

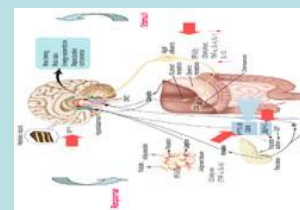
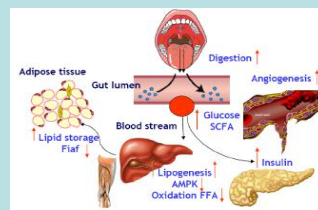
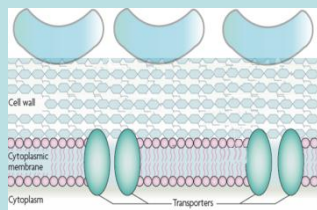
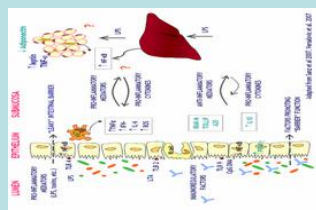
# 干酪乳杆菌抵御酸胁迫的生理机制解析

# 乳酸菌概述

## 乳酸菌的分类

乳杆菌属、乳球菌属、双歧杆菌属、链球菌属、明串珠菌属、片球菌属

## 乳酸菌的生理功能



**产生重要代谢产物** 改善胃肠道功能。抑**及特殊酶系**。抑制制病原菌的生长，维持肠道菌群平衡，促进食物消化。

**粘附定植的能力**。通过粘附素与肠粘膜结合，形成生理屏障。阻止病原菌入侵。

**增强免疫力**。影响非特异性免疫应答，刺激特异性免疫应答。

**改善营养健康状况**。降低胆固醇、调节血脂、抑制肿瘤

## 乳酸菌在食品制造中的应用

### 乳制品工业



酸奶、发酵乳饮料、干酪、奶油的生产

### 酿造工业



酱油、醋、白酒、啤酒

### 发酵果蔬



制作泡菜、酸菜、水果饮料

### 肉制品谷物制品



发酵肉制品、谷物乳酸发酵饮料

### 重要发酵产物



细菌素、有机酸、氨基酸胞外多糖等

# 乳酸菌面临的环境胁迫

发酵  
生产

下游  
加工

运输  
储存

人体胃  
肠道

■ 酸胁迫

■ 氧胁迫

■ 酸胁迫

■ 酸胁迫

■ 氧胁迫

■ 冷冻胁迫

■ 冷冻胁迫

■ 胆盐胁迫

■ 影响菌体生长及代谢活性

■ 生理功能的缺失

■ 降低食品微生物制造效率

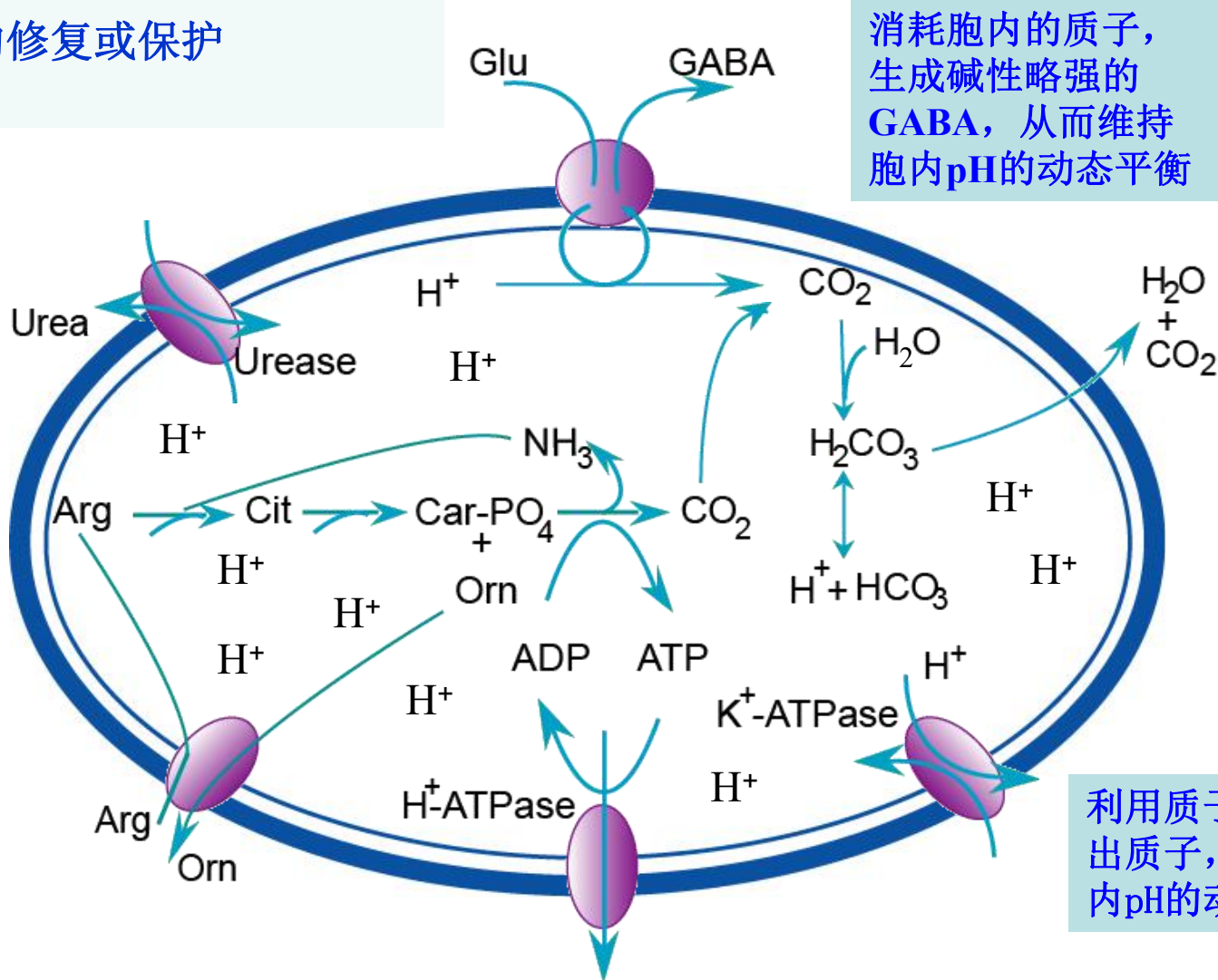
■ 影响益生功能的发挥

如何提高乳酸菌对环境胁迫的抗性已成为学术界和产业界共同关注的焦点问题！



# 微生物抵御酸胁迫的生理机制

- 胞内pH的自我调控
- 代谢方式的改变
- 大分子的修复或保护
- ...



# 提升乳酸菌酸胁迫抗性的策略

## 生化工程

外源添加保护剂

多元醇、糖类、氨基酸、GSH、海藻糖等

胁迫应激反应

预适应机制、交互保护机制

## 代谢工程

构建新代谢途径

引入生成GSH、海藻糖、甜菜碱的代谢途径

消耗氢或生成氨

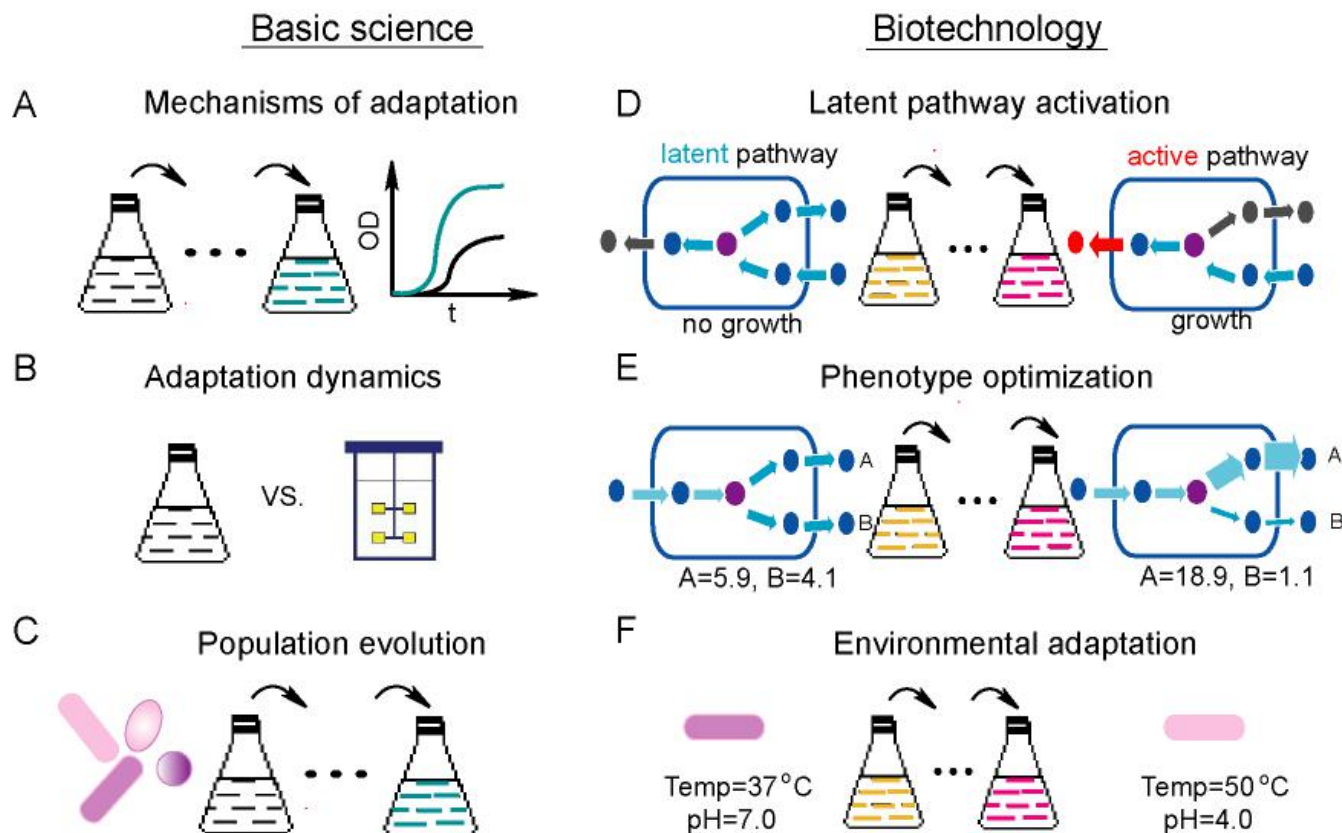
表达脲酶基因

表达关键蛋白

过量表达DnaK、GroEL等胁迫应激蛋白

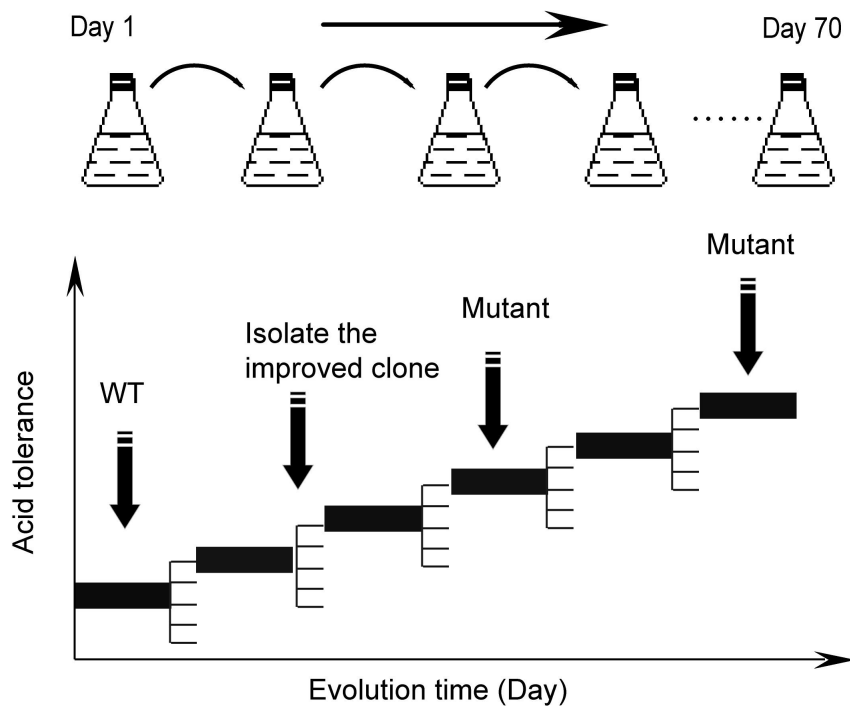
## 第二章 适应性进化提高*L. casei* 酸胁迫抗性

### ■ 适应性进化

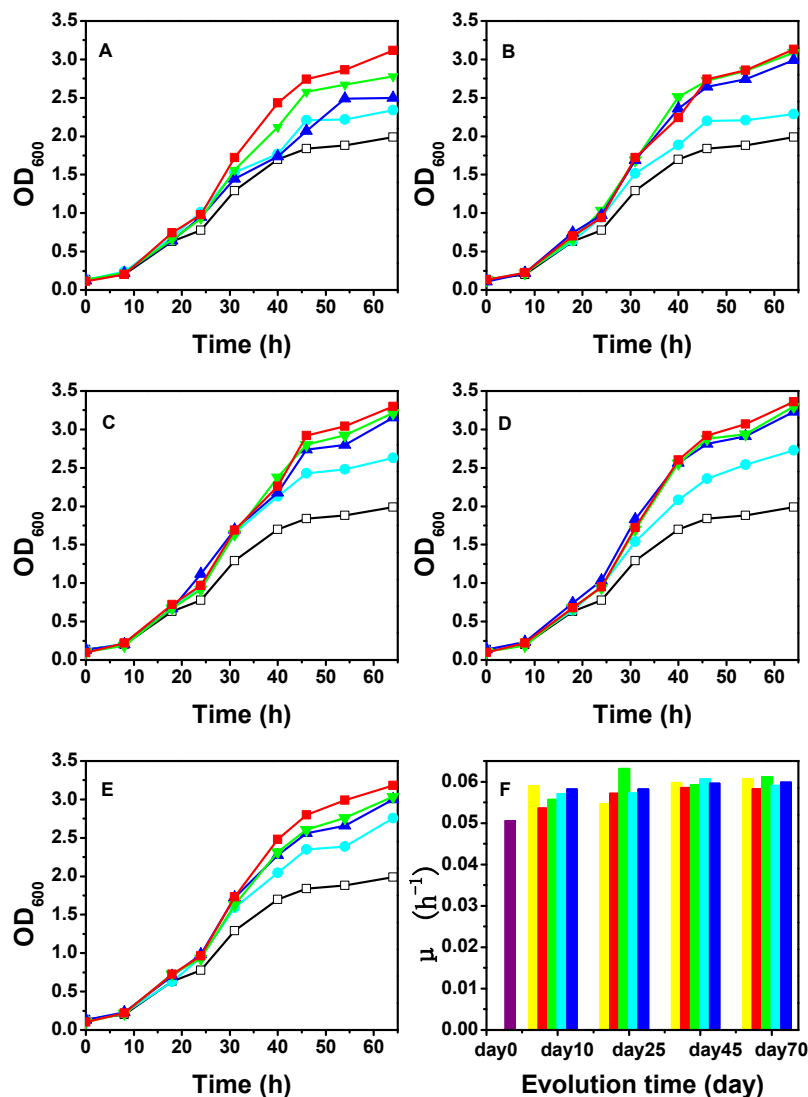


# 适应性进化改善*L. casei*酸胁迫条件下的生长性能

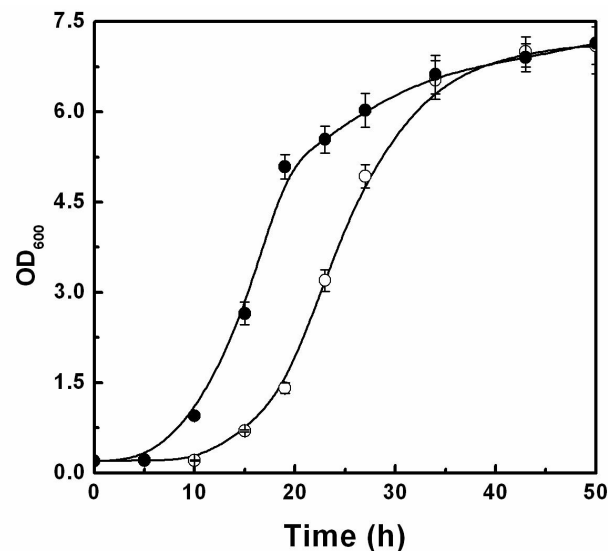
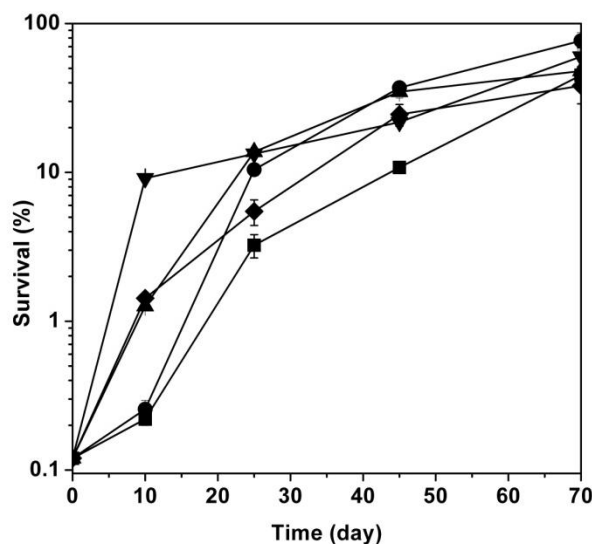
## ■ 适应性进化



经70 d进化培养，*L. casei*进化菌株较原始菌株的生物量提高60%，比生长速率提高10%。



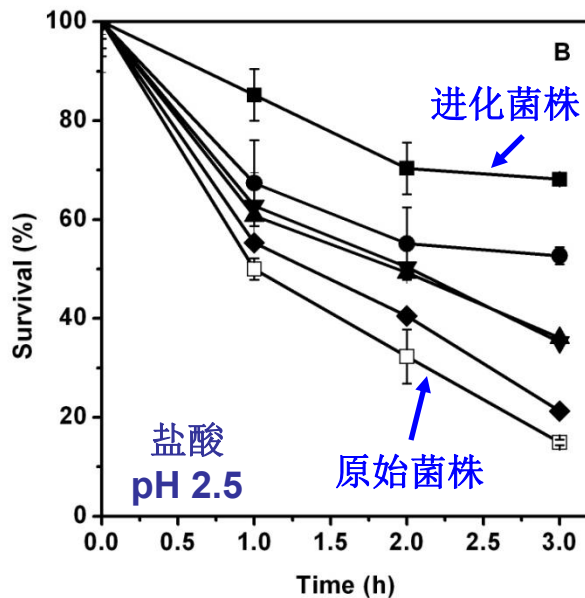
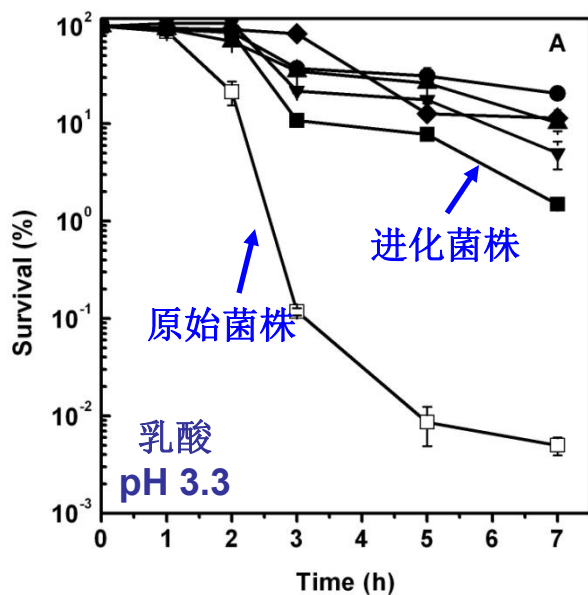
# 进化过程中*L. casei*耐酸性能的变化



随着进化时间的增加，5株菌对乳酸的耐受性逐渐增加，进化70天，进化菌株**Lbz-1**存活率较原始菌株提高了**638**倍。

胁迫后的菌株在重培养过程中，能够更快地恢复生长，**生长速率显著高于原始菌株**，**生长延滞期较原始菌株缩短7-8 h**。

# 进化菌株酸耐受性分析

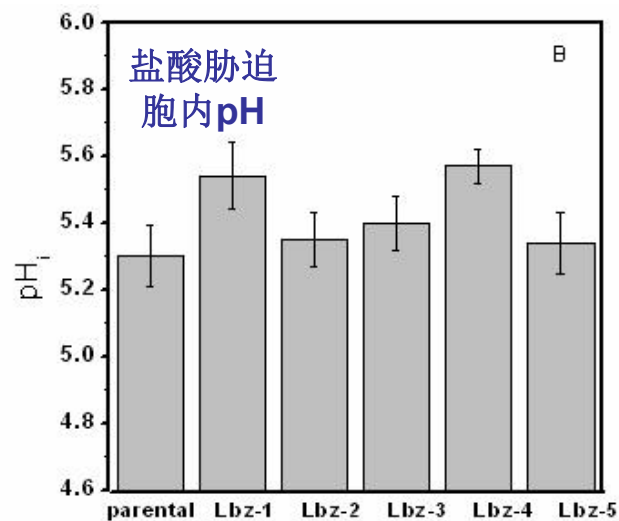
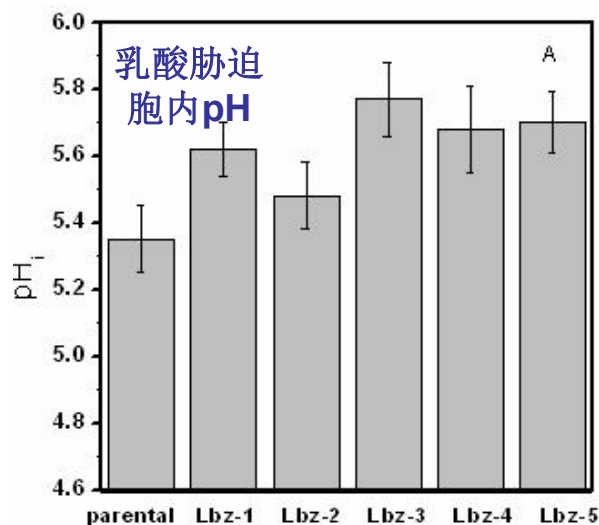


乳酸胁迫7 h, 原始菌株存活率为0.005%, 进化菌株Lbz-1为20.5%;

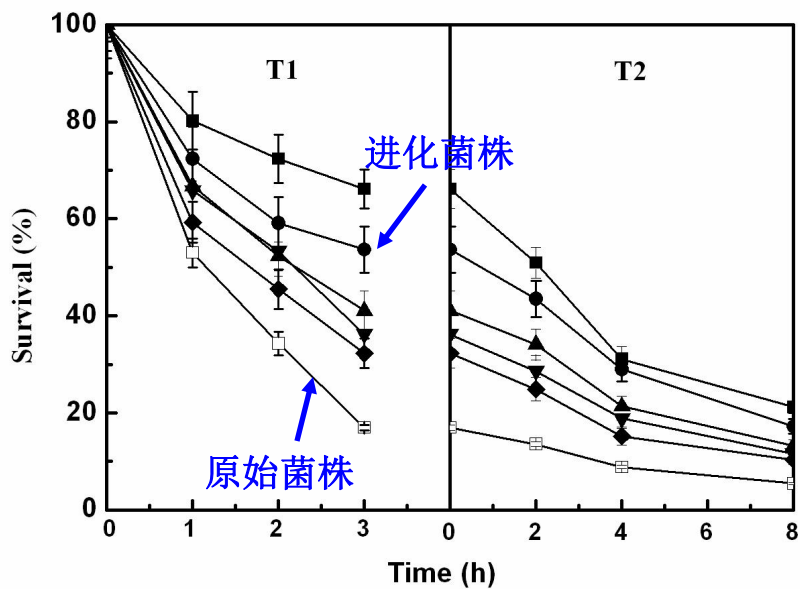
盐酸胁迫3 h, 原始菌株存活率为14.9%, Lbz-4为67.1%。

在乳酸和盐酸胁迫条件下进化菌株相对于原始菌株均保持了更高的胞内pH。表明进化菌株能够有效地进行生理调控, 维持胞内pH的动态平衡, 提高细胞在酸胁迫条件下的耐受性。

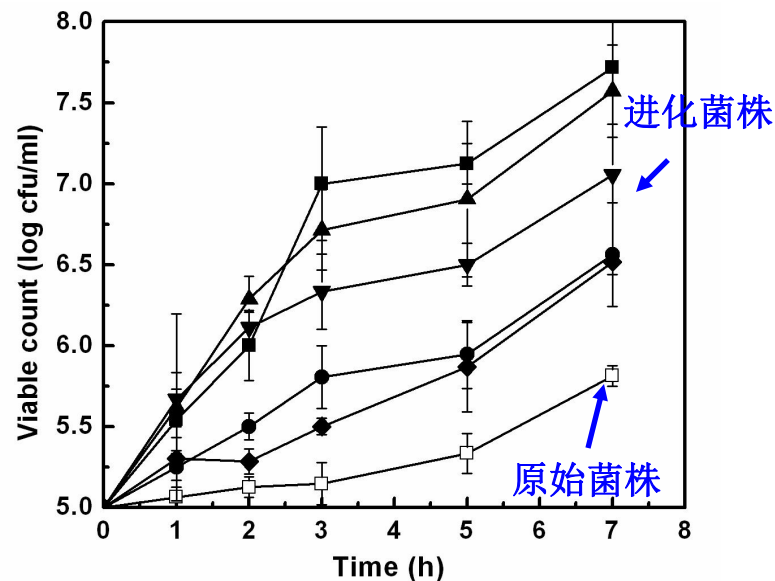
□ parental strain, ● Lbz-1, ▲ Lbz-2, ▼ Lbz-3, ■ Lbz-4, ◆ Lbz-5



# 进化菌株的转运耐受及胆盐耐受分析



转运耐受分析



对胆盐胁迫的耐受性

在模拟胃液中胁迫3 h后，原始菌株存活率为16.9%，进化菌株Lbz-4为68.9%，经模拟胰液胁迫8 h，原始菌株存活率仅为5.4%，而进化菌株均保持10%以上的存活率。菌株经进化后对胃肠转运的耐受性明显提高。

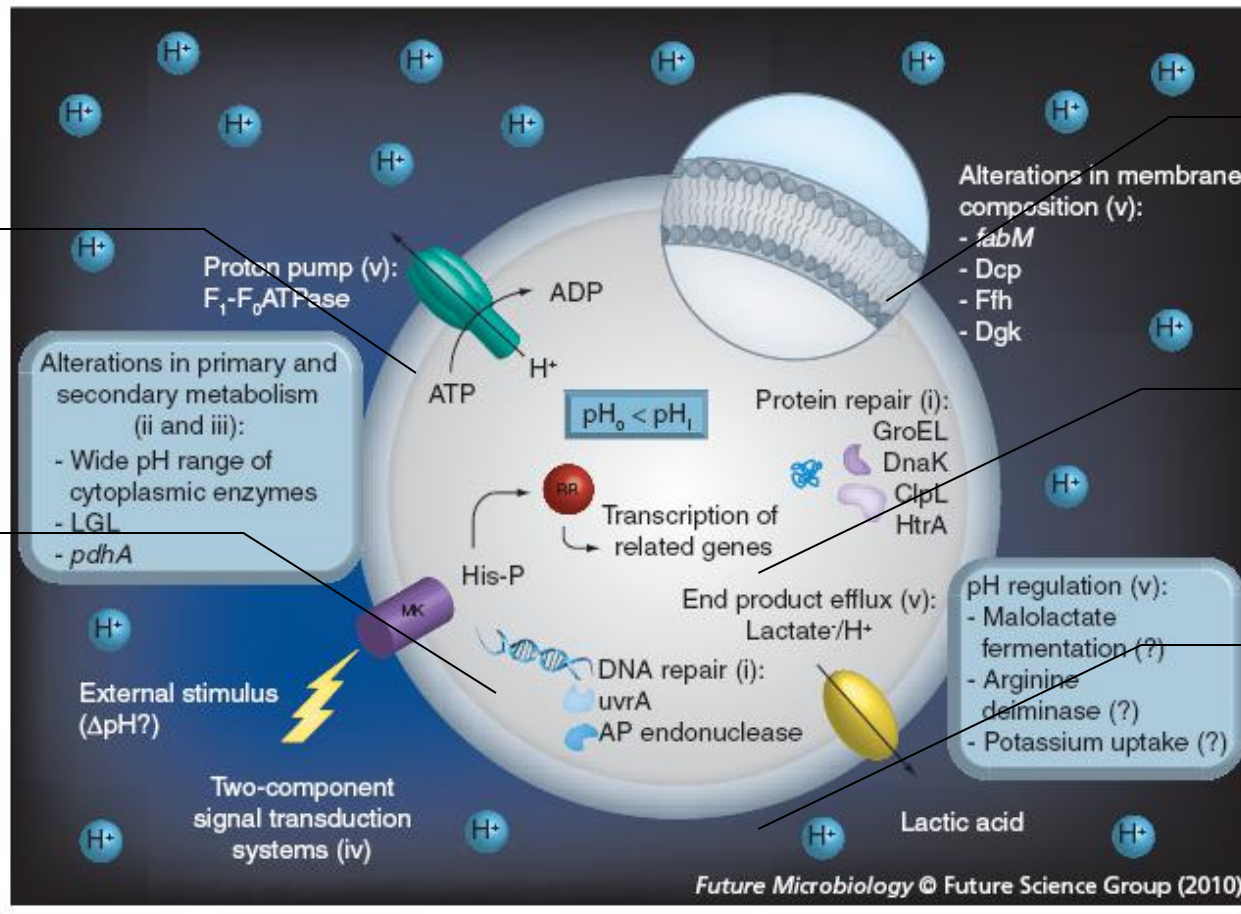
细胞对胆盐耐受性分析结果表明，进化菌株在含有胆盐的培养基中培养7 h，活菌数比原始菌株提高了2个对数单位。

# 本章小结

---

- (1) 适应性进化改善干酪乳杆菌酸胁迫条件下的生长性能。通过进化，获得的进化菌株在酸胁迫条件下的生物量比原始菌株提高60%，菌株比生长速率增加10%。
- (2) 随着进化时间的延长，进化菌株对酸胁迫的耐受性逐渐增强，进化70天的菌株对乳酸和盐酸胁迫的耐受性分别提高638倍和3.5倍。
- (3) 进化菌株对模拟胃肠道系统的耐受性明显提高，在胃肠转运过程中的存活率以及对胆盐的耐受性都高于原始菌株。

# 第三章 酸胁迫条件下干酪乳杆菌生理响应机制



辅因子水平

大分子物质的修复和表达

细胞结构的完整性，细胞膜的生理状态

胞内pH自我调控

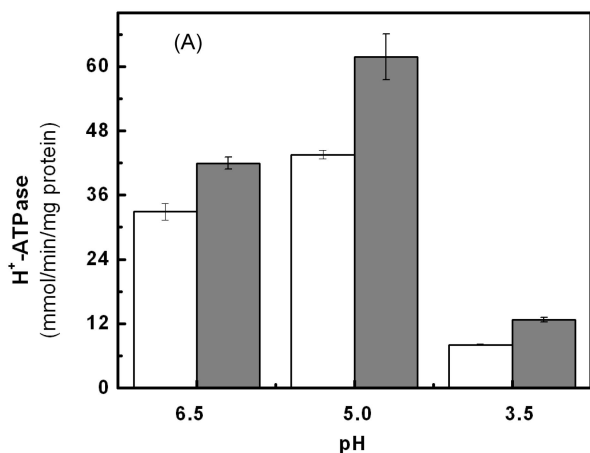
胞内外代谢产物

酸胁迫条件下的细胞生理应答

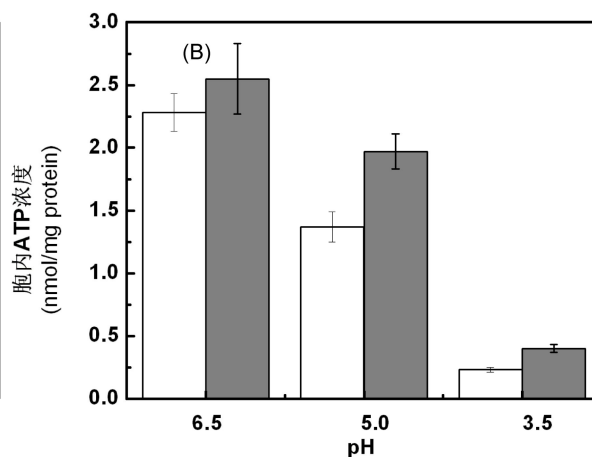
# 酸胁迫条件下胞内生理应答

## ■ 胞内微环境

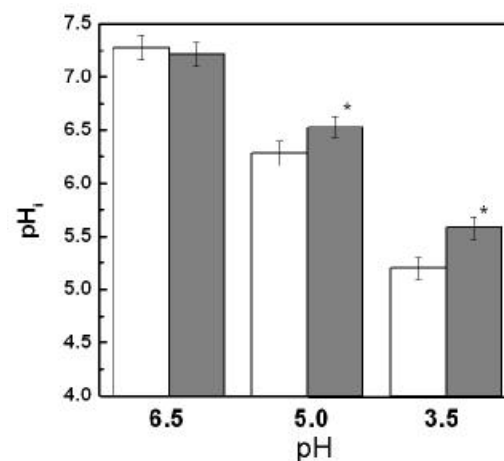
酸胁迫对H<sup>+</sup>-ATPase的影响



酸胁迫对胞内ATP的影响



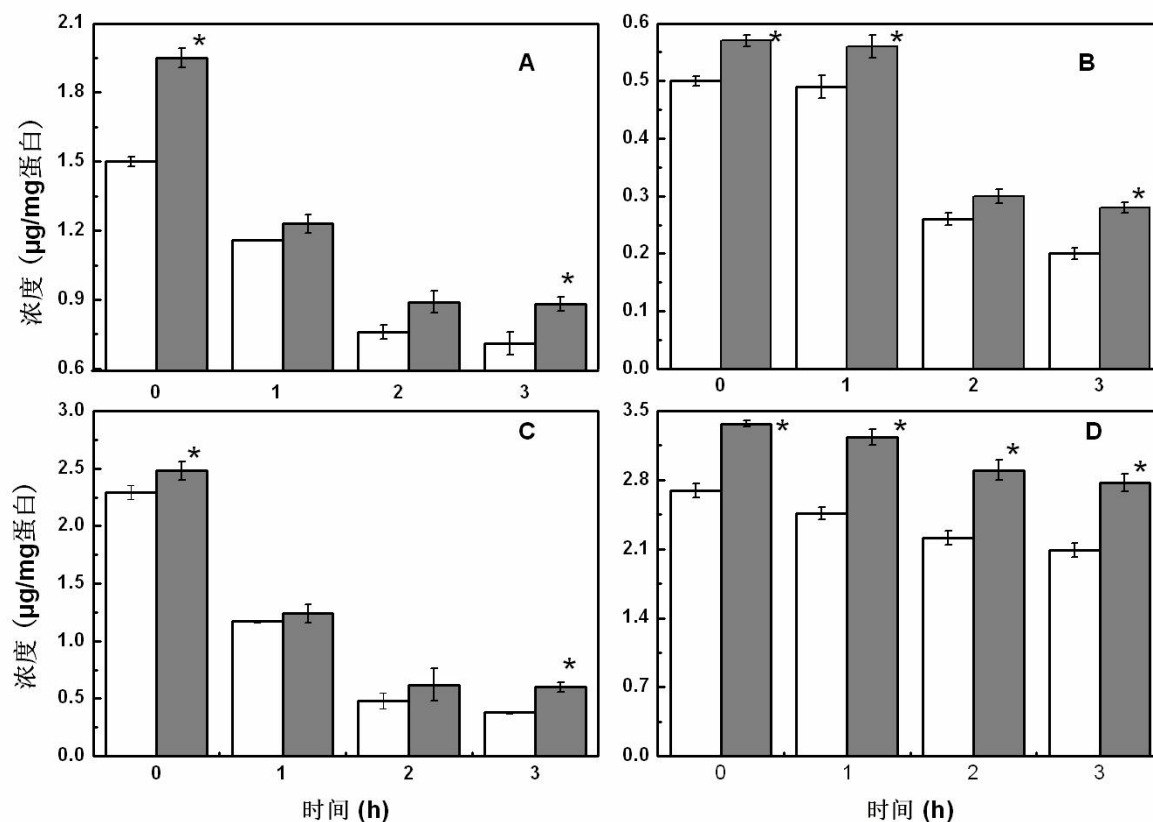
酸胁迫对pH<sub>i</sub>的影响



酸胁迫条件下，酸耐受的突变株具有更高的胞内**H<sup>+</sup>-ATPase**活性、胞内**ATP**水平以及更高地**pH<sub>i</sub>**。高的H<sup>+</sup>-ATPase活性以及ATP水平能有效地将胞内质子泵出胞外，**维持胞内pH的动态平衡**。

# 酸胁迫条件下胞内生理应答

## ■ 胞内氨基酸的变化



A: Asp

B: Arg

C: Glu

D: Ala

酸胁迫条件下，**Arg**和**Glu**分别通过生成氨和消耗 $\text{H}^+$ 的方式保持胞内pH的动态平衡；**Asp**可以转化成**Ala**并消耗 $\text{H}^+$ ，此外，**Asp**可以进入尿素循环生成氨和ATP。

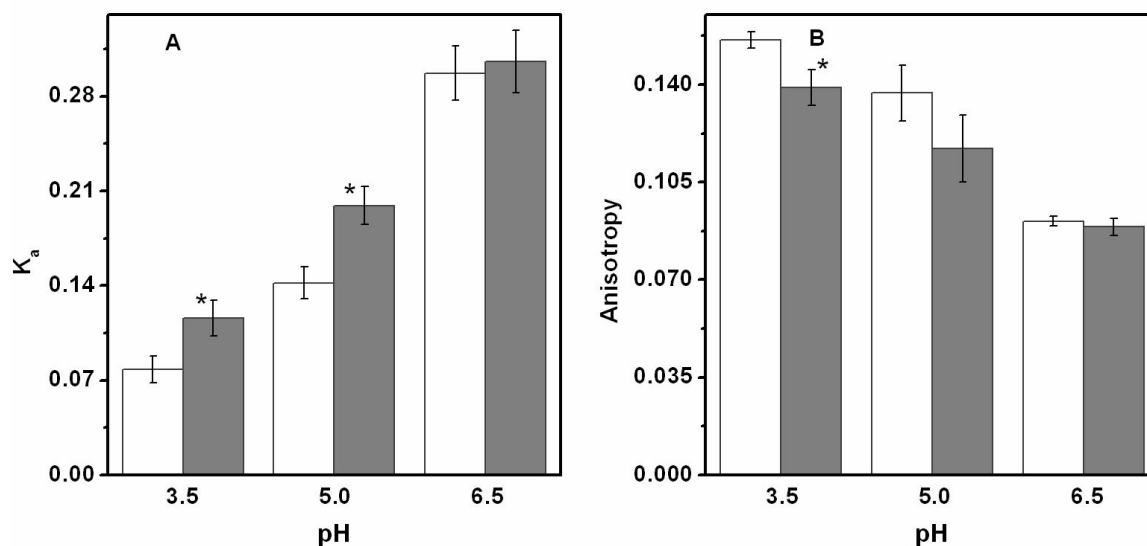
# 酸胁迫条件下胞内生理应答

## ■ 酸胁迫对PEP-PTS活性及酸化速率的影响

| Organism | pH  | Glucose PTS activity<br>(nmol/min/mg protein) | 35-min glycolytic pH<br>(final pH) |
|----------|-----|-----------------------------------------------|------------------------------------|
| WT       | 6.5 | $75.70 \pm 7.42$                              | $3.83 \pm 0.06$                    |
| mutant   | 6.5 | $78.64 \pm 6.89$                              | $3.75 \pm 0.04$                    |
| WT       | 5.0 | $31.32 \pm 3.83$                              | $4.13 \pm 0.09$                    |
| mutant   | 5.0 | $41.90 \pm 5.14$ ↑                            | $3.86 \pm 0.10$ ↓                  |

# 酸胁迫条件下细胞膜水平上的生理应答

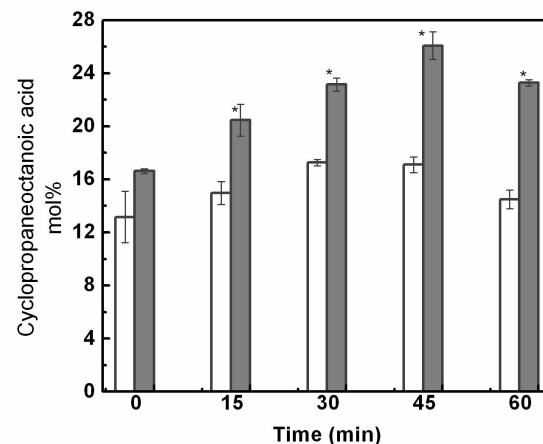
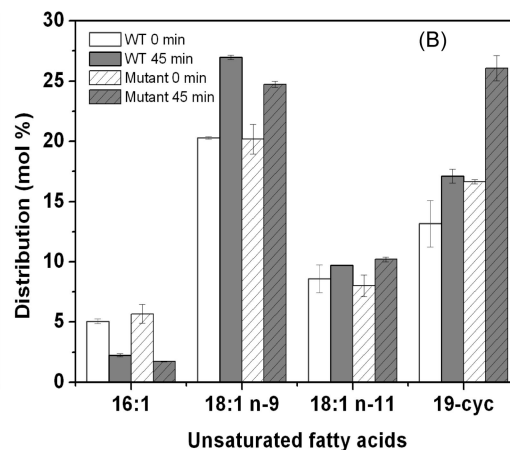
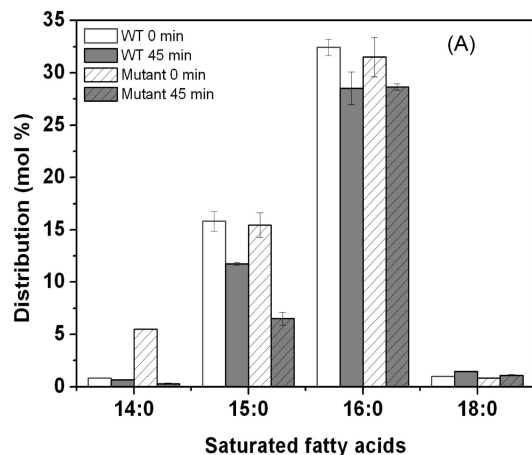
## ■ 细胞膜流动性的变化



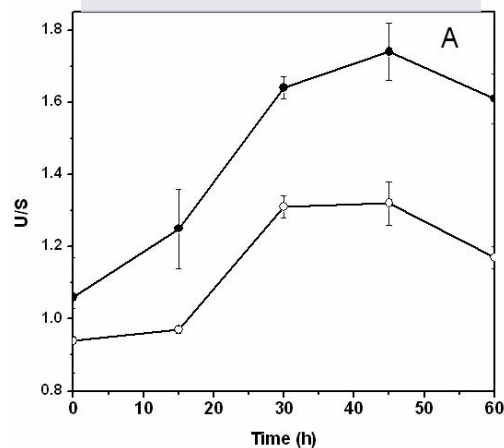
酸胁迫条件下，细胞膜流动性逐渐降低，突与原始菌株相比，变株保持了更高的侧向扩散速率(A)和较低的细胞膜微粘度(B)，表明突变株具有更高地膜流动性。

# 酸胁迫条件下细胞膜水平上的生理应答

## ■ 细胞膜脂肪酸含量的变化

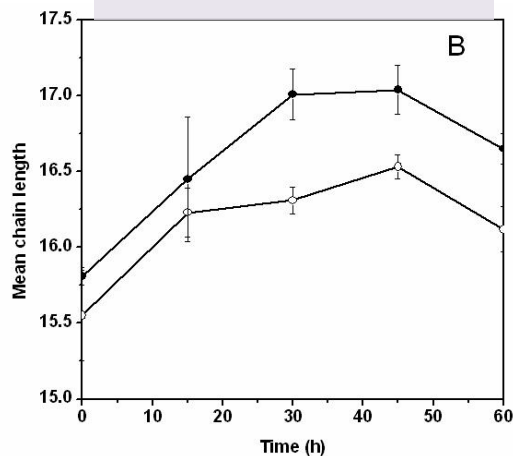


### 饱和脂肪酸



### 不饱和度

### 不饱和脂肪酸



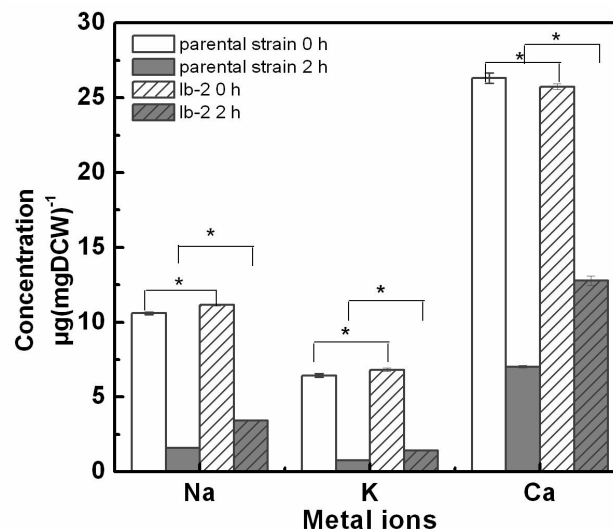
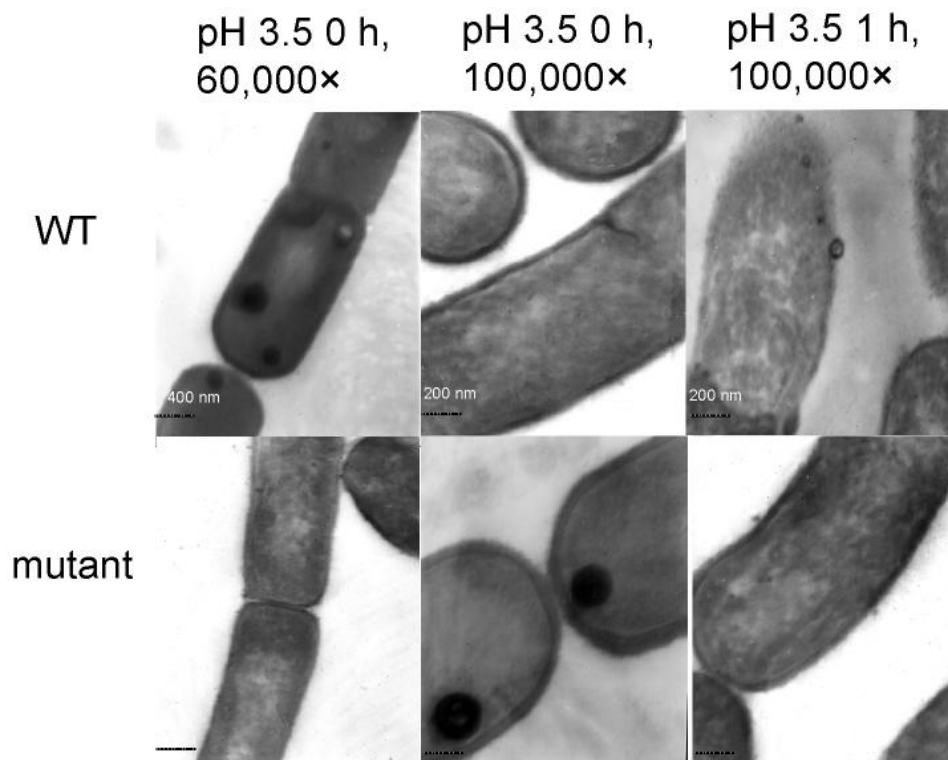
### 碳链长度

### 环丙烷(Cyc-19)脂肪酸

酸胁迫引起饱和脂肪酸 (C14:0; C15:0; C16:0; C18:0) 含量降低, 不饱和脂肪酸含量增加, 从而引起膜不饱和度增加, 碳链长度增加。同时, 突变株具有更高的环丙烷脂肪酸含量。

# 酸胁迫条件下细胞膜水平上的生理应答

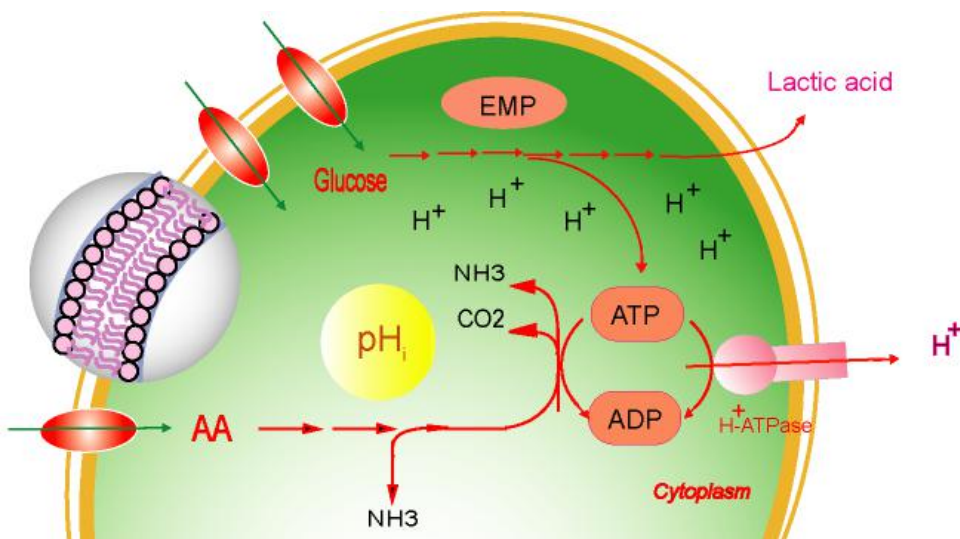
## ■ 细胞完整性的变化



胞内金属离子

酸胁迫使细胞膜变薄，表面变得粗糙，与原始菌株相比，突变株更好地保持了膜的完整性。

# 本章小结



胞内微环境及细胞膜水平上的胁迫响应

(1) 胞内pH的动态平衡时维持细胞活性的重要指标，在酸胁迫条件下，突变株比原始菌株保持了更高的胞内pH,细胞通过调节H<sup>+</sup>-ATPase活性和胞内ATP水平维持胞内pH的稳定。

(2) 酸胁迫条件下，突变株具有更高的PEP-PTS活性及更高的酸化速率。同时突变株还积累更高浓度的胞内Arg、Asp、Ala和Glu。

(3) 酸胁迫引起细胞膜流动性降低，突变株保持了更高的膜流动性，此外，酸胁迫引起细胞膜不饱和度、碳链长度和环丙烷脂肪酸含量的增加。

(4) 酸胁迫条件下，突变株能更好地保持细胞结构的完整性，减少胞内物质的溢出及胞外有害物质的进入。

# 第四章 基于蛋白质组学的细胞酸胁迫抗性机制解析

## ■ 基于蛋白质组学的研究方法

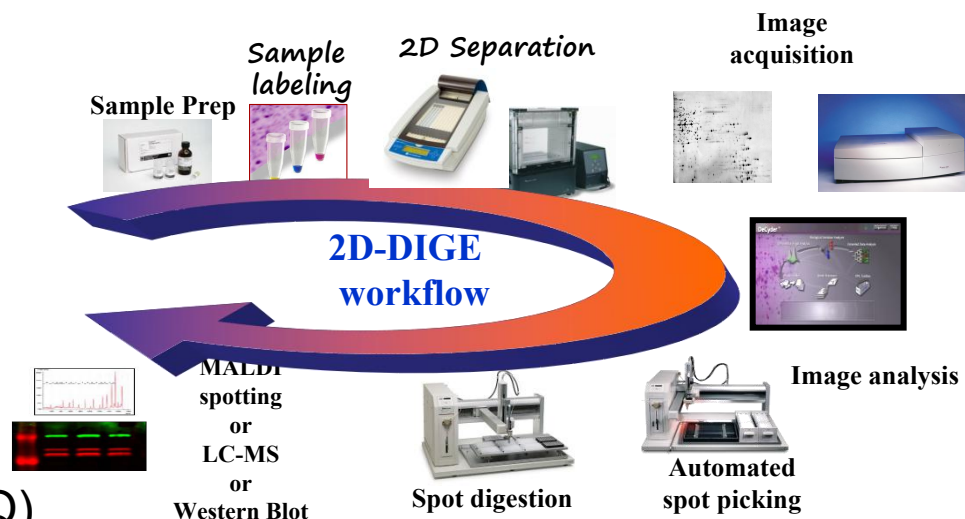
- 以凝胶染色强度为基础的

- 传统2-DE
- DIGE

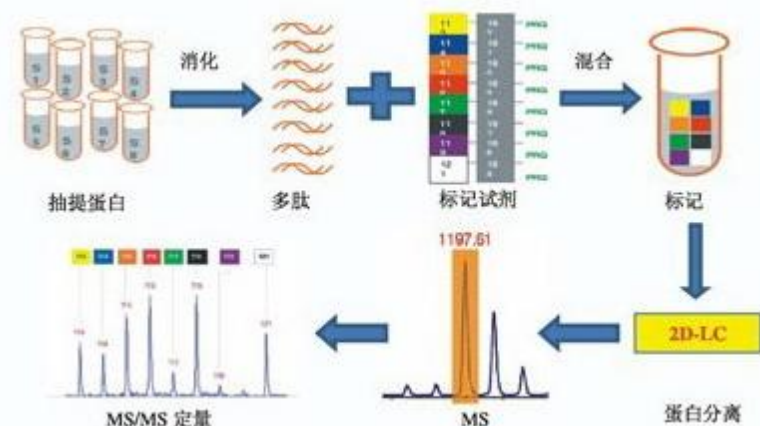
- 以质谱检测为基础的

- 同位素标记相对和绝对定量(i-TRAQ)
- 同位素亲和标记(ICAT)
- 同位素代谢标记法(SILAC)
- 酶催化 $^{18}\text{O}$ -同位素标记法
- Label-free
- .....

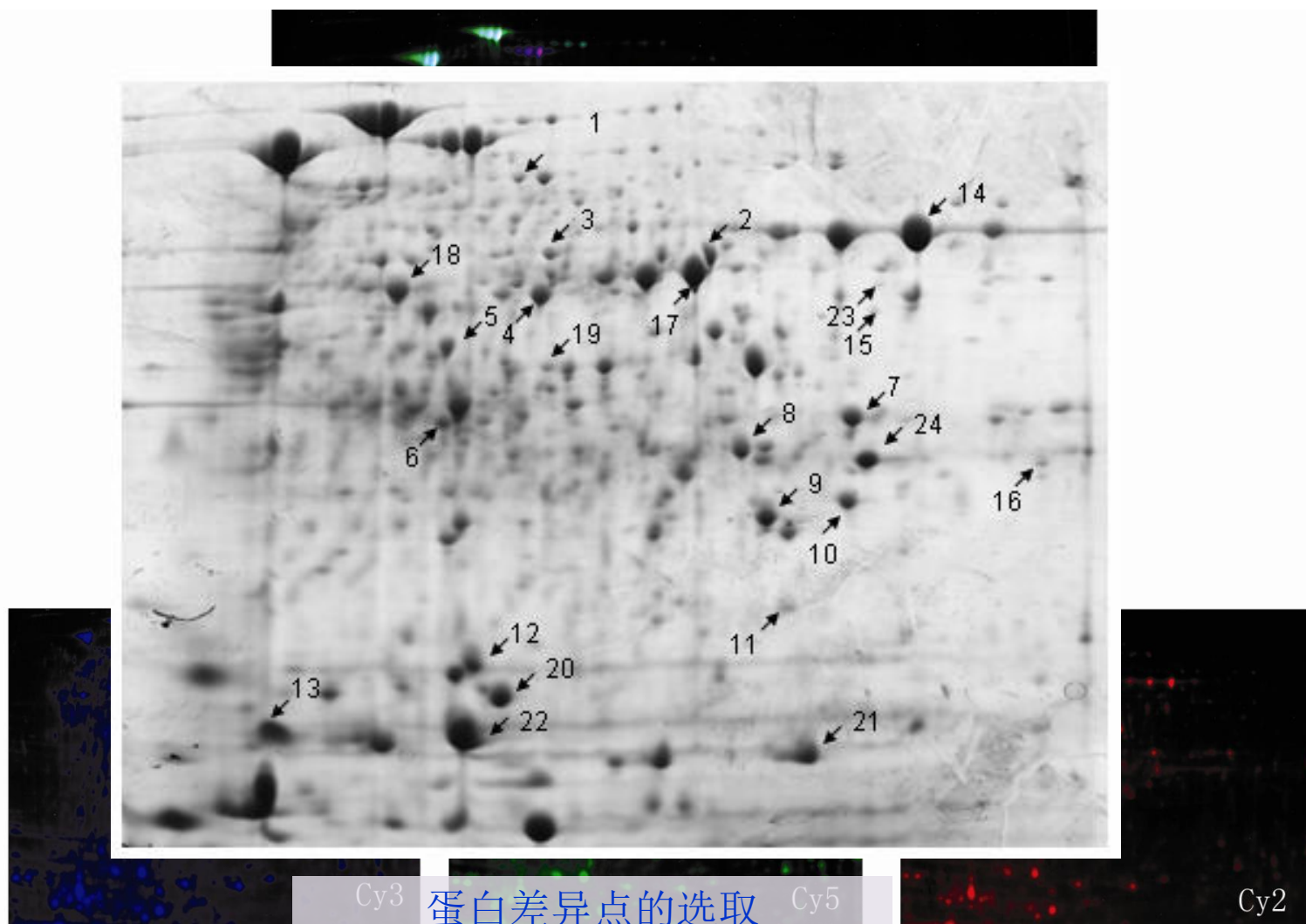
### 2D-DIGE工作流程



### i-TRAQ工作流程



# 基于2D-DIGE的蛋白质组学分析

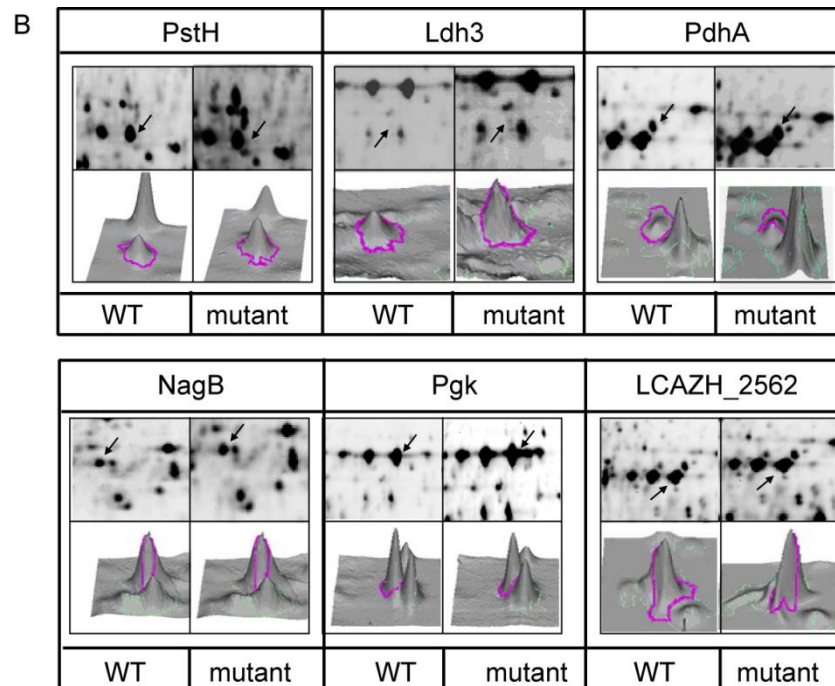
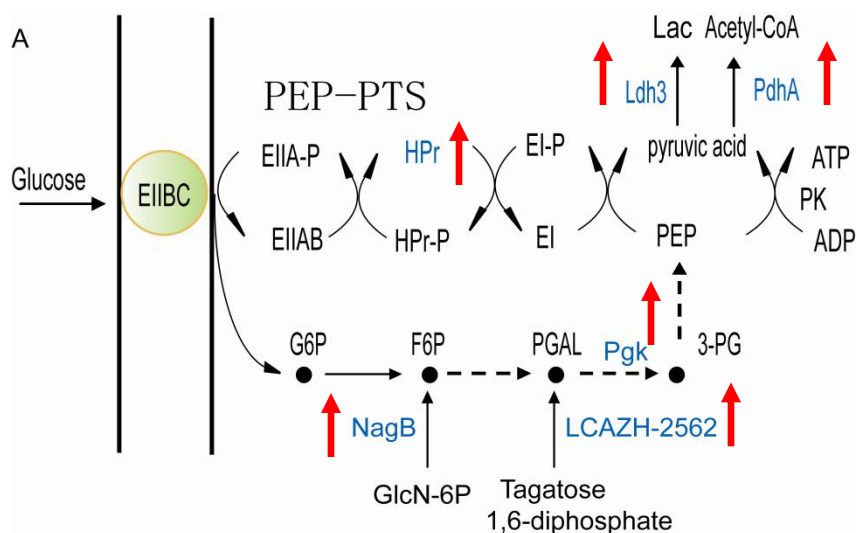


干酪乳杆菌2D-DIGE图谱

| COG <sup>a</sup>                                             | Spot no. <sup>b</sup> | NCBI accession no. | Putative function                                           | Gene locus    | Gene  | Mass (Da) | pI   | Sequence coverage (%) <sup>c</sup> | Ratio ( <i>P</i> -value) <sup>d</sup> |                             |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------|---------------|-------|-----------|------|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
|                                                              |                       |                    |                                                             |               |       |           |      |                                    | pH 6.5 mutant/WT                      | pH 3.5 mutant/WT            |
| Carbohydrate transport and metabolism                        | 8                     | gi 239527064       | Glucosamine-6-phosphate deaminase                           | LBPB_01514    | nagB  | 25867.1   | 5.3  | 90.25                              | $1.27(1.62 \times 10^{-2})$           | $1.62(1.41 \times 10^{-2})$ |
|                                                              | 14                    | gi 190712210       | Phosphoglycerate kinase                                     | LCABL_11310   | pgk   | 42211.2   | 5.64 | 46.21                              | NS                                    | $1.88(7.01 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 17                    | gi 300439986       | Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase                          | LCAZH_2562    |       | 36400.9   | 5.25 | 78.92                              | $1.41(2.81 \times 10^{-2})$           | $2.05(4.13 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 19                    | gi 300439987       | Galactose mutarotase related enzyme                         | LCAZH_2563    |       | 32378.1   | 5.04 | 59.39                              | $1.26(1.84 \times 10^{-3})$           | $1.92(1.01 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 22                    | gi 8307834         | Hpr                                                         |               | pstH  | 9247.1    | 4.91 | 48.86                              | NS                                    | $1.72(7.04 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 23                    | gi 190714078       | EIIAB                                                       | LCABL_30340   | manL  | 35296.3   | 5.48 | 85.19                              | NS                                    | $1.28(3.12 \times 10^{-3})$ |
| Translation, ribosomal structure and biogenesis              | 1                     | gi 190712674       | 30S Ribosomal protein S1                                    | LCABL_15990   | rpsA  | 47620.7   | 5.04 | 57.86                              | NS                                    | $3.37(5.12 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 4                     | gi 190712872       | Elongation factor Ts (EF-Ts)                                | LCABL_17980   | tsf   | 31681.3   | 5.0  | 74.74                              | NS                                    | $1.47(1.6 \times 10^{-3})$  |
|                                                              | 6                     | gi 22266146        | Putative elongation factor Tu                               |               | tuf   | 28210.6   | 4.54 | 57.87                              | NS                                    | $1.38(1.2 \times 10^{-3})$  |
|                                                              | 9                     | gi 190712870       | Ribosome recycling factor                                   | LCABL_17960   | frr   | 20580.8   | 5.43 | 87.03                              | NS                                    | $2.14(4.71 \times 10^{-2})$ |
| Posttranslational modification, protein turnover, chaperones | 5                     | gi 190713480       | 60kDa chaperonin (protein Cpn60) (groEL protein)            | LCABL_24200   | groEL | 57392.9   | 4.89 | 41.18                              | NS                                    | $3.07(6.13 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 11                    | gi 190712852       | Chaperone protein dnaK(Heat shock protein 70)               | LCABL_17780   | dnaK  | 67522.6   | 4.77 | 12.8                               | NS                                    | $2.19(3.24 \times 10^{-2})$ |
|                                                              | 12                    | gi 190711872       | Small heat shock protein                                    | LCABL_07530   | hsp1  | 17804.6   | 4.98 | 56.33                              | NS                                    | $1.98(5.41 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 20                    | gi 300440230       | Molecular chaperone (small heat shock protein)              | LCAZH_2811    |       | 16495.1   | 5    | 99.31                              | NS                                    | $2.31(4.08 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 24                    | gi 227187398       | molecular chaperone GrpE                                    | HMPREF0530_22 | grpE  | 24651.5   | 5.47 | 46.85                              | NS                                    | $1.99(1.17 \times 10^{-3})$ |
| Transcription                                                | 13                    | gi 259648959       | cold shock protein                                          | LC705_01149   | cspC  | 7198.4    | 4.6  | 83.33                              | NS                                    | $2.09(1.14 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 21                    | gi 300439624       | Translational regulator protein, xre family                 | LCAZH_2180    |       | 13977.3   | 5.46 | 82.17                              | NS                                    | $1.32(3.51 \times 10^{-3})$ |
| Energy production and conversion                             | 2                     | gi 190712611       | Pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit | LCABL_15360   | pdhA  | 40787.7   | 5.29 | 68.11                              | $1.26(4.11 \times 10^{-2})$           | $1.32(4.71 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 15                    | gi 205270992       | L-lactate dehydrogenase                                     |               | ldh3  | 32664.7   | 5.49 | 30.30                              | NS                                    | $3.30(4.26 \times 10^{-2})$ |
|                                                              | 18                    | gi 300438867       | Inorganic pyrophosphate/exopolyphosphatase                  | LCAZH_1400    |       | 33760.9   | 4.74 | 67.42                              | NS                                    | $1.32(4.11 \times 10^{-2})$ |
| Unknown function                                             | 3                     | gi 116494244       | Hypothetical protein LSEI_0696                              | LSEI_0696     |       | 38957.2   | 5.02 | 66.01                              | NS                                    | $1.32(4.18 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 7                     | gi 190713229       | ABC transporter related                                     | LCABL_21680   |       | 27109.2   | 5.33 | 68.65                              | NS                                    | $3.30(3.09 \times 10^{-3})$ |
|                                                              | 10                    | gi 190712608       | Peptide deformylase PDF (Polypeptide deformylase)           | LCABL_15330   | def   | 20686.6   | 5.44 | 73.37                              | NS                                    | $1.56(3.41 \times 10^{-2})$ |

# 基于2D-DIGE的蛋白质组学分析

## ■ 酸胁迫对糖代谢的影响



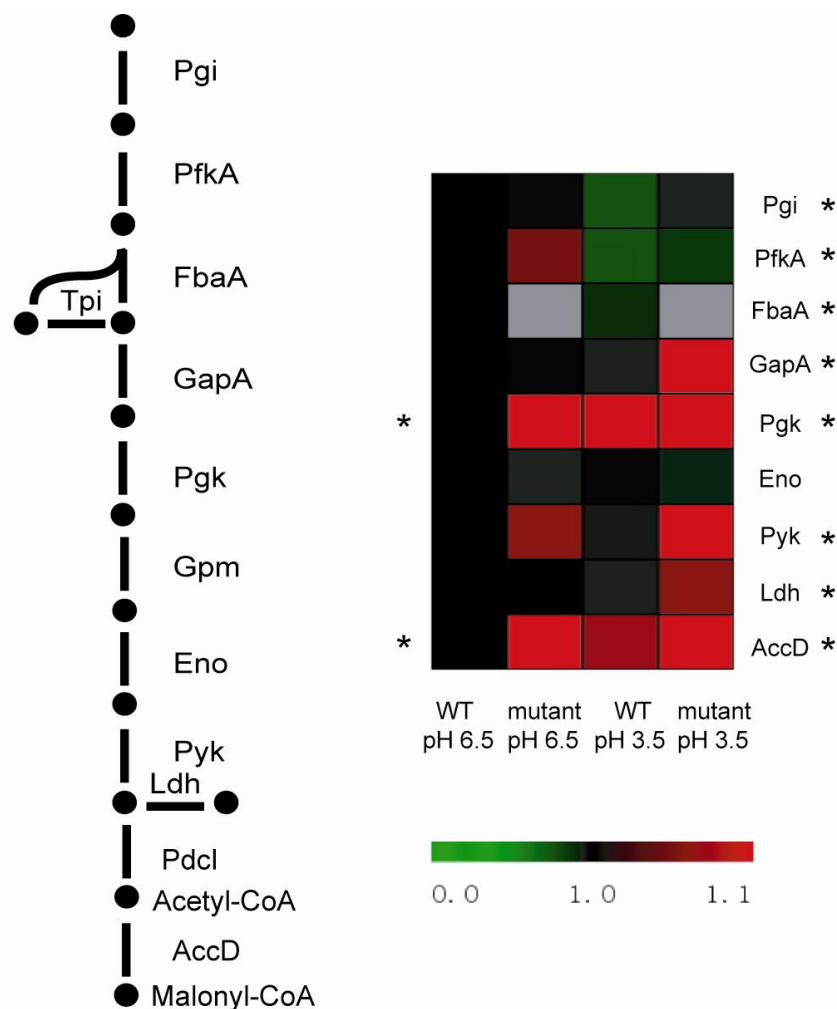
(1)酸胁迫条件下，突变株中蛋白**Hpr**,磷酸甘油激酶**Pgk**,丙酮酸脱氢酶复合体系**E1 PdhA**和乳酸脱氢酶**Ldh3**表达上调。

(2)酸胁迫条件下，突变株中6-磷酸氨基葡萄糖异构酶**NagB**和1,6-二磷酸塔格糖醛缩酶**LCAZH-2562**表达上调。

共鉴定蛋白**280**个，主要分为**3**类：**(1)**细胞物质代谢和能量生成相关蛋白；**(2)**DNA复制、RNA合成和翻译相关蛋白；**(3)**后翻译修饰相关蛋白以及分子伴侣蛋白。

# 基于i-TRAQ技术的蛋白质组学分析

## ■ 中心代谢途径的蛋白表达谱

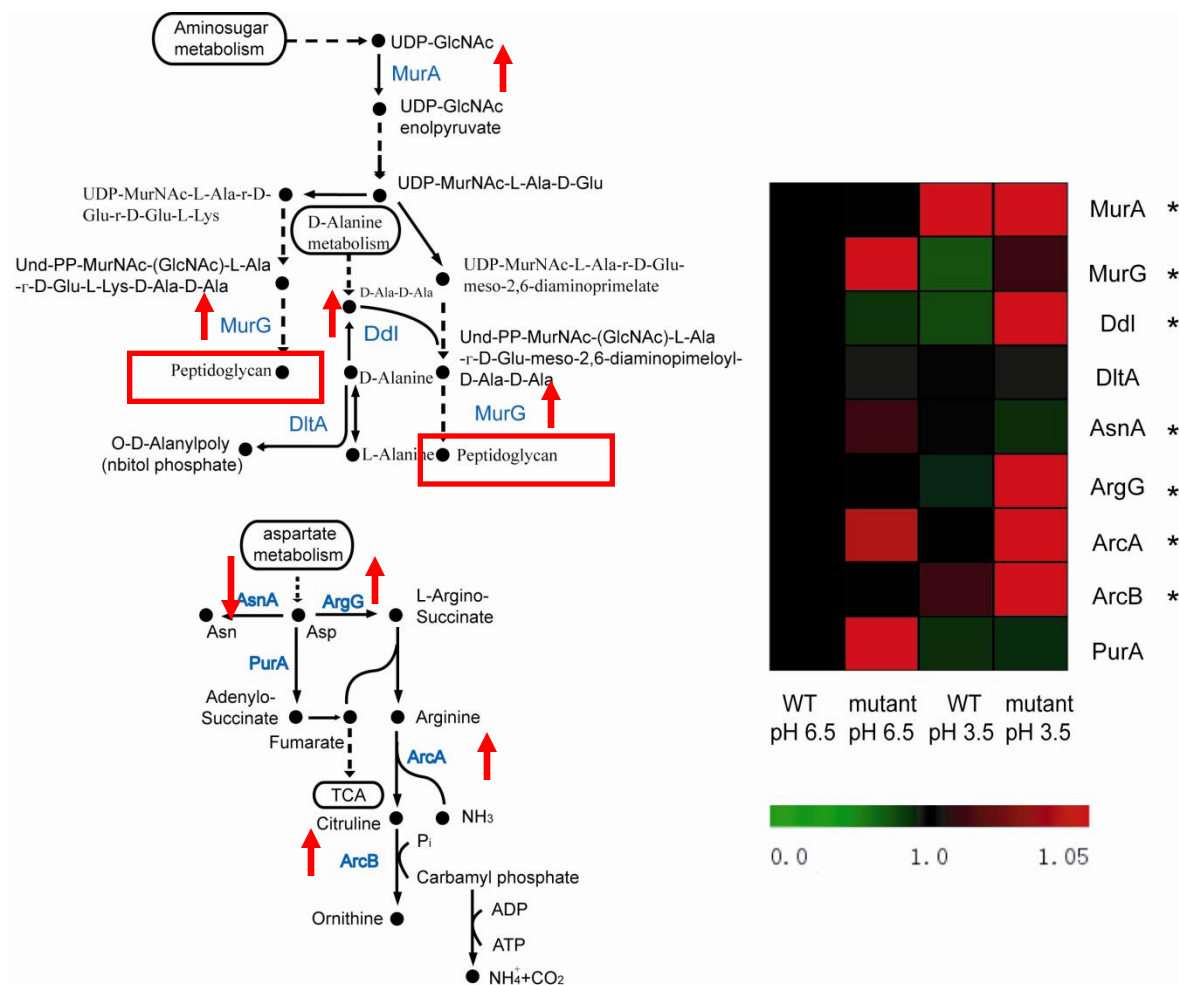


(1) 酸胁迫前，突变株中磷酸甘油激酶Pgk和乙酰辅酶A羧化酶转移酶 $\beta$ 亚基AccD表达量高于原始菌株。

(2) 酸胁迫引起两株菌中6-磷酸果糖异构酶Pgi, 磷酸果糖激酶PfkA和二磷酸果糖醛缩酶FbaA表达下调，与原始菌株相比，突变株中除烯醇化酶Eno没有显著变化外，其余蛋白表达均高于原始菌株。

# 基于i-TRAQ技术的蛋白质组学分析

## ■ 肽聚糖合成途径和天冬氨酸代谢途径



(1) 酸胁迫后，突变株中往肽聚糖合成途径中的蛋白表达上调。

(2) 酸胁迫后，突变株中Asp往Arg代谢途径中的蛋白表达上调。

## ■ DNA复制、转录、翻译相关蛋白及胁迫应激蛋白



分子伴侣: GroL, DnaJ, DnaK, HslO, GroS, ClpX。

# 本章小结

---

- (1) 酸胁迫引起细胞物质代谢和能量产生途径的蛋白表达发生变化，与原始菌株相比，突变株具有更高的糖酵解速率，肽聚糖合成以及天冬氨酸和精氨酸代谢活性，有利于减少酸胁迫对细胞造成的损伤。
- (2) 酸胁迫导致DNA合成、转录和翻译等途径的相关蛋白表达下调，但是与DNA修复相关蛋白却显著上调。
- (3) 酸胁迫诱导大量胁迫应激蛋白的产生，如分子伴侣，冷/热应激蛋白等这些蛋白在酸胁迫条件下显著上调。