

国家自然科学基金面上项目 (31771949) 资助
河南省高校科技创新人才支持计划 (17HASTIT037) 资助

酸土脂环酸芽孢杆菌 芽孢在低pH条件下萌发的 蛋白组学研究

焦凌霞 何承云 冯鑫 著

 中国农业出版社

国家自然科学基金面上项目 (31771949) 资助

河南省高校科技创新人才支持计划 (17HASTIT037) 资助

酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢在 低 pH 条件下萌发的蛋白组学研究

焦凌霞 何承云 冯鑫 著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢在低 pH 条件下萌发的蛋白组学研究 / 焦凌霞, 何承云, 冯鑫著. —北京: 中国农业出版社, 2018. 7

ISBN 978-7-109-24345-3

I. ①酸… II. ①焦… ②何… ③冯… III. ①芽孢杆菌属—发芽—蛋白质—基因组—研究 IV. ①Q939.124

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 157068 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码 100125)

责任编辑 王玉英

北京印刷一厂印刷 新华书店北京发行所发行
2018 年 7 月第 1 版 2018 年 7 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 3.125

字数: 100 千字

定价: 30.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内 容 简 介

本书研究了不同营养因子对酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢形成及 pH 对其芽孢萌发的影响,通过芽孢萌发过程中的蛋白组学研究,对参与酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢萌发的差异蛋白进行 Gene Ontology 和 KEEG 分析,解析差异表达蛋白的分子功能及其参与的代谢途径,筛选在低 pH 条件下该菌芽孢萌发密切相关的差异蛋白,揭示其芽孢在低 pH 条件下萌发生长的调控机制,为控制酸土脂环酸芽孢杆菌污染及修正低 pH 食品的巴氏杀菌工艺提供理论依据。

前 言

酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) 具有嗜酸、耐热、产芽孢和强抗逆性等生理生化特征,能经受传统的巴氏灭菌过程而存活,因而会导致果汁产品腐败变质、出现沉淀和产生难闻气味,丧失商品价值。该菌主要存在于土壤及水果加工产品中,最早在巴氏灭菌苹果汁中被发现,随后相继在橙汁、番茄汁、菠萝汁、西番莲汁、葡萄汁、芒果汁及罐装番茄丁等产品中都检出了酸土脂环酸芽孢杆菌。目前,由酸土脂环酸芽孢杆菌引起的腐败变质给果汁加工业造成了巨大的经济损失。内生芽孢是细菌生长的特定阶段,它的形成与菌种本身有关,同时芽孢形成还受到营养物质及环境因素的影响,该菌芽孢具有更强的耐高温高酸特性,当外部条件适宜时迅速萌发并生长繁殖,引起低 pH 食品腐败变质,对低 pH 食品工业的巴氏灭菌工艺提出严峻的挑战。研究认为,消除酸土脂环酸芽孢杆菌污染是防止酸性饮料变质的关键,目前该菌的危害控制已成为食品研究领域普遍关注的问题。

芽孢萌发是细菌开启生长繁殖的关键环节,同时失去极端抗性,是其危害控制的重要阶段。本书研究了培养基中葡萄糖、酵母浸粉、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 等成分对酸土脂环酸芽孢杆菌的菌体生长和芽孢形成的影响,并通过芽孢菌悬液光密度检测和环境扫描电镜观察芽孢形态变化,确定了酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢萌发的最适宜 pH。利用 Label-free 技术筛选在低 pH 条

件下参与酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢萌发的差异蛋白，并对其分子功能及参与的代谢途径进行解析，揭示其芽孢在低 pH 条件下萌发生长的调控机制，为控制酸土脂环酸芽孢杆菌污染引起的食品腐败变质提供理论依据。

本书的出版得到国家自然科学基金面上项目（31771949）和河南省高校科技创新人才支持计划（17HASTIT037）的资助，在此表示衷心的感谢！由于编者的专业水平有限，书中疏漏之处，恳请各位专家学者批评指正！

焦凌霞

2018 年 3 月

目 录

前言

第一章 绪论	1
一、酸土脂环酸芽孢杆菌	1
(一) 酸土脂环酸芽孢杆菌的特性	1
(二) 酸土脂环酸芽孢杆菌的耐热性	2
(三) 酸土脂环酸芽孢杆菌的危害	4
(四) 酸土脂环酸芽孢杆菌的鉴定与检测	6
(五) 酸土脂环酸芽孢杆菌的控制	7
二、细菌芽孢的结构及生理特性	10
(一) 芽孢结构	10
(二) 芽孢形成	12
(三) 芽孢复苏	14
三、非标记蛋白组学分析	17
(一) 基于鉴定蛋白的肽段数的定量方法	18
(二) 基于质谱峰强度的定量方法	19
第二章 营养因子对酸土脂环酸芽孢杆菌生长及 芽孢形成的影响	21
一、材料与方法	22
(一) 材料与仪器	22
(二) 培养基制备	23

(三) 试验方法	23
(四) 数据处理	25
二、结果分析	26
(一) 酸土脂环酸芽孢杆菌生长及芽孢形成	26
(二) 碳源对酸土脂环酸芽孢杆菌生长及芽孢形成的影响	27
(三) 氮源对酸土脂环酸芽孢杆菌生长及芽孢形成的影响	28
(四) 无机盐对酸土脂环酸芽孢杆菌生长及芽孢形成的影响	29
(五) 不显著因素交互作用对酸土脂环酸芽孢杆菌生长和芽孢形成的影响	32
三、结论	34
第三章 pH 对酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢萌发的影响	35
一、材料与方法	36
(一) 主要仪器	36
(二) 菌种与培养基	36
二、试验方法	36
(一) 芽孢收集	36
(二) pH 对酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢萌发率的影响	38
(三) pH 对酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢萌发形态的影响	38
三、结果与分析	38
(一) pH 对酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢萌发率的影响	38
(二) pH 对萌发过程中的酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢形态的影响	39
四、讨论	42

第四章 Label-free 技术筛选酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢 低 pH 下萌发过程的差异表达蛋白	44
一、仪器和试剂	45
二、试验方法	46
(一) 菌体蛋白样品的制备、定量和检测	46
(二) 蛋白质的 FASP 酶解	46
(三) 酶解产物的 LCMS/MS 分析	47
(四) Maxquant 的非标记分析	47
(五) 生物信息学分析	47
(六) RNA 提取及实时定量 PCR 验证	48
(七) 数据分析	50
三、结果与分析	50
(一) 总蛋白浓度及各组样品平行性	50
(二) LC-ESI-MS/MS 分析芽孢在低 pH 下萌发时的 差异表达蛋白	51
(三) 芽孢萌发相关蛋白的生物信息学分析	51
(四) 实时定量 PCR 验证显著差异蛋白的 基因表达	53
四、讨论	53
附表	60
附表 1 差异表达蛋白	60
附表 2 KEGG 通路分析	67
参考文献	75

第一章 绪 论

一、酸土脂环酸芽孢杆菌

(一) 酸土脂环酸芽孢杆菌的特性

酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) 是耐酸、耐热、好氧型的革兰氏阳性芽孢杆菌, 呈杆状、短杆状或棒状, 大小为 $(2.9 \sim 4.3) \mu\text{m} \times (0.6 \sim 0.8) \mu\text{m}$, 在不利于营养菌体生长的条件下形成近端或终端椭圆形芽孢, 大小为 $(1.5 \sim 1.8) \mu\text{m} \times (0.9 \sim 1.0) \mu\text{m}$, 在固体培养基中 45°C 培养 1~2d 可形成边缘不整齐、表面光滑黏稠、不易挑起的乳白色圆形菌落, 有些菌落中间颜色较深^[1-4]。其芽孢在典型的巴氏杀菌 (92°C , 10s) 仍能够存活, 营养菌体在温度 $42 \sim 55^{\circ}\text{C}$ 、pH3.5~4.5 可以很好地繁殖生长。目前, 已有多名学者对其生理特性、碳源的利用、化学特性等进行了研究 (表 1-1)。

表 1-1 酸土脂环酸芽孢杆菌的特性

特性	实验项目					
生理特性	触酶	氧化酶	明胶液化	吡啶反应	淀粉水解	V-P 试验
	+	-	+	-	-	V
	氮源利用	脲酶试验	5%NaCl	硝酸盐	柠檬酸盐	
碳源利用	+	+	-	+	+	
	L-阿拉伯糖	D-甘露	D-葡萄糖	D-木糖	D-海藻糖	
	+	+	+	+	V	

注: 数据来自 Darland 和 Brock, 特性依据 *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM3922^T 菌株。+: 阳性反应, -: 阴性反应, V: 分离株之间可变。

(二) 酸土脂环酸芽孢杆菌的耐热性

通常我们将可以在 $40\sim 100^{\circ}\text{C}$ 生长的细菌称为嗜热菌^[5]。酸土脂环酸芽孢杆菌属是典型的嗜酸嗜热菌，其营养细胞 80°C 处理 $10\sim 20\text{min}$ 即可全部杀死^[6]，但其芽孢具有更强的耐热性。

1. 影响酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢耐热性的因素

不同的酸土脂环酸芽孢菌株菌属的差异、芽孢的形成温度、pH、可溶性固体含量 (SS)、二价阳离子和处理温度等因素都影响着芽孢的耐热性^[4]。在 pH4.0 McIlvaine 缓冲液中，酸土脂环酸芽孢杆菌 AB-1 菌株芽孢的耐热性约是 DSM2498 菌株的两倍；较高温度培养菌体生长可以增加内生芽孢的耐热性，当芽孢形成温度从 45°C 增加到 65°C 时， D_{110} 值呈线性增加，并且随着 pH 的降低，酸土脂环酸芽孢杆菌的耐热性呈线性下降，在 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 温度区间，这一趋势更加明显^[6]；酸土脂环酸芽孢杆菌内生芽孢与其他芽孢杆菌属物种相比，在较低 pH 下能够更强地结合 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} ， Ca^{2+} 螯合二吡啶甲酸 (DPA) 形成 Ca-DPA，增加芽孢耐热性^[7]；果汁中可溶性固体含量 (SS) 也影响芽孢的耐热性，浓缩果汁中的芽孢比稀释果汁中的更难消除^[8]；芽孢的耐热性随温度升高呈非线性下降，如在苹果汁中，当温度升高 2°C (95°C 增加到 97°C)，芽孢的耐热性从 2.82min 降到 0.57min^[9]。

2. 酸土脂环酸芽孢杆菌的耐热机理

根据目前的研究结果，酸土脂环酸芽孢杆菌独特的生理适应能力 and 嗜酸耐热机理研究主要包括以下三个方面：

(1) 细胞膜化学成分组成 研究表明，脂环酸芽孢杆菌属

的细胞膜中含有比较罕见的 ω -环状脂环酸和藿烷类化合物结构, 结构特殊的环状脂肪酸的密封环为脂环酸芽孢杆菌的细胞膜形成了一个保护层, 降低了细胞中的小分子物质在高温环境下的扩散率, 从而保护细胞的结构, 使其可以在高温、低 pH 等不良环境条件下生存^[10]。但该属中也有部分菌株只含有直链或支链饱和脂肪酸。2003 年 Goto 等从混合酸性果汁中分离出一株嗜酸耐热内生孢子菌 (*A. pomorum*), 该菌细胞膜中只含有顺式和反式支链脂肪酸, 而不含有任何一种 ω -脂环酸^[11]。因此, 细胞膜中含有 ω -脂环酸只是该属细菌嗜酸耐热的影响因素之一, 并非主导因素。

(2) 类脂的特殊结构 嗜热菌细胞膜中的双层类脂含有很多复合类脂, 随环境温度升高, 一些热稳定性好的直链饱和脂肪酸量也明显增加, 而热稳定性低的不饱和脂肪酸量则明显降低。另外, 脂环酸芽孢杆菌细胞膜中醌类以 MK-7 为主, 还含有少量的 MK-6、MK-9 等, 这些特殊类脂可能对抗热抗酸有特殊的作用^[12,13]。研究所得的上述结论尚待进一步验证。

(3) 遗传物质的热稳定性 嗜热菌的 DNA 双螺旋结构中氢键的数量大于嗜温菌 DNA 的氢键数量且嗜热菌 DNA 的 G-C 碱基对含量通常高于嗜温菌 DNA 碱基对的 G-C 含量。嗜温菌 DNA 碱基对的 G-C 含量一般为 44.9%, 脂环酸芽孢杆菌属 DNA 碱基对的 G-C 含量为 51.6%~64.3%^[14], 较嗜温菌 DNA 的 G-C 含量高, 并且其 DNA 双螺旋结构中的核苷酸排列有序, 增加了碱基堆积力, 使其双螺旋结构更稳定。而且高温菌的 tRNA 的周转速度大于中温菌, 因此高温菌的代谢快, 保护了热稳定性差的代谢物, 使重要代谢产物能迅速再合成^[15]。

(4) 其他大分子的热稳定性 目前从脂环酸芽孢杆菌中分离出的多种酶类, 如酸性 α -淀粉酶^[16]、 β -1,4-葡聚糖酶 CelA4^[17]、激素敏感脂肪酶家族 (HSL) 的热稳定丝氨酸水解酶 EST2^[18] 及纤维素酶 CelG^[19] 均具有耐酸热稳定性。由于高温菌的蛋白质和酶均对热稳定, 所以脂环酸芽孢杆菌才能在高温、低 pH 环境下得以生存^[5]。

细菌对外部环境的应激反应是其基因组中大部分基因参与的一个十分复杂的过程, 涉及多种代谢调控途径。细菌面对外界生存环境的变化时, 会在短时间内通过诱导和抑制调控蛋白的表达, 有选择地合成新的蛋白或者增加急需蛋白的数量, 调节关键应激蛋白的数量和活性, 进而全局调控细胞内总蛋白的表达来抵御外界胁迫环境^[20]。由于细菌具有的独特 mRNA 降解机制使菌体内的 mRNA 更新速度很快, 平均几分钟就更新一次, 因此细菌能迅速感受外界压力并传导信号, 不断根据环境情况对蛋白合成做出调节, 有选择地合成那些可以抵御压力环境、修复损伤的蛋白, 抑制某些蛋白合成。这一复杂的反应过程, 目的是为了调控最终发挥功能的活性蛋白^[21]。

据报道, 细菌对外界环境胁迫的响应机制主要包括 σ 因子、双组分或者三组分调节系统、小分子非编码 RNA、分子伴侣蛋白、DNA 修复、毒素—抗毒素系统、严紧反应、外排泵和调节细胞被膜合成等。尽管许多调节元件在不同的细菌中是保守的, 但在不同细菌中却可能存在不同的调控机制, 研究不断发现并证明存活于特定环境中的细菌都有新的基因调节元件^[22]。

(三) 酸土脂环酸芽孢杆菌的危害

研究表明, 导致果汁浑浊、沉淀及风味改变的因素很多,

包括微生物、酚类物质、果胶、蛋白质、淀粉等，而微生物是使果汁浑浊的主要原因^[23]。1998 年的美国食品加工商协会 (NFPA) 调查显示，在美国有 35% 的果汁腐败变质都与嗜酸芽孢杆菌有关^[1]，已经在各种果汁和饮料中分离出酸土脂环酸芽孢杆菌，比如苹果、柑橘、蓝莓、芒果、百香果、梨、番茄、香蕉、杏、桃子、葡萄、番石榴、柚子和猕猴桃等果汁及果酱、调味品中也发现有酸土脂环酸芽孢杆菌^[24-32]。

酸土脂环酸芽孢杆菌糖代谢时产酸不产气，但是被污染的果汁 pH 并无变化，仅在瓶子底部看到有正常的浊度^[33]，其营养菌体在代谢过程中形成愈创木酚（2-甲氧基苯酚）、2,6-二溴苯酚和 2,6-二氯苯酚，愈创木酚是导致果汁产生烟熏味的主要代谢物。愈创木酚经常用作食品的合成调味剂，有助于一些烧烤食品的烟熏风味。例如，咖啡和大麦麦芽，却是腐败果汁最主要的产生药物化学等异味的不良风味物。其感官阈值很低，为 2.32×10^{-12} ，很容易通过嗅觉检测到^[34]，当酸土脂环酸芽孢杆菌在苹果汁中的菌体量达到 10^5 cfu/mL 时，就可以明显闻到这种不良气味。通常采用高分辨率毛细管气相色谱法或固相微萃取和离子监测质谱来检测果汁中的愈创木酚，或采用过氧化物酶氧化愈创木酚的比色测定法来检测^[35,36]。

果汁被酸土脂环酸芽孢杆菌污染后，产品并不一定会变质，还有其他因素影响酸土脂环芽孢杆菌在酸性饮料中的腐败作用，包括酸土脂环酸芽孢杆菌的浓度、储藏温度和热处理等^[4]。Bahçeci 指出在苹果汁中检测有 10^5 cfu/mL 酸土脂环酸芽孢杆菌时，可立刻产生愈创木酚，浓度为 10^3 cfu/mL，大约 30h 后产生愈创木酚；若苹果汁中含有 $10^3 \sim 10^5$ cfu/mL 酸土脂环酸芽孢杆菌，在 46℃ 条件下 75h 愈创木酚浓度就会最大，

而 25℃ 条件, 则不会产生愈创木酚; 热处理会加速内生芽孢的萌发, 导致营养菌体能够以更快的速度达到高浓度, 从而导致酸性饮品腐败^[6]。

(四) 酸土脂环酸芽孢杆菌的鉴定与检测

目前酸土脂环酸芽孢杆菌的鉴定方法分为传统鉴定方法和现代鉴定方法。传统鉴定方法主要包括形态特征 (G^+ 、产芽孢、白色、圆形菌落)、生长条件 (pH、温度) 及生理生化特征等。生理生化特征采用 API 50CHB 系统, 根据芽孢杆菌对 49 种碳源 (糖、醇) 利用情况进行鉴定。但是, 由于脂环酸芽孢杆菌的部分菌株之间糖利用情况的差异并不显著, 往往还要进一步的鉴定^[15]。传统检测法存在程序复杂、耗时等不足之处, 致使检测结果滞后, 无法及时向生产线反馈信息, 以采取相应的防范和控制措施。

现代鉴定技术有甲基萘醌分析、傅立叶红外光谱检测、16S rRNA 序列分析、PCR 等分子检测。微生物醌是能量代谢过程的电子传递体, 不同的微生物含有不同种类和分子结构的醌, 因此微生物醌的组成即醌指纹可以在一定程度上反应微生物的群体结构^[37]。傅立叶红外光谱检测 (Fourier transform infra-red spectroscopy, FT-IR) 是根据细菌生化构造的细微差异, 对脂环酸芽孢杆菌建立一个特有的“指纹图谱”, 以实现浓缩果汁中的脂环酸芽孢杆菌进行快速检测^[38]。16S rRNA 序列分析是将测得的 16S rRNA 序列与脂环酸芽孢杆菌属不同种的全序列进行 BLAST 相似性分析, 获悉测得序列与已知序列的相似性程度后进行系统发育分析。

PCR 分子检测方法由于具有检测时间短、特异性高等特

点被广泛地应用于脂环酸芽孢杆菌的检测和鉴定。Yamazaki 通过建立在 PCR 基础上的随机扩增多态性 DNA 技术 (RAPD-PCR) 成功筛选出 3 个足以区分酸土脂环酸芽孢杆菌和其他相关菌的引物: Ba-10 (5'-AACGCGCAAC-3')、F-61 (5'-CCTGTGATGGGC-3') 和 F-64 (5'-GCCGCGCCAGTA-3'), 费时 6h, 且与常规检测方法一致性很高^[39]。Barrios 等采用不对称巢式 RT-PCR 方法进行定量检测, 最小检测限度达到了 2cfu/mL^[40]。尽管使用靶向脂环酸芽孢杆菌特异性基因的 DNA 探针商业试剂盒 (例如, Vermicon AG, Germany) 可以加速检测时间, 但是富集一定数量的菌体提取 DNA, 仍需长达一周的培养时间。Hünniger 等通过磁分离从橙汁中收集到直接用做实时定量 PCR 的 DNA 模板, 缩短了收集 DNA 的时间^[41]。利用高特异性和受体的亲和力, 王峰等制备了嗜酸耐热菌营养体及芽孢多克隆抗体, 为建立耐热菌酶联免疫分析技术奠定基础^[42]。2014 年, Jianke 等从大鼠和白兔上获得针对酸土脂环酸芽孢杆菌的异源抗体, 建立了低成本、快速和高灵敏度的双重抗体夹心 ELISA (DAS-ELISA), 快速检测浓缩苹果汁中的酸土脂环酸芽孢杆菌的方法, 检测限为 5×10^3 cfu/mL^[43]。

(五) 酸土脂环酸芽孢杆菌的控制

传统巴氏灭菌不能彻底除去脂环酸芽孢杆菌, 且该菌污染初期不容易被发现, 其芽孢可污染果汁生产中的半成品和生产材料, 包括果汁和加工用水等。因此, 我们不仅需要探索准确快速的在线检测方法, 还需要开发快速高效且不会造成果汁营养成分损失的控制技术。

1. 物理方法

长期以来,热处理一直是控制脂环酸芽孢杆菌的主要方法,Vieira 等发现使用 HTST 在 115℃条件下处理 8s,脂环酸芽孢杆菌的芽孢数量减少了 $5\log_{10}$ ^[44]。然而,热处理会使产品风味劣变、营养损失、品质下降,许多研究者提出,在 207~621MPa 的压力范围内,使用高静水压力(HHP)来钝化脂环酸芽孢杆菌的营养菌体和芽孢,但是发现当果汁浓缩物为 70°Bx 时,HHP 处理并无作用,HHP 不仅受果汁中糖和可溶性固体含量的影响,处理温度和时间也影响其有效性。尽管高压灭菌能够破坏细菌的细胞壁和细胞外膜结构,但是 Bevilacqua 研究发现,50~170MPa 的高压对 DSMZ 2498、C4 和 C8 三株脂环酸芽孢杆菌的营养细胞和芽孢的抑制效果并不显著^[45]。Nakauma 等应用辐射(电子束和 γ 射线)结合传统的热处理(85~95℃)灭活了糊精中的脂环酸芽孢杆菌^[46],但其操作要求高,中小型企业不易实施。微波也可以抑制芽孢杆菌的芽孢,Roma 在 2 450MHz 至 900W 功率下处理了 5~7min,芦笋奶油中的酸土脂环酸芽孢杆菌的芽孢数减少了 $2\log_{10}$ ^[47]。章樟红采用孔径为 0.1 μm 的钛合金膜超滤系统过滤除菌,效果基本达到商品果汁的卫生安全要求^[48]。Torlak 等在 22℃条件下用 5.3mg/L 臭氧对苹果汁处理 40min,芽孢数量下降了 $2.4\log_{10}$ ^[49]。Baysal 等用 30V/cm 的欧姆加热苹果汁,脂环酸芽孢杆菌的芽孢数量减少了 $5\log$ ^[50]。

2. 非物理方法

其他因素也会影响脂环酸芽孢杆菌的生长,包括可溶性固体含量、酚类化合物、乙醇、盐浓度及防腐剂^[51]。可溶性固体含量 20°Bx 左右就可以很好地抑制脂环酸芽孢杆菌的生长;