

来源于益生菌 FGM 的 *aga2* 基因在黄芪发酵过程中的表达

郝桂娟, 张 凯, 王旭荣, 张景艳, 王学智, 孟嘉仁, 杨志强, 李建喜*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃省中兽药工程技术研究中心, 农业部兽用药物创制重点实验室, 甘肃省新兽药工程重点实验室, 兰州 730050)

摘 要: 通过对益生菌 FGM 所产 α -半乳糖苷酶 *aga2* 基因在黄芪发酵不同阶段的表达水平分析, 为 α -半乳糖苷酶在黄芪发酵过程中的作用及其益生机制探究提供依据。绘制益生菌 FGM 在黄芪发酵过程中的生长及发酵液 pH 变化曲线, 同源序列法克隆 *aga2* 基因, 运用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 技术检测 *aga2* 基因在黄芪发酵不同阶段表达水平。结果表明, 在发酵 6 h 内 FGM 菌株处于对数生长期, 大量产酸使 pH 由初始 7.2 迅速下降到 5.3; 12 h 后细菌进入稳定期, pH 下降到 4.5; 48 h 至发酵结束 pH 稳定在 4.0 左右。成功克隆到一段 648 bp 的 *aga2* 基因片段(GenBank 登录号 KC202825), 序列相似性最高达 98%。发酵 24 h 内 *aga2* 基因表达逐渐上调并达到最高; 36 h 表达水平下降明显, 仅是初始发酵水平的 1.28 倍, 之后至 60 h 又呈上升趋势。上述结果提示, 益生菌 FGM 在黄芪发酵中可产生 α -半乳糖苷酶以分解黄芪粉中的抗营养因子 α -半乳糖苷类, 其分解产物半乳糖通过 Leloir 途径中间产物 UDP-半乳糖可能间接参与胞外多糖合成, 为黄芪发酵产物中多糖得率增加起了一定作用。

关键词: 黄芪; 益生菌 FGM; 发酵; α -半乳糖苷酶; *aga2* 基因表达

中图分类号: S853.7

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)04-0642-07

Analysis of *aga2* Gene Expression Derived from Probiotics FGM in *Astragalus membranaceus* Fermentation

HAO Gui-juan, ZHANG Kai, WANG Xu-rong, ZHANG Jing-yan, WANG Xue-zhi, MENG Jia-ren, YANG Zhi-qiang, LI Jian-xi*

(Key LAB of Veterinary Pharmaceutical Development of Ministry of Agriculture/ Engineering & Technology Research Center of Traditional Chinese Veterinary Medicine/Key LAB of New Animal Drug Project of Gansu Province, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The present study was conducted to investigate the possible functions of α -galactosidase derived from *Streptococcus alactolyticus* strain FGM in *Astragalus membranaceus* fermentation. The α -galactosidase *aga2* gene was cloned with homology-based cloning and its expression during *A. membranaceus* fermentation was estimated using the determined ideal reference gene *ldh* through real-time reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). The results showed that the strain FGM was in exponential growth phase within 6 h and there was a rapid decline of pH value from initial 7.2 to 5.3. The bacteria stable growth phase was post 12 h, pH value was 4.5 and pH value changes were not observed from 48 h to the end of fermentation (72 h). A nucleotide segment of 648 bp was successfully obtained (GenBank No. KC202825) and its highest sequence identity was 98%. *Aga2* gene expression was significantly up-regulated ($P < 0.05$) within

收稿日期: 2012-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072162); 国家行业农业科研专项(201303040); 公益性研究所基本科研费(1610322011007)

作者简介: 郝桂娟(1988-), 女, 山东泰安人, 硕士生, 主要从事益生菌发酵机理研究, E-mail: muyue807@126.com

* 通信作者: 李建喜, 副研究员, E-mail: ljianxil@163.com

24 h and reached a maximum at 24 h (6.04-fold). The *aga2* gene expression was only 1.3-fold higher at 36 h. However, it showed a gradual decrease from 36 h to 60 h and was down-regulated at 72 h when it reached a minimum (0.68-fold). The results suggested that α -galactosidase produced by *S. alactolyticus* strain FGM not only showed some ability to hydrolyze some anti-nutritional factors α -galactosides in *A. membranaceus*, but also might be responsible for exopolysaccharides biosynthesis indirectly by the Leloir pathway of galactose metabolism.

Key words: *Astragalus membranaceus*; probiotics FGM; fermentation; α -galactosidase; *aga2* gene expression

益生菌 FGM 是从鸡盲肠分离的一种乳酸菌,经 16S rDNA 鉴定为非解乳糖链球菌(*Streptococcus alactolyticus* strain FGM, GenBank 登录号 JX435470)。非解乳糖链球菌是马肠链球菌/牛链球菌复合群(*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex, SBSEC)的一个种,自 1984 年 J. A. E. Farrow 等人从猪和鸡肠道分离到该菌后,相继从其他动物(如鸽子、鸭)的肠道中也分离到该菌^[1-3]。M. L. Rinkinen 等^[4]报道犬空肠和粪便中的优势乳酸菌是非解乳糖链球菌。2010 年 J. Czerwiński 等^[5]通过 DNA 指纹图谱表明,鸡盲肠内的主要微生物种群是非解乳糖链球菌。然而,有关该菌的性能及其应用研究鲜有报道。本实验室从 2007 年至今一直开展该菌的生物性能及其在补益类中药黄芪多糖发酵方面的应用研究。

黄芪(*Radix Astragalus*)属豆科植物,主要有效成分包括多糖、皂苷、黄酮及其它多种生物活性成分,其中多糖是含量最高的有效成分,也是近年来研究和应用热点,但常规提取率较低。本实验室前期用菌株 FGM 发酵处理黄芪后,产物粗多糖得率最高可达 27.94%,比发酵前增加 4 倍多^[6]。研究表明,饲料中添加黄芪发酵多糖提取物可改善适口性,提高肉仔鸡生长性能,增强免疫力,有改善饲料转化率的作用^[7-8]。黄芪发酵多糖提取物还有保护肝细胞,抑制 CCl₄ 诱发的肝纤维化的作用^[9]。豆科植物中 α -半乳糖苷(如棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖)含量普遍较高,单胃动物不能分泌消化该类物质的酶,只有通过微生物发酵后才能利用其中的寡聚糖^[10]。 α -半乳糖苷酶(α -Galactosidase, EC3.2.1.22)不仅可催化水解上述 α -半乳糖苷,还可作用于含 α -半乳糖苷键的多聚糖以及复合多糖^[11]。益生菌 FGM 可产生 α -半乳糖苷酶,但该酶在发酵黄芪过程中是否会表达、表达水平及作用机制还不清楚。分析益生菌 FGM 所产 α -半乳糖苷酶在黄芪发酵过程中的表

达水平对阐述其发酵机理很有必要。本研究通过同源序列法克隆 α -半乳糖苷酶 *aga2* 基因,利用实时荧光定量 PCR 技术检测其表达水平,旨在为菌株 FGM 发酵提取黄芪多糖的机理阐述提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

培养基: MRS 肉汤,复活传代用;发酵培养基,实验室改良优化配方,黄芪添加量为 $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;主要试剂:细菌基因组 DNA、RNA 提取试剂盒(O-MEGA),pGEM-T Easy 载体(Promega),DNA 凝胶回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、内切酶、反转录及荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 基因组 DNA 提取及 α -半乳糖苷酶 *aga2* 基因克隆

按细菌 DNA 试剂盒说明书提取菌株 FGM 基因组 DNA,并用 NanoDrop 2000 光度计(USA)测定 DNA 浓度和纯度。以 GenBank 数据库中牛链球菌 α -半乳糖苷酶 *aga2* 基因序列为参考模板,利用 Primer premier 5.0、Oligo 7 软件设计特异性引物 *aga2*-F 和 *aga2*-R(表 1),引物由华大基因公司合成。

PCR 反应体系: Premix Ex Taq 25 μL , 模板 DNA 5 μL (0.1 μg), 引物(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1 μL , 补加灭菌双蒸水至 50 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒纯化目的片段后,连接至 pGEM-T Easy Vector, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选。挑取白斑于氨苄青霉素 LB 液体培养基中增值培养,质粒提取试剂盒提取质粒, *EcoR* I 酶切验证后将质粒送至华大基

因公司测序。

1.3 内参基因选择与克隆

参考常用内参基因,选取 16S、*recA* 和 *ldh* 为备选内参基因。以 GenBank 数据库中牛链球菌 *recA*

和 *ldh* 基因序列为参考模板,利用 Primer premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1),引物由华大基因公司合成。PCR 反应体系和反应条件同上。

表 1 *aga2*、*recA* 和 *ldh* 基因克隆引物

Table 1 Primers used in *aga2*, *recA* and *ldh* gene cloning

引物 Primers	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	引物大小 Primers size	产物大小/bp Products size/bp	GenBank 登录号 GenBank No.
<i>aga2</i> -F	GAGATAATTTTGAAACGCCAGT	22	648	KC202825
<i>aga2</i> -R	GGTCGCAAGATAAGTATCACC	21		
<i>recA</i> -F	GTGCTGTTGACCTCGTCGTTGT	22	655	JX947343
<i>recA</i> -R	GTGCTGTTGACCTCGTCGTTGT	22		
<i>ldh</i> -F	GGTGCCGTAGGTTTCATCT	18	857	JX947344
<i>ldh</i> -R	TGTTGTTCAGCGTCATTCA	19		

1.4 基因序列分析

测序结果应用 DNASTar 软件进行序列拼接,所得序列提交至 NCBI 数据库运行 Blast 程序进行序列相似性搜索和分析。

1.5 发酵液取样与 FGM 生长曲线绘制

将 FGM 菌株在 MRS 肉汤培养基中复活传代培养 7 代后,按体积分数 4% 的接菌量(约 4.5×10^8 cfu · mL⁻¹)接入含有 100 mL 发酵培养基(已用 Na₂CO₃ 调初始 pH 值至 7.4)的三角瓶中,37 °C、100 r · min⁻¹ 厌氧摇床发酵 68 h。在发酵过程中,分别取 0、6、12、24、36、48、60 和 72 h 的发酵液 50 mL。取部分发酵液稀释适当倍数后涂布 MRS 琼脂平板,37 °C 厌氧培养箱中培养 72 h 后计数并绘制生长曲线。剩余发酵液测定 pH 后保存于 -80 °C 冰箱中备 RNA 提取用。

1.6 细菌总 RNA 提取与 cDNA 合成

取保存于 -80 °C 冰箱的发酵液于 37 °C 水浴中快速解冻后,1 000 g、4 °C 离心 3 min 使黄芪粉等不溶杂质沉淀,取上清发酵液按细菌 RNA 试剂盒说明书提取菌株 FGM 总 RNA,提取过程中用 RNase-free DNase I(OMEGA)去除基因组 DNA 污染。以质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,NanoDrop 2000 光度计(USA)测定 RNA 浓度和纯度。采用 PrimeScript[®] RT 试剂盒反转录合成 cDNA,10 μL 反应体系中含有 5 × PrimeScript[®]

Buffer 2 μL,PrimeScript[®] RT Enzyme Mix I 0.5 μL,Oligo dT Primer(50 μmol · L⁻¹)、Random 6 Primers(100 μmol · L⁻¹)各 0.5 μL,以及约 500 ng 总 RNA。RT 反应条件:37 °C 15 min;85 °C 5 s。

1.7 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR

1.7.1 实时荧光定量 PCR 引物设计与合成 根据所获得的 FGM 菌株 16S、*recA*、*ldh* 和 *aga2* 基因部分序列,并参考 SYBR Green I 荧光定量试剂盒说明书中引物要求设计特异性引物(表 2),引物由华大基因公司合成。

1.7.2 标准曲线的建立 取发酵 0 h 反转录的 cDNA,用 Easy dilution(TaKaRa)按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 进行 10 倍梯度稀释,反应体系及反应条件同下,以验证引物扩增效率及有无二聚体或非特异性扩增。

1.7.3 内参基因稳定性分析 参照 J. Helle-mans 等^[12] 建立的方法,将内参基因 *recA* 和 *ldh* 不同发酵阶段的样品 Ct 值及相关数据导入 qbase^{PLUS} 2.4 软件,运行 geNorm 程序分析 *recA* 和 *ldh* 内参基因的稳定性及可行性(geNorm < 1.5)。

1.7.4 实时荧光定量 PCR 反应条件 使用 iCycler iQTM5(Bio-Rad 公司)及配套的 96 孔板进行实时荧光定量 PCR 反应。25 μL 反应体系中包含 12.5 μL SYBR[®] Premix Ex TaqTM II,引物(10 μmol · L⁻¹)各 1 μL,cDNA 模板 2 μL,以及灭菌

ddH₂O 8.5 μL。每一样品做 3 个重复、2 个阴性对照(无模板和无引物对照)。两步法反应程序:95 °C 预变性 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,反应 40 个循环。之后继续记录荧光信号进行融解曲线分析,反应条

件:60 °C 10 s,以 0.05 °C · s⁻¹ 的速度从 60 °C 升高到 95 °C。数据分析软件为 Bio-Rad iQTM5 光学系统软件 2.0 版本。

表 2 用于实时荧光定量 PCR 的引物

Table 2 Primers for Real-time PCR

引物 Primers	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	引物大小 Primers size	产物大小/bp Products size/bp
16S-F	GCGACGATACATAGCCGACCT	21	92
16S-R	TGATTCCTACTGCTGCCTCC	21	
<i>recA</i> -F	CGAAAAGATAGCAGCATCGGTAAAG	25	251
<i>recA</i> -R	AAGGTGTCAGGGTGGTCACTCAAG	24	
<i>ldh</i> -F	CAAGAAGACTCCGTTGAAACCAGA	24	291
<i>ldh</i> -R	CTCGTAAACCAAGGAATCGACA	23	
<i>aga2</i> -F	CAACGCAGAAAACTCGGTGG	21	231
<i>aga2</i> -R	GCTGGCTTGATGGAGGCTATG	21	

1.7.5 发酵不同阶段 *aga2* 基因表达水平变化

以 *recA* 和 *ldh* 为内参基因,取不同发酵阶段的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,以发酵 0 h 时的表达量作对照,每个样品做 3 个重复,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。根据 *Ct* 值计算变异系数以验证试验重复性和可行性。

2 结果

2.1 *aga2* 基因序列分析

提取的基因组 DNA 经检测 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 比值均在 1.8~2.0,纯度良好。以特异性引物 *aga2*-F 和 *aga2*-R 成功获得 1 段 648 bp 的核酸序列(GenBank 登录号 KC202825);Blast 结果显示,与马其顿链球菌(*S. macedonicus*)序列一致性最高,为 98%。

2.2 *recA* 和 *ldh* 基因序列分析

以特异性引物 *recA*-F 和 *recA*-R 成功获得 1 段 655 bp 的核酸序列(GenBank 登录号 JX947343);Blast 结果显示,与婴儿链球菌婴儿亚种(*S. infantarius* subsp. *infantarius*)序列一致性最高,为 86%。以特异性引物 *ldh*-F 和 *ldh*-R 成功获得 1 段 857 bp 的核酸序列(GenBank 登录号 JX947344);Blast 结果显示,与解没食子酸链球菌解没食子酸亚种(*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*)序列一致

性最高,为 90%。

2.3 FGM 生长曲线与发酵液 pH 变化曲线

取不同阶段的发酵液进行平板计数和 pH 值测定,绘制 FGM 生长曲线和发酵过程中的 pH 变化曲线(图 1)。结果显示,在发酵 6 h 内 FGM 处于对数生长期,12 h 后开始进入稳定期。pH 变化曲线显示,发酵 6 h 后 pH 由初始 7.4 迅速下降到 5.3,12 h 后下降到 4.5,48 h 至发酵结束稳定在 4.0 左右。

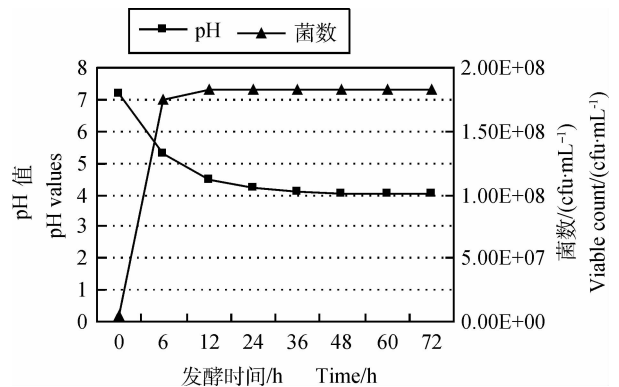


图 1 黄芪发酵过程中发酵液 pH 变化曲线和 FGM 生长曲线

Fig. 1 The pH value of broth and growth profile of the strain FGM during *A. membranaceus* fermentation

2.4 实时荧光定量 PCR 的标准曲线

提取 RNA 的 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比值均在 1.8~2.0, 纯度良好, 琼脂糖凝胶电泳检测显示 5S、16S 和 23S 条带完整, 可用于 mRNA 的表达分析。内参基因 *recA* 和 *ldh* 以及目的基因 *aga2* 的标准曲线均

呈现良好线性关系, 如表 3 所示扩增效率 E 在 90%~110% 范围。融解曲线显示为单峰, 表明无引物二聚体和非特异性扩增, 可以用于实时荧光定量 PCR 分析。

表 3 标准曲线相关数据

Table 3 The relevant data of standard curve

基因 Gene	扩增效率/% Amplification efficiency/%	斜率 Slope	R ² R square	最高变异系数/% The highest coefficient of variation/%
16S	100.9	-3.301	1.000	2.14
<i>recA</i>	106.2	-3.201	0.997	1.87
<i>ldh</i>	104.8	-3.321	0.995	1.56
<i>aga2</i>	104.0	-3.229	0.994	2.35

2.5 内参基因稳定性分析

运行 qbase^{PLUS} 2.4 软件中的 geNorm 程序分析内参基因稳定性, 结果如图 2 所示, 16S、*recA* 和 *ldh* 的 geNorm M 值分别为 1.148、0.990 和 0.929, 均低于临界值 1.5, 表明这 3 个内参基因均可用于实时荧光定量 PCR 检测。选用 geNorm M 值最低的 *recA* 为试验内参基因。

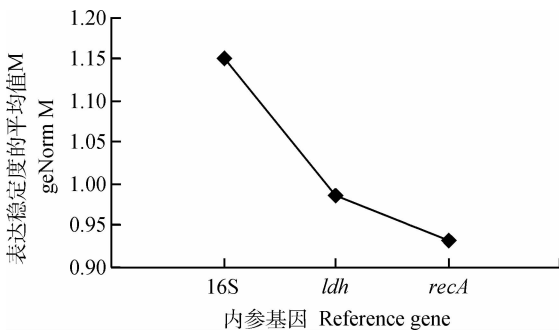


图 2 3 个内参基因的 geNorm M 值

Fig. 2 The geNorm M values of three reference genes

2.6 *aga2* 基因在发酵不同阶段的表达水平变化

以 *recA* 和 *ldh* 为内参基因, 0 h 为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。结果如图 3 所示, *aga2* 基因在发酵 24 h 内表达水平显著上调 ($P < 0.05$) 并达到最高, 是初始发酵 0 h 的 6.04 倍; 36 h 较 24 h 显著下调 ($P < 0.05$), 仅是初始发酵的 1.28 倍; 之后又逐渐呈小幅度上调趋势, 至发酵 60 h 时 *aga2* 基因表达水平约是初始发酵的 2 倍; 72 h 时表达水平下

调, 仅是初始发酵的 0.68 倍。

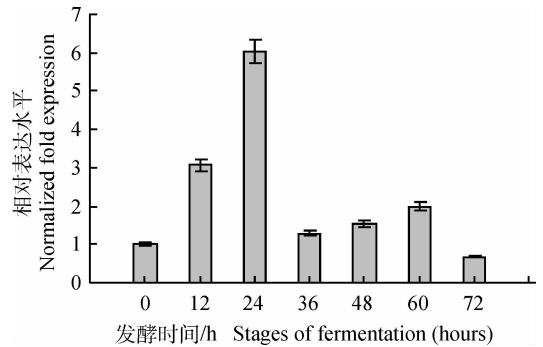


图 3 *aga2* 基因在黄芪发酵不同阶段的表达水平

Fig. 3 The *aga2* gene expression at different phases of *A. membranaceus* fermentation

3 讨论

非解乳糖链球菌 FGM 株为同型乳酸发酵, 即通过糖酵解途径 (EMP) 代谢产生乳酸等。王龙等^[13]通过实时荧光定量 PCR 技术检测了 EMP 中的 2 个限速酶葡萄糖激酶 (*glcK*) 和磷酸甘油酸激酶 (*pgk*) 在黄芪发酵过程中的表达水平变化, 其结果与本试验发酵液 pH 变化和 FGM 生长曲线相吻合, 即菌株 FGM 通过 EMP 代谢产酸, *glcK* 和 *pgk* 基因表达水平迅速上调并达到最高, pH 由初始 7.2 急剧下降到 4.5, 细菌生长较快, 处于对数生长期; 之后 *glcK* 和 *pgk* 基因表达水平与 6 h 相比呈下降趋势, 糖代谢率逐渐降低, pH 值下降至 4.2 后, 菌

株生长较慢,12 h 后 2 个基因表达水平开始下调,糖代谢缓慢,pH 值稳定在 4.0 左右,此时细菌生长缓慢甚至停滞,处于稳定期。本试验结果显示,黄芪发酵过程中 *aga2* 基因在 60 h 内表达上调,72 h 表达下调,其表达贯穿整个发酵过程,且不同阶段表达水平不同。这表明非解乳糖链球菌 FGM 株在黄芪发酵过程中能产生 α -半乳糖苷酶,它在黄芪发酵过程中发挥了重要作用。其作用之一可能是分解黄芪中的 α -半乳糖苷类,使这类抗营养因子在发酵型黄芪提取物中的含量降低,从而进一步改善发酵黄芪提取物有效成分。

α -半乳糖苷酶分解 α -半乳糖苷类产生的半乳糖主要通过 Leloir 途径代谢,在此途径中半乳糖经半乳糖激酶、半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶、UDP-半乳糖 4-异构酶和焦磷酸化酶催化,最终释放 ATP 供细菌代谢利用。其中,UDP-半乳糖 4-异构酶(*galE*)催化产生的 UDP-半乳糖可作为多糖合成前体物质参与胞外多糖(Exopolysaccharide, EPS)合成。*galE* 调节 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖之间的相互转化,是乳酸菌胞外多糖生物合成的关键控制点^[14]。研究表明,半乳糖是胞外多糖结构骨架中首要的、共有的主要单元之一,Leloir 途径对胞外多糖前体糖基-核苷酸的合成至关重要,且它的合成水平直接控制胞外多糖的生物合成^[15-17]。胞外多糖的合成一般在细菌对数生长末期和稳定期,其合成水平与 *eps* 基因簇表达水平息息相关^[18]。C. B. Ingeborg 等^[19]研究表明,乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)胞外多糖合成量提高是 *eps* 合成基因簇表达水平升高导致的。本试验中,黄芪发酵 12 h 后 FGM 菌株已进入生长稳定期,细菌生长代谢缓慢,糖酵解速度降低,单糖利用率随之下降。然而,至发酵 24 h *aga2* 基因表达明显上调并达到最高,这提示 α -半乳糖苷酶分解代谢产生的半乳糖以 UDP-半乳糖形式参与胞外多糖合成,促使 *aga2* 基因表达上调。36 h 表达水平较 24 h 显著下降($P < 0.05$),仅是初始发酵水平的 0.68 倍,这可能是由于发酵 24 h 内 *aga2* 基因高水平表达使 α -半乳糖苷酶分解代谢产生大量半乳糖,半乳糖经 Leloir 途径催化产生大量 UDP-半乳糖,进而以多糖合成前体形式参与胞外多糖合成,36 h 左右反应开始达到一定平衡,因而此时基因表达水平较低。之后一直到发酵 60 h,多糖合成前体 UDP-半乳糖的消耗间接促使 *aga2* 基因表达再次上调,分解 α -半乳糖苷类产生半乳糖,半乳糖进入

Leloir 途径代谢产生 UDP-半乳糖使胞外多糖合成反应得以继续进行。赵玉娟等^[20]报道,如果其中一种多糖合成前体被大量消耗,相关酶催化反应将继续进行直到新的平衡出现。这与本试验结果相吻合。因此, α -半乳糖苷酶另一作用很可能是以分解产物半乳糖的形式通过 Leloir 途径间接参与胞外多糖合成。

综上所述,本试验通过对非解乳糖链球菌 FGM 株 *aga2* 基因在黄芪不同发酵阶段的表达水平分析,表明 α -半乳糖苷酶通过分解产物半乳糖间接参与胞外多糖合成,为黄芪发酵后多糖得率增加起了一定作用;非解乳糖链球菌 FGM 株所产 α -半乳糖苷酶可将黄芪中的抗营养因子 α -半乳糖苷类转化分解,这有助于发酵型黄芪提取物成分进一步改善。

参考文献:

- [1] FARROW J A E, KRUIZE J, PHILIPS B A, et al. Taxonomic studies on *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*: description of *Streptococcus alactolyticus* sp. nov and *Streptococcus saccharolyticus* sp. nov [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1984, 5: 467-482.
- [2] KURZAK P, EHRMANN M A, VOGEL R F. Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1988, 21: 588-592.
- [3] BAELE M, DEVRIESE L A, BUTAYE P, et al. Composition of enterococcal and streptococcal flora from pigeon intestines [J]. *J Appl Microbiol*, 2002, 92: 348-351.
- [4] RINKINEN M L, KOORT J M, OUWEHAND A C, et al. *Streptococcus alactolyticus* is the dominating culturable lactic acid bacterium species in canine jejunum and feces of four fistulated dogs [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 230(1): 35-39.
- [5] CZERWIŃSKI J, HØBERG O, SMULIKOWSKA S, et al. Influence of dietary peas and organic acids and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens [J]. *Br Poult Sci*, 2010, 51(2): 258-269.
- [6] 朱新术. 发酵黄芪的乳酸菌的选育与发酵参数优化研究[D]. 北京:中国农业科学院,2008.
- [7] 张 凯,杨志强,王学智,等. 发酵型黄芪提取物对肉仔鸡生产性能及免疫球蛋白的作用研究[J]. 湖北农业科学,2011,50(6):1216-1218.
- [8] 张 凯,李建喜,杨志强,等. 发酵型黄芪提取物对肉仔鸡生产性能及血液生化指标的影响[J]. 中国畜牧

- 兽医,2011,38(5):31-34.
- [9] QIN Z, LI J, YANG Z Q, et al. Effects of fermentation astragalus polysaccharides on experimental hepatic fibrosis [J]. *J Anim Vet Adv*, 2012, 11 (8): 1195-1203.
- [10] 张继东,王志祥,丁景华,等. α -半乳糖苷的危害机理及其酶的应用研究[J]. *中国畜牧兽医*,2006,33(12): 27-30.
- [11] KATROLIA P, JIA H Y, YAN Q G, et al. Characterization of a protease-resistant α -galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides[J]. *Bioresour Technol*, 2012, 110: 578-586.
- [12] HELLEMANS J, MORTIER G, PAEPE A D, et al. QBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data[J]. *Genome Biol*, 2007, 8(2): R19.
- [13] 王 龙. 发酵黄芪多糖的菌种生物学特性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2012.
- [14] GUO H J, LI L, WANG P G. Biochemical characterization of UDP-GlcNac/Glc 4-epimerase from *Escherichia coli* 086: B7 [J]. *Biochemistry*, 2006, 45 (46): 13760-13768.
- [15] CHAI Y R, BEAUREGARD P B, VLAMAKIS H, et al. Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis* [J]. *MBio*, 2012, 3(4): e00184-12.
- [16] MOZZI F, ROLLÁN G, DE GIORI G S, et al. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthesis enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87[J]. *J Appl Microbiol*, 2002, 191: 160-167.
- [17] GOH K K T, HAISMAN R D, SINGH H. Examination of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* using confocal laser scanning and scanning electron microscopy techniques [J]. *J Food Sci*, 2005, 70: M224-229.
- [18] 刁虎欣,赵大健. 细菌胞外多糖生物合成的水平调控 [J]. *微生物学杂志*,1990,10(1-2):136-141,57.
- [19] INGEBORG C B, RICHARD V K, MARJA W K. Increased exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* due to increased levels of expression of the NIZO B40 *eps* gene cluster [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 5029-5031.
- [20] 赵玉娟,李盛钰,张 莉,等. 植物乳杆菌 C88 胞外多糖生物合成基因的克隆及序列比对[J]. *基因组学与应用生物学*,2011,30(4):331-337.

(编辑 白永平)