

碳源对凝结芽孢杆菌耐酸特性的影响及其机制研究

李长福¹, 吴影^{1,2,3}, 周子吕¹, 曹力^{1,3}, 王大红^{1,2}, 古绍彬^{1,2,3*}

1(河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳, 471023) 2(河南省食品微生物工程技术研究中心, 河南 洛阳, 471023)

3(食品加工与安全国家级实验教学示范中心, 河南 洛阳, 471023)

摘要 为分析食物中重要碳水化合物对益生菌生物学特性的影响, 研究了不同碳水化合物形式与益生凝结芽孢杆菌耐酸特性间的关系。在 pH 3.5 酸胁迫下, 以单糖、二糖及有机酸等为碳源, 研究其对菌体耐酸特性的影响。结果表明, 以果糖为碳源时, 菌体耐酸能力比对照组提高了 21%, 是有机酸组的 27.84 倍, 乳糖组的 35.63 倍; 进一步研究发现, 以果糖为碳源时, 胞内 ATP 含量达到了 5.818 1 $\mu\text{mol/g prot}$, 是对照组 1.95 倍; 十七烷酸和总不饱和脂肪酸含量显著提高, 达到 61.87% 和 26.49%; 与菌体耐酸能力密切相关的 Glu、Arg、Asp、Lys 等胞内含量也急剧增加。不同碳源由于进入细胞后代谢途径不同, 引起与酸耐受直接相关的能量水平、细胞膜脂组成, 胞内氨基酸代谢等发生了显著变化, 导致菌体耐酸能力存在明显差异。因此, 不同碳源对益生菌耐酸特性具有显著影响, 该研究为分析不同营养环境下菌体耐酸机制奠定了基础。

关键词 凝结芽孢杆菌; 脂肪酸; 耐酸能力; 氨基酸; 三磷酸腺苷

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)是一种能产乳酸的革兰氏阳性菌, 生长繁殖迅速, 兼具乳酸菌和芽孢杆菌的诸多益生特性^[1]。凝结芽孢杆菌芽孢具有的优良抗逆性使其可广泛应用于食品加工中, 并能简化益生菌产品的存储运输条件以及延长货架期^[2]。益生菌要发挥其益生功能须能经过极端酸环境的胃部到达弱酸环境(pH 4~6)的肠道内进行生长繁殖, 并保持足够的活菌数^[3]。人体胃液主要成分为胃酸, pH 受个人身体状况和饮食习惯影响, 其空腹 pH 值约为 2, 进食后由于稀释作用可升至 3.5^[4]。食物进入胃部后停留时间为 1~3 h, 只有极少部分能够抵抗极端酸环境的微生物才能通过胃部发挥益生作用^[5]。绝大多数的微生物因为缺乏耐受低 pH 环境的相关调节机制, 在经胃部酸环境时大量 H⁺ 进入菌体细胞, 引起细胞酸化, 进而影响细菌正常生长与代谢, 导致菌体死亡。

研究发现, 营养组成和培养条件对微生物的耐酸能力有显著影响^[6]。菌体细胞在酸性环境下保持胞内 pH 稳态的一个重要调节途径是细胞膜对 H⁺ 的低透性。细菌受到酸环境刺激后细胞膜脂成分会发生相应变化以抵御不良环境造成的影响。吴重德等^[7]发现细胞膜中不饱和脂肪酸比例增加以及平均碳链增长会降

低细胞膜的流动性, 有利于细胞将过多的 H⁺ 阻挡在胞外, 维持胞内 pH 稳态, 从而诱发干酪乳杆菌耐酸能力的变化。陈霞等^[8]研究发现 H⁺-ATPase 与干酪乳杆菌耐酸性有关, 一些阳离子转运 ATP 酶(如 K⁺-ATP 酶)可通过细胞 H⁺ 和 K⁺ 的交换, 维持细胞内 pH 的稳定^[9]。谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、精氨酸(Arg)、 γ -氨基丁酸(GABA)、鸟氨酸(Orn)、天冬氨酸(Asp)、赖氨酸(Lys)等胞内氨基酸水平发生变化, 被认为是微生物耐酸能力变化的主要代谢表征^[3, 10-12]。

碳水化合物(碳源)是食物中三大营养成分之一, 其进入肠道后也是肠道微生物生长代谢过程中合成细胞碳架及为细胞生命活动提供能量的重要营养物质^[13]。不同的碳水化合物及其分解产物, 在肠道中与益生菌等肠道微生物接触时, 是否影响微生物生长代谢行为及益生特性呢? 众所周知, 由于基质不同, 所诱导微生物产生的代谢酶系也存在显著差异, 形成的代谢产物也可能存在较大差异, 进而诱发菌体呈现出不同的生理及代谢特征。本研究旨在通过实施胞外碳源扰动实验, 分析凝结芽孢杆菌在酸胁迫下生理代谢的响应情况及耐酸能力变化情况, 初步揭示碳源变化与菌体耐酸性能间的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans* CGMCC 9951), 实验室分离保藏菌株。

第一作者: 硕士研究生(古绍彬教授为通讯作者, E-mail: shaobingu@haust.edu.cn)。

基金项目: 河南省自然科学基金项目(182300410066); 河南省科技攻关项目(162102210199)

收稿日期: 2019-08-07, 改回日期: 2019-09-15

液体培养基(g/L):葡萄糖 15,蛋白胨 15,酵母粉 10, MgSO_4 5, pH 8.0。固体培养基再添加 20 g/L 的琼脂粉。

不同碳源酸性培养基:以液体培养基为基础将葡萄糖替换为其他相同质量体积比(g:L)的碳源(蔗糖、乳糖、麦芽糖、柠檬酸、果糖),用稀盐酸将 pH 调至 pH 3.5。

ATP 含量试剂盒、总蛋白定量测试盒(BCA 法):南京建成生物工程研究所;37 种脂肪酸混标:上海安谱实验科技股份有限公司;42 种游离氨基酸混标:德国曼默博尔公司。

1.2 仪器与设备

7890A 型气相色谱仪(配 FID 氢火焰检测器),美国安捷伦科技有限公司;A300 型全自动氨基酸分析仪,德国曼默博尔公司;UV2100 型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 凝结芽孢杆菌 CGMCC9951 的培养

将冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的凝结芽孢杆菌 CGMCC 9951 接种到培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 16~20 h,活化传代 2 次,备用。

1.3.2 不同碳源耐酸性能检测

取活化好的菌液,离心洗涤 3 次后用相同体积生理盐水重悬。按 3% 接种量分别接种于不同碳源的酸性培养基中,培养 3 h,然后取样采用平板稀释涂布法进行涂布计数。

1.3.3 胞内氨基酸测定

取 20 mL 活化好的菌液,离心洗涤后加入不同碳源的酸性培养基中培养 3 h,然后用磷酸缓冲液离心洗涤(3 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min)3 次,弃上清重悬于 1 mL 相同缓冲液中。沸水浴 15 min,离心(112 40 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min),取上清 800 μL ,加 200 μL 100 g/L 磺基水杨酸,混合均匀。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 60 min,14 500 r/min 冷冻离心 15 min,取上清相同操作离心 5 min,用样品稀释液等比例稀释后经 0.22 μm 过滤器过滤后上机分析。氨基酸含量表示为每克细胞(干重)所含氨基酸数, $\mu\text{g/g}$ 。

1.3.4 ATP 含量测定

根据 ATP 含量测定试剂盒所提供的试验方法和步骤测定凝结芽孢杆菌酸培养 3 h 后胞内 ATP 的含量。ATP 含量表示为 $\mu\text{mol/g prot}$ 。

1.3.5 细胞膜脂肪酸测定前处理

取 20 mL 活化好的菌体,加入不同碳源酸性培养基中培养 3 h,然后用超纯水离心洗涤(10 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min)3 次,弃上清后向沉淀中加入 1.5 mL

1 mol/L 甲醇钠振荡 1.5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min,加入 1 mL 正己烷,振荡 1 min,静置 5 min,取上层有机相过膜后上机测定细胞膜脂肪酸。碳链长度参考文献[7]的方法进行。

1.3.6 气相色谱检测

采用安捷伦 7890A 型气相色谱仪。色谱柱:HP-88 毛细管柱(60 m \times 0.25 mm, 0.20 μm);升温程序:程序升温至 $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min,以 $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升至 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min,然后 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 $196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min,最后 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min;载气 N_2 ,进样量 1 μL 。定性采用标准品对照法,定量采用面积归一化法。

1.4 数据处理

图表采用 OriginPro 2017 软件绘制,数据采用 IBM SPSS Statistics 22 软件进行统计分析,多重比较采用 Duncan 新复极差法分析。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对酸胁迫下凝结芽孢杆菌存活的影响

如图 1 所示,酸胁迫下,添加不同碳源的凝结芽孢杆菌耐酸能力依次是:果糖 > 葡萄糖 > 蔗糖 > 麦芽糖 > 柠檬酸 > 乳糖。其中,以果糖作为碳源时,菌体的耐酸能力与对照组相比提高了 21%,是蔗糖组的 1.69 倍,柠檬酸组的 27.84 倍,乳糖组的 35.63 倍。杨郁等^[6]研究发现,在人工胃液中添加葡萄糖后,干酪乳杆菌 T-32 的存活率比未添加葡萄糖的对照组提高了 118.10 倍。郭泽镔^[14]研究发现,在 pH 2.5 酸性处理 3 h 的条件下,超高压处理后的莲子淀粉可使双歧杆菌存活率由葡萄糖组的 61.31% 提高至 72.84%。由此可见,碳源种类对菌体的耐酸能力有直接影响。可能由于不同碳源进入细胞后诱导微生物产生的代谢酶系存在显著差异,其在胞内的代谢途径及形成的代谢产物也存在较大差异,引起与酸耐受直接相关的能量代谢水平,细胞膜脂组成,胞内氨基酸代谢等的显著变化,从而使菌体酸耐受能力发生改变。

2.2 不同碳源对酸胁迫下凝结芽孢杆菌胞内 ATP 含量的影响

碳源为微生物的生命活动提供所需的能量。有报道指出乳酸菌在酸性环境中可利用质子泵 $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ 消耗能量 ATP 排出胞内 H^+ ,维持胞质 pH 正常^[11]。酸胁迫下,不同碳源对凝结芽孢杆菌胞 ATP 含量的影响如图 2 所示,以蔗糖和果糖作为碳源时,胞内 ATP 含量较高,分别达到了 6.925 0 $\mu\text{mol/g prot}$

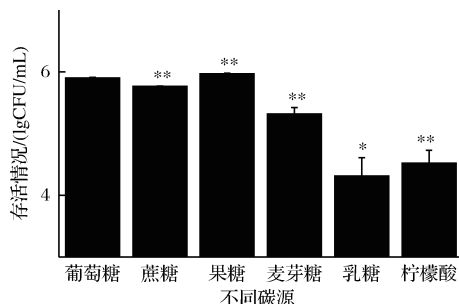


图1 不同碳源对酸胁迫下凝结芽孢杆菌存活的影响

Fig.1 Effects of different carbon sources on the survival of *Bacillus coagulans* under acids tress

注:“*”代表差异显著, $P < 0.05$;“**”代表差异极显著, $P < 0.01$ 。

和 $5.818 \text{ 1 } \mu\text{mol/g prot}$, 柠檬酸组 ATP 含量最低, 为 $0.828 \text{ 2 } \mu\text{mol/g prot}$ 。其中果糖组 ATP 含量是葡萄糖组 1.95 倍, 是柠檬酸组 7.02 倍。由于蔗糖水解为葡萄糖和果糖后分别进入葡萄糖代谢途径和果糖代谢途径, 果糖代谢不经过糖酵解途径中由磷酸果糖激酶 (EC:2.7.1.11) 催化的限速反应步骤, 同时 1-磷酸果糖是丙酮酸激酶 (EC:2.7.1.40) 的激动剂, 产生大量的 ATP^[15]。半乳糖则需经 5 步反应才能生成葡萄糖-6-磷酸, 产生 ATP, 因此 ATP 生成速率受到一定影响。尽管柠檬酸是三羧酸循环中的中间物质, 但实验结果显示, 在所有碳源中柠檬酸所产生的 ATP 含量最低, 主要是高浓度的柠檬酸对菌体产生明显的抑菌作用^[16]。KOPONEN 等^[11]研究发现, 在酸胁迫下, 乳酸菌 F_0F_1 -ATPase 酶中 F_1 复合体的全部或部分亚单位表达均上调。KULLEN 等^[17]证实, pH 3.5 的酸胁迫处理嗜热乳杆菌 60 min, 可使嗜热乳杆菌 F_0F_1 -ATPase 转录水平提高约 2 倍。因此, 酸胁迫下, 高水平的 F_0F_1 -ATPase 表达量和高浓度的 ATP 能量水平对维持胞内稳定的 pH 环境, 提高菌体耐酸能力具有重要作用; 不同碳源由于其代谢方式不同, 产生 ATP 的含量和速率有一定差异, 进而影响菌体对酸胁迫的耐受能力。

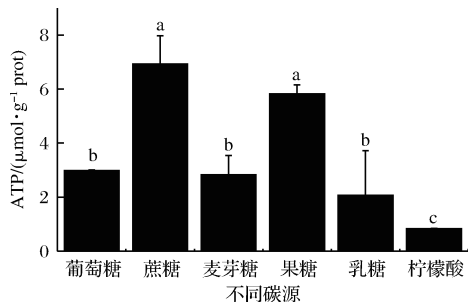


图2 不同碳源对酸胁迫下凝结芽孢杆菌胞内 ATP 含量的影响

Fig.2 Effects of different carbon sources on intracellular ATP content of *Bacillus coagulans* under acid stress

注:图中不同小写字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

2.3 不同碳源对酸胁迫下凝结芽孢杆菌膜脂组成的影响

脂肪酸是细胞膜的重要组成成分, 脂肪酸的比例以及饱和度等对细胞膜的流动性和通透性具有显著影响^[18], 而细胞膜的流动性和通透性对细胞的新陈代谢和维持细胞稳定的内环境发挥着至关重要的作用。表1为酸胁迫下不同碳源对凝结芽孢杆菌细胞膜脂肪酸组成及百分含量, 与正常培养 (pH 8.0) 的对照组相比, 酸胁迫组的脂肪酸组成发生了较大变化, 其中以果糖、乳糖等为碳源时, 十七烷酸百分含量分别增加至 61.87% 和 61.70%, 总饱和脂肪酸 (SFA) 百分含量分别下降为 73.51% 和 73.67%, 总不饱和脂肪酸 (UFA) 百分含量分别上升至 26.49% 和 26.33%, SFA/UFA 比值下降至 2.77 和 2.80, 平均碳链长度分别增长至 16.18 和 16.17。BROWN 和杨扬等^[19-20]发现, 十七烷酸含量的显著增加能够提高大肠杆菌耐酸能力及抗高密度二氧化碳 (DPCD) 胁迫。吴重德等^[7]证实酸胁迫下酪乳杆菌 45 min 后, 细胞膜脂碳链长度由 15.55 增加至 16.53。SCHOUG 等^[21]观察到棒状乳杆菌 pH 值从 5.5 降至 4.5 后, SFA/UFA 比值由 0.86 下降至 0.51, 可减少由酸胁迫引起的氧应激对细胞产生的损伤^[7]。杨旭^[22]研究发现, 脂肪酸平均碳链长度增长将有助于双歧杆菌提高酸抵抗能力, 主要是由于长链更容易跨越磷脂双分子层使膜趋于凝胶状, 从而促使细胞膜流动性降低。因此, 酸胁迫后细菌凝结芽孢杆菌细胞膜 SFA/UFA 比值下降及平均碳链长度增长, 都导致细胞膜的流动性降低, 从而有利于细胞将过多的 H^+ 阻挡在胞外, 维持胞内 pH 稳态。

2.4 不同碳源对酸胁迫下凝结芽孢杆菌胞内氨基酸含量的影响

研究发现, 胞内较高的 Glu、Gln、Arg、Orn 等氨基酸水平对提高微生物抵御环境胁迫的能力及调控胞内 pH 稳定等具有重要作用^[23]。酸胁迫下, 不同碳源对凝结芽孢杆菌胞内氨基酸水平的影响如表2所示, 以果糖为碳源时, 与酸耐受性相关的 6 种氨基酸 Glu、Gln、Arg、Orn、Asp 和 Lys 的含量均显著高于其他 5 组 ($P < 0.05$), 分别达到了 597.23、44.30、167.16、127.98、178.46 和 409.05 $\mu\text{g/g}$ 。蔗糖组中, 上述 6 种氨基酸含量均显著高于麦芽糖、柠檬酸和乳糖组。而当以乳糖为碳源时, Asp、Arg、Lys 含量最低, 仅为 54.94、69.24 和 158.75 $\mu\text{g/g}$ 。结合图1结果分析, 不难发现, 不同碳源条件下, 菌体耐酸能力与上述氨

基酸的胞内水平呈现明显相关性。

表 1 不同碳源对酸胁迫下凝结芽孢杆菌膜脂组成的影响

脂肪酸	脂肪酸百分含量/%						
	葡萄糖 (pH 8.0)	葡萄糖 (pH 3.5)	蔗糖 (pH 3.5)	麦芽糖 (pH 3.5)	果糖 (pH 3.5)	乳糖 (pH 3.5)	柠檬酸 (pH 3.5)
C6:0	0.23 ± 0.01 ^{bc}	0.24 ± 0.00 ^{bc}	0.30 ± 0.05 ^{abc}	0.24 ± 0.04 ^{bc}	0.23 ± 0.06 ^c	0.37 ± 0.02 ^a	0.32 ± 0.02 ^{ab}
C8:0	0.27 ± 0.00	—	—	—	—	—	—
C14:0	1.79 ± 0.00 ^a	1.01 ± 0.04 ^b	0.99 ± 0.03 ^{bcd}	0.97 ± 0.00 ^{bcd}	1.00 ± 0.01 ^{bc}	0.95 ± 0.01 ^d	0.97 ± 0.00 ^{cd}
C14:1	21.41 ± 0.08 ^c	21.93 ± 0.19 ^{ab}	21.91 ± 0.04 ^{ab}	22.03 ± 0.06 ^a	21.99 ± 0.13 ^{ab}	21.77 ± 0.02 ^b	21.85 ± 0.02 ^{ab}
C15:1	0.94 ± 0.01 ^a	0.87 ± 0.14 ^a	0.89 ± 0.04 ^a	0.89 ± 0.04 ^a	0.85 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	0.87 ± 0.01 ^a
C16:0	11.77 ± 0.05 ^a	9.15 ± 0.04 ^b	8.97 ± 0.17 ^{bc}	8.88 ± 0.00 ^c	8.87 ± 0.01 ^c	9.13 ± 0.01 ^b	9.01 ± 0.10 ^{bc}
C16:1	2.99 ± 0.02 ^a	2.82 ± 0.06 ^b	2.79 ± 0.00 ^b	2.80 ± 0.01 ^b	2.76 ± 0.04 ^b	2.80 ± 0.02 ^b	2.80 ± 0.01 ^b
C17:0	59.00 ± 0.13 ^c	61.46 ± 0.24 ^b	61.69 ± 0.02 ^{ab}	61.88 ± 0.03 ^a	61.87 ± 0.01 ^a	61.70 ± 0.01 ^{ab}	61.64 ± 0.25 ^{ab}
C18:0	0.90 ± 0.00 ^b	1.68 ± 0.16 ^a	1.53 ± 0.01 ^a	1.52 ± 0.11 ^a	1.54 ± 0.06 ^a	1.52 ± 0.00 ^a	1.63 ± 0.00 ^a
C18:1T	0.43 ± 0.00 ^b	0.48 ± 0.05 ^{ab}	0.49 ± 0.00 ^{ab}	0.49 ± 0.01 ^{ab}	0.52 ± 0.00 ^a	0.53 ± 0.03 ^a	0.52 ± 0.03 ^a
C18:1	0.29 ± 0.00 ^a	0.35 ± 0.02 ^a	0.43 ± 0.00 ^a	0.30 ± 0.01 ^a	0.37 ± 0.06 ^a	0.39 ± 0.00 ^a	0.39 ± 0.13 ^a
SFA	73.95 ± 0.06 ^a	73.54 ± 0.08 ^b	73.48 ± 0.08 ^b	73.49 ± 0.04 ^b	73.51 ± 0.10 ^b	73.67 ± 0.01 ^b	73.57 ± 0.13 ^b
UFA	26.05 ± 0.06 ^b	26.46 ± 0.08 ^a	26.52 ± 0.08 ^a	26.51 ± 0.04 ^a	26.49 ± 0.10 ^a	26.33 ± 0.01 ^a	26.43 ± 0.13 ^a
SFA/UFA	2.83 ± 0.0093 ^a	2.78 ± 0.01 ^b	2.77 ± 0.01 ^b	2.77 ± 0.01 ^b	2.77 ± 0.01 ^b	2.80 ± 0.00 ^b	2.78 ± 0.02 ^b
平均碳链长度	16.10 ± 0.00 ^b	16.17 ± 0.01 ^a	16.17 ± 0.01 ^a	16.17 ± 0.01 ^a	16.18 ± 0.00 ^a	16.17 ± 0.00 ^a	16.17 ± 0.00 ^a

注：C6:0,己酸；C8:0,辛酸；C14:0,肉豆蔻酸；C14:1,肉豆蔻烯酸；C15:1,十五碳烯酸；C16:0,棕榈酸；C16:1,棕榈油酸；C17:0,十七烷酸；C18:0,硬脂酸；C18:1T,反油酸；C18:1,油酸；SFA,饱和脂肪酸；UFA,不饱和脂肪酸；“—”表示未检出；同行不同字母表示差异显著水平($P < 0.05$)。下同。

表 2 不同碳源对酸胁迫下凝结芽孢杆菌胞内氨基酸含量的影响

氨基酸	氨基酸含量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)					
	葡萄糖	蔗糖	果糖	乳糖	麦芽糖	柠檬酸
P-Ser	68.06 ± 1.75 ^b	64.68 ± 0.63 ^b	78.96 ± 6.55 ^a	50.70 ± 0.58 ^c	56.13 ± 1.77 ^c	55.35 ± 3.67 ^c
Tau	44.76 ± 0.16 ^a	41.09 ± 0.13 ^b	44.79 ± 0.60 ^a	40.32 ± 2.32 ^b	40.46 ± 0.63 ^b	40.64 ± 1.10 ^b
Asp	99.68 ± 3.38 ^b	91.69 ± 0.00 ^b	178.46 ± 1.74 ^a	54.94 ± 5.60 ^d	68.29 ± 0.91 ^c	64.94 ± 0.92 ^c
Thr	66.89 ± 1.81 ^b	54.10 ± 1.57 ^c	91.18 ± 2.58 ^a	28.37 ± 3.35 ^e	35.76 ± 2.01 ^d	27.30 ± 0.03 ^e
Ser	53.80 ± 4.56 ^b	48.15 ± 0.81 ^b	88.40 ± 9.68 ^a	32.02 ± 1.81 ^c	36.68 ± 3.38 ^c	32.40 ± 0.34 ^c
Asn	48.36 ± 2.74 ^b	50.45 ± 1.63 ^b	64.99 ± 2.13 ^a	21.60 ± 0.91 ^{cd}	25.18 ± 0.95 ^c	16.53 ± 2.69 ^d
Glu	420.21 ± 10.57 ^b	415.57 ± 10.62 ^b	597.23 ± 13.03 ^a	139.81 ± 2.37 ^d	185.25 ± 9.09 ^c	97.77 ± 1.56 ^e
Gln	30.83 ± 2.69 ^b	26.37 ± 0.30 ^c	44.30 ± 0.80 ^a	9.52 ± 1.75 ^d	12.26 ± 1.91 ^d	4.66 ± 0.19 ^e
Gly	40.67 ± 4.63 ^b	36.85 ± 1.40 ^b	66.39 ± 4.70 ^a	19.69 ± 1.38 ^{cd}	22.02 ± 2.29 ^c	17.16 ± 1.24 ^d
Ala	94.61 ± 9.14 ^b	86.34 ± 3.60 ^b	154.31 ± 6.41 ^a	49.55 ± 3.64 ^d	59.26 ± 1.23 ^c	45.66 ± 0.93 ^d
Cit	24.82 ± 5.83 ^b	27.60 ± 1.09 ^b	36.48 ± 1.05 ^a	11.40 ± 2.70 ^c	14.41 ± 1.44 ^c	4.43 ± 1.52 ^d
Val	87.14 ± 2.67 ^b	87.75 ± 5.27 ^b	138.49 ± 2.66 ^a	59.89 ± 10.83 ^c	67.90 ± 1.30 ^c	64.45 ± 3.70 ^c
(Cys) ₂	162.07 ± 6.97 ^{ab}	168.16 ± 8.28 ^{ab}	168.08 ± 3.22 ^a	160.44 ± 1.41 ^{ab}	157.19 ± 3.56 ^b	171.59 ± 0.23 ^a
Met	66.68 ± 2.55 ^b	62.02 ± 5.97 ^b	75.55 ± 1.46 ^a	44.90 ± 3.46 ^c	47.83 ± 1.07 ^c	43.28 ± 1.51 ^c
Ile	40.58 ± 1.20 ^c	46.33 ± 5.14 ^b	53.16 ± 4.33 ^a	36.06 ± 5.10 ^c	36.31 ± 1.86 ^c	39.19 ± 2.03 ^c
Leu	129.61 ± 0.57 ^b	145.56 ± 13.08 ^a	161.15 ± 19.40 ^a	108.46 ± 13.12 ^c	120.37 ± 4.78 ^{bc}	121.13 ± 4.76 ^{bc}
Tyr	44.32 ± 0.38 ^b	45.80 ± 3.34 ^b	60.10 ± 4.31 ^a	33.76 ± 2.24 ^c	37.52 ± 3.28 ^c	35.82 ± 0.89 ^c
Phe	118.33 ± 15.94 ^b	112.40 ± 3.81 ^b	156.23 ± 4.59 ^a	89.86 ± 9.53 ^c	100.05 ± 6.00 ^c	98.42 ± 7.28 ^c
GABA	76.71 ± 0.63 ^a	78.67 ± 0.07 ^a	71.25 ± 2.99 ^{bc}	70.65 ± 4.29 ^c	74.72 ± 1.83 ^{ab}	71.65 ± 2.71 ^{bc}
3Mehis	47.81 ± 2.39 ^b	47.60 ± 0.55 ^b	72.64 ± 2.41 ^a	33.96 ± 1.96 ^c	33.30 ± 0.45 ^c	32.09 ± 1.43 ^c
Trp	60.01 ± 1.95 ^c	70.38 ± 1.03 ^{ab}	77.95 ± 8.64 ^a	56.81 ± 9.68 ^c	64.89 ± 2.18 ^{bc}	72.00 ± 4.72 ^{ab}
Ans	152.22 ± 14.50 ^a	137.98 ± 7.68 ^{ab}	126.96 ± 3.67 ^b	124.04 ± 18.43 ^b	138.20 ± 0.27 ^{ab}	138.50 ± 10.59 ^{ab}
Orn	98.21 ± 7.64 ^b	86.99 ± 2.54 ^c	127.98 ± 2.09 ^a	63.17 ± 1.07 ^{de}	67.51 ± 1.47 ^d	58.91 ± 2.45 ^e
Lys	254.35 ± 19.37 ^b	242.80 ± 5.88 ^b	409.05 ± 22.51 ^a	158.75 ± 10.43 ^c	185.53 ± 4.85 ^c	160.36 ± 2.19 ^c
Arg	99.71 ± 4.23 ^b	103.91 ± 8.52 ^b	167.16 ± 6.34 ^a	69.24 ± 8.26 ^d	84.44 ± 4.95 ^c	81.51 ± 5.03 ^c

细菌中 88% 的氮源来源于 Glu, 其余则来源于 Gln^[22]。Glu 经谷氨酸脱羧酶(*gadA/B*)消耗 H^+ 催化生成碱性氨基酸 GABA, GABA 通过反向转运蛋白 *GadC* 外排至胞外提高环境 pH, 帮助菌体抵御酸环境^[24]。Gln 则可被酸激活的谷氨酰胺酶转化为 Glu 和 NH_3 , NH_3 结合胞内过多的 H^+ 形成 NH_4^+ , 维持胞内 pH 稳态^[12]。WU 等^[3]研究发现在 pH 3.3 的酸性条件下, 分别添加 50 mmol/L 的 Asp 和 Arg, 干酪乳杆菌的存活率提高了 1.36 倍和 2.10 倍。袁峥^[24]证实, 精氨酸可经脱亚胺酶途径(*arginine deiminase*, ADI)和脲酶途径生成 NH_3 来调节胞内 pH 环境, 提高菌体的酸耐受能力。在 ADI 途径中精氨酸利用脱氨酶、鸟氨酸氨基甲酰转移酶和氨甲酸酯激酶, 将 Arg 转化为 Orn、 NH_3 和 CO_2 , 同时生成 ATP, 产生的 ATP 还可以用于 H^+ -ATPase 将胞内过多的 H^+ 泵出胞外, 减小酸环境压力^[11]。在脲酶途径中, Arg 被精氨酸酶分解成 Orn 和尿素, 尿素经脲酶水解 NH_3 和 CO_2 , 进而维持胞内 pH 稳态^[25]。Asp 不仅可与 H^+ 结合形成丙氨酸(Ala), 还可生成 Arg 从而进入 ADI 途径, 提高耐酸能力^[3]。赖氨酸可以通过赖氨酸脱羧酶分解为尸胺和 CO_2 增强菌体耐酸能力^[10]。本研究中由于不同碳源在凝结芽孢杆菌胞内代谢方式不同, 产生的氨基酸, 尤其是与酸耐受能力相关的氨基酸种类和含量差异较大, 进而导致菌体耐酸特性差异显著。

3 结论

研究发现, 在酸性环境下, 不同碳源可通过影响凝结芽孢杆菌 CGMCC9951 细胞膜成分及组成比例, 增加十七烷酸和总不饱和脂肪酸含量, 提高胞内 ATP 含量, 产生更高水平的与耐酸相关氨基酸(如 Glu、Arg、Asp、Lys)等方式提高凝结芽孢杆菌耐酸能力。同时还发现, 由于果糖代谢可不经磷酸果糖激酶催化的限速反应, 且 1-磷酸果糖是丙酮酸激酶的激动剂, 从而加速果糖在体内的代谢速率, 这对提高菌体的耐酸能力具有重要作用。因此, 在使用凝结芽孢杆菌时, 辅以果糖或含有果糖的食物可大幅度提高凝结芽孢的酸抵抗能力, 这将有利于其进入肠道发挥益生作用。

此外, 大量实验研究证实酸胁迫使菌体产生应激蛋白, 同时菌体通过质子泵排出 H^+ 和产生碱性物质中和胞内过多的 H^+ 过程均需要特定酶的参与来完成; 有关凝结芽孢杆菌在酸性环境下哪种应激蛋白、

伴侣蛋白和产碱酶参与耐酸调控, 这都将是本研究在后续工作中持续关注的问题。

参 考 文 献

- [1] 董惠钧, 姜俊云, 郑立军, 等. 新型微生态益生菌凝结芽孢杆菌研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 292 - 294.
- [2] MAJEED M, MAJEED S, NAGABHUSHANAM K, et al. Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(4): 894 - 901.
- [3] WU C, 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 & Biotechnology, 2012, 39(2): 707 - 722.
- [4] 赵小茜, 魏旭丹, 陈戴玲, 等. 产多糖植物乳杆菌的耐酸耐胆盐能力[J]. 乳业科学与技术, 2016, 39(3): 1 - 3.
- [5] 熊涛, 刘妍妍, 黄涛, 等. 副干酪乳杆菌 NCU622 耐酸耐胆盐及其黏附性能[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 93 - 98.
- [6] 杨郁, 张丽靖, 天知诚吾. 乳酸菌耐酸机理的研究[J]. 食品工程, 2007(4): 42 - 45.
- [7] 吴重德, 何桂强, 张娟, 等. 酸胁迫对干酪乳杆菌细胞膜生理特性的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 122 - 125.
- [8] 陈霞, 孙志宏, 张文弈, 等. 酸胁迫对干酪乳杆菌 H^+ -ATP 酶基因表达的影响[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 479 - 482.
- [9] VAN D G M, SERRA P, CHERVAUX C, et al. Stress responses in lactic acid bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 82(1-4): 187 - 216.
- [10] DIEZ-GONZALEZ F, KARAI BRAHIMOGLU Y. Comparison of the glutamate-, arginine- and lysine-dependent acid resistance systems in *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 96(6): 1 237 - 1 244.
- [11] KOPONEN J, LAAKSO K, KOSKENNIEMI K, et al. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(4): 1 357 - 1 374.
- [12] LU P, MA D, CHEN Y, et al. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia[J]. Cell Res, 2013, 23(5): 635 - 644.
- [13] 赵丽娜. 凝结芽孢杆菌的筛选及高密度培养工艺研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2017.

- [14] 郭泽斌. 超高压处理对莲子淀粉结构及理化特性影响的研究[D]. 福州:福建农林大学, 2014.
- [15] 韩金祥,赵乃倩,王丽. 果糖诱导肥胖和内脏脂肪蓄积的研究进展[J]. 生命科学, 2017,29(8):790-796.
- [16] 陈南南,徐歆,商丰才,等. 不同防腐剂对3种模式腐败菌抑菌效果的比较[J]. 食品科学, 2011,32(1):14-18.
- [17] KULLEN M J, KLAENHAMMER T R. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F_1F_0 -ATPase (*atp-BEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: Gene structure, cloning and characterization[J]. Molecular microbiology, 1999,33(6):1 152-1 161.
- [18] HUANG R, PAN M, WAN C, et al. Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress[J]. Journal of Dairy Science, 2016,99(2):1 002-1 010.
- [19] BROWN J L, ROSS T, MCMEEKIN T A, et al. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance[J]. International journal of food microbiology, 1997,37(2-3):163-173.
- [20] 杨扬,李欣,饶伟丽,等. 高密度二氧化碳诱变的大肠杆菌突变菌株脂肪酸及蛋白质组分析[J]. 中国食品学报, 2016,16(5):188-195.
- [21] SCHOUG Å, FISCHER J, HEIPIEPER H J, et al. Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008,35(3):175-181.
- [22] 杨旭. 长双歧杆菌和短双歧杆菌的耐酸机制研究[D]. 上海:上海交通大学, 2015.
- [23] 田喜梅. 植物乳杆菌 ZDY 2013 的耐酸机制研究及其谷氨酸脱氢酶基因的克隆表达[D]. 南昌:南昌大学, 2016.
- [24] 袁峥. 嗜酸乳杆菌耐酸机理研究[D]. 洛阳:河南科技学院, 2013.
- [25] COTTER P D, HILL C. Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH[J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews Mmbr, 2003,67(3):429-453.

Effect and mechanisms of carbon sources on acid tolerance of *Bacillus coagulans*

LI Changfu¹, WU Ying^{1,2,3}, ZHOU Zilyu¹, CAO Li^{1,3}, WANG Dahong^{1,2}, GU Shaobin^{1,2,3*}

1(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

2(Henan Engineering Research Center of Food Microbiology, Luoyang 471023, China)

3(National Demonstration Center for Experimental Food Processing and Safety Education, Luoyang 471023, China)

ABSTRACT In order to analyze the effects of carbohydrates in food on probiotic's biological characteristics, and relationship between carbohydrates and acid-tolerance of *Bacillus coagulans* was studied. When fructose was used as the carbon source, the intracellular ATP content of *B. coagulans* reached 5.8181 mol/g prot, which was 1.95 times higher than that of the control group. At the same time, the contents of heptadecanoic acid and total unsaturated fatty acid increased significantly, reaching 61.87% and 26.49%, respectively. The intracellular ATP content of Glu, Arg, Asp and Lys closely related to the bacteria's acid tolerance ability showed a sharp increase. The acid resistance was 21% higher than that of the control group, 27.84 times higher than that of the organic acid group, and 35.63 times higher than that of the lactose group. In conclusion, different carbon sources have significantly different effects on probiotic acid tolerance ability.

Key words *Bacillus coagulans*; fatty acid; acid resistance; amino acid; ATP