

鼠李糖乳酪杆菌 *ccpA* 基因缺陷型的生长能力变化

陈由运¹, 程浩浩^{1,2}, 李梦婷¹, 邵俊¹, 王海康^{1,2}, 关成冉^{1,2}, 陈大卫^{1,2}, 顾瑞霞^{1,2}, 张臣臣^{1,2*}

(1. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127)

(2. 扬州大学江苏省益生菌与乳品深加工重点实验室, 江苏扬州 225127)

摘要: *ccpA* 基因在乳酸菌的碳源利用过程中发挥重要作用。该文无痕敲除鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 的 *ccpA* 基因; 探究鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 及其 *ccpA* 缺陷型菌株在不同营养条件下的生长状况。结果显示, 在以葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖等为唯一碳源时, 野生型菌株的生长速率均高于缺陷型菌株, 提前 4~5 h 到达稳定期。在混合碳源质量分数较低 (0.2%) 且存在非偏好碳源时, 野生型菌株会出现二次生长现象; 缺陷型菌株不会出现二次生长现象, 并先于野生型到达稳定期。在低碳源和低氮源环境下, 缺陷型的生长量高于野生型 (OD_{600} 高约 0.3)。*ccpA* 基因有助于鼠李糖乳酪杆菌在营养充足的环境中获得生长优势, 但是并非在所有环境中均发挥积极作用, 会降低其在复杂、低营养环境下的生长量。该论文解析了 *ccpA* 基因在鼠李糖乳酪杆菌碳源利用和生长控制中的作用, 为其精准培养提供理论和数据支持。

关键词: 鼠李糖乳酪杆菌; *ccpA*; 二次生长; 碳源利用; 生长量

文章编号: 1673-9078(2025)08-72-82

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.8.0798

Growth Changes of *ccpA*-deficient *Lactocaseibacillus rhamnosus*

CHEN Youyun¹, CHENG Haohao^{1,2}, LI Mengting¹, SHAO Jun¹, WANG Haikang^{1,2}, GUAN Chengran^{1,2},

CHEN Dawei^{1,2}, GU Ruixia^{1,2}, ZHANG Chenchen^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China) (2. Jiangsu Key Laboratory for Probiotics and Dairy Deep Processing, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: The gene encoding the carbon metabolism control protein, *ccpA*, plays a critical role in the utilization of carbon sources and environmental adaptation of lactic acid bacteria. The *ccpA* gene of *Lactocaseibacillus rhamnosus* *hsryfm* 1301 was completely deleted using an in-frame, marker-free method. The growth status of *L. rhamnosus* *hsryfm* 1301 and its *ccpA* deficient strain were compared under different conditions. The use of glucose, fructose, mannose, galactose, or lactose as the sole carbon source resulted in the wild-type strain reaching the stationary phase 4~5 h faster than the *ccpA* mutant. At low mass fraction of mixed carbon sources (0.2%) and the presence of non-preferred carbon sources, the wild-type strain exhibited a secondary growth phase. In contrast, the mutant strain did not exhibit the secondary growth phase but entered the stationary phase earlier than the wild-type strain. Under low-carbon source conditions, the biomass of the *ccpA* mutant was

引文格式:

陈由运,程浩浩,李梦婷,等.鼠李糖乳酪杆菌 *ccpA* 基因缺陷型的生长能力变化[J].现代食品科技,2025,41(8):72-82.

CHEN Youyun, CHENG Haohao, LI Mengting, et al. Growth changes of *ccpA*-deficient *Lactocaseibacillus rhamnosus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(8): 72-82.

收稿日期: 2024-06-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32272333); 扬州市 - 扬州大学市校合作共建科技创新平台项目 (YZ2020265); 扬州大学“高端人才支持计划”; 扬州大学“青蓝工程”; 扬州大学大学生科创基金项目 (CXC20231072)

作者简介: 陈由运 (2002-), 女, 本科生, 研究方向: 乳品微生物, E-mail: 2736695315@qq.com

通讯作者: 张臣臣 (1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 乳品微生物, E-mail: cczhang@yzu.edu.cn

greater (approximately 0.3 of OD₆₀₀) than that of the wild-type strain. The *ccpA* gene enhanced the growth rate of *L. rhamnosus*, but it inhibited growth under low carbon source conditions. The effects of the *ccpA* gene on the growth of *L. rhamnosus* varied across different environments, conferring a growth advantage to the strain under conditions with ample carbon sources.

Key words: *Lacticaseibacillus rhamnosus*; *ccpA*; secondary growth; carbon source utilization; biomass

微生物适应环境变化的能力取决于其获取和利用营养资源的能力。碳源代谢是微生物的核心代谢过程和生长基础。乳酸菌在利用不同的碳源时，会表现出性状差异。碳源对乳酸菌的影响首先表现在生长速率上^[1]，同时对乳酸菌的抗逆^[2]、代谢产物^[3,4]、益生功能^[5,6]和风味产生^[3]等都存在重要影响。专性同型乳酸发酵和兼性异型乳酸发酵乳酸菌的碳源利用均受到碳源分解代谢阻遏（Carbon Catabolite Repression, CCR）和碳源诱导的共同控制，即除葡萄糖外，菌体在利用某种碳源时，既受到葡萄糖的抑制，又需要该碳源的诱导（如乳糖操纵子）^[4,7]，在生长曲线上则表现出二次生长现象。

在乳酸菌中，CCR 效应的关键调控因子为代谢物控制蛋白 A（Catabolite Control Protein A, CcpA）。研究人员最初发现的 CcpA 功能是对非速效（非偏好）碳源利用基因的抑制作用。在葡萄糖存在时，干酪乳杆菌的 β -半乳糖苷酶、乳糖操纵子、L-山梨糖操纵子和麦芽糖操纵子^[8,9]，戊糖乳杆菌的 5-磷酸 - 木酮糖解酮酶和木糖操纵子^[10,11]，植物乳杆菌的 β -葡萄糖苷酶和 β -半乳糖苷酶^[8]、乳酸乳球菌的半乳糖操纵子^[7]的表达都会受到 CcpA 的抑制。值得注意的是，在葡萄糖不存在时，其他碳源也可能引起 CCR，通过 CcpA 对碳源代谢进行调控^[12]，从而形成阶梯式的碳源利用顺序。后续研究发现，CcpA 是一个全局调控元件，它的调控作用具有多效性，其调控基因涉及碳源利用、胁迫耐受和代谢流向等方面。CcpA 对基因的转录调控不只表现在抑制方面，它还具有上调基因转录的作用。乳酸乳球菌和植物乳杆菌的磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶等的转录受到 CcpA 上调，乳酸乳球菌 *ccpA* 基因的沉默会使菌株在含有葡萄糖、蔗糖和果糖的培养基中的生长速率变为原来的二分之一^[7]，植物乳杆菌和干酪乳杆菌 *ccpA* 基因的缺失也会降低菌株的生长速度^[13,14]。

鉴于碳源对乳酸菌及其发酵食品的生产效率、生产成本和产品品质的重要影响，其代谢模式和机理正受到越来越多的关注。乳酸菌包含几十个属的菌种，不同菌种的碳源代谢调控机制存在差异。鼠

李糖乳酪杆菌（*Lacticaseibacillus rhamnosus*）广泛分布于国人的肠道和乳汁^[15,16]，以及发酵乳制品和发酵果蔬制品等，是目前研究和应用最多的益生菌之一^[17,18]。但 *ccpA* 基因在鼠李糖乳酪杆菌中的作用尚未得到研究，该文以鼠李糖乳酪杆菌 hsryfm 1301 及其 *ccpA* 缺陷型菌株为研究对象，通过其在不同碳氮源条件下的生长能力，探究 *ccpA* 基因对鼠李糖乳酪杆菌生长的影响，为其工业生产和生态占位研究提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 菌株

该实验采用的实验菌株如表 1 所示。鼠李糖乳酪杆菌菌株在 MRS 培养基中 37 ℃ 静置培养；大肠杆菌菌株在 LB 培养基中 37 ℃ 摇动培养。红霉素使用质量分数如下：鼠李糖乳酪杆菌菌株为 10 μ g/mL；大肠杆菌菌株为 250 μ g/mL。

表 1 实验采用的菌株
Table 1 The strains used in this study

菌株名称	菌株说明
鼠李糖乳酪杆菌 hsryfm 1301	筛选自广西长寿老人，CGMCC No. 8545
鼠李糖乳酪杆菌 ccpAm	hsryfm 1301 的 <i>ccpA</i> 缺陷型菌株， 本文构建
鼠李糖乳酪杆菌 ccpAh	ccpAm 的 <i>ccpA</i> 回补菌株，红霉素抗性， 本文构建
鼠李糖乳酪杆菌 1301e	含 pMG36e 的 hsryfm 1301，红霉素 抗性，本文构建
鼠李糖乳酪杆菌 ccpAme	含 pMG36e 的 ccpAm，红霉素抗性， 本文构建
大肠杆菌 XL1-Blue	通用载体构建菌株

1.2 材料与试剂

试剂：葡萄糖，国药集团化学试剂有限公司；果糖、核糖、半乳糖、甘露糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖，生工生物工程（上海）股份有限公司；棉子糖、水苏糖，北京索莱宝科技有限公司；低聚半乳糖（GOS）、低聚果糖（FOS），量子高科（中国）生物股份有限公司。

表 2 不同培养基中的碳源种类及质量分数
Table 2 Carbon sources in the culture media

培养基种类	碳源质量分数/%											
	葡萄糖	果糖	半乳糖	甘露糖	核糖	乳糖	蔗糖	麦芽糖	棉子糖	水苏糖	GOS	FOS
Gly-MRS	0.0											
Glc-MRS	1.0											
Glc-MRS-1	0.1											
Glc-MRS-2	0.2											
Glc-MRS-3	0.3											
Glc-MRS-4	0.4											
Glc-MRS-5	0.5											
Fru-MRS		1.0										
Gal-MRS			1.0									
Man-MRS				1.0								
Lac-MRS						1.0						
Suc-MRS							1.0					
Mal-MRS								1.0				
Glc+Gal-MRS	0.2		0.2									
Glc+Lac-MRS	0.2					0.2						
Glc+Man-MRS	0.2			0.2								
Glc+Fru-MRS	0.2	0.2										
Glc+Rib-MRS	0.2				0.2							
Glc+Suc-MRS	0.2						0.2					
Glc+Mal-MRS	0.2							0.2				
Glc+Raf-MRS	0.2								0.2			
Glc+Sta-MRS	0.2									0.2		
Glc+FOS-MRS	0.2										0.2	
Glc+GOS-MRS	0.2											0.2

细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *Eco*R I、*Hind* III、连接酶,宝日医生物技术(北京)有限公司。

MRS 培养基配制方法如下:称取葡萄糖 20.0 g,蛋白胨 10.0 g,醋酸钠 5.0 g,磷酸氢二钾 2.0 g,柠檬酸三胺 2.0 g,硫酸镁 0.2 g,硫酸锰 0.05 g,吐温 80 1.0 g,牛肉膏 10.0 g,酵母膏 5.0 g 于容器中,加入蒸馏水加热溶化后,定容至 1 000 mL,放入灭菌锅中 121 ℃, 15 min 灭菌后备用。通过添加琼脂获得 MRS 固体培养基。

通过更换不同种类的糖获得不同碳源的 MRS 培养基,具体如下: Gly-MRS 为剔除 MRS 配方中的葡萄糖;其余碳源调整培养基由向 Gly-MRS 中添加对应质量分数的碳源获得(表 2)。无蛋白胨 MRS

(0P-MRS)、四分之一蛋白胨 MRS (QP-MRS)、二分之一蛋白胨 MRS (LP-MRS) 和两倍蛋白胨 MRS (HP-MRS) 为分别将 MRS 培养基中的蛋白胨调整为 0.0 (0.0%)、2.5 (0.25%)、5.0 (0.5%) 和 20.0 g/L (2.0%)。

1.3 主要仪器设备

HCB-900V 洁净工作台,海尔集团公司;Mastercycler® nexus PCR 仪、BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪、Multiporator 4308 电穿孔仪,艾本德(中国)有限公司;JF-SX-500 全自动灭菌锅,日本 TOMY 公司;DYCP-31DN DNA 水平电泳槽,北京六一生物科技有限公司;SPX-150BSH 生化培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;FP-110-C 自动生长曲线分析仪,芬兰 Bioscreen 公司。

表 3 该文用到的质粒

Table 3 Plasmids used in this study

名称	特性	来源
pUC19e	pUC19 衍生质粒，红霉素抗性	[17]
pUC19e-ccpAUD	pUC19e 衍生质粒，多克隆位点插入 <i>ccpA</i> 基因的上游和下游片段	该文
pMG36e	红霉素抗性，大肠杆菌 - 乳酸菌穿梭载体	Novagen
pMG36e-ccpA	pMG36e 衍生质粒，用 1301 的 <i>ccpA</i> 基因序列（含启动子）替换 P32	该文

表 4 该文用到的引物

Table 4 Primers used in this study

名称	序列	内切酶位点
Eco-ccpaupF	TTTGAATTCCATATACCCATGATTGTCGGTGC	<i>EcoR</i> I
ccpaupR	TTTATTTTCTCCTTAGTCGTGAAAA	
ccpdownF	TTTTCACGACTAAGGAGAAAATAAAACAGAAGTAACACGATATTCTGGC	
hind-ccpdownR	AAGAAGCTTGTCATCAAGTCAAAAAGACCAAG	<i>Hind</i> III
ccpaTestF	GTCCATCGCGGTAAAGTTAGCC	
ccpaTestR	CAACATTCGCCAATCAAGGTG	
M13c-F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	
RV-M	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	
Eco-1301ccpAF	GGAATTCGGCTACTCCTTAAACTCGCTG	<i>EcoR</i> I
Hind-1301ccpAR	ATTAAGCTTCTACTTGGTTGAACCACGCTTC	<i>Hind</i> III

1.4 实验方法

1.4.1 菌株的培养

从冰箱中取出保存的鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301，接种于 5 mL 的 MRS 液体培养基，置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h，将菌液在 MRS 固体培养基上划线，37 ℃ 培养 36 h，挑取单菌落，于 MRS 液体培养基中培养 24 h，放入 4 ℃ 冰箱保存^[19]。

1.4.2 敲除载体构建

该文用到的质粒和引物如表 3 和表 4 所示。提取鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 的 DNA，以其为模板，用 *Eco*-ccpaupF、ccpaupR 和 ccpdownF、hind-ccpdownR 分别扩增 *ccpA* 基因的上游片段 ccpAUP 和下游片段 ccpADOWN；利用重叠延伸 PCR，将 ccpAUP 和 ccpADOWN 融合为 ccpAU-D^[17]；用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切 pUC19e 质粒和 ccpAU-D 片段，连接后转化至大肠杆菌感受态细胞，获得 pUC19e-ccpAUD 质粒。

1.4.3 *ccpA* 基因的无痕敲除

基因的无痕敲除流程参照文献进行^[17]。具体步骤如下：将 pUC19e-ccpAUD 电转化至鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301，在含有红霉素的 MRS 平板

上挑取转化子，利用引物 ccpaTestF、M13c-47 和 ccpaTestR、RV-M 验证自杀载体的整合；将第一次单交换转化子在无红霉素的 MRS 中多次传代，利用逐个检出法筛选无红霉素抗性菌株，利用引物 ccpaTestF、ccpaTestR 检出缺陷型菌株，命名为鼠李糖乳酪杆菌 *ccpAm*。

1.4.4 回补载体构建

以鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 的 DNA 为模板，用 *Eco*-1301ccpAF 和 *Hind*-1301ccpAR 扩增 *ccpA* 基因的启动子和编码序列 P-ccpA；提取 pMG36e；用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切 pMG36e 质粒和 P-ccpA 片段，连接后转化至大肠杆菌感受态细胞，获得 pMG36e-ccpA 质粒。将 pMG36e-ccpA 质粒电转化至鼠李糖乳酪杆菌 *ccpAm*，获得鼠李糖乳酪杆菌 *ccpAh*。同时将 pMG36e 转化至鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm*，获得鼠李糖乳酪杆菌 1301e 和 *ccpAme*。

1.4.5 菌株生长曲线测定

将活化 2 代的鼠李糖乳酪杆菌菌株按照 2% 的接种量（体积分数）分别接种到液体培养基中。混匀后，吸取 300 μL 至蜂窝培养板，每个样品做三个平行样，然后放入微生物自动生长曲线分析仪，参数设置为 37 ℃，培养 48 h，每隔 30 min 读取 1 次

数据^[20]。含质粒菌株,在培养基中添加 10 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素。

1.4.6 菌株在不同葡萄糖质量分数下的生长测定

将活化 2 代的鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 菌株和 *ccpAm* 按照 2% 的接种量 (体积分数) 分别接种到液体培养基 Glc-MRS 1、Glc-MRS 2、Glc-MRS 3、Glc-MRS 4、Glc-MRS 5 中;按照 1.4.5 的方法,测定两个菌株的生长曲线。

1.4.7 菌株在不同碳源条件下的生长测定

将活化 2 代的鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 菌株和 *ccpAm* (保证其 OD 值一致) 按照 2% 的接种量 (体积分数) 分别接种到液体培养基 Glc-MRS-2、Glc+Gal-MRS、Glc+Lac-MRS、Glc+Man-MRS、Glc+Fru-MRS、Glc+Rib-MRS、Glc+Suc-MRS、Glc+Mal-MRS、Glc+Raf-MRS、Glc+Sta-MRS、Glc+FOS-MRS、Glc+GOS-MRS 中;按照 1.4.5 的方法,测定两个菌株的生长曲线。

1.4.8 菌株在不同蛋白胨质量分数下的生长测定

将活化 2 代的鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 菌株和 *ccpAm* (保证其 OD 值一致) 按照 2% 的接种量 (体积分数) 分别接种到液体培养基 OP-MRS、QP-MRS、LP-MRS 和 HP-MRS 中;按照 1.4.3 的方法,测定两个菌株的生长曲线。

1.4.9 数据分析

试验所得数据为 3 次重复试验结果的平均值,并利用 Origin 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 *ccpA* 基因的敲除

利用 pUC19e 质粒和鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 成功构建了敲除载体 pUC19e-*ccpAUD* 质粒,通过分步同源双交换法,获得了无红霉素抗性的菌株 *ccpAm* (图 1a)。提取菌株的 DNA 后,使用 *ccpA* 检测引物对 (*ccpA*TestF、*ccpA*TestR) 其进行 PCR 扩增。电泳结果显示,野生型的扩增条带略大于 3 000 bp, *ccpAm* 的扩增条带略大于 2 000 bp (图 1b)。*ccpA* 基因的大小普遍在 1 000 bp 左右^[21]。鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 *ccpA* 基因的大小为 1 002 bp (Genbank locus_tag="F5976_03715"),*ccpA* 检测引物在 *ccpA* 基因的上下游各约 1 000 bp 处,预期扩增大小为 3 292 bp,缺陷型预期扩增

大小为 2 290 bp。电泳结果与预期一致,即成功敲除了鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 的 *ccpA* 基因 (*ccpAm*),且缺陷菌株未引入任何外源基因和抗性,不会对菌株的培养造成影响。

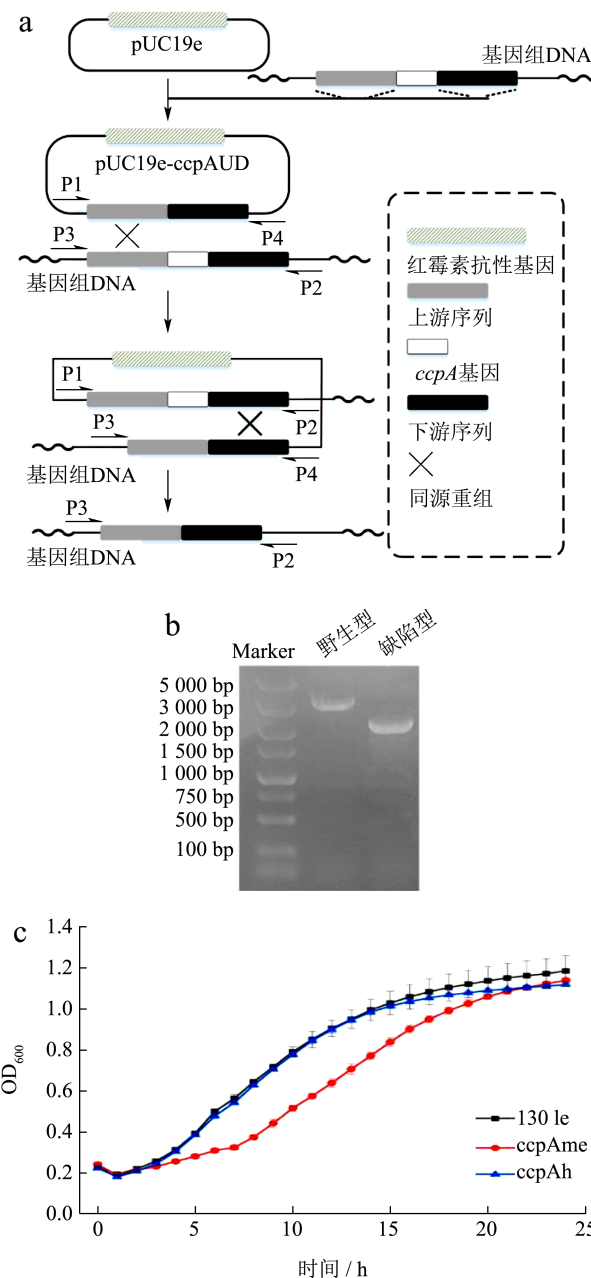


图 1 *ccpA* 基因的敲除及回补

Fig.1 Deletion of the *ccpA* gene

注: a: 基因敲除流程图; P1: M13c-F; P2: *ccpA*TestR; P3: *ccpA*TestF; P4: RV-M; b: 野生型和缺陷型扩增条带; c: 野生型菌株 (1301e)、缺陷型菌株 (*ccpAme*) 和回补型菌株 (*ccpA_h*) 在 MRS 培养基 (含红霉素) 中的生长曲线。

利用 pMG36e 质粒, 构建了 *ccpA* 回补载体, 并电转化至 *ccpAm* 菌株 (即 *ccpA_h*); 为抵消红

霉素对菌株生长的影响，将 pMG36e 空载体分别转化至鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm 1301*（即 1301e）和 *ccpAm*（即 *ccpAme*）。生长曲线显示，*ccpAme* 的生长速度慢于 1301e，而回补 *ccpA* 基因后，*ccpAh* 的生长速度恢复到野生型水平（图 1c）。CcpA 具有上调基因转录的作用，乳酸乳球菌和植物乳杆菌的磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶等的转录受到 CcpA 上调；鼠李糖乳酪杆菌 *ccpA* 缺陷型生长速度变慢的现象与乳酸乳球菌、植物乳杆菌和干酪乳杆菌等乳酸菌相似^[13,14]。鼠李糖乳酪杆菌的 *ccpA* 基因同样有助于提高生长速度。

2.2 鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm 1301* 和 *ccpAm* 在不同碳源条件下的生长能力

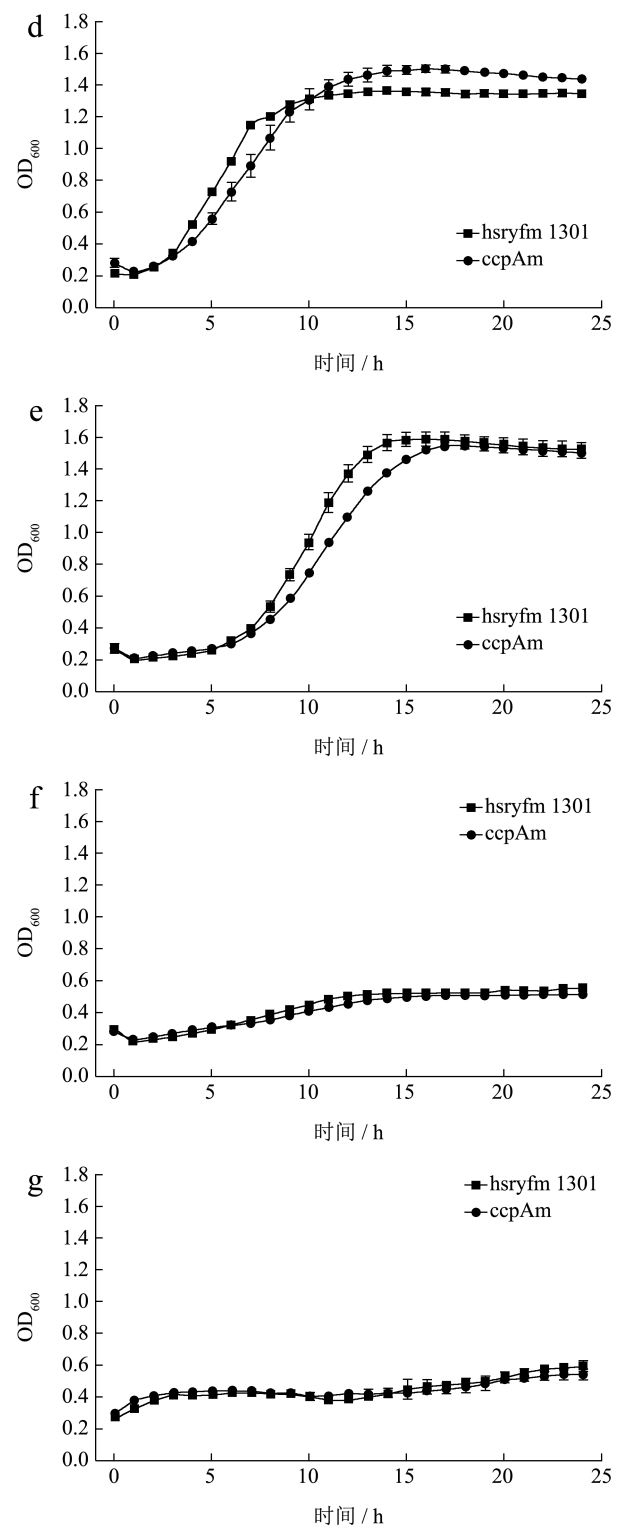
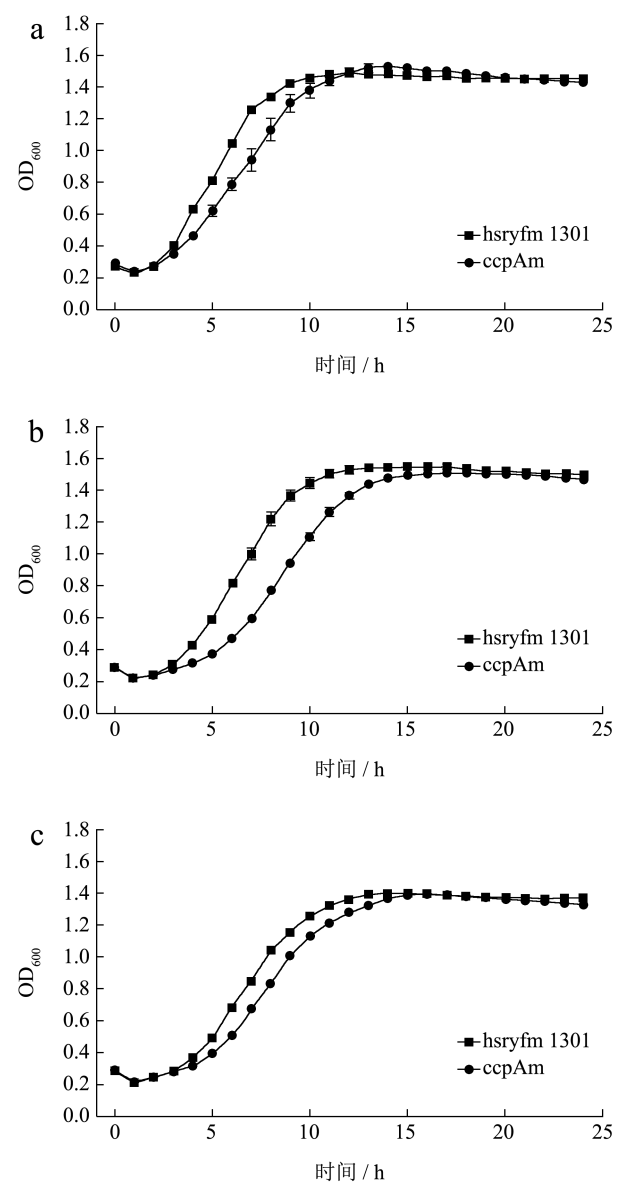


图 2 野生型 (*hsryfm 1301*) 和 *ccpA* 缺陷型 (*ccpAm*) 菌株在不同碳源条件下的生长曲线
Fig.2 Growth curves of wild-type and the *ccpA* mutant under different carbon source conditions

注: a: 培养基为 Glc-MRS ; b: 培养基为 Gal-MRS ; c: 培养基为 Fru-MRS ; d: 培养基为 Man-MRS ; e: 培养基为 Lac-MRS ; f: 培养基为 Suc-MRS ; g: 培养基为 Mal-MRS。

OD₆₀₀值和活菌数能够从生物量和繁殖数两个方面反映菌株的生长能力,然而鼠李糖乳酪杆菌是一种链状杆菌,且链长随生长时期变化;相较于CFU,其OD₆₀₀值与qPCR计数的“菌体数”结果更为一致^[22],因而该文采用OD₆₀₀值反映菌株的生长能力。将鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 接种于不同碳源种类的 MRS 培养基 (1.0%), 测定其生长曲线。如图 2 所示,鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 能够利用葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖和乳糖为唯一碳源生长;利用蔗糖和麦芽糖的能力较弱。鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 在 1.0% 葡萄糖质量分数下的生长量相同,最高 OD₆₀₀ 值均能达到约 1.6 (图 2a)。在利用葡萄糖、半乳糖和甘露糖时,鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 延滞期较短,约为 2 h,利用果糖时延滞期稍长,而利用乳糖时,延滞期大于 5 h (图 2e)。鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 在各种糖环境下的指数期均在 7 h 左右 (图 2)。鼠李糖乳酪杆菌 *ccpAm* 的碳源利用能力与 *hsryfm* 1301 相近,但是 *hsryfm* 1301 的生长速率明显高于 *ccpAm*,先到达稳定期 (提前 4~5 h)。鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 对蔗糖和麦芽糖几乎没有利用能力 (图 2f、2g),在进行培养基优化时应避免利用这两种碳源^[23]。CcpA 通过上调磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶等的转录提高菌株的生长速度,而丙酮酸激酶等是各种所测碳源代谢均需要的酶^[7,14],因而,鼠李糖乳酪杆菌 *ccpA* 缺陷型 (*ccpAm*) 生长速度变慢的现象在各种可利用碳源中普遍存在。

2.3 葡萄糖质量分数对鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 生长的影响

微生物在复杂碳源环境下会出现二次生长现象^[24,25]。由于 CCR 现象的存在,较高浓度的葡萄糖会限制非偏好碳源的利用,且能够供菌体生长到 OD₆₀₀ 值测定或者是单次培养基中菌体浓度的上限,因而掩盖了非偏好碳源的利用过程,导致无法观测到菌株的碳源利用转换。因此,为了探究 *ccpA* 基因对碳源利用转换的影响,首先要确认鼠李糖乳酪杆菌生长受限制的碳源质量分数。将鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 接种于不同葡萄糖质量分数的 MRS 培养基 (葡萄糖质量分数分别为 0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%), 绘制生长曲线。结果显示,在 0.5% 葡萄糖质量分数下,鼠李糖乳酪

杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 均仍能够较好生长;随着葡萄糖质量分数的降低,两个菌株的生长速度均未受到影响,但是菌株的生长量受到限制 (图 3)。当培养基的葡萄糖质量分数为 0.2% 时, *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 的生长速度未发生变化,但是生长量显著下降,此时存在非偏好碳源,则有希望表现出明显的二次生长曲线,可以作为后续实验的条件。此外,该研究发现,在葡萄糖质量分数受到限制时, *ccpAm* 具有更高的生长量。

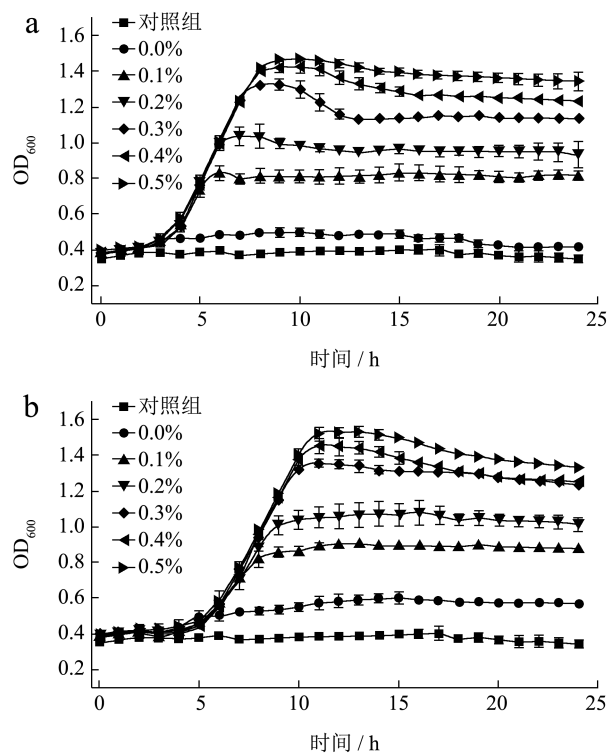


图 3 野生型和 *ccpA* 缺陷型菌株在不同葡萄糖质量分数下的生长曲线

Fig.3 Growth curves of wild-type and the *ccpA* mutant under different concentrations of glucose

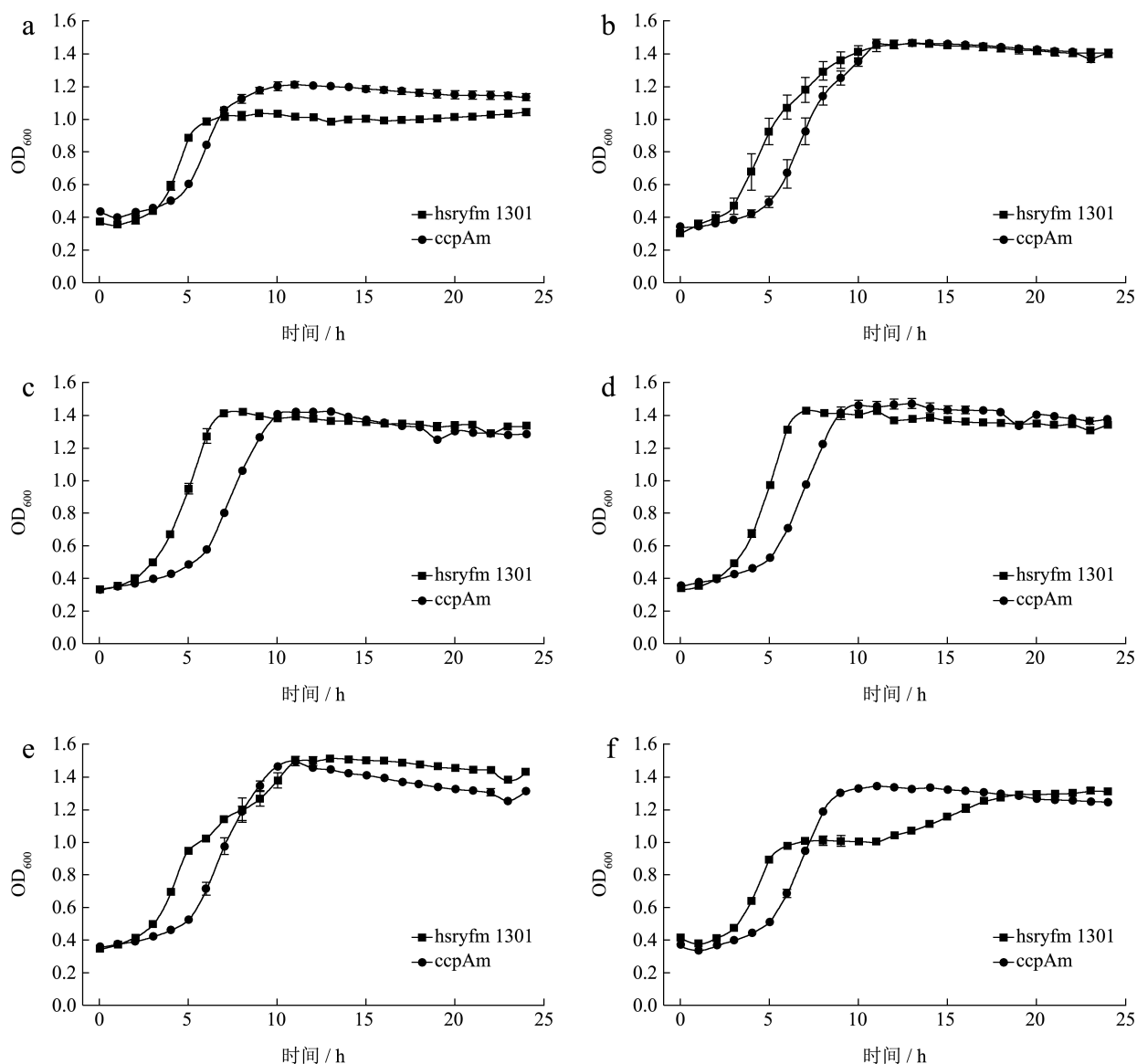
注: a: 野生型 (*hsryfm* 1301); b: *ccpA* 缺陷型 (*ccpAm*); 对照组未接种菌液, 质量分数为葡萄糖含量。

2.4 鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 在混合碳源中的二次生长情况

将鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 接种于不同的双碳源 MRS 培养基 (每种碳源的质量分数均为 0.2%), 绘制生长曲线。当培养基中只含有葡萄糖时, *ccpAm* 具有更高的生长量 (图 4a)。当培养基碳源为葡萄糖和半乳糖、葡萄糖和甘露糖、葡萄糖和果糖时 (总质量分数为 0.4%), *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 均未发生二次生长现象, *hsryfm*

1301 生长速度快于 *ccpAm*, 且最终生长量相近 (图 4b~4d)。二次生长的中段延滞期是微生物在快速适应和高生长率之间进行的权衡^[25]。根据章节 2.2 的结果, 半乳糖、甘露糖和果糖均为鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 可利用的单糖, 这几种糖与葡萄糖混合利用不会影响鼠李糖乳酪杆菌的生长速度, 不进行二次生长, 表明鼠李糖乳酪杆菌利用这几种单糖时不需要代谢转换。当培养基碳源为葡萄糖和核糖、葡萄糖和乳糖、葡萄糖和棉子糖、葡萄糖和水苏糖、葡萄糖和低聚半乳糖时, *hsryfm* 1301 发生了二次生长现象, 而 *ccpAm* 没有发生二次生长 (图 4e~4i)。这是因为在这些复合碳源条件下, 鼠李糖乳酪杆菌对碳源进行了先后利用^[24], *hsryfm* 1301 先利用葡萄糖, 进入稳定期, 经过短暂的适应

后, 再利用乳糖进行二次生长, 而 *ccpAm* 由于敲除了 *ccpA* 基因, 二次生长现象消失。这说明核糖、乳糖、棉子糖、低聚半乳糖等属于鼠李糖乳酪杆菌的非偏好碳源, 在利用这些糖时, 鼠李糖乳酪杆菌需要适应期, 而且此适应期是由 *ccpA* 基因引起, *ccpA* 基因控制菌株的碳源代谢。在利用此类非偏好碳源时, 由于 *ccpAm* 没有适应期, 其生长速度会在后期超过 *hsryfm* 1301; 两个菌株的最终生长量相当。当复合碳源为葡萄糖和蔗糖、葡萄糖和麦芽糖、葡萄糖和低聚果糖时, *hsryfm* 1301 并未发生二次生长现象, *ccpAm* 的生长量大于 *hsryfm* 1301 (图 4j~4l)。鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 对蔗糖、麦芽糖、水苏糖、低聚果糖的利用能力较弱, 其生长曲线类似于低质量分数葡萄糖培养基。



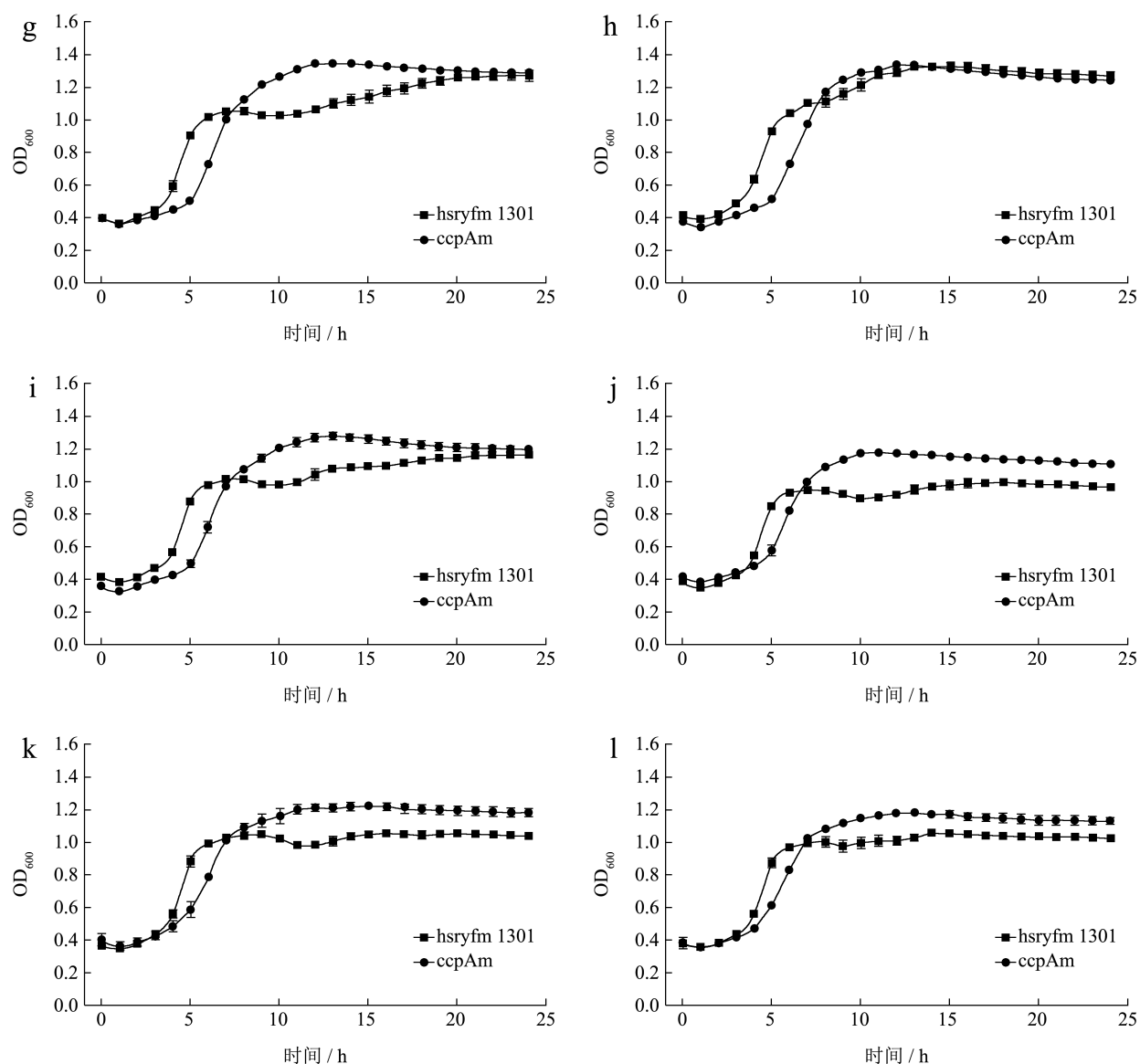


图4 野生型 (hsryfm 1301) 和 *ccpA* 缺陷型 (*ccpAm*) 菌株在不同混合碳源下的生长曲线

Fig.4 Growth curves of wild-type and the *ccpA* mutant under different mixed carbon source conditions

注: a: 培养基为 Glc-MRS-2; b: 培养基为 Glc+Gal-MRS; c: 培养基为 Glc+Fru-MRS; d: 培养基为 Glc+Man-MRS; e: 培养基为 Glc+Lac-MRS; f: 培养基为 Glc+Raf-MRS; g: 培养基为 Glc+Rib-MRS; h: 培养基为 Glc+GOS-MRS; i: 培养基为 Glc+Sta-MRS; j: 培养基为 Glc+Suc-MRS; k: 培养基为 Glc+Mal-MRS; l: 培养基为 Glc+FOS-MRS。

2.5 鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 在不同氮源条件下的生长情况

前期研究表明, 不同氮源条件下, 鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 碳源代谢基因的转录受到影响^[1], 推测鼠李糖乳酪杆菌中 *ccpA* 基因的作用, 可能受氮源影响。将鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm* 1301 和 *ccpAm* 接种于含有不同蛋白胨质量分数的 MRS 培养基, 绘制生长曲线。在 4 种培养基中, *hsryfm* 1301 均具有更快的生长速度; 当培养基中不含有蛋白胨时,

ccpAm 具有更高的生长量; 随蛋白胨含量的增加, *hsryfm* 1301 与 *ccpAm* 的生长量逐渐接近 (图 5)。结果表明, 氮源受限条件下, 与碳源受限条件相同, *ccpAm* 具有生长量优势。这一结果与低氮源环境下, CCR 的解除相印证^[1]。*ccpA* 基因上调了多种基因的转录, 会消耗更多的氨基酸、ATP 或者还原力, 这一消耗在营养丰富时影响轻微、难以察觉, 但是在氮源和碳源受限时, *hsryfm* 1301 则可能表现出生长量下降。

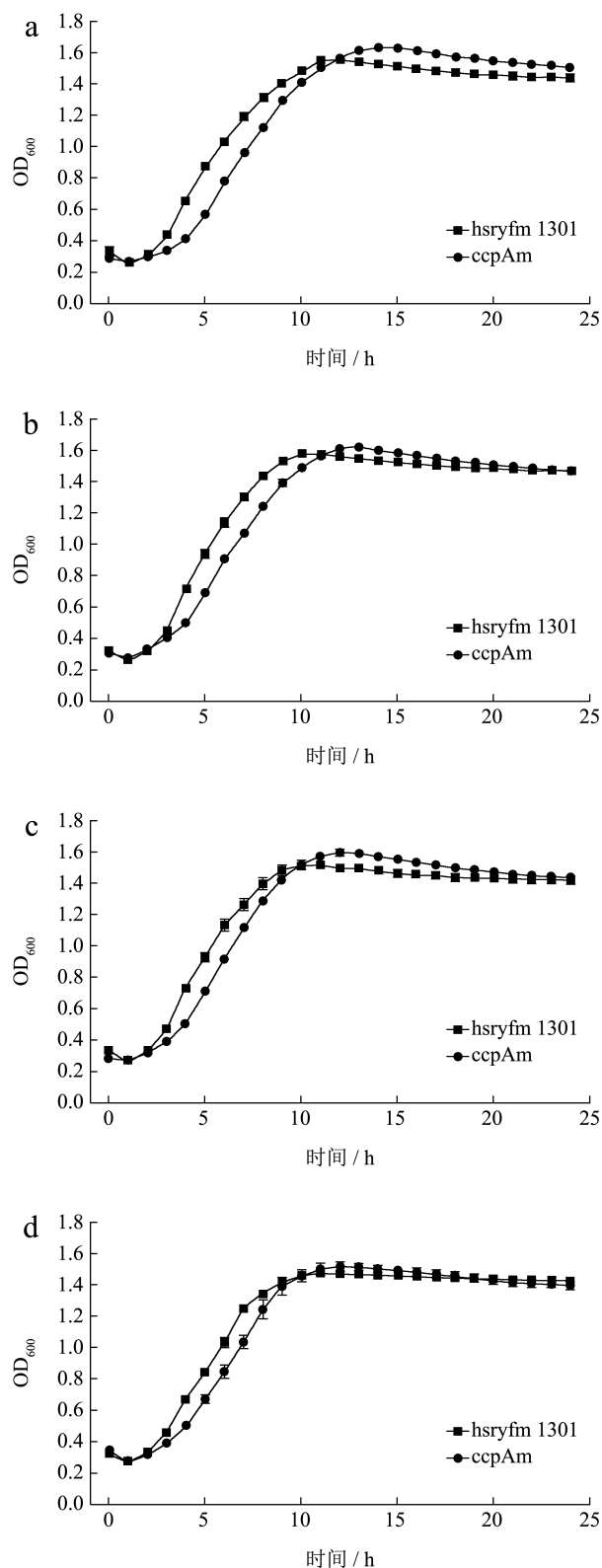


图5 野生型 (*hsryfm 1301*) 和 *ccpA* 缺陷型 (*ccpAm*) 菌株在不同氮源下的生长曲线

Fig.5 Growth curves of wild-type and the *ccpA* mutant under different nitrogen source conditions

注: a: 培养基为 0P-MRS-2; b: 培养基为 QP-MRS; c: 培养基为 LP-MRS; d: 培养基为 HP-MRS。

3 结论

该文比较了鼠李糖乳酪杆菌 *hsryfm 1301* 及其 *ccpA* 缺陷型 (*ccpAm*) 在不同碳源和氮源条件下的生长状况, 当碳源充足时, *hsryfm 1301* 具有生长速度优势。在碳源限制条件下, 易利用碳源和葡萄糖不会引起 *hsryfm 1301* 二次生长; 非偏好碳源和葡萄糖会引起 *hsryfm 1301* 二次生长, 但 *ccpAm* 不存在二次生长现象, 因而 *ccpAm* 在指数后期会获得生长速度优势。在可利用碳源和氮源不足时, *ccpAm* 会获得生长量优势。不同环境下, *ccpA* 基因对鼠李糖乳酪杆菌的生长影响不同, *ccpA* 基因有助于鼠李糖乳酪杆菌在营养充足的环境中获得生长优势。该论文解析了 *ccpA* 基因在鼠李糖乳酪杆菌碳源利用和生长控制中的作用, 为工业生产鼠李糖乳酪杆菌的精准调控提供理论和数据支持; 实际生产中应避免蔗糖和麦芽糖的使用, 且在使用非偏好碳源为主的培养基质时, 应避免添加葡萄糖。

参考文献

- [1] ZHANG C, CHENG H, HAN Y, et al. Transcriptome-phenotype matching analysis of how nitrogen sources influence *Lactocaseibacillus rhamnosus* tolerance to heat stress and oxidative stress [J]. Microb Cell Fact, 2022, 21(1): 257.
- [2] HERNANDEZ-HERNANDEZ O, MUTHAIYAN A, MORENO F J, et al. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus* [J]. Food Microbiol, 2012, 30(2): 355-361.
- [3] FUSIEGER A, MARTINS M C F, DE FREITAS R, et al. Technological properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* obtained from dairy and non-dairy niches [J]. Braz J Microbiol, 2020, 51(1): 313-321.
- [4] BURON-MOLES G, CHAILYAN A, DOLEJS I, et al. Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(7): 3135-3152.
- [5] POLAK-BERECKA M, WAŚKO A, SZWAJGIER D, et al. Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources [J]. Pol J Microbiol, 2013, 62(2): 181-188.
- [6] SONG H Y, YU R C. Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production in fermented adzuki bean milk [J]. J Food Drug Anal, 2018, 26(1): 74-81.

- [7] LUESINK E J, VAN HERPEN R E, GROSSIORD B P, et al. Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 30(4): 789-798.
- [8] MUSCARIELLO L, MARASCO R, DE FELICE M, et al. The functional *ccpA* gene is required for carbon catabolite repression in *Lactobacillus plantarum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 2903-2907.
- [9] GOSALBES M J, MONEDERO V, ALPERT C A, et al. Establishing a model to study the regulation of the lactose operon in *Lactobacillus casei* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 148(1): 83-89.
- [10] POSTHUMA C C, BADER R, ENGELMANN R, et al. Expression of the xylulose 5-phosphate phosphoketolase gene, *xpkA*, from *Lactobacillus pentosus* MD363 is induced by sugars that are fermented via the phosphoketolase pathway and is repressed by glucose mediated by CcpA and the mannose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(2): 831-837.
- [11] LOKMAN B C, HEERIKHUISEN M, LEER R J, et al. Regulation of expression of the *Lactobacillus pentosus* *xylAB* operon [J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(17): 5391-5397.
- [12] LU Y, SONG S, TIAN H, et al. Functional analysis of the role of CcpA in *Lactobacillus plantarum* grown on fructooligosaccharides or glucose: a transcriptomic perspective [J]. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 201.
- [13] ZOTTA T, RICCIARDI A, GUIDONE A, et al. Inactivation of *ccpA* and aeration affect growth, metabolite production and stress tolerance in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 155(1-2): 51-59.
- [14] MAZZEO M F, CACACE G, PELUSO A, et al. Effect of inactivation of *ccpA* and aerobic growth in *Lactobacillus plantarum*: A proteomic perspective [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(13): 4050-4061.
- [15] ZHANG C, YU X, WANG D, et al. Rapid strain-specific identification of two *Lactobacillus rhamnosus* strains using PCR based on gene family analysis [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2021, 146: 111395.
- [16] 胡鹏钰,于俊娟,王鹏,等.母乳来源益生菌的筛选及潜在益生特性研究[J].食品与发酵工业,2021,47(14):190-195.
- [17] 韩越眉.转录调控元件GlnR在鼠李糖乳杆菌热-氧化胁迫交叉适应中的作用[D].扬州:扬州大学,2023.
- [18] 周文娟.鼠李糖乳杆菌hsryfm 1301的预胁迫处理及其对益生菌慕斯品质的影响[D].扬州:扬州大学,2020.
- [19] 王岱,韩越眉,桂亚,等.低氮源培养对鼠李糖乳杆菌胁迫耐受能力的影响[J].食品与发酵工业,2022,48(10):78-83.
- [20] 张玉律,张臣臣,陈大卫,等.碳源对鼠李糖乳杆菌生长特性的影响[J].食品安全质量检测学报,2019,10(8):2304-2310.
- [21] 肖丰旭.地衣芽孢杆菌CcpA蛋白介导的碳代谢调控分子机制研究[D].无锡:江南大学,2023.
- [22] ZHANG C, HU M, YU X, et al. The strain level antagonism between chain-forming *Lactocaseibacillus rhamnosus* LV108 and hsryfm 1301 [J]. *J Food Meas Charact*, 2023, 17(6): 6307-6317.
- [23] 方国权.鼠李糖乳杆菌LR-CC高密度发酵工艺优化及在玉米秸秆青/黄贮中应用[D].长春:吉林农业大学,2022.
- [24] WANG X, XIA K, YANG X, et al. Growth strategy of microbes on mixed carbon sources [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1279.
- [25] CHU D, BAMES D. The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25191.