

基于蛋白质组学研究冷冻干燥对副干酪乳杆菌 PC-01 细胞活性的影响

许家齐, 郑新飞, 冯 燕, 郭 琳, 于 洁, 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 目的:从蛋白组学的角度剖析冷冻干燥对副干酪乳杆菌 PC-01 菌体细胞存活的影响。方法:设定培养温度分别为 32.5℃与 37℃,对副干酪乳杆菌 PC-01 高密度发酵并冷冻干燥。取冻干前与冻干后的样品,利用 TMT 技术测定蛋白质含量,对鉴定出的差异蛋白进行 KEGG 功能注释与富集分析,研究蛋白的差异表达对两个试验组菌体存活的影响。结果:32.5℃试验组冷冻干燥前、后的活菌数均显著高于 37℃试验组,上调蛋白都集中于碳水化合物代谢与膜运输途径上,且冻干前、后差异倍数偏大的蛋白有醛酮还原酶、4-草酰巴豆酸互变异构酶、二肽酶、GNAT 家族 N-乙酰转移酶、磷酸核糖甘氨酸氨甲酰转移酶等蛋白。结论:冷冻干燥前、后副干酪乳杆菌 PC-01 内部分子发生变化,据关键差异蛋白的功能,冷冻干燥主要是从抗冷冻性、膜运输能力以及细胞代谢能力等方面影响副干酪乳杆菌 PC-01 菌株细胞存活。研究结果为副干酪乳杆菌 PC-01 的工业化生产提供了参考。

关键词 副干酪乳杆菌 PC-01; 蛋白组学; 冷冻干燥; 细胞活性;

文章编号 1009-7848(2023)03-0177-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.019

益生菌是活的微生物,对人体有益^[1-2]。许多研究已证明副干酪乳杆菌具有丰富的益生菌特性^[3],如抗菌活性和对人体体外细胞的黏附^[4],良好的耐酸性和耐胆盐性^[5],润肠通便,预防溃疡性结肠炎^[6-7],维持肠道的生态平衡和正常机能^[8-9]。益生菌具有极大的开发应用价值,其中乳酸菌就是典型的代表之一^[10]。

众多研究发现,乳酸菌适应不利环境通常与大量基因的诱导、应激反应蛋白的合成以及对各种应激交叉抗性的发展有关,往往对这些反应的调节是复杂且相互作用的,并与代谢途径密切相关^[11-13]。国内外研究表明乳酸杆菌在不利环境下会产生生理应激反应以增强其适应性,微生物应激反应的特点是特定蛋白质的瞬时诱导使其出现生理变化,这些变化会增强菌体抵御不利环境条件的能力,并且这种适应性机制通常会激活不同的代谢途径,从而使处于压力条件下菌体内部的蛋白质发生变化^[14-16]。乳酸菌在高密度条件下培养并维持高活性,对其在食品工业的应用和人体益生

作用的发挥起重要的作用,且真空冷冻干燥冻干菌种可较好地保持菌种活力,因此高密度发酵与冻干工艺的优化一直是人们研究的热点^[17-18]。随着科技的进步,人们的研究不再停留于工艺条件的优化,探究菌种内部分子机制的变化逐步成为人们关注的热点之一。

蛋白质组学技术为研究菌体内部分子机制提供了强有力的工具,通过测定某一特定菌种在不同应激条件下的蛋白质表达水平,标记具有功能指标的蛋白,这种基于蛋白组学的功能指标往往与菌种的遗传反应或生理状况有关,研究这些功能指标可加深人们对特定菌种在不同应激条件下出现表型差异的理解,为深层次的研究提供理论依据^[19-21]。

本研究用菌株副干酪乳杆菌 PC-01 分离自西藏拉萨地区当雄县龙仁乡酸牦牛奶中,根据冻干前、后该菌体内部蛋白质的变化,分析冷冻干燥对菌体存活的影响,旨在为其工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

菌株副干酪乳杆菌 PC-01,内蒙古农业大学

收稿日期: 2022-03-10

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0014)

第一作者: 许家齐,男,硕士生

通信作者: 张和平 E-mail: hepingdd@vip.sina.com

乳酸菌菌种资源库 (Lactic Acid Bacteria Collection Center, LABCC) 提供。MRS 培养基, 英国 Oxoid 公司。

1.2 主要仪器与设备

Synergy H1 酶标仪, 美国 BioTek 公司; 质谱仪, Thermofisher Scientific; 全自动数码凝胶图像分析系统, 上海天能科技有限公司; 垂直电泳槽, 上海天能科技有限公司; 发酵罐, 信鼎公司; 真空冷冻干燥机, 东富龙公司; 高压灭菌锅, 上海雅程仪器设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种的活化 将冻存管中冷冻保存的副干酪乳杆菌 PC-01 接种于 10 mL 的 MRS 液体培养基中, 在 37 °C 条件下有氧培养 24 h, 作为第 1 代活化菌种。从 1 代菌液中取 2% 接种于 40 mL 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 有氧培养 24 h, 作为第 2 代活化菌种。从 2 代菌液中取 2% 接种于 2 L 的 MRS 液体培养基中, 在 37 °C 条件下有氧培养 24 h, 为第 3 代活化菌种, 待用。

1.3.2 冻干前、后样品的制备 将体积分数 5% 的第 3 代活化后菌液接种于 35 L MRS 液体培养基中, 设定培养温度为 32.5 °C 和 37 °C, 在发酵罐中进行高密度培养。培养至终点后降温离心, 获得的菌泥与冷冻保护剂以 1:2 比例混合, 取一部分样品作为冻干前的样液氮急冷, 置于 -80 °C, 待用。设置真空冷冻干燥机预冻温度 -40 °C, 时间 25 h, 将剩余的混合样品置于真空冷冻干燥机中冷冻干燥 35 h, 得到副干酪乳杆菌 PC-01 冻干菌粉。取一部分菌粉作为冻干后的样品, 液氮急冷, 置于 -80 °C, 待用。

1.3.3 活菌数的测定 活菌数的测定: 参照 GB 4789.35-2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》方法测定菌种活菌数。

1.3.4 蛋白的提取与检测 取出置于 -80 °C 冷冻条件下保存的样品, 解冻后加入蛋白裂解液 (8 mol/L+1% SDS 尿素, 含蛋白酶抑制剂), 在研磨机上研磨 3 次, 每次 3 min, 于冰上裂解 30 min, 之后在冰上超声波破碎 10 min, 在 4 °C 12 000 g 条件下离心 20 min, 取蛋白上清, 按 1:4 比例加入 100% 丙酮, 4 °C 漩涡振荡混匀, 置于 -20 °C 过夜, 沉淀蛋白。24 h 后取出样品, 在 4 °C 12 000 g 条件下

离心 20 min, 弃上清, 向沉淀中加入 90% 预冷丙酮, 混匀后离心, 弃上清, 重复 3 次。沉淀用蛋白裂解液溶解后于冰上超声破碎 2 min, 4 °C 12 000 g 离心 20 min, 取蛋白上清液。采用 BCA 法对蛋白浓度进行定量测定, SDS-PAGE 电泳, 根据电泳图判断组内重复性是否良好。

1.3.5 蛋白质鉴定及功能分析

1.3.5.1 串联质谱标记 (TMT) 技术对蛋白定量 水解蛋白样品得到肽段混合物, 用 TMT 试剂标记样品中所有的肽, 并混合所有标记后的蛋白样品。对混合标记的蛋白样品进行串联质谱标记, 得到一级质谱图。由于在一级质谱图中, 任何一种 TMT 试剂标记的不同样本中的同一肽段表现为相同的质荷比, 因此不同来源的相同肽段表现为一个质谱峰。收集一级质谱图中同一个峰的样品, 得到不同样品的相同肽端混合物。对加入标记的肽段进行二级质谱标记, 得到二级质谱图。

1.3.5.2 LC-MS 液-质谱联用技术 采用 LC-MS 液-质谱联用技术检测肽段信号, 将二级质谱图的质谱数据输入 Proteome Discoverer 软件筛选质谱图。之后将提取的图谱进行数据库搜索, 对蛋白质进行定性和定量分析。运用生物信息学方法分析表型特征差异与蛋白质表达模式间的相关性。

1.3.5.3 差异蛋白 KEGG 通路分析 为方便分析蛋白质功能, 分别对所有蛋白质及差异蛋白质用 KEGG 数据库注释, 利用 KEGG 数据库将蛋白按其所在代谢通路或行使的功能分类。针对本研究涉及的两组菌株的差异蛋白, 将其代入 KEGG 代谢通路图上, 还原关键蛋白的代谢通路。为提供研究的可靠性, 进行 KEGG 通路富集分析, 以便快速锁定显著差异的代谢通路。本次使用通路富集工具 KOBAS3.0 进行 KEGG 通路富集分析, 使用 Fisher 精确检验进行计算。

1.4 数据处理

试验中每个处理结果重复 3 次, 采用 SPSS 27 进行显著性分析, Origin 2019 进行数据分析及作图。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 电泳结果

图 1 所示为蛋白样品的电泳图谱, 其中序号

1~3 号为 32.5 ℃ 试验组冻干后样品的 3 个平行；4~6 号为 37 ℃ 试验组冻干后样品的 3 个平行；16~18 号是 32.5 ℃ 试验组冻干前样品的 3 个平

行；28~30 号是 37 ℃ 试验组冻干前样品的 3 个平行。从图谱中可看出蛋白组间条带清晰，组内重复性良好，且蛋白总量满足分析需要，质检合格。

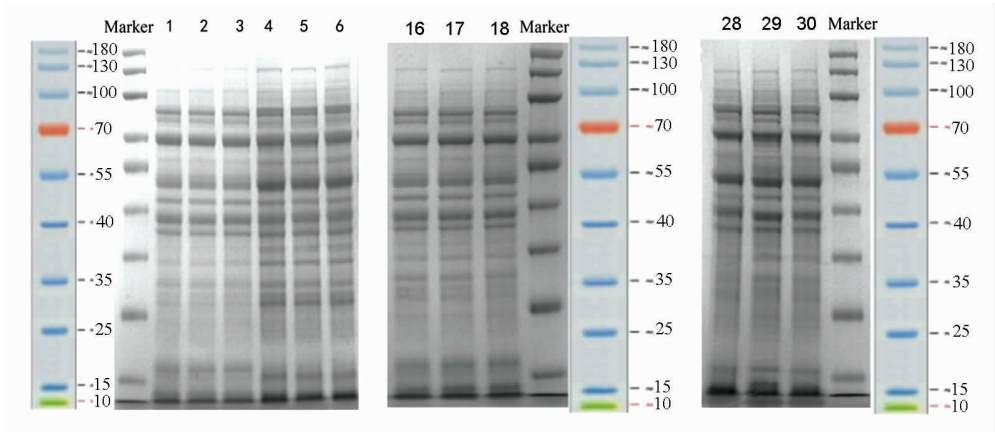


图 1 电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern

2.2 冻干前、后两试验组的活菌数

由图 2 可知，冻干前、后 32.5 ℃ 试验组的活菌数均显著高于 37 ℃ 试验组。从蛋白分子的角度分析冷冻干燥前、后两个试验组菌体内部差异蛋白的作用机理，有助于揭示冷冻干燥对副干酪乳杆菌 PC-01 活性的影响机制。

2.3 蛋白组学测定结果

运用统计学方法对质谱结果进行统计和质控，从宏观上反映检测结果与数据质量。

2.3.1 质控信息-蛋白质 对试验菌株进行蛋白质分子质量统计，结果如图 3 所示。横坐标为蛋白质分子质量的分布范围，纵坐标表示蛋白数量。鉴定到的蛋白质分子质量主要集中在 1~101 ku 之间，其中蛋白质分子质量为 21~41 ku 的蛋白质数量最多，为 870 个，其次为分子质量在 1~21 ku 的蛋白质有 561 个。分子质量大于 101 ku 的蛋白质数量较少。由此可知，本研究中鉴定到的蛋白质数量多，便于后续数据分析。

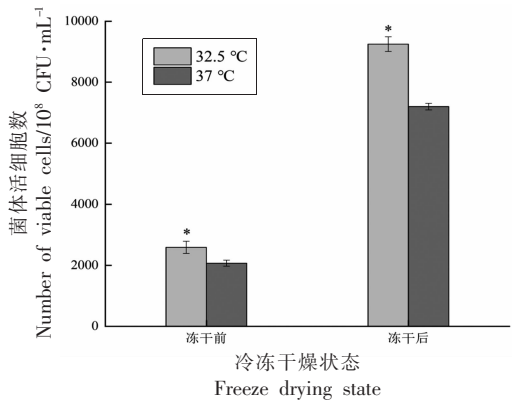


图 2 32.5 ℃ 与 37 ℃ 试验组冻干前、后的活菌数

Fig.2 The number of viable bacteria before and after freeze-drying in 32.5 ℃ and 37 ℃ experimental groups

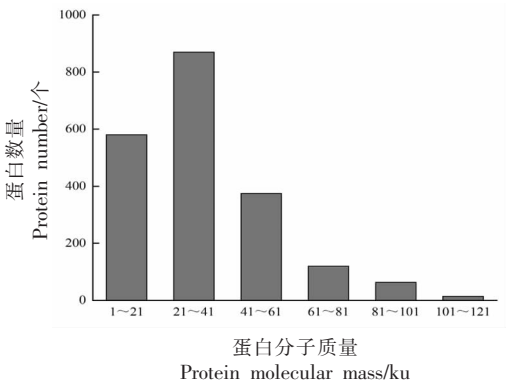


图 3 蛋白质分子质量分布

Fig.3 The distribution of protein molecular mass

2.3.2 全蛋白 KEGG 功能注释统计 将鉴定到的全部蛋白质匹配在 KEGG 通路，结果如图 4

所示。图 4 中纵坐标表示代谢通路名称，横坐标表

示注释到该通路下蛋白质的数量。可以看出本次试验鉴定到的所有蛋白质主要匹配到五大类中,其中匹配蛋白质数量最多的前3类分别是:代谢、遗传信息处理、环境信息处理3条通路。代谢类匹配到蛋白质最多的通路是碳水化合物代谢;遗传

信息处理通路中匹配蛋白最多的通路是翻译;环境信息处理通路中匹配蛋白最多的通路是膜运输。由此可以看出副干酪乳杆菌 PC-01 在冷冻干燥前、后内部的蛋白分子在碳水化合物代谢与膜运输方面起的作用较大。

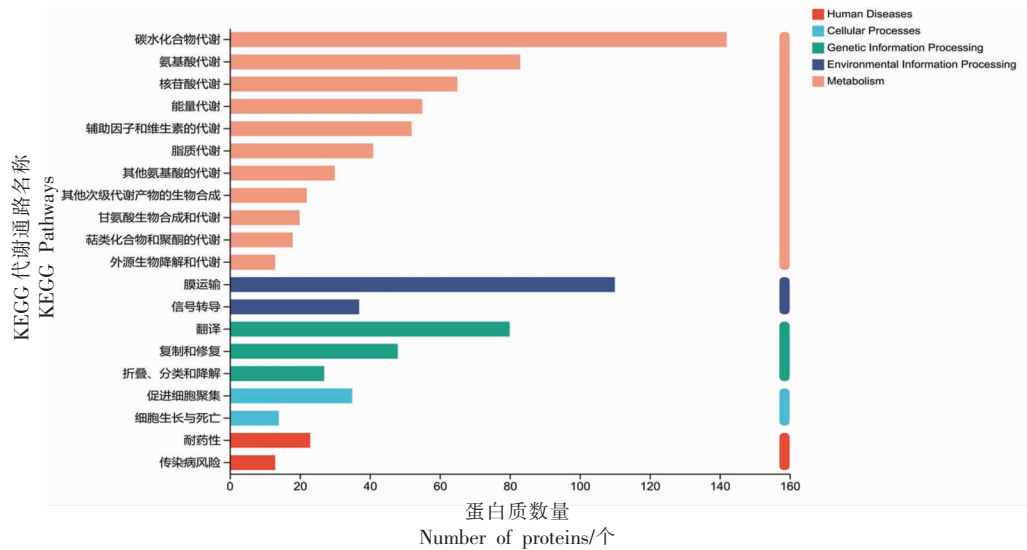


图 4 全蛋白质 Pathway 分类统计

Fig.4 Classification statistics of the whole protein pathway

2.3.3 差异表达显著性蛋白 设置差异表达蛋白的表达值倍数变化 (Fold Change)>1.5 为上调蛋白;表达值倍数变化(Fold Change)<0.83 为下调

蛋白, P 值<0.05 时定义为显著差异表达蛋白。两试验组差异表达显著蛋白统计情况见图 5。

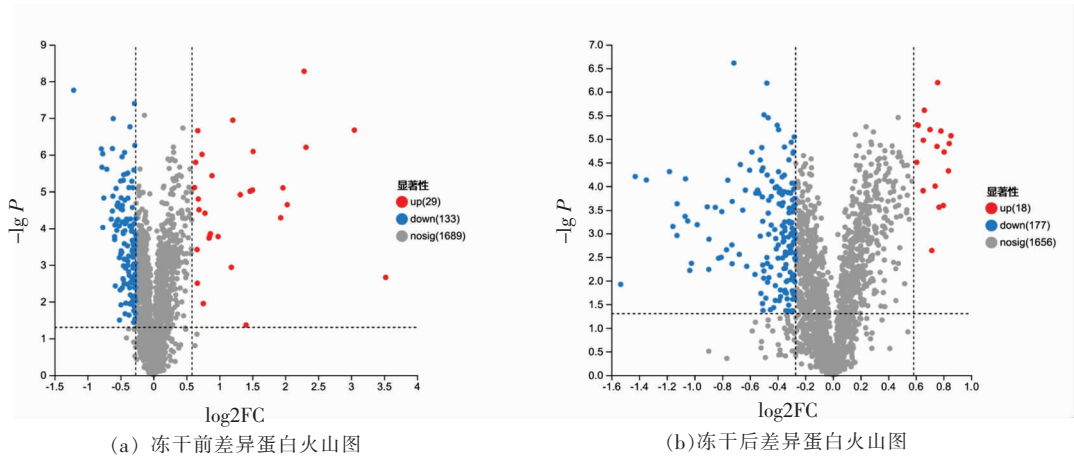


图 5 冻干前、后差异蛋白火山图

Fig.5 Differential protein volcano map before and after freeze-drying

图 5a 与图 5b 所示为冻干前、后 32.5℃ 与 37℃ 试验组鉴定到的差异蛋白火山图,图中每个点代表一个蛋白质。横坐标表示蛋白在两个样本

中的倍数变化值,0 点左边表示蛋白表达下调,右边表示蛋白表达上调;纵坐标表示蛋白表达量变化差异统计学检验值(P 值),纵坐标越大,显著性

越强。冻干前两个试验组鉴定出具有显著性差异表达的蛋白质 162 个, 其中上调蛋白显著表达的 29 个, 下调蛋白显著表达的 133 个; 冻干后两个试验组鉴定出具有显著性差异表达的蛋白有 195 个, 其中显著上调蛋白 18 个, 显著下调蛋白 177 个。这说明冷冻干燥使副干酪乳杆菌 PC-01 内部

蛋白分子发生变化, 从而影响菌种的活性。

2.3.3.1 差异表达蛋白 KEGG 功能注释 将 32.5℃ 与 37℃ 试验组冻干前、后的所有差异蛋白进行 KEGG 功能注释统计, 在功能水平上分析差异蛋白所参与的 Pathway 通路或行使的功能分类。功能注释结果见图 6、7。

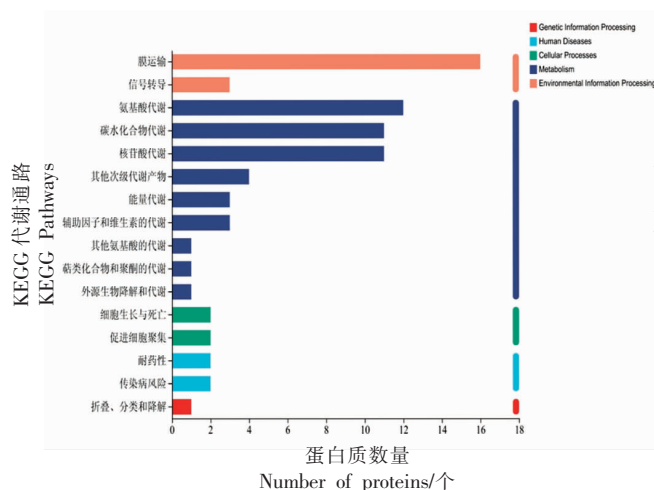


图 6 冻干前差异表达蛋白质 KEGG 功能注释

Fig.6 Functional annotation of differentially expressed protein KEGG before lyophilization

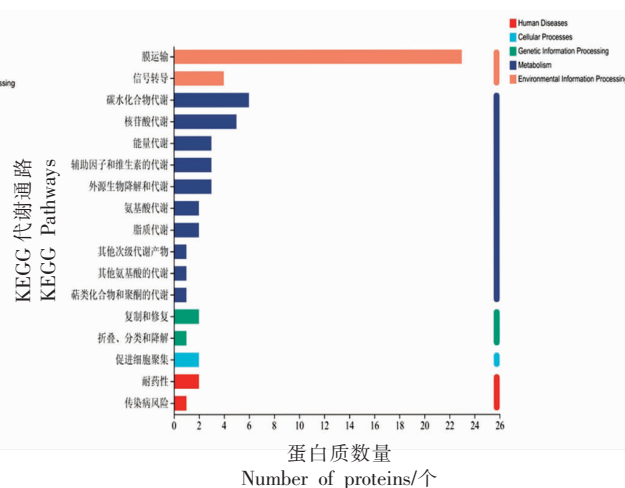


图 7 冻干后差异蛋白质 KEGG 功能注释

Fig.7 Functional annotation of differential protein KEGG after lyophilization

由图 6、图 7 可以看到两个试验组差异表达蛋白质主要注释到代谢、环境信息处理进程中。在代谢进程中, 注释到差异蛋白相对较多的通路是碳水化合物代谢、核苷酸代谢; 环境信息处理进程中注释的差异蛋白大多集中于膜运输通路。通过 KEGG 功能注释发现, 当副干酪乳杆菌 PC-01 处于对自身不利的环境中时, 其内部蛋白分子会立刻从细胞代谢及抵抗外界环境这两方面作出反应, 形成防御机制, 从而减弱外界环境对菌种活性的损害程度。

2.3.3.2 差异表达蛋白 KEGG 富集分析 将 32.5℃ 与 37℃ 试验组冻干前、后的差异蛋白分成两组蛋白集, 分别对每组差异表达蛋白集进行 KEGG Pathway 富集分析, 从而获得该蛋白集中蛋白主要具有的 KEGG 功能, 富集结果见图 8。

图 8 中横坐标表示代谢通路名称, 纵坐标表示富集率。图中圆点的颜色深、浅程度表示富集显著性, 颜色越深越富集, 越显著; 圆点的大小表示 KEGG 通路中差异蛋白的数量。根据富集结果可

知, 冻干前两个试验组的差异蛋白质显著富集于嘌呤代谢、RNA 降解、ABC 转运、脂肪酸生物合成、嘧啶代谢、氧化磷酸化等代谢通路。其中, 嘌呤代谢、嘧啶代谢、RNA 降解这 3 种代谢通路内部蛋白所行使功能大多是维持细胞遗传物质的稳定性, 从而增强菌株的繁殖能力; ABC 转运代谢通路中的蛋白参与许多重要的生理过程, 如: 营养摄入、细胞解毒、病毒防御等; 脂肪酸生物合成代谢通路中的蛋白会影响饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例, 进而影响菌体细胞膜流动性; 氧化磷酸化代谢通路中的蛋白主要参与 ATP 的生成, 与菌体细胞吸收营养物质的能力有关。由此可知, 冷冻干燥前, 副干酪乳杆菌 PC-01 内部蛋白分子主要是从维持细胞内部结构稳定与抵抗外界环境胁迫这两方面来保护菌体活性; 冷冻干燥后副干酪乳杆菌 PC-01 内部蛋白分子富集代谢通路的转变如图 9 所示。

在图 9 中存在 3 个条目的差异蛋白代谢通路显著富集, 分别是丙酮酸代谢、果糖与甘露糖代

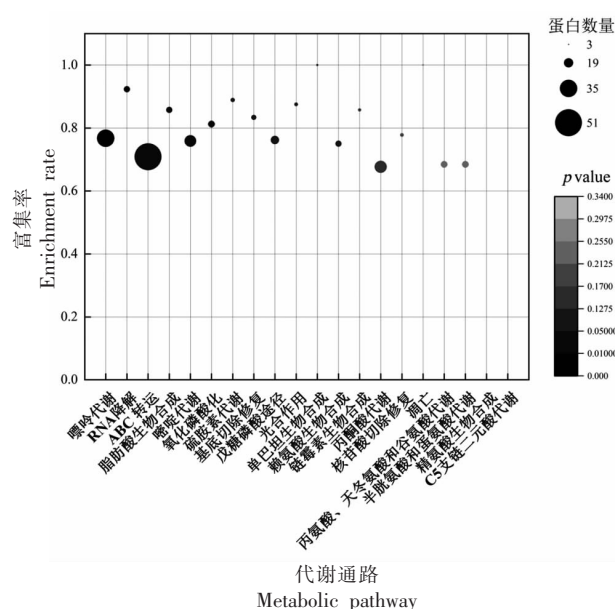


图8 32.5 °C与37 °C试验组冻干前差异表达蛋白 KEGG 富集分析

Fig.8 The enrichment analysis of the differentially expressed protein KEGG in the experimental groups at 32.5 °C and 37 °C before freeze-drying

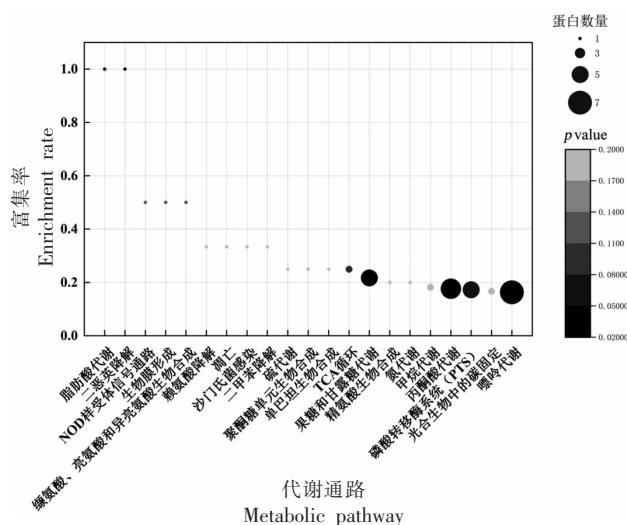


图9 32.5 °C与37 °C试验组冻干后差异表达蛋白 KEGG 富集分析

Fig.9 The enrichment analysis of the differentially expressed protein KEGG in the experimental groups at 32.5 °C and 37 °C before freeze-drying

谢、嘌呤代谢等代谢通路。在嘌呤代谢通路中发现磷酸核糖甘氨酸酰胺甲酰转移酶、腺苷脱氨酶,这两种酶在32.5 °C试验组中都表达上调,这些酶都

是乳酸菌嘌呤核苷酸合成与代谢的关键酶^[22]。由于菌体细胞在冷冻干燥后DNA的糖基键断裂会发生脱嘌呤和脱嘧啶反应,嘌呤核苷酸是DNA和RNA合成的底物,相关蛋白的过量表达会促进核糖核酸的生成,进而减少冻干对细胞遗传物质的破坏;在果糖与甘露糖代谢途径上果糖双磷酸酶III类与II类果糖-1,6-二磷酸醛缩酶于32.5 °C试验组中均过量表达,这两种酶参与糖类代谢^[23-24],可促进菌体对营养物质的吸收;在丙酮酸代谢通路上草酰乙酸脱羧酶、丙酮酸羧化酶、NAD依赖性苹果酸酶、丙酮酸激酶等酶在32.5 °C试验组中均过量表达,在这些酶的作用下会促进菌体细胞丙酮酸的产生与代谢水平,且丙酮酸激酶可使磷酸烯醇式丙酮酸和ADP发生反应生成ATP和丙酮酸,产生的ATP是供能物质,可为菌体细胞吸收营养物质提供能量。由此可知,即便是副干酪乳杆菌PC-01经过冷冻干燥,其内部蛋白分子富集通路发生转变,这些蛋白的功能与冻干前大同小异,都是通过增强细胞代谢维持细胞内部结构稳定。

对冻干前、后32.5 °C与37 °C试验组差异蛋白分析发现,差异倍数偏大的蛋白主要有醛酮还原酶、4-草酰巴豆酸互变异构酶、二肽酶、GNAT家族N-乙酰转移酶、磷酸核糖甘氨酸甲酰转移酶等蛋白,蛋白表达量详情如图10、图11所示。醛酮还原酶是冻干后两个试验组差异倍数最大的蛋白,该酶参与脂肪酸的合成与代谢,可增强菌体细胞对外界环境胁迫的耐受能力;4-草酰巴豆酸互变异构酶与二肽酶的作用都与增强细胞吸收营养物质的能力有关,且二肽酶可促进细胞进行代谢调节,增强其适应外界环境的能力;N-乙酰转移酶是一种可使细胞体内物质实现转化代谢的重要物质,在细胞代谢中起着重要的作用;磷酸核糖甘氨酸酰胺甲酰转移酶是乳酸菌嘌呤核苷酸合成与代谢的关键酶,可减少冻干对细胞遗传物质的破坏。由图10可知,32.5 °C试验组经冷冻干燥后,醛酮还原酶、二肽酶、GNAT家族N-乙酰转移酶等蛋白表达上调;磷酸核糖甘氨酸酰胺甲酰转移酶表达量与冻干前相比无显著变化;4-草酰巴豆酸互变异构酶表达量下调,分析原因可能是外界环境胁迫使该蛋白受损,从而表达量降低。由图11可看

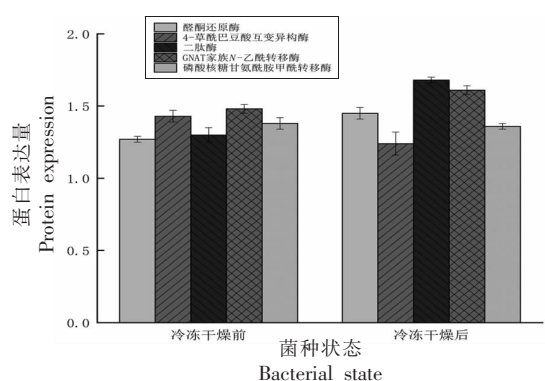


图 10 32.5 °C 试验组主要差异蛋白表达量

Fig.10 The main differential protein expression in the experimental group at 32.5 °C

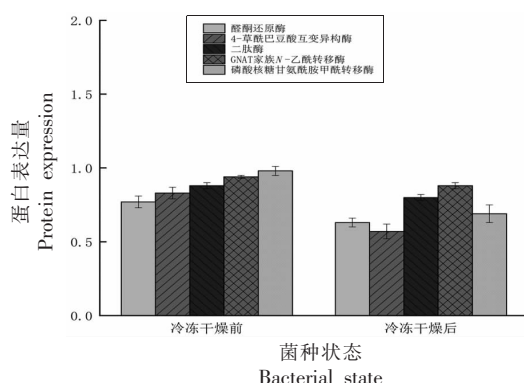


图 11 37 °C 试验组主要差异蛋白表达量

Fig.11 The expression of main differential proteins in the experimental group at 37 °C

出37 °C试验组经冷冻干燥后相关差异蛋白表达量降低。结合这些蛋白的功能推测相关差异蛋白在冷冻干燥后表达量上调,使得32.5 °C试验组在细胞代谢及对冷冻干燥环境的耐受性方面强于37 °C试验组,这可能是32.5 °C试验组经冷冻干燥后活性高于37 °C试验组的原因之一,同时这也说明冷冻干燥对副干酪乳杆菌 PC-01 细胞代谢及抗冷冻性等方面的影响较大。

2.4 讨论

利用 TMT 与 LC-MS 液-质谱联用技术对不同培养温度(32.5 °C与 37 °C)条件下,冷冻干燥前、后菌体活性存在显著差异的副干酪乳杆菌 PC-01 进行蛋白组学分析。对鉴定出的差异蛋白进行 KEGG 通路注释与富集分析,结果表明,32.5 °C 试验组中上调差异蛋白显著富集于碳水化合物代谢通路与膜运输通路,具有代表性的蛋白主要有 ECF 转运体 S 组分、金属 ABC 转运蛋白 ATP 结合蛋白、NADH 过氧化物酶等蛋白,这些蛋白均是菌株生长繁殖必不可少的,其中 ECF 转运体 S 组分、金属 ABC 转运蛋白 ATP 结合蛋白的功能均与膜运输有关且结合的底物为金属离子,通过运输膜两侧的金属离子来维持渗透压平衡,从而维持细胞结构稳定^[25-26]。NADH 过氧化物酶的作用是帮助细胞分解体内氧化毒性物质,抵抗氧化应激^[27]。通过对两个试验组冻干前、后差异显著蛋白的综合分析,发现 32.5 °C 试验组中一些关键蛋白在冻干后的表达量显著高于冻干前。例如醛酮还原酶,

该蛋白作用底物范围广泛,如糖类、脂肪醛等,可在辅酶的参与下进行羰基还原、碳碳双键还原、内酯还原和半缩醛氧化反应,同时参与不饱和脂肪酸的合成与代谢。由于诸多研究表明高比例的不饱和脂肪酸可更好地维持冻干后菌株细胞膜流动性及完整性^[28-29],因此推测醛酮还原酶在 32.5 °C 试验组中表达量提高,使菌株不饱和脂肪酸的量增加,从而增强细胞膜的韧劲并可更好地维持细胞膜流动性,由此增大了菌体细胞的抗冷冻性。

3 结论

运用蛋白组学技术分析冷冻干燥对副干酪乳杆菌 PC-01 菌体存活的影响,研究表明:冻干前、后的差异蛋白质在 KEGG 功能注释中主要集中在代谢进程和环境处理进程中,差异蛋白的功能分类多集中在碳水化合物代谢与膜运输这两类功能上。

通过分析关键差异蛋白的功能,发现这些蛋白表达上调会极大地增强菌体细胞抵抗外界胁迫与吸收营养物质的能力,推测这一结果是冻干前、后 32.5 °C 试验组活菌数显著高于 37 °C 试验组的原因之一。

本研究明确了冷冻干燥前、后副干酪乳杆菌 PC-01 内部蛋白分子的变化。根据关键差异蛋白的功能,可知冷冻干燥主要是从抗冷冻性、膜运输以及细胞代谢 3 个方面影响 PC-01 菌株细胞存活的。这一结论可为其工业化生产提供参考。

参 考 文 献

- [1] ALEIXANDRE-TUDÓ J, CASTELLÓ C, ALEIXANDRE J L, et al. Tendencies and challenges in worldwide scientific research on probiotics[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(3): 785–797.
- [2] ABUSHELAIBI A, AL-MAHADIN S, EL-TARABILI K, et al. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk[J]. LWT – Food Science and Technology, 2017, 79: 316–325.
- [3] KIA E M, GHASEMPOUR Z, GHANBARI S, et al. Development of probiotic yogurt by incorporation of milk protein concentrate (MPC) and microencapsulated *Lactobacillus paracasei* in gellan–caseinate mixture[J]. British Food Journal, 2018, 120(7): 1516–1528.
- [4] MANGIA N P, SALIBA L, ZOUMPOPOULOU G, et al. Goat milk with different alpha–s1 casein genotype (CSN1S1) fermented by selected *Lactobacillus paracasei* as potential functional food[J]. Fermentation, 2019, 5(3): 55.
- [5] CHEN Y P, HSU C A, HUNG W T, et al. Effects of *Lactobacillus paracasei* 01 fermented milk beverage on protection of intestinal epithelial cell in vitro[J]. J Sci Food Agric, 2016, 96(6): 2154–2160.
- [6] CHIEN L, CHEN H, PEI Y, et al. Therapeutic effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. paracasei NTU 101 powder on dextran sulfate sodium–induced colitis in mice[J]. Journal of food and drug analysis, 2019, 27(1): 83–92.
- [7] PAN T, GUO H Y, ZHANG H, et al. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* alleviates clinical symptoms of colitis induced by dextran sulphate sodium salt in BALB/c mice[J]. Beneficial Microbes, 2014, 5(3): 315–322.
- [8] JI H C, CHANG M M, SHIN T, et al. *Lactobacillus paracasei*–derived extracellular vesicles attenuate the intestinal inflammatory response by augmenting the endoplasmic reticulum stress pathway[J]. Experimental and Molecular Medicine, 2020, 52: 423–437.
- [9] MORITA Y, KENTA J, AKIHIKO S, et al. Long-term intake of *Lactobacillus paracasei* KW3110 prevents age–related chronic inflammation and retinal cell loss in physiologically aged mice[J]. Aging, 2018, 10(10): 2723–2740.
- [10] LIU Y, LI Y, YU X, et al. Physiological characteristics of *Lactobacillus casei* strains and their alleviation effects against inflammatory bowel disease[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 31(1): 92–103.
- [11] KUSTER S, BERNHARD H, SCHOTT A, et al. Quantitative proteomics for the comprehensive analysis of stress responses of *Lactobacillus paracasei* subsp. paracasei F19[J]. Journal of proteome research, 2017, 16(10): 3816–3829.
- [12] KOHLSTEDT M, SAPPA P K, MEYER H, et al. Adaptation of *Bacillus subtilis* carbon core metabolism to simultaneous nutrient limitation and osmotic challenge: a multi–omics perspective[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(6): 1898–1917.
- [13] ANGELIS D, CALASSO M, CAVALLLO N, et al. Functional proteomics within the genus *Lactobacillus* [J]. Proteomics, 2016, 16(6): 946–962.
- [14] SIROLI L, BRASCHI G, ROSSI S, et al. *Lactobacillus paracasei* A13 and high–pressure homogenization stress response[J]. Microorganisms, 2020, 8(3): 439.
- [15] TONG Y, ZHAI Q, LU W, et al. New insights in integrated response mechanism of *Lactobacillus plantarum* under excessive manganese stress[J]. Food Research International, 2017, 102: 323–332.
- [16] ZHAI Z, YANG Y, WANG H, et al. Global transcriptomic analysis of *Lactobacillus plantarum* CAUH2 in response to hydrogen peroxide stress[J]. Food microbiology, 2020, 87(5): 9.
- [17] HOU B G, WANG H, YAN T W, et al. Production for high–vitality starter culture of *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 by high cell–density cultivation and low–temperature vacuum drying[J]. Japanese Society for Food Science and Technology, 2016, 22(4): 519–527.
- [18] WANG T, LU Y, YAN H, et al. Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS–8[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(3): 515–528.
- [19] HUSSAIN M A, NEZHAD M H, YU S, et al. Pro-

- teomics and the stressful life of lactobacilli[J]. Fems Microbiology Letters, 2013(1): 1-8.
- [20] XU M F, HU S H, WANG Y W, et al. Integrated transcriptome and proteome analyses reveal protein metabolism in *Lactobacillus helveticus* CICC22171 [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12 (6): 128-138.
- [21] SICILIANO R, PANNENA G, LIPPOLIS R, et al. Impact of aerobic and respirative life-style on *Lactobacillus casei* N87 proteome[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 29(8): 51-62.
- [22] WANG J, ZHANG W, ZHI Z, et al. Gene expression profile of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang during the late stage of milk fermentation[J]. Food Control, 2012, 25(1): 321-327.
- [23] 陶萍, 吴耀生. 6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-2 是一种重要的代谢信号酶[J]. 生命的化学, 2006 (2): 110-113.
- TAO P, WU YS. 6-phosphofructokinase-2/fructose biphosphatase-2 is an important metabolic signal enzyme[J]. The Chemistry of Life, 2006(02): 110-113.
- [24] 张宇. 水稻果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 ALD Y 的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- ZHANG Y. Study on the function of rice fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene ALD Y[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. 2014.
- [25] WANG T, FU G, PAN X, et al. Structure of a bacterial energy-coupling factor transporter[J]. Nature, 2014, 22(1): 20-26.
- [26] 刘艳青, 赵永芳. ABC 转运蛋白结构与转运机制的研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(3): 223-229.
- LIU Y Q, ZHAO Y F. Research progress on the structure and transport mechanism of ABC transporter[J]. Life Sciences, 2017, 29(3): 223-229.
- [27] NARAKI S, IGIMI S, SASAKI Y., et al. NADH peroxidase plays a crucial role in consuming H₂O₂ in *Lactobacillus casei* IGM394[J]. Bioscience of Microbiota, Food and Health, 2020, 39(2): 45-56.
- [28] VELLY H, BOUIX M, PASSOT S, et al. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(2): 907-918.
- [29] JINGING E, MA L, CHEN Z, et al. Effects of buffer salts on the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 based on transcriptome and proteome analyses [J]. Food Chemistry, 2020, 326(1): 1-9.

Effects of Freeze-drying on the Activity of *Lactobacillus paracasei* PC-01 Cells Based on Proteomics

Xu Jiaqi, Zheng Xinfei, Feng Yan, Guo Lin, Yu Jie, Zhang Heping*

(Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Huhhot 010018)

Abstract Objective: This study aims to analyze the reasons why freeze-drying affects the survival of *Lactobacillus paracasei* PC-01 cells from the perspective of proteome. Method: Set different fermentation temperatures to 32.5 °C and 37 °C, respectively, high-density fermentation of *Lactobacillus paracasei* PC-01 and freeze-drying, taking samples before and after freeze-drying, using TMT technology for protein quantitative determination, KEGG function annotation and enrichment analysis were performed on the identified differential proteins, and the mechanism of the differential expression of the proteins on the survival of the bacteria in the two experimental groups was studied. Result: The experimental results showed that the number of viable bacteria before and after freeze-drying of the high-density fermentation of *Lactobacillus paracasei* PC-01 at 32.5 °C was significantly higher than that of the 37 °C experimental group. The study found that the up-regulated proteins were concentrated in carbohydrate metabolism and membrane transport. In terms of pathways, the proteins with large differences before and after freeze-drying are aldehyde ketone reductase, 4-oxalocrotonic acid tautomerase, dipeptidase, GNAT family N-acetyltransferase, phosphoribosylglycinamide formyl proteins such as transferase. Conclusion: The development of this research has enabled us to understand the changes in the internal molecules of

Lactobacillus paracasei PC-01 before and after freeze-drying. According to the functions of key differential proteins, freeze-drying mainly affects freezing resistance, membrane transport capacity and cell metabolism. The cells of *Lactobacillus paracasei* PC-01 strain survived. This can provide a reference for the industrial production of *Lactobacillus paracasei* PC-01.

Keywords *Lactobacillus paracasei* PC-01; proteomics; freeze-drying; cell activity