

酸适应对一株乳酸乳球菌膜脂肪酸组成和膜蛋白表达的影响

刘怀龙, 孟祥晨*

(东北农业大学, ¹ 乳品科学教育部重点实验室, ² 食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】筛选具有较强酸适应能力的菌株, 研究酸适应对其膜脂肪酸组成和膜蛋白表达的影响。

【方法】从 20 株菌中筛选出一株具有较强酸适应能力的乳酸乳球菌 KLDS4.0312, 以 GC-MS 法测定该菌酸适应前后膜脂肪酸组成变化; 对酸适应前后该菌膜蛋白的差异表达进行双向电泳分析。

【结果】酸适应后, 该菌膜不饱和脂肪酸含量从 30.77% 上升到 42.93%, 饱和脂肪酸含量从 69.23% 下降到 57.07%, 且有一种新的长链单不饱和脂肪酸 C_{19:1-n6} 被诱导产生。酸适应过程中至少有 65 个蛋白质点表达出现显著差异, 其中上调的蛋白质点有 43 个, 减弱表达的蛋白质点有 22 个。而添加氯霉素后, 菌株的酸适应能力消除, 可能与氯霉素抑制新蛋白的合成有关。【结论】说明细胞膜脂肪酸组成的适应性改变和应激蛋白的诱导产生是该菌主要的酸适应机制。

关键词: 酸适应; 乳酸乳球菌; 脂肪酸; 应激蛋白; 存活率

中图分类号: Q931 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1459-07

当前各种益生菌制剂大量涌现, 市场前景广阔。然而, 益生菌本身发酵产生的乳酸、乙酸以及过胃时的胃酸等酸胁迫 (acid stress) 均会明显降低制剂的活菌数。如 *Lactobacillus casei* ASCC 1520 等 5 株乳杆菌在 pH 2.0 环境中作用 2 h 后, 活菌数从 10¹⁰ cfu/mL 下降到 10⁴ cfu/mL^[1]; *Lactobacillus plantarum* ST- 等 3 株乳杆菌在 pH 1.5 的人工胃液中作用 2.5 h, 均不能存活^[2]。因而, 提高益生菌的酸耐受力是目前益生菌制品研制与开发的技术关键。提高益生菌酸耐受力的主要方法包括^[3]: 筛选耐酸菌株、添加还原剂或抗氧化剂、微胶囊技术、双层包埋技术、基因融合技术等, 但这些方法本身在安全、实用性上还存在不足之处。而研究证明, *Propionibacterium freudenreichii*^[4]、*Lactobacillus acidophilus*^[5]、*Bifidobacterium*^[6] 等益生菌可通过酸适应 (acid adaptation) 提高其酸胁迫抗性。酸适应过程中引发了酸应激反应 (acid tolerance response, ATR), 菌体质膜 F₁F₀-ATPase 活性、谷氨酸

脱羧酶活性、细胞膜脂肪酸组成和应激蛋白表达等发生相应变化^[7], 提高了益生菌的酸耐受力。

因此, 研究益生菌的酸适应机制, 并采取相应方法来提高益生菌的酸耐受力, 成为一种新思路。这对于解决目前益生菌制剂过胃时存活率普遍偏低的现象具有重要意义。另外, 一些乳酸菌常用作发酵剂, 如能找到提高其酸胁迫抗性的途径, 实现普通生产条件下浓缩发酵剂的生产和“细胞工厂”的高密度培养, 将会极大推动这些微生物在工业生产中的应用。本试验从 20 株菌株中筛选出一株具有较强酸适应能力 (acid adaptive capacity) 的菌株, 并研究酸适应对该菌膜脂肪酸组成和膜蛋白表达的影响, 以探讨该菌酸适应机制, 为最终提高菌株的酸耐受力提供一定的理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基: 婴儿双歧杆菌: KLDS2.0602、

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA102344); 东北农业大学创新团队项目

*通讯作者: Tel: +86-451-55191813; E-mail: xchmeng@163.com

作者简介: 刘怀龙 (1981-), 男, 山东金乡, 硕士, 主要研究方向为乳品微生物。

收稿日期: 2008-04-25; 修回日期: 2008-07-24

KLDS2.0603、KLDS2.0606、KLDS2.0611、KLDS2.0613；长双歧杆菌：KLDS2.0601、KLDS2.0608；青春双歧杆菌：KLDS2.0612；植物乳杆菌：KLDS1.0314、KLDS1.0317；乳酸乳球菌：KLDS4.0304、KLDS4.0305、KLDS4.0306、KLDS4.0308、KLDS4.0309、KLDS4.0311、KLDS4.0312、KLDS4.0313、KLDS4.0314、KLDS4.0316，均为乳品工业微生物菌种保藏中心（东北农业大学）保藏菌种。TPY 和 MRS 培养基参照文献^[8]配制。

1.1.2 主要试剂和仪器：超声波破碎仪（宁波新芝 JY92-D 型），厌氧培养箱（自行设计），超高速冷冻离心机（美国 BECKMAN），KL512 型氮吹仪（北京康林科技），GL-21M 离心机（上海市离心机械研究所），HVE-50 型高压灭菌器（日本 HIRAYAMA），气相色谱-质谱联用仪（安捷伦 6890-5973N），双向凝胶电泳系统（瑞典 Amersham pharmacia Biotech）。

1.2 菌株酸适应能力的评估

菌株的酸适应处理：双歧杆菌、植物乳杆菌和乳酸乳球菌共 20 株菌，分别以 5% 接种量接种至 TPY 或 MRS 液体培养基中，双歧杆菌在厌氧条件下、植物乳杆菌和乳酸乳球菌在需氧条件下于 37 培养 4~6 h，再各取 10 mL 菌液，6000×g 离心 10 min，收集的双歧杆菌菌体分散于等体积 pH 4.5 的 TPY 液体培养基中，收集的植物乳杆菌和乳酸乳球菌分散于等体积 pH 4.5 的 MRS 液体培养基中，均在 37 条件下适应 1 h。

菌株酸耐力的评价：上述酸适应处理菌株在 6000×g 下离心 10 min，收集的菌体分散于 PBS（双歧杆菌作用 pH 值为 2.0 植物乳杆菌作用 pH 值为 1.5，乳酸乳球菌作用 pH 值为 2.5）中，37 作用 2 h。各自出发菌株作对照。作用前后分别取样，采用标准平板菌落计数方法测定活菌数。

1.3 细胞膜脂肪酸组成的分析

1.3.1 细胞膜提取：乳酸乳球菌 KLDS4.0312 在 37 培养 4~6 h，菌液以 6000×g 离心 10 min，收集的菌体在 PBS 中清洗，再于 6000×g 离心 10 min，收集的菌体分散于 pH 4.5 的 MRS 液体中适应 45 min。出发菌株作对照。取适应株和出发株菌液各 10 mL，同以上条件离心，收集的菌体分散于 PBS 中，超声波破碎（工作 5 s，间歇 15 s，功率 800 W）15 min，13000×g 离心 20 min，弃沉淀，上清以 75000×g 离心 45 min，沉淀即为细胞膜。

1.3.2 脂质的制备^[9]：收集的细胞膜加入 5 mL 甲醇：

氯仿（2：1，V/V），涡旋 2 h 后在 4 条件下静置 24 h。静置液于 6000×g 离心 10 min，取上清。沉淀加入甲醇：氯仿：水（2：1：0.8，V/V）混匀后同以上条件离心，将所得上清与静置液上清合并，加入氯仿：水（1：1，V/V）共 5 mL，分层，取下层（氯仿相），氮吹 2 h，加入 1 mL 甲醇，于 4 条件下保存。

1.3.3 脂肪酸甲酯化：提取的脂肪酸先加入 1 mL 0.5 mol/L 的 NaOH-CH₃OH，65 皂化 0.5 h，冷却后再加入 1 mL BF₃-甲醇溶液，将混合物在 70 水浴中煮 2 min。冷却，加入 1 mL 正己烷，振荡使甲酯转入正己烷层，加入饱和 NaCl 溶液，使正己烷上浮到容量瓶细颈处。

1.3.4 脂肪酸分析：使用安捷伦 6890-5973N 气质联用仪对甲酯化后的样品进行分析，色谱柱采用 HP-5 弹性石英毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）。色谱条件如下：汽化室温度，280 ；柱温采用程序升温，70（2 min）→230（20 min），以 5 /min 升温；分流比，20：1；载气，氦气；流速，1 mL/min。

1.4 酸适应对菌株膜蛋白表达的影响

1.4.1 细胞膜提取：乳酸乳球菌 KLDS4.0312 细胞膜的提取见 1.3.1，细胞膜溶于 0.5 mL TEP 缓冲液中（内含 1 mmol/L EDTA 和 0.001% PMSF）中，-80 保存备用。

1.4.2 膜蛋白样品制备：细胞膜沉淀重悬于 5 mL 裂解液（20 mmol/L Tris-HCl pH 7.0，7 mol/L 尿素，2 mol/L Thiourea，1% ASB-14，20 mmol/L DTT，0.5% IPG buffer）中，加入蛋白酶抑制剂，充分放置，使样品于裂解液中全部溶解，呈透明状态，20000×g 离心 20 min 去除不溶性沉淀。采用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.4.3 双向电泳及图像分析：等电聚焦使用不同梯度 IPG 胶条，IPGphor 第一向等电聚焦电泳主要依据 Görg^[10]描述的方法进行，二向 SDS-PAGE（13.0%）SDS-PAGE 按每一胶条 40 mA 电泳 40 min 后，再 60 mA 电泳 5 h，银染，采用 ImageScanner 光密度扫描仪扫描，并经 ImageMaster 2D Platinum 软件分析。

1.5 氯霉素对菌株酸适应能力的影响

乳酸乳球菌 KLDS4.0312 在 37 条件下培养 4~6 h，各取 10 mL 菌液，6000×g 下离心 10 min，收集的菌体分别分散于 10 mL pH 4.5 MRS 液体培养基和 10 mL pH 4.5 含 50 μg/mL 氯霉素的 MRS 液体培养基中，均在 37 适应 45 min；适应后的菌液同

以上条件离心, 收集的菌体再分别分散于 10 mL pH 2.5 的 PBS 中, 37 °C 作用 2 h。以出发菌株作对照。作用前后分别取样, 采用标准平板菌落计数法测定活菌数。

2 结果和分析

2.1 菌株酸适应能力的评价

20 株经酸适应处理的菌株及其出发菌株在酸胁迫环境下作用 2 h 后的活菌数见表 1 所示。8 株双歧杆菌中, 两歧双歧杆菌 KLDS2.0613、两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 和长双歧杆菌 KLDS2.0601 三株菌酸适

应后, 酸耐受力分别较出发菌株提高 3.12 倍、4.69 倍和 1.66 倍, 但其余五株在本试验条件下没有表现出酸适应能力。2 株植物乳杆菌中, 仅植物乳杆菌 KLDS1.0317 有一定的酸适应能力, 酸适应株的酸耐受力是出发菌株的 2.71 倍。与出发菌株相比, 9 株乳酸乳球菌酸适应株在酸胁迫环境下作用 2 h, 活菌数可提高 2~4 个对数级; 其中乳酸乳球菌 KLDS4.0312 酸适应株在 pH 2.5 的酸胁迫环境下作用 2 h 后的存活率是出发菌株的 7542 倍, 酸适应能力最强, 选取该菌进行后续研究。

表 1 20 株经酸适应处理的益生菌株及其出发菌株在酸胁迫环境下作用 2 h 后的活菌数
Table 1 Survival counts of acid adapted and non-adapted cells of 20 strains probiotic in acid stress for 2 h

Strains	Non-adapted cells in acid stress		Adapted cells in acid stress	
	0 h	2 h	0 h	2 h
<i>B. longum</i> KLDS2.0608	3.20×10^7	3.55×10^5	6.00×10^8	1.78×10^6
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0611	1.351×10^8	1.59×10^5	9.85×10^8	1.70×10^5
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0613	8.35×10^8	1.62×10^5	6.85×10^8	4.15×10^5
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0606	5.45×10^8	9.20×10^5	6.05×10^8	9.40×10^5
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0602	1.14×10^9	1.28×10^6	1.38×10^9	3.15×10^4
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0603	2.09×10^9	4.80×10^7	4.45×10^8	4.80×10^7
<i>B. longum</i> KLDS2.0601	1.21×10^8	5.00×10^4	1.37×10^8	9.40×10^4
<i>B. adolescent</i> KLDS2.0612	1.09×10^8	3.00×10^5	2.82×10^8	2.76×10^5
<i>L. plantum</i> KLDS1.0314	5.11×10^8	1.80×10^7	8.24×10^8	2.40×10^7
<i>L. plantum</i> KLDS1.0317	3.00×10^9	5.20×10^6	9.78×10^8	4.50×10^6
<i>L. lactis</i> KLDS4.0308	4.70×10^8	2.03×10^4	3.45×10^8	5.60×10^5
<i>L. lactis</i> KLDS4.0313	5.80×10^7	0	3.65×10^7	2.50×10^1
<i>L. lactis</i> KLDS4.0305	5.90×10^8	0	3.30×10^8	2.60×10^4
<i>L. lactis</i> KLDS4.0316	1.55×10^9	7.65×10^3	1.61×10^9	1.67×10^7
<i>L. lactis</i> KLDS4.0311	1.49×10^7	4.50×10^1	1.20×10^8	1.40×10^2
<i>L. lactis</i> KLDS4.0312	1.69×10^9	3.70×10^3	1.60×10^9	2.62×10^7
<i>L. lactis</i> KLDS4.0304	6.70×10^8	7.85×10^3	8.05×10^8	2.28×10^6
<i>L. lactis</i> KLDS4.0306	1.87×10^8	0	1.62×10^8	6.05×10^3
<i>L. lactis</i> KLDS4.0309	1.14×10^9	8.60×10^4	1.23×10^9	2.16×10^7
<i>L. lactis</i> KLDS4.0314	4.45×10^8	0	3.30×10^8	1.40×10^4

很多益生菌可在酸适应过程中诱发酸应激反应而提高自身酸耐受力, 如 *Lactobacillus bulgaricus* VI-1010 在 pH 4.75 条件下适应 30 min 后, 酸耐受力可提高 250 倍^[11]。但并非所有菌株的酸耐受力都可在酸适应后得到提高, 本试验结果证实了这一点。另外, 酸适应能力大小也因菌种和菌株而异, 因而筛选具有较强酸适应能力的菌株在实际生产中具有重要意义。

2.2 酸适应对乳酸乳球菌 KLDS4.0312 膜脂脂肪酸组成的影响

采用 GC-MS 法测定了乳酸乳球菌 KLDS4.0312 酸适应前后菌株细胞膜脂脂肪酸的组成(图 1)。出发株细胞膜的不饱和脂肪酸含量为 30.77%, 饱和脂肪酸含量为 69.23%, 不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例

(U/S) 为 0.444; 在 pH 4.5 条件下适应 45 min 后的酸适应菌株, 其细胞膜不饱和脂肪酸含量上升为 42.93%, 而饱和脂肪酸含量下降为 57.07%, 不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例 (U/S) 为 0.752。此结果表明: 在此酸适应条件下, 该菌株的细胞膜脂脂肪酸组成趋向不饱和方向转化(表 2)。

此外, 在此酸适应过程中, 诱导产生了一种新的长链单不饱和脂肪酸—— $C_{19:1-n6}$, 其含量为 11.18% (见图 2)。在所检测的膜脂脂肪酸中, $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1-n9}$ 等在酸适应前后含量并未发生明显变化, 但酸适应使膜脂脂肪酸 $C_{18:1-n7}$ 的含量从 7.25% 下降到 3.91%, 使 $C_{18:0}$ 的含量从 22.93% 下降到 11.54%。说明在此酸适应过程中, 菌株细胞膜脂脂肪酸组成发生了改变以适应低 pH 环境。

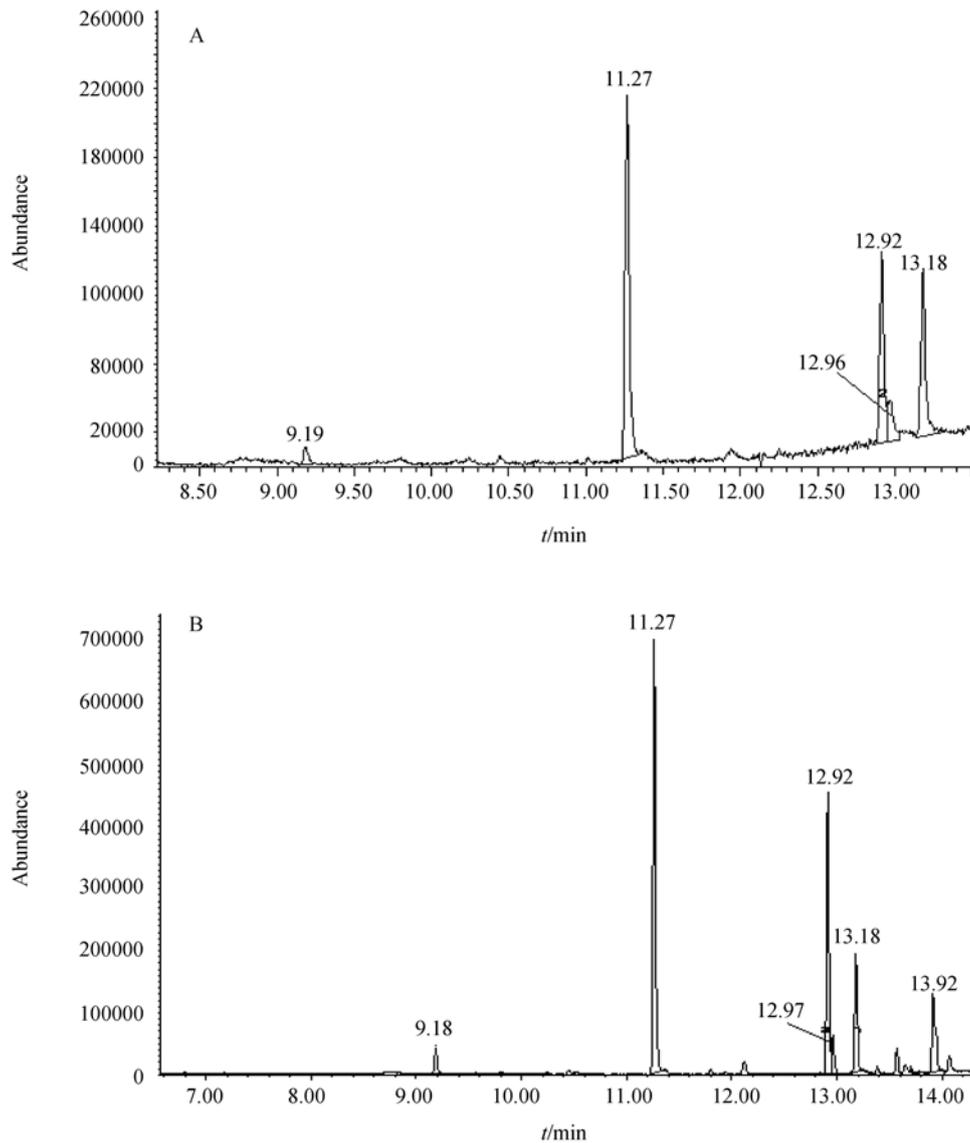


图 1 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 出发株与适应株细胞膜脂肪酸气相色谱-质谱总离子流色谱图(TIC)

Fig. 1 Total ion current chromatogram of membrane fatty acids in *L. lactis* KLDS4.0312 non-adapted and adapted cells. A: non-adapted cells; B: adapted cells.

表 2 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 出发株与适应株细胞膜中各脂肪酸含量

Table 2 The content of fatty acids in membrane lipids of non-adapted and adapted cells of *L. lactis* KLDS4.0312

Composition	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:1-n9}	C _{18:1-n7}	C _{18:0}	C _{19:1-n6}	U/S
Non-adapted cells	2.47%	43.83%	23.52%	7.25%	22.93%	—	0.444
Adapted cells	2.77%	42.73%	27.85%	3.91%	11.54%	11.18%	0.752

2.3 酸适应对乳酸乳球菌 KLDS4.0312 膜蛋白表达的影响

Bradford 法测定乳酸乳球菌 KLDS4.0312 出发株与适应株膜蛋白浓度分别为 2.78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 3.69 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 满足用 18 cm 胶条进行双向电泳的需要。采用双向电泳方法分析该菌出发株与适应株的膜蛋白表达情况, 所获得的双向电泳图谱经 Imagemaster 2D platinum 分析

软件进行比较分析, 在出发株的图谱中识别出 288 个蛋白质点, 适应株图谱中识别出 465 个蛋白质点。出发株与适应株蛋白质点的匹配数为 189, 匹配百分率为 50.20%。

识别出的蛋白质点其等电点 (pI) 主要分布在 pH 4 ~ 6 之间, 相对分子质量 (MW) 主要分布在

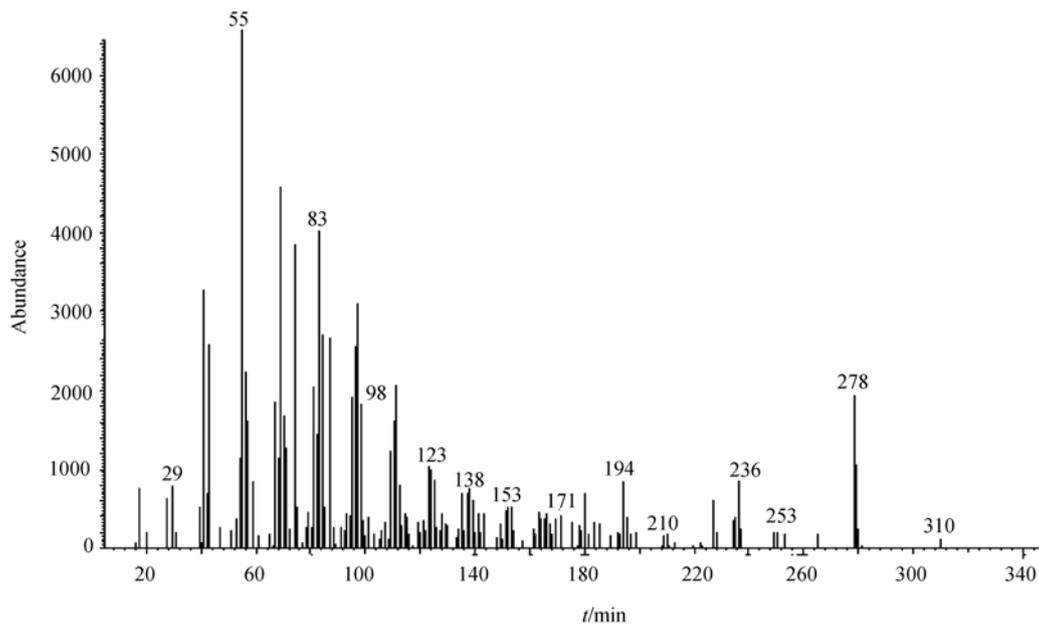


图2 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 适应株细胞膜脂脂肪酸中 C_{19:1-n6} 脂肪酸棒状色谱图

Fig. 2 Mass spectra of fatty acid C_{19:1-n6} in *L. lactis* KLDS 4.0312 adapted cells.

30 ~ 97 kDa 之间。出发株中, pI 在 4.0 ~ 5.0 之间的蛋白质点有 101 个, pI 在 5.0 ~ 6.0 之间的蛋白质点有 146 个, pI 在 6.0 ~ 7.0 之间的蛋白质点有 41 个。适应株中, pI 在 4.0 ~ 5.0 之间的蛋白质点有 107 个, pI 在 5.0 ~ 6.0 之间的蛋白质点有 309 个, pI 在 6.0 ~ 7.0 之间的蛋白质点有 49 个, 示意主要为酸性蛋白。出发株中蛋白质点的 MW 主要分布在 30 ~ 60 kDa 内, 适应株中蛋白质点的 MW 主要分布在 30 ~ 110 kDa 内, 说明酸适应后出现较多的大分子量蛋白。

在 189 个匹配蛋白质点中, 通过肉眼观察及手动调整, 结果发现适应株与出发株之间有 65 个蛋白点差异显著。与出发株相比, 酸适应后的适应株有 43 个蛋白质点表达上调, 22 个蛋白质点表达下调。部分显著差异蛋白点如图 3 所示, 其中 A 图为出发株, 标记为 11 ~ 20 的点为下调蛋白质点; B 图为适应株, 标记为 1 ~ 10 的点为上调蛋白质点。

2.4 氯霉素对乳酸乳球菌 KLDS4.0312 酸适应能力的影响

乳酸乳球菌 KLDS4.0312 在 pH 4.5 条件下适应 45 min, 适应株在酸胁迫条件下作用 2 h 后的活菌数比出发株高 1 ~ 2 个数量级(图 4), 表明酸适应可显著提高该菌的酸胁迫抗性。在酸适应的同时添加氯霉素, 则适应株在酸胁迫条件下作用 2 h 后的活菌数反而低于出发株, 说明菌体的酸适应能力被氯霉素抑制了, 这可能与氯霉素抑制新蛋白的合成有关^[2]。

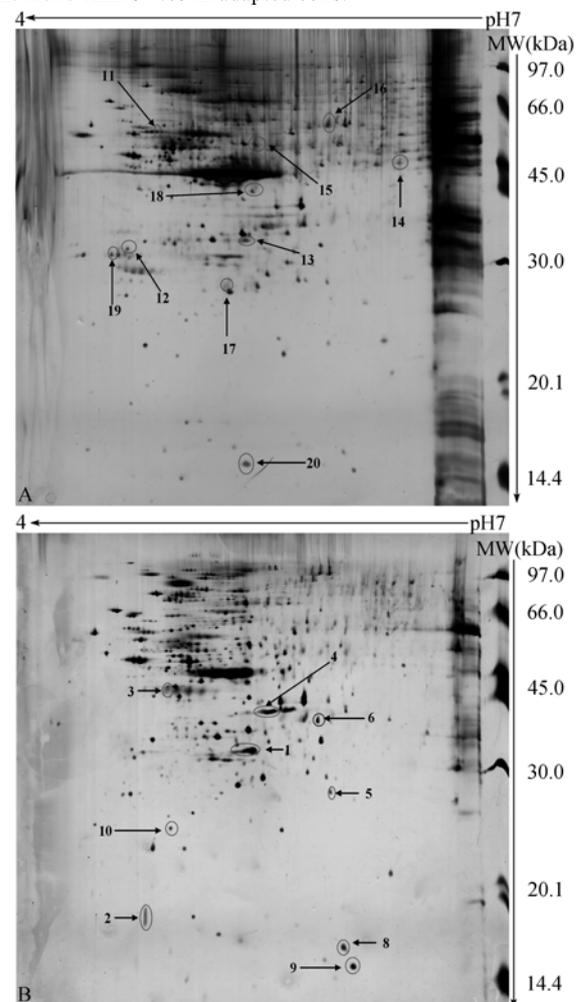


图3 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 出发株(A)与适应株(B)部分显著差异蛋白点

Fig. 3 The 2-DE map of some distinct protein spots expressed by *L. lactis* KLDS4.0312 non-adapted (A) and adapted cells (B).

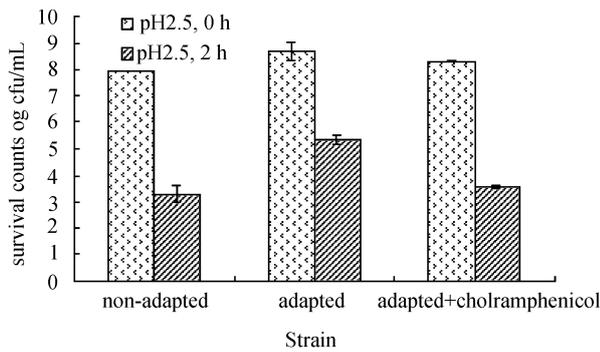


图 4 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 出发株、适应株和氯霉素处理适应株在酸胁迫中作用 2 h 的活菌数

Fig. 4 Survival counts of non-adapted, adapted cells and adapted cells with chloramphenicol of *L. lactis* KLDS4.0312 in acid stress for 2 h.

3 讨论

乳酸乳球菌 KLDS4.0312 酸适应后, 菌体酸耐受力大幅提高。该菌逐级酸适应 (pH 5.0→pH 4.5→pH 4.0) 时, 菌体的酸适应能力是单次酸适应时的 46 倍, 逐级酸适应使得乳酸乳球菌 KLDS4.0312 在酸胁迫中作用 2 h 的存活率从 <0.1% 提高到 25.74% (数据未发表), 该菌酸胁迫抗性得到极大提高。研究证实, 该菌酸适应过程中同时存在着多种适应机制, 其中 F_1F_0 -ATPase 活性诱导增加^[12]、膜脂肪酸组成改变和膜蛋白出现差异表达, 而谷氨酸脱羧酶活性变化不显著 ($P>0.05$) (数据未发表)。

酸适应过程中, 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 膜膜脂肪酸组成发生了适应性改变, 以降低质子的细胞膜渗透性, 维持胞内 pH 稳定, 防止低 pH 值对细胞起到毒害作用。若添加浅蓝菌素(一种脂肪酸合酶抑制剂) 阻止这种转化, 则菌体对酸胁迫的耐受力会明显降低^[13]。另外, 这种适应性改变是在较短时间内完成的。*Streptococcus mutans* UA159 在 pH 逐渐降低的过程中, 细胞膜脂肪酸从短链饱和脂肪酸向长链单不饱和脂肪酸转化, 仅在 20 min 内就完成了这一转化, 但至少需要 10 个代时才能逆转这种适应性变化^[13]。Jan 等人^[14]也证实菌体细胞在短时间内引发 ATR, 并迅速达到最佳酸应激反应。随着适应时间的延长, 膜脂肪酸从饱和向不饱和方向转化的趋势将会持续, 但趋于平缓^[13]。

酸适应过程中, 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 的表达调控体系发生了明显变化, 一些应激蛋白被诱导产生。微生物在胁迫条件下可通过诱导应激蛋白的合成来适应环境, 应激蛋白可阻止附着于膜上的酶的改变,

影响膜自身的物理特性, 且具有反馈作用, 以稳定膜蛋白和膜脂质。而添加了对新蛋白合成具有抑制作用的氯霉素后, 菌体的酸适应能力丧失, 说明应激蛋白的诱导合成是该菌的酸适应机制之一, 与菌体酸耐受力的提高具有重要相关性。袁静^[15]对长双歧杆菌 NCC2705 发酵至稳定期时的应激蛋白进行了鉴定, 44 个差异蛋白点对应着 8 种蛋白质, 其中 DnaK、GroEL 和 GroES 等被酸诱导进而大量表达, 与该菌株的酸耐受力密切相关。但氯霉素的添加, 可能也会同时抑制 F_1F_0 -ATPase 的诱导产生, 从而影响菌株的酸适应能力。

4 结论

本试验筛选到的乳酸乳球菌 KLDS4.0312 具有较强的酸适应能力, 研究证实酸适应过程中该菌膜脂肪酸组成发生了适应性改变, 且有一种新的长链单不饱和脂肪酸 $C_{19:1-n6}$ 被诱导产生; 该菌膜蛋白也出现了差异表达; 两者均是该菌的酸适应机制。后续试验将考虑调控该菌细胞膜脂肪酸的组成以及蛋白的表达, 以提高该菌的酸胁迫抗性。另外, 本研究也表明将酸适应方法在益生菌制剂和浓缩发酵剂的生产中应用是可行的, 但需要注意的是酸适应能力在菌种和菌株水平上存在着差异, 需要提前评价菌株的酸适应能力。

参 考 文 献

- [1] Liong MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88: 55–66.
- [2] 辛玲, 郭本恒. 3 株乳杆菌在模拟消化环境中存活性能的研究. *中国乳品工业(China Dairy Industry)*, 2005, 33(5): 15–17.
- [3] Ross RP, Desmond C, Fitzgerald GF, et al. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98: 1410–1417.
- [4] Jan Gwénaél, Leverrier Pauline, Pichereau Vianney, et al. Changes in Protein Synthesis and Morphology during Acid Adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2029–2036.
- [5] Andrea M, Eric A, Rebecca H, et al. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5315–5322.
- [6] Maus, Ingham. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance

- of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95: 146–154.
- [7] Cotter Paul, Hill Colin. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(3): 429–453.
- [8] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [9] Murga ML, Cabrera GM, Font G, *et al*. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88: 342–348.
- [10] Görg A, Obermaier C, Boguth G, *et al*. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1037–1053.
- [11] Lim Eng Mong, Anne Lafon, Larbi Dridi, *et al*. Identification of stress proteins in *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* by two-dimensional electrophoresis. *Lait*, 2001, 81: 317–325.
- [12] 刘怀龙, 孟祥晨. 酸应激对一株乳酸乳球菌 F₁F₀-ATPase 活性的影响. *食品与发酵工业(Food and Fermentation Industries)*, 2008, 34(5): 65–67.
- [13] Fozo Elizabeth M, Robert G Quivey. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 929–936.
- [14] Jan Gwénaél, Annette Rouault, Jean-Louis Maubois. Acid stress and acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Lait*, 2000, 80: 325–336.
- [15] 袁静, 朱力, 冯尔玲, 等. 长双歧杆菌 NCC2705 菌株应激蛋白的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(3): 390–396.

Influence of Acid Adaptation on Membrane Fatty Acid Profile and Expression of Membrane proteins in *Lactococcus lactis*

Huailong Liu, Xiangchen Meng*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, and Food Science & Technology College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: [Objective] *Lactococcus lactis* with high acid adaptive capacity was screened, and the influence of acid adaptation on membrane fatty acid profile and expression of membrane proteins were studied. [Methods] *Lactococcus lactis* KLDS4.0312 with high acid adaptive capacity was screened from 12 lactic acid bacteria and 8 *Bifidobacterium*. The change of the fatty acid profile in cell membrane of this strain was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, and two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis method was used to analyze the differential expression of membrane proteins during the acid adaptation. [Results] After acid adaptation, *Lactococcus lactis* KLDS4.0312 increased the proportion of unsaturated fatty acids from 30.77% to 42.93% in its membrane lipids with a concomitant decrease in saturated fatty acids from 69.23% to 57.07%, and a new long-chained, mono-unsaturated fatty acid C_{19:1-n6} was induced. Compared with the non-adapted sample, there were at least 65 distinct protein points in the adapted sample, where 43 proteins were up-regulated and 22 proteins were down-regulated. But the acid adaptive capacity of *Lactococcus lactis* KLDS4.0312 was eliminated by adding chloramphenicol which can restrain the synthesis of new proteins. [Conclusion] These results showed that change in the membrane fatty acid profile by acid adaptation in *Lactococcus lactis* KLDS4.0312.

Keywords: acid adaptation; *Lactococcus lactis*; fatty acids; shock protein; survival rate

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA102344) and the Innovation Group Program from Northeast Agricultural University

*Corresponding author. Tel: +86-451-55191813; E-mail: xchmeng@163.com

Received: 25 April 2008/ Revised: 24 July 2008