

研究报告

天冬氨酸提高乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* NZ9000 酸胁迫抗性的作用机制

张彦位^{1,2} 张娟^{1,2*} 堵国成^{2,3} 陈坚^{2,4}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

(3. 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(4. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【背景】乳酸菌作为重要的发酵微生物在应用过程中面临广泛存在的酸胁迫。【目的】确认天冬氨酸可有效提高乳酸乳球菌的酸胁迫抗性,通过解析天冬氨酸的作用机制,为进一步提高乳酸菌酸胁迫抗性提供可借鉴的思路。【方法】通过荧光定量 PCR 比较胁迫条件下天冬氨酸对 *L. lactis* NZ9000 产能和氨基酸代谢途径中关键基因转录水平的影响,并通过过量表达天冬酰胺酶增加胞内天冬氨酸的含量。【结果】天冬氨酸主要是在转氨酶的作用下生成草酰乙酸和谷氨酸。草酰乙酸参与三羧酸循环,为细胞提供更多的能量;谷氨酸经谷氨酸脱羧酶途径提高细胞的酸胁迫抗性。经 pH 4.0 胁迫处理后,天冬氨酸使糖酵解和三羧酸循环产能途径中关键基因转录上调,胞内 ATP 含量为对照组的 42 倍;胞内谷氨酸含量为对照的 1.99 倍。通过过量表达天冬酰胺酶获得的重组菌株,在 pH 3.6 条件下胁迫 0.5 h 后,存活率约为对照组的 11.11 倍。【结论】在 *L. lactis* NZ9000 中探究了天冬氨酸提高酸胁迫抗性的作用机理,进一步完善了氨基酸代谢提高乳酸菌酸胁迫抗性的理论基础。

关键词: *Lactococcus lactis* NZ9000, 天冬氨酸, 酸胁迫, 荧光定量 PCR, 天冬酰胺酶

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31470160); Production Prospective Joint Research Project in Jiangsu Province (BY2016022-39)

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85918307; E-mail: zhangj@jiangnan.edu.cn

Received: January 08, 2018; **Accepted:** March 26, 2018; **Published online** (www.cnki.net): May 15, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31470160); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2016022-39)

***通信作者:** Tel: 86-510-85918307; E-mail: zhangj@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-01-08; **接受日期:** 2018-03-26; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-05-15

Improvement of acid-tolerance of *Lactococcus lactis* NZ9000 by aspartate

ZHANG Yan-Wei^{1,2} ZHANG Juan^{1,2*} DU Guo-Cheng^{2,3} CHEN Jian^{2,4}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(3. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(4. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Background] As an important microorganism in fermentation, lactic acid bacteria are confronted with severe acid stress during the process of production. [Objective] We analyzed the specific mechanism how aspartic acid improved acid stress resistance of *L. lactis* NZ9000. [Methods] The effects of aspartate on transcription levels of key genes in energy production and amino acid metabolic pathways were analyzed by fluorescence quantitative PCR under acid stress. The content of aspartic acid was increased by overexpression of L-asparaginase. [Results] The main mechanism of aspartic acid to improve the acid stress resistance was generating oxaloacetate and glutamate in the role of transaminase. Oxaloacetate entered three carboxylic acid cycle and can provide more energy for cells; glutamate promoted acid resistance through glutamic acid decarboxylase pathway. The transcription levels of genes of glycolysis and three carboxylic acid cycle pathway were up-regulated and the content of intracellular ATP was 42 times as high as that in the control group at pH 4.0 for some time. The intracellular glutamate content was 1.99 times higher than that of the control. The survival rate of recombinant strain obtained by overexpression L-asparaginase was about 11.11 times as high as that of the control at pH 3.6 for 0.5 h. [Conclusion] Aspartic acid could improve acid stress resistance of *L. lactis* NZ9000.

Keywords: *Lactococcus lactis* NZ9000, Aspartate, Acid stress, Fluorescence quantitative PCR, L-asparaginase

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)属于革兰氏阳性菌,是一类兼性厌氧、不产芽孢、可发酵碳水化合物生成乳酸和其他风味物质的细菌,在食品、饮料和微生物菌剂等领域被广泛应用,属于重要的发酵微生物^[1]。在发酵生产和应用过程中,乳酸的大量生成以及人或动物的胃肠道都会使乳酸菌遭受强烈的酸胁迫,影响乳酸菌的生长与代谢,进而抑制其目的产物的进一步积累和益生功能的发挥,因此,提高乳酸菌酸胁迫抗性尤为迫切^[2-3]。目前,改善酸胁迫抗性的方法主要有适应性进化^[4]、过量表达胁迫抗性相关的应激蛋白^[5]、添加或异源表达海藻糖以及亚铁血红素等保护剂^[6-7]。

氨基酸作为维持细胞生长代谢的重要原料物质,在提高细胞酸胁迫抗性中发挥着重要作用。目前的相关研究主要集中于谷氨酸脱羧酶途径和精

氨酸脱亚胺酶途径。谷氨酸脱羧酶途径主要通过谷氨酸在谷氨酸脱羧酶作用下消耗胞内 H^+ 生成 γ -氨基丁酸来维持胞内 pH (pH_i) 的平衡^[8-10]; 精氨酸脱亚胺酶途径中精氨酸逐步代谢生成 NH_3 和 ATP, 中和 H^+ 的同时也有利于 H^+ 排出胞外^[11-13]。此外,支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)的合成会竞争消耗丙酮酸,降低甲酸等产量,缓和胁迫压力,从而改善乳酸菌的酸胁迫抗性。Len 等^[14]发现酸胁迫下其合成过程中编码转氨酶的 *ihvE* 转录水平上调 2.70 倍; Santiago 等^[15]将 *ihvE* 敲除,重组菌株的酸胁迫抗性显著降低。然而,相较于谷氨酸脱羧酶途径和精氨酸脱亚胺酶途径,对其它氨基酸代谢途径在改善微生物酸胁迫抗性方面的研究还非常有限,相关的作用机理也有待进一步探究。

本团队前期研究中通过适应性进化,获得了酸

胁迫下存活率为对照菌株 4 100 倍的耐酸突变株——干酪乳杆菌 Lbz-1, 进一步分析发现耐酸突变株胞内天冬氨酸(Asp)积累量显著增加^[16]。为了进一步发掘 Asp 在作为酸胁迫主体乳酸菌中的抗酸胁迫作用, 本研究以乳酸菌模式菌 *Lactococcus lactis* NZ9000 为研究对象, 验证 Asp 在改善酸胁迫方面的作用效果, 并进一步探究其具体的作用机制, 以期为氨基酸代谢途径的抗酸作用机制解析和工业耐酸菌株的构建提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

所用菌株为 *Lactococcus lactis* NZ9000 (保藏编号: LLN, CP002094; 荷兰“NIZO Food Research”奶制品研究所), 质粒为 pNZ8148^[17]。 *L. lactis* NZ9000 在 GM17 培养基(M17 中添加 5 g/L 的葡萄糖)和只含游离氨基酸的 SA 化学合成培养基^[18]培养, 培养温度为 30 °C。

1.2 主要试剂和仪器

M17 肉汤培养基(Oxoid)、天冬氨酸(Asp), 生工生物工程(上海)股份有限公司; GeneJET PCR 纯化试剂盒、*Spe* I、*Sph* I 内切酶和 NuPAGE 10% Bis-Tris Gel, Thermo Scientific 公司; Solution I、PrimerSTAR HS (Premix)、PrimeScriptTM Reagent Kit 和 SYBR[®] Premix ExTaqTM, 大连宝生物工程有限公司; Nisin、缬氨霉素与尼日利亚菌素, Sigma 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit, 天根生化科技有限公司; ATP Assay Kit、BCECF AM 荧光探针, 碧云天生物技术研究; Ammonia Assay Kit, ScienCell 公司; 细胞丙酮酸激酶(PK)总活性比色法定量检测试剂盒, 上海杰美基因医药科技有限公司; AmpliteTM Colorimetric NAD/NADH Ratio Assay Kit, AAT Bioquest[®]公司; 其他试剂均为国产分析纯。

组织和细胞匀浆仪, MP Biomedicals 公司; LightCycler[®]480 system, 罗氏公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 安捷伦科技(中国)有限公司; 多功能酶标仪, Thermo Scientific 公司; 凝胶成像仪、

电转化仪, Bio-Rad 公司。

1.3 Asp 最适添加浓度的测定

30 °C 静置培养 12 h 的种子液以 2% 的接种量转接至外源 Asp 浓度分别为 0、40、60、80 mmol/L 的 GM17 培养基中, 待生长至对数中期(5 h)、稳定中期(9 h)、稳定中后期(13 h)时, 取 10 mL 菌液于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 菌体用等体积磷酸缓冲液(200 mmol/L, pH 7.00)重悬后 8 000 r/min 离心 3 min, 洗涤 2 次, 液氮预冻, 保存备用。将菌体重悬于 1 mL 上述磷酸缓冲液中于室温下解冻, 菌悬液转移至破碎管中, 使用 FastPrep-24 振荡破碎细胞, 12 000 r/min 离心 5 min 取上清液, 向上清液中加入等体积的 5%三氯乙酸(TCA)混匀, 静置 30 min 沉淀蛋白, 12 000 r/min 离心 5 min 取上清, 0.22 μm 的水系滤膜过滤备用。

高效液相色谱仪分析方法: 邻二甲苯(OPA)进行柱前衍生; 色谱柱: ODS HYPERSIL (250 mm×4.60 mm×5 μm); 柱温: 40 °C; 流速: 1 mL/min; 紫外检测器: 激发波长 338 nm, 接收波长 262 nm^[19]。

1.4 *L. lactis* NZ9000 酸胁迫抗性的分析

如 1.3 培养 12 h 的种子液以 2% 的接种量转接至含 60 mmol/L Asp 和 pH 分别为 6.0、5.5、5.0、4.5 (乳酸调节)的 GM17 培养基中, 于 30 °C 静置培养。每隔 1 h 取样, 测定 600 nm 处的吸光值, 以 GM17 培养基为空白对照。以 OD_{600} 为纵坐标, 培养时间为横坐标, 绘制 *L. lactis* NZ9000 的生长曲线。每次测定 3 个平行, 结果取平均值。

如 1.3 培养 12 h 的种子液以 2% 的接种量转接至 GM17 培养基中, 待菌体生长至对数中期(5 h), 取 5 mL 菌液于 8 000 r/min 离心 3 min, 用 0.85%生理盐水重悬后 8 000 r/min 离心 3 min, 洗涤 2 次, 加等体积 pH 4.0 和含 60 mmol/L Asp 的 GM17 培养基进行胁迫培养。分别胁迫 0、1.5、2.5、3.5 h 后, 取 900 μL 菌液于 8 000 r/min 离心 3 min, 用 0.85%生理盐水洗涤并梯度稀释至合适浓度, 取 10 μL 点种于 GM17 琼脂培养基上, 30 °C 培养 24 h, 单菌落计数并计算存活率(活菌计数的有效范围为 30–300 CFU)^[20]。

1.5 荧光实时定量 PCR

L. lactis NZ9000 在 GM17 培养基中生长至对数中期(5 h), 8 000 r/min 离心 3 min, 0.85%生理盐水洗涤、收集菌体, 加等体积 pH 4.0 GM17 胁迫培养。胁迫 3.5 h 后离心、洗涤、离心收集菌体, 液氮冷冻后迅速研磨, 按照 RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit 说明书提取总 RNA, 并立即使用 PrimeScript™ Reagent Kit 将 RNA 反转录为 cDNA。根据 *L. lactis* NZ9000 目的基因的序列, 使用 Beacon Designer 7 软件设计实时荧光定量 PCR (RT-PCR)的引物(表 1), 以 16S rRNA 基因作为内参基因。RT-PCR 反应体系: 2×SYBR® Premix *ExTaq*™ 7.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L)各 0.6 μL, cDNA 模板(200 ng/μL) 1.2 μL, 无菌水 5.1 μL。RT-PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 5 s, 55 °C 20 s, 共 40 个循环。

表 1 RT-PCR 引物

Table 1 Primers used in RT-PCR

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')
acnBF	ACAGATAGTCATACAACAAT	akF	CTGGAAGAATTGAAGATA
acnBR	CTAACATTACAGCCTCAG	akR	ATATAAGGAATGACTGAAG
argGF	CTTGGCATATTCAGGTGGAT	pdHF	CTCATATTCACCAGTAA
argGR	AAGCGGCAATGACATCAA	pdHR	TGCTTATCATAGTCAACA
argHF	TCAAGTAGCAACCGATATG	thrAF	GCAGACAATATCCACAACCTT
argHR	GGCATAAGAGTGTCAACA	thrAR	GACTCGGTAAGCCAGAAT
LdhF	ACTTATTACGGAATTGGAATG	glkF	CAGGAATCGTTTCGCTTAG
LdhR	TTACGACAGATGGAACAC	glkR	TTACTTCATCACCATTGTCAA
adeF	CTTCACCTCATTCCATCA	pfkF	GCTCAAGTAGAAGGACAAC
adeR	TCAGCAAGATAAGCGATT	pfkR	GTCACCACCGATTACAAC
ser II F	TGTTCCACATCCAGAAGAA	pgkF	TCCATTTCGTAGCAATCCTT
ser II R	ATTCCAGTCACGGTCATT	pgkR	CCACCACCGATGATAACT
glyAF	CAATCCACTTCCTTATGC	pkF	CGTTGTTACTGGAGATAA
glyAR	TTAGCCAAGACTTCATCA	pkR	CATCATCAATCAAGATAGTT
aspBF	TCAATCATTCATCCAATCCT	pycAF	GAACCTCGTCAACCTCTACT
aspBR	TTACGACAGCCATTCTTG	pycAR	CACATATTCAACTACCGCATCA
gltBF	TCGTGACAGGAAGAGATG	gltAF	AACAATACTGACCAATCCTT
gltBR	GATACAACCAATCGCAACT	gltAR	GCTAACGACTGCTCTAAG
pyOF	TCAGCAAGATAAGCGATT	gapdhF	AACAGTCGTATTCAACAC
pyOR	CTTCACCTCATTCCATCA	gapdhR	GTATGAGTGGACAGTAGT
gadF	GCCTATCAGTTAGTTCAA	16S rRNAF	GCTAATACCGCATAATAACTT
gadR	CAGTTGTTCTTGGATATTC	16S rRNAR	TATGTATCATCGCCTTGG

1.6 *L. lactis* NZ9000 胞内氨基酸含量的测定

为了避免 GM17 培养基中多肽对胞内氨基酸含量测定的影响, 将如 1.3 培养 12 h 的种子液以 2% 的接种量转接至 SA 合成培养基中, 菌体生长至对数中期(5 h), 8 000 r/min 离心 3 min, 用 0.85%生理盐水重悬、离心, 洗涤 2 次, 加等体积 pH 4.0 和含 60 mmol/L Asp 的 SA 合成培养基进行胁迫培养。分别胁迫 0、1.5、2.5、3.5 h 后取 10 mL 菌液离心、洗涤、离心收集菌体并用液氮预冻, 保存备用。按照 1.3 的方法破碎细胞、制备液相样品并测定氨基酸的含量。

1.7 胞内 ATP、丙酮酸激酶(PK)酶活、氧化还原电位和 pH_i 的测定

L. lactis NZ9000 在 GM17 培养基中生长至对数中期(5 h), 8 000 r/min 离心 3 min, 用 0.85%生理盐

水洗、收集菌体,随后在 pH 4.0 条件下进行胁迫培养。胁迫 0、0.5、1.0、1.5、2.5、3.5 h 后,取样、离心、洗涤,液氮预冻后进行破碎。取破碎液上清液,分别用 ATP Assay Kit、细胞丙酮酸激酶(PK)总活性比色法定量检测试剂盒和 Amplite™ Colorimetric NAD/NADH Ratio Assay Kit 测定胞内 ATP 的含量、PK 活性以及胞内 NAD⁺/NADH 的比率。

1.8 重组菌株 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-ansB 表达载体的构建与转化

在 KEGG 中获得编码天冬酰胺酶的基因 *ansB* 的序列,利用 Primer Premier 5 设计引物 ansBF 和 ansBR (表 2),上、下游引物的 5'端分别加入 *Xba* I 和 *Sac* I 两个酶切位点(引物中划线部分)。以 *L. lactis* NZ9000 的基因组为模板,通过 PCR 扩增获得 *ansB* 基因。PCR 反应体系: 2×Prime STAR HS (Premix) 25.0 μL,引物 ansBF 和 ansBR (10 μmol/L)各 2.0 μL, *L. lactis* NZ9000 的基因组模板 2.0 μL, 无菌水 19.0 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 28 个循环。质粒 pNZ8148 和 PCR 扩增产物分别用 *Xba* I 和 *Sac* I 进行酶切,酶切产物纯化后用 DNA 连接酶将目的基因与载体连接。利用电转化的方法将重组质粒和空质粒转入 *L. lactis* NZ9000,通过氯霉素抗性筛选获得重组菌株 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB* 和对照菌株 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148。

1.9 天冬酰胺酶的诱导表达和酶活力测定

重组菌株和对照菌株在含有 10 mg/L 氯霉素的 GM17 培养基中生长至 *OD*₆₀₀ 约为 0.4,加入 10 mg/L 的 Nisin 诱导天冬酰胺酶表达。待菌株生长至稳定中期(9 h),8 000 r/min 离心 3 min,用 0.85%生理盐水洗涤、收集菌体。用磷酸缓冲液(100 mmol/L, pH 7.2)重悬菌体,使用 FastPrep-24 振荡破碎细胞,

4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 后取上清进行 SDS-PAGE 分析和酶活力测定。

SDS-PAGE 分析^[21]采用 5%的上层浓缩胶和 12%的下层分离胶,制备方法参考上海碧云天生物技术有限公司南通分公司的产品说明书。5×Loading buffer 的制备: 1.25 mL Tris-HCl (1 mol/L, pH 6.8), 0.5 g SDS, 25.0 mg 溴酚蓝, 2.5 mL 甘油, 加去离子水溶解并定容至 5 mL, 室温保存备用。取 40 μL 样品,加 10 μL 5×Loading buffer, 70 °C 加热 10 min, 10 000 r/min 离心 30 s, 取上清液 20 μL 上样进行电泳。电泳结束后,蛋白胶在考马斯亮蓝 R-250 溶液染色 1 h, 10% (体积比)醋酸脱色至出现清晰的蓝色蛋白条带。

利用奈氏试剂显色法测定天冬酰胺酶的活性。酶活性单位: 1 min 转化 L-asparagine 生成 1 μmol/L Asp 和 NH₃ 所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)^[22]。

1.10 胁迫条件下重组菌株酸胁迫抗性的分析

在含有 10 mg/L 氯霉素的 GM17 培养基中培养重组菌株和对照菌株至 *OD*₆₀₀ 约为 0.4, 加入 10 mg/L 的 Nisin 诱导生长,待菌株生长至对数中后期(6 h), 8 000 r/min 离心 3 min, 0.85%生理盐水洗涤、离心、收集菌体,加等体积 pH 3.6 的 GM17 进行胁迫培养。每隔 0.25 h 取样, 点板, 测定重组菌株的存活率。

1.11 胁迫条件下重组菌株胞内氨基酸、NH₄⁺和 ATP 含量的测定

Nisin 诱导重组菌株和对照菌株生长至对数中后期(6 h), 8 000 r/min 离心 3 min, 0.85%生理盐水洗涤、收集菌体,加等体积 pH 3.6 的 GM17 培养基进行胁迫培养。每隔 0.5 h 取样, 收集菌体, 破碎细胞,取细胞破碎液测定胞内氨基酸、NH₄⁺和 ATP。

选用 Ammonia Assay Kit (ScienCell)测定胞内 NH₄⁺浓度,原理是在 α-酮戊二酸和谷氨酸脱氢酶存在条件下 NADPH 被氧化生成 NADP,随着反应的进行,在 340 nm 处的吸光度逐渐降低, NH₄⁺浓度与其氧化速率成正比,根据氧化速率求出样品中 NH₄⁺的浓度。

2 结果与分析

2.1 Asp 最适添加浓度的确定

随着外源 Asp 浓度的增加和培养时间的延长,

表 2 质粒构建用引物

Figure 2 Primers used for plasmid construction

引物	序列
Primers	Sequences (5'→3')
ansBF	ATATATCTAGAAATGAAAAAATCTTAATTCTCCAC
ansBR	ATATAGAGCTCTTAATTTTCCAAAAAAGGACG

L. lactis NZ9000 胞内 Asp 的积累量会不断增加, 直至达到饱和。通过高效液相色谱仪对不同外源 Asp 浓度下 *L. lactis* NZ9000 的胞内含量进行了测定, 结果如表 3 所示。当外源 Asp 浓度高于 60 mmol/L 时,

表 3 外源 Asp 对 *L. lactis* NZ9000 胞内 Asp 含量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)的影响

Table 3 The effect of exogenous Asp concentration on intracellular Asp of *L. lactis* NZ9000 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)

时间 Time (h)	外源 Asp 浓度 Concentration of exogenous Asp (mmol/L)			
	0	40	60	80
5	12.29 \pm 0.04	26.23 \pm 0.09	35.47 \pm 0.11	33.14 \pm 0.07
9	25.76 \pm 0.12	50.43 \pm 0.06	56.51 \pm 0.09	56.80 \pm 0.12
13	25.53 \pm 0.08	44.36 \pm 0.02	43.83 \pm 0.07	46.01 \pm 0.03

胞内含量不再增加, 维持在 56 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白左右, *L. lactis* NZ9000 的胞内 Asp 含量已达到饱和, 因此选用 60 mmol/L 为最适添加浓度进行后续实验。

2.2 Asp 对 *L. lactis* NZ9000 酸胁迫抗性的影响

为了确定 Asp 对 *L. lactis* NZ9000 酸胁迫抗性的影响, 测定了在含有 Asp 的 pH 分别为 6.0、5.5、5.0、4.5 胁迫条件下, *L. lactis* NZ9000 的生长性能。结果如图 1 所示。在 pH 6.0、5.5、5.0 的培养条件下, Asp 的存在使稳定期(12 h) *L. lactis* NZ9000 的生物量分别增加 23.9%、63.3%和 463.0%。实验结果表明, 酸胁迫条件下, Asp 可以明显提高 *L. lactis* NZ9000 的生长性能。

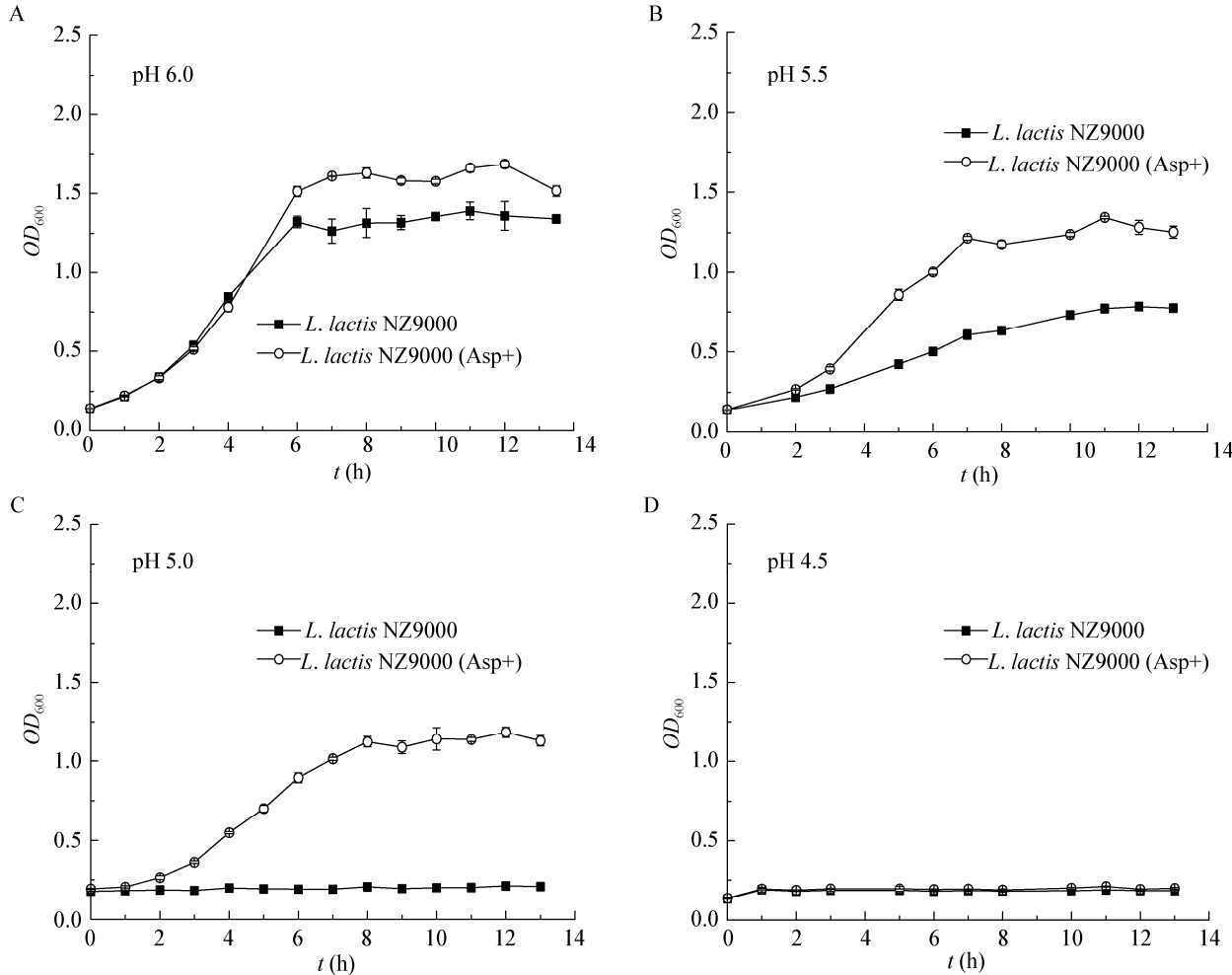


图 1 不同 pH 下 *L. lactis* NZ9000 的生长曲线

Figure 1 Growth curves of *L. lactis* NZ9000 under different pH

注: A: pH 6.0; B: pH 5.5; C: pH 5.0; D: pH 4.5. 误差线为 3 次平行实验的标准差。

Note: A: pH 6.0; B: pH 5.5; C: pH 5.0; D: pH 4.5. Error bars indicate standard deviations (n=3).

为了进一步确定酸胁迫条件下 Asp 对 *L. lactis* NZ9000 耐受性的影响, 测定了 pH 4.0 时菌株的存活率。结果如图 2 所示, 胁迫 3.5 h 后, 菌株存活率为对照的 75 倍, 表明 Asp 可显著提高 *L. lactis* NZ9000 在 pH 4.0 胁迫条件下的存活率。

通过生长性能和存活率分析, 验证了 Asp 可显著提高 *L. lactis* NZ9000 的酸胁迫抗性。

2.3 Asp 对 *L. lactis* NZ9000 关键基因转录水平的影响

上述实验结果证实 Asp 可有效提高 *L. lactis* NZ9000 的酸胁迫抗性。Asp 在 *L. lactis* NZ9000 的代谢方式包括: (1) 在转氨酶的作用下生成草酰乙酸和谷氨酸; (2) 在裂解酶的作用下生成精氨酸和延胡索酸。草酰乙酸和延胡索酸参与三羧酸循环为细胞提供了更多的能量; 谷氨酸和精氨酸分别经谷氨酸脱羧酶途径和精氨酸脱亚胺酶途径代谢提高了细胞的酸胁迫抗性^[23-24]。我们利用 RT-PCR 确定了胁迫条件下 Asp 对 *L. lactis* NZ9000 糖酵解和三羧酸循环主要产能途径, 及 Asp 代谢途径中关键基因转录水平的影响。如图 3 所示(*R* 代表胁迫前后基因

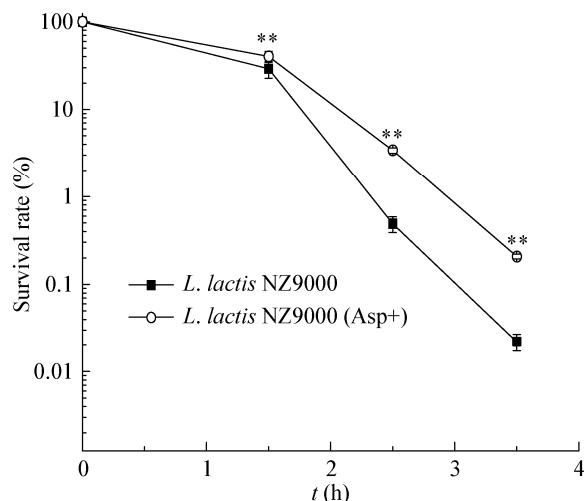


图 2 胁迫条件下 Asp 对 *L. lactis* NZ9000 存活率的影响
Figure 2 The effect of Asp on the survival rate of *L. lactis* NZ9000 under acid stress

注: 误差线: 标准差($n=3$); **: 差异显著($P \leq 0.05$).

Note: Error bars indicate standard deviations ($n=3$); **: Significant difference ($P \leq 0.05$).

转录水平的比值), 因为天冬氨酸转氨酶在 Asp 合成和代谢过程中具有极高的专一性^[24], pH 4.0 胁迫 3.5 h 后, 编码天冬氨酸转氨酶(L-aspartate aminotransferase)的 *AspB* 基因转录上调 2.24 倍, 表明 Asp 在 *L. lactis* NZ9000 的主要代谢方式是在转氨酶作用下生成草酰乙酸(Oxaloacetate)和谷氨酸(Glu)。

2.4 Asp 对 *L. lactis* NZ9000 胞内 Glu 和 GABA 含量的影响

为了确定天冬氨酸转氨酶途径和谷氨酸脱羧酶途径的代谢强弱, 分别测定了其代谢产物 Glu 和 GABA 的含量。同时, 为了避免多肽水解对胞内氨基酸含量的影响, 选用只含游离氨基酸的化学合成培养基培养 *L. lactis* NZ9000, 利用高效液相色谱仪测定了胁迫条件下外源 Asp 对胞内 Glu 和 GABA 含量的影响, 结果见图 4。pH 4.0 胁迫条件下 Asp 的存在使胞内 Glu 和 GABA 的含量明显增加, 胁迫 3.5 h 后, 其含量分别为对照的 2.28 和 2.22 倍, 与基因转录水平的分析结果一致。

2.5 Asp 对 *L. lactis* NZ9000 胞内微环境的影响

上述 RT-PCR 结果表明, 胁迫条件下 Asp 使得糖酵解和三羧酸循环产能途径中关键基因上调, 可能为细胞提供了更多的能量, 更好地维持了 pH_i 的相对稳定。为了进一步证实该结论, 对 pH 4.0 胁迫条件下 *L. lactis* NZ9000 胞内 ATP、PK 酶活力、氧化还原电位和 pH_i 进行了测定, 结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出, 胁迫条件下, Asp 的存在可明显提高 *L. lactis* NZ9000 胞内 ATP 的含量, pH 4.0 条件下胁迫 3.5 h 后 ATP 含量为对照组的 42 倍; pH 4.0 胁迫初期, *L. lactis* NZ9000 的 PK 酶活力明显升高, 随着胁迫时间的延长, 酶活力迅速下降, Asp 可以保持 PK 酶活力相对稳定, 胁迫 3.5 h 后约为对照组的 1.6 倍; 酸胁迫使 *L. lactis* NZ9000 胞内 NAD^+ 含量明显升高, 氧化呼吸产能无法正常进行, 而 Asp 可以维持 $NAD^+/NADH$ 的相对平衡; 胁迫 3.5 h 后, 对照组的 pH_i 不断下降, 其 ΔpH 为 0.24, 而 Asp 的存在使 pH_i 的下降明显降低, ΔpH 仅为 0.10, 有效地保证了 pH_i 的相对平衡。

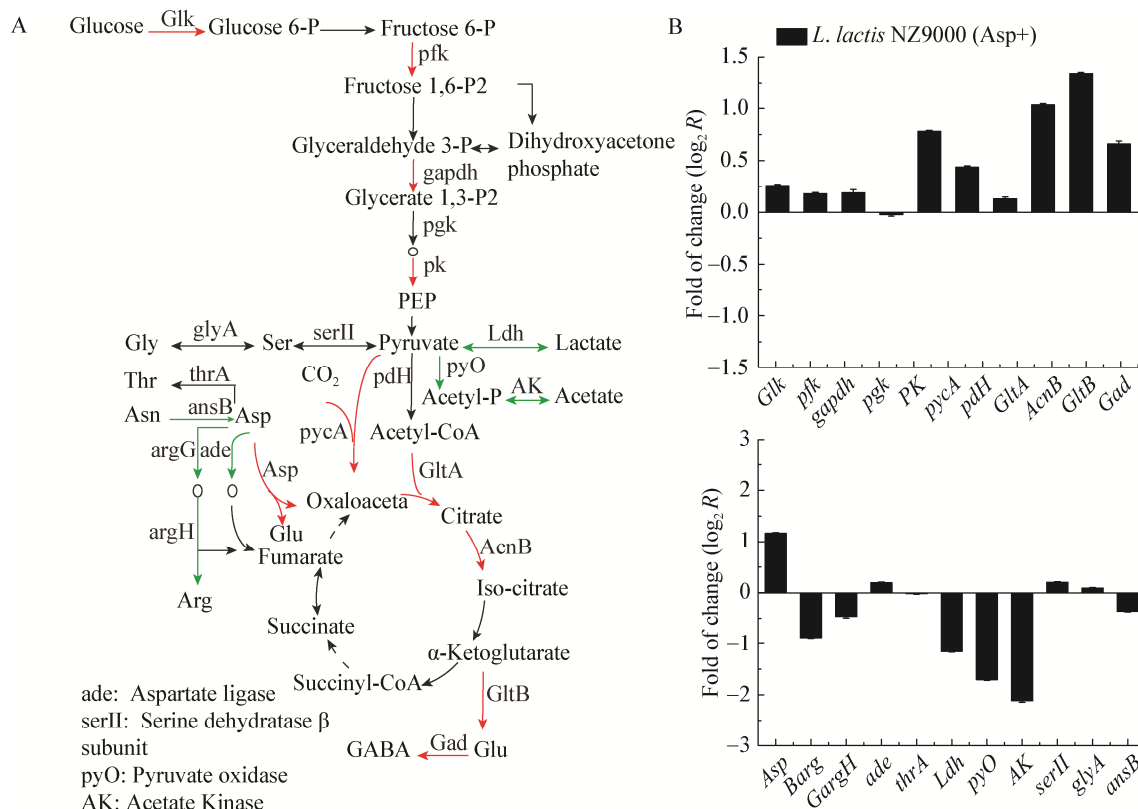


图3 *L. lactis* NZ9000 中葡萄糖和氨基酸代谢机制及 Asp 对其中关键基因转录水平的影响

Figure 3 Schematic representation of glucose and amino acid pathway in *L. lactis* NZ9000 and effect of Asp on the transcriptional level of key genes

注: A: *L. lactis* NZ9000 中葡萄糖和氨基酸代谢机制; B: Asp 对关键基因转录水平的影响。R: 胁迫前后基因转录水平的比值。

Note: A: Schematic representation of glucose and amino acid pathway in *L. lactis* NZ9000; B: Effect of Asp on the transcriptional level of key genes. R: The ratio of gene transcription levels before and after acid stress.

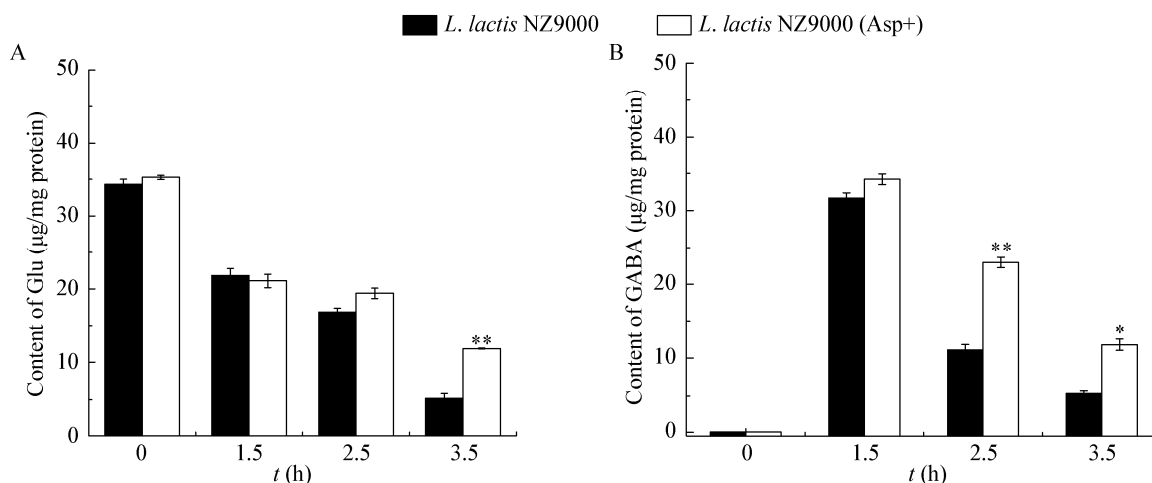


图4 胁迫条件下 Asp 对胞内 Glu 和 GABA 含量的影响

Figure 4 Effect of Asp on the content of other Glu and GABA under acid stress

注: A: Glu 的含量; B: GABA 的含量; 误差线: 标准差($n=3$); **: 差异显著($P \leq 0.05$); *: 差异显著($P \leq 0.1$).

Note: A: Content of Glu; B: Content of GABA; Error bars indicate standard deviations ($n=3$); **: Significant difference ($P \leq 0.05$); *: Significant difference ($P \leq 0.1$).

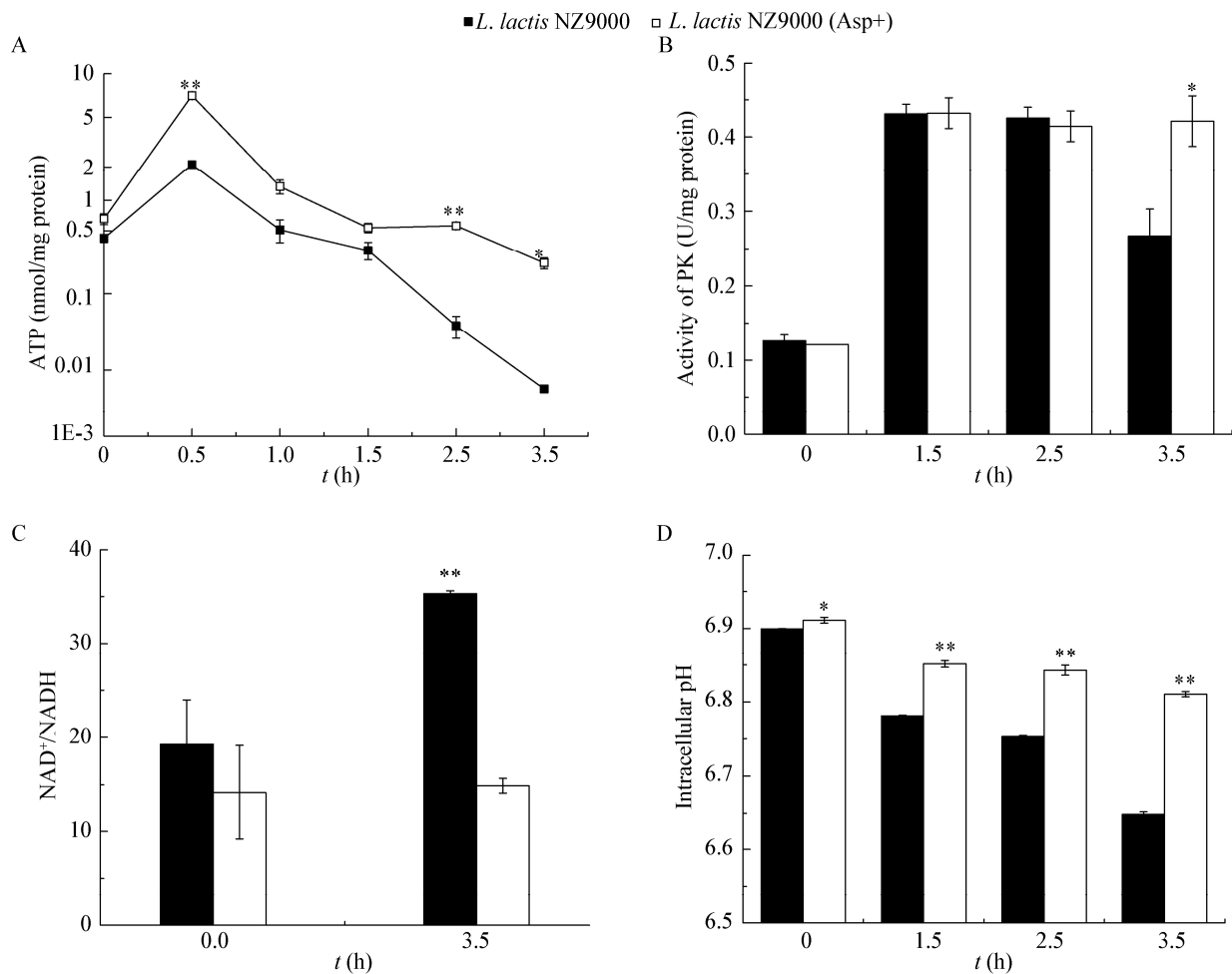


图 5 胁迫条件下 Asp 对胞内 ATP、PK 酶活力、NAD⁺/NADH 和 pH_i 的影响

Figure 5 Effect of Asp on the contents of intracellular ATP, activity of PK, ratio of NAD⁺/NADH and intracellular pH under acid stress

注: A: 胞内 ATP 的浓度; B: PK 酶活; C: NAD⁺/NADH; D: pH_i. 误差线: 标准差(n=3); **: 差异显著(P≤0.05); *: 差异显著(P≤0.1).

Note: A: Intracellular ATP concentration; B: Activity of PK; C: NAD⁺/NADH; D: Intracellular pH. Error bars indicate standard deviations (n=3); **: Significant difference (P≤0.05); *: Significant difference (P≤0.1).

2.6 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-ansB 的诱导表达和酶活测定

上述实验结果证实, 胞内 Asp 的积累可有效提高 *L. lactis* NZ9000 的酸胁迫抗性。依靠外源添加方法, 胞内 Asp 积累量较对照增加了 2.19 倍, 酸胁迫抗性得到明显改善, 但是由于 Asp 和 Glu 有共同的转运蛋白 AcaP^[25], 大量外源 Asp 对转运蛋白的竞争严重抑制了胞内 Glu 的积累^[3]。Glu 作为 *L. lactis* NZ9000 的必需氨基酸在菌株生长和抵御酸胁迫方面

都发挥重要作用, 因此, 为了避免转运载体的竞争对 Glu 含量的影响, 通过分子生物学手段使 *L. lactis* NZ9000 积累更多的 Asp, 从而提高其酸胁迫抗性。重组菌株诱导培养后, 收集菌体进行了 SDS-PAGE 分析并测定了 L-asparaginase 的酶活力, 结果如图 6 所示。L-asparaginase 的分子量为 34.97 kD, 从图 6A 中可以看出 L-asparaginase 在 *L. lactis* NZ9000 中成功表达。与对照菌株相比, *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-ansB 的天冬酰胺酶酶活提高了 5.57 倍(图 6B)。

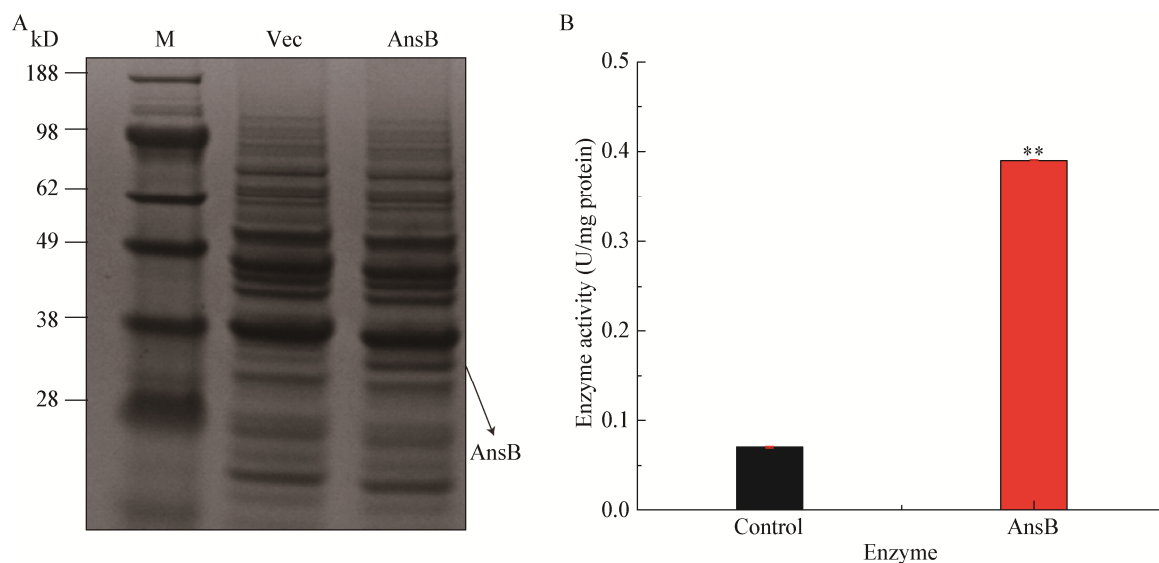


图6 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB* SDS-PAGE 分析(A)和天冬酰胺酶的酶活力(B)

Figure 6 SDS-PAGE analysis of *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB* (A) and activity of L-asparaginase (B)

注: M: Marker; Control: *L. lactis* NZ9000-pNZ8148; AnsB: *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB*. 误差线: 标准差($n=3$); **: 差异显著($P\leq 0.05$).

Note: M: Marker; Control: *L. lactis* NZ9000-pNZ8148; AnsB: *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB*. Error bars indicate standard deviations ($n=3$); **: Significant difference ($P\leq 0.05$).

2.7 胁迫条件下 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB* 的存活率

诱导培养 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB*, 并进一步降低 pH 加剧胁迫。如图 7 所示, pH 3.6 胁迫

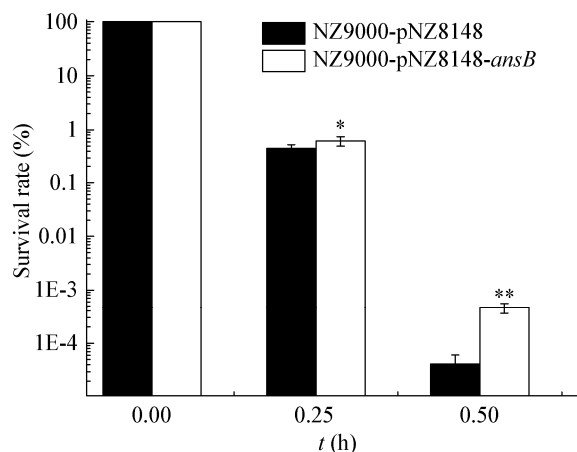


图7 胁迫条件下 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB* 的存活率

Figure 7 The survival rates of *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB* under acid stress

注: 误差线: 标准差($n=3$); **: 差异显著($P\leq 0.05$); *: 差异显著($P\leq 0.1$).

Note: Error bars indicate standard deviations ($n=3$); **: Significant difference ($P\leq 0.05$); *: Significant difference ($P\leq 0.1$).

迫培养 0.5 h 后, 重组菌株 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB* 的存活率为对照的 11.11 倍, 重组菌株的酸胁迫抗性得到显著提高, 表明通过基因工程手段增加菌株胞内 Asp 积累量是提高其酸胁迫抗性的有效方法。

2.8 胁迫条件下重组菌株胞内氨基酸和 NH_4^+ 含量的测定

为了进一步验证天冬酰胺酶的作用效果, 测定了胁迫培养后 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB* 胞内氨基酸和 NH_4^+ 的含量, 结果如图 8 所示。Asp 作为谷氨酸(Glu)、苏氨酸(Thr)和亮氨酸(Leu)的前体物质, 随着其胞内积累量的增加, Glu、Thr 和 Leu 的含量均增加。pH 3.6 条件下胁迫 0.5 h 后 Asp、Glu、Thr 和 Leu 含量分别为对照菌株的 2.14、2.84、2.77 和 6.49 倍。此外, 天冬酰胺酶催化天冬酰胺生成 Asp 和 NH_3 , 胁迫过程中 NH_3 可以中和 H^+ 生成 NH_4^+ , 重组菌株 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-*ansB* 胞内 NH_4^+ 明显高于对照菌株, 胁迫 1 h 后胞内 NH_4^+ 含量为对照菌株的 3.75 倍。

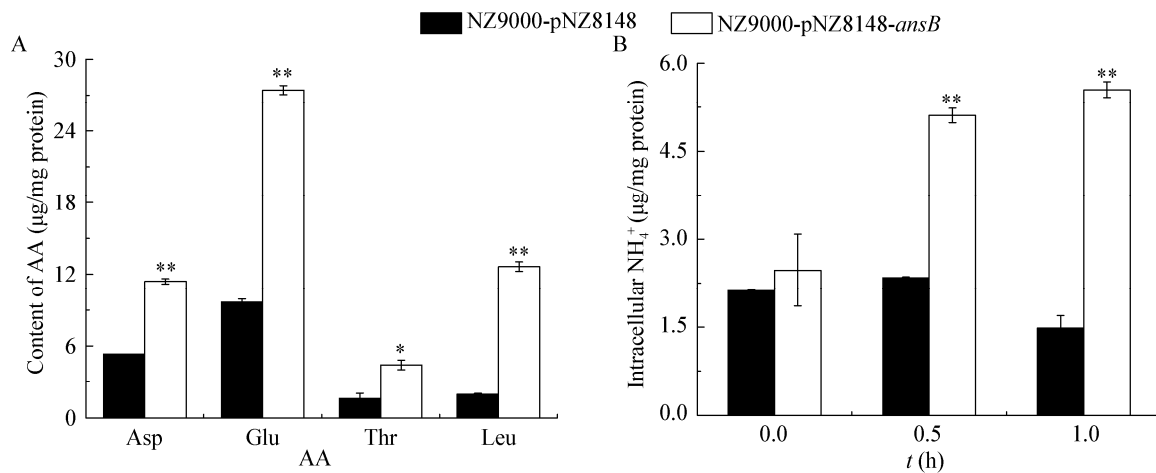


图 8 胁迫条件下 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-ansB 胞内氨基酸和 NH_4^+ 的含量

Figure 8 The contents of intracellular amino acids and NH_4^+ of *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-ansB under acid stress

注: A: 胞内氨基酸含量; B: 胞内 NH_4^+ 含量. 误差线: 标准差($n=3$); **: 差异显著($P \leq 0.05$); *: 差异显著($P \leq 0.1$).

Note: A: Content of intracellular aa; B: Content of intracellular NH_4^+ . Error bars indicate standard deviations ($n=3$); **: Significant difference ($P \leq 0.05$); *: Significant difference ($P \leq 0.1$).

2.9 胁迫条件下重组菌株胞内 ATP 含量的测定

上述实验结果证明, 胁迫过程中, 胞内 Asp 含量的增加可以为细胞提供更多的 ATP, 因此测定了重组菌株胞内 ATP 的含量, 结果如图 9 所示。pH 3.6 胁迫条件下, 初期由于应激反应, 重组菌株和对照

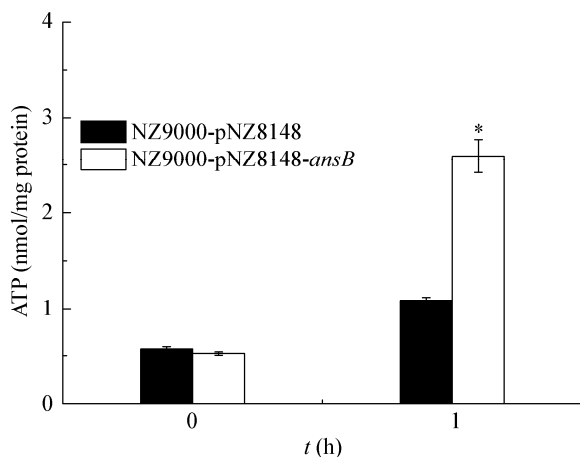


图 9 胁迫条件下 *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-ansB 胞内 ATP 的含量

Figure 9 The contents of intracellular ATP of *L. lactis* NZ9000-pNZ8148-ansB under acid stress

注: 误差线: 标准差($n=3$); *: 差异显著($P \leq 0.1$).

Note: Error bars indicate standard deviations ($n=3$); *: Significant difference ($P \leq 0.1$).

菌株胞内 ATP 含量均迅速升高, 但重组菌株 ATP 的含量明显高于对照菌株, 胁迫 1 h 后重组菌株胞内 ATP 含量为对照菌株的 2.4 倍。

3 讨论与结论

草酰乙酸会迅速被降解成丙酮酸, 同时作为中间代谢物参与三羧酸循环, 使得有氧呼吸产能途径中关键基因转录上调, 为细胞提供更多的 ATP^[26]。胁迫条件下, H^+ -ATPase 需消耗大量 ATP 将 H^+ 泵出来维持 pH_i 的相对平衡^[27]。同时, 胞内 Glu 含量增加, 编码谷氨酸脱羧酶的基因 *gad* 上调, Glu 在谷氨酸脱羧酶的催化下消耗 H^+ 脱羧并生成碱性较强的 GABA, 减轻细胞的胁迫压力, 维持 *L. lactis* NZ9000 pH_i 的相对平衡^[28]。 pH_i 自我调节是乳酸菌应对酸胁迫的重要响应机制, 菌株正常的生长代谢及益生作用的发挥均需要维持 pH_i 的相对平衡^[29-30]。胞内微环境分析发现, Asp 可有效维持胞内 NAD^+/NADH 和 pH_i 的相对平衡, 保证细胞生长代谢的正常进行^[25,31-33]; Asp 代谢产物 Thr 和 Leu 含量增加, Thr 在苏氨酸脱氨酶的作用下可释放 NH_3 中和 H^+ ^[26], Leu 合成过程中会竞争性消耗丙酮酸, 降低甲酸等有机酸的产量, 进而缓解细胞的胁迫压力^[15]。本研究证实了 Asp 可有效提高 *L. lactis*

NZ9000 的酸胁迫抗性, 进一步揭示了 Asp 的作用机制。我们的研究结果表明, 天冬氨酸转氨酶在乳酸菌生长代谢过程中发挥着重要作用。胁迫条件下, 天冬氨酸转氨酶催化 Asp 生成草酰乙酸和谷氨酸, 分别通过提供 ATP 和消耗胞内 H^+ 的方式缓解细胞受到的胁迫压力。此外, 为了提高 *L. lactis* NZ9000 胞内 Asp 的积累量, 我们过量表达了 L-天冬酰胺酶, 重组菌株胞内 Asp 的含量和存活率分别提高了 2.14 倍和 11.11 倍, 这提供了一种改善乳酸菌酸胁迫抗性的有效方式。我们的研究结果可拓展对氨基酸抗酸胁迫的研究认识, 深化 Asp 提高乳酸菌酸胁迫抗性的作用机制解析, 同时也为工业耐酸菌株的构建提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] Benbouziane B, Ribelles P, Aubry C, et al. Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(2): 120-129
- [2] Azizan KA, Resson HW, Mendoza ER, et al. ^{13}C based proteinogenic amino acid (PAA) and metabolic flux ratio analysis of *Lactococcus lactis* reveals changes in pentose phosphate (PP) pathway in response to agitation and temperature related stresses[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3451
- [3] Weidmann S, Maitre M, Laurent J, et al. Production of the small heat shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* in *Lactococcus lactis* improves its stress tolerance[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 247: 18-23
- [4] Zhang J, Wu CD, Du GC, et al. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus casei* by adaptive evolution and compared stress response during acid stress[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2012, 17(2): 283-289
- [5] Almarza O, Núñez D, Toledo H. The DNA-binding protein HU has a regulatory role in the acid stress response mechanism in *Helicobacter pylori*[J]. *Helicobacter*, 2015, 20(1): 29-40
- [6] Carvalho AL, Cardoso FS, Bohn A, et al. Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2011, 77(12): 4189-4199
- [7] Lechardeur D, Cesselin B, Fernandez A, et al. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(2): 143-149
- [8] He A, Penix SR, Basting PJ, et al. Acid evolution of *Escherichia coli* K-12 eliminates amino acid decarboxylases and reregulates catabolism[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2017, 83(12): e00442-17
- [9] Feehily C, Karatzas KAG. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(1): 11-24
- [10] Chattopadhyay MK, Tabor H. Polyamines are critical for the induction of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(47): 33559-33570
- [11] Savino MJ, Sánchez LA, Saguir FM, et al. Lactic acid bacteria isolated from apples are able to catabolise arginine[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2012, 28(3): 1003-1012
- [12] Cusumano ZT, Caparon MG. Citrulline protects *Streptococcus pyogenes* from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F_1F_0 -ATPase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(7): 1288-1296
- [13] Valenzuela M, Cáceres A, Almarza O, et al. Characterization of the arginine decarboxylase gene (ORF HP0422, *speA*) involved in acid tolerance in *Helicobacter pylori*[J]. *Helicobacter*, 2014, 19(3): 182-193
- [14] Len ACL, Harty DWS, Jacques NA. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance[J]. *Microbiology*, 2004, 150(5): 1353-1366
- [15] Santiago B, MacGilvray M, Faustoferri RC, et al. The branched-chain amino acid aminotransferase encoded by *ilvE* is involved in acid tolerance in *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(8): 2010-2019
- [16] Wu CD. *Lactobacillus casei* against acid stress physiological mechanism analysis[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2012 (in Chinese)
吴重德. 干酪乳杆菌抵御酸胁迫的生理机制解析[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2012
- [17] Shi WJ, Li Y, Gao XL, et al. Improvement of the respiration efficiency of *Lactococcus lactis* by decreasing the culture pH[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(3): 495-501
- [18] Jensen PR, Hammer K. Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1993, 59(12): 4363-4366
- [19] Su JK, Wang X, Lu JQ, et al. Determination of amino acids with OPA-FMOC by on-line derivatization[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2012, 18(15): 135-138 (in Chinese)
苏建坤, 王雪, 卢建秋, 等. OPA-FMOC 在线衍生化法测定氨基酸的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(15): 135-138
- [20] Zhai ZY, An HR, Wang GH, et al. Functional role of pyruvate kinase from *Lactobacillus bulgaricus* in acid tolerance and identification of its transcription factor by bacterial one-hybrid[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17024
- [21] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *Bacteriophage* T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [22] Batool T, Makky EA, Jalal M, et al. A comprehensive review on L-asparaginase and its applications[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2016, 178(5): 900-923
- [23] Kieronczyk A, Skeie S, Langsrud T, et al. The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate

- dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids[J]. International Dairy Journal, 2004, 14(3): 227-235
- [24] Dudley EG, Steele JL. *Lactococcus lactis* LM0230 contains a single aminotransferase involved in aspartate biosynthesis, which is essential for growth in milk[J]. Microbiology, 2001, 147(1): 215-224
- [25] Trip H, Mulder NL, Lolkema JS. Cloning, expression, and functional characterization of secondary amino acid transporters of *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(2): 340-350
- [26] van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, et al. Stress responses in lactic acid bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 82(1/4): 187-216
- [27] Ajdić D, Mcshan WM, McLaughlin RE, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(22): 14434-14439
- [28] Damiano MA, Bastianelli D, Al Dahouk S, et al. Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Brucella* spp.: distribution and contribution to fitness under extremely acidic conditions[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2015, 81(2): 578-586
- [29] Karatzas KAG, Suur L, O'Byrne CP. Characterization of the intracellular glutamate decarboxylase system: analysis of its function, transcription, and role in the acid resistance of various strains of *Listeria monocytogenes*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(10): 3571-3579
- [30] Le Lay J, Bahloul H, Sérino S, et al. Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 314-321
- [31] Cole SPC. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "Multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(45): 30880-30888
- [32] Tachon S, Chambellon E, Yvon M. Identification of a conserved sequence in flavoproteins essential for the correct conformation and activity of the NADH oxidase NoxE of *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(12): 3000-3008
- [33] Zuljan FA, Repizo GD, Alarcon SH, et al. α -Acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* contributes to pH homeostasis in acid stress conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 188: 99-107

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

