

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (7): 721 - 727; 4 July 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.001

## 调控乳酸菌酸胁迫抗性研究进展

吴重德, 黄钧, 周荣清\*

四川大学轻纺与食品学院, 皮革化学与工程教育部重点实验室, 四川 成都 610065

**摘要:** 作为工业化的细胞工厂, 乳酸菌广泛应用于食品、农业和医药等行业。酸胁迫是乳酸菌在发酵生产以及作为益生菌在人体胃肠道系统中广泛存在的一种环境胁迫, 严重影响乳酸菌的生理功能。近年来, 随着系统生物学和代谢工程等技术的发展, 为进一步揭示乳酸菌酸胁迫抗性机制并提高其耐酸性能带来了可能。本文综述了乳酸菌酸胁迫研究进展, 介绍了乳酸菌应对酸胁迫的生理机制, 并提出了提升乳酸菌酸胁迫抗性的策略。

**关键词:** 乳酸菌, 酸胁迫, 氨基酸代谢, 细胞膜, 交互保护

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209(2014)07-0721-07

乳酸菌是一类可发酵糖类并产生以乳酸为主要代谢产物的革兰氏阳性菌的总称, 广泛应用于食品、医药、饲料等工业<sup>[1]</sup>。然而在乳酸菌的发酵生产、工业应用以及作为益生菌在人体胃肠道系统中都会面临多种环境胁迫, 包括酸、盐、冷冻胁迫等, 这些环境胁迫严重影响了乳酸菌正常的生理代谢, 从而影响了食品微生物制造的效率和益生功能的发挥。因此, 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。

酸胁迫是乳酸菌面临的最为严重的挑战之一, 应对酸胁迫, 乳酸菌往往会诱发多种胁迫响应机制, 包括调控胞内 pH 的动态平衡、诱导表达胁迫应激蛋白以及保持细胞膜生理功能等<sup>[2-3]</sup>。近年来, 随着代谢工程和系统生物学等新技术和新手段的不断出现, 使得从全局水平上系统解析乳酸菌酸胁迫应激反应以及酸胁迫抗性机制成为可能, 从而为定向

改造乳酸菌生理功能, 构建酸胁迫抗性菌株奠定了基础。本文综述了调控乳酸菌酸胁迫抗性的研究进展, 并在此基础上提出了提升乳酸菌酸耐受性能的策略。

### 1 调控氨基酸代谢提升乳酸菌酸胁迫抗性

乳酸菌是一类兼性厌氧的细菌, 由于缺乏完整的 TCA 循环, 因此, 糖酵解和氨基酸代谢是其 ATP 产生的主要方式。此外, 氨基酸代谢在调控胞内 pH, 产生代谢能量或还原力、增强细胞对环境胁迫的抗性等方面具有重要作用<sup>[4]</sup>。已报道的氨基酸如谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸等在调控胞内 pH 动态平衡以及保护细胞抵御酸胁迫过程中有重要作用 (图 1)。在乳酸菌中, 精氨酸可以通过精氨酸脱亚

基金项目: 国家自然科学基金(31171742, 31301546)

\* 通信作者。Tel: +86-28-85406149; Fax: +86-28-85405237; E-mail: zhourqing@scu.edu.cn

作者简介: 吴重德(1982-), 男, 四川成都人, 讲师, 博士, 主要从事乳酸菌生理学方面的研究。

收稿日期: 2013-09-16; 修回日期: 2013-11-25

胺酶途径 (ADI) 产生  $\text{NH}_3$  用于中和胞内质子, 同时产生的 ATP 通过 ATPase 将胞内质子泵出胞外。目前, 除了乳酸菌外, 已在 *E. coli*, *S. mutans*, *L. monocytogenes* 和 *Bacillus spp.* 等多种微生物中鉴定了 ADI 途径的存在<sup>[5-7]</sup>。Zhang 等<sup>[8]</sup> 外源添加精氨酸至 *L. casei* 酸胁迫培养基中, *L. casei* 存活率显著提高, 同时研究发现胞内 ATP 浓度和  $\text{H}^+$ -ATPase 活性显著增加。基因分析表明, 编码 ADI 途径 3 个酶 (精氨酸脱亚胺酶、鸟氨酸氨甲酰转移酶、氨甲酰酯酶) 的基因 *arcA*, *arcB*, *arcC* 位于同一操纵子下, 敲除 *arcABC* 或者与 ADI 途径相关的调节基因 *argR* 导致 *S. suis* 在酸性条件下生长性能和胞内氨浓度降低<sup>[9]</sup>。天冬氨酸, 作为精氨酸生物合成前体之一在保护乳酸菌抵御酸胁迫过程中具有重要作用。比较蛋白质组学研究结果表明, 酸胁迫导致 *L. casei* 催化天冬氨酸合成精氨酸途径中的关键酶 ArgG 和 ArgH 表达上调, 使细胞代谢更多地流向 ADI 途径, 同时外源添加天冬氨酸使 *L. casei* 在酸胁迫条件下 (pH 4.3) 的生长性能和存活率显著增加<sup>[2,10]</sup>, 表明酸胁迫条件下乳酸菌通过调节天冬氨酸代谢方式提高细胞酸耐受性能。此外, Hu 等<sup>[11]</sup> 在 *Yersinia pseudotuberculosis* 中鉴定了另一种依赖于天冬氨酸代谢的酸存活系统, 表达催化天冬氨酸脱氨生成富马酸的天冬氨酸酶 (AspA), 使宿主菌在低酸条件下存活率显著提高。富马酸的生成过程中会伴随着  $\text{NH}_3$  的产生, 同时富马酸可以转化为苹果酸, 后者通过苹果酸乳酸途径消耗胞内的  $\text{H}^+$ , 产生 ATP, 减少酸胁迫对细胞造成的损伤<sup>[12-13]</sup> (图 1)。

氨基酸脱羧是乳酸菌抵御酸胁迫的又一重要途径, 通过脱羧产生  $\text{CO}_2$  同时消耗质子  $\text{H}^+$  (图 1)。例如, 谷氨酸和组氨酸通过脱羧消耗质子产生  $\text{CO}_2$ , 同时生成  $\gamma$ -氨基丁酸和组胺<sup>[4]</sup>。Trip 等<sup>[14]</sup> 在 *L. lactis* 中异源表达了组氨酸脱羧酶途径, 通过添加组氨酸, 使宿主细胞在酸胁迫条件下存活率显著提高。外源添加 30 mmol/L 组氨酸至培养基中使 *L. casei* 在酸胁迫条件下的存活率提高 100 倍以上<sup>[12]</sup>。

胞内积累支链氨基酸 (亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸) 是乳酸菌常见的一种酸应激反应<sup>[15,10]</sup>。由于支链氨基酸的合成需要丙酮酸和 NADH 的参与, 因此, 合成支链氨基酸可以在消耗丙酮酸和 NADH 的同时减少甲酸的含量。由于甲酸 (pKa 3.75) 的酸性强于乳酸 (pKa 3.86) 和醋酸 (pKa 4.75), 因此,

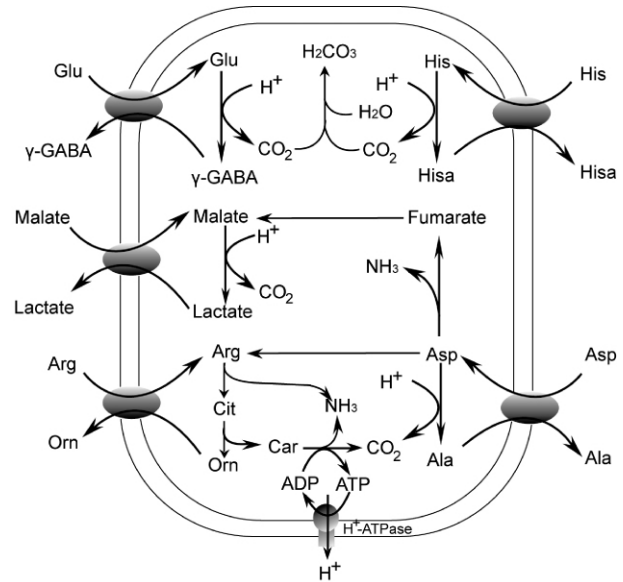


图 1. 基于氨基酸代谢的胞内 pH 动态平衡

Figure 1. Intracellular pH homeostasis based on amino acid metabolism. Glu: glutamate;  $\gamma$ -GABA:  $\gamma$ -aminobutyric acid; Arg: arginine; Orn: ornithine; Cit: citrulline; Car: carbamoyl-phosphate; His: histidine; Hisa: histamine; Asp: aspartate; Ala: alanine.

支链氨基酸的积累可以减少酸胁迫对细胞的损伤<sup>[16]</sup>。前期的研究表明, 酸胁迫条件下支链氨基酸合成中的酶 (IlvA, IlvC2, IlvD, IlvE) 表达上调<sup>[15-16]</sup>, 同时敲除 *ilvE* 基因使 *S. mutans* 酸耐受性能和  $\text{H}^+$ -ATPase 活力显著降低<sup>[17]</sup>。

## 2 调控细胞膜和细胞壁生理功能提升乳酸菌酸耐受性

细胞膜在细胞生长、代谢以及维持胞内微环境的稳定方面具有重要作用, 同时也是环境胁迫作用的首要位点。保持细胞膜正常的生理功能对于保持细胞活性, 提高细胞对环境胁迫的抗性具有重要作用。改变细胞膜脂肪酸组成是乳酸菌常见的一种酸胁迫应激反应。酸胁迫条件下, 乳酸菌通常会增加不饱和和脂肪酸的比例, 降低饱和脂肪酸的比例, 从而增加膜脂的不饱和度和膜脂的碳链长度<sup>[3]</sup>。通常膜脂碳链长度的增加使其更容易横跨膜双分子层, 与其它的脂类和蛋白通过疏水作用结合, 使脂肪酸链更紧凑, 而膜环境更接近于“凝胶状”, 从而增加膜的稳定性<sup>[18]</sup>。不饱和脂肪酸的合成需要脱饱和酶的参与, 而脱饱和酶是一种依赖于氧的酶, 它催化

合成不饱和脂肪酸是一种耗氧的过程,这样可以减少由酸胁迫引发的氧胁迫对细胞造成的伤害<sup>[19-20]</sup>。Fozo 和 Quivey<sup>[21]</sup>在 *S. mutans* 中鉴定了一种合成单不饱和脂肪酸的酶 FabM,敲除了 *fabM* 基因的突变株对酸胁迫的耐受性显著降低,通过遗传回补或者添加不饱和脂肪酸,突变株对酸的耐受性重新恢复。此外,过量合成环丙烷脂肪酸(19-Cyc)也是乳酸菌应对酸胁迫的一种胁迫响应<sup>[3]</sup>,在敲除了环丙烷合成基因 *cfa* 的突变株中,细胞对酸胁迫的耐受性降低,重新表达 *cfa* 基因后,细胞对酸的耐受性得到恢复<sup>[22]</sup>。

磷壁酸是革兰氏阳性菌细胞壁特殊组分,是由核糖醇或甘油残基连接而成的多聚物,包括甘油磷壁酸和核糖醇磷壁酸。甘油磷壁酸主链是由甘油和磷酸分子交替链接而成,侧链是由单个的 D-丙氨酸分别以酯键相连。在与 D-丙氨酸酯化过程中,需要操纵子 *dlt* 控制下的 4 个基因 *dltA-dltD* 的参与<sup>[23]</sup>。在 *L. rhamnosus* GG 中,对 *dltD* 基因进行插入突变,使突变株在模拟胃液中的存活率降低,同样在 *L. reuteri* 中敲除 *dltA* 使细胞在酸胁迫条件下的生长性能降低<sup>[24-25]</sup>。Boyd 等<sup>[26]</sup>在 *Streptococcus mutans* 中对 *dltC* 基因进行突变,产生了酸敏感的突变株,突变株在酸胁迫条件下生长速率降低,倍增时间延长,同时渗透分析表明,与原始菌株相比,突变株对质子的渗透性显著增加。表明操纵细胞结构的完整性是调节乳酸菌酸胁迫抗性的一种有效策略。*N*-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸脱醛酶(NagA)可催化氨基糖类的代谢,以及催化 *N*-乙酰-D-6-磷酸葡萄糖胺与 D-6-磷酸果糖的转化,而 *N*-乙酰-D-6-磷酸葡萄糖胺是 *N*-乙酰-D-葡萄糖胺和 UDP-*N*-乙酰胞壁酸的前体,所以,NagA 可能与细菌细胞壁肽聚糖和磷壁酸的合成有密切关系。比较蛋白质组学分析研究发现,*L. casei* Zhang 在酸胁迫条件下蛋白 NagA 表达增强,可能有利于维持细胞形态,提高细胞壁的保护作用<sup>[27]</sup>。

### 3 引入外源代谢途径改善乳酸菌酸胁迫抗性

一直以来,作为工业化“细胞工厂”的乳酸菌,是原核细菌中的一种重要的工业微生物。在以乳

酸菌为发酵剂的食物制造过程中,致病菌和乳酸菌几乎遇到同样的环境挑战,包括酸、盐、氧等。但是这些致病菌往往能够利用非常有效的方法在包括食品热杀菌过程、人类胃肠道、肠道内上皮细胞迁移、宿主免疫细胞入侵这些高度易变的环境和挑战性的生存条件下躲避、适应和存活下来。因此分析这些致病菌生存效应的分子机理,可以将这些特性异源移植到乳酸菌中,从而改善乳酸菌的生理功能(表1)。为此,Sleator 和 Hill<sup>[28]</sup>提出了病理-生物技术(Patho-biotechnology)的概念,用以描述致病菌的开发和用于食品和生物医学的特殊细菌毒性研究中。例如,Sheehan 等<sup>[29]</sup>在 *Lactobacillus salivarius* UCC118 中表达来自 *L. monocytogenes* 的利用甜菜碱的基因 *betL*,研究发现,工程菌对渗透压胁迫和低温胁迫的耐受性显著提高,同时对喷雾干燥和冷冻干燥的抗性也得到增强。病理生物技术除了提高乳酸菌抵抗生产中的各种胁迫外,还能改善其在宿主中的定植能力和临床功效。在 *B. breve* UCC2003 中引入 *betL* 基因,重组菌株对人工胃液和渗透压胁迫的耐受性显著增强,同时通过对小鼠食用表达了 *betL* 基因的 *Bifidobacterium breve*,菌株在小鼠肠道中的定植能力增强,小鼠受感染的几率大大降低<sup>[30]</sup>。

谷胱甘肽(GSH)是细胞内最重要的非蛋白巯基化合物,是由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸经肽键缩合而成的一种同时具有  $\gamma$ -谷氨酰基和巯基的生物活性三肽化合物。GSH 可以作为谷胱甘肽过氧化物酶的底物,抑制脂质过氧化,保护细胞膜;同时可以保护含巯基酶的活性,减少自由基对 DNA 的攻击,降低 DNA 的损伤和突变。Zhang 等<sup>[31]</sup>将源于 *E. coli* 中的合成 GSH 的基因 *gshA* 和 *gshB* 导入 *L. lactis* NZ9000,构建了一条 GSH 合成途径,结果表明,宿主菌对酸胁迫(pH 2.5, 30 min)的抗性比对照菌提高了 15 倍。此外,在 *L. lactis* 中引入来源于 *P. freudenreichii* 的海藻糖生物合成途径,宿主菌对酸(pH 3.0)、冷(4℃)和热(45℃)胁迫的抗性显著增强<sup>[32]</sup>。这些研究结果表明,构建异源生物合成途径是提高乳酸菌酸胁迫抗性的一种有效方法。

表 1. 代谢工程提高乳酸菌酸胁迫抗性

Table 1. Improving acid stress resistance of lactic acid bacteria by metabolic engineering

strain	strategie	performance	reference
introduction of exogenous biosynthetic capacity			
<i>B. breve</i> UCC2003	Introduction of betaine-uptake system from <i>L. monocytogenes</i>	Increased tolerance to gastric juice and osmolarity was achieved	[30]
<i>L. lactis</i>	Expressed glutathione synthetase genes <i>gshA</i> and <i>gshB</i> from <i>E. coli</i>	The survival increased 15-fold when challenged at pH 2.5 for 30 min	[31]
<i>L. paracasei</i> NFBC338	Expressed glycosyltransferase ( encoded by <i>gtf</i> gene) from <i>P. parvulus</i>	The tolerance to acid, heat, bile salt increased 20 -, 60 -, and 5.5 - fold, respectively	[33]
<i>L. lactis</i>	Introduction of trehalose biosynthetic pathway from <i>P. freudenreichii</i>	Higher survival to acid, cold, and heat stresses was obtained	[32]
overexpression of general stress response proteins			
<i>L. lactis</i>	Heterologous expression of <i>shsp</i> gene from <i>S. thermophilus</i>	The host cells displayed significantly higher survival under acid, heat, ethanol, bile salt and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> stresses	[34]
<i>L. lactis</i>	Heterologous expression of <i>E. coli dnaK</i>	The maximum biomass increased 1.44-fold in the presence of 0.5% lactic acid	[35]
<i>L. lactis</i>	Heterologous expression of <i>RecO</i> gene from <i>L. casei</i>	Significantly higher survival during acid, salt, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> stresses was achieved	[36]

## 4 过量表达胁迫应激蛋白提升乳酸菌酸胁迫抗性

外界环境胁迫可诱导乳酸菌产生应激反应,如在发酵生产以及贮藏过程中的酸胁迫、渗透压胁迫和冷胁迫等,可诱导不同种类和数量的蛋白或基因发生变化。利用系统生物学的方法(基因组学、蛋白质组学、代谢组学等)可以揭示乳酸菌在环境胁迫下蛋白或基因等表达模式的动态变化,有助于阐明乳酸菌应激反应调节的分子机制,从而为选育和改良优良乳酸菌种奠定基础。酸胁迫条件下诱导表达的蛋白主要是热休克蛋白以及与 DNA 修复相关的蛋白<sup>[2,27]</sup>(表 1)。热休克蛋白(HSPs)是最早发现的一类应激蛋白,属于分子伴侣蛋白,具有修复受损蛋白质的生物学功能,主要包括 HSP70 (DnaK)、HSP60 (GroEL)、HSP85 和 HSP100 等。其中,DnaK 和 GroEL 是研究最多的与乳酸菌酸胁迫应激反应相关的蛋白。Abdullah-Al-Mahin 等<sup>[35]</sup>在 *L. lactis* 中表达 DnaK 蛋白,工程菌对酸(0.5% 乳酸, pH 5.47)、盐(3% NaCl)和乙醇(5%)的耐受性都显著提高。同样地,Tian 等<sup>[34]</sup>将来源于 *S. thermophilus* 的应激蛋白基因 *shsp* 在 *L. lactis* 中表达,研究发现,工程菌株对酸、热、乙醇、胆盐和过氧化氢的耐受性显著增强。DNA 修复蛋白的主要功能是识别受损的 DNA 并对受损部位进行修复。Wu 等<sup>[2]</sup>利用蛋白质组学的方法对 *L. casei* Zhang 及其酸耐受的突

变株 *L. casei* lb-2 在酸胁迫条件下的蛋白表达进行了分析,研究发现,酸胁迫条件下突变株中与 DNA 修复相关的蛋白 Muts, RecO 表达显著上调,为了进一步验证 DNA 修复蛋白的生理功能,作者在 *L. lactis* 中异源表达了 RecO 蛋白,并对宿主菌环境胁迫抗性进行了研究,结果表明,工程菌在酸胁迫(pH 5.0)、盐胁迫(3% NaCl)和氧胁迫(0.1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)下的生物量分别提高 22.03%、37.04 和 19.37%。进一步研究还发现,RecO 蛋白的表达能够更好的保护乳酸脱氢酶的活性,进而提高乳酸产量<sup>[36]</sup>。因此,表达胁迫应激蛋白可能是提高乳酸菌酸胁迫抗性的有效方法之一。

## 5 基于预适应与交互保护提升乳酸菌酸胁迫抗性

酸适应性反应(ATR)是乳酸菌常见的一种酸应激保护方式,当细胞处于胁迫环境中时,由一种适应性反应所诱导的保护作用,可以保护细胞抵御更为恶劣的环境胁迫,这些反应可以用于提高乳酸菌在胁迫条件下的存活和改进它们的生产工艺。Hartke 等<sup>[37]</sup>报道,*L. lactis* 在 pH 5.5 的温和酸胁迫条件下预处理 30 min 后,再经 pH 3.9 的致死酸胁迫处理,其存活率比未经预适应的细胞显著改善。表 2 列举了利用预适应机制提高乳酸菌胁迫抗性的例子。交互保护作为另一种应激反应,在提高乳酸菌胁迫条件下的存活率和改进工艺性质方面有重要

作用。薛峰等<sup>[38]</sup>研究了不同预适应条件对 *L. casei* ATCC393 存活的影响, 研究结果表明, 分别经热、酸、过氧化氢和胆盐预适应的细胞均能诱导交互保护作用。其中经 pH 4.0 的盐酸预适应 90 min 后, *L. casei* ATCC393 对热胁迫 (70℃, 90 min) 和氧胁迫 (10 mol/L 过氧化氢, 90 min) 的交互保护作用最

为显著, 其存活率分别提高了 305 倍和 173 倍。同时不同的诱导因素对交互保护的效果还存在差异, 细胞分别经 pH 4.0 的盐酸和乳酸预适应后考察其对热胁迫和氧胁迫的耐受性, 结果表明, 经盐酸预适应的细胞诱发的交互保护作用对菌体的存活更加显著。

表 2. 预适应对乳酸菌胁迫抗性的影响

Table 2. Effects of pre-adaptation on stress resistance of lactic acid bacteria

strain	pre-adaptation condition	stress condition	tolerance factor*	reference
<i>L. sanfranciscensis</i> CB1	pH 5.0, 60 min	pH 3.4, 10 h	4000	[39]
<i>L. casei</i> ATCC 334	pH 4.5, 20 min	pH 2.0, 140 min	4	[12]
<i>L. acidophilus</i> LA1-1	53℃, 30 min	60℃, 30 min	166	[40]
<i>L. casei</i> ATCC 393	42℃, 90 min	70℃, 90 min	6	[38]
<i>L. casei</i> LC301	42℃, 20 min	54℃, 20 min	5	[41]

\* The ratio of survival rate between pre-adapted cells and control cells (without pre-adaptation).

## 6 展望

调控乳酸菌环境胁迫抗性是改善其生理功能, 提高食品微生物制造效率所要解决的根本问题。利用代谢工程的方法表达某个基因虽然能在一定程度上改善微生物生理功能, 但是效果仍然有限。回顾以往的研究并结合当前研究中所遇到的问题, 可以从以下两方面开展工作: (1) 基于系统生物学技术的乳酸菌酸胁迫应激反应和酸胁迫抗性机制的解析, 从细胞全局的基础上进一步阐释乳酸菌酸胁迫耐受机制; (2) 利用系统生物学技术提供的充实数据, 从系统代谢工程的角度考虑如何从全局角度设计更为合理的代谢工程方案, 从而为进一步揭示乳酸菌酸胁迫调控机制, 定向改造乳酸菌生理功能奠定基础。

## 参考文献

[1] Gaspar P, Carvalho AL, Vinga S, Santos H, Neves AR. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 764-788.

[2] Wu C, Zhang J, Chen W, Wang M, Du G, Chen J. A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93: 707-722.

[3] Wu C, Zhang J, Wang M, Du G, Chen J. *Lactobacillus*

*casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39: 1031-1039.

[4] Fernández M, Zúñiga M. Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2006, 32(3): 155-183.

[5] Matsui R, Cvitkovitch D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiology*, 2010, 5(3): 403-417.

[6] Senouci-Rezkallah K, Schmitt P, Jobin M. Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC14579 strain. *Food Microbiology*, 2011, 28: 364-372.

[7] Zhao B, Houry WA. Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival. *Biochemistry and Cell Biology*, 2010, 88(2): 301-314.

[8] Zhang J, Wu C, Du G, Chen J. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus casei* by adaptive evolution and compared stress response during acid stress. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 17(2): 283-289.

[9] Fulde M, Willenborg J, de Greeff A, Benga L, Smith HE, Valentin-Weigand P, Goethe R. ArgR is an essential local transcriptional regulator of the arcABC operon in *Streptococcus suis* and is crucial for biological fitness in an acidic environment. *Microbiology-SGM*, 2011, 157(2): 572-582.

[10] Wu C, Zhang J, Du G, Chen J. Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97: 4083-4093.

[11] Hu Y, Lu P, Zhang Y, Li L, Chen S. Characterization of

- an aspartate-dependent acid survival system in *Yersinia pseudotuberculosis*. *FEBS Letters*, 2010, 584 (11) : 2311–2314.
- [12] Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 : 2445–2458.
- [13] Wu R, Wu J, Meng H, Zhang H. Acid intimidation responses of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology*, 2007, 27 (2) : 62–66. (in Chinese)  
乌日娜, 武俊瑞, 孟和, 张和平. 乳酸菌酸胁迫反应机制研究进展. *微生物学杂志*, 2007, 27 (2) : 62–66.
- [14] Trip H, Mulder NL, Lolkema JS. Improved acid stress survival of *Lactococcus lactis* expressing the histidine decarboxylation pathway of *Streptococcus thermophilus* CHCC1524. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287 : 11195–11204.
- [15] Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Collado MC, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, de los Reyes-Gavilan CG, Margolles A, Zagorec M. Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* Biotype longum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (20) : 6450–6459.
- [16] Len MCL, Harty DWS, Jacques NA. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. *Microbiology-SGM*, 2004, 150 : 1353–1366.
- [17] Santiago B, MacGilvray M, Faustoferri RC, Quivey RG. The branched-chain amino acid aminotransferase encoded by *ilvE* is involved in acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (8) : 2010–2019.
- [18] Mykytczuk NCS, Trevors JT, Leduc LG, Ferroni GD. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2007, 95 (1–3) : 60–82.
- [19] Guerzoni ME, Ferruzzi M, Sinigaglia M, Criscuoli GC. Increased cellular fatty acid desaturation as a possible key factor in thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, 43 (6) : 569–576.
- [20] Weber MHW, Klein W, Muller L, Niess UM, Marahiel MA. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Molecular Microbiology*, 2001, 39 (5) : 1321–1329.
- [21] Fozo EM, Quivey RG. The *fabM* gene product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (13) : 4152–4158.
- [22] Chang YY, Cronan JE. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 1999, 33 (2) : 249–259.
- [23] Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67 (4) : 686–723.
- [24] Vélez MP, Verhoeven TL, Draing C, Von Aulock S, Pfitzenmaier M, Geyer A, Lambrechts I, Grangette C, Pot B, Vanderleyden J. Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (11) : 3595–3604.
- [25] Walter J, Loach DM, Alqumber M, Rockel C, Hermann C, Pfitzenmaier M, Tannock GW. D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100–23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (7) : 1750–1760.
- [26] Boyd DA, Cvitkovitch DG, Bleiweis AS, Kiriukhin MY, Debabov DV, Neuhaus FC, Hamilton IR. Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (21) : 6055–6065.
- [27] Wu R, Zhang W, Sun T, Wu J, Yue X, Meng H, Zhang H. Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 147 (3) : 181–187.
- [28] Sleator R, Hill C. Patho-biotechnology: using bad bugs to do good things. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17 (2) : 211–216.
- [29] Sheehan VM, Sleator RD, Fitzgerald GF, Hill C. Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (3) : 2170–2177.
- [30] Sheehan V, Sleator R, Hill C, Fitzgerald G. Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology-SGM*, 2007, 153 (10) : 3563–3571.
- [31] Zhang J, Fu R-Y, Hugenholtz J, Li Y, Chen J. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress.

- Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (16) : 5268-5275.
- [32] Carvalho AL, Cardoso FS, Bohn A, Neves AR, Santos H. Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77: 4189-4199.
- [33] Stack HM, Kearney N, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (2) : 500-507.
- [34] Tian H, Tan J, Zhang L, Gu X, Xu W, Guo X, Luo Y. Increase of stress resistance in *Lactococcus lactis* via a novel food-grade vector expressing a *shsp* gene from *Streptococcus thermophilus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43 (3) : 1157-1164.
- [35] Abdullah-Al-Mahin, Sugimoto S, Higashi C, Matsumoto S, Sonomoto K. Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli dnaK*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (13) : 4277-4285.
- [36] Wu C, Zhang J, Du G, Chen J. Heterologous expression of *Lactobacillus casei* RecO improved the multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 during salt stress. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 238-241.
- [37] Hartke A, Bouche S, Giard JC, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology*, 1996, 33 (3) : 194-199.
- [38] Xue F, Zhang J, Du G, Chen J. Influence of cross-protection on the survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (4) : 478-484. (in Chinese)  
薛峰, 张娟, 堵国成, 陈坚. 交互保护对于酪乳杆菌 ATCC393<sup>TM</sup>存活的影响. 微生物学报, 2010, 50 (4) : 478-484.
- [39] De Angelis M, Bini L, Pallini V, Coconcelli PS, Gobbetti M. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology-SGM*, 2001, 147: 1863-1873.
- [40] Kim WS, Perl L, Park JH, Tandianus JE, Dunn NW. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology*, 2001, 43 (5) : 346-350.
- [41] Broadbent J, Ober C, Wang H, Wei L. Attributes of the heat shock response in three species of dairy *Lactobacillus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1997, 20 (1) : 12-19.

## Regulating acid stress resistance of lactic acid bacteria – A review

Chongde Wu, Jun Huang, Rongqing Zhou\*

College of Light Industry, Textile & Food Engineering; Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering, Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan Province, China

**Abstract:** As cell factories, lactic acid bacteria are widely used in food, agriculture, pharmaceutical and other industries. Acid stress is one the important survival challenges encountered by lactic acid bacteria both in fermentation process and in the gastrointestinal tract. Recently, the development of systems biology and metabolic engineering brings unprecedented opportunity for further elucidating the acid tolerance mechanisms and improving the acid stress resistance of lactic acid bacteria. This review addresses physiological mechanisms of lactic acid bacteria during acid stress. Moreover, strategies to improve the acid stress resistance of lactic acid were proposed.

**Keywords:** lactic acid bacteria, acid stress, amino acid metabolism, cell membrane, cross-protection

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171742, 31301546)

\* Corresponding author. Tel: +86-28-85406149; Fax: +86-28-85405237; E-mail: zhourqing@scu.edu.cn

Received: 16 September 2013 / Revised: 25 November 2013