

乳酸菌渗透胁迫相关相容性溶质及其转运机制 研究进展

高薇 韩雪 张兰威*

(哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 渗透胁迫严重影响乳酸菌的生理功能, 制约着相关产品开发。近年来相容性溶质作为响应乳酸菌渗透胁迫的重要功能物质受到广泛关注。本文综述了国内外与乳酸菌响应渗透胁迫相关相容性物质的种类和特性, 在此基础上进一步介绍了其转运机制, 并对后续研究进行展望。

关键词: 乳酸菌, 渗透胁迫, 相容性溶质, 转运机制

Research advances of the osmotic stress-related compatible solutes of lactic acid bacteria and it's transport mechanism

GAO Wei HAN Xue ZHANG Lan-Wei*

(College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

Abstract: Osmotic stress seriously affects the physiological function of lactic acid bacteria, which has caused some difficulties in the development process of some related products. In recent years, compatible solutes as the functional substances in response to the osmotic stress of lactic acid bacteria have received extensive attention. In this paper, types, properties and transport mechanisms of the osmotic stress-related compatible solutes for lactic acid bacteria are detailed and the prospect of the follow-up research is also made.

Keywords: Lactic acid bacteria, Osmotic stress, Compatible solutes, Transport mechanism

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31101317); 国家 863 计划项目(No. 2011AA100902)

*通讯作者: Tel: 86-451-86282901; 信箱: zhanglw@hit.edu.cn

收稿日期: 2012-12-05; 接受日期: 2013-02-26

渗透胁迫是乳酸菌在工业生产中面临的重要胁迫因素之一,当外界渗透压改变时,乳酸菌菌体细胞体积缩小或膨胀,胞内各种生理代谢活动紊乱甚至死亡。食品工业中乳酸菌面临的渗透胁迫包括盐胁迫及糖胁迫,研究表明糖胁迫对乳酸菌影响较小且为瞬间渗透胁迫,糖可以通过自由扩散进入菌体细胞从而使乳酸菌在短时间内恢复胞内外渗透压平衡,而乳酸菌无法在短时间内消除盐胁迫带来的不利影响,故盐胁迫为其最主要渗透胁迫因素^[1]。乳酸菌在干酪、酱油、泡菜等发酵食品制备过程中都将面临盐胁迫,此外盐胁迫还将阻碍菌体密度进一步提高,造成高活性乳酸菌发酵剂制备及相关产品开发过程中的困难。近年来相容性溶质作为调节乳酸菌渗透压的重要功能物质受到广泛关注。1972年, Brown 和 Simpson 首次提出相容性溶质的概念,它指与细胞内体系相容而不影响其它生物大分子功能的溶质^[2]。细菌在胞内合成或转运该物质是对高渗环境的一种保护性反应,相容性溶质的积累能够提高胞内的渗透势从而抵御外界渗透压的改变来保持渗透平衡,减少细胞失水从而维持胞内蛋白质、核酸的稳定性及膜的完整性。

近年来,相容性溶质在直投式发酵剂制备工艺关键环节——乳酸菌高密度培养及冻干保护中引起了人们广泛关注。实现菌体的高密度培养是发挥乳酸益生菌等产品功能特性的首要条件。在高密度培养过程中,随着乳酸菌生长的外界环境不断发生变化,其渗透环境发生巨大改变,由于各种微生物生长都有最适渗透压,外界渗透压的改变引起了细胞体积、膜压、膜势能的改变,最终将导致细胞裂解。有些乳酸菌中会积累相应渗透保护物质——相容性溶质而继续生长繁殖, Baliarda 等学者研究表明,甘氨酸甜菜碱的添加能够缓解 *Pediococcus pen-*

tosaceus 因氯化钠胁迫引起的生长抑制,在含 0.8 mol/L 氯化钠的基质中添加该溶质能使菌体密度和比生长率分别提高至未添加时的 170% 及 135%^[3]。此外,使用糖类及甜菜碱类等相容性溶质作为冻干保护剂能显著提高乳酸菌在冻干过程中的存活率^[4-5],如在 *Lactobacillus reuteri* CICC6226 冷冻干燥过程中,在冷冻基质中添加蔗糖及海藻糖不仅能显著提高冻干后菌体乳酸脱氢酶和 ATP 酶活性,还能使菌体细胞膜完整性及流动性增强^[6]。

综上所述,研究乳酸菌渗透胁迫响应机制并开发相应适应策略在食品工业中意义重大,本文介绍了乳酸菌渗透胁迫响应核心物质——相容性溶质的种类、特性及转运机制,现将其国内外研究进展综述如下。

1 乳酸菌渗透胁迫响应相关相容性溶质种类及特性

目前研究表明乳酸菌渗透胁迫响应相关相容性溶质主要包括:季铵盐化合物类、氨基酸类以及四氢嘧啶、多肽等其他物质^[7-8]。

1.1 季铵盐化合物类

目前研究表明季铵盐化合物对乳酸菌具有重要的渗透调节功能,其中具有渗透保护作用的相容性溶质有:甘氨酸甜菜碱、肉毒碱和胆碱(表 1)。

研究人员对高渗胁迫乳酸菌细胞内可能积累的相容性溶质进行检测,分别在 *Lactococcus lactis*^[11]、*Pediococcus pentosaceus*^[3]、*Enterococcus faecalis*^[16]、*Lactobacillus plantarum*^[13]、*Lactobacillus coryniformis*^[8]、*Thellungiella halophila*^[9]中发现甘氨酸甜菜碱的存在,且随渗透压提高或培养时间延长其含量增加,这与本研究室在对 *Lactobacillus bulgaricus* 高密度培养基优化过程中对甜菜碱类的检测结果一

表 1 乳酸菌的潜在渗透保护剂					
Table 1 Potential osmoprotectant of lactic acid bacteria					
添加物质 Additive substance	典型菌株 Typical strains				
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ^[3]	<i>Thellungiella halophila</i> ^[9-10]	<i>Lactococcus lactis</i> ^[11-12]	<i>Lactobacillus plantarum</i> ^[13-15]	<i>Enterococcus faecalis</i> ^[16]
L-carnitine	+	+	+, -	+	+
Choline	+	+	-	+, -	ND
DMSA	+	+	+	ND	+
DMSP	-	+	+	ND	+
Ectoine	-	+	-	-	-
Glycine betaine	+	+	+	+	+
Pipecolic acid	-	-	-	ND	-
Proline	+	-	-, +	+	-
Sarcosine	-	-	ND	-	+
Taurine	-	-	-	ND	+

注: +: 具有高渗透保护特性; -: 不具有高渗透保护特性; ND: 未检测; DMSA: 二甲基巯基丁二酸; DMSP: 三甲基巯基丙酸。
Note: +: With high permeability protection characteristic; -: Without high permeability protection characteristic; ND: Not determined; DMSA: Dimethylsulfonioacetate; DMSP: Dimethylsulfoniopropionate.

致,并推测 *L. bulgaricus* 转运甜菜碱类到细胞内发挥渗透保护作用(本实验结果尚未公开发表)。Kets 等研究表明肉毒碱对 *L. plantarum* 和 *P. pentosaceus* 具有渗透保护作用(对 *P. pentosaceus* 保护作用较弱),且研究表明肉毒碱的渗透保护作用与立体构型无关^[3,17]。此外,肉毒碱结构类似物乙酰肉毒碱和丙酰肉毒碱在盐胁迫 *L. plantarum* 细胞中也能积累,其渗透保护作用弱于肉毒碱,故推测肉毒碱类的渗透保护作用随酰基碳链的增长而减弱。同时,另有研究表明季铵盐化合物中胆碱对 *T. halophila* 和 *P. pentosaceus* 具有渗透保护作用,胆碱对 *T. halophila* 的渗透保护作用虽弱,但在有氧条件下其能转换为甘氨酸甜菜碱进一步发挥渗透保护作用,该转换发生在有氧条件下,且提高基质盐度能激活/诱导胆碱—甘氨酸甜菜碱转换途径^[9]。

1.2 氨基酸类

除季铵盐类化合物外,某些氨基酸对乳酸菌也具有渗透保护作用。研究表明谷氨酸对

L. plantarum 和 *T. halophila* 具有渗透保护作用^[9,13]。Robert 等研究表明当 *T. halophila* 在含 1 mol/L 氯化钠的 DM 培养基中生长时,谷氨酸是其胞内溶质池中最主要的有机溶质,当培养基氯化钠浓度由 0 变化到 2 mol/L 时,谷氨酸的积累水平增长了 2-3 倍。同时该研究还表明脯氨酸和天冬氨酸对 *T. halophila* 也具有渗透调节功能^[9];Baliarda 等研究表明脯氨酸对 *L. plantarum*^[13]和 *P. pentosaceus*^[3]具有渗透保护作用;Le Marrec 等研究表明天冬氨酸对 *Oenococcus oeni* 具有渗透保护作用而脯氨酸没有作用,并推测在 *O. oeni* 中缺乏编码脯氨酸转运系统的基因^[15],该研究还表明当季铵盐化合物类存在时其能优先积累并抑制氨基酸类的积累,并推测氨基酸类对乳酸菌的渗透保护作用弱于季铵盐化合物类。

1.3 其他物质

除上述几种重要相容性溶质外,近年研究表明二甲基巯基丁二酸、三甲基巯基丙酸、四氢噻

啉和多肽对乳酸菌也具有重要渗透保护作用。

DMSA 和 DMSP 是甘氨酸甜菜碱的结构类似物。研究表明二甲基巯基丁二酸和三甲基巯基丙酸对 *L. lactis* subsp. *lactis* ADRIA 和 *T. halophila* 具有渗透保护作用^[3,11]。四氢嘧啶类是嗜盐菌中最普遍存在的相容性溶质,它能够处于极端条件刺激下的细菌细胞内大分子提供保护作用^[18-19]。目前资料表明四氢嘧啶只对乳酸菌中 *T. halophila* 具有渗透保护作用,与其他中度嗜盐菌不同的是 *T. halophila* 只能转运该物质而不能自身合成^[3,9]。此外,目前研究表明二肽、三肽对高渗基质中 *O. oeni* 和 *L. zeae* 的生长抑制具有缓解作用^[15,20]。Piuri 等发现小肽有助于高渗基质中 *L. zeae* 质粒 DNA 超螺旋的重建,同时该研究还表明,在添加小肽的高渗基质中细胞膜相关蛋白酶——PrtP 和 PepX 肽酶的活性增强^[20]。此外,研究表明谷胱甘肽对 *L. lactis* SK11 也具有高盐胁迫保护作用,通过蛋白组学分析表明,在添加谷胱甘肽的细胞内几种糖酵解相关酶类活性显著提高,并推测其为提高菌株胁迫抗性的关键因素^[21]。

2 乳酸菌渗透胁迫响应相关相容性溶质转运机制

高渗环境中细菌积累相容性溶质方式有两种:直接从环境吸收和自身合成。一般细菌可同时采用两种方式积累相容性溶质,也有的只采用一种。肠道菌及 *Bacillus subtilis* 等其他细菌在高渗环境中可以通过自身合成相容性溶质来平衡胞内外渗透压^[22],与它们不同,乳酸菌由于自身合成相容性溶质能力非常有限,它们很少或几乎不合成相容性溶质,而需从外界环境转运相容性溶质进行渗透调节^[23-24]。乳酸菌拥有进化高效的渗透依赖性转运系统吸收特定相容性溶质,目前相关报道中相容性溶质的吸

收及转运机制主要涉及到 *L. lactis*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* 等有限菌株。

2.1 乳球菌属

目前对乳球菌属菌株相容性溶质转运机制的研究主要涉及到 *L. lactis*, 与其相关相容性溶质中对甘氨酸甜菜碱的研究最热。研究表明在 *L. lactis* 中,甘氨酸甜菜碱的转运调节由转运系统 OpuA 调控^[25],它属于 ATP-结合盒(ABC)转运系统。典型的原核细胞结合蛋白依赖性 ABC 转运系统由 5 个蛋白组成:一个胞外结合蛋白(即感受器),两个 ATP-结合/水解蛋白和两个跨膜蛋白。与其他 ABC 转运系统相似, OpuA 系统也存在两个 ATP-结合/水解蛋白和两个跨膜蛋白,相比之下其结构还具有独特性。

如图 1 所示^[26], OpuA 系统由 OpuAA 亚单元及 OpuABC 亚单元组成。如图 2A 及 2B 所示^[27], Wolters 等研究表明 *opuAA* 基因编码由 408 个氨基酸组成的 ATP-结合/水解亚单元,其由核苷酸结合域(NBD)及非离子尾部串联的 CBS (胱硫醚- β -合成酶)域(大约 20 个氨基酸)组成。*opuABC* 基因编码一个由 573 个氨基酸组成的蛋白质, Patzlaff 等研究表明该蛋白是跨膜域 OpuAB (TMD)和底物结合域 OpuAC (含 2 个 SBD 子域)的融合区,而且两 SBD 子域之间能够交换,两 SBD 子域能通过相互作用刺激任一

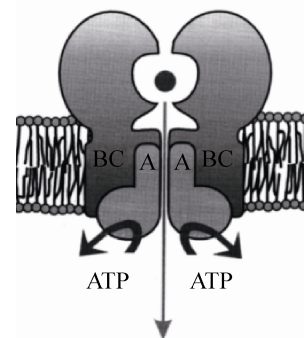


图 1 *Lactobacillus lactis* 的 OpuA 转运系统结构^[26]

Fig. 1 The structure of the transport system in *Lactobacillus lactis*—OpuA^[26]

子域与跨膜域 OpuAB 对接并将甘氨酸甜菜碱运输到该跨膜域上。该研究通过对 OpuA 系统结构的分析推测出该系统的一种甘氨酸甜菜碱转运机制, 如图 1 所示, 甘氨酸甜菜碱首先与 OpuABC 中底物结合域 OpuAC 结合, 然后其通过两步结合到 ATP 结合/水解亚单元 OpuAA 上, 此过程中每转运一分子甘氨酸甜菜碱两个 ATP 发生水解, 其中一个 ATP 用来提供跨膜转运甘氨酸甜菜碱的能量, 另一个用于系统重建^[28]。

在 *L. lactis* 转运甘氨酸甜菜碱的过程中,

OpuA 既渗透调节器也是感受器。Bouvier 等研究表明低渗条件下 OpuA 转运系统无活性, 当基质渗透压提高到阈值水平时其能够被激活。对于 *L. lactis*, 激活 OpuA 转运系统渗透压最低阈值水平为 20 mosmol/kg, 当渗透压达 270 mosmol/kg 时激活程度最大^[29], 且该激活阈值水平取决于细胞膜脂含量。此外研究表明膜脂头部基团的变化对 OpuA 的激活作用也有影响。两个 CBS (胱硫醚- β -合成酶) 子域组成的调节域负责调控与 OpuA 激活相关的脂依赖性离子^[30], 且当 CBS 子域被激活时其构象发生改变^[31]。

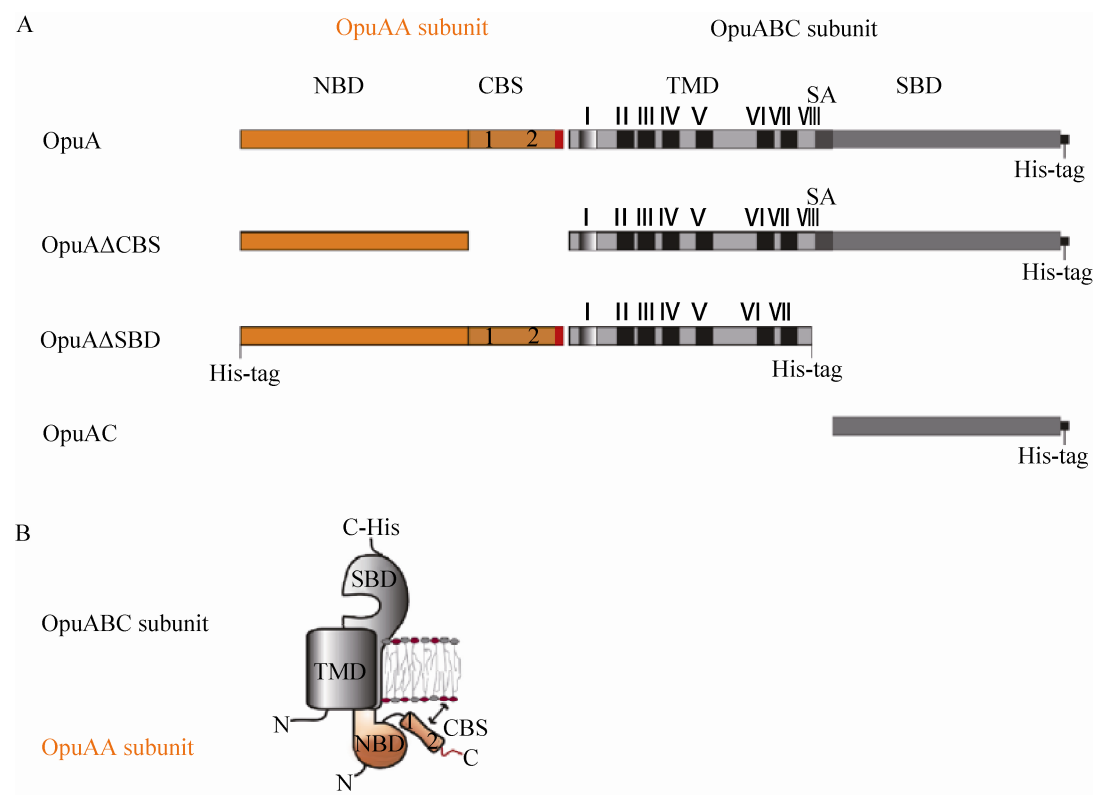


图 2 *Lactococcus lactis* 的 OpuA 转运系统结构分析^[27]

Fig. 2 The structure analysis of the transport system in *Lactococcus lactis*—OpuA^[27]

注: 图中 A 部分代表 OpuA 的几种不同结构, 在 TMD (OpuAB) 中: I 为两性分子螺旋; II–VII 为跨膜部分; SA 为信号锚定序列; 图中 B 部分展示了 OpuA 的不同结构的组成, 其中 OpuAA 亚基为橘色的, OpuABC 亚基为灰色的^[27]。

Note: Part A represents the different constructs of OpuA, in the TMD (OpuAB): I is amphipatic helix; II–VII are transmembrane segments; SA is the signal anchor sequence. Part B shows the organization of the different constructs of OpuA, the OpuAA subunits in orange and the OpuABC subunits are depicted in grey^[27].

OpuA 转运系统不仅是 *L. lactis* 的渗透调节器同时也是渗透感受器。Romeo 等研究表明 *opuA* 上游基因编码 BusR 蛋白, 在低渗条件下该蛋白能够与 *opuA* 启动子的一个重叠区结合起来抑制 *opuA* 转录。高渗条件下其与 *opuA* 启动子分离从而使 OpuA 转运系统具有活性。研究还表明渗透压能影响 *opuA* 操纵子的转录, 当渗透压骤升时 *opuA* 操纵子转录增强, 使得 OpuA 转运蛋白数量增多^[25,32], 进而使 *L. lactis* 对甘氨酸甜菜碱的转运作用增强。

2.2 乳杆菌属

研究人员对乳杆菌属菌株相容性溶质的转运机制也进行了初步研究, 目前研究菌株主要涉及到 *L. plantarum*、*L. sakei* 及 *L. salivarius*。

Glaasker 等研究表明在 *L. plantarum* ATCC14917 中存在着转运系统 QacT, 它在 *L. plantarum* 中负责甘氨酸甜菜碱和脯氨酸的转运。QacT 系统对甘氨酸甜菜碱转运亲和性较高 ($K_m=18 \mu\text{mol/L}$) 但对脯氨酸亲和性较低 ($K_m=950 \mu\text{mol/L}$), 胞内其他相容性溶质浓度的提高会与季铵盐化合物转运产生竞争作用^[33]。如图 3 所示, 当胞内外渗透压稳定时, 甘氨酸甜菜碱通过转运系统 QacT 吸收及外排系统 SES 排出, 从而含量保持在稳定水平。当胞外基质渗透压骤升时, 转运系统 QacT 被激活, 对甘氨酸甜菜碱转运作用增强而外排系统 SES 受到抑制。与此相反, 当胞外基质渗透压骤降时, 甘氨酸甜菜碱转运系统 QacT 受到抑制, 而外排系统 SES 被激活, 一个特定的细胞质膜门控通道 EC 同时打开协助外排系统 SES 完成甘氨酸甜菜碱外排^[13]。

此外, QacT 系统进行双重模式调节, 即反式底物的抑制作用减弱时或相关膨压升高时可激活该系统, 研究推测该激活机制可能同底物与系统内部位点结合引起的构象改变有关。

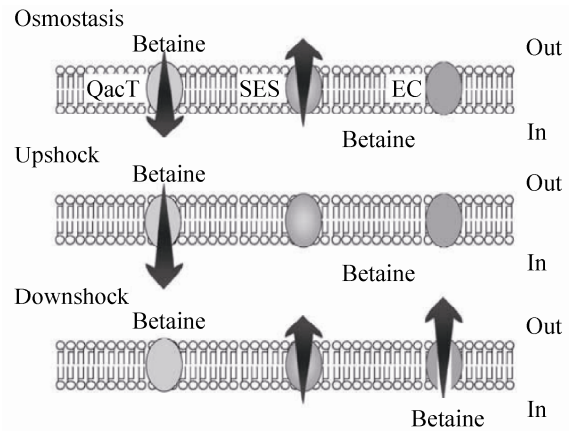


图 3 *Lactobacillus plantarum* 的渗透调节模式^[13]

Fig. 3 Osmoregulation mode in *Lactobacillus plantarum*^[13]

QacT 在基因表达水平调节作用较弱, 其转运调控作用主要体现在酶水平上。此外, 据目前 *L. plantarum* WCFS1 已发布的基因组信息表明 *L. plantarum* 中还存在另外两个 ABC 系统: 同 *L. monocytogenes* 的 OpuC 系统具有相似性的四组分系统 OpuABCD (负责谷氨酸的转运) 及转运系统 ChoQS (负责胆碱/甘氨酸甜菜碱转运)^[34]。

Chaillou 等通过全基因组测序研究表明 *Lactobacillus sakei* 基因组编码 3 个 ABC 转运系统 (这 3 个转运系统基因位置分别位于 0616–0619, 1 694–1 696, 1 869–1 870 kb 之间), 同时这 3 个转运系统与一个 Na^+ -依赖性的共输送体 (该共输送体基因位置位于 0264 kb) 偶联, 并推测这 3 个转运系统可以转运甘氨酸甜菜碱和肉毒碱从而发挥渗透保护作用。研究还推测, 在高盐条件下, *L. sakei* 可能利用胞外 Na^+ 来驱动与其他溶质的协同转运或外排, 并发现 *L. sakei* 中至少存在 6 个 Na^+/H^+ 反向转运体和 1 个 ATP-依赖型的 Na^+ 外排泵 (基因位置位于 0051–0052 kb 之间) 能调节胞外 Na^+ 的这种驱动作用^[35]。此外, 研究表明与 *L. lactis* 相似, 在 *L. salivarius*

中也存在 ChoQS 相关系统, 并推测其对细胞具有高盐胁迫保护作用^[36]。

2.3 其他乳酸菌属

目前报道中对乳球菌属及乳杆菌属外其他菌属菌株的研究较少, 主要包括乳片球菌属和乳链球菌属等。Baliarda 等研究表明甘氨酸甜菜碱、二甲基巯基丁二酸、L-肉毒碱、胆碱、脯氨酸能够解除在 0.8 mol/L 氯化钠 DM 培养基中 *P. pentosaceus* 因受渗透胁迫引起的生长抑制, 并推测在 *P. pentosaceus* 中存在着这 5 种物质的共转运系统。此外, 通过对 *P. pentosaceus* 及 *L. plantarum* 比较分析表明在渗透胁迫条件下两者为了维持渗透平衡所转运的相容性溶质的种类很相似, 主要的不同在于 L-肉毒碱对 *P. pentosaceus* 的渗透保护作用较弱^[3]。据报道 *P. pentosaceus* 与 *L. plantarum* 的一些基因具有同

源性, Kleerebezem 等通过对 *L. plantarum* WCFS1 菌株的全基因组序列分析表明, 在 *L. plantarum* WCFS1 中存在 5 个连续的基因所编码的蛋白同 *P. pentosaceus* (GenBank 登录号为 No. Z32771) 中负责糖类转运、代谢、调节的蛋白相似性几乎达到 100%^[34]。Abranches 等通过对 GenBank 中的资料搜索表明 *Streptococcus mutans* UA159 菌株基因组中包含两个渗透胁迫相关的基因簇, 这两个基因簇中的基因排列方式如图 4 所示, 两基因簇中包含了 ATP-结合盒 (ABC) 相容性溶质转运系统中的 *opu* 家族。图 4A 展示了第一个基因簇 *opu/opc* 及其侧区域的基因排列情况, 其中基因簇 *opu/opc* 同 *Listeria monocytogenes* 中的 *opuC* 基因簇(图 4C)具有显著的相似性。基因簇 *opu/opc* 中的第一个基因 *opcA* 同 *L. monocytogenes opuC* 基因簇中的

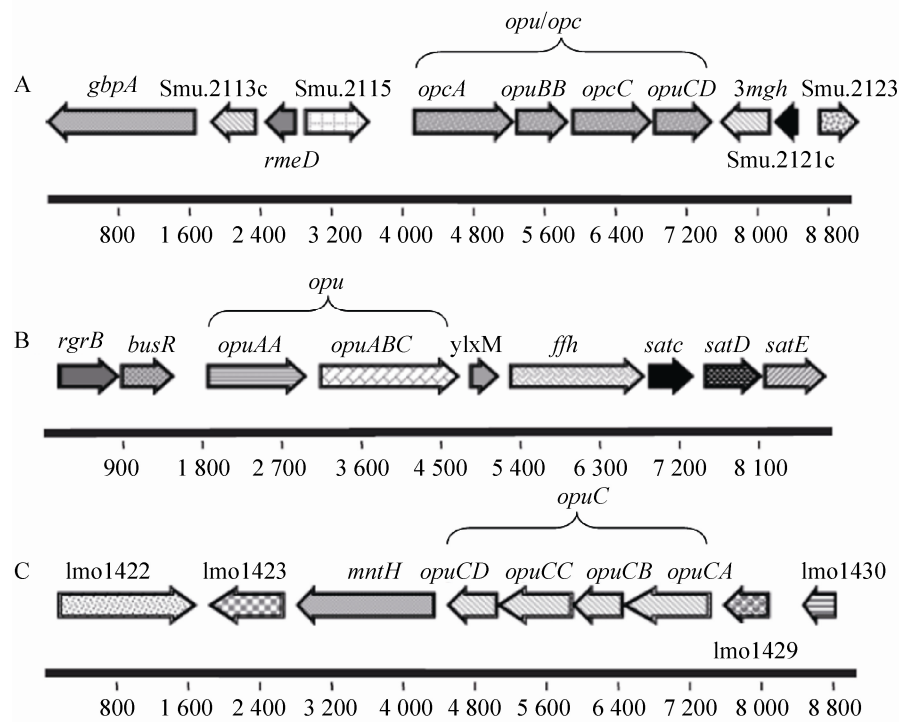


图 4 *Streptococcus mutans* UA159 与 *Listeria monocytogenes* 相容性溶质转运相关基因簇及侧区域基因排列图^[37]
Fig. 4 Arrangement of the genes for osmoprotectant uptake transporters and flanking regions in *Streptococcus* UA159 and *Listeria monocytogenes*^[37]

opuCA (图 4C) 基因相似性为 62%, 并研究推测 *opcA* 能够编码季铵盐转运系统。*opu/opc* 中的第二个基因 *opuBB* 编码一种膜透性酶, 它同 *L. monocytogenes opuC* 基因簇中的 *opuCB* 基因(图 4C)相似性为 60%。基因簇 *opu/opc* 中的第三个基因 *opcC* 编码一种季铵盐结合蛋白, 它同 *L. monocytogenes opuC* 基因簇中的 *opuCC* 基因(图 4C)的相似性为 52%。基因簇 *opu/opc* 中最后一个基因 *opuCD* 编码另一种膜透性酶, 它同 *L. monocytogenes opuC* 基因簇中的 *opuCD* 基因(图 4C)相似性为 60%。图 4B 展示了第二个基因簇 *opu* 的基因排列情况。该基因簇的第一个基因 *opuAA* 编码一个蛋白, 该蛋白同 *L. lactis* 中 *OpuA* 转运系统中 *OpuAA* 亚单元相似性为 66%。该基因簇的第二个基因 *opuABC* 编码的蛋白同 *L. lactis* 中脯氨酸/甘氨酸甜菜碱透性酶的相似性为 60%。同时, 与 *L. lactis* 相似, 在该基因簇 *opu* 的上游有一个调节基因 *busR*。Abranches 等通过 DNA 狭缝杂交分析表明, 渗透压骤变对基因 *opcA* 具有诱导作用, 并通过实时 PCR 研究表明渗透压骤变对基因 *opuAA* 也具有诱导作用。这些结果表明在渗透胁迫时 *S. mutans* UA159 菌株也可通过转运胞外相容性溶质来维持渗透平衡^[37]。

3 展望

据目前研究可将乳酸菌渗透胁迫响应机制概括为: (1) 感应渗透胁迫刺激; (2) 将信号传递到相关反应体系; (3) 激活相关转运蛋白及酶的活性; (4) 改变基因的表达谱。此外, 乳酸菌还可利用其它革兰氏阳性菌缺乏的 Sigma 因子来响应渗透胁迫。但目前国内外对于乳酸菌渗透胁迫相关相容性溶质转运机制的研究仅涉及到 *L. lactis*、*L. plantarum*、*P. pentosaceus* 等几种有限菌株, 而缺乏对与这几株乳酸菌转运

系统相关及无关的其他菌株的综合全面分析。我国对嗜盐菌渗透胁迫转运机制研究较多, 对乳酸菌的研究尚少。目前许多乳酸菌的遗传背景还不清楚, 相信通过基因组学及功能基因组学与经典生物化学相结合将为乳酸菌渗透胁迫转运机制及其他渗透胁迫响应机制的研究提供更大帮助。这些研究将为工业生产过程中选择与生产活性较高, 稳定性较好的发酵剂提供一个新的视角, 对于乳酸菌产品性能的提高意义重大。

参考文献

- [1] Molina-Höppner A, Doster W, Vogel RF, et al. Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 2013–2020.
- [2] Brown AD, Simpson JR. Water relations of sugar tolerant yeasts: the role of intracellular polyols[J]. Journal of General Microbiology, 1972, 72: 589–591.
- [3] Baliarda A, Robert H, Jebbar M, et al. Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 84: 13–20.
- [4] Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying[J]. Food Research International, 2010, 43: 193–202.
- [5] Strasser S, Neureiter M, Geppl M, et al. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107: 167–177.
- [6] Li BK, Tian FW, Liu XM, et al. Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226[J]. Applied Microbial and Cell Physiology, 2011, 92: 609–616.
- [7] Faiza B, Halima Z, Nour-Eddine K. Physiological

- responses of salt stress and osmoprotection with proline in two strains of lactococci isolated from camel's milk in Southern Algeria[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(83): 19429–19435.
- [8] Bergholtz ÅS, Wessman P, Wuttke A, et al. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying[J]. *Cryobiology*, 2012, 1: 2.
- [9] Robert H, Le Marrec C, Blanco C, et al. Glycine betaine, carnitine, and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 509–517.
- [10] Baliarda A, Robert H, Jebbar M, et al. Isolation and characterization of ButA, a secondary glycine betaine transport system operating in *Tetragenococcus halophila*[J]. *Current Microbiology*, 2003, 47: 347–351.
- [11] Uguen P, Hamelin J, Le Pennec JP, et al. Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 291–293.
- [12] Obis D, Guillot A, Gripon JC, et al. Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 6238–6246.
- [13] Glaasker E, Konings WN, Poolman B. Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmotic stress and hyper- and hypo-osmotic shock[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(27): 10060–10065.
- [14] Kets EP, Groot M, Galinski EA, et al. Choline and acetylcholine: novel cationic osmolytes in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 48: 94–98.
- [15] Le Marrec C, Bon E, Lonvaud-Funel A. Tolerance to high osmolality of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* and identification of potential osmoprotectants[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115: 335–342.
- [16] Pichereau V, Bourot S, Flahaut S, et al. The osmoprotectant glycine betaine inhibits salt-induced cross-tolerance towards lethal treatment in *Enterococcus faecalis*[J]. *Microbiology*, 1999, 145: 427–435.
- [17] Kets EPW, Galinski EA, De Bont JAM. Carnitine: a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Archives of Microbiology*, 1994, 162: 243–248.
- [18] Bursy J, Kuhlmann AU, Pittelkow M, et al. Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 7286–7296.
- [19] Mustakhimov II, Reshetnikov AS, Khmelenina VN, et al. Regulatory aspects of ectoine biosynthesis in halophilic bacteria[J]. *Microbiology*, 2010, 79(5): 583–592.
- [20] Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM. Adaptation to high salt in lactobacillus: role of peptides and proteolytic enzymes[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95: 372–379.
- [21] Zhang Y, Zhu Y, Mao SM, et al. Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(10): 3177–3186.
- [22] Smits SHJ, Höing M, Lecher J, et al. The compatible-solute-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis*: ligand binding, site-directed mutagenesis and crystallographic studies[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(16): 5663–5671.
- [23] Van Der Heide T, Poolman B. Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(1): 203–206.
- [24] Konings WN. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 82: 3–27.

- [25] Romeo Y, Bouvier J, Gutierrez C. Osmotic regulation of transcription in *Lactococcus lactis*: ionic strength-dependent binding of the BusR repressor to the busA promoter[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 581: 3387–3390.
- [26] Wood JM, Bremer E, Csonka LN, et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2001, 130: 437–460.
- [27] Wolters JC, Berntsson RPA, Gul N, et al. Ligand Binding and Crystal Structures of the Substrate-Binding Domain of the ABC Transporter OpuA[J]. PLoS ONE, 2010, 5(4): e10361. doi: 10.1371/journal.pone.0010361.
- [28] Patzlaff JS, Van Der Heide T, Poolman B. The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 29546–29551.
- [29] Bouvier J, Bordes P, Romeo Y, et al. Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2000, 2: 199–205.
- [30] Mahmood NA, Biemans-Oldehinkel E, Poolman B. Engineering of ion sensing by the cystathionine beta-synthase module of the ABC transporter OpuA[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284: 14368–14376.
- [31] Karasawa A, Erkens GB, Berntsson RPA, et al. Cystathionine β -Synthase (CBS) Domains 1 and 2 fulfill different roles in ionic strength sensing of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286: 37280–37291.
- [32] Sir  na N, Salonen K, Leisola M, et al. A new salt inducible expression system for *Lactococcus lactis*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 48: 132–135.
- [33] Glaesker E, Heuberger EHML, Konings WN, et al. Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180: 5540–5546.
- [34] Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(4): 1990–1995.
- [35] Chaillou S, Champomier-Verg  s MC, Cornet M, et al. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(12): 1527–1533.
- [36] Fang F, Flynn S, Li Y, et al. Characterization of endogenous plasmids from *Lactobacillus salivarius* UCC118[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74: 3216–3228.
- [37] Abranches J, Lemos JA, Burne RA. Osmotic responses of *Streptococcus mutans* UA159[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 255: 240–246.