

吕佳良, 刘 芳, 孙芝兰, 等. 不同盐浓度下粪肠球菌代谢精氨酸的规律[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24): 189–191.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.051

不同盐浓度下粪肠球菌代谢精氨酸的规律

吕佳良^{1,2}, 刘 芳², 孙芝兰², 王道营², 许晓曦¹, 徐为民²

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要:精氨酸脱亚胺酶途径是某些乳酸菌代谢精氨酸转化成鸟氨酸, 同时产生氨气和能量的重要作用途径, 因此精氨酸代谢是细菌获得能量的重要途径之一。对粪肠球菌在不同盐浓度培养条件下的精氨酸代谢规律进行研究, 结果发现, 随着培养基中盐浓度的升高, 菌液的吸光度逐渐降低, 但是菌液中残留的精氨酸浓度逐渐下降。通过荧光定量 PCR 对不同盐浓度条件下精氨酸脱亚胺酶的编码基因 *arcA* 的表达量进行分析发现, 随着盐浓度的升高, 菌体细胞内 *acrA* 的表达量明显升高。结果说明, 菌体在高盐环境下代谢精氨酸的能力提高, 推断精氨酸脱亚胺酶途径对粪肠球菌 R-612-Z1 适应高盐环境起着重要的作用。

关键词:精氨酸代谢; 瓜氨酸; 鸟氨酸; 精氨酸脱亚胺酶途径; 盐胁迫; 粪肠球菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)24-0189-03

精氨酸的生物合成和代谢因其代谢途径的复杂性和多样性吸引了大量的研究者。精氨酸及其前体(如多胺和一些抗生素)可参与一些代谢产物的生物合成。精氨酸降解的多种途径在微生物中已有描述, 某些情况下其中的几个途径在同种微生物中同时存在^[1-2]。在这些降解途径中, 精氨酸脱亚胺酶(ADI)途径是精氨酸降解最广泛的厌氧途径。精氨酸脱亚胺酶途径包含 3 个反应, 参与的酶有精氨酸脱亚胺酶(ADI)、鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)和氨基甲酸酯激酶(CK)(图 1), 并且完成了精氨酸到鸟氨酸、氨气和 CO₂ 的转化, 其中生成 1 mol ATP 消耗 1 mol 精氨酸, 因此 ADI 途径是一些微生物主要的能量来源^[2-3]。

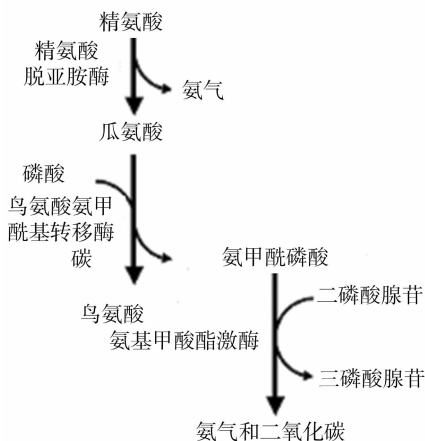


图1 精氨酸脱亚胺酶途径

有研究提出, 精氨酸脱亚胺酶途径对细菌在酸性环境中的存活起着重要作用^[4-5]。Vrancken 等进行了在发酵乳杆菌 IMDO130101 中环境 pH 值下通过精氨酸脱亚胺酶途径决定瓜氨酸和鸟氨酸释放的试验^[6]。然而到目前为止, 还没有关于精氨酸在细菌盐胁迫条件下代谢规律的研究。本研究主要对粪肠球菌在不同盐浓度条件下代谢精氨酸的规律进行研究, 可为解析该菌适应酸胁迫环境的机制提供一定的参考, 同时可为研究该菌在酸性条件下的生长奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

粪肠球菌 R-612-Z1(江苏省农业科学院农产品加工研究所自盐水鸭中分离获得的产酪胺菌株); 乙腈、正己烷, 均为色谱纯; 异硫氰酸苯酯(纯度≥98%, 美国 Sigma 公司); 三乙胺(纯度≥99.5%, 瑞士 Fluka 公司); 乙酸钠(AR 级, 国药集团化学试剂有限公司); M17 培养基(山东青岛高科园海博生物技术有限公司); L-精氨酸标准物质(纯度>99%, 上海融禾医药科技发展有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的制备 活化菌种: 取 -40℃ 保藏的粪肠球菌 R-612-Z1 600 μL 接种到 50 mL 的 M17 培养基中, 在 37℃ 恒温箱中培养 12 h。

配制氯化钠浓度分别为 0%、2%、4%、6% 的 M17 培养基, 并加入 1% 的精氨酸, 将活化好的菌液按 4% 接种, 每隔 2 h 取 2 mL 菌液, 用紫外分光光度计测 600 nm 处菌液的吸光度。通过吸光度的变化规律, 观察粪肠球菌在不同浓度氯化钠胁迫下的生长情况。

1.2.2 不同浓度氯化钠培养条件下发酵液中残留精氨酸浓度的测定

1.2.2.1 标准溶液的配制 精确称取 L-精氨酸标准物质 213.2 mg 置于 50 mL 容量瓶中, 用去离子水溶解并定容, 摇匀即得 L-精氨酸标准储备液, 稀释成浓度分别为 4.264、2.132、1.066、0.533、0.267、0.133 mg/mL 的溶液, 于 4℃ 冰

收稿日期: 2016-06-17

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31371802); 江苏省自然科学基金(编号: BK20151367)。

作者简介: 吕佳良(1991—), 男, 黑龙江佳木斯人, 硕士, 研究方向为食品微生物。E-mail: 125954049@qq.com。

通信作者: 许晓曦, 博士, 教授, 研究方向为畜产品加工与食品安全, E-mail: xiaoxi_xu01@163.com; 刘 芳, 博士, 副研究员, 研究方向为肉品加工与质量控制, E-mail: fangliu82@163.com。

箱保存备用。

1.2.2.2 样品处理 在无菌操作台上,用移液枪取 8 mL 菌液置于 10 mL 离心管中,用离心机以 6 000 r/min 的转速离心 10 min,取上清液,于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2.3 样品的提取和衍生化 精密量取标准品溶液或菌液 200 μL,加入 0.1 mol/L 的异硫氰酸苯酯-乙腈溶液 100 μL,1.0 mol/L 的三乙胺-乙腈溶液 100 μL,旋涡混匀后室温放置 1 h,加入 400 μL 正己烷溶液,旋涡混匀 1 min 并静置 10 min,取澄清的下层溶液 200 μL 用乙腈定容至 1 mL,摇匀,经 0.45 μm 有机相滤膜过滤后上液相色谱仪进行分析。

1.2.2.4 色谱条件 Waters Alliance 2695 液相色谱系统,色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm,5 μm),UV-2487 紫外检测器,检测波长为 254 nm,流速为 1 mL/min,进样量 2 μL,柱温 40 ℃,流动相 A 为 0.1 mol/L 醋酸钠-乙腈溶液(体积比 93:7),流动相 B 为水-乙腈溶液(体积比 20:80),梯度洗脱条件见表 1^[7]。

表 1 梯度洗脱条件

时间(min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
5	97	3
14	89	11
17	79	21
29	66	34
41	0	100
43	100	0
50	100	0

1.2.3 不同浓度氯化钠培养条件下菌体内精氨酸脱亚胺酶的表达量差异 将活化好的菌液按 4% 接种到不同氯化钠浓

度且添加 1% 精氨酸的 M17 培养基中,培养 4 h 后,从每个样品(每个处理 3 个重复)取出 3 mL 菌液,4 ℃ 条件下以 10 000 r/min 的转速离心 3 min,收集沉淀物。使用天根生化科技(北京)有限公司的细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒提取菌泥的 RNA。通过 2% 的琼脂糖电泳和 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的值对 RNA 的完整性、浓度和纯度进行鉴定。

使用宝生物工程(大连)有限公司生产的 PrimeScript RT reagent kit 去除提取液中的 DNA,并将提取的 RNA 反转录成 cDNA。参照宝生物工程(大连)有限公司的 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒的使用说明书配制实时荧光定量 PCR 反应液,反应体系按照说明书添加。荧光定量 PCR 引物见表 2。使用美国应用生物系统公司的 ABI 7500 Real-Time PCR System 进行实时荧光定量 PCR 试验,不同样品反应体系设 3 次重复。分析各基因的 C_T 值,利用 Excel 2003 软件计算出标化后的 $-\Delta\Delta C_T$ 值,目的基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行评估,计算公式为 $\Delta\Delta C_T = \text{未知样品 } \Delta C_T - \text{参照样品 } \Delta C_T$,未知样品 $\Delta C_T = C_T$ 目的基因 - C_T 管家基因,参照样品 $\Delta C_T = C_T$ 参照样品目的基因 - C_T 参照样品管家基因。

2 结果与分析

2.1 精氨酸测定方法的建立

L-精氨酸标准品的 C₁₈-HPLC 色谱结果如图 2 所示。以 *L*-精氨酸衍生物的峰面积为横坐标,*L*-精氨酸标准溶液浓度(mg/mL)为纵坐标得到的线性回归方程为 $y = 6.1 \times 10^5 x - 196\ 18$, $r^2 = 0.998$ 。结果表明,*L*-精氨酸质量浓度在 0.133~4.264 mg/mL 范围内时,其质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

表 2 荧光定量 PCR 引物

基因	编码蛋白	引物序列(5'→3')	参考文献
<i>gdhA</i>	谷氨酸脱氢酶	正向:GGAATTGATGTGGCGTTAG;反向:GTGTTGCACATGCTAACG	[8]
<i>gdh</i>	葡萄糖-1-脱氢酶	正向:CAAGCATGTTCTCTATGG;反向:AGTGTGTTCCGGTTACG	[8]
<i>arcA</i>	精氨酸脱亚胺酶	正向:GATCGGAATACGATTACGAATAAAG;反向:GATCTTCACGGTAAAGTGGCATACT	本研究

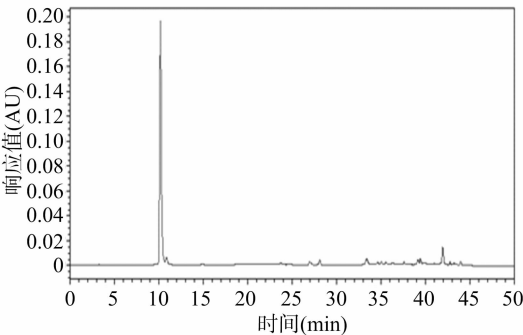


图2 *L*-精氨酸标准品的 C₁₈-HPLC 色谱

2.2 不同浓度氯化钠溶液处理下粪肠球菌的吸光度变化

由图 3 可知,0%、2% 氯化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液增长幅度较大,接种后 6~8 h 快速增长,而 4%、6% 氯化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液增长幅度较平缓,6% 氯化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液的吸光度明显低于其他组。随着氯化钠浓度的升高,粪肠球菌 R-612-Z1 受到抑制的程度依次增加,4 组不同浓度氯

化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液在培养 8 h 后,最终的吸光度随氯化钠溶液浓度的升高而减小,其中最大值是最小值的 3.41 倍。

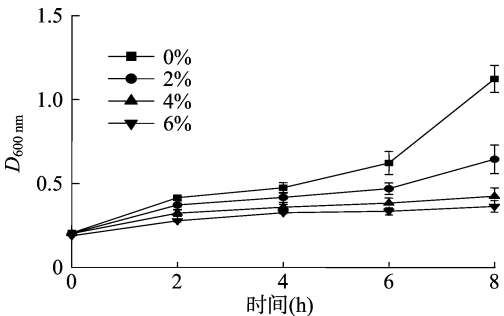


图3 不同氯化钠浓度下粪肠球菌 R-612-Z1 菌液的吸光度

2.3 不同浓度氯化钠溶液处理下发酵液中残留精氨酸含量的变化

由图 4 可知,菌液中精氨酸的初始浓度为 10 mg/mL,不同浓度氯化钠溶液处理后 0~2 h 精氨酸含量迅速消耗,0%、

2% 氯化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液的精氨酸含量下降趋势基本一致,4%、6% 氯化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液的精氨酸含量下降速度更快,其中 6% 氯化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液的精氨酸含量下降速度最快。培养 2~6 h 下降趋势明显变缓,0%、2% 氯化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液的精氨酸含量明显高于 4%、6% 氯化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液,其中 6% 氯化钠溶液处理的粪肠球菌 R-612-Z1 菌液的精氨酸含量最低。培养 6~8 h,精氨酸含量趋于稳定。

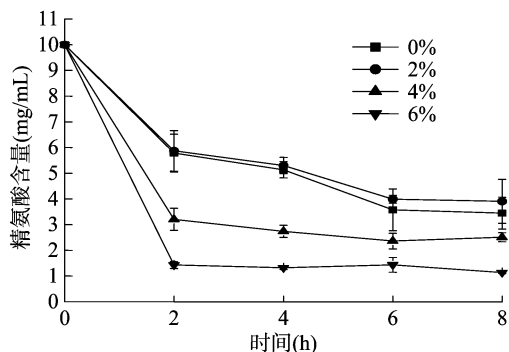


图4 不同浓度氯化钠溶液处理下发酵液中精氨酸的含量

2.4 荧光定量 PCR 测定精氨酸脱亚胺酶基因表达量的变化

精氨酸脱亚胺酶途径包含 3 个反应,包括精氨酸脱亚胺酶(由 *arcA* 编码)、鸟氨酸氨甲酰基转移酶(由 *argB* 编码)和氨基甲酸酯酶(由 *arcC* 编码)等 3 种酶,并且完成精氨酸到鸟氨酸、氨气和 CO_2 的转化。以上各酶的基因处于 1 个操纵子上(图 5-A)。因此笔者选择了精氨酸脱亚胺酶为目标物,通过分析其对应基因在不同氯化钠浓度条件下的表达量差异来研究精氨酸的代谢情况。结果(图 5-B)表明,随着氯化钠浓度的升高,*gDH* 管家基因的表达式几乎无变化,而 *arcA* 基因表达式依次升高,说明高浓度氯化钠胁迫下粪肠球菌 R-612-Z1 中与精氨酸代谢相关的精氨酸脱亚胺酶基因的表达量升高,增强了精氨酸的代谢能力。

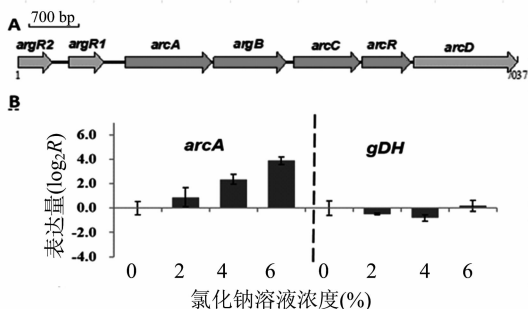


图5 粪肠球菌 R-612-Z1 的精氨酸脱亚胺酶途径基因簇(A)与精氨酸脱亚胺酶在不同盐浓度下的表达量

3 讨论

精氨酸脱亚胺酶途径催化精氨酸产生鸟氨酸、氨气和 CO_2 ,生成 1 mol ATP 消耗 1 mol 精氨酸。因此,该途径是一些微生物主要的能量和碳、氮来源^[2-3]。Xu 等研究发现,精氨酸脱亚胺酶途径是马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*)适应环境 pH 值变化的主要途径之一^[9]。

Vrancken 等研究发现,环境 pH 值决定发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) IMDO 130101 通过精氨酸脱亚胺酶途径产生瓜氨酸和鸟氨酸的含量^[6]。以上研究都说明,精氨酸脱亚胺酶途径是细菌适应酸性环境的一个机制。本研究发现,虽然在高盐浓度下粪肠球菌 R-612-Z1 的生长变得缓慢,但是发酵液中残留的精氨酸的含量却急剧减少,说明菌体在高盐环境下代谢精氨酸的能力提高,因此推断精氨酸脱亚胺酶途径也是粪肠球菌 R-612-Z1 适应高盐环境的一个机制。目前有关精氨酸脱亚胺酶途径在细菌盐胁迫中作用的文献报道较少,有研究者在植物盐胁迫中发现,瓜氨酸是甜瓜耐盐碱和干旱胁迫时叶片中的一个重要生化指标^[10]。Vrancken 等研究发现,发酵乳杆菌 IMDO 130101 中精氨酸脱亚胺酶通路的活性与培养环境中的盐浓度有关^[11],说明精氨酸脱亚胺酶途径在细菌适应盐胁迫环境的过程中也起着重要作用。

参考文献:

- [1] Abdelal A T. Arginine catabolism by microorganisms [J]. Annual Review of Microbiology, 1979, 33 (1): 139-168.
- [2] Cunin R, Glandsdorff N, Piérard A, et al. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria [J]. Microbiological Reviews, 1986, 50 (3): 314-352.
- [3] Crow V L, Thomas T D. Arginine metabolism in lactic streptococci [J]. Journal of Bacteriology, 1982, 150 (3): 1024-1032.
- [4] Marquis R E, Bender G R, Murray D R, et al. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acidic environments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53 (1): 198-200.
- [5] Xiong L F, Teng J L, Watt R M, et al. Arginine deiminase pathway is far more important than urease for acid resistance and intracellular survival in *Laribacter hongkongensis*: a possible result of arc gene cassette duplication [J]. BMC Microbiology, 2014, 14 (1): 1-12.
- [6] Vrancken G, Rimaux T, Weckx S, et al. Environmental pH determines citrulline and ornithine release through the arginine deiminase pathway in *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135 (3): 216-222.
- [7] 周慧,郝宁,严明,等.柱前衍生化 HPLC 法测定发酵液中 L-瓜氨酸和 L-鸟氨酸含量 [J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2009, 31 (2): 77-80.
- [8] Lenz C A, Hew Ferstl C M, Vogel R F. Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis* [J]. Food Microbiology, 2010, 27 (3): 317-326.
- [9] Xu B, Yang X Y, Zhang P, et al. The arginine deiminase system facilitates environmental adaptability of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* through pH adjustment [J]. Research in Microbiology, 2016, 167 (5): 403-412.
- [10] Kusvuran S, Dasgan H Y, Abak K. Citrulline is an important biochemical indicator in tolerance to saline and drought stresses in melon [J]. The Scientific World Journal, 2013, 2013 (5): 253414.
- [11] 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.