

添加肉类蛋白对米酒乳杆菌生境适应相关基因表达的影响

许慧卿, 高璐, 田颖, 蒋云升, 彭景, 陈玉

(扬州大学旅游烹饪(食品科学)学院, 江苏扬州 225127)

摘要: 米酒乳杆菌是常见的异型发酵乳酸菌, 它常常用作肉类工业发酵剂。为了了解其在肉类环境中的生存状况, 本文用定量PCR对米酒乳杆菌 La22 在添加肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的培养基中生长时生境适应相关基因表达量进行分析。结果显示, 在两种培养基中生长时, pH 值均随时间的延长而下降, 在添加肌浆蛋白的培养基略高于添加肌原纤维蛋白培养基。与对照相比, 在添加肌浆蛋白培养基中的 *arcA*、*arcB*、*arcC*、*arcT* 以及添加肌原纤维蛋白培养基中的 *arcR* 基因表达量明显上调, 其余几个 *arc* 基因也均上调, 但不明显; 压力相关基因 *lsa00513*、*usp4* 以及 *usp2* 在肌浆蛋白培养基中均明显上调; 有 6 个 ABC 转运子基因在添加两种肌肉蛋白的培养基中表达量明显上调。结果表明米酒乳杆菌能通过能量转换与基因表达调节来适应含肉类蛋白的培养环境。

关键词: 米酒乳杆菌; 肌浆蛋白; 肌原纤维蛋白; 基因; 生境适应性

文章编号: 1673-9078(2015)6-44-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.008

Effects of Meat Protein Environments on Niche-specific Genetic Expression of *Lactobacillus sakei*

XU Hui-qing, GAO Lu, TIAN Ying, JIANG Yun-sheng, PENG Jin, CHEN Yu

(Yangzhou University Tour and Cuisine (Food Science) College, Yangzhou 225127, China)

Abstract: *Lactobacillus sakei* is a ubiquitous heterofermentative lactic acid bacterium that is frequently used as a meat industrial starter culture. To investigate its adaptations to a meat protein environment, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to analyze the niche-specific genetic expression of *L. sakei* strain La22 when cultured in myofibrillar and sarcoplasmic protein-supplemented chemically defined media (CDM). The results showed that pH decreased with time, and that the pH value in CDM containing myofibrillar proteins was higher than that in CDM with sarcoplasmic proteins. Genetic expressions of *arcA*, *arcB*, *arcC*, and *arcT* in CDM containing myofibrillar proteins and *arcR* in CDM containing sarcoplasmic proteins were significantly higher compared to the control. The remaining *arc* operon genes were also upregulated in both culture media, but the increases were not significant. Stress response genes *lsa00513*, *usp4*, and *usp2* in CDM containing myofibrillar proteins were significantly upregulated, and six genes encoding ABC transporter were significantly upregulated in both protein media. The results suggested that *L. sakei* had adapted to a meat protein environment by energy conversion and modulation of genetic expression.

Key words: *Lactobacillus sakei*; myofibrillar protein; sarcoplasmic protein; gene; niche adaptability

米酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*) 属于异型发酵乳酸菌, 是一种重要的工业微生物, 虽然其常常作为食品发酵剂用于蔬菜、鱼类和肉类发酵, 但最常见的还是在肉类环境中, 尤其是在西欧的发酵香肠中更为常用。米酒乳杆菌已成为肉制品发酵工业中最常用, 也是最重要的发酵剂之一, 它可以有效抑制腐败菌, 提高发酵食品的营养价值和感官品质以及增加食品

收稿日期: 2014-08-27

基金项目: 国家自然科学基金(31101305); 江苏省自然科学基金(BK2010319)

作者简介: 许慧卿 (1972-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食品加工及微生物生物技术

风味^[1]。最新研究发现, 米酒乳杆菌还是人类肠道菌群的临时成员。米酒乳杆菌能适应多种不同的环境并在其中存活, 提示该菌可能存在一些特殊的生理生化特性。

在发酵过程由于其自身的产酸及各种环境因子的变化, 发酵菌株不可避免地面临着多种环境胁迫。通过对米酒乳杆菌 23 K 菌株基因组序列的研究表明, 米酒乳杆菌存在一些区别于其它乳酸杆菌的生境特异性基因, 这些基因帮助它在特定的生态环境中生长和生存, 比如高盐环境、高 pH 环境以及极端温度环境。一般来说, 细菌在压力条件下诱导表达的基因主要包

括三类: DNA 修复、一般代谢和特定压力反应基因。目前已发现一些热激基因和冷激基因参与米酒乳杆菌在热激、冷激、高盐及酒精环境中的生存。另外,米酒乳杆菌中存在精氨酸脱亚胺酶途径,这一途径广泛地存在于多种微生物中,它能提高细菌在酸性环境下的生存机率^[2]。

作为米酒乳杆菌生长的重要基质,肉类代表一种碳水化合物相对贫乏而蛋白质含量丰富的环境。在这种环境中,蛋白质提供的氮源是细胞生长的主要能源物质。虽然 Fadda 和 McLeod 等^[3-4]对米酒乳杆菌在肉类蛋白和添加核糖的培养基中生长时其蛋白组学和转录组学进行研究,但对米酒乳杆菌如何通过表达一些生境适应基因来适应肉类环境缺乏相应的报道。因此,本研究通过研究米酒乳杆菌 La22 在添加肉肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的培养基中生长时生境适应相关基因表达量变化,探讨该菌对肉类蛋白的适应性,这对更好的利用乳酸菌具有实际的指导意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

米酒乳杆菌(*L.sakei*)La22, 具蛋白质分解能力, 本实验保存。

1.1.2 原料

市售猪肉。

1.1.3 培养基

CDM 培养基^[5], pH 调至 6.5 左右。

1.1.4 试剂

RNAiso Plus、PrimeScript RT-PCR Kit 和 SYBR Premix Ex Taq 购自大连宝生物; 定量 PCR 引物由上海生工合成; 化学试剂均购自国药集团。

1.2 方法

1.2.1 肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的提取

肌浆蛋白的提取: 取猪肉 10 g, 充分粉碎后按质量体积比 (*m/V*) 1:10 加入 0.03 mol/L pH 6.5 的磷酸缓冲液, 4 °C 下用磁力搅拌器匀浆 4 min, 同温度下 10000 r/min 离心 20 min, 取上清液 4 °C 透析过夜, 即为肌浆蛋白。

肌原纤维蛋白的提取: 取猪肉 10 g, 充分粉碎后按质量体积比 (*m/V*) 1:10 加入 0.03 mol/L, pH 6.5 的磷酸盐缓冲液, 4 °C 下用磁力搅拌器匀浆 4 min, 同温度下 10000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 再按质量体积比 (*m/V*) 1:10 加入 0.03 mol/L 的磷酸缓冲液, 4 °C

下磁力搅拌器上匀浆 4 min, 同温度下 10000 r/min 离心 20 min。重复上述操作 3 次, 然后按质量体积比 (*m/V*) 1:4 加入 0.1 mol/L, pH 6.5 (含 0.7 mol/L KI 和 0.02% NaN₃) 的磷酸盐缓冲液, 4 °C 下用磁力搅拌器匀浆 4 min, 同温度下 10000 r/min 离心 20 min, 取上清液 4 °C 透析过夜, 即为肌原纤维蛋白。

1.2.2 pH 值测定

将活化的米酒乳杆菌接种于含肌浆蛋白与肌原纤维蛋白的液体 CDM 培养基中, 30 °C 培养箱内培养约 72 h, 测定培养液的 pH 值, 以不含蛋白的 CDM 培养基为对照。

1.2.3 菌株的培养

将活化的米酒乳杆菌划满板分别接种于添加 50% 肉肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的固体培养基上, 置于 30 °C 培养箱内培养约 24 h, 同时以生长在不添加蛋白类物质的 CDM 培养基上的菌为对照。

1.2.4 样品 RNA 提取

将不同生长期的菌苔从平板上刮下, 置于 -70 °C 冰箱中。提取时将样品从超低温冰箱中取出, 用 1×PBS 清洗 3 次, 加入 1 mL 的 RNAiso Plus, 用移液枪吹匀。将上述裂解液室温静置 5 min, 然后按说明书方法提取米酒乳杆菌的 RNA。具体方法如下: 向上述裂解液中加入氯仿 (RNAiso Plus 的 1/5 体积量), 盖紧离心管盖, 用手剧烈振荡 15 s (氯仿沸点低、易挥发, 振荡时应小心离心管盖突然弹开)。待溶液充分乳化 (无分相现象) 后, 再室温静置 5 min。用 12000 r/min, 4 °C 离心 15 min。从离心机中小心取出离心管, 此时裂解液分为三层, 即: 无色的上清液、中间白色蛋白层及带有颜色的下层有机相。吸取上清液转移至另一新的离心管中 (切忌吸出白色中间层)。向上清中加入等体积的异丙醇, 上下颠倒离心管充分混匀后, 在 15~30 °C 下静置 10 min。12000 r/min 4 °C 离心 10 min。一般在离心后, 试管底部会出现沉淀。小心弃去上清, 缓慢地沿离心管壁加入 75% 的乙醇 1 mL (切勿触及沉淀), 轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁, 12000 r/min、4 °C 离心 5 min 后小心弃去乙醇 (为了更好地控制 RNA 中的盐离子含量, 应尽量除净乙醇)。室温干燥沉淀 2~5 分钟 (不可以离心或加热干燥, 否则 RNA 将会很难溶解), 加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀, 必要时可用移液枪轻轻吹打沉淀, 待 RNA 沉淀完全溶解后用 Nanodrop 测定 RNA 浓度, 用甲醛变性胶电泳检验提取的 RNA 样品, 于 -80 °C 保存。

1.2.5 RNA 纯化及反转录反应

按照 PrimeScript RT-PCR Kit 要求, 取 1.2.4 提取的 RNA 500 ng, 依次加入 5× gDNA Eraser Buffer 2 μL,

gDNA Eraser 1 μL , 然后用 RNase Free dH_2O 补足 10 μL , 在 42 $^\circ\text{C}$ 水浴反应 2 min, 然后 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.2.6 反转录反应

在 1.2.3 反应液中依次加入 5 \times PrimeScript $^\circledR$ Buffer 2 (for Real Time) 4 μL , PrimeScript $^\circledR$ RT Enzyme Mix I 1 μL , RT Primer Mix \times 4 1 μL , 然后用 RNase Free dH_2O 补足 20 μL , 先于在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴反应 2 min, 然后于 85 $^\circ\text{C}$ 金属浴反应 5 s 灭活相应的酶, -20 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.2.7 qRT-PCR 反应

以上述获得的不同样品的 cDNA 为模板, 应用 LightCycler $^\circledR$ Real Time PCR 扩增仪的操作方法, 按下列组份在冰上配制 PCR 反应体系: SYBR $^\circledR$ Premix Ex TaqTM II (2 \times) 10.0 μL , PCR Forward Primer 0.4 μM , PCR Reverse Primer 0.4 μM , cDNA 模板 50~100 ng, 用灭菌蒸馏水补足 20 μL 体系。每样品 3 个重复。两步法 qRT-PCR 反应程序如下:

Stage 1: 预变性: 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 20 $^\circ\text{C}/\text{s}$; 1 Cycle;

Stage 2: PCR 反应: 95 $^\circ\text{C}$ 5 s, 20 $^\circ\text{C}/\text{s}$; 60 $^\circ\text{C}$ 20 sec, 20 $^\circ\text{C}/\text{sec}$; 40 Cycles;

表 1 米酒乳杆菌 La22 在含不同肉类蛋白的 CDM 培养基上生长时 72 h 的 pH 值变化

Table 1 pH measurements of *L. sakei* La22 on CDM-containing meat protein over 72 h

培养基	0h	6h	12h	24h	48h	72h
CDM	6.43 \pm 0.11	5.32 \pm 0.09	4.67 \pm 0.1	4.44 \pm 0.06	4.45 \pm 0.09	4.45 \pm 0.12
CDM+肌浆蛋白	6.39 \pm 0.12	5.94 \pm 0.08	5.01 \pm 0.03	4.74 \pm 0.09	4.75 \pm 0.09	4.74 \pm 0.05
CDM+肌原纤维蛋白	6.46 \pm 0.08	5.52 \pm 0.04	4.88 \pm 0.11	4.51 \pm 0.08	4.51 \pm 0.07	4.5 \pm 0.06

由于培养基中添加了不同的肉类蛋白, 因此三种培养基的氨基酸总浓度分别为 400.52 mg/100 mL (添加肉肌浆蛋白的 CDM 培养基)、288.89 mg/100 mL (添加肉肌原纤维蛋白的 CDM 培养基) 和 90 mg/mL (CDM 培养基)。通过 72 h 的培养, 三种培养基的 pH 值均从 6.4 左右下降至 4.5 左右 (表 1)。而肌浆蛋白的 pH 比其它两种培养基下降得少一些。同时本研究发现 48 h 后米酒乳杆菌在添加肉类蛋白的培养基中存活非常艰难。这与米酒乳杆菌的基本特性相符。

2.2 添加不同肉蛋白质对精氨酸脱亚胺酶途径的影响

米酒乳杆菌能通过精氨酸脱亚胺酶途径(ADI), 产生 ATP, 保护其在酸压力环境中生存^[6]。ADI 途径如图 1A 所示, 包含三个细胞质酶: 精氨酸脱亚胺酶, 负责把精氨酸转化为瓜氨酸和氨; 异化鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC), 负责把瓜氨酸转化为氨甲酰磷酸和鸟氨酸; 氨基甲酸激酶(CK), 负责把氨甲酰磷酸转化为氨、二氧化碳和 ATP。从而, 精氨酸通过 ADI 途径

Stage 3: 融解曲线分析: 95 $^\circ\text{C}$ 0 s, 20 $^\circ\text{C}/\text{s}$; 65 $^\circ\text{C}$ 15 s, 20 $^\circ\text{C}/\text{s}$; 95 $^\circ\text{C}$ 0 s, 0.1 $^\circ\text{C}/\text{s}$ 。

1.2.8 数据统计分析

试验数据用 SPSS 15.0 进行统计分析, 相对定量的结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行处理。计算公式: $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{待测组的基因平均 Ct 值}-\text{待测组看家基因平均 Ct 值})-(\text{对照组的基因平均 Ct 值}-\text{对照组看家基因平均 Ct 值})$, 即每一个样品目标基因表达经内参均一化处理后相对于某个样品的倍数。其中, Ct(初始循环数)为扩增曲线与 Threshold line 交点的横坐标值, 即 PCR 扩增过程中荧光信号强度达到阈值所需要的循环数, 以看家基因 *gapdh* 为参比基因。

2 结果与讨论

2.1 添加不同肉蛋白对米酒乳杆菌产酸的影响

转化为鸟氨酸、氨和二氧化碳。同时, 每转化 1 mol 精氨酸产生 1 分子的 ATP。ATP 为米酒乳杆菌提供了额外的能量, 而氨可能有利于其缓解酸压力。参与 ADI 的基因普遍存在于各种微生物中。大多数微生物中, 参与 ADI 途径的基因组成一个 *arc* 操纵子。乳酸菌中 *arc* 操纵子十分多样化, 在米酒乳杆菌中, 主要包括 *arcA*、*arcB*、*arcC*、*arcT*、*arcD* 和 *arcR* 六个基因 (图 1B), 分别编码酶 ADI、OTC、CK、精氨酸/鸟氨酸逆向运输体、可能的氨基转移酶和调节基因。在肉环境中, 米酒乳杆菌的生存十分依赖 ADI 途径。

另外, 米酒乳杆菌中可能还存在着另一个类似于 *arc* 操纵子的结构, 称作 AgDI 途径^[7]。其主要作用是把胍基丁胺转化为氨基甲酰丁二胺, 丁二胺氨甲酰基转移酶(PTC), 负责把胍基甲酰丁二胺转化为氨甲酰磷酸和丁二胺 (图 1C)。其成员主要包括 6 个基因 (图 1D)。基因 *lsa0067* 产物与 *arcB* 产物的氨基酸序列只有 33% 的同源性, *lsa0070* 产物与 *arcA* 产物的氨基酸序列也只有 57% 的同源性, 但通过聚类分析发现基因 *lsa0067* 产物与已知的丁二胺氨甲酰基转移酶聚合度较好, 而 *lsa0070* 产物与胍基丁胺脱亚胺酶聚合度较

好。

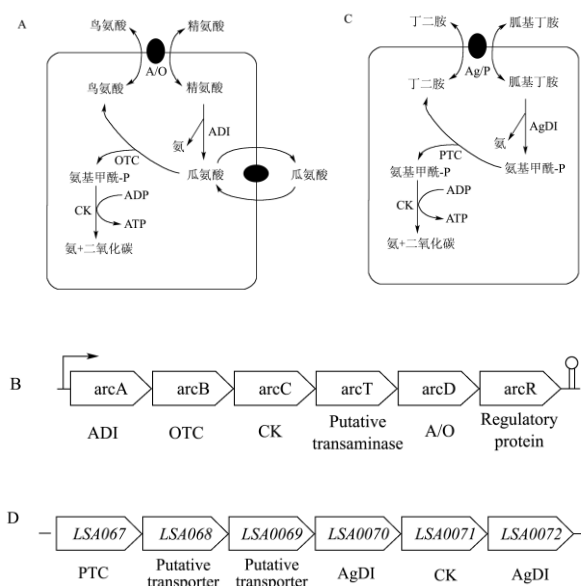


图1 米酒乳杆菌中精氨酸和胍基丁胺代谢的 ADI 途径 (A) 和 AgDI 途径 (C); 米酒乳杆菌中 arc 操纵子 (B) 以及 AgDI 操纵子 (D) 在基因组中的顺序

Fig.1 Catabolic pathways for arginine and agmatine in *L. sakei* through the ADI pathway (A) and AgDI pathway (C), and organization of the arc operon (B) and AgDI operon (D) in *L. sakei*

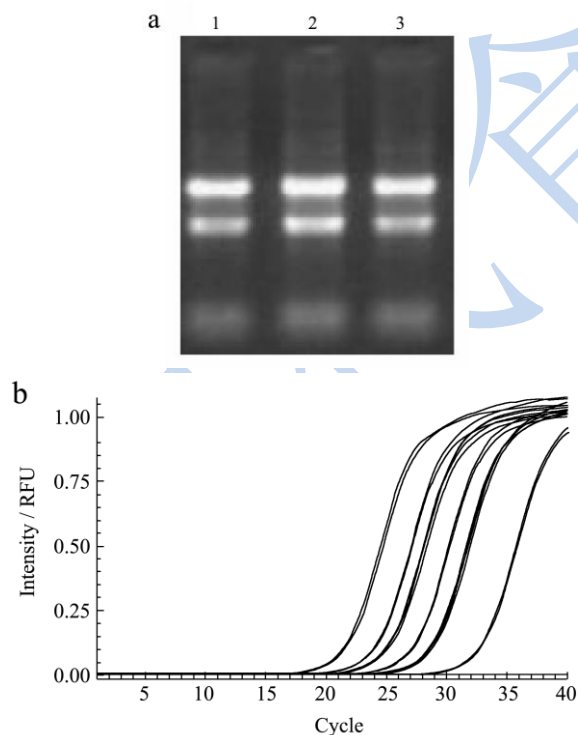


图2 (a) 甲醛变性凝胶电泳鉴定米酒乳杆菌 La22 RNA, 1-3 为三次重复; (b) 定量 PCR 扩增曲线图

Fig.2 (a) Detection of *L. sakei* La22 RNA by agarose-formaldehyde electrophoresis; (b) Amplification curve of qRT-PCR

图 2a 为用甲醛变性凝胶电泳检验米酒乳杆菌 La22 RNA 提取质量。电泳条带清晰, 23S 与 16S 条带亮度接近 1:1, 结果显示所提取的 RNA 可用。图 2b 为部分基因的定量 PCR 扩增曲线图。定量 PCR 理想的扩增效率应在 0.8~1.2 之间, 本次试验研究的基因的扩增效率在 0.85~1.0 之间, 均符合理想的扩增效率, 可用于相应基因的定量解析。

一般来说, 基因差异表达的定义是错误发现率 (FDR) 控制在 5% 以内, 表达差异大于 2 倍的为明显上调, 表达差异小于 0.5 的为明显下调。本试验通过对米酒乳杆菌在添加两种肉类蛋白的环境中 arc 操纵子的转录情况进行研究发现, 与对照相比, 米酒乳杆菌 La22 的 arcA, arcB 和 arcC 基因在添加肌浆蛋白培养基中表达量明显上调, 其它几个基因表达量没有明显变化, 而在添加肌原纤维蛋白的培养基中, 仅有 arcR 的表达量明显上调 (图 3)。另一条可能存在的 AgDI 途径中的 6 个基因在本次试验中并没有检测到其表达量有明显变化。

Fernandez 等对米酒乳杆菌在不同环境中的转录反应进行研究, 在有精氨酸、葡萄糖压力和缺氧的条件下均能诱导米酒乳杆菌表达 arc 操纵子^[8]。McLeod 等发现在添加核糖的培养基中, arcA 的表达量比添加葡萄糖的略有上调, 而 arcC 的表达量略有下调, 但其变化均不明显^[8]。Fernandez 等的研究还发现厌氧条件能刺激米酒乳杆菌表达 arc 操纵子^[8]。Makhlin 等认为 arcR 对于 arc 操纵子的表达是必须的, 但 arcR 基因的缺失并不影响米酒乳杆菌的正常生长^[9]。本试验显示在添加肌浆蛋白和添加肌原纤维蛋白的培养基中 arc 操纵子的表达量与对照相比均有一定程度上调。试验中米酒乳杆菌 La22 在有氧条件下培养, 且 CDM 培养基及添加肉类蛋白的 CDM 培养基中并未添加葡萄糖, 说明在环境中大量的精氨酸存在时, 米酒乳杆菌能利用此能量物质通过 ADI 途径提高其在酸性环境中的存活率。精氨酸转换途径普遍存在于米酒乳杆菌中, 它对菌株适应环境 pH 值起到重要的调节作用。研究显示当 pH 值等于 6.0 时 arc 操纵子的表达量最大, 而偏离此值时表达量减少^[10]。本试验测得随着时间的增加, 添加肌原纤维蛋白的培养基 pH 值下降得更快, 且肌浆蛋白中精氨酸的含量为 26.7 mg/100 mL, 远高于肌原纤维蛋白的 4.6 mg/100 mL, 因此 arc 操纵子在添加肌浆蛋白培养基中的表达量更高。另外 AgDI 途径虽然在某些米酒乳杆菌中存在, 但并不是所有的米酒乳杆菌都需表达该途径来中和环境中的酸。AgDI 途径不需精氨酸诱导, 且可以独立

于 ADI 途径存在, 提示其有可能存在其他的作用^[11]。

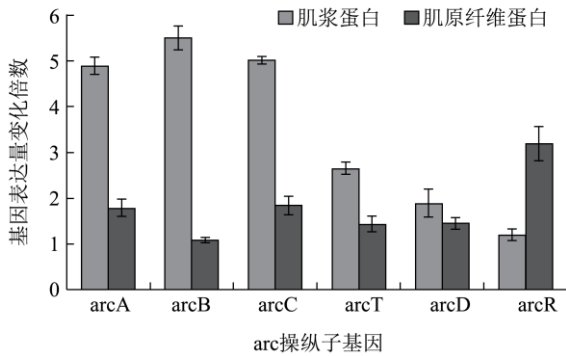


图3 添加不同肉类蛋白对米酒乳杆菌 arc 操纵子表达量的影响

Fig.3 Effects of a meat protein environment on arc operon genes expression of *L. sakei*

2.3 添加不同肉类蛋白对压力反应相关基因表达的影响

米酒乳杆菌之所以能适应多种不同的环境, 如肉类、鱼类和蔬菜, 甚至人类的肠道内, 与其独特的生理生化特性有密切的关系。根据 Genebank 公布的米酒乳杆菌 23K 菌株的基因组序列, 米酒乳杆菌存在多个压力相关基因及其它酶类以应对环境中出现的一些如热、冷等不良刺激因子。米酒乳杆菌 La22 的压力相关基因在添加肉类蛋白环境中的表达量变化如图 4 所示。通过定量 PCR, 本次试对 17 个压力相关基因进行检验, 发现米酒乳杆菌 La22 有 6 个压力相关基因表达量有明显变化。与对照相比, 在添加肉肌浆蛋白的培养基中生长时, UspA 家族的两个基因, *usp2* 和 *usp4*, 均表现出明显上调, 另外基因 *lsa0513* 和 *lsa0791* 也明显上调, 而基因 *lsa0264* 和 Cps 家族的 *csp2* 基因则明显下调。在添加肉肌原纤维蛋白培养基中生长时, 只有 *lsa0513* 和 *usp4* 明显上调。

UspA 家族的基因 (*usp2* 和 *usp4*) 编码类似于压力相关蛋白。压力相关蛋白可以使菌株耐受恶劣的生存环境, 如酸、氧化剂、养份缺乏和高渗透压等。有报导称在植物乳杆菌中, 另一个 UspA 家族的蛋白 Usp1 可以帮助菌株耐受强酸环境^[12]。而 Fadda 等发现在对数生长初期米酒乳杆菌 23K 在添加肉类蛋白的培养基中蛋白 Usp1 的表达量有所下调^[3]。在本试验中, 不同培养基中的菌株均培养至对数生长末期, 环境中 pH 值较低, 且环境中碳水化合物缺乏而蛋白质含量丰富, 可能是导致这两个基因的变化原因。但由于生长期、肉蛋白添加量及菌株的差异导致试验结果与 Fadda 等不一致, 说明 UspA 家族基因的表达变化受多种因素影响。另外, UspA 家族中的各个基因在压

力环境中分别起到什么样的调节作用还有待于进一步的研究。

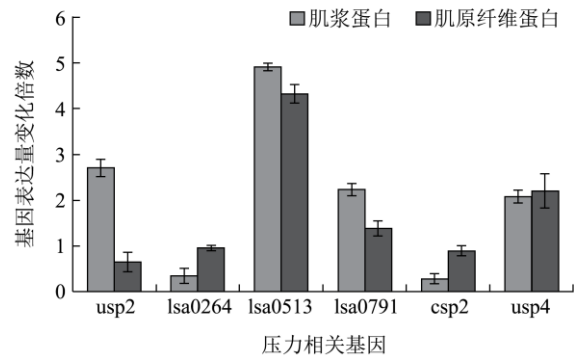


图4 添加不同肉类蛋白对米酒乳杆菌压力相关基因表达量的影响

Fig.4 Effects of a meat protein environment on stress response gene expression of *L. sakei*

基因 *cps2* 编码一种冷激蛋白, 属于 Csp 家族。冷激蛋白 Csp 家族的分布非常广泛, 存在于一些鱼类、植物以及细菌中。Csp 家族的种类、数量及其诱导效率与菌株处理或存放的温度及时间密切相关。同时, 一些研究表明, 低温刺激后 Csp 蛋白的超量表达影响菌体的生长速率, 这种速率的变化因不同菌株而异。通过对三株植物乳杆菌的 *csp* 基因进行研究发现在冷激和非冷激条件下其功能完全不同^[13-14]。目前, 对 Csp 蛋白的诱导机制尚没有定论。本试验对照组与添加肉类蛋白组在同一环境下培养, 添加肉类蛋白组并未受极端温度的影响, 因此该基因表达量的变化有可能是不同蛋白质含量的培养基影响菌株对温度的敏感性, 但目前还没有报道称添加营养物质, 如氮源, 能影响冷激蛋白 Csp 家族的转录及表达, 该基因表达量的变化的具体原因还有待进一步研究。

基因 *lsa0264*、*lsa0513* 和 *lsa0791* 分别编码甘氨酸/三甲基甘氨酸转运蛋白、压力反应转录调节子和“V”型转氨酶。米酒乳杆菌可以通过转运环境中的氨基酸或肽类来满足其对氮源的需求, 基因 *lsa0264* 表达量在添加肉类蛋白的培养基中下调说明米酒乳杆菌优先通过转运和利用肽类来摄取甘氨酸/三甲基甘氨酸, 下调 *lsa0264* 表达量是为了保持其胞内外的平衡。转氨酶基因 *lsa0791* 编码一种半胱氨酸脱硫酶, 其表达量的变化可能与米酒乳杆菌对肉类蛋白中半胱氨酸的利用有关。值得注意的是, 压力反应转录调节子基因 *lsa0513* 在添加肉类蛋白的培养基中表达量上调十分明显, 说明在添加肉类蛋白的培养基中生长, 米酒乳杆菌在压力条件下通过自身的转录调节, 通过对环境能量的选择性利用来提高自身在变化的压力环境下的生存率。

2.4 添加不同肉类蛋白对生境适应相关的ABC转运子基因表达的影响

本试验共检测了24个与氨基酸和肽类转运相关的ABC转运子基因,发现有六个ABC转运子基因参与了米酒乳杆菌在添加肉蛋白培养基中的能量调控,其编码产物中LSA0616属于ATP结合亚单位,LSA0617、LSA0619和LSA1695属于跨膜亚单位,LSA0618和LSA1694属于底物结合前体脂蛋白。六个基因中,除*lsa1694*在添加肌浆蛋白和*lsa1695*在添加肌原纤维蛋白中表达量不明显外,其它与对照相比均明显上调,*lsa0513*上调量最明显,在两种培养基中均上调4倍以上(图5)。

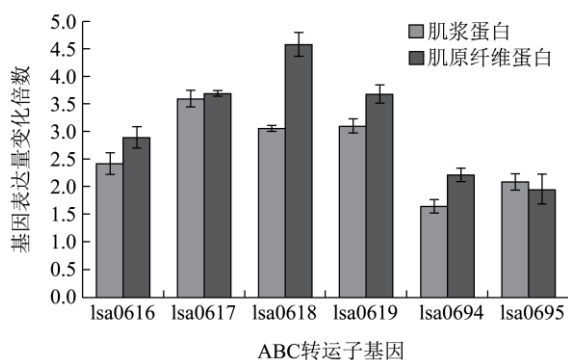


图5 添加不同肉类蛋白对米酒乳杆菌ABC转运子基因表达量的影响

Fig.5 Effects of a meat protein environment on ABC transporter genes expression of *L. sakei*

米酒乳杆菌中的ABC转运子通常会参与细菌改变能量来源、抗渗透和抗冻等情况下的能量调控,而ADI途径将精氨酸转化为鸟氨酸的过程中能产生ATP。因此,ABC转运基因的表达量变化证实了米酒乳杆菌在添加肉类蛋白的环境中生存时需要能量物质参与来抵抗外界压力的影响。

3 结论

总之,对米酒乳杆菌来说,虽然添加不同肉蛋白的培养环境存在一定的生存压力,如较低的pH值,但米酒乳杆菌能通过调节基因表达来提高自身的生存率。但添加肉类蛋白的培养基并不代表一个真正的肉类环境。因此需对米酒乳杆菌适应不同环境压力的机制作进一步研究,对于更好地利用米酒乳杆菌,获得更好的发酵产品具有指导意义。

参考文献

[1] Ravyts F, Barbuti S, Frustoli M A, et al. Competitiveness and

antibacterial potential of bacteriocin-producing starter cultures in different types of fermented sausages [J]. *J. Food Prot.*, 2008, 71(9): 1817-1827

[2] Rimaux T, Vrancken G, Pothakos V, et al. The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 Are pH-dependent [J]. *Food Microbiol.*, 2011, 28(3): 597-604

[3] Fadda S, Anglade P, Baraige F, et al. Adaptive response of *Lactobacillus sakei* 23 K during growth in the presence of meat extracts: a proteomic approach [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 142(1-2): 36-43

[4] McLeod A, Snipen L, Naterstad K, et al. Global transcriptome response in *Lactobacillus sakei* during growth on ribose [J]. *BMC Microbiol.*, 2011, 11: 145

[5] Lauret R, Morel-Deville F, Berthier F, et al. Carbohydrate utilization in *Lactobacillus sakei* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(6): 1922-1927

[6] Rimaux T, Vrancken G, Vuylsteke B, et al. The pentose moiety of adenosine and inosine is an important energy source for the fermented-meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(18): 6539-6550

[7] Naumoff D G, Xu Y, Stalon V, et al. The difficulty of annotating genes: the case of putrescine carbamoyltransferase [J]. *Microbiology*, 2004, 150(12): 3908-3911

[8] Fernandez M, M Zuniga. Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria [J]. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2006, 32(3): 155-183

[9] Makhlin J, Kofman T, Borovok I, et al. *Staphylococcus aureus* arcR controls expression of the arginine deiminase operon [J]. *J. Bacteriol.*, 2007, 189(16): 5976-5986

[10] Rimaux T, Riviere A, Illegheems K, et al. Expression of the arginine deiminase pathway genes in *Lactobacillus sakei* is strain dependent and is affected by the environmental pH [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78(14): 4874-4883

[11] Coton E, M Coton. Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis* [J]. *Food Microbiol.*, 2009, 26(1): 52-57

[12] Gury J, Seraut H, Tran N P, et al. Inactivation of PadR, the repressor of the phenolic acid stress response, by molecular interaction with Usp1, a universal stress protein from *Lactobacillus plantarum*, in *Escherichia coli* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75(16): 5273-5283

[13] Derzelle S, Hallet B, Ferain T, et al. Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in

lactobacillus plant arum over producing cold-shock proteins
[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(7): 4285-4290

Bacteria [J]. China Dairy Industry, 2013, 41(10): 18-22

[14] 刘彩虹,邵玉宇,高姝冉,等.冷应激蛋白(CSPs)对乳酸菌
抗冷冻性的影响[J].中国乳品工业,2013,41(10):18-22

LIU Cai-hong, SHAO Yu-yu, GAO Shu-ran, et al. Effect of
cold shock proteins (csps) on cryotolerance of the *Lactic Acid*

