



基于 PTP 转运蛋白的瓜氨酸利用菌株高通量筛选策略及其应用评估

王文玉, 毛兆敏, 马赵蓉, 杨森, 徐淑霞, 吴坤, 张继冉*

河南农业大学生命科学院, 河南 郑州 450002

王文玉, 毛兆敏, 马赵蓉, 杨森, 徐淑霞, 吴坤, 张继冉. 基于 PTP 转运蛋白的瓜氨酸利用菌株高通量筛选策略及其应用评估. 微生物学报, 2022, 62(8): 3137–3151.

Wang Wenyu, Mao Zhaomin, Ma Zhaorong, Yang Sen, Xu Shuxia, Wu Kun, Zhang Jiran. High-throughput screening of citrulline-utilizing strains based on putative transport protein and its application assessment. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3137–3151.

摘要: 【目的】为降低发酵体系中氨基甲酸乙酯前体物瓜氨酸的浓度, 建立基于 PTP (putative transport protein) 转运蛋白的瓜氨酸利用菌株高通量筛选策略, 对不同样品中的瓜氨酸利用菌株进行分离、筛选和鉴定, 并对其胞外瓜氨酸利用能力进行比较和分析。【方法】通过对瓜氨酸转运蛋白 PTP 的氨基酸序列进行比对分析, 确定其保守区域, 并通过设计获得简并引物, 结合溴甲酚紫变色圈法、简并引物菌落 PCR 和二乙酰一肟显色法, 建立瓜氨酸利用菌株的高通量筛选策略。【结果】设计出一对可用于筛选瓜氨酸利用菌株的简并引物, 利用建立的高通量筛选策略从环境中分离获得 65 株具有瓜氨酸利用能力的菌株, 其中 *Levilactobacillus brevis* PC4 可在 4 h 内消耗体系中 91.08% 的瓜氨酸。对分离菌株 PTP 编码基因在基因组中的位置进行分析发现, *Latilactobacillus sakei* 等 4 株菌的 PTP 编码基因都位于 *arc* 基因簇内, 表明 PTP 蛋白的功能与分离菌株的瓜氨酸代谢途径密切相关。【结论】PTP 蛋白是菌株胞外瓜氨酸利用的重要功能蛋白, 基于 PTP 编码基因设计的高通量筛选策略可用于高效地从环境中分离瓜氨酸利用菌株, 从而降低发酵体系中的瓜氨酸浓度。

关键词: 氨基甲酸乙酯; 瓜氨酸; 高通量筛选; 精氨酸脱亚氨基途径; PTP 转运蛋白

基金项目: 国家自然科学基金(31801672)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31801672)

*Corresponding author. Tel: +86-371-63555790; E-mail: zhangjiran@henau.edu.cn

Received: 8 December 2021; Revised: 19 January 2022; Published online: 16 February 2022

High-throughput screening of citrulline-utilizing strains based on putative transport protein and its application assessment

WANG Wenyu, MAO Zhaomin, MA Zhaorong, YANG Sen, XU Shuxia, WU Kun, ZHANG Jiran*

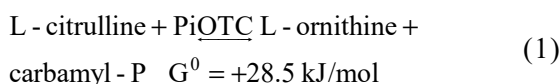
College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: [Objective] Citrulline is a precursor of ethyl carbamate in fermentation systems. To reduce the concentration of citrulline, we established a putative transport protein (PTP)-based high-throughput screening strategy to isolate and identify citrulline-utilizing strains from different samples and then evaluated the extracellular citrulline utilization abilities of the strains. [Methods] We compared the amino acid sequences of PTPs to determine the motif and then designed degeneracy primers to obtain the nucleic acid sequences of PTPs. The citrulline-utilizing strains were isolated by high-throughput screening strategy combined with bromocresol purple chromogenic circle method, colony PCR with degeneracy primers, and diacetyl monoxime colorimetric method. [Results] A pair of degeneracy primers was designed for the screening of citrulline-utilizing strains. Using the high-throughput screening strategy, we isolated 65 citrulline-utilizing strains from different environments. *Levilactobacillus brevis* PC4 consumed 91.08% citrulline in 4 h. The PTP genes of four strains were located in *arc* gene cluster, which indicated that the function of PTP was closely related to citrulline metabolic pathway. [Conclusion] PTP is an important functional protein for extracellular citrulline utilization of bacteria. High-throughput screening strategy based on PTP gene is an efficient way to isolate citrulline-utilizing strains from different environments.

Keywords: ethyl carbamate; citrulline; high-throughput screening; arginine deiminase pathway; putative transport protein

瓜氨酸(citrulline, CIT),是一种非编码型 α -氨基酸,近年研究发现,瓜氨酸作为氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)前体会对发酵食品安全造成严重威胁^[1]。氨基甲酸乙酯,又名尿烷或乌拉坦(urethan),是2A类致癌物^[2],由尿素、瓜氨酸等前体物与体系中的乙醇在自发条件下生成,一旦形成就极难被降解^[3],因此对发酵体系中EC消除的主要途径是对其前体物进行消除^[4]。前体物氰化物和尿素,可通过对原料进行预处理^[5]或添加脲酶,在发酵开始前或发酵终止时进行消除^[6-8]。前体物瓜氨酸则主要在发酵过程中,由微生物通过精氨酸脱亚氨基途径(arginine deiminase pathway, ADI)代谢精氨

酸积累而成^[9]。对前体物瓜氨酸,目前较多的研究还停留于其形成机制和产生微生物等方面^[10],对其消除方法还未有系统研究。瓜氨酸无法采用类似于尿素的酶法消除技术,这主要是由于鸟氨酸氨甲酰磷酸转移酶(ornithine transcarboxylase deficiency, OTC)所催化的降解反应从热力学角度是不利发生的,其化学反应式及反应动力学参数如公式(1)所示。同时酶解产生的氨甲酰磷酸(carbamoyl phosphate)是一种高能磷酸化合物,是EC的重要前体物之一,其在自发条件下生成EC的能力比尿素和瓜氨酸更强。因此,采用酶法对EC的前体物瓜氨酸进行消除尚不可行^[11]。



之前的研究表明,一些微生物,尤其是部分乳酸菌,会对胞外瓜氨酸进行利用,但对瓜氨酸的利用机制和途径并未进行深入研究^[12]。Zúñiga等通过生物信息学分析发现,一些细菌在 *arc* 基因簇(皆为 ADI 途径相关基因)内或下游,可能存在与胞外瓜氨酸利用有关的基因^[13-14]。Rimaux等通过对 *L. sakei* CTC494 中 putative transport protein 的 PTP 编码基因进行敲除,发现 *L. sakei* CTC494 失去了利用环境中瓜氨酸的能力,从而确定了菌株中属于 YfcC 家族的与 PTP 高度同源的 C4-dicarboxylate anaerobic carriers (DcuC)等蛋白与胞外瓜氨酸向胞内的转运有关^[15],是影响胞外瓜氨酸利用的关键因素。刘晓慧等通过对来源于 *L. brevis* 中的 PTP 同源编码基因进行异源表达,发现作为宿主的大肠杆菌获得了之前所不具备的胞外瓜氨酸利用能力,从而进一步证明 PTP 蛋白与胞外瓜氨酸利用高度相关^[16]。

本研究旨在于,通过生物信息学分析,获得 PTP 蛋白的保守编码区,综合考虑简并度等因素,获得合适的简并引物,用于从环境中高效筛选潜在的具有胞外瓜氨酸利用能力的菌株。比较含 PTP 蛋白编码基因的菌种对胞外瓜氨酸利用能力的差异,为消除食品发酵过程中 EC 的前体物瓜氨酸,从而实现降低 EC 浓度提供解决策略和技术手段。该筛选方法的建立,

意味着可以从多种瓜氨酸产生环境中高效原位筛选其利用菌株,从而用于瓜氨酸的浓度控制。

1 材料与方法

1.1 培养基

乳酸菌肉汤(MRS)液体培养基(1 L): 蛋白胨 15.0 g, 酵母浸粉 5.0 g, 磷酸二氢钾 2.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 番茄浸出粉 2.5 g, 吐温-80 1.0 g, pH 值 5.3±0.2。

筛选培养基(g/L): 蛋白胨 15.0, 酵母浸粉 5.0, 磷酸二氢钾 2.0, 葡萄糖 10.0, 番茄浸出粉 2.5, 吐温-80 1.0, 瓜氨酸 10.0, 溴甲酚紫 0.06, pH 值 5.3±0.2, 琼脂 20.0。

1.2 主要试剂

细菌基因组提取试剂盒购自天根生物公司; DL2000 DNA Marker 购自擎科生物技术有限公司; 2×Es Taq Master Mix (Dye) DNA Polymerase 购自康为世纪生物科技有限公司; 2×Pfu PCR Master Mix 高保真酶购自杭州宝赛生物科技有限公司。

氨基酸标准品 L-瓜氨酸购自 BBI 生命科学有限公司; H₂SO₄ 和 H₃PO₄ 购自洛阳昊华化学试剂有限公司; 二乙酰一肟(diacetylmonoxime)购自上海麦克林生化科技有限公司。

本研究用到的反应液配方如表 1 所示。

1.3 引物

本研究用到的引物如表 2 所示。

表 1 主要反应液配方

Table 1 Main reaction fluid formula

Reagent	Formula	Note
0.3 mol/L diacetyl monooxime	diacetyl monooxime 1.5 g, H ₂ O 50 mL	Stored at room temperature away from light
6 mol/L H ₃ PO ₄	80% H ₃ PO ₄ 41 mL, H ₂ O 100 mL	Stored at room temperature
H ₂ SO ₄ -H ₃ PO ₄ mixture	$V_{(\text{H}_2\text{SO}_4)}:V_{(\text{H}_3\text{PO}_4)}=1:3$	Stored at room temperature

表 2 瓜氨酸利用菌种筛选和鉴定所用的引物
Table 2 Primers for screening and identification of citrulline utilizing strains

Primers	Sequences (5'→3')
PTP-F	NACHACHGGCCAHACRAA
PTP-R	GTHGAYATHATGGTMTTYAT
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

Degenerate base codes Y=C/T, R=A/G, H=A/C/T, B=G/T/C, N=A/T/C/G.

1.4 菌株分离和培养

从腊肠、大酱、酱油和泡菜等材料中筛选可以利用瓜氨酸的细菌,由于瓜氨酸参与的乳酸菌精氨酸代谢途径(ADI)会有 NH_3 产生,使菌落周围 pH 发生改变,故在筛选培养基中加入溴甲酚紫作为酸碱指示剂,当培养基环境变为碱性时,培养基会发生紫色反应,由此初步筛选出 ADI 代谢途径较强的菌株。

各取适量样品编号,常温水浸泡,30 °C、180 r/min,充分振荡培养 30 min 后静置 10 min。取上清液 1 mL 进行梯度稀释至 10^{-2} – 10^{-6} ,制备待筛样品,各取 100 μL 稀释液分别涂布于筛选培养基上,30 °C 恒温静置培养 16 h。使用接种环挑取不同形态菌落,采用平板划线法,在筛选培养基上划线,分离单菌落,30 °C 恒温静置培养 16 h。挑取单菌落,接种于 MRS 培养基中纯培养,作为初筛菌株。

1.5 简并引物高通量筛选瓜氨酸利用菌株

用高压灭菌的牙签或枪头挑取具有溴甲酚紫阳性显色反应的菌落作为 PCR 模板,利用简并引物对初筛菌株进行菌落 PCR 鉴定。PCR 反应体系为 50 μL : 上游引物和下游引物各 1 μL , 2×Es *Taq* Master Mix (Dye) DNA Polymerase 25 μL , 灭菌超纯水补至 50 μL 。PCR 反应条件为: 98 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s、48 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C

延伸 2 min。菌落 PCR 扩增结束后取 5 μL 进行 1%琼脂糖凝胶电泳。按照引物设计,若待测菌株确实含有 PTP 编码基因,则通过琼脂糖凝胶电泳检测,扩增产物在约 1 150 bp 位置处会出现电泳条带。扩增产物中有预期条带的菌株即为复筛菌株。

1.6 16S rRNA 基因的扩增和测序

使用细菌基因组提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,通用引物 27F 和 1492R 为引物,进行 16S rRNA 基因 PCR,配制反应体系为 50 μL : 2×*Pfu* PCR Master Mix 高保真酶 25 μL , 模板 DNA<50 ng, 引物 27F 1 μL , 引物 1492R 1 μL , 灭菌超纯水补至 50 μL 。PCR 反应条件为: 98 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s、50 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增结束后取 5 μL 进行 1%琼脂糖凝胶电泳。将扩增产物有约 1 500 bp DNA 片段的 PCR 原液送至擎科生物技术有限公司进行测序。

1.7 系统发育树的构建及菌种保藏

将测序成功的 16S rRNA 基因拼接序列提交 NCBI 数据库与已知菌株的 16S rRNA 基因序列比对,利用 BLAST 软件进行分析,选择相似菌株通过 MEGA 7.0.20 计算进化距离,采用 neighbor-joining 算法构建系统发育树,与待测菌株序列相似性最高的菌株所属的种,即为该菌株所属的种。

对筛选到的菌种采用甘油管保藏法,即 40% 甘油与菌液等体积均匀混合,于-80 °C 冰箱保藏。

1.8 筛选菌株胞外瓜氨酸含量的检测

将上述甘油保藏菌在 MRS 培养基中活化 12 h 后,按 1%接种量转接到 100 mL MRS 液体培养基中,30 °C、180 r/min,培养 OD_{600} 至 0.8–1.0,收集菌体转入 50 mL 含 10 mmol/L 瓜

氨酸的 MRS 液体培养基重悬, 每种菌设计 3 组平行实验, 继续 30 °C、180 r/min 培养。于 0、4、8、12 h 分别取样, 离心取上清, 将上清液稀释 200 倍制成待测样品。取待测样品 5 mL, 加入 H₂SO₄-H₃PO₄ 混合酸 2 mL, 0.3 mol/L 二乙酰一肟 0.25 mL, 避光沸水浴反应 30 min, 冷却至室温, 测定 490 nm 处吸光度, 以 Flask MRS 液体培养基作对照校准。

2 结果与分析

2.1 具有 PTP 蛋白的微生物信息学分析

将 *L. sakei* CTC494 中 PTP 蛋白的氨基酸序列导入 NCBI 数据库进行 protein blast 分析, 得到一批与 PTP 蛋白具有较高同源相似度的氨基

酸序列及其来源菌种信息。使用 MEGA 7.0.20 软件构建进化树, 如图 1 所示, 通过进化分析可得知, 与 *L. sakei* 中 PTP 蛋白高度同源的菌种主要集中于以下几个种属, 分别为 *Lactobacillus*、*Weissella*、*Pediococcus*、*Lentilactobacillus*、*Levilactobacillus* 和 *Staphylococcus*。

结合之前的研究和文献报道可发现, 具有 PTP 蛋白的菌株, 其生存环境大多数集中在一些高盐或高酸的发酵食品, 如腌肉、腊肠、豆酱、酱油曲、啤酒、黄酒和一些青储饲料中。菌株都属于可培养微生物, 且通过 MRS 培养基培养都可以正常生长, 如表 3 所示。因此, 后续使用相应的培养基从上述菌株适宜的生存环境中对瓜氨酸利用菌株进行分离。

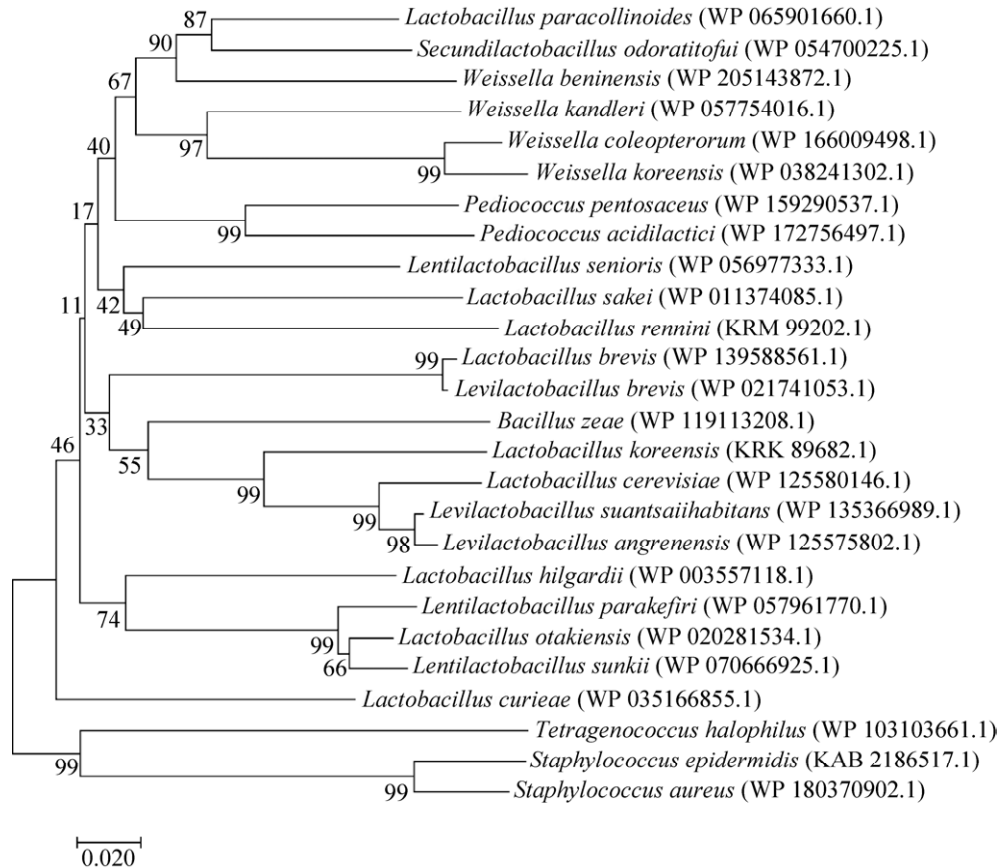


图 1 PTP 转运蛋白系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of putative transport proteins from different strains. Numbers at nodes represent the percentages of occurrence of nodes in 1 000 bootstrap trials. The scale bar represents 0.020 substitution per nucleotide position.

表 3 具有 PTP 蛋白的菌种信息

Table 3 Species information with PTP protein

Species	Source	Culture medium	Reference
<i>Weissella kandleri</i>	Koumiss	MRS	[17]
<i>Weissella koreensis</i>	Kimchi	MRS	[18]
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Fish sauce	Histidine	[19]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Dry sausage	Mannitol salt	[20]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Raw milk and ice cream	Baird-Parker	[21]
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Harbin dry sausage	MRS	[22]
<i>Lactobacillus sakei</i>	Traditionally fermented milk	MRS	[23]
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	Spoilage beer	MRS	[24]
<i>Lactobacillus rennini</i>	Rennin	MRS	[25]
<i>Lactobacillus brevis</i>	Chinese traditional paocai	MRS	[26]
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Kalarei	MRS	[27]
<i>Lactobacillus koreensis</i>	Kimchi	MRS	[28]
<i>Bacillus zeae</i>	The rhizosphere of zea mays	Tryptic soy agar	[29]
<i>Lactobacillus otakiensis</i>	Traditional Pico cheese	MRS	[30]
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Natural grass silages	MRS	[31]
<i>Lactobacillus curieae</i>	Stinky tofu brine	MRS	[32]
<i>Lentilactobacillus senioris</i>	Human faeces	MRS	[33]
<i>Weissella beninensis</i>	Submerged cassava fermentations	MRS	[34]
<i>Levilactobacillus suantsaiihabitans</i>	Suan-tsai	MRS	[35]
<i>Lentilactobacillus sunkii</i>	Silage	MRS	[36]

2.2 简并引物设计和合成

利用 MEGA 7.0.20 软件对不同菌种 PTP 蛋白的氨基酸序列进行比对, 定位出多个保守 Motif 位点, 通过比较不同 Motif 的碱基序列简并度, 并综合考虑 Motif 间的序列长度, 确定出上下游 2 段保守区域, 间隔约 1 150 bp。将保守区域 Motif 1 和 Motif 2 的氨基酸序列直译为对应三联体密码子碱基序列, 通过与从 NCBI 下载的不同菌种的 PTP 编码基因序列进行分析, 将上游引物简并度从 512 降至 216, 下游引物的简并度从 576 降至 72, 由此获得一对合适的简并引物 PTP-F 和 PTP-R, 引物设计流程如图 2 所示。设计的引物由擎科生物技术有限公司进行合成。

2.3 瓜氨酸利用菌株的高通量筛选策略

由于胞外瓜氨酸的利用主要由 2 个因素决

定, 一是胞内具有较强的瓜氨酸利用能力, 二是必须具有胞外瓜氨酸的转运能力, 基于这 2 点, 设计瓜氨酸利用菌株的高通量筛选策略。首先将筛选样品经梯度稀释、涂布于溴甲酚紫变色平板后, 获得能够高效利用胞外精氨酸, 即具有较强精氨酸脱亚氨基代谢能力的菌株。之后通过 PTP 蛋白简并引物筛选出能够将胞外瓜氨酸转运至细胞内进行代谢的菌株, 即为瓜氨酸高效利用菌株, 筛选流程如图 3 所示。

利用该筛选策略从腊肠、酱油曲料、酱醪、泡菜等样品中, 通过溴甲酚紫显色培养基分离获得 671 株初筛菌株。将初筛菌株利用 PTP 蛋白简并引物进行菌落 PCR 验证, 共筛选到 65 株在 1 150 bp 处有特异性条带的菌株, 扩增结果如图 4 所示。

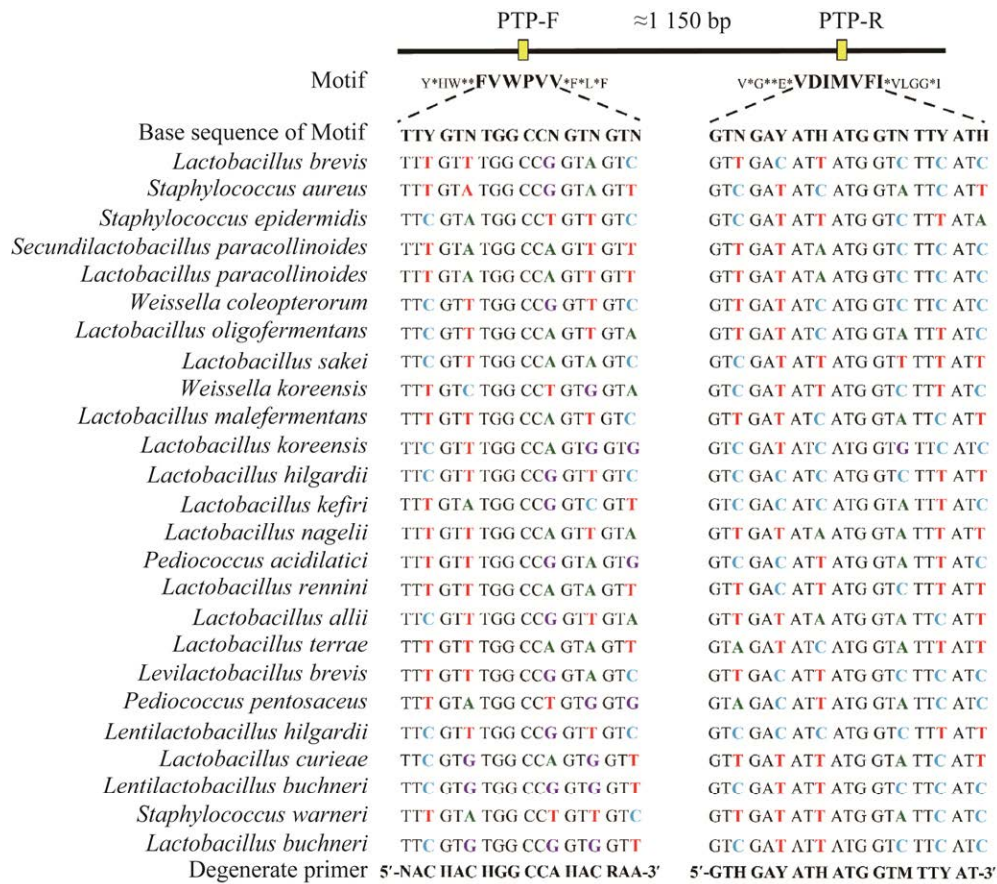


图 2 PTP 转运蛋白编码基因简并引物设计

Figure 2 Design of degenerate primers for coding gene of putative transport proteins. Degenerate base codes Y=C/T, R=A/G, H=A/C/T, B=G/T/C, N=A/T/C/G.

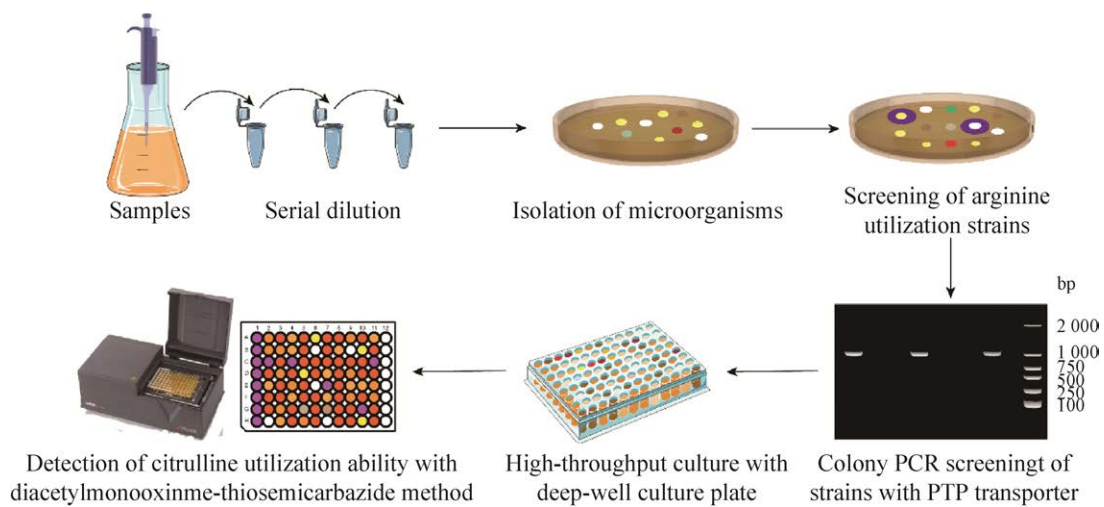


图 3 瓜氨酸高效利用菌株的高通量筛选策略

Figure 3 High-throughput screening strategy for strains with high-efficiency utilization of citrulline.

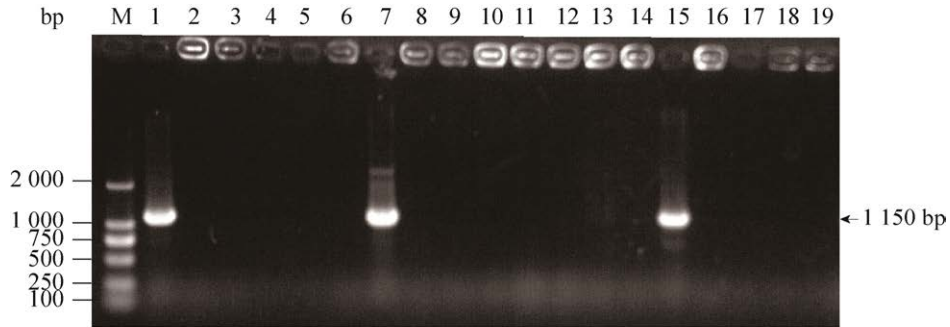


图 4 简并引物菌落 PCR 扩增产物电泳图

Figure 4 Electrophoresis diagram of colony PCR products of degeneracy primers. Lane M: DL2000 DNA marker; lane 1–19: PCR products amplified by PTP protein degeneracy primers of partial initial screening strains.

经显微形态观察、生理生化实验及 16S rRNA 基因测序，并构建 neighbor-joining 系统

进化树(图 5)，可将之归为 5 个种属，分别是广布乳杆菌属、促生乳杆菌属、片球菌属、葡萄

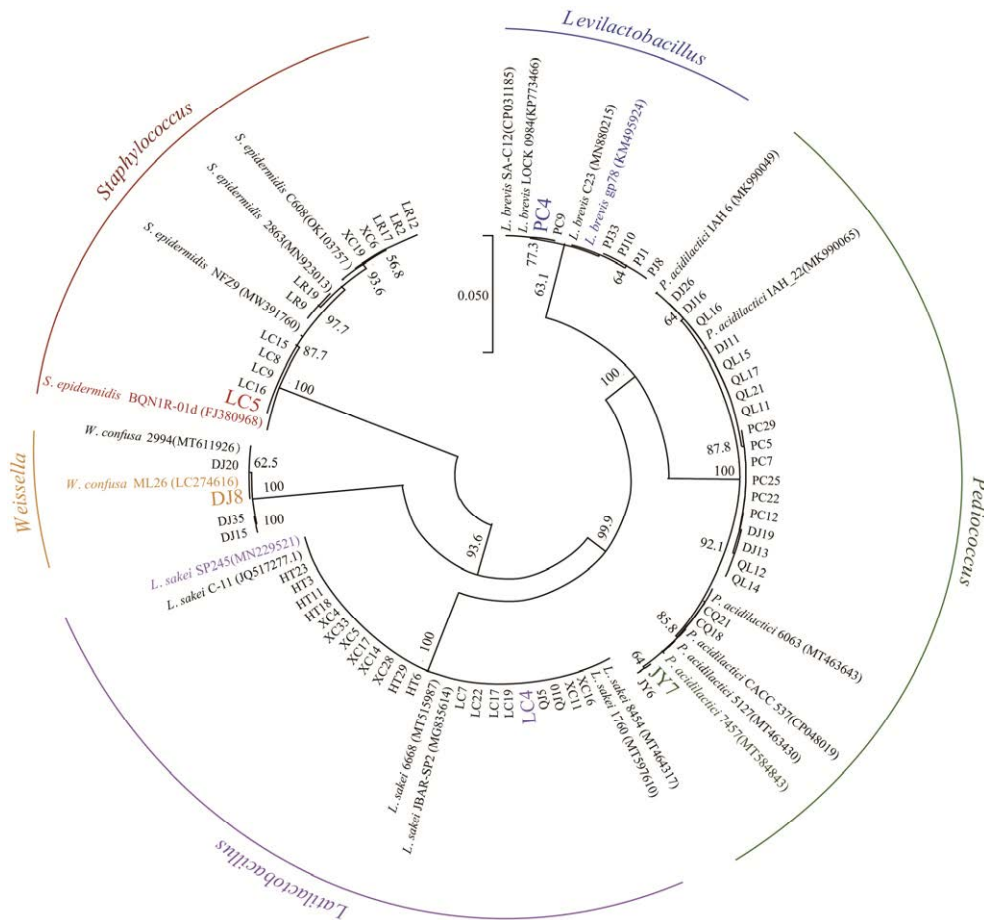


图 5 65 株筛选菌株 16S rRNA 基因系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of 16S rRNA genes of the 65 isolated strains. Numbers at nodes represent the percentages of occurrence of nodes in 1 000 bootstrap trials. The scale bar represents 0.050 substitution per nucleotide position.

球菌属和魏斯氏菌属。选取每个种属中对瓜氨酸利用能力最强的菌株, LC4 (OM149720)与 NCBI 数据库中 *L. sakei* SP245 (MN229521) 相似度最高, 一致性为 100%, 命名为清酒广布乳杆菌 *L. sakei* LC4。DJ8 (OM073986)与 *W. confusa* ML26 (LC274616) 相似度最高, 一致性为 100%、命名为融合魏斯氏菌 *W. confusa* DJ8。JY7 (OM073984)与 *P. acidilactici* 7457 (MT584843) 相似度最高, 一致性为 99.79%, 命名为嗜酸乳酸片球菌 *P. acidilactici* JY7。PC4 (OM073983)与 *L. brevis* gp78 (KM495924) 具有最高的同源相似度, 一致性为 99.80%, 命名为短促生乳杆菌 *L. brevis* PC4。LC5 (OM073985)与 *S. epidermidis* BQN1R-01d (FJ380968) 具有最高的同源相似度, 一致性为 100%, 将其命名为表皮葡萄球菌 *S. epidermidis* LC5。

2.4 分离菌株对胞外瓜氨酸的利用能力

将高通量筛选所获得的菌株, 进行瓜氨酸利用能力的测定, 如图 6 所示, 结果表明, 除 *W. confusa* DJ8 外, 其余 4 株菌在 12 h 的反应终点, 均表现出对胞外瓜氨酸的显著利用。*W. confusa* DJ8 在前 4 h 的代谢过程中, 也表现出对胞外瓜氨酸的利用能力, 在第 4 h 时将胞外瓜氨酸浓度降低了 29.69%, 但随后又出现胞外瓜氨酸浓度的持续上升。而 *L. brevis* PC4

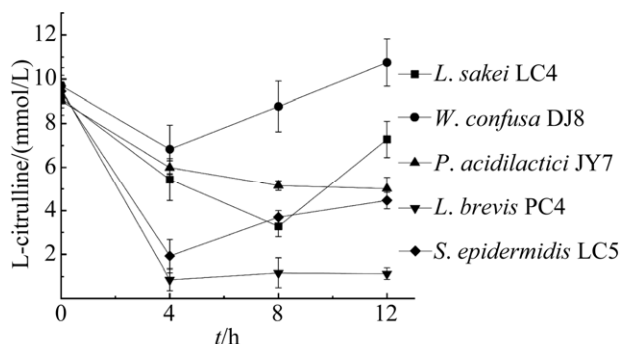


图 6 筛选菌株对胞外瓜氨酸的利用能力

Figure 6 The utilization of extracellular citrulline by the screened strains. The results were the mean values of three replicates, error bars represented standard error.

则表现出对胞外瓜氨酸最强的利用能力, 在第 4 h 时即将胞外瓜氨酸浓度降低了 91.08%, 并在之后 12 h 内, 持续保持较低的胞外瓜氨酸浓度水平。总体而言, *P. acidilactici* JY7 在 12 h 的培养过程中, 保持对胞外瓜氨酸持续的利用能力, 其余 4 株菌的胞外瓜氨酸浓度变化趋势为先降低后升高, 且发酵终点时体系内的瓜氨酸浓度低于初始值。

2.5 分离菌株瓜氨酸代谢关键基因分析

通过检测分离菌株对胞外瓜氨酸的利用能力可以发现, 虽然各分离菌株对胞外瓜氨酸的利用能力和趋势存在显著不同, 但各菌株在一定程度上都体现出对瓜氨酸的利用能力。如图 7 所示, 通过对分离菌株 PTP 蛋白编码基因与 *arc* 基因簇关键基因位置的分析可以得知, *L. sakei*、*P. acidilactici*、*L. brevis*、*S. epidermidis* 这 4 株菌在 NCBI 数据库中的模式菌株全基因组序列中, 均可找到 PTP 蛋白的同源序列并确定其在基因组中的位置。由图 7 可知, *L. sakei* 和 *L. brevis* 的 PTP 编码基因位于 *arc* 基因簇的下游, *P. acidilactici* 的 PTP 编码基因不在 *arc* 基因簇的关键功能基因簇(包括 *arcA*、*arcB*、*arcC* 和 *arcD*) 内, 而位于 *arc* 基因簇的调控基因 *arcR* 的上游。*S. epidermidis* 具有多个 *arc* 基因簇, PTP 蛋白编码基因位于其中一个基因簇的下游。以上 4 株菌株 PTP 编码基因在基因组中的位置表明, 其都位于 *arc* 基因簇内, 与瓜氨酸的代谢高度相关。

对 *W. confusa* 进行全基因组序列分析, 在其 *arc* 基因簇内未找到与 PTP 蛋白高度同源的序列, *W. confusa* 中没有以 DcuC 或 YfcC family protein 命名的蛋白, 但通过对 *W. confusa* DJ8 的简并引物 PCR 产物进行测序(NMDCN0000R4Q)和进化树分析可以发现, *W. confusa* DJ8 中的 PTP 蛋白具有与 *P. pentosaceus* JQI-7 中的 YfcC family protein 极高的同源相似度, 位于同一进化分支, 如图 8 所示。

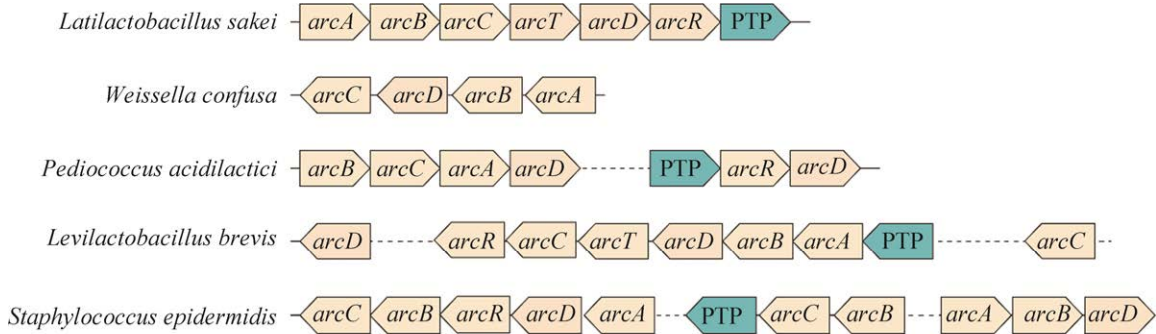


图 7 PTP 编码基因和 *arc* 基因簇的位置分布

Figure 7 Location distribution of PTP gene and *arc* gene cluster. The length of solid line occupied by a gene frame indicates that a gene is separated. The dotted lines indicate large distances that is multiple genes apart.

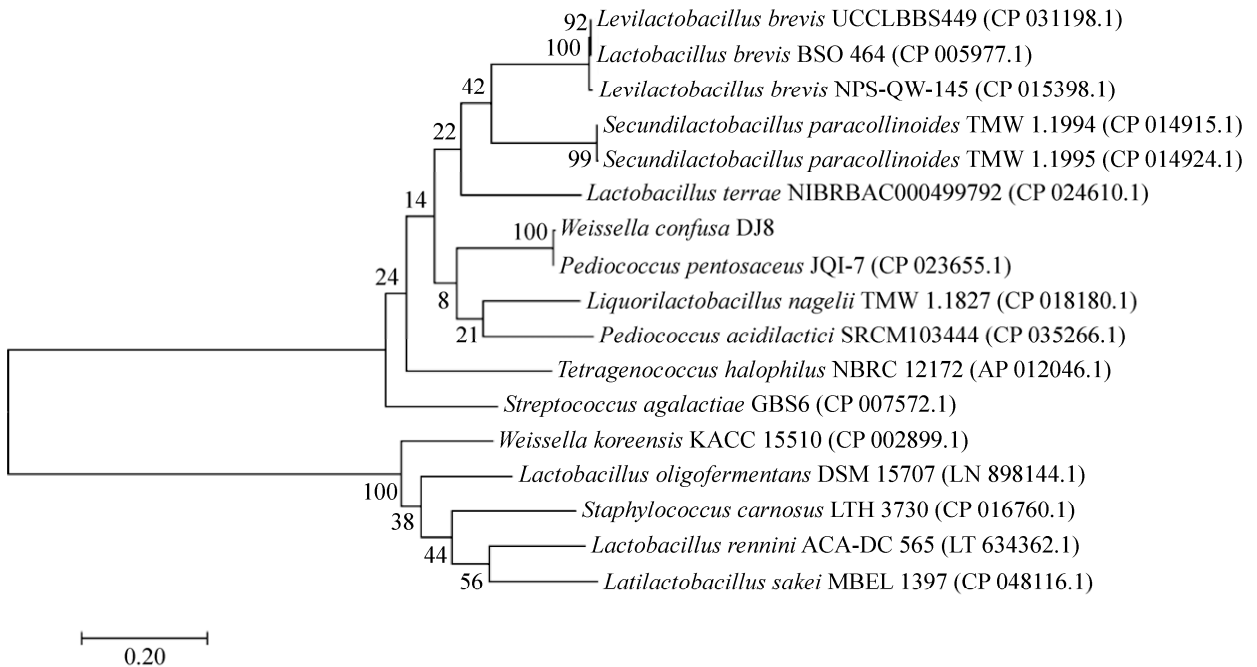


图 8 *W. confusa* DJ8 的 PTP 编码基因极大似然法系统发育树

Figure 8 Phylogenetic tree of *W. confusa* DJ8 gene sequence amplified by degenerative primers of PTP. Numbers at nodes represent the percentages of occurrence of nodes in 1 000 bootstrap trials. The scale bar represents 0.20 substitution per nucleotide position.

3 讨论

3.1 用于高通量筛选的简并引物有效性

本研究以细菌中具有瓜氨酸转运功能的 PTP 蛋白为依据, 通过分析其氨基酸保守区域, 设计出一对用于筛选瓜氨酸降解菌株的简并引

物, 并基于此设计了瓜氨酸利用菌株的高通量筛选策略。利用该策略从不同的发酵体系中筛选出 65 株具有瓜氨酸利用能力的菌株。在利用简并引物通过菌落 PCR 对菌株进行筛选过程中, 所获得的 PCR 产物特异性较强, 电泳条带单一, 如图 4 所示, 表现出其对 PTP 转运蛋白良好的

识别度。通过鉴定可将筛选菌株归于 5 个种, 它们分别是 *L. sakei*、*W. confusa*、*P. acidilactici*、*L. brevis* 和 *S. epidermidis*。如图 1 所示, *S. epidermidis* 的获得表明该引物对位于进化过程中处于较远分支的瓜氨酸利用菌株, 依然具有良好的筛选效果, 表明该简并引物兼容性较好, 可用于识别多物种中的 PTP 转运蛋白。

3.2 PTP 蛋白与胞外瓜氨酸利用的关联分析

在分离获得的菌种中, *L. sakei*^[15]、*P. acidilactici*^[12]和 *L. brevis*^[16,37]均有相关报道证实其具有对胞外瓜氨酸的利用能力, 且 *L. sakei* 和 *L. brevis* 中 PTP 蛋白已被证明与菌株对胞外瓜氨酸的利用密切相关。*P. acidilactici*、*S. epidermidis* 等菌的基因组信息中, 也显示了具有与 *L. sakei* 的 PTP 蛋白高度同源的蛋白序列。在 NCBI 模式菌株基因组信息中, *W. confusa* 中没有与 PTP 蛋白高度同源的蛋白序列。有研究表明, 环境中分离到的 *W. confusa* 中存在 2 种对胞外瓜氨酸的积累表现型, 一种在代谢过程中会大量利用精氨酸积累瓜氨酸, 盐胁迫条件下会积累更多的瓜氨酸; 而另一种无盐条件下少量利用精氨酸但无瓜氨酸的积累, 在有盐条件下大量利用精氨酸但不积累瓜氨酸^[38]。方芳等的研究结果表明, 从酱油成曲中分离得到的 *W. confusa*, 在检测培养基中不利用瓜氨酸^[39]。这就表明, *W. confusa* 在对胞外瓜氨酸的利用能力上, 可能具有多种表现形式。通过测序发现, 分离菌株 *W. confusa* DJ8 中的部分 PTP 编码基因具有与 *P. pentosaceus* 中 YfcC family protein 编码基因 98.94% 的相似度, 表明 PTP 蛋白编码基因在不同物种间存在一定程度的基因横向转移现象。

3.3 筛选菌株对胞外瓜氨酸的利用特性及高通量筛选策略的优化

通过对分离菌株胞外瓜氨酸利用能力的检

测可以看出, 虽然具有 PTP 蛋白的菌株都表现出了对胞外瓜氨酸的利用, 但其利用趋势和能力却存在很大差异。所有菌株在 4 h 内, 都表现出了对胞外瓜氨酸的显著利用能力, 但随着发酵时间的延长, 部分菌株如 *W. confusa* 又出现了明显的胞外瓜氨酸积累现象。基于此现象, 在进行瓜氨酸高效利用菌株的筛选过程中, 应在最后的复筛阶段对菌株的胞外瓜氨酸持续利用能力进行检测, 才能更加准确地分析筛选菌株对瓜氨酸的利用能力。如果在复筛过程中, 想要通过固定时长来尽可能多地获得具有潜在瓜氨酸利用能力的菌株, 则应将反应时长控制在 4 h 左右, 从而避免瓜氨酸的重积累现象对筛选造成影响。而造成这种现象的原因, 可能是由于菌株中瓜氨酸利用途径的关键酶 OTC 酶所催化的是一个双向反应, 并且从热力学角度分析, 该反应更容易向瓜氨酸生成的方向发生。

3.4 *arc* 基因簇结构与对胞外瓜氨酸的利用能力

对瓜氨酸利用菌株的 *arc* 基因簇结构进行解析可以发现, 不同菌种间的 *arc* 基因簇存在较大差异, 其关键功能基因 *arcA*、*arcB*、*arcC* 和 *arcD* 的数量和位置各不相同, 如图 7 所示。廖淡宜的研究结果表明, 酱醪中分离获得的 *T. halophilus* 菌株, 具有瓜氨酸降解能力, 同时存在多种 *arc* 基因簇的构型, *arcB* 和 *arcC* 基因数量较多的 *T. halophilus* 菌株, 其代谢精氨酸和瓜氨酸的能力也较强^[40]。在本研究中, 具有较多 *arcB* 和 *arcC* 编码基因的 *S. epidermidis* 和 *L. brevis* 也表现出了相对较强的瓜氨酸利用能力, 但其瓜氨酸利用能力又并非完全与 *arcB* 和 *arcC* 基因数量相关, 具有较少 *arcB* 和 *arcC* 编码基因的 *L. brevis* PC4 具有比 *S. epidermidis* 更强的瓜氨酸利用能力。综上所述可以看出, 不同的菌种, 甚至相同菌种中的不同菌株, 其瓜氨酸关键代谢基因的构成及

对瓜氨酸的利用能力也可能存在显著差异。通过高通量筛选策略,获得更多具有潜在瓜氨酸利用能力的菌株,并通过复筛对其利用能力进行比较,是获得瓜氨酸高效降解菌株的有效途径。

3.5 *L. brevis* 在对发酵体系中瓜氨酸控制的重要作用

利用所建立的高通量筛选策略,从不同的环境中获得了多株具有瓜氨酸降解能力的菌株。在这些菌株中,*L. brevis* PC4 具有最强的瓜氨酸利用能力,能在 4 h 内利用 9.11 mmol/L 的瓜氨酸。Yu 等和 Zhou 等的研究结果也指出,*L. brevis* 具有较强的重吸收瓜氨酸的能力,可用于黄酒中瓜氨酸的消除,从而控制 EC 的产生^[41-42]。这些结论都表明,*L. brevis* 是一类具有较强瓜氨酸利用能力的微生物菌种,可在食品发酵生产过程中用于控制瓜氨酸浓度,在保障发酵食品安全性方面具有一定应用价值。进一步的研究可以围绕 *L. brevis* 对胞外瓜氨酸的吸收及代谢途径展开,从而为瓜氨酸利用菌株的基因工程改造提供理论基础。

3.6 现有研究中对瓜氨酸利用菌株的筛选

目前,针对瓜氨酸利用菌株,所建立的筛选策略较少,仅有一件授权发明专利设计了通过检测 ADI 途径关键基因拷贝数,从而确定瓜氨酸高效利用菌株的方法^[39]。但该方法需对研究对象进行全基因组提取,并在获得目标菌株的全基因组信息后,通过设计特异性引物才能够实现筛选,因而无法实现对多来源菌株的高通量筛选。Yu 等分离到的对胞外瓜氨酸有较强利用能力的 *L. brevis* 2-34 菌株,是在分离和筛选黄酒中瓜氨酸产生菌的过程中,通过检测胞外瓜氨酸浓度变化获得^[41]。该菌株可在 24 h 内完全利用培养基中的 5 g/L 瓜氨酸。但该菌株的筛选获得,并不是依靠理性设计的高通量菌株筛选方案,如果应用于实际分离,会存在工作量大、易漏筛等多种问题,不具有普适性和参考意义。Arena 等也对

瓜氨酸利用菌株进行了研究,所使用的瓜氨酸利用菌株 *Lactobacillus hilgardii* X1B、*Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*) X₂L 和 *P. pentosaceus* 12p 均为实验室前期从葡萄酒中筛选获得并保藏^[43-44]。3 株瓜氨酸利用菌株中,*L. hilgardii* 和 *P. pentosaceus* 均为具有 PTP 转运蛋白的菌株,如图 1 所示,进一步证明了 PTP 转运蛋白在瓜氨酸利用菌株中的重要作用。但未能找到关于筛选方法的报道。

4 结论

本研究为从多种发酵体系中大范围筛选瓜氨酸降解菌提供了理论和技术支持,同时,研究结果也为 PTP 蛋白在瓜氨酸利用途径中的功能提供支撑和证明,为后期 PTP 蛋白功能研究和利用基因工程构建瓜氨酸高效利用重组菌株提供有力支持。

参考文献

- [1] 陈丽叶. 饮料酒中氨基甲酸乙酯的研究进展. 食品工业, 2020, 41(8): 235-239.
Chen LY. Research progress on ethyl carbamate in alcoholic beverages. *The Food Industry*, 2020, 41(8): 235-239. (in Chinese)
- [2] 杨佳, 李新生, 耿敬章, 徐悦菱, 刘智强, 裴金金. 黄酒中氨基甲酸乙酯的研究进展. 中国酿造, 2020, 39(3): 7-11.
Yang J, Li XS, Geng JZ, Xu YL, Liu ZQ, Pei JJ. Research progress on ethyl carbamate of Huangjiu. *China Brewing*, 2020, 39(3): 7-11. (in Chinese)
- [3] Zhao XR, Du GC, Zou HJ, Fu JW, Zhou JW, Chen J. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 32(2): 97-107.
- [4] Liu XF, Zhang Q, Zhou ND, Tian YP. Expression of an acid urease with urethanase activity in *E. coli* and analysis of urease gene. *Molecular Biotechnology*, 2017, 59(2-3): 84-97.
- [5] 曹帅, 吴群, 徐岩. 白酒固态发酵过程中不同品种高

- 梁原料对氨基甲酸乙酯形成的影响. 食品与生物技术学报, 2016, 35(7): 677–683.
- Cao S, Wu Q, Xu Y. Effects of different *Sorghum* cultivars on the formation of ethyl carbamate in the solid-state fermentation process of Chinese liquor. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(7): 677–683. (in Chinese)
- [6] 丁霞, 李巧玉, 刘凡, 曾伟主, 陈坚, 堵国成, 方芳. 降解浓香型白酒中氨基甲酸乙酯菌株的筛选及产酶特性研究. 食品与发酵工业, 2018, 44(7): 29–36.
- Ding X, Li QY, Liu F, Zeng WZ, Chen J, Du GC, Fang F. Isolation of microbial strains for degradation of ethyl carbamate in Luzhou-flavour Baijiu and characterization of corresponding enzymes. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(7): 29–36. (in Chinese)
- [7] 孟庆达, 周新虎, 陈翔, 堵国成, 陈坚, 方芳. 白酒酿造过程酒醅中尿素的控制与减少. 食品与发酵工业, 2017, 43(8): 33–39.
- Meng QD, Zhou XH, Chen X, Du GC, Chen J, Fang F. Reduction of urea in fermented grains during Chinese liquor brewing process. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(8): 33–39. (in Chinese)
- [8] 周建立, 康振, 刘庆涛, 堵国成, 陈坚. 重组酸性脲酶对黄酒中尿素和氨基甲酸乙酯的降解应用. 生物工程学报, 2016, 32(1): 74–83.
- Zhou JL, Kang Z, Liu QT, Du GC, Chen J. Degradation of urea and ethyl carbamate in Chinese Rice wine by recombinant acid urease. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(1): 74–83. (in Chinese)
- [9] Matsudo T, Aoki T, Abe K, Fukuta N, Higuchi T, Sasaki M, Uchida K. Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41(3): 352–356.
- [10] 仇钰莹, 方芳, 周新虎, 陈翔, 张龙云, 堵国成, 陈坚. 酒醅中精氨酸利用菌株的分离筛选及其对浓香型白酒中瓜氨酸积累的影响. 微生物学报, 2016, 56(10): 1638–1646.
- Qiu YY, Fang F, Zhou XH, Chen X, Zhang LY, Du GC, Chen J. Characterization of arginine utilization strains from fermented grains and evaluation of their contribution to citrulline accumulation in Chinese Luzhou-flavor spirits. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(10): 1638–1646. (in Chinese)
- [11] Li XF, Han RM, Bao T, Osire T, Zhang X, Xu MJ, Yang TW, Rao ZM. Citrulline deiminase pathway provides ATP and boosts growth of *Clostridium carboxidivorans* P7. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 1–10.
- [12] 张继冉. 酱油中氨基甲酸乙酯的产生机制和消除策略研究. 江南大学博士学位论文, 2016.
- [13] Zúñiga M, Pérez G, González-Candelas F. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2002, 25(3): 429–444.
- [14] Zúñiga M, Champomier-Verges M, Zagorec M, Pérez-Martínez G. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sake*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(16): 4154–4159.
- [15] Rimaux T, Rivière A, Hebert EM, Mozzi F, Weckx S, de Vuyst L, Leroy F. A putative transport protein is involved in citrulline excretion and re-uptake during arginine deiminase pathway activity by *Lactobacillus sakei*. *Research in Microbiology*, 2013, 164(3): 216–225.
- [16] 刘晓慧, 李晓敏, 禹伟, 吴殿辉, 陆健. 短乳杆菌 2-34 中瓜氨酸转运蛋白的鉴定. 微生物学通报, 2019, 46(9): 2249–2257.
- Liu XH, Li XM, Yu W, Wu DH, Lu J. Identification of a putative citrulline transporter in *Lactobacillus brevis* 2-34. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2249–2257. (in Chinese)
- [17] 孟和毕力格, 乌日娜, 王立平, 杨续金, 徐杰, 董莹, 孙志宏, 张和平. 不同地区酸马奶中乳杆菌的分离及其生物学特性的研究. 中国乳品工业, 2004, 32(11): 6–11.
- Meng H, Wu RN, Wang LP, Yang XJ, Xu J, Dong Y, Sun ZH, Zhang HP. Isolation and identification of *Lactobacillus* from koumiss collected in Inner Mongolia and People's Republic of Mongolia. *China Dairy Industry*, 2004, 32(11): 6–11. (in Chinese)
- [18] Lee JS, Lee KC, Ahn JS, Mheen TI, Pyun YR, Park YH. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(4): 1257–1261.
- [19] Satomi M, Furushita M, Oikawa H, Yoshikawa-Takahashi M, Yano Y. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. *International Journal of Food Microbiology*, 2008,

- 126(1-2): 202–209.
- [20] Wang H, Liu JM, Chen Q, Kong BH, Sun FD. Biochemical properties of extracellular protease from *Staphylococcus epidermidis* isolated from Harbin dry sausages and its hydrolysis of meat protein. *Food Bioscience*, 2021, 42: 101130.
- [21] Abdeen EE, Mousa WS, Abdel Salam SY, Al-Maary KS, Mubarak AS, Moussa IM, Hemeg HA, Almuzaini AM, Alajaji AI, Alsubki RA, Elbehiry A. Antibiogram and phylogenetic diversity of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains from milk products and public health implications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020, 27(8): 1968–1974.
- [22] Zhang H, Zhang C, Liu HT, Chen Q, Kong BH. Proteomic response strategies of *Pediococcus pentosaceus* R1 isolated from Harbin dry sausages to oxidative stress. *Food Bioscience*, 2021, 44(PartA): 101364.
- [23] Toukam LL, Tatsinkou Fossi B, Taiwe GS, Bila RB, Feugaing Sofeu DD, Ivo EP, Achidi EA. *In vivo* antimalarial activity of a probiotic bacterium *Lactobacillus sakei* isolated from traditionally fermented milk in BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 280: 114448.
- [24] Suzuki K, Funahashi W, Koyanagi M, Yamashita H. *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(1): 115–117.
- [25] Chenoll E, Macián MC, Aznar R. *Lactobacillus rennini* sp. nov., isolated from rennin and associated with cheese spoilage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(2): 449–452.
- [26] Li HX, Gao DD, Cao YS, Xu HY. A high γ -aminobutyric acid-producing *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai. *Annals of Microbiology*, 2008, 58(4): 649–653.
- [27] Bhagat D, Raina N, Kumar A, Katoch M, Khajuria Y, Slathia PS, Sharma P. Probiotic properties of a phytase producing *Pediococcus acidilactici* strain SMVDUDB2 isolated from traditional fermented cheese product, Kalarei. *Scientific Reports*, 2020, (1): 1–11.
- [28] Bui TPN, Kim YJ, In JG, Yang DC. *Lactobacillus koreensis* sp. nov., isolated from the traditional Korean food kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(4): 772–776.
- [29] Kämpfer P, Busse HJ, McInroy JA, Hu CH, Kloepper JW, Glaeser SP. *Bacillus zeae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Zea mays*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1241–1246.
- [30] Ribeiro SC, Domingos-Lopes MFP, Stanton C, Ross RP, Silva CC. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus otakiensis* and other *Lactobacillus* sp. isolated from traditional Pico cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 2018, 71(4): 1012–1017.
- [31] Josson K, Scheirlinck T, Michiels F, Platteeuw C, Stanssens P, Joos H, Dhaese P, Zabeau M, Mahillon J. Characterization of a gram-positive broad-host-range plasmid isolated from *Lactobacillus hilgardii*. *Plasmid*, 1989, 21(1): 9–20.
- [32] Lei X, Sun GP, Xie JL, Wei DZ. *Lactobacillus curieae* sp. nov., isolated from stinky tofu brine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(7): 2501–2505.
- [33] Oki K, Kudo Y, Watanabe K. *Lactobacillus saniviri* sp. nov. and *Lactobacillus senioris* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(3): 601–607.
- [34] Padonou SW, Schillinger U, Nielsen DS, Franz CMAP, Hansen M, Hounhouigan JD, Nago MC, Jakobsen M. *Weissella beninensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus *Weissella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(9): 2193–2198.
- [35] Lin ST, Wang LT, Wang HM, Tamura T, Mori K, Huang LN, Watanabe K. *Lactobacillus suantsaicola* sp. nov. and *Lactobacillus suantsaihabitans* sp. nov., isolated from Suan-tsai, a traditional fermented mustard green product of Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(5): 2972–2980.
- [36] Doi K, Nishizaki Y, Kimura H, Kitahara M, Fujino Y, Ohmomo S, Ohshima T, Ogata S. Identification of thermo tolerant lactic acid bacteria isolated from silage prepared in the hot and humid climate of Southwestern Japan. *SpringerPlus*, 2013, 2(1): 1–12.

- [37] 刘晓慧. 短乳杆菌 2-34 瓜氨酸转运蛋白的鉴定及功能研究. 江南大学硕士学位论文, 2019.
- [38] 贾爱娟, 周凯, 孙远明, 徐振林, 陈元佳, 韦晓群. 酱油发酵过程中融合魏斯氏乳酸菌促进瓜氨酸的积累. 现代食品科技, 2018, 34(8): 99–104.
Jia AJ, Zhou K, Sun YM, Xu ZL, Chen YJ, Wei XQ. Citrulline accumulated by *Weissella confusa* during soy sauce fermented process. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(8): 99–104. (in Chinese)
- [39] 方芳, 陈坚, 廖淡宜, 杨怡敏, 堵国成. 一种高效筛选能充分利用瓜氨酸的乳酸菌的方法, CN104312953A. 2015.
- [40] 廖淡宜. 酱醪中嗜盐四联球菌的分离及特性研究. 江南大学硕士学位论文, 2015.
- [41] Yu W, Xie GF, Wu DH, Li XM, Lu J. A *Lactobacillus brevis* strain with citrulline re-uptake activity for citrulline and ethyl carbamate control during Chinese rice wine fermentation. *Food Bioscience*, 2020, 36: 100612.
- [42] Zhou WY, Shu Q, Zhang XL, Chen QH. Application of mixed-culture with *Lactobacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* to Chinese yellow rice wine brewing for ethyl carbamate regulation. *Food Control*, 2021, 122: 107821.
- [43] Arena ME, Saguir FM, Manca de Nadra MC. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 52(3): 155–161.
- [44] Arena ME, Manca de Nadra MC. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Research in Microbiology*, 2005, 156(8): 858–864.

(本文责编 张晓丽)