

植物乳杆菌 *L. plantarum* FS5-5 在盐胁迫下的蛋白质组学

乌日娜^{1,2}, 王茜茜¹, 唐筱扬¹, 张颖¹, 邹婷婷¹, 武俊瑞^{*1}

(1. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: *L. plantarum* FS5-5 是一株筛选自东北传统发酵大豆、具有耐盐特性的植物乳杆菌。该研究利用蛋白质组学双向电泳技术, 比较了其在 NaCl 质量浓度分别为 0、3 g/dL 的 MRS 培养基中生长至对数生长中期的蛋白质组学表达差异情况。结果表明, 有 16 个蛋白质点的表达发生了明显的变化, 经过基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱鉴定, 其中有 12 个蛋白质点鉴定出来, 包括 10 个表达增强的蛋白质, 分别为 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖二磷酸化酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、半胱氨酸氨基肽酶、UDP-N-乙酰胞壁酰丙氨酸-D-谷氨酸连接酶、前噬菌体蛋白、ABC 转运蛋白(铁硫聚类组装蛋白)、胆盐水解酶、谷氨酰胺合成酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、Xaa-蛋白二肽酶; 还有 2 个表达减弱的蛋白质, 分别为腺苷酸琥珀酸合成酶、丙酮酸激酶。盐胁迫可诱导乳酸菌产生复杂的盐应激反应, 涉及不同的代谢调控途径。

关键词: *L. plantarum* FS5-5; 蛋白质组; 盐胁迫

中图分类号: Q 51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)02—0123—06

Proteomics Research on Salt Response of *L. plantarum* FS5-5 Grown at Different NaCl Concentrations Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis

WU Rina^{1,2}, WANG Qianqian¹, TANG Xiaoyang¹, ZHANG Ying¹, ZOU Tingting¹, WU Junrui^{*1}

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *L. plantarum* FS5-5, isolated from traditional home-made fermented soybean in northeast of China, has been considered as a new salt tolerance bacterium. Proteomics research were carried out to identify proteins expression of *L. plantarum* FS5-5 grown at different NaCl concentrations of 0% and 3% in this study. Cytosolic proteins of mid-exponential phase were resolved and further analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. The results showed that sixteen protein spots were found with statistically significant differences. Twelve of total protein spots were identified as

收稿日期: 2014-09-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000805, 31471713); 中国博士后科学基金资助项目(2014M560395); 辽宁省农业领域青年科技创新人才培养资助计划(2014048); 辽宁省高等学校优秀人才计划(IJQ 2011071); 沈阳农业大学“天柱山英才支持计划”; 辽宁省教育厅科学技术项目课题(L2012249)。

作者简介: 乌日娜(1979—), 女, 蒙古族, 内蒙古呼和浩特人, 农学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

E-mail: wrn6956@163.com

*** 通信作者:** 武俊瑞(1977—), 男, 内蒙古呼和浩特人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

E-mail: junruiwu@126.com

UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase, glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase, adenylosuccinate synthetase, cysteine aminopeptidase, prophage protein, pyruvate kinase, ABC transporter (iron-sulfur cluster assembly protein), bile salt hydrolase, glutamine synthetase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, Xaa-Pro dipeptidase using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS), indicating the complex response of lactic acid bacteria to salt stress.

Keywords: *L. plantarum* FS5-5, proteomics, salt stress

植物乳杆菌是乳酸杆菌的一种, 不产芽孢, 兼性厌氧, 最适 pH 6.5 左右, 最适温度为 37 °C, 是一种公认的益生菌^[1]。它具有诸多生理功能, 包括改善胃肠道功能^[2]、抗肿瘤^[3]、增强机体免疫力^[4]、降低胆固醇^[5]、维持泌尿系统菌群平衡^[6]等作用, 是一种常见的益生菌^[7]。*L. plantarum* WCFS1^[8]作为植物乳杆菌的模式菌株被测定出全基因组序列以来, 对人们在分子生物学水平上研究植物乳杆菌耐受环境的性能方面提供了实验基础。

植物乳杆菌在含有盐的环境下可以生存, 并且可以耐受高的渗透压, 基于植物乳杆菌的这种优点, 植物乳杆菌在人类的生产活动中应用广泛。在食品工业中, 植物乳杆菌主要应用于发酵传统大酱^[9]、腌制酸菜、泡菜、发酵肉制品、生产果蔬汁饮料^[10]等。同时, 植物乳杆菌还可以用于生产生物性防腐剂^[11], 作为饲料的添加剂^[12], 生产青贮饲料^[13]等领域。蛋白质组 (proteome) 是一个基因组所表达的全套的蛋白质^[14], 是后基因组研究的主要方式, 其中双向电泳技术 (Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 是蛋白质组学研究中的核心技术^[15]。利用蛋白质组学研究植物乳杆菌对盐环境的适应机理是一种非常有效的方法。

作者以东北传统大酱中筛选出的耐盐的植物乳杆菌 *L. plantarum* FS5-5^[16]为研究对象, 利用双向电泳技术, 构建了该菌株在 0、3 g/dL 的盐质量浓度下, 生长至对数生长期中期的菌体总蛋白质的差异表达双向凝胶电泳图谱。扫描后, 利用软件 Image 6.0 对图谱进行了分析, 找出与耐盐相关的差异表达蛋白质, 然后通过 MALDI-TOF/TOF 质谱对蛋白质进行鉴定, 并利用生物信息学对其功能进行了分析, 确定蛋白质的种类及功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 耐盐植物乳杆菌 *L. plantarum* FS5-5,

由沈阳农业大学食品学院从东北传统大酱中分离得到。

1.1.2 改良的 MRS 培养基 (g/L) 牛肉浸膏 8; 蛋白胨 10; 酵母粉 4; 无水乙酸钠 5; 葡萄糖 20; 吐温 1; 磷酸氢二钾 2; 七水硫酸镁 0.58; 柠檬酸钠 2; 四水硫酸锰 0.25。

1.1.3 试剂 MES、MOPS: 北京 Coolaber 公司; Urea、Thisurea、DTT、CHAPS、Iodoacetamide、Ammonium bicarbonate、考马斯亮蓝 G250、R250、IPG (Immobilized pH gradient) 干胶条 (18 cm, pI 3~10): 美国 Bio-rad 公司; Tris、SDS、TEMED、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、AgNO₃、Trichloroacetic acid: 美国 Sigma 公司; APS、Acetone、EDTA、Na₂S₂O₃、Na₂CO₃、无水乙酸钠、正丁醇: 上海鼎国生物科技发展有限公司; 低相对分子质量标准蛋白质: 美国 Bio-rad 公司。

1.2 仪器与设备

等电聚焦仪, Ettan DALT Twelve system 灌胶装置, Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System, Hofer SE 600, UMax Powerlook 2110XL 扫描仪, Image Master 6.0 图像分析系统: 美国 GE 公司; TGL-168 低温高速离心机: 德国 Eppendorf 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 植物乳杆菌的培养 将活化三代的 *L. plantarum* FS5-5 供试菌液以 1% 的接种体积分数分别接种到 NaCl 为 0、3 g/dL 的新鲜配置的 MRS 培养基中, 培养基用 HCl 调节 pH 到 6.5, 同时添加 MOPS、MES 缓冲剂。以每管 5 mL 的量分装试管, 于 37 °C 下恒温培养 24 h, 每隔 2 小时进行取样, 绘制 *L. plantarum* FS5-5 在不同盐质量浓度下的生长曲线。

1.3.2 蛋白质样品的提取与制备 取 100 μL 菌体, 加入 600 μL 2D 裂解液, 超声提取蛋白质 (80 W 超声 10 s, 停 15 s, 50 个循环) 直至液体澄清, 15 °C、14000 g, 离心 45 min, 取上清液至 15 mL 离心管

中,加入13 mL 预冷的丙酮,沉淀过夜,4 ℃、7 187 g 离心 45 min,弃去丙酮,加入预冷的丙酮清洗两次,弃去丙酮,待剩余丙酮挥发完全后加入 250 μ L 2D 裂解液。使用 Bio-Radford 蛋白质含量测定试剂盒定量,-80 ℃低温保存。

1.3.3 双向凝胶电泳 将菌体蛋白质样品 100 μ g 加入溶胀液中,使总体积为 350 μ L。充分混匀后,将其加入到持胶槽中,并将 IPG 干胶条胶面向下放于样品之上进行溶胀。胶条溶胀后,进行第一向等电聚焦。等电聚焦参数为:30 V 12 h,500 V 1 h,1 000 V 1 h,8 000 V 8 h,500 V 4 h。聚焦结束后,将胶条分别放入含有 1 g/dL DTT 的 SDS 平衡液和含有 2.5 %浓度的碘乙酰胺 SDS 平衡缓冲液中,于摇床上平衡 15 min。然后将胶条转移至 12.5 g/dL 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(26 cm $\times$ 20 cm)进行电泳,至溴酚蓝色带距离胶下沿 0.5 cm 时停止电泳,取下凝胶采用银染法进行染色^[17]。

1.3.4 图像分析及质谱鉴定 将染色后的凝胶置于 Image Scanner 上进行扫描,扫描后,利用软件 Image 6.0 图像分析软件对凝胶图谱进行分析。选取在相同条件下的两块平行胶构建成一个参考胶,通过参考胶蛋白质质量的匹配和比较,对不同条件下的蛋白质表达情况进行分析,对相互之间能够匹配上的点进行位置和量的重复性分析,对相互之间不能匹配的点进行差异表达量的分析^[18]。

在凝胶上选取差异蛋白点,将差异蛋白点切下,经胰酶消化处理后,通过 MALDI-TOF/TOF 质谱对蛋白质点消化后的肽段进行鉴定,并利用生物信息学对其功能进行分析,确定蛋白质的种类及功能。

2 结果与分析

2.1 不同盐质量浓度下 *L. plantarum* FS5-5 的生长

L. plantarum FS5-5 在 NaCl 质量浓度分别为 0 g/dL 和 3 g/dL 的改良的 MRS 培养基中能够生长,其生长曲线见图 1。*L. plantarum* FS5-5 在 0 g/dL 时 4 h 到达对数生长中期,在 3 g/dL 条件下 6 h 到达对数生长中期。缓冲剂的加入使 *L. plantarum* FS5-5 在进入稳定期前可维持初始 pH 在 $\pm 0.1 \sim 0.3$ 的范围内缓慢降低,可基本维持 pH 6.5 左右,进入稳定期后,培养液的 pH 值才会显著下降^[18]。

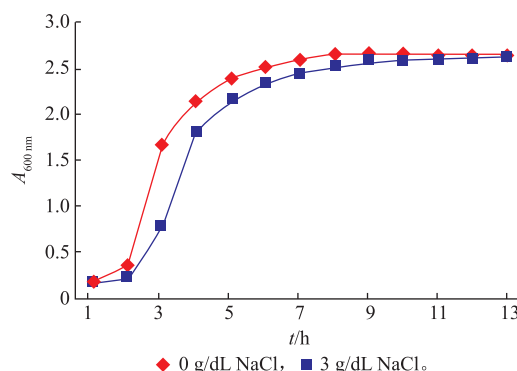


图 1 植物乳杆菌 *L. plantarum* FS5-5 在不同 NaCl 质量浓度条件下的生长

Fig. 1 Growth of *L. plantarum* FS5-5 cultured in MRS medium at different NaCl concentrations

2.2 不同 NaCl 质量浓度下 *L. plantarum* FS5-5 对数生长中期蛋白组双向电泳图像分析

利用双向电泳技术,构建了 *L. plantarum* FS5-5 在不同 NaCl 质量浓度下生长的 2-DE 图谱,见图 2。通过软件 Image 6.0 对 2-DE 图像进行分析,结果表明,3 块平行胶的匹配率均在 90 以上。可检测到的斑点分别为 1640 ± 139 (NaCl 质量浓度为 0 g/dL), 1730 ± 140 (NaCl 质量浓度为 3 g/dL)。

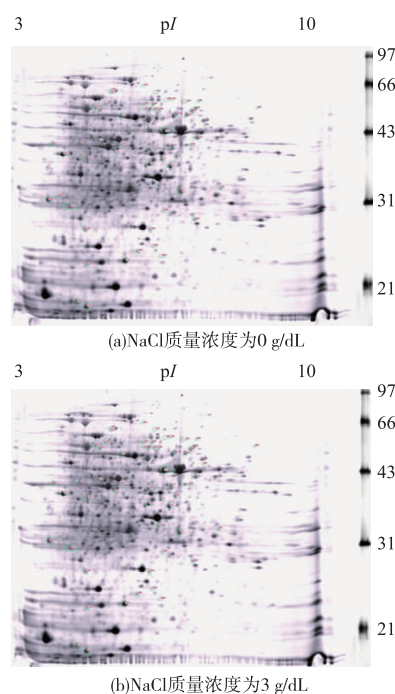


图 2 *L. plantarum* FS5-5 在不同 NaCl 质量浓度下生长至对数生长中期的蛋白组双向电泳表达图谱

Fig. 2 2-DE gels of the cytoplasmic proteins of *L. plantarum* FS5-5 exposed in MRS medium at different NaCl concentrations

2.3 不同 NaCl 质量浓度下 *L. plantarum* FS5-5 对数生长中期蛋白组双向电泳差异表达谱比较

经过软件 Image 6.0 软件对 2-DE 图谱的分析,

以表达量增强(或下降)在 1.5 倍以上为标准,研究发现 16 种蛋白质在 *L. plantarum* FS5-5 对数生长中期的表达发生明显变化,见表 1。

表 1 *L. plantarum* FS5-5 在 NaCl 质量浓度为 0 g/dL 和 3 g/dL 生长至对数中期的差异表达蛋白质
Table 1 Identification of *L. plantarum* FS5-5 different expression proteins affected by different NaCl concentrations of 0 g/dL and 3 g/dL

蛋白质点	蛋白质名称	理论分子质量	理论等电点	功能分类	差异表达	gi in NCBI
250	UDP-N-乙酰氨基葡萄糖二磷酸化酶	50 267	5.33	糖代谢	增强	gil380031491
177	6-磷酸葡萄糖脱氢酶	56 751.2	5.22	糖代谢	增强	gil380033329
309	腺苷酸琥珀酸合成酶	47 434.4	5.4	核苷酸代谢	减弱	gil308181870
277	半胱氨酸氨基肽酶	50 412.6	4.89	-	增强	gil308179689
289	UDP-N-乙酰胞壁酰丙氨酸-D-谷氨酸连接酶	50 262.7	5.86	氨基酸代谢	增强	gil380032939
1446	前噬菌体蛋白	17 076.4	4.6	-	增强	gil308181187
711	丙酮酸激酶	49 700.3	4.98	糖酵解	减弱	gil308180705
241	ABC 转运蛋白,铁硫聚类组装蛋白	47 636.2	5.38	-	增强	gil380032321
617	胆盐水解酶	37 303.2	5.12	脂类代谢	增强	gil380033873
348	谷氨酰胺合成酶	51 111.3	5.35	氨基酸代谢	增强	gil308180434
266	6-磷酸葡萄糖脱氢酶	53 062.8	5.04	糖代谢	增强	gil380032155
507	Xaa-蛋白二肽酶	41 320.6	5.01	-	增强	gil380032989
1294	Unidentified	-	-	-	减弱	-
1608	Unidentified	-	-	-	减弱	-
1237	Unidentified	-	-	-	减弱	-
787	Unidentified	-	-	-	减弱	-

由表 1 可知,在不同盐质量浓度条件下培养的 *L. plantarum* FS5-5 的双向电泳图中有 16 个表达情况不同的蛋白质点,其中有 12 个蛋白质点通过 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定技术鉴定出对应的蛋白质,有 4 个蛋白质点未鉴定出对应的蛋白质。在这 16 个差异表达蛋白质点中,有 10 个蛋白质点表达增强,包括 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖二磷酸化酶(点 250)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(点 177)、半胱氨酸氨基肽酶(点 277)、UDP-N-乙酰胞壁酰丙氨酸-D-谷氨酸连接酶(点 289)、前噬菌体蛋白(点 1446)、ABC 转运蛋白,铁硫聚类组装蛋白(点 241)、胆盐水解酶(点 617)、谷氨酰胺合成酶(点 348)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(点 266)、Xaa-蛋白二肽酶(点 507);有 6 个蛋白质点表达减弱,包括已经鉴定出的腺苷酸琥珀酸合成酶(点 309)、丙酮酸激酶(点 711)以及未鉴定出的 4 个蛋白质点(点 1294、点 1608、点 1237、点 787)。

根据 COG 蛋白质的功能分类,对鉴定出的蛋白质进行功能注释^[19]。其中,鉴定出的蛋白质的功能主要包括糖代谢(点 250、点 177、点 266)、氨基酸代

谢(点 289、点 348)、核苷酸代谢(点 309)、脂类代谢(点 617)和糖酵解(点 711)。其中,3 个与糖代谢相关的蛋白包括 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖二磷酸化酶(点 250)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(点 177)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(点 266);2 个与氨基酸代谢相关的蛋白包括 UDP-N-乙酰胞壁酰丙氨酸-D-谷氨酸连接酶(点 289)、谷氨酰胺合成酶(点 348);1 个与核苷酸代谢相关的蛋白为腺苷酸琥珀酸合成酶(点 309);1 个与脂类代谢相关的蛋白为胆盐水解酶(点 617);1 个与糖酵解相关的蛋白为丙酮酸激酶(点 711)。

3 结 语

植物乳杆菌处于 NaCl 环境中,会诱导植物乳杆菌产生盐应激反应来适应所处的 NaCl 环境。从差异表达的蛋白质点的鉴定情况来看,依据蛋白质功能分类,鉴定出的蛋白质大多属于代谢相关的酶类,这也说明了这类蛋白质在植物乳杆菌菌体的生长过程中起到了非常重要的作用^[20]。

在植物乳杆菌生长过程中,糖代谢途径的主要

功能是提供能量。在 NaCl 质量浓度为 3 g/dL 的环境下生长的植物乳杆菌表达上调的 10 种蛋白质中,有 3 种是与糖代谢相关的,其中有 2 个蛋白质点表达增强在 2.5 倍以上。这也说明了乳酸菌在某些不利的环境下,需要消耗更多的能量来维持自身的生长和代谢,所以糖代谢途径中的一些酶类的表达可能会发生变化^[20-21]。除了糖代谢途径外,氨基酸代谢途径、脂类代谢在植物乳杆菌适应 NaCl 环境方面也起到了重要作用。其中,半胱氨酸氨基肽酶、谷氨酰胺合成酶、Xaa-蛋白二肽酶表达的上调也说明了在 NaCl 质量浓度为 3 g/dL 的 MRS 培养基中生长时乳酸菌代谢中的氧化过程增多,乳酸菌氧化能力增强。

在鉴定出的蛋白质中,UDP-N-乙酰氨基葡萄糖

糖二磷酸化酶(点 250)和 UDP-N-乙酰胞壁酰丙氨酸-D-谷氨酸连接酶(点 289)是与细菌细胞壁肽聚糖合成相关的酶。在 NaCl 质量浓度为 3 g/dL 的 MRS 培养基中生长时,这两种蛋白质的表达均上调。Piuri 等人相关的研究表明,如果在培养乳杆菌的培养基中增加与细胞膜相连的肽酶,可以增加其耐盐性^[22]。肽聚糖是细菌细胞壁的基本骨架,是抵抗不利环境因素的第一道防线,对植物乳杆菌适应 NaCl 环境具有重要的生理功能^[23]。

在本研究中,鉴定出的差异表达点还包括前噬菌体蛋白、胆盐水解酶,它们在植物乳杆菌耐受 NaCl 环境中所起的具体作用还需在后续的实验中进一步研究。

参考文献:

- [1] Wassenaar T M, Klein G. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements [J]. *J Food Prot*, 2008, 71(8): 1734-1741.
- [2] Pieper R, Janczyk P, Urubschurov V, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbial community composition and response to enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in weaning piglets[J]. *Livestock Science*, 2010, 133: 98-100.
- [3] 靳志强, 王延祥. 植物乳杆菌在人体肠道的益生特性[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(9): 30-34.
JIN Zhiqiang, WANG Yanxiang. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* in the human intestinal tract [J]. *China Dairy Industry*, 2007, 35(9): 30-34. (in Chinese)
- [4] 张筠, 刘宁, 孟祥晨. 乳酸菌胞外多糖的生物学活性[J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 31(4): 227-230.
ZHANG Jun, LIU Ning, MENG Xiangchen. The biological activities of exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria[J]. *Journal of Environmental Hygiene*, 2004, 31(4): 227-230. (in Chinese)
- [5] 张佳程, 骆承庠. 乳酸菌对食品中胆固醇脱除作用的研究[J]. 食品科学, 1998, 19(3): 20-22.
ZHANG Jiacheng, LUO Chengxiang. Study on cholesterol removal of food by lactic acid bacteria [J]. *Food Science*, 1998, 19(3): 20-22. (in Chinese)
- [6] 任志华. 草酸降解菌的分离鉴定及其对犬草酸钙尿结石的预防作用与机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2001.
- [7] 金世琳. 乳酸菌的科学与技术[J]. 中国乳品工业, 1998, 26(4): 14-16.
JIN Shilin. Science and technology of lactic acid bacteria[J]. *China Dairy Industry*, 1998, 26(4): 14-16. (in Chinese)
- [8] DPA Cohen. Functional analysis of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: a proteomic approach [D]. The Netherlands: Wageningen, 2007.
- [9] 单婷婷. 大酱发酵过程中活性物质的变化[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(2): 101-104.
SHAN Tingting, LU Mingchun, LI Yongchun, et al. Transformation of active substance in the miso fermentation [J]. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2011, 30(2): 101-104. (in Chinese)
- [10] 张杨, 孟祥晨. 自然发酵酸菜发酵液中乳杆菌的分离鉴定与多态性分析[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(2): 19-22.
ZHANG Yang, MENG Xiangchen. Isolation, identification and genetic diversity analysis of lactobacilli from naturally fermented northeast sauerkraut[J]. *China Dairy Industry*, 2009, 37(2): 19-22. (in Chinese)
- [11] 赵玲艳, 邓放明, 杨细平, 等. 生物防腐剂—乳酸菌素[J]. 中国食物与营养, 2005(2): 27-29.
ZHAO Lingyan, DENG Fangming, YANG Xiping, et al. Biological preservatives-lactic acid bacteria [J]. *Food and Nutrition in China*, 2005(2): 27-29. (in Chinese)
- [12] 王华, 陈有客. 益生菌和水产动物饲料添加剂[J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(3): 181-186.

- WANG Hua, CHEN Yourong. Probiotics and aquatic animal feed additives[J]. **Chinese Journal of Microecology**, 2001, 13(3): 181-186. (in Chinese)
- [13] 刘贤. 不同添加剂对苜蓿青贮饲料品质的影响[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(3): 25-30.
LIU Xian, HAN Lujia, Hara Shinichiro, et al. Effects of different additives on the quality of alfalfa silage[J]. **Journal of China Agricultural University**, 2004, 9(3): 25-30. (in Chinese)
- [14] 贺福初. 蛋白质组学研究—后基因组时代的主力军[J]. 科学通报, 1999, 44(2): 113-122.
HE Fuchu. Proteomics-post genomic[J]. **Science**, 1999, 44(2): 113-122. (in Chinese)
- [15] 乌日娜, 张和平, 孟和, 等. 干酪乳杆菌蛋白质双向电泳条件优化及图谱建立[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 598-602.
WU Rina, ZHANG Heping, MENG He, et al. The construction and optimization of two-dimensional electrophoresis of *Lactobacillus casei*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 598-602. (in Chinese)
- [16] 徐鑫, 王茜茜, 乌日娜, 等. 传统农家大酱中耐盐性乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11): 33-40.
XU Xin, WANG Qianqian, WU Rina, et al. Isolation and identification of salt-resistant lactic acid bacteria in farmers' soybean paste[J]. **Journal of Food and Fermented Industry**, 2014, 40(11): 33-40. (in Chinese)
- [17] Wu R N, Wang W W, Yu D L, et al. Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditionally home-made koumiss in Inner Mongolia of China[J]. **Molecular & Cellular Proteomics**, 2009, 8(10): 2321-2338.
- [18] 乌日娜, 岳喜庆, 张和平. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 在酸胁迫下的蛋白质组学研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 17-20.
WU Rina, YUE Xiqing, ZHANG Heping. The proteomics of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* Zhang to acid stress [J]. **Journal of Food and Fermented Industry**, 2012, 38(7): 17-20. (in Chinese)
- [19] 乌日娜. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 蛋白质组学研究[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2009.
- [20] 乌日娜, 孙志宏, 张和平, 等. 蛋白质组学在乳酸菌应激反应机制研究中的应用[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 324-327.
WU Rina, SUN Zhihong, ZHANG Heping, et al. Application of proteomics to study stress response of lactic acid bacteria[J]. **Food Science**, 2013, 34(1): 324-327. (in Chinese)
- [21] Kullen M J, Klaenhammer T R. Identification of the pH inducible, proton-translocating F_1F_0 -ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization[J]. **Mol Microbiol**, 1999, 33: 1152-1161.
- [22] Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal S M. Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzymes[J]. **J Appl Microbiol**, 2003, 95: 372-379.
- [23] 赵蕾, 张克英, 丁雪梅. 肽聚糖在非特异性免疫中的信号作用[J]. 饲料工业, 2008, 29(2): 45-47.
ZHAO Lei, ZHANG Keying, DING Xuemei. The signals function of peptidoglycan in non-specific immune[J]. **Feed Industry**, 2008, 29(2): 45-47. (in Chinese)