

pH 对产叶酸植物乳杆菌叶酸产量及相关基因表达的影响

吴 边^{1,2}, 柳陈坚³, 李强坤³, 李晓然^{3*}

(1. 云南省第一人民医院普外二科, 昆明 650032; 2. 昆明理工大学附属医院普外二科, 昆明 650032;
3. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

摘 要: 叶酸是细胞代谢的重要中间体, 人类由于缺乏叶酸生物合成途径中的关键酶, 需要从膳食中摄取叶酸。由于谷氨酸尾数目的差别, 生物合成的叶酸更容易被人体利用。一些植物乳杆菌菌株可以合成叶酸, 但培养条件对叶酸合成有较大影响。选择一株高产叶酸的植物乳杆菌 4_3 菌株, 探讨了在同一培养基中, 不调节 pH 和使 pH 稳定在 6.0 对其生长状况和叶酸合成的影响。比起不调节 pH, 维持 pH 6.0 可以长期保持较高的活细胞密度。实时荧光定量 PCR 的结果显示, 在 pH 6.0 的培养基中, 叶酸合成相关基因表达量均要高于不调节 pH 的培养基。

关键词: 植物乳杆菌; 叶酸; 生物合成; 基因表达

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)05-0761-06

Effect of pH value on folate production and gene expression of *Lactobacillus plantarum*

WU Bian^{1,2}, LIU Chenjian³, LI Qiangkun³, LI Xiaoran³

(1. Department of General Surgery II, the First People Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032; 2. Department of General Surgery II, the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032; 3. School of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500)

Abstract: Folate is an important intermediate in cellular metabolism. However, because of lack of key enzymes in folate biosynthetic pathway, humans require folate from diet. Due to the difference in the number of glutamate, biosynthesis folate is superior to chemical synthetic folic acid by the body. Some *Lactobacillus plantarum* strains have the ability to synthesize folate. The extent of folate production and its form depend on the strain and culture conditions. The primary objective of this study is to gain a better understanding of the effects of pH on folate production and related gene expression in *L. plantarum* strain 4_3, which can generate high folate yields. Bacteria in pH 6.0 medium could still maintain a high cell density after logarithmic growth, but the folate content in the corresponding medium decreased. Real-time fluorescence quantitative PCR results showed that the expression of folate biosynthesis-related genes in pH 6.0 medium was higher as compared with those without regulated pH values.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; folate; biosynthesis; gene expression

叶酸, 也称为维生素 B9, 在嘌呤、甲酰甲硫氨酸、胸腺嘧啶、泛酸、甘氨酸、丝氨酸和蛋氨酸的合成过程中作为一种碳转移反应的辅因子, 对人体健康极为重要^[1]。作为单碳供体, 叶酸参与核苷酸生物合成过程中发生的甲基化和甲酰化反应^[2]。在妊娠期, 如果缺乏叶酸将影响胚胎组织中的 DNA 合成, 导致细胞分裂率降低^[3]。植物、真菌、某些

原生动物和大多数细菌可以从头开始合成叶酸, 但是高等动物缺乏叶酸生物合成途径的关键酶^[4]。生物来源的叶酸大多是多聚谷氨酸叶酸, 而化学合成的叶酸膳食补充剂则多为单谷氨酸叶酸。然而, 在生物体内, 大多数依赖叶酸的酶更倾向于使用多聚谷氨酸叶酸^[5]。因此, 对于人体来说, 从膳食中摄入叶酸比通过化学制剂摄取更有优势。

收稿日期: 2019-01-09

基金项目: 国家自然科学基金(31471716)和云南省科技厅—昆明医科大学应用基础研究联合专项[2018FE001-(110)]共同资助。

共同第一作者简介: 吴 边, 主治医师。E-mail: 6026170@qq.com; 柳陈坚, 教授。E-mail: 913506151@qq.com

* 通信作者: 李晓然, 博士, 副教授。E-mail: starkeyran@163.com

在模式生物中的叶酸合成和补救途径已经被广泛研究^[6-8]。乳酸菌是一类低 GC 含量的革兰氏阳性菌, 碳水化合物发酵的主要最终产物为乳酸, 有助于改善食品品质, 改良风味, 有助于改善营养和有利于人体健康, 越来越多用于生产健康的功能性食品。在乳酸菌中, 有很多如乳酸乳球菌和嗜热链球菌的菌株不能合成叶酸, 而大多数植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 则可以从头合成叶酸^[9-10]。*L. plantarum* 可以用于不同的食品基质进行发酵, 包括乳制品、蔬菜、淀粉类和肉类等^[11-12]。不同的菌株具有不同的合成叶酸的能力, *L. plantarum* 可以产生 B 族维生素包括叶酸, 比如 *L. plantarum* WCSF1 具有较好的合成叶酸能力^[13]。产生叶酸的谷氨酸残基的数量和产量主要取决于菌株本身和培养条件^[14]。在分析叶酸产量的研究中, 大多关注在培养末期叶酸的最终产量, 而很少有研究分析在培养过程中, 叶酸的产量发生了哪些变化, 而对这些过程进行深入了解对于更好地调控叶酸产量极为重要^[8, 15]。

因此, 作者选择一株高产叶酸的 *L. plantarum* 4_3 进行培养, 通过调节其培养过程中的 pH, 试图探索不同 pH 条件下叶酸产量和合成叶酸相关基因表达量的变化来阐明 pH 对叶酸基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

从云南传统发酵食品分离得到的 *L. plantarum* 4_3 菌株 (保存于昆明理工大学生命科学与技术学院应用微生物实验室)。

MRS 培养基: 蛋白胨, 10.0 g; Lab-lemco

powder, 8.0 g; Yeast extract, 4.0 g; 葡萄糖, 20.0 g; Tween-80, 1 mL; 磷酸氢二钾, 2.0 g; 醋酸钠, 5.0 g; 柠檬酸三铵, 2.0 g; 七水硫酸镁, 0.2 g; 四水硫酸锰, 0.05 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 121℃ 灭菌 15 min, 冷却后 4℃ 保存备用。

1.2 仪器与设备

荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 7300, 美国), 高效液相色谱-质谱联用仪 (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS) (AB Sciex QTRAP® 4500, USA), 发酵罐 (BIOFLO 415 Fermentor, Eppendorf, 德国)。

1.3 方法

1.3.1 *L. plantarum* 4_3 菌株发酵条件 取冷冻保存的 *L. plantarum* 4_3 菌株解冻, 在固体 MRS 培养基中划线培养, 选择单菌落接种至液体 MRS 肉汤培养基, 活化后按 1% 的比例接种至 5 mL MRS 肉汤培养基中, 置于 37℃ 恒温静止培养 12 h 后, 再将其按 1% 浓度接种至 50 mL 锥形瓶中, 37℃ 扩大培养 12 h, 通过活菌计数法计算菌液浓度, 随后按 10^6 cfu·mL⁻¹ 的终浓度将其接种至 5 L 发酵罐中, 于 37℃, 150 r·min⁻¹ 发酵。在控制 pH 发酵过程中, 利用发酵罐中 pH 计对 pH 值进行监测, 并利用发酵罐装置使用 10 mol·L⁻¹ NaOH 溶液使 MRS 发酵液维持在 pH 6.0。

1.3.2 *L. plantarum* 4_3 菌株生长动态监测 发酵过程中间隔 3 h 取样, 将所取样品用生理盐水按 10 倍梯度稀释, 分别取 100 μL 稀释液涂布固体 MRS 平板, 每个样品做 3 个生物学重复, 置于 37℃ 恒温培养 48 h 后计数。

表 1 荧光实时定量 PCR 所使用引物及扩增效率
Table 1 The used primers and amplification efficiency in qPCR

扩增目标基因 Target gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequence	扩增效率/% Amplification efficiency
<i>folE</i>	F	5'-GGGATTAGTAGAAACACCAGC-3'	110
	R	5'-CAACTTGAACCGTGCCAAAAAAC-3'	
<i>folQ</i>	F	5'-GTGTTTGGCTTATTATGGCTTG-3'	107
	R	5'-CCGCTCGTTGTCAGGGAT-3'	
<i>folB</i>	F	5'-AAGAACGGCGTAATGGTCAACAAC-3'	93.2
	R	5'-TCCACATCATCAAAGATTCCAGGCA-3'	
<i>folK</i>	F	5'-CAAGCCCTTAGCCGATTACG-3'	104
	R	5'-GCTTTCCCCACGGTTGAGTC-3'	
<i>folP</i>	F	5'-TTAGATGGGGTCGTGCTGG-3'	109
	R	5'-ACCCGCTTGCCAAAAACA-3'	
16S rRNA	F	5'-AACCCAACATCTCACGACAC-3'	98.2
	R	5'-GCAAGGCTGAAACTCAAAGG-3'	

1.3.3 叶酸合成相关基因表达量测定监测 取 *L. plantarum* 4_3 菌株在 12、24、36 和 48 h 时间点的发酵液进行 RNA 提取, 使用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司), 后使用反转录试剂盒 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(南京诺唯赞生物科技有限公司)进行反转录, 最后进行荧光实时定量 PCR (Quantitative PCR, qPCR) 测定植物乳杆菌 YM 4-3 叶酸合成相关基因表达情况。qPCR 所使用的引物利用 Primer Premier 5 软件设计, 具体序列信息见表 1。使用 ChamQ™ SYBR Qpcr Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司) 对反转录后的产物进行扩增, 以 16S rRNA 基因为内参, 每个样品做 3 个重复试验, 经过梯度 PCR 测试。虽然每对引物 Tm 值不完全一样, 但是在 60℃ 的退火温度条件下均能达到较好的扩增效率, 因此扩增程序统一为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 扩增 40 个循环后置于 4℃ 保存。qPCR 的结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 代表相对表达量, 以 MRS 培养基中 12 h 样品各个基因表达量做对照。

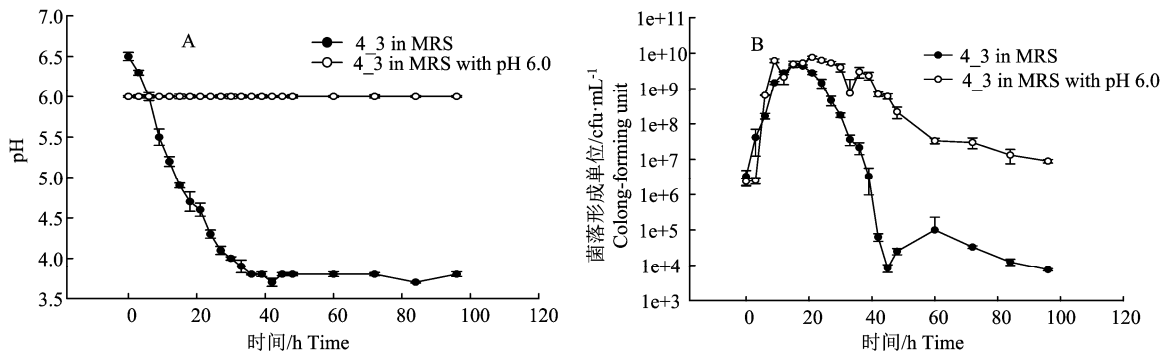
1.3.4 叶酸含量测定 取植物乳杆菌 YM 4_3 在 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 时间点的发酵液超声破碎 10 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 将处理好的样品用高效液相色谱-质谱联用仪进行叶酸含量测定。质谱条件: 气帘气(CUR)25, 碰撞气(CAD)中等, 离子源气 1 (GS1) 45, 离子源气 2 (GS2) 50, 电喷雾电压 5 500 V, 加热器温度 350℃,

选用正离子模式进行检测, 离子源为 ESI 电离源。

2 结果与分析

2.1 *L. plantarum* 4_3 发酵过程中生长特性监测

作为乳酸菌, *L. plantarum* 在发酵过程中会产生大量的有机酸, 使培养环境处于酸性条件下, 在培养的前 20 h 内, pH 迅速降到 4.5 以下并保持稳定(图 1A)。在该条件下, *L. plantarum* 4_3 菌株迅速达到生长对数期, 在前 20 h 活菌数就达到最高并开始急剧下降, 在 40 h 以后, 大致保持在 $10^4 \sim 10^5$ cfu·mL⁻¹ 的范围(图 1B)。微生物细胞对 pH 的改变非常敏感, 即使是乳酸菌, 在较低 pH 条件下也会抑制其生命活动。大多数 *L. plantarum* 的初始最适 pH 为 6.0 左右, 在一般实验室培养条件下, 由于 *L. plantarum* 在持续产生有机酸使 pH 下降, 难以使得 pH 在全部发酵过程中保持稳定, 所以大多数的研究仅仅能够在培养初期调整 pH 至 6.0^[16-17]。在本研究中, 使用了可以自动监测并调节 pH 的发酵罐来培养, 因此可以做到在整个培养周期内保持 pH 稳定在 6.0(图 1A)。pH 的调节可以使 *L. plantarum* 4_3 菌株在 24 h 达到生长对数期, 之后的 20 h 也能够保持稳定的较高生长密度, 直到 40 h 以后才缓慢下降, 即使到 96 h 还能达到 10^7 cfu·mL⁻¹(图 1B)。这一结果说明调节 pH 保持在 6.0 可以使 *L. plantarum* 4_3 菌株细胞死亡速度降低, 使培养基内的活细胞密度长时间维持在较高水平。



A. pH 值的变化; B. 菌株的生长曲线 A. pH values; B. growth curves

图 1 培养过程中不调节 pH 和 pH 6.0 条件下 pH 变化和菌株的生长曲线

Figure 1 Comparison of pH values between MRS and pH 6.0 MRS medium during fermentation

2.2 *L. plantarum* 4_3 叶酸产量

采用高效液相色谱-质谱联用仪对培养 96 h 过程中培养基中的叶酸含量进行测定。为了更好地适应大规模发酵培养, 在实验中使用了最适宜乳酸菌生长的 MRS 培养基, 而 MRS 培养基并不是无叶酸培养基, 因此在起始培养时仍然检测到一定量的叶酸。在不调节 pH 的培养基中, 叶酸含量在 36 h 前

后降到最低, 随后缓慢上升; 而在 pH 6.0 的培养基中, 叶酸含量则先上升后缓慢下降(图 2A)。 *L. plantarum* 在生长过程中需要消耗叶酸, 因此在培养过程中, *L. plantarum* 会首先消耗培养基中的叶酸继而自行合成供给细胞消耗^[18]。

由于 24 h 后 *L. plantarum* 4_3 达到生长对数期顶峰, 培养基中的活细胞密度开始下降, 仅仅根据

叶酸浓度来推测 *L. plantarum* 4_3 产叶酸能力是不够的,因此,用每 cfu 产叶酸浓度来推测在长达 96 h 中的培养过程中产叶酸能力的变化更为合理(图 2B)。由于比起生长后的细胞浓度,接种浓度较低,所以起始叶酸浓度较高,培养 12~24 h 后,一方面培养基中原有叶酸被消耗,另一方面细菌快速生长,所以叶酸浓度降到最低。随后,在两种 pH 条件下,叶酸浓度都呈现出明显的上升趋势,在不调节 pH 的 MRS 培养基中,由于培养后期细胞密度下降至很低的水平,叶酸浓度上升很明显,在调节 pH 的培养基中,由于培养后期仍然有较高的活细胞密度,叶酸浓度虽然不高,但是仍然呈现出稳步上升的趋势。虽然从检测数值来看,pH 6.0 的 MRS 培养基中叶酸含量低于不调节 pH 的,但是由于在 pH 6.0 的条件下,细菌生长更为旺盛,从而消耗了更多的叶酸,所以不能就此推断调节 pH 不利于叶酸产生,而要通过相关基因的表达量来进行推测,这一点也可以从单位细胞叶酸产量结果看出(图 2B)。

总体来说,比起临床上推荐人体摄入量来说(例如孕妇建议 $400 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$),*L. plantarum* 4_3 产生的叶酸产量不算太高,但是比起来其他 *L. plantarum* 的野生型菌株还是要高一些^[8,15],尤其是在基因改造菌株难以直接进入食品的情况下,对其发酵条件进行调整和优化来获得更多的生物合成叶酸产量极为必要^[17,19]。

2.3 *L. plantarum* 4_3 合成叶酸基因表达量

并非所有的 *L. plantarum* 菌株都具有叶酸合成能力。通过基因组分析,*L. plantarum* WCFS1 菌株和 LZ227 菌株具有这一能力^[15,20],但是 JDM1 菌株则缺乏相关的基因^[21]。*L. plantarum* 4_3 菌株则具有叶酸从头生物合成的全部基因。为了进一步了解在

培养过程中 pH 对叶酸合成相关基因的影响,使用 qPCR 对叶酸生物合成过程中合成 DHPPP (6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate) 和二氢蝶酸的主要基因进行了定量检测(图 3)。在提取总 RNA 时,发现刚接种的 0 h 和 48 h 以后的样品难以得到足够分析叶酸合成相关基因的 RNA,因此 qPCR 的结果只有 12 h 到 48 h 之间的数据,这些基因的 Ct 值大多已超过 30,且在 36 h 到 48 h 之间均呈现明显的下降趋势,也预示了 48 h 以后叶酸合成相关基因表达量的下降。

如图 3 所示,大多数基因在 pH 6.0 的 MRS 培养基中的表达量都要高于不调节 pH 的,尤其是在 12 h 时,pH 6.0 的培养基中,叶酸生物合成的相关基因都远高于不调节 pH 的培养基中的细菌。在调节 pH 的 MRS 培养基中,大多数基因的表达量在 12 h 达到最高,随后逐步下降至 36 h 最低,到 48 h 均有所上升;而在不调节 pH 的 MRS 培养基中,各个基因的变化趋势不尽相同,*folE* 基因的表达量整体变化不大,*folQ* 基因表达量逐步上升,*folB* 基因表达水平 24 h 相比 12 h 下降,随后上升,*folK* 基因与在调节 pH 的培养基中趋势相同,*folP* 基因则逐渐下降(图 3)。*folE* 基因是 DHPPP 合成的基因簇中的第一个基因,该基因表达量的增加可以使得叶酸水平增加 2~4 倍^[9,22],因此,该基因的高表达暗示了在 pH 6.0 的 MRS 培养基中 12 h 时较高的叶酸合成活性。*folP* 基因的编码产物是所有合成叶酸的生物体中所独有的蛋白^[23],也是 DHPPP 与 pABA 合成叶酸的关键步骤,但是在调节 pH 的 MRS 培养基中的 *L. plantarum* 4_3 这一基因的表达量并不太高,在 36 h 甚至略低,这可能是调节 pH 后叶酸产量并没有显著升高的主要原因。

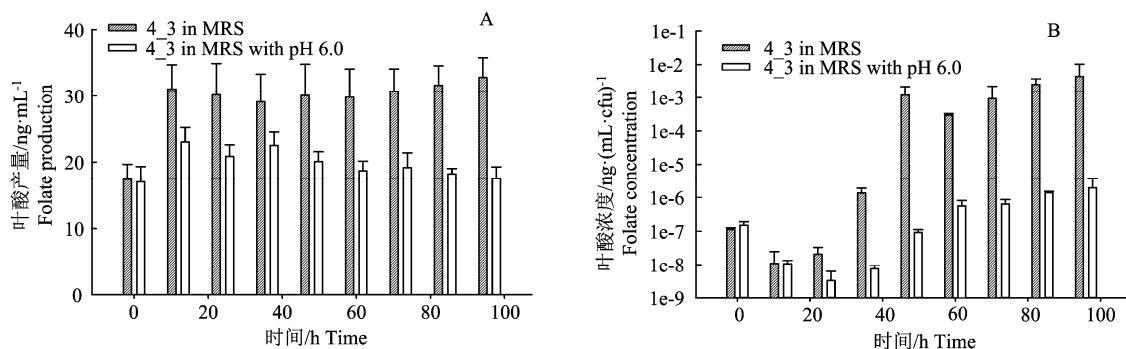


图 2 96 h 培养过程中叶酸的产量及浓度

Figure 2 Comparison of folate production and concentration between MRS and pH-modified MRS medium during 96 h

叶酸合成的其他基因,比如 pABA 合成通路上的相关基因,也与叶酸产量密切相关。pABA 是叶

酸的重要前体,分支酸是 pABA 的前体^[14],因此,合成分支酸的相关基因也同样重要,很多研究叶酸

合成的论文会在培养基中额外添加 pABA 来得到更高的叶酸产率^[15, 17]。本研究中所用的 *L. plantarum*

4_3 菌株包含 pABA 以及分支酸合成的所有基因。

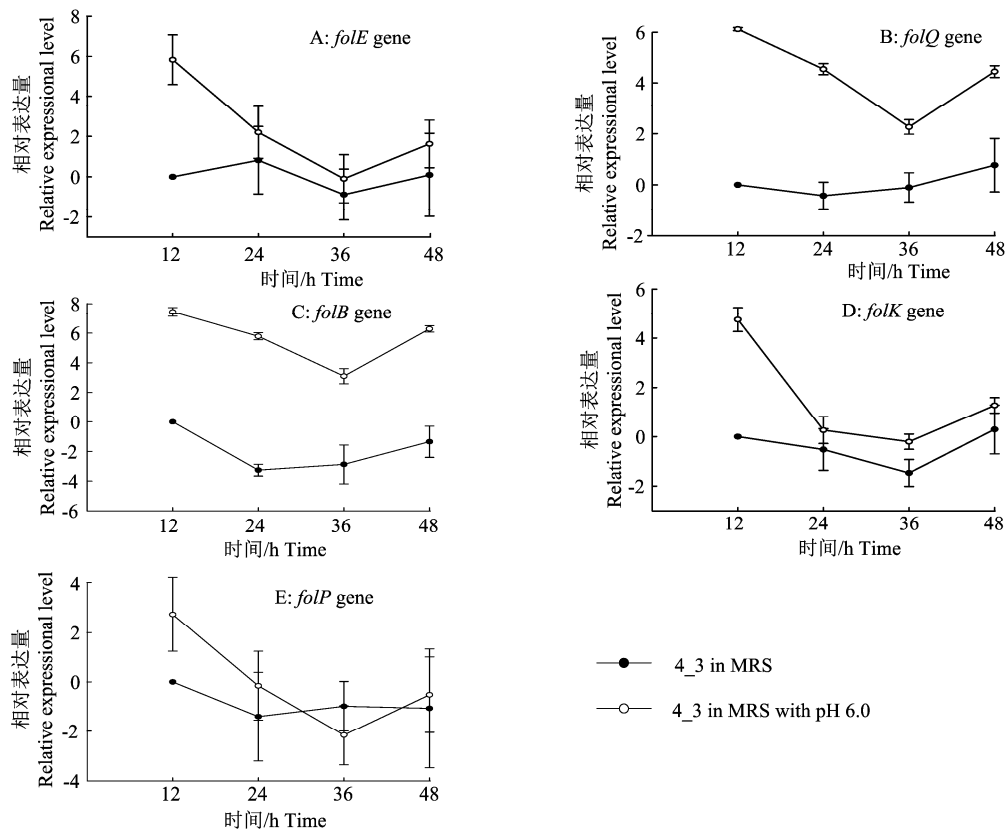


图 3 叶酸合成中主要基因的相对表达量 (内参: 16S rRNA 基因)

Figure 3 Expression of major genes in folate biosynthesis analyzed by qPCR (Internal reference gene: 16S rRNA gene)

虽然在调节 pH 的培养基中叶酸产量相对较低 (图 2), 而叶酸生物合成相关基因表达量却相对较高 (图 3), 这可能是由于 pH 稳定在 6.0 时, *L. plantarum* 4_3 的生长时间延长, 死亡趋于缓慢, 相应的叶酸合成等生命活动也更加旺盛, *L. plantarum* 4_3 一方面在合成叶酸, 另一方面也在不断消耗叶酸完成自身的生长, 因此, 在连续培养中, 仅检测培养系统中的叶酸含量可能不能完全代表合成的叶酸总量。

3 结论

叶酸参与基本的细胞生命活动, 如氨基酸代谢和 DNA 复制修复, 对于细胞分裂是必不可少的^[24]。无论在发展中国家还是发达国家, 叶酸缺乏仍然是一个世界性的健康问题^[25]。*L. plantarum* 是应用广泛的益生菌, 其可以合成叶酸的特性赋予了这类细菌更好的应用价值。由于 *L. plantarum* 在生长过程中持续产生有机酸使得培养基的 pH 降低, 本研究探讨了 pH 对于 *L. plantarum* 4_3 菌株生长及叶酸生物合成的影响。将 pH 稳定在 6.0 有利于细菌长时间

保持高密度生长, 在这样的条件下, 叶酸合成相关基因也有较高的表达, 单位细胞产生叶酸量也较高。

参考文献:

- [1] CAPOZZI V, RUSSO P, DUEÑAS M T, et al. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96(6): 1383-1394.
- [2] STOVER P J. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease [J]. Nutr Rev, 2004, 62(6 Pt 2): S3-S13.
- [3] ROTH C, BJØRKE-MONSEN A L, REICHBORN-KJENNERUD T, et al. Use of folic acid supplements in early pregnancy in relation to maternal plasma levels in week 18 of pregnancy[J]. Mol Nutr Food Res, 2013, 57(4): 653-660.
- [4] COSSINS E A, CHEN L F. Foliates and one-carbon metabolism in plants and fungi[J]. Phytochem, 1997, 45(3): 437-452.
- [5] LUCOCK M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes[J]. Mol Genet Metab, 2000, 71(1/2): 121-138.
- [6] KARILUOTO S, EDELMANN M, NYSTRÖM L, et al. In situ enrichment of folate by microorganisms in beta-glucan rich oat and barley matrices[J]. Int J Food Microbiol, 2014, 176: 38-48.

- [7] HOSSAIN T, ROSENBERG I, SELHUB J, et al. Enhancement of folates in plants through metabolic engineering [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(14): 5158-5163.
- [8] WALKEY C J, KITTS D D, LIU Y Z, et al. Bioengineering yeast to enhance folate levels in wine[J]. Process Biochem, 2015, 50(2): 205-210.
- [9] SYBESMA W, STARRENBURG M, TIJSSELING L, et al. Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(8): 4542-4548.
- [10] CRITTENDEN R G, MARTINEZ N R, PLAYNE M J. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria[J]. Int J Food Microbiol, 2003, 80(3): 217-222.
- [11] SIEZEN R J, TZENEVA V A, CASTIONI A, et al. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches[J]. Environ Microbiol, 2010, 12(3): 758-773.
- [12] VRANCKEN G, DE VUYST L, RIMAUX T, et al. Adaptation of *Lactobacillus plantarum* IMDO 130201, a wheat sourdough isolate, to growth in wheat sourdough simulation medium at different pH values through differential gene expression[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(10): 3406-3412.
- [13] WEGKAMP A, DE VOS W M, SMID E J. Folate overproduction in *Lactobacillus plantarum* wcf51 causes methotrexate resistance[J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 297(2): 261-265.
- [14] ROSSI M, AMARETTI A, RAIMONDI S. Folate production by probiotic bacteria[J]. Nutrients, 2011, 3(1): 118-134.
- [15] WEGKAMP A, MARS A E, FAIJES M, et al. Physiological responses to folate overproduction in *Lactobacillus plantarum* wcf51 [J]. Microb Cell Fact, 2010, 9(1): 100.
- [16] 姜黎明, 罗义勇, 王良才, 等. 植物乳杆菌素产生条件及分离方法的优化[J]. 现代食品科技, 2014, 30(10): 218-225, 288.
- [17] HUGENSCHMIDT S, SCHWENNINGER S M, LACROIX C. Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13[J]. Process Biochem, 2011, 46(5): 1063-1070.
- [18] KURATSU M, HAMANO Y, DAIRI T. Analysis of the *Lactobacillus* metabolic pathway[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(21): 7299-7301.
- [19] PADALINO M, PEREZ-CONESA D, LÓPEZ-NICOLÁS R, et al. Effect of fructooligosaccharides and galactooligosaccharides on the folate production of some folate-producing bacteria in media cultures or milk[J]. Int Dairy J, 2012, 27(1/2): 27-33.
- [20] LI P, ZHOU Q Q, GU Q. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ227, a potential probiotic strain producing B-group vitamins[J]. J Biotechnol, 2016, 234: 66-70.
- [21] ZHANG Z Y, LIU C, ZHU Y Z, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1[J]. J Bacteriol, 2009, 191(15): 5020-5021.
- [22] LAIÑO J E, JUÁREZ DEL VALLE M, HÉBERT E M, et al. Folate production and *fol* genes expression by the dairy starter culture *Streptococcus thermophilus* CRL803 in free and controlled pH batch fermentations[J]. LWT - Food Sci and Technol, 2017, 85: 146-150.
- [23] WILLIAMS D L, SPRING L, HARRIS E, et al. Dihydropteroate synthase of mycobacterium leprae and dapsone resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6): 1530-1537.
- [24] MURAKAMI K, SASAKI S. Dietary intake and depressive symptoms: A systematic review of observational studies[J]. Mol Nutr Food Res, 2010, 54(4): 471-488.
- [25] YOUNGBLOOD M E, WILLIAMSON R, BELL K N, et al. 2012 Update on global prevention of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly[J]. Birth Defects Res Part A: Clin Mol Teratol, 2013, 97(10): 658-663.