

精氨酸代谢途径抗酸关键基因对乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* NZ9000 胁迫抗性的影响

张明阳^{1,2} 张娟^{1,2} 刘龙^{1,2*} 堵国成^{1,3} 陈坚^{1,4}

(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:【目的】寻找精氨酸代谢途径中与酸胁迫相关的关键作用因素。【方法】通过在 *Lactococcus lactis* NZ9000 中分别过量表达来源于 *Lactobacillus casei* Zhang 的精氨酸琥珀酸合成酶(ASS)和精氨酸琥珀酸裂解酶(ASL)改变精氨酸代谢提高酸胁迫抗性。【结果】与对照菌株对比, 重组菌株在环境胁迫下表现了较高的生长性能、存活率和发酵性能。生理学分析发现, 酸胁迫环境下, 重组菌株细胞有较高的胞内 NH_4^+ 、ATP 含量和 H^+ -ATPase 活性, 并显著提高了精氨酸脱亚胺酶(ADI)途径中的氨基酸浓度。进一步的转录分析发现, 天冬氨酸合成、精氨酸代谢相关的基因转录水平上调。【结论】在 *L. lactis* NZ9000 中过量表达 ASS 或 ASL 可以引发精氨酸代谢流量的上调, 进而提高了细胞的多种胁迫抗性。精氨酸合成途径广泛存在于多种微生物中, 为微生物, 尤其是工业微生物提高胁迫抗性提供了新思路。

关键词: *Lactococcus lactis*, 环境胁迫, 精氨酸琥珀酸合成酶, 精氨酸琥珀酸裂解酶, 精氨酸代谢

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31470160); National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB733902); China Postdoctoral Science Foundation (No. 2013M540538, 114957); National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA100901); 111 Project (No. 111-2-06)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918312; E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn

Received: January 31, 2016; Accepted: April 11, 2016; Published online (www.cnki.net): July 19, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31470160); 国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No. 2013CB733902); 中国博士后科学基金项目(No. 2013M540538, 114957); 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(No. 2011AA100901); 111 计划项目(No. 111-2-06)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918312; E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-31; 接受日期: 2016-04-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-07-19

Influence of key acid-resistant genes in arginine metabolism on stress tolerance in *Lactococcus lactis* NZ9000

ZHANG Ming-Yang^{1,2} ZHANG Juan^{1,2} LIU Long^{1,2*} DU Guo-Cheng^{1,3} CHEN Jian^{1,4}

(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: [Objective] The aim of the present study was to find key factors of arginine metabolism on the stress tolerance. **[Methods]** Arginine metabolism was switched by argininosuccinate synthase (ASS) or argininosuccinate lyase (ASL) overexpression in *L. lactis* NZ9000 to enhance the stress tolerance. **[Results]** The recombinant strains exhibited higher growth performance, viability and fermentation performance compared with the control strain under environmental stresses. Analysis of the physiological data showed that the recombinant cells exhibited higher intracellular pH, intracellular NH_4^+ and ATP content, and H^+ -ATPase activity under acid stress, and the content of amino acid in arginine deiminase (ADI) pathway was significantly higher than the control strain. Further transcriptional analysis showed that the expression of the genes related to aspartate synthesis and arginine catabolism were up-regulated. **[Conclusion]** These results suggest that ASS or ASL overexpression in *L. lactis* NZ9000 can enhance arginine metabolism flux and up-regulated arginine metabolism flux improve the multiple-stress tolerance of cells. As arginine synthesis pathway widely exists in various kinds of microorganisms, results presented in this study provide new idea to enhance stress tolerance of tons of microorganisms especially industrial strains.

Keywords: *Lactococcus lactis*, Environmental stress, Argininosuccinate synthase, Argininosuccinate lyase, Arginine metabolism

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是一类兼性厌氧、能够代谢糖类产乳酸且不产芽孢的革兰氏阳性菌^[1]。由于 LAB 被普遍认为是安全的(GRAS)并具有突出的益生作用,被广泛用于食品、药品、饮料发酵、微生物菌剂生产、风味产生等^[2-4]。在上述应用中乳酸菌可能遭遇到各种各样的环境胁迫,比如高温、冷冻、酸、渗透压、氧以及饥饿等^[5]。为了发挥其工业应用价值和益生作用,在加工处理环节或人体胃肠道的胁迫中,必须保证其具有充足数量和存活能力的菌体细胞^[6]。目前,相关策略如保护剂的添加^[7-8]、预适应及交叉保护^[9-11]、适应性进化^[12-13]、过量表达胁迫应激蛋白^[14-16]、引入外源物质合成途径^[17-19]等被用于提高乳酸菌的胁迫抗性。

多种胁迫之中,酸胁迫是影响存活能力最严重的胁迫之一^[20]。目前已证实的酸胁迫抗性机制研究

包括胞内 pH 的动态平衡调节、细胞膜功能性调节、上调胁迫响应蛋白等^[21]。同时,氨基酸代谢调节在胞内 pH 调节中发挥着至关重要的作用,如谷氨酸脱羧酶系统、ADI 途径^[22-23]。ADI 途径作为酸胁迫响应在乳酸菌中被广泛报道^[24-25],此途径可以代谢精氨酸并产生 NH_3 和 ATP,有利于中和 H^+ 以及泵出质子^[5,26-27]。Senouci-Rezkallah 等^[23]发现精氨酸的添加可以提高 *Bacillus cereus* ATCC14579 在 pH 4.0 酸胁迫环境中的存活率。虽然 ADI 途径及精氨酸对酸性环境中细胞存活的保护机制已经被广泛了解,但是精氨酸代谢途径中与酸胁迫相关的关键因素的确认及其相关控制策略尚无报道。在前期研究中,本团队首次发现了 *Lactobacillus casei* Zhang 酸耐受突变株中精氨酸的合成前体天冬氨酸的显著积累^[12]。后续研究发现,外源添加天冬氨酸可以提高 *L. casei*

Zhang 酸胁迫条件下的存活率^[28]。蛋白质组学数据分析发现, 酸胁迫条件下 *L. casei* Zhang 中精氨酸琥珀酸合成酶(ASS, EC: 6.3.4.5)和精氨酸琥珀酸裂解酶(ASL, EC: 4.3.2.1)的表达上调, 而且外源添加天冬氨酸实验也发现酸环境中 *argG* 和 *argH* 基因的转录水平上调^[28-29]。ASS 由 *argG* 基因编码, 可以催化瓜氨酸、天冬氨酸和 ATP 产生精氨酸琥珀酸, 是精氨酸合成和尿素循环的限速酶; ASL 由 *argH* 基因编码, 可以催化精氨酸琥珀酸产生精氨酸, 是尿素循环相关的重要酶, 两个蛋白的合成均受到 ArgR 蛋白的调控^[30-32]。有研究表明外源添加精氨酸可以提高菌株酸胁迫抗性^[23], 而精氨酸代谢显著影响菌株酸胁迫条件下的存活能力^[33-34]。本研究拟通过在 *L. lactis* NZ9000 中分别过量表达 ASS 和 ASL, 确定精氨酸代谢途径中相关蛋白对细胞胁迫抗性影响及发酵性能的影响。本研究将会为精氨酸代谢中影响酸胁迫抗性的关键因素的发掘以及其在提高工业生产菌株耐酸性能的应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及生长环境

所用的菌株为 *Lactobacillus casei* Zhang (CGMCC1697)和 *Lactococcus lactis* NZ9000 [LN, CP002094 荷兰 NIZO Food Research (Kernhemseweg, Netherlands)]。 *L. casei* Zhang (内蒙古农业大学的张和平教授惠赠)作为基因供体, 37 °C 静置培养于 MRS 培养基中。 *L. lactis* NZ9000 和 pNZ8148 分别作为异源表达 ASS、ASL 的宿主和载体。 *L. lactis* NZ9000 培养条件: GM17 培养基(M17 肉汤添加 5 g/L 葡萄糖), 30 °C 静置培养。为了便于筛选, 培养基中可以添加 10 mg/L 的氯霉素或者 5 mg/L 的红霉素。

1.2 主要试剂和仪器

M17 肉汤培养基、MRS 培养基购自 Oxoid 公司; GeneJET PCR 纯化试剂盒、*Spe* I、*Sph* I 内切酶购自 Thermo Scientific 公司; DNA 连接酶、Prime STAR DNA 聚合酶、PrimeScript™ Reagent Kit、SYBR® Premix ExTaq™ 购自大连宝生物工程有限

公司; Nisin、缬氨霉素、尼日利亚菌素、荧光探针 BCECF AM 购自 Sigma 公司; BCA 蛋白测定试剂盒、RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit 购自天根生化科技有限公司; NuPAGE 10% Bis-Tris Gel 购自 Life 公司; ATP Assay Kit 购自碧云天生物技术研究; Ammonia Assay Kit 购自美国 ScienCell 公司; H⁺-ATPase Assay Kit 购自上海杰美基因科技有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。SBA-40E 生物传感器购自山东省科学院生物研究所; LightCycler® 480 system 购自罗氏公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪购自安捷伦科技(中国)有限公司; Multiskan FC 多功能酶标仪购自 Thermo Scientific 公司。

1.3 表达载体构建及转化

以 *L. casei* Zhang 基因组 DNA 为模板, 以 *argGF*、*argGR*、*argHF* 和 *argHR* (表 1)为引物进行 PCR 获得 *argG* 和 *argH* 基因。反应体系: 2×Prime STAR HS (Premix) 25.0 μL, 上下游引物(10 μmol/L) 各 2.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, 灭菌超纯水 19.0 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 5 s, 56 °C 5 s, 72 °C 90 s, 共 35 个循环。设计引物时包含 *Spe* I 和 *Sph* I 酶切位点(引物中划线部分), 将 PCR 扩增产物和质粒 pNZ8148 用 *Spe* I 和 *Sph* I 双酶切, 经 GeneJET PCR 纯化试剂盒纯化后, 使用 DNA 连接酶过夜连接。将连接产物和空质粒通过电转化转入 *L. lactis* NZ9000^[35], 筛选氯霉素抗性菌株并验证, 获得重组菌 *L. lactis* NZ9000(pNZ8148-ASS)、*L. lactis* NZ9000(pNZ8148-ASL)和对照菌 *L. lactis* NZ9000(pNZ8148)。

表 1 质粒构建用引物
Table 1 Primers used for plasmid construction

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')
<i>argGF</i>	ACATG <u>CATGC</u> CATATGACAGAAAAAATCGTACT GGC
<i>argGR</i>	GGACTAGITCAGTCATGTTGTTTTTCCTCGG
<i>argHF</i>	ACATG <u>CATGC</u> CATATGACTGATAAGTTATGGG GC
<i>argHR</i>	GGACTAGICTAGTGAGAAGCAATCATTTCCTC

1.4 ASS 和 ASL 的表达及 SDS-PAGE 分析

将 3 株菌分别以 2% 接种量接种于含有 10 mg/L 氯霉素的 GM17 培养基中。培养至 600 nm 处吸光度 (OD_{600}) 达到 0.4–0.5, 向培养基中加入 10 μ g/L Nisin 诱导培养 8 h。4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤、重悬。使用超声破碎仪在冰上将细胞破碎, 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min 除去细胞碎片收集得到细胞提取液。测定细胞提取液蛋白浓度并使用 NuPAGE 10% Bis-Tris Gel 进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 多种胁迫条件下胁迫抗性分析

为了考察菌株在不同环境胁迫条件下的生长性能。将 Nisin 诱导的种子培养液以 2% 接种量接入不同胁迫条件下的 GM17 培养基 (10 mg/L 氯霉素, 10 μ g/L Nisin) 中, 胁迫条件分别为: 酸胁迫 (pH 5.0, 乳酸调节)、盐胁迫 (3% NaCl) 和乙醇胁迫 (5% 乙醇)。同时测定非胁迫条件 (30 $^{\circ}$ C) 下生长性能作为对照。每隔一定时间取样, 测量其 600 nm 处的吸光值, 平行实验重复 3 次。

为了比较菌株的胁迫存活能力, 将菌株培养至对数生长期中后期, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 3 min 后用 0.85% 的生理盐水洗涤菌体, 并重悬于酸胁迫 (pH 4.0, 乳酸调节) 下的 GM17 培养基中。分别在胁迫 0、2、4、5 h 进行取样, 通过平板菌落计数法计算存活细胞及存活率。

1.6 胁迫条件下发酵性能分析

将 Nisin 诱导种子液接种至新鲜的 pH 5.5 的 GM17 培养基 (补充 10 mg/L 氯霉素, 10 μ g/L Nisin) 中, 间隔一定时间取样并测定发酵液的细胞干重、葡萄糖残余浓度及乳酸浓度。葡萄糖残余浓度及乳酸浓度由 SBA-40E 生物传感器测定。

1.7 胞内 pH (pH_i) 的测定

将细胞在初始 pH 7.0 的 GM17 培养基中培养至对数中期, 洗涤细胞并用新鲜的 GM17 (pH 5.0) 培养基等体积重悬, 30 $^{\circ}$ C 培养 5 h。以 Wu 等^[29]改进的荧光探针法^[36]进行 pH_i 的测定。

1.8 胞内氨基酸浓度的确定

将重组菌和对照菌培养至对数中期, 收集细胞并将其在 pH 5.0 条件下胁迫 5 h。将胁迫和非胁迫条件下培养液进行离心收集细胞, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.0) 洗涤并超声破碎。12 000 r/min 离心 5 min 收集上清液, 并加入等体积的 5% 三氯乙酸, 混匀后室温静置 10 min。将混合物在 12 000 r/min 转速下离心 10 min, 上清液利用 HPLC 方法分析胞内氨基酸浓度^[37]。

1.9 荧光定量 PCR

定量 PCR 所用引物根据 *L. lactis* NZ9000 序列设计, 见表 2。为了提取细胞总 RNA, 将 3 菌株培养至对数中期, 收集细胞并在 pH 5.0 条件下胁迫 5 h。收集胁迫前后的菌体, 液氮速冻后并液氮研磨, 然后按照 RNAPrep Pure Cell/Bacteria Kit 的方

表 2 RT-PCR 使用的引物
Table 2 Primers used in RT-PCR

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')
arcAF	CATTCAATCAAGTCAAGTTCTG
arcAR	ATTCTTCGTCCTGGTCAA
arcBF	AGTGAATCTGGAGCAACA
arcBR	TGGTGATGGTCGTAACAA
asnHF	ACCGTATTCTTCGTAACC
asnHR	TCGCCTGAGTATTATTGAC
argRF	GACTTCTGGCAACTCTAA
argRR	GTTTCGTCATCTAAAGCATT
glnAF	AAGCCTTAACCGCATTGT
glnAR	CTATGTGATGACTGAAGAAGAAC
argJF	TTGGCTAAGGACTGACAA
argJR	GTGGATGGAGATACTTCAAC
aspBF	TCAATCATTCATCCAATCCT
aspBR	TTACGACAGCCATTCTTG
gltBF	TCGTGACAGGAAGAGATG
gltBR	GATACAACCAATCGCAACT
purAF	TCAGCAAGATAAGCGATT
purAR	CTTCACCTCATTCCATCA
thrAF	GCAGACAATATCCACAACCT
thrAR	GACTCGGTAAGCCAGAAT
16S rRNAF	GCTAATACCGCATAATAAAGT
16S rRNAR	TATGTATCATCGCCTTGG

法提取总 RNA，并立即按照 PrimeScript™ Reagent Kit 的方法进行反转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板，以 16S rRNA 基因作为内参基因进行定量 PCR。反应体系：2×SYBR® Premix ExTaq™ 10.0 μL，上下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL，DNA 模板 2.0 μL，灭菌超纯水 6.4 μL。定量 PCR 反应条件：95 °C 5 min；95 °C 5 s，55 °C 20 s，共 50 个循环。

1.10 胞内 ATP、氨浓度及酶活力分析

将细胞诱导培养 8 h 后，使用超声破碎仪在冰上将细胞破碎，4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 除去细胞碎片收集得到细胞提取液，使用细胞提取液进行 ASS 和 ASL 酶活力分析。ASS 酶活力测定参照 Cruz 等^[38]和 Brasse-Lagnel 等^[39]的方法。酶活单位定义：每分钟催化 1 μmol 瓜氨酸的酶量为一个酶活单位。

ASL 酶活力的测定参照 Hwang 等^[40]和 Alberty 等^[41]的方法。酶活单位定义：每小时产生 1 μmol 富马酸的酶量为一个酶活单位。

胞内 ATP 浓度利用萤火虫荧光素酶的原理按照 ATP Assay Kit 的方法测定。而氨水平使用 Ammonia Assay Kit 通过 NADPH 氧化速率进行分析。

H⁺-ATPase 按照 H⁺-ATPase Assay Kit 的方法进行测定，酶活单位定义为每分钟每毫克蛋白氧化 1 nmol NADH 为 1 U。

2 结果与讨论

2.1 在 *L. lactis* 中异源表达 ASS 和 ASL

前期研究表明 *L. casei* Zhang 的酸胁迫抗性与 ASS 和 ASL 的表达有关^[28-29]，本研究中为了检验 ASS 和 ASL 对胁迫耐受性的影响，在 *L. lactis* NZ9000 中表达了来源于 *L. casei* Zhang 的 ASS 和 ASL。SDS-PAGE 实验结果显示，重组菌株经 Nisin 诱导后，*L. lactis* NZ9000(pNZ8148-ASS)和 *L. lactis* NZ9000(pNZ8148-ASL)在约 45 kD 和 52 kD 处的条带明显多于对照菌 *L. lactis* NZ9000(pNZ8148) (图 1)，与 ASS 和 ASL 分子质量一致，说明重组菌株中成功表达了 ASS 和 ASL。

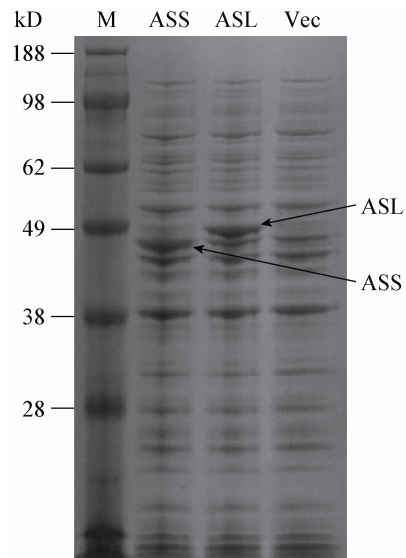


图 1 *L. lactis* 表达 ASS 和 ASL 的 SDS-PAGE 分析
Figure 1 SDS-PAGE analysis of the expression of ASS and ASL in *L. lactis*

注：M：蛋白标准 Marker；ASS：NZ9000(pNZ8148-ASS)；ASL：NZ9000(pNZ8148-ASL)；Vec：NZ9000(pNZ8148)。蛋白 Marker 的分子量标注于左侧；箭头指示相应的蛋白。

Note: M: Protein standard marker; ASS: NZ9000(pNZ8148-ASS); ASL: NZ9000(pNZ8148-ASL); Vec: NZ9000(pNZ8148). The positions of the molecular mass markers are shown on the left side of the panel. Arrows indicate the corresponding proteins.

为进一步确定 ASS 和 ASL 在 *L. lactis* NZ9000 中的表达，测定了重组菌和对照菌株中 ASS 和 ASL 的活性，结果如图 2 所示，相对于对照菌，NZ9000 (pNZ8148-ASS) 中 ASS 酶活提高了 30.65%，而 NZ9000(pNZ8148-ASL) 中 ASL 酶活提高了 57.06%。说明 ASS 和 ASL 在 *L. lactis* NZ9000 成功表达。

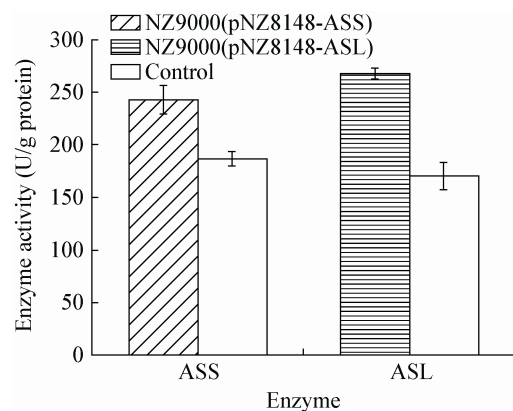


图 2 ASS 和 ASL 酶活

Figure 2 Enzyme activities of ASS and ASL

2.2 重组菌株的胁迫抗性

为了比较重组菌和对照菌的胁迫抗性,测定了菌株在不同环境胁迫中的生长性能。在酸胁迫(pH 5.0)、盐胁迫(3% NaCl)、乙醇胁迫(5%)条件下,生长性能较非胁迫环境中明显下降(图 3)。与对照菌相比, NZ9000(pNZ8148-ASS)在酸胁迫(pH 5.0)、盐胁迫(3% NaCl)、乙醇胁迫(5%)条件下生长性能分别提高了 5.29%、28.22%、25.79%;而 NZ9000(pNZ8148-ASL)则分别提高了 24.03%、19.91%、21.16%。结果表明重组菌酸胁迫、盐胁迫、乙醇胁迫条件下生长性能明显高于对照菌。

基于生长性能的研究结果,考察了菌株在酸胁迫(pH 4.0)条件下存活率的差异。如图 4 所示,酸胁迫

5 h 后存活率明显下降, NZ9000(pNZ8148-ASS)和 NZ9000(pNZ8148-ASL)的存活率分别为对照菌的 3.54 倍和 7.50 倍。因此,重组菌酸胁迫下的存活能力明显高于对照。

2.3 乳酸发酵性能分析

由于重组菌在酸胁迫下的生长性能和存活能力明显提高,因此测定了酸胁迫(pH 5.5)条件下的发酵性能。非胁迫条件下,三菌株的发酵性能没有明显的差异;而在 pH 5.5 环境中,菌株之间发酵性能的差距较明显,重组菌的 DCW、葡萄糖消耗、乳酸产量均高于对照菌; NZ9000(pNZ8148-ASS)和 NZ9000(pNZ8148-ASL)的乳酸产量分别比对照菌高 31.58%和 44.74%。酸胁迫和非胁迫条件下的具体

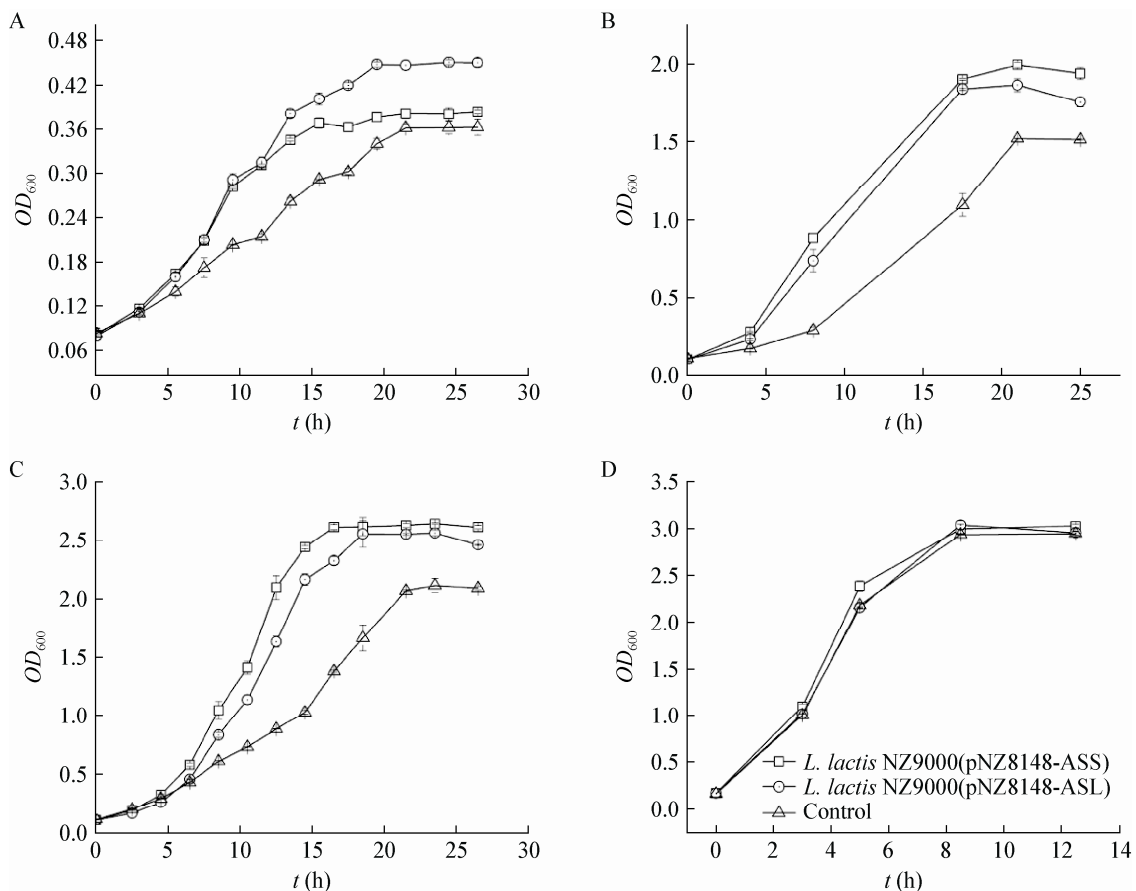


图 3 重组菌株在环境胁迫下生长性能

Figure 3 Growth performance of recombinant strains during various environmental stresses

注: A: pH 5.0; B: 3% NaCl; C: 5%乙醇; D: 30 °C. 误差线表示 3 次实验的标准差。

Note: A: pH 5.0; B: 3% NaCl; C: 5% Ethanol; D: 30 °C. Error bars indicate standard deviations ($n=3$).

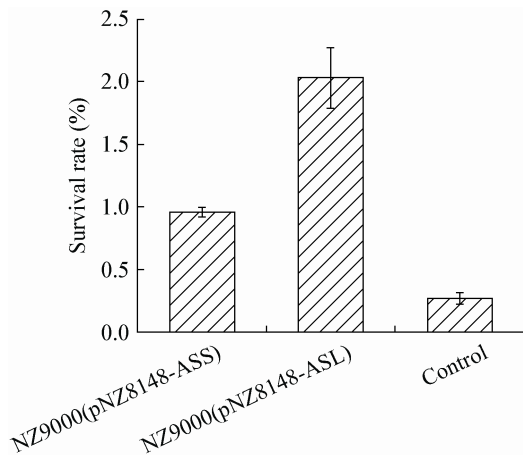


图4 重组菌株在酸胁迫下的存活率

Figure 4 Survival rate of recombinant strains during acid stress

发酵数据如表3所示。可以看出, NZ9000(pNZ8148-ASS)的细胞干重(DCW)、最大乳酸产量和乳酸生产强度分别为对照菌株的1.33、1.32和1.30倍; NZ9000(pNZ8148-ASL)分别为对照菌株的1.30、1.45和1.40倍,因此,重组菌的发酵性能有所提高。

2.4 ASS和ASL对氨基酸代谢的影响

基因 *argG* 和 *argH* 编码的 ASS 和 ASL 催化天冬氨酸转化为精氨酸,因此考察了 ASS 和 ASL 对

氨基酸代谢的影响。本研究中通过定量 PCR 对氨基酸代谢中相关基因的转录水平做了分析,表4表明了酸胁迫环境中过量表达 ASS 和 ASL 对氨基酸代谢基因的转录水平有显著的影响。重组菌精氨酸代谢基因 *arcA*、*arcB* 和 *argR* 的转录水平均被加强。ArcA 和 ArcB 蛋白为 ADI 途径中两个重要的酶,能够分解精氨酸并产生氨和 ATP,从而抵抗酸胁迫^[42]。但是 ArgR 蛋白对精氨酸代谢有阻遏作用^[43]。天冬氨酸合成代谢基因 *aspB* 转录水平上调;天冬氨酸分解代谢相关基因中 *purA*、*asnH* 基因的转录下调,基因 *thrA* 转录水平上调;有利于重组菌株中天冬氨酸的合成,而天冬氨酸为精氨酸合成的前体,有利于精氨酸合成。谷氨酸代谢相关基因 *glnA*、*gltB* 和 *argJ* 被诱导。

为了验证定量 PCR 的实验结果,测定了酸胁迫下重组菌的氨基酸浓度。如表5所示,ASS 和 ASL 的表达引起了胞内氨基酸的显著改变。酸胁迫 5 h 后,重组菌中谷氨酸族氨基酸精氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸水平高于对照菌,而谷氨酸的水平却低于对照;可能与 *glnA*、*gltB* 和 *argJ* 被诱导以及 ASS、ASL 的表达有关。天冬氨酸族和丙酮酸族氨基酸中除甲硫氨酸外,大多数氨基酸均低于重组菌。甘油

表3 乳酸发酵性能参数表
Table 3 Parameters for lactic acid fermentation

参数 Parameters	pH 7.0			pH 5.5		
	NZ9000(pNZ 8148-ASS)	NZ9000(pNZ 8148-ASL)	Control	NZ9000(pNZ 8148-ASS)	NZ9000(pNZ 8148-ASL)	Control
发酵时间 Fermentation time (h)	9	9	9	20	20	20
细胞干重 DCW (g/L)	0.88±0.02	0.89±0.01	0.86±0.01	0.36±0.01	0.35±0.01	0.27±0.01
葡萄糖消耗 Glucose consumption (g/L)	4.56±0.06	4.45±0.06	4.55±0.06	3.00±0.28	3.20±0.28	2.30±0.71
乳酸产量 Lactic acid production (g/L)	4.43±0.10	4.33±0.10	4.53±0.15	2.50±0.28	2.75±0.07	1.90±0.14
菌体对葡萄糖得率 Biomass yield (g/g glucose)	0.20±0.01	0.20±0.01	0.19±0.01	0.12±0.01	0.11±0.01	0.12±0.03
乳酸对葡萄糖得率 Lactic acid yield (g/g glucose)	0.97±0.01	0.97±0.01	0.99±0.02	0.83±0.02	0.86±0.05	0.86±0.20
乳酸生产强度 Lactic acid productivity (g/(L·h))	0.49±0.01	0.48±0.01	0.50±0.02	0.13±0.01	0.14±0.01	0.10±0.03

表 4 ASS 或 ASL 的表达对酸胁迫下氨基酸代谢基因转录的影响(改变倍数, \log_2^R)Table 4 Effect of ASS or ASL overexpression on transcription of amino acid metabolic genes during acid stress (Fold of change, \log_2^R)

基因 Genes	NZ9000 (pNZ8148-ASS)	NZ9000 (pNZ8148-ASL)	基因 Genes	NZ9000 (pNZ8148-ASS)	NZ9000 (pNZ8148-ASL)
<i>glnA</i>	1.43	1.99	<i>asnH</i>	-7.90	-3.80
<i>gltB</i>	1.21	1.64	<i>aspB</i>	1.39	1.66
<i>argJ</i>	0.95	-0.08	<i>arcA</i>	3.17	3.15
<i>thrA</i>	0.61	1.38	<i>arcB</i>	1.70	2.40
<i>purA</i>	-9.24	-10.07	<i>argR</i>	0.67	1.54

注: R: 酸胁迫前后 *L. lactis* 中基因转录水平的比值。

Note: R: Ratio of transcription level of genes in *L. lactis* before or after acid treatment.

表 5 ASS 或 ASL 的表达对酸胁迫下氨基酸水平的影响(改变倍数, \log_2^R)Table 5 Effect of ASS or ASL overexpression on amino acid level under acid stress (Fold of change, \log_2^R)

氨基酸 Amino acid	NZ9000 (pNZ8148-ASS)	NZ9000 (pNZ8148-ASL)	氨基酸 Amino acid	NZ9000 (pNZ8148-ASS)	NZ9000 (pNZ8148-ASL)
谷氨酸 Glutamate	0.75±0.04	0.87±0.02	丙氨酸 Alanine	0.82±0.05	0.86±0.06
精氨酸 Arginine	1.54±0.12	1.32±0.02	异亮氨酸 Isoleucine	0.84±0.13	0.83±0.03
瓜氨酸 Citrulline	8.60±0.48	2.57±0.42	亮氨酸 Leucine	0.74±0.20	0.92±0.09
鸟氨酸 Ornithine	1.96±0.48	1.41±0.28	缬氨酸 Valine	0.77±0.01	0.75±0.07
脯氨酸 Proline	1.05±0.28	1.97±0.21	甲硫氨酸 Methionine	1.39±0.35	3.68±0.12
天冬氨酸 Aspartate	0.73±0.09	0.89±0.02	半胱氨酸 Cysteine	1.23±0.23	1.16±0.02
苏氨酸 Threonine	0.80±0.09	0.82±0.02	甘氨酸 Glycine	0.74±0.03	0.83±0.12

磷酸族和芳香族氨基酸中, 丙氨酸和苯丙氨酸低于对照菌, 但是半胱氨酸和酪氨酸高于对照菌。结果表明, ADI 途径中氨基酸浓度明显提高, 而以天冬氨酸、丙酮酸为前体的天冬氨酸族和丙酮酸族大部分氨基酸水平均下降。

氨基酸代谢机制如图 5 所示。过量表达 ASS 和 ASL 引起了 *aspB*、*arcA* 和 *arcB* 基因转录上调, 进而导致了天冬氨酸合成、天冬氨酸转化为精氨酸以及 ADI 途径的代谢流量增加。重组菌中 *purA* 和 *asnH* 基因转录下调, 使天冬氨酸到天冬酰胺和腺苷酸琥珀酸代谢流量降低。在天冬氨酸添加提高胁迫抗性实验中有同样的结果^[28]。代谢流量的改变使细胞内天冬氨酸、精氨酸浓度增加, ADI 途径代谢流量增加产生更多的 ATP 和 NH_3 。而 NH_3 可以中和细胞内的质子, 产生的 ATP 为 H^+ -ATPase 提供能量从而排出 H^+ ^[44-45]。因此, ASS 和 ASL 影响了氨基酸代谢, 有利于胞内

pH 平衡的调节, 防止细胞受到酸胁迫的伤害。

2.5 酸胁迫条件下胞内 ATP 和 NH_4^+ 的分析

图 6 考察了重组菌在酸环境下胞内 ATP 和 NH_4^+ 水平的变化。酸胁迫条件下, 胞内 ATP 含量随着胁迫时间延长不断下降; 非胁迫环境中, 三菌株细胞中 ATP 含量差别不大, 在酸胁迫环境中重组菌 ATP 水平高于对照菌, 且差距随时间不断扩大。对于 NH_4^+ 水平, pH 5.0 胁迫 5 h 后, 重组菌 NH_4^+ 水平较高, 而且 NH_4^+ 水平的减少量小于对照。

ADI 途径是乳酸菌胞内 pH 自我调控的一种重要机制。ADI 途径中酶催化精氨酸转化为鸟氨酸并产生 ATP 和 NH_3 , NH_3 的中和作用以及 ATP 为质子泵提供能量排出质子都有助于细胞内 pH 的维持。因此, 精氨酸代谢流量的上调使重组菌维持了较高的 ATP 和 NH_4^+ 水平, 对于菌株维持 pH_i 的稳定有促进作用。

pH, 酸胁迫后重组菌的胞内 pH 高于对照, NZ9000 (pNZ8148-ASS)、NZ9000(pNZ8148-ASL) 胞内 pH 分别下降 1.06 和 1.11, 而对照下降了 1.44。说明精氨酸代谢的上调使重组菌维持了较高的 H^+ -ATPase 活性和胞内 pH。

据研究报道, LAB 对酸胁迫的敏感性主要取决于 pH_i , pH_o 的降低影响菌体生长、代谢以及关键酶的活性等^[46-47]。酸胁迫条件下, 重组菌胞内 ATP、氨浓度、 H^+ -ATPase 活性均高于对照菌, 这些因素都有利于胞内 pH 的维持, 而且重组菌胞内 pH 高于对照, 因此, 对酸胁迫中 *L. lactis* 起到保护作用。

3 结论

本研究利用基因工程手段, 将 ASS 和 ASL 在 *L. lactis* NZ9000 重组表达, 且重组菌株中 ASS 和 ASL 的比酶活均有提高。重组菌 *L. lactis* NZ9000 (pNZ8148-ASS) 和 *L. lactis* NZ9000(pNZ8148-ASL) 在酸胁迫条件下的生长性能、耐受性以及发酵性能均优于对照菌。氨基酸代谢分析发现, 重组菌中天冬氨酸转化为精氨酸途径以及 ADI 途径中的基因 *argG*、*argH*、*arcA* 和 *arcB* 转录水平上调, 同时 ADI 途径中精氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸浓度均高于对照菌株, 表明过量表达 ASS 和 ASL 引起了精氨酸代谢流量的增加。精氨酸代谢流量的增加可以产生更多的 ATP 和 NH_3 , 有利于胞内 pH 的维持。精氨酸合成途径广泛存在于多种微生物中, 本研究结果将为通过调整精氨酸代谢通路提高工业微生物的胁迫抗性提供新的思路。

参考文献

[1] Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1983, 49(3): 209-224

[2] Komiyama M, Nishikawa M, Kan M, et al. Endovascular treatment of intractable oronasal bleeding associated with severe craniofacial injury[J]. *The Journal of Trauma*, 1998, 44(2): 330-334

[3] Bermúdez-Humarán LG, Aubry C, Motta JP, et al. Engineering lactococci and lactobacilli for human health[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(3): 278-283

[4] Papagianni M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2012, 3(4): 1-8

[5] Sanders JW, Venema G, Kok J. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23(4):

483-501

[6] Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald G, et al. Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2008, 14(14): 1382-1399

[7] Zhang J, Li Y, Chen W, et al. Glutathione improves the cold resistance of *Lactobacillus sanfranciscensis* by physiological regulation[J]. *Food Microbiology*, 2012, 31(2): 285-292

[8] 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

[9] Jin JH, Qin Q, Guo HY, et al. Effect of Pre-stressing on the acid-stress response in *Bifidobacterium* revealed using proteomic and physiological approaches[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117702

[10] Khan AU, Forney RB, Hughes FW. Stress of shocking stimulus on plasma free fatty acids in rats[J]. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 1964, 151: 459-465

[11] De Angelis M, Di Cagno R, Huet C, et al. Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(3): 1336-1346

[12] 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 and Bioengineering*, 2012, 17(2): 283-289

[13] Teusink B, Wiersma A, Jacobs L, et al. Understanding the adaptive growth strategy of *Lactobacillus plantarum* by *in silico* optimisation[J]. *PLoS Computational Biology*, 2009, 5(6): e1000410

[14] Wu CD, Zhang J, Du GC, et al. Heterologous expression of *Lactobacillus casei* RecO improved the multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 during salt stress[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 238-241

[15] Tian HT, Tan JX, Zhang LF, et al. Increase of stress resistance in *Lactococcus lactis* via a novel food-grade vector expressing a *shsp* gene from *Streptococcus thermophilus*[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(3): 1157-1164

[16] 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

[17] Zhang J, Fu RY, Hugenholtz J, et al. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5268-5275

[18] Branduardi P, Fossati T, Sauer M, et al. Biosynthesis of vitamin C by yeast leads to increased stress resistance[J]. *PLoS One*, 2007, 2(10): e1092

[19] Trip H, Mulder NL, Lolkema JS. Improved acid stress survival of *Lactococcus lactis* expressing the histidine decarboxylation pathway of *Streptococcus thermophilus* CHCC1524[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(14): 11195-11204

[20] Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(6): 1171-1185

[21] Wu CD, Huang J, Zhou RQ. Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(3): 1055-1063

[22] Schwenk WS, Donovan TM. A multispecies framework for landscape conservation planning[J]. *Conservation Biology*, 2011, 25(5): 1010-1021

[23] Senouci-Rezkallah K, Schmitt P, Jobin MP. Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC14579 strain[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(3): 364-372

[24] Budin-Verneuil A, Maguin E, Auffray Y, et al. Genetic structure and transcriptional analysis of the arginine deiminase (ADI) cluster in *Lactococcus lactis* MG1363[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52(7): 617-622

[25] Poolman B, Driessen AJ, Konings WN. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway

- in *Streptococcus lactis*[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5597-5604
- [26] Marquis RE, Bender GR, Murray DR, et al. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(1): 198-200
- [27] Bender GR, Sutton SV, Marquis RE. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci[J]. Infection and Immunity, 1986, 53(2): 331-338
- [28] Wu CD, Zhang J, Du GC, et al. Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 4083-4093
- [29] Wu CD, Zhang J, Chen W, et al. A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 707-722
- [30] Lemke CT, Howell PL. Substrate induced conformational changes in argininosuccinate synthetase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(15): 13074-13081
- [31] Cao YL, Li GL, Wang KT, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of argininosuccinate lyase from *Streptococcus mutans*[J]. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, 2011, 67(6): 682-684
- [32] Zhao QQ, Luo YC, Dou WF, et al. Controlling the transcription levels of *argGH* redistributed L-arginine metabolic flux in *N*-acetylglutamate kinase and ArgR-deregulated *Corynebacterium crenatum*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(1): 55-66
- [33] Ryan S, Begley M, Gahan CGM, et al. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(2): 432-445
- [34] Budin-Verneuil A, Maguin E, Auffray Y, et al. An essential role for arginine catabolism in the acid tolerance of *Lactococcus lactis* MG1363[J]. Lait, 2004, 84(1/2): 61-68
- [35] Holo H, Nes IF. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(12): 3119-3123
- [36] Breeuwer P, Drocourt J, Rombouts FM, et al. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(1): 178-183
- [37] Fountoulakis M, Lahm HW. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins[J]. Journal of Chromatography A, 1998, 826(2): 109-134
- [38] Cruz C, Egsgaard H, Trujillo C, et al. Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Plant Physiology, 2007, 144(2): 782-792
- [39] Brasse-Lagnel C, Lavoine A, Fairand A, et al. IL-1 β stimulates argininosuccinate synthetase gene expression through NF- κ B in Caco-2 cells[J]. Biochimie, 2005, 87(5): 403-409
- [40] Hwang ID, Lee Y, Kim SG, et al. Enzyme activities of canavanine metabolism in *Canavalia lineata* L. Callus[J]. Journal of Plant Physiology, 1996, 149(5): 494-500
- [41] Alberty RA, Massey V, Frieden C, et al. Studies of the enzyme fumarase. III. The dependence of the kinetic constants at 25° upon the concentration and pH of phosphate buffers[J]. Journal of the American Chemical Society, 1954, 76(9): 2485-2493
- [42] Vrancken G, Rimaux T, Wouters D, et al. The arginine deiminase pathway of *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 responds to growth under stress conditions of both temperature and salt[J]. Food Microbiology, 2009, 26(7): 720-727
- [43] Larsen R, Kok J, Kuipers OP. Interaction between ArgR and AhrC controls regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(19): 19319-19330
- [44] Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 193(1): 1-6
- [45] Casiano-Colón A, Marquis RE. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(6): 1318-1324
- [46] Cook GM, Russell JB. The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*[J]. Current Microbiology, 1994, 28(3): 165-168
- [47] O'Sullivan E, Condon S. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4210-4215