic characteristics[J]. **International Journal of Dairy Technology**,2010,63(3):339-348.
[23] LIN M Y,YOUNG C M. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria[J]. **International Dairy Journal**,2000,10(5-6):409-413.
[24] HUGENSCHMIDT S,SCHWENNINGER S M,GNEHM N. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate[J]. **International Dairy Journal**,2010,20(12):852-857.
[25] LAINO J E,JUAREZ D V M,SAVOY de Giori G,et al. Applicability of a Lactobacillus amylovorus strain as co-culture for natural folate bio-enrichment of fermented milk[J]. **International Journal of Food Science and Technology**,2014,191C:10-16.
[26] CRITTENDEN R G,MARTINEZ N R,PLAYNE M J. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria[J]. **In International Journal of Food Microbiolog**,2003,80(3):217-222.
[27] MO H,KARILUOTO S,PIIRONEN V,et al. Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate,vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe[J]. **Food Chem**,2013,141(3):2418-2425.

会　议　消　息

2018 年第八届全国发酵工程学术研讨会

【会议简介】 由江南大学和中国生物发酵产业协会主办的"2016 年第七届全国发酵工程学术研讨会"取得圆满成功,来自高校、科研院所、企业的参会代表共计 312 名,会议对促进我国发酵工程相关研究领域的学术交流和产业化推进起到了积极作用。

为进一步推进发酵工程领域的学术交流,经讨论决定,由江南大学和中国生物发酵产业协会主办的"2018 年第八届全国发酵工程学术研讨会"将于 2018 年 10 月 10 日至 10 月 12 日在江苏省无锡市江南大学召开。会议主题为:"新一代发酵工程与轻工生物技术"。

本次会议将邀请行业领导、知名专家和学者出席并作大会报告,同时举行发酵工程领域技术成果、产品以及仪器展示等相关业务推介活动,欢迎相关企业参展和赞助。热诚欢迎各高校、科研院(所)以及企事业单位的科研、工程技术和管理人员及学生踊跃投稿,积极参会,扩大学术交流与学科影响。

【主办单位】:江南大学　中国生物发酵产业协会

【会议主题】:

(1)生物信息学与微生物资源
(2)酶技术与生物催化转化工程
(3)合成生物学与系统代谢工程
(4)食品生物技术与制造
(5)糖生物技术与制造
(6)生物过程工程与智能装备

【会议注册费】:会议代表,1500 元,学生 800 元(凭学生证)。注册费含资料费、正餐费,不含住宿费

【联系人】:孔宇 电话:0510-85918516; E-mail: biotech@jiangnan.edu.cn
徐静 电话:0510-85197012; E-mail:xjecho@jiangnan.edu.cn