张格文, 钱亮亮, 周文梅, 等. *Limosilactobacillus fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 的培养基优化及转录组学分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 197−205. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110318

ZHANG Gewen, QIAN Liangliang, ZHOU Wenmei, et al. Optimization of Medium and Transcriptomic Analysis for Converting Ellagic Acid to Urolithin A by *Limosilactobacillus fermentum* FUA033[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 197−205. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110318

· 生物工程 ·

Limosilactobacillus fermentum FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 的培养基优化及转录组学分析

张格文[1], 钱亮亮[2], 周文梅[3], 宫艳艳[3], 陈　涛[4], 刘莹岭[1], 房耀维[1], 刘　姝[1,*]

(1.江苏海洋大学海洋食品与生物工程学院, 江苏连云港 222005;
2.连云港市质量技术综合检验检测中心, 江苏连云港 222005;
3.连云港市食品药品检验检测中心, 江苏连云港 222005;
4.宿迁市产品质量监督检验所, 江苏宿迁 223814)

摘　要: 本研究旨在优化 *Limosilactobacillus fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 的培养基，提高转化率，初步探索菌株转化鞣花酸生成尿石素的分子机制。通过单因素和响应面法对 *L. fermentum* FUA033（发酵粘液乳杆菌 FUA033）转化鞣花酸生成尿石素 A 的培养基进行优化。采用转录组测序技术对添加鞣花酸前后菌株进行分析，推测菌株发酵转化鞣花酸生成尿石素 A 的分子机制。结果表明，优化获得 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 的最佳培养基配方为：厌氧菌肉汤（Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth，WAM）培养基添加微量元素溶液 0.16%、甲基紫精 0.16 mmol/L、维生素溶液 0.21%。在最佳培养基条件下，转化率为 74.91%，较优化前提高了 20.83%。培养基中添加鞣花酸后，显著上调和下调基因分别为 64 个和 123 个。GO 富集分析显示差异基因富集于转运蛋白活性、膜、离子转运等功能。KEGG 通路富集分析表明氧化磷酸化差异显著（$P<0.05$），代谢通路和次级代谢产物生物合成的功能基因富集程度大。另外，两个内酯酶基因显著上调，推测为编码催化鞣花酸生成尿石素 A 通路中的关键酶。本研究结果为尿石素 A 的发酵制备以及揭示菌株转化鞣花酸生成尿石素 A 的关键酶基因提供一定的研究基础。

关键词: *Limosilactobacillus fermentum* FUA033, 鞣花酸, 尿石素 A, 发酵优化, 转录组分析

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0197−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110318

本文网刊:

Optimization of Medium and Transcriptomic Analysis for Converting Ellagic Acid to Urolithin A by *Limosilactobacillus fermentum* FUA033

ZHANG Gewen[1], QIAN Liangliang[2], ZHOU Wenmei[3], GONG Yanyan[3], CHEN Tao[4], LIU Yingling[1], FANG Yaowei[1], LIU Shu[1,*]

(1.College of Marine Food and Bioengineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2.Lianyungang Quality and Technology Comprehensive Inspection and Testing Center, Lianyungang 222005, China;
3.Lianyungang Food and Drug Inspection and Testing Center, Lianyungang 222005, China;
4.Suqian Product Quality Supervision and Testing Institute, Suqian 223814, China)

收稿日期: 2024−11−25

基金项目: 国家自然科学基金（32102270）; 江苏省高等学校重点自然科学基金（20KJA550001）; 江苏省“333”高层次人才培养工程; 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室开放基金（SH20191204）; 江苏省研究生科研实践创新计划（KYCX2023-126）; 江苏省大学生创新创业训练计划（SY202311641638001）。

作者简介: 张格文（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: w17805031961@163.com。

*** 通信作者:** 刘姝（1975−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: jdliushu@163.com。

Abstract: This study aimed to establish a systematic framework for enhancing the bioconversion efficiency of ellagic acid to urolithin A by *Limosilactobacillus fermentum* FUA033 through rational medium engineering, while deciphering the molecular orchestration underlying this metabolic process. Single factor and response surface methodology were used to optimize the culture medium. Transcriptome sequencing technology was utilized to analyze *L. fermentum* FUA033 before and after ellagic acid supplementation in media, and predict the molecular mechanisms involved in the biotransformation of ellagic acid into urolithin A. The optimized medium was determined to be Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth (WAM) supplemented with 0.16% trace element solution, 0.16 mmol/L methyl viologen, and 0.21% vitamin solution. The optimization resulted in biotransformation rate of 74.91%, 20.83% improved as compared to the unoptimized condition. Following the addition of ellagic acid, 64 significantly up-regulated genes, and 123 differentially down-regulated genes. GO enrichment analysis demonstrated that the differentially expressed genes were significantly enriched in molecular functions including transporter activity, membrane, and ion transport. The KEGG pathway enrichment analysis demonstrated significant alterations in oxidative phosphorylation (P<0.05), with substantial enrichment of functional genes related to metabolic pathways and the biosynthesis of secondary metabolites. Notably, two lactonase-encoding genes exhibited significant upregulation, strongly suggesting their catalytic role in hydrolyzing ellagic acid's lactone rings to generate the urolithin A precursor. These findings establish a mechanistic foundation for microbial biosynthesis of urolithin A through fermentation, while systematically delineating the enzymatic determinants governing the bacterial-mediated biotransformation of ellagic acid into urolithin A.

Key words: *Limosilactobacillus fermentum* FUA033; ellagic acid; urolithin A; fermentation optimization; transcriptome analysis

鞣花酸是一种多酚类化合物，广泛存在于石榴、草莓、核桃、板栗等水果和坚果中，其水溶性较低，导致其难以被吸收利用[1−2]。鞣花酸经人体肠道微生物转化为尿石素，特别是具有延缓衰老、缓解肌肉衰退、抗炎、抗肿瘤、抗神经退行性疾病的尿石素 A，营养功效显著提升[3]。但是，人肠道菌群的个体差异导致转化鞣花酸生成尿石素 A 的能力存在显著差异，在 40 岁以上人群中仅有约 40% 的人肠道菌群转化鞣花酸生成尿石素 A，并且随着年龄的增长呈下降趋势[4−5]。因此，2018 年美国食品药品监督管理局批准尿石素 A 作为营养补充剂。化学合成的尿石素 A 的营养增强剂产品受到消费者的青睐。

尿石素的化学合成易引起环境污染，如果能筛选获得体外发酵转化鞣花酸生成尿石素 A 的安全菌株，则可以利用微生物发酵法绿色环保地制备尿石素 A，或者利用菌株发酵富含鞣花酸的食品，通过制备富含尿石素 A 和益生菌的功能性发酵食品，使人们在日常饮食中摄入尿石素和益生菌，从而有助于延缓肌肉衰退并提升整体健康水平[6]。但是，目前报道的转化鞣花酸生成尿石素 A 的菌株较少，主要有 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* INIA P815[7]、*Lactobacillus plantarum* CCFM1286[8]、*L. plantarum* CCFM1290[8]、*L. plantarum* CCFM1291[8]、*Gordonibacter urolithinfaciens*[9] 以及本研究团队发现的 *Streptococcus thermophilus* FUA329[10]、*Enterococcus faecium* FUA027[11]、*Lactococcus garvieae* FUA009[12]、*L. fermentum* FUA033[13]。上述菌株存在转化鞣花酸生成尿石素 A 效率较低的问题。*L. fermentum* FUA033 的转化效率相对较高，但仍未达到理想的转化效果。另外，菌株转化鞣花酸生成尿石素 A 的分子机制尚不明确。

培养基对微生物的生长和底物转化有显著影响，通过优化碳源和氮源等培养基成分，优化后比初始培养基生物量提高了 89.1%[14]。刘书彤等[15] 经过调整葡萄糖和硫酸铵浓度并添加微量元素五水合硫酸铜后，L-苹果酸的产量提升了约 3.44 倍。另外，阐明底物转化分子机制，可为通过合成生物学合成目的产物奠定基础。转录组测序和生物信息学分析技术的快速发展，为揭示微生物底物转化的分子机制提供了高效的工具。使用转录组测序和生物信息学分析技术，揭示了变异链球菌在酸性环境中如何通过 SpR19 和 GroEL 调节机制适应环境变化[16]。枯草芽孢杆菌通过多种途径来还原亚硒酸盐，促进了亚硒酸盐的生物转化。通过转录组分析，能够深入分析细菌在亚硒酸盐处理下的基因表达变化，这些基因的上调表明亚硒酸盐处理激活了细胞内的应激响应，从而促进亚硒酸盐的转化和降解[17]。

本研究对 *L. fermentum* FUA033 的发酵培养基进行优化，并通过转录组测序分析添加鞣花酸前后基因表达的差异，推测 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 的分子机制，以期为利用发酵法制备尿石素 A 提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

L. fermentum FUA033　本研究室分离，保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心（CGMCC NO. 28447）；鞣花酸标准品（含量≥95%）、尿石素 A 标准品（含量≥97%）　美国 Sigma-Aldrich 公司；乙酸乙酯、厌氧菌肉汤（Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth, WAM）　上海吉至生化科技有限公司；微量元素溶液（1000×SL-10 Trace Elements Solution）、维生素溶液（Wolfe's Vitamin Solution）　北京酷来搏科技有

限公司；复方氨基酸注射液（Compound Amino Acid Injection 14AA-SF）　湖北一半天制药有限公司；甲酸、乙腈（分析纯）　上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

A20 厌氧工作站　英国 Don Whitley Scientific；Agilent1200 高效液相色谱仪　美国安捷伦科技公司；Multifuge X 3R 台式高速冷冻离心机　美国赛默飞世尔科技公司；S210 数字 pH 计　瑞士梅特勒-托利多公司；LDZX-50L 立式高压蒸汽灭菌锅　上海申安医疗器械厂；SW-CJ-1FD 超净工作台　苏州市华宇净化设备有限公司；GRX-9203A 微生物恒温培养箱　上海福玛实验设备有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　菌株种子液制备　将−80 ℃ 甘油保藏的 *L. fermentum* FUA033 在 WAM 固体培养基上三区划线，37 ℃ 静置厌氧培养 48 h，挑取单菌落接种于 WAM 液体培养基（厌氧菌肉汤），37 ℃ 静置厌氧培养 72 h 作为种子液。

1.2.2　*L. fermentum* 转化鞣花酸生成尿石素 A 培养基单因素优化

1.2.2.1　微量元素对尿石素 A 转化率的影响　在 WAM 液体培养基的基础上，发酵培养基初始 pH 为 7.0，发酵温度为 37 ℃、发酵时间为 48 h、菌株 FUA033 接种量 2% 的情况下，探究微量元素添加量（V/V）为 0%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35% 对尿石素 A 转化率的影响。

1.2.2.2　甲基紫精对尿石素 A 转化率的影响　在 WAM 液体培养基的基础上，发酵培养基初始 pH 为 7.0，发酵温度为 37 ℃、发酵时间为 48 h、菌株 FUA033 接种量 2% 的情况下，探究甲基紫精为 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35 mmol/L 对尿石素 A 转化率的影响。

1.2.2.3　维生素对尿石素 A 转化率的影响　在 WAM 液体培养基的基础上，发酵培养基初始 pH 为 7.0，发酵温度为 37 ℃、发酵时间为 48 h、菌株 FUA033 接种量 2% 的情况下，探究维生素添加量（V/V）为 0%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35% 对尿石素 A 转化率的影响。

1.2.2.4　氨基酸对尿石素 A 转化率的影响　在 WAM 液体培养基的基础上，发酵培养基初始 pH 为 7.0，发酵温度为 37 ℃、发酵时间为 48 h、菌株 FUA033 接种量 2% 的情况下，探究氨基酸添加量（V/V）为 0%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35% 对尿石素 A 转化率的影响。

1.2.2.5　富氢水对尿石素 A 转化率的影响　在 WAM 液体培养基的基础上，发酵培养基初始 pH 为 7.0，发酵温度为 37 ℃、发酵时间为 48 h、菌株 FUA033 接种量 2% 的情况下，探究富氢水添加量（V/V）为 0%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5% 对尿石素 A 转化率的影响。

1.2.3　响应面优化发酵培养基试验　根据 Box-Benhnken 试验设计，以鞣花酸生成尿石素 A 的转化率为指标，采用响应面法对影响 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 转化效率显著的微量元素溶液、甲基紫精溶液和维生素溶液添加量进行优化，设计水平见表 1。

表 1　响应面试验因素与水平

Table 1　Factors and levels of response surface test

水平	因素		
	微量元素（%）	甲基紫精（mmol/L）	维生素（%）
−1	0.1	0.1	0.15
0	0.15	0.15	0.2
1	0.2	0.2	0.25

1.2.4　尿石素 A 的提取及转化率的计算

1.2.4.1　尿石素 A 的提取及定量　以菌株接种量 2%（V/V）接种菌株 FUA033 至终浓度为 15 μmol/L 鞣花酸的 WAM 液体培养基，37 ℃，厌氧培养 48 h。将 10 mL 发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取，用 1.5% 甲酸酸化后，分离上层有机相并旋转蒸发，使用 1 mL 有机溶剂（乙腈∶水∶甲酸=80∶19.9∶0.1，V∶V∶V）回溶，用 0.22 μmol/L 针头式过滤器过滤，打进样瓶[18]。

采用高效液相色谱（HPLC）分析 *L. fermentum* FUA033 发酵前后的样品，测定尿石素 A 含量。使用乙腈（色谱纯，A 相）和 1% 甲酸的水溶液（B 相）作为流动相，通过梯度洗脱方式在 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱上进行分离。进样体积为 5 μL，流速为 1 mL/min，柱温 35 ℃，检测波长为 305 nm。梯度洗脱程序为：0~15 min，0~20% 乙腈；15~20 min，20%~70% 乙腈；20~21 min，70%~95% 乙腈；21~24 min，95%~100% 乙腈；24~25 min，100%~20% 乙腈[19]。

以不同浓度梯度尿石素 A 为横坐标，HPLC 测定峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，获得曲线拟合回归方程 y=5.92632x+2.13943，R^2=0.99967。

1.2.4.2　鞣花酸转化为尿石素 A 的转化率计算

$$\eta = \frac{C_{Uro-A}}{C_{EA}} \times 100$$

式中：η 为转化率（%），C_{Uro-A} 为尿石素 A 浓度（μmol/L），C_{EA} 为鞣花酸初始浓度（μmol/L）。

1.2.5　*L. fermentum* FUA033 的转录组学分析　将 *L. fermentum* FUA033 分别接种到添加和不添加鞣花酸的 WAM 液体培养基中，37 ℃ 静置厌氧培养 48 h。吸取 10 mL 菌液至离心管，4 ℃、10000×g 离心 10 min。弃上清，将菌体沉淀迅速置于液氮中冷冻 1 h，转移至−80 ℃ 保存，在北京诺禾致源生物科技有限公司进行转录组测序。

使用 fastp 对获得的转录组原始测序数据进行质控处理并计算 Q20、Q30 和 GC 含量。通过 Bowtie 2 将经过质量控制和过滤处理后得到的高质量测序

读段比对到参考基因组上，使用 HTSeq 统计各基因的测序数据中对应的测序读段的数量，计算基因表达值以校正测序深度和基因长度差异[20]。采用 DESeq2 进行差异表达分析，通过比较基因表达的变化，可以推测这些基因的生物学过程或机制。使用 GOseq R 包软件对差异基因集进行 GO（Gene Ontology）功能富集分析，使用 KOBAS 软件进行 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）通路富集分析。

1.3 数据处理

每个实验设置三次平行，通过 Excel 2010 整理数据。使用 IBMSPSS Statistics 27.0 软件，采用 Duncan 法进行分析（P<0.05 作为显著性差异的判断标准）。使用 Origin 软件绘图。采用 Design-Expert 13.0 分析响应面试验数据，数据结果均用平均值±标准误差表示。使用 DESeq 2 用于转录组测序数据的差异表达统计分析，准确检测基因在不同条件下的表达差异。

2 结果与分析

2.1 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 培养基优化的单因素实验结果

2.1.1 微量元素对 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 转化率的影响 当微量元素添加量为 0.15% 时，菌株转化率效果最佳，显著高于其他浓度（P<0.05），达到 63.76%（图 1A）。微量元素在调节细胞代谢中起着关键作用[21]。微量元素可以作为酶的辅因子、激活剂或抑制剂，其浓度的不同显著提高或降低酶活性，从而影响微生物代谢。如 Fe^{2+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}是内酯酶、脱羟基酶的辅因子，影响细胞呼吸和能量代谢过程[22]。Mn^{2+}作为酶的辅助因子，可以显著提高 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 的发酵效率和发酵乳质量[23−24]。

2.1.2 甲基紫精对 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 转化率的影响 甲基紫精添加量对 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 转化率具有显著影响（P<0.05）。甲基紫精浓度为 0.15 mmol/L，转化率最高，达到 63.34%（图 1B）。甲基紫精能够增强电子传递效率，促进酶催化的还原反应，提高尿石素 A 的转化率。研究表明添加甲基紫精显著促进菌株 *G. urolithinfaciens* DSM 27213 产生尿石素[25]。然而，由于甲基紫精的强氧化性，过高的甲基紫精浓度对菌株产生抑制作用，导致代谢效率下降[26]。

2.1.3 维生素对 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 转化率的影响 维生素添加量对 *L. fermentum* FUA033 尿石素 A 转化率具有显著影响（P<0.05）。当添加量为 0.20% 时，转化率最高，达到 61.47%（图 1C）。维生素 C 作为酶促反应的关键辅助因子，通过增强糖酵解途径中己糖激酶、磷酸果糖激酶等关键酶的活性，提高 *Lactobacillus thermophilus* A69 的代谢效率和糖类利用率[27]。另外，维生素 C 的抗氧化作用降低细胞内的活性氧水平，从而加速发酵过程[27]。通过补充维生素 B_{12} 有助于延长 *Levilactobacillus brevis* KU15152 寿命并降低死亡率[28]。适当补充维生素不仅加速发酵，还可以通过调节细胞内的抗氧化机制，维持菌株活力，进而

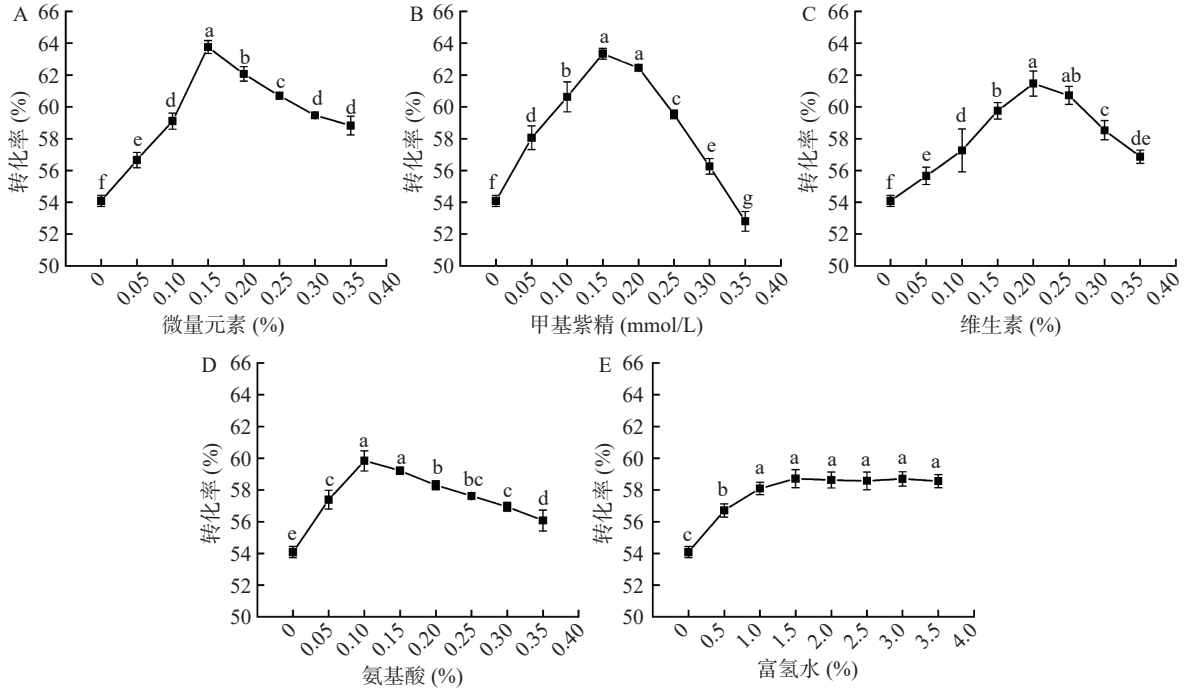


图 1 不同营养元素对 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 的影响

Fig.1 Effect of different nutrients on the conversion of ellagic acid to urolithin A by *L. fermentum* FUA033

注：不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

提高发酵稳定性，但是，高浓度的维生素抑制细菌的生长繁殖，从而降低转化效率[29]。

2.1.4　氨基酸对 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 转化率的影响　氨基酸添加量的变化对 *L. fermentum* FUA033 尿石素 A 转化率有一定影响。添加量为 0.1% 时，转化率最高，达到 59.83%（图 1D）。氨基酸在乳酸菌催化橄榄苦苷转化过程中提供氮源、增强 *β*-葡萄糖苷酶与酯酶的活性、调控代谢途径，并维持适宜的 pH，最终促进羟基酪醇的生成，提高生物转化效率[30]。低浓度的复合氨基酸，为乳酸菌提供氮源，提高鞣花酸转化效率，高浓度的氨基酸及其代谢产物对酶产生反馈抑制，影响尿石素 A 的合成。

2.1.5　富氢水对 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 转化率的影响　富氢水对 *L. fermentum* FUA033 尿石素 A 转化率影响较小，当添加量为 1.5% 时，转化率为 58.71%（图 1E）。氢气具有还原性，在细菌的代谢过程中与氧化态的底物反应，提供电子，从而促进还原反应。因此，添加富氢水可增强还原反应的发生[31]。梭菌在厌氧环境中通过发酵糖类生成氢气，利用氢分子作为电子供体，有效促进了细胞的生长和代谢，提升发酵效率[32]。氢气在培养基中的溶解量有限，导致其促进效果受限[33]。

根据上述结果，微量元素、维生素和甲基紫精对菌株转化鞣花酸生成尿石素 A 的影响更显著，因此，后续对三者进行响应面优化研究。

2.2　优化合成培养基响应面分析

根据单因素实验结果，筛选出对 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 影响较显著的微量元素溶液添加量、维生素溶液添加量和甲基紫精溶液添加量作为响应面因素。以转化率为响应值，采用三因素三水平法对培养基添加比例进行优化（表 2）。

表 2　响应面试验设计及结果

Table 2　Experimental design and results of response surface methodology

试验号	A微量元素	B甲基紫精	C维生素	转化率(%)
1	1	1	0	68.98
2	0	0	0	75.02
3	−1	0	−1	64.81
4	0	0	0	75.16
5	−1	0	1	66.15
6	−1	1	0	64.26
7	1	−1	0	67.13
8	1	0	1	70.19
9	0	1	−1	70.36
10	0	1	1	70.58
11	0	0	0	74.67
12	0	0	0	75.13
13	1	0	−1	69.49
14	0	−1	−1	68.14
15	0	−1	1	68.87
16	−1	−1	0	62.62
17	0	0	0	74.81

对响应面结果进行多元二次回归拟合，建立了转化率的回归方程 $Y=74.96+2.24A+0.9275B+0.3738C+0.0525AB-0.1600AC-0.1275BC-5.52A^2-3.69B^2-1.78C^2$，模型拟合的决定系数（$R$）和校正决定系数（$R$ 值）分别为 0.9986 和 0.9967，C.V.% 为 0.3358，远小于 10，表明该实验的可信度和精确度较高（表 3）。模型的 P 值小于 0.01，具有极显著性，失拟项 P 值为 0.3370，大于 0.05，不显著。微量元素、甲基紫精与维生素对尿石素 A 转化率影响极显著（$P<0.01$），各因素的二次项对尿石素 A 转化率的影响皆极显著（$P<0.01$）。

表 3　回归模型的方差分析

Table 3　Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	265.88	9	29.54	538.09	<0.0001	**
A	40.28	1	40.28	733.60	<0.0001	**
B	6.88	1	6.88	125.35	<0.0001	**
C	1.12	1	1.12	20.36	0.0028	**
AB	0.0110	1	0.0110	0.2008	0.6676	
AC	0.1024	1	0.1024	1.87	0.2143	
BC	0.0650	1	0.0650	1.18	0.3125	
A^2	128.25	1	128.25	2336.03	<0.0001	**
B^2	57.38	1	57.38	1045.12	<0.0001	**
C^2	13.33	1	13.33	242.72	<0.0001	**
残差	0.3843	7	0.0549			
失拟项	0.2052	3	0.0684	1.53	0.3370	不显著
纯误差	0.1791	4	0.0448			
总和	266.26	16				

注：**表示极显著水平（$P<0.01$）；*表示显著水平（$P<0.05$）。

图 2 为微量元素、甲基紫精、维生素交互作用对尿石素 A 转化率的影响，曲线陡峭程度反映了营养元素对于尿石素 A 转化率的影响。等高线呈椭圆形状表明自变量之间交互作用显著；而当等高线呈圆形时，则表明自变量之间的交互作用对响应变量影响不显著。如图 2 所示，三种因素两两之间交互作用不显著。通过 Design Expert 13.0 软件对回归模型方程求解得到的优化工艺条件为：微量元素溶液添加 0.160%、甲基紫精添加 0.156 mmol/L、维生素溶液添加 0.205%，产尿石素 A 的预测值为 75.261%。考虑实际情况，调整最佳发酵条件为微量元素溶液添加 0.16%、甲基紫精添加 0.16 mmol/L、维生素溶液添加 0.21%。为检验模型的可靠性，在此最优发酵培养基条件下，进行 3 次平行实验。所测得的尿石素 A 转化率为 74.91%±0.42%，与模型预测值接近，表明优化的发酵培养基参数准确可靠。

目前，*L. plantarum* CCFM1291 被接种于含有鞣花单宁的石榴汁中，发酵液中尿石素 A 的转化率达到了 10.73%[34]。相比于 *L. plantarum* CCFM1291，菌株 FUA033 的转化率高 64.18%。*S. thermophilus* FUA329 在发酵 50 h 时尿石素 A 的转化率达到 82%[10]。尽管 *L. fermentum* FUA033 转化率（74.91%）略低于 *S. thermophilus* FUA329，但 *L. fermentum*

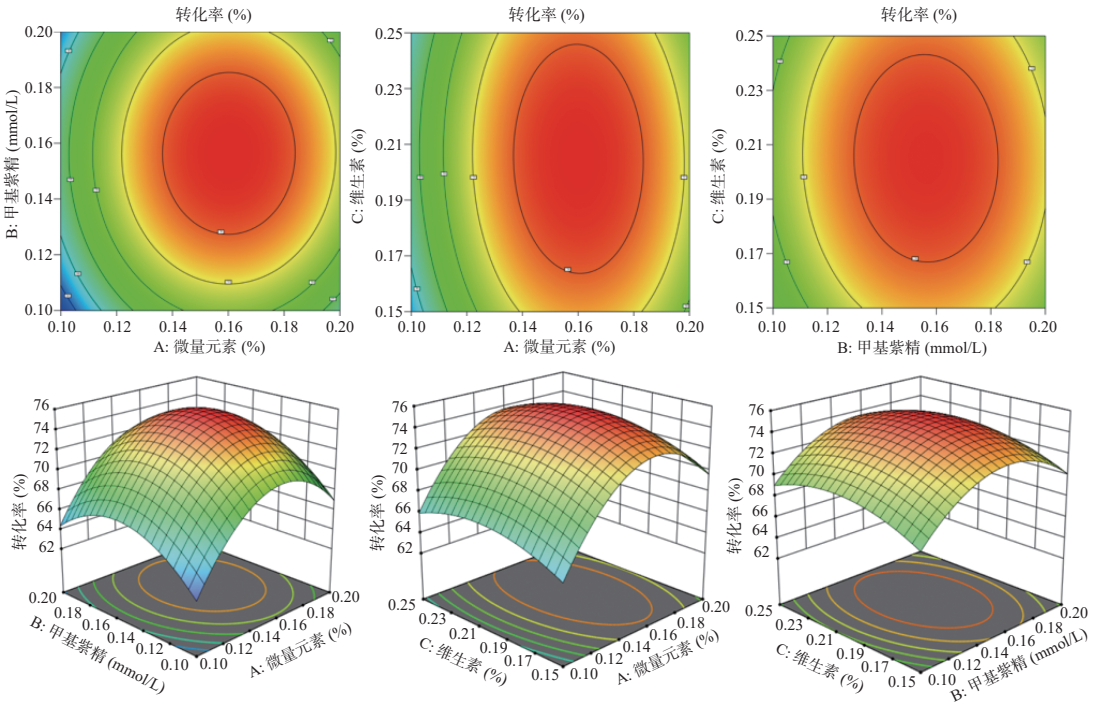


图 2　各因素交互作用对尿石素 A 转化率影响的等高线和响应面图

Fig.2　Contour lines and response surface for the interaction effects of various factors on the conversion rate of urolithine A

FUA033 具有较好的安全性和益生性，更具备开发为新一代益生菌的潜力。

2.3　转录组分析

2.3.1　测序结果和质量　对 *L. fermentum* FUA033 测序后的数据进行统计分析，该菌有 16451175 条 reads，Q20 值为 98.07%，Q30 值为 94.27%，Clean Data 值为 97.68%。大多数的碱基序列 Q 值在 20~30 范围内，表明测序准确性较高，碱基的质量良好。

2.3.2　差异表达基因分析　为了揭示 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 的关键酶编码基因，阐明其分子机制，对添加鞣花酸前后的菌株的转录组进行测序分析。根据 P<0.05 与|$\log_2$FC|>0 筛选菌株是否添加鞣花酸的差异表达基因。结果如图 3 所示，红点表示上调基因，绿点表示下调基因，蓝点表示非显著差异基因，点越靠近图左上角或者右上角表示基因的下调或上调越显著。添加与不添加鞣花酸的 *L. fermentum* FUA033 共有 187 个差异表达基因。其中，显著上调基因 64 个，显著下调基因 123 个，非显著差异基因 1895 个。表明添加鞣花酸后，*L. fermentum* FUA033 的代谢过程发生变化，体现在基因表达发生了显著变化。

2.3.3　添加鞣花酸后 *L. fermentum* FUA033 差异基因 GO 富集分析　以分子功能、生物过程和细胞组分 3 个层面为基础进行 GO 分类，挑选最显著富集的 30 个 Go term 进行分析，每个层面各选取 10 个 Go term。如表 4 和图 4 所示，在分子功能分类中，涉及到转运蛋白活性(transporter activity)、氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)这 2 条通路中的基因最多，说明可能在物质转运、能量代谢和抗氧化应激

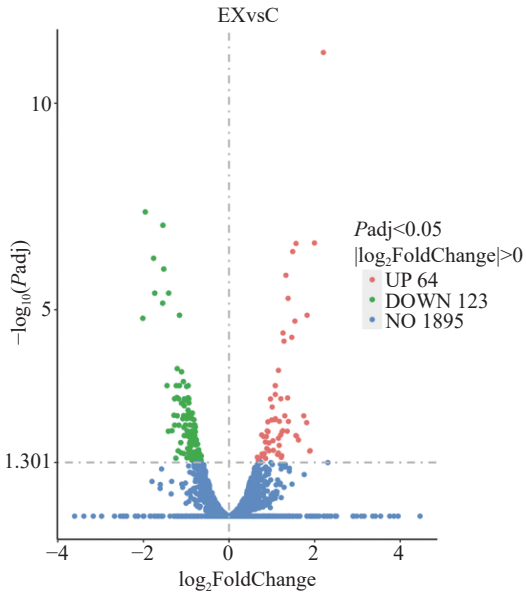


图 3　*L. fermentum* FUA033 差异表达基因火山图

Fig.3　Volcano map of *L. fermentum* FUA033 differentially expressed gene

注：EX 代表添加鞣花酸发酵的实验组；C 代表不添加鞣花酸发酵的对照组。

方面需求增加，反映出细胞可能处于高代谢活动状态。在细胞组分中，富集在膜(membrane)中的基因数目最多，这表明这些基因可能影响跨膜运输、信号传递或细胞与环境相互作用方面。在生物过程分类中，富集到最显著的差异表达基因与离子转运(ion transport)有关，含有 10 个差异表达基因；这表明这些基因可能影响调节离子平衡、信号传递或应对环境变化方面。

表 4　GO 分类统计结果

Table 4　GO statistical tables by category

类别	功能描述	GO ID(Level2)	EX vs C Up mRNA	EX vs C down mRNA
分子功能（Molecular Function）	主动跨膜转运蛋白活性(active transmembrane transporter activity)	GO:0022804	3	1
	ATP酶活性，偶联(ATPase activity, coupled)	GO:0042623	2	2
	氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)	GO:0016491	4	10
	跨膜转运蛋白活性(transmembrane transporter activity)	GO:0022857	9	4
	转运蛋白活性(transporter activity)	GO:0005215	10	4
	无机分子实体跨膜转运蛋白活性 (inorganic molecular entity transmembrane transporter activity)	GO:0015318	7	0
	离子跨膜转运体活性(ion transmembrane transporter activity)	GO:0015075	8	0
	阳离子跨膜转运体活性(cation transmembrane transporter activity)	GO:0008324	7	0
	无机阳离子跨膜转运体活性(inorganic cation transmembrane transporter activity)	GO:0022890	6	0
	单价无机阳离子跨膜转运体活性 (monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity)	GO:0015077	5	0
细胞组分（Cellular component）	细胞质(cytoplasm)	GO:0005737	2	2
	膜的固有成分(intrinsic component of membrane)	GO:0031224	2	6
	膜的整体成分(integral component of membrane)	GO:0016021	2	6
	细胞内(intracellular)	GO:0005622	5	3
	细胞内部分(intracellular part)	GO:0044424	5	3
	含蛋白质的复合物(protein-containing complex)	GO:0032991	5	2
	细胞部分(cell part)	GO:0044464	5	5
	细胞(cell)	GO:0005623	5	5
	膜部分(membrane part)	GO:0044425	6	6
	膜(membrane)	GO:0016020	11	11
生物过程（Biological process）	嘌呤核苷三磷酸生物合成过程(purine nucleoside triphosphate biosynthetic process)	GO:0009145	5	0
	核苷三磷酸生物合成过程(nucleoside triphosphate biosynthetic process)	GO:0009142	5	0
	ATP生物合成过程(ATP biosynthetic process)	GO:0006754	5	0
	离子转运(ion transport)	GO:0006811	10	0
	阳离子转运(cation transport)	GO:0006812	9	0
	离子跨膜转运(ion transmembrane transport)	GO:0034220	6	0
	无机阳离子跨膜转运(inorganic cation transmembrane transport)	GO:0098662	6	0
	无机离子跨膜转运(inorganic ion transmembrane transport)	GO:0098660	6	0
	阳离子跨膜转运(cation transmembrane transport)	GO:0098655	6	0
	单价无机阳离子转运(monovalent inorganic cation transport)	GO:0015672	7	0

注：EX代表添加鞣花酸发酵的实验组，C代表不添加鞣花酸发酵的对照组。

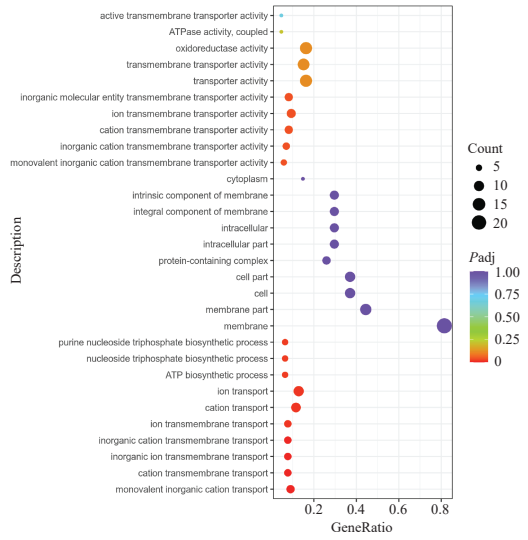


图 4　差异表达基因 GO 富集分析气泡图

Fig.4　Bubble diagram of GO enrichment analysis of differentially expressed gene

注：横坐标为注释到该功能的基因与差异基因总数比值，纵坐标为 GO Term，散点图以不同颜色，点的大小来展示，颜色从紫色到红色呈渐变色，颜色越红，富集越显著；点越大，富集上的基因越多。

2.3.4　添加鞣花酸后 *L. fermentum* FUA033 差异基因 KEGG 富集分析　通过对 KEGG 富集到的信息进行筛选及分析，选择富集结果 top20 的通路，结果如表 5 和图 5 所示，氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)的 KEGG Pathway 功能基因存在显著(P<0.05)富集，氧化磷酸化共注释到 6 个基因。氧化磷酸化是细胞产生能量的关键途径，能够通过电子传递链将 NADH 和 $FADH_2$ 转化为 ATP[35]。通过转录组测序技术分析了乙酸菌(主要是 *Komagataeibacter europaeus*)高酸发酵阶段氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)途径的相关基因上调情况，这些基因的上调可能是为了满足细胞在高酸压力下的能量需求，帮助菌体更好地应对胁迫条件[36]。如图 5 所示，代谢通路(Metabolic pathways)和次级代谢产物生物合成(Biosynthesis of secondary metabolites transporters)的 KEGG Pathway 功能基因富集程度大。代谢通路共注释到 37 个基因，次级代谢产物生物合成共注释到 20 个基因(表 5)。表明差异表达基因主要参与生物分子的合成与细胞代谢调控过程。

表 5 差异表达基因 KEGG 富集分析

Table 5 Analysis of KEGG enrichment for differentially expressed genes

功能描述	*P* value	*P* adj	基因名	总数	上调基因数	上调基因数
氧化磷酸化	0.000319155	0.013085347	*atpA*	6	6	0
代谢通路	0.299713711	0.87773301	–	37	17	20
次级代谢产物生物合成	0.175898484	0.721183786	–	20	7	13

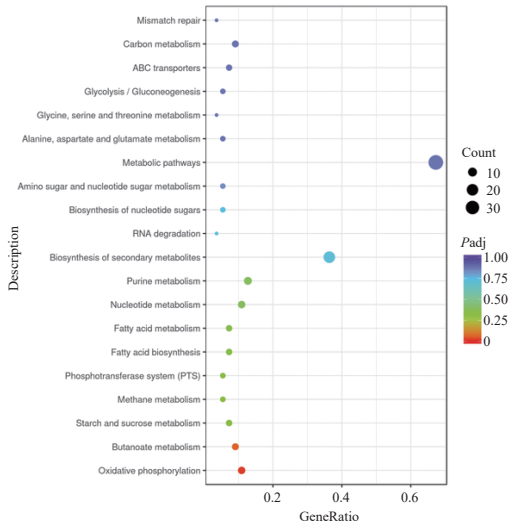


图 5 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig.5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

注：横坐标为注释到 KEGG 通路上的差异基因数与差异基因总数的比值，纵坐标为 KEGG 通路，散点图以不同颜色，点的大小来展示，颜色从紫色到红色呈渐变趋势，颜色越红，富集越显著，点越大，富集上的基因越多。

如表 5 所示，在 KEGG 富集分析的结果中，与对照组相比，添加鞣花酸组参与氧化磷酸化通路的相关基因显著上调。氧化磷酸化通路中的 *atpA* 基因表达上调，该基因编码的亚基在 ATP 合成过程中直接参与质子流动和旋转催化反应，从而保证 ATP 合成酶的高效运作，显著提升 ATP 合成量，维持能量平衡，确保细胞完成生理和代谢活动[37]。

如表 6 所示，添加鞣花酸后，*L. fermentum* FUA033 的 2 个内酯酶基因 Q3V38_RS01645 和 Q3V38_RS07670 的基因表达值从 103 和 105 分别增至 122 和 219，表明添加鞣花酸后，2 个内酯酶基因的表达量显著上调，推测为编码该菌株转化鞣花酸生成尿石素 A 的关键酶。内酯酶催化鞣花酸酯键断裂，进一步经脱羧反应和脱羟反应，生成尿石素 A[38]。在后续的研究中，可以通过基因的敲除、回补、过表达，结合发酵实验进一步确定。

表 6 添加鞣花酸后 *L. fermentum* FUA033 与内酯酶有关的显著差异基因表达情况

Table 6 Differential expression profiles of lactonase-encoding genes in *L. fermentum* FUA033 following ellagic acid supplementation

Gene_id	EX	C
Q3V38_RS01645	122	103
Q3V38_RS07670	219	105

注：EX代表添加鞣花酸发酵的实验组；C代表不添加鞣花酸发酵的对照组；Gene_id代表注释到KEGG通路编号上的差异基因id。

3 结论

本研究通过优化 *L. fermentum* FUA033 转化鞣花酸生成尿石素 A 的培养基，获得了最佳发酵培养基。在最佳培养基条件中，鞣花酸转化为尿石素 A 的转化率达到 74.91%，比优化前提高了 20.83%。经转录组学分析，添加鞣花酸前后 *L. fermentum* FUA033 有 187 个差异表达基因。GO 富集分析结果表明，差异表达基因主要富集在与转运蛋白活性、膜以及离子转运相关的生物学功能。KEGG 通路富集分析表明氧化磷酸化的功能基因存在显著富集，表明其在菌株的能量代谢中发挥关键作用。添加鞣花酸后，*L. fermentum* FUA033 的 2 个内酯酶基因的基因表达值显著增加。本研究为尿石素 A 的绿色微生物发酵技术开发奠定了重要理论基础，系统解析了 FUA033 菌株通过酶促级联反应将鞣花酸定向转化为尿石素 A 的关键分子机制。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] HE F, BIAN Y, ZHAO Y, et al. *In vitro* conversion of ellagic acid to urolithin A by different gut microbiota of urolithin metabotype A[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 215.

[2] STOENESCU A M, TRANDAFIR I. Ellagic acid: A review on natural sources and medicinal importance[J]. Annals of the University of Craiova, 2023, 28(64): 287−296.

[3] ZHAO H, SONG G, ZHU H, et al. Pharmacological effects of urolithin A and its role in muscle health and performance: Current knowledge and prospects[J]. Nutrients, 2023, 15(20): 4441.

[4] IGLESIAS-AGUIRRE C E, GARCÍA-VILLALBA R, BELTRÁN D, et al. Gut bacteria involved in ellagic acid metabolism to yield human urolithin metabotypes revealed[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(9): 4029−4035.

[5] CORTÉS-MARTÍN A, GARCÍA-VILLALBA R, GONZÁLEZ-SARRÍAS A, et al. The gut microbiota urolithin metabotypes revisited: The human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging[J]. Food & Function, 2018, 9(8): 4100−4106.

[6] HUA Z, WU Q, YANG Y, et al. Essential roles of ellagic acid-to-urolithin converting bacteria in human health and health food industry: An updated review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 151: 104622.

[7] GAYA P, PEIROTÉN Á, MEDINA M, et al. *Sporomusa ovata* INIA P815: The first bacterium able to produce urolithins A and B from ellagic acid[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 45: 95−99.

[8] ZHANG M, CUI S, MAO B, et al. Urolithin A produced by novel microbial fermentation possesses anti-aging effects by improving mitophagy and reducing reactive oxygen species in *Caenorhabditis elegans*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(16): 6348−6357.

[9] GARCÍA-VILLALBA R, GIMÉNEZ-BASTIDA J A, CORTÉS-

MARTÍN A, et al. Urolithins: A comprehensive update on their metabolism, bioactivity, and associated gut microbiota[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2022, 66(21): 2101019.
[10] LIU Q, LIU S, YE Q, et al. A novel *Streptococcus thermophilus* FUA329 isolated from human breast milk capable of producing urolithin A from ellagic acid[J]. Foods, 2022, 11(20): 3280.
[11] ZHANG X, FANG Y, YANG G, et al. Isolation and characterization of a novel human intestinal *Enterococcus faecium* FUA027 capable of producing urolithin A from ellagic acid[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1039697.
[12] MI H, LIU S, HAI Y, et al. *Lactococcus garvieae* FUA009, a novel intestinal bacterium capable of producing the bioactive metabolite urolithin A from ellagic acid[J]. Foods, 2022, 11(17): 2621.
[13] 母淑婷, 华梓延, 赵双双. 等. 基于全基因组测序的菌株 *Limosilactobacillus fermentum* FUA033 的安全性和益生特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(24): 169−175. [MU Shuting, HUA Ziyan, ZHAO Shuangshuang, et al. Safety and probiotic characteristics of *Limosilactobacillus fermentum* FUA033 based on complete genome analysis[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(24): 169−175.]
[14] 邹球龙, 金康, 黎琪, 等. 呕吐毒素脱毒菌 *Devosia* sp. 发酵培养基优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 93−99. [ZOU Qiulong, JIN Kang, LI Qi, et al. Optimization of fermentation medium of deoxynivalenol detoxified bacteria *Devosia* sp.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(18): 93−99.]
[15] 刘书彤, 石冰冰, 谭奕阳, 等. 一株产 L-苹果酸黑曲霉菌株的诱变筛选及发酵培养基优化[J]. 食品工业科技, 2024, 45(8): 165−173. [LIU Shutong, SHI Bingbing, TAN Yiyang, et al. Screening of mutants and optimization of fermentation medium for *Aspergillus niger* producing L-malic acid[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(8): 165−173.]
[16] HU T, ZHENG W, LI S, ET al. Changes in expressions of sRNA SpR19 and its potential target GroEL in *Streptococcus mutans* strains with different cariogenicity cultured under different pH conditions[J]. Journal of South Medical University, 2017, 37(6): 802−806.
[17] JIA H, HUANG S, CHENG S, et al. Novel mechanisms of selenite reduction in *Bacillus subtilis* 168: Confirmation of multiple-pathway mediated remediation based on transcriptome analysis[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 433: 128834.
[18] XIA M, HUA Z, ZHAO Y, et al. Improvement of urolithin A yield by *in vitro* cofermentation of *Streptococcus thermophilus* FUA329 with human gut microbiota from different urolithin metabotypes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(6): 3008−3016.
[19] 韩舒婷, 华梓延, 房耀维. 等. 嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液及贮藏特性评价[J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 322−328. [HAN Shuting, HUA Ziyan, FANG Yaowei. et al. Fermentation of green tea extract by *Streptococcus thermophilus* FUA329 and evaluation of storage characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 322−328.]
[20] HU X, ZHANG X, WANG J, et al. Transcriptome analysis of BmN cells following over-expression of *BmSTAT*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290: 2137−2146.
[21] ZABŁOCKA-SŁOWIŃSKA K, PRESCHA A, PŁACZKOWSKA S, et al. Serum and whole blood Cu and Zn status in predicting mortality in lung cancer patients[J]. Nutrients, 2021, 13(1): 60−72.
[22] PRABHU A, GADGIL M. Trace metals in cellular metabolism and their impact on recombinant protein production[J]. Process Biochemistry, 2021, 110: 251−262.
[23] MENG L, LI S, LIU G, et al. The nutrient requirements of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and their application to fermented milk[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(1): 138−150.
[24] WU C, ZHANG J, WANG M, et al. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(7): 1031−1039.
[25] WATANABE H, KISHINO S, KUDOH M, et al. Evaluation of electron-transferring cofactor mediating enzyme systems involved in urolithin dehydroxylation in *Gordonibacter urolithinfaciens* DSM 27213[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 129(5): 552−557.
[26] WEN Z T, NGUYEN A H, BITOUN J P, et al. Transcriptome analysis of LuxS-deficient *Streptococcus mutans* grown in biofilms[J]. Molecular Oral Microbiology, 2011, 26(1): 2−18.
[27] TIAN X, HU W, CHEN J, et al. The supplement of vitamin C facilitates L-lactic acid biosynthesis in *Lactobacillus thermophilus* A69 from sweet sorghum juice coupled with soybean hydrolysate as feedstocks[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 146: 112159.
[28] RASTOGI M, SINGH V, SHAIDA B, et al. Biofortification, metabolomic profiling and quantitative analysis of vitamin B_{12} enrichment in guava juice via lactic acid fermentation using *Levilactobacillus brevis* strain KU15152[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2024, 104(15): 9191−9201.
[29] LI P, ZHOU Q, GU Q. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ227, a potential probiotic strain producing B-group vitamins[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 234: 66−70.
[30] SANTOS M M, PICCIRILLO C, CASTRO P M L, et al. Bioconversion of oleuropein to hydroxytyrosol by lactic acid bacteria[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(6): 2435−2440.
[31] HE C, ZHANG B, YAN W, et al. Enhanced microbial chromate reduction using hydrogen and methane as joint electron donors[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 395: 122684.
[32] SRIVASTAVA N, SRIVASTAVA M, KUSHWAHA D, et al. Efficient dark fermentative hydrogen production from enzyme hydrolyzed rice straw by *Clostridium pasteurianum* (MTCC116)[J]. Bioresource Technology, 2017, 238: 552−558.
[33] BAJRACHARYA S, KRIGE A, MATSAKAS L, et al. Dual cathode configuration and headspace gas recirculation for enhancing microbial electrosynthesis using *Sporomusa ovata*[J]. Chemosphere, 2022, 287: 132188.
[34] 唐鑫, 张孟炜, 毛丙永, 等. 一株可产尿石素 A 抗衰老的植物乳杆菌及其应用: CN202211404309.8[P]. 2024-03-12. [TANG Xin, ZHANG Mengwei, MAO Bingyong, et al. Anti-aging *Lactobacillus* plantarum capable of producing urolithin A and application thereof: CN202211404309.8[P]. 2024-03-12.]
[35] GUO D, HE H, MENG Y, et al. Determiners of cell fates: The tricarboxylic acid cycle versus the citrate-malate shuttle[J]. Protein & Cell, 2023, 14(3): 162−164.
[36] YANG H, HE Y, LIAO J, et al. RNA-Seq transcriptomic analysis reveals gene expression profiles of acetic acid bacteria under high-acidity submerged industrial fermentation process[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 956729.
[37] SUZUKI T, UENO H, MITOME N, et al. F_0 of ATP synthase is a rotary proton channel[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(15): 13281−13285.
[38] ZHANG Mengwei, CUI Shumao, MAO Bingyong, et al. Ellagic acid and intestinal microflora metabolite urolithin A: A review on its sources, metabolic distribution, health benefits, and biotransformation[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(24): 6900−6922.