

# L-乳酸脱氢酶基因在乳酸乳球菌 KLDS4.0325 中的表达

周颖, 高晓峰, 刘飞, 谷春涛, 霍贵成

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:**本文研究了在 mRNA 转录水平上三种 L-乳酸脱氢酶基因在乳酸乳球菌 KLDS4.0325 不同生长阶段的表达情况。以 *16s rRNA* 作为内参基因, 应用实时荧光定量 PCR 技术测定不同生长阶段的菌体中 L-乳酸脱氢酶基因 (*ldh*、*ldhX* 和 *ldhB*) 表达的动态变化规律。该菌株的生长曲线呈 S 型, 培养 2~6 h 为菌体的生长对数期, 随后进入稳定期。生长曲线的测定表明该菌株生长力极其旺盛; *16s rRNA*、*ldh*、*ldhX* 和 *ldhB* 基因的扩增效率曲线显示, 内参基因与目的基因的扩增效率一致且接近 100%, 这说明利用相对荧光定量法能够较好的反应目的基因的表达量; *ldh*、*ldhX* 和 *ldhB* 基因在菌体生长的 3 个时间点 (6 h、9 h 和 12 h) 都有一定量的表达, 随着菌体的不断生长, 基因表达的变化均呈现显著性上升趋势, 且上升幅度不断增加, 在 12 h 时基因表达量达到最大值。其中 *ldh* 基因在的表达量在菌体生长的 3 个时间点存在显著性差异, 而 *ldhX*、*ldhB* 基因的表达量存在极显著差异。

**关键词:** 乳酸乳球菌 KLDS4.0325; L-乳酸脱氢酶基因; 基因表达

文章编号: 1673-9078(2015)4-63-68

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.011

## Variations in the Expression of the L-lactate Dehydrogenase Gene during the Different Phases of *Lactococcus lactis* KLDS4.0325 Growth

ZHOU Ying, GAO Xiao-feng, LIU Fei, GU Chun-tao, HUO Gui-cheng

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The expressions of three L-lactate dehydrogenase genes at the mRNA transcription level during the different phases of *Lactococcus lactis* KLDS4.0325 growth were investigated in this study. Dynamic variations in the expressions of the three L-lactate dehydrogenase genes (*ldh*, *ldhB*, and *ldhX*) during the different growth phases were detected by fluorescence-based quantitative real time polymerase chain reaction (PCR), using the *16s rRNA* gene as the internal standard. The growth curves of the strain were observed to be 'S'-shaped, with the strains reaching the exponential phase of growth within 2~6 h of culture; subsequently, the cells remained in the stationary phase. The growth curve revealed the extremely strong vitality of the cells; the amplification efficiency curve of the *16s rRNA*, *ldh*, *ldhB*, and *ldhX* genes indicated similar amplification efficiencies (close to 100%) of the reference and target genes. These results indicated that the fluorescence-based quantitative real time PCR method reflected the expression level of the target genes adequately. The *ldh*, *ldhB*, and *ldhX* genes were expressed to specific levels during the three time points (6 h, 9 h, and 12 h) of strain growth. In addition to the growth of the strain, the gene expression levels demonstrated a significant upward trend, with a continuous amplitude of increase; the highest expression level was observed at 12 h post-initiation. The levels of expression of the *ldh* gene significantly differed among the three time points; in addition, the expression of *ldhB* significantly differed from that of *ldhX*.

**Key words:** *Lactococcus lactis* KLDS4.0325; L-lactate dehydrogenase gene; gene expression

乳酸乳球菌是一种广泛用于乳品行业的重要发酵型细菌,除了提供特殊的香味,它能够在发酵过程中快速产生乳酸,具有防腐的特性,能够延长乳品的保质期。对于乳球菌的基因和生理特性,我们已经获取了相对丰富的信息。乳酸乳球菌具有 GRAS 的地位、代谢途径相对简单以及基因组小的优势,因此它是代

收稿日期: 2014-07-28

基金项目: 国家 863 科技计划项目 (2011AA100902、2012AA022108)

作者简介: 周颖 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 霍贵成 (1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学

谢工程研究的极佳模型<sup>[1-2]</sup>。

L-乳酸脱氢酶 (LDH; EC1.1.1.27) 是乳酸乳球菌同型发酵的关键酶,它与 NADH 结合将丙酮酸还原成乳酸<sup>[3]</sup>。L-乳酸脱氢酶广泛存在于乳酸乳球菌、嗜热链球菌以及乳杆菌中,同时也是许多科学研究的研究对象<sup>[4]</sup>。在乳酸乳球菌中, L-乳酸脱氢酶主要是由乳酸操纵子上的 *ldh* 基因编码合成,该操纵子上还包括磷酸果糖激酶基因 (*pfk*) 和丙酮酸激酶基因 (*pyk*)。然而,对乳酸乳球菌的全基因序列分析研究发现, *ldhB*、*ldhX* 和 *hicD* 所编码的氨基酸序列与 *ldh* 基因的氨基酸

序列有 30% 的相似性<sup>[5-7]</sup>。除此之外,在 *ldh* 基因失活的 LDH 缺陷菌株发酵过程中仍能够检测到乳酸的生成<sup>[8]</sup>。Bongers<sup>[9]</sup>研究显示,LDH 缺陷菌株在无氧条件下连续培养后发现乳酸的生成,并证实这种现象是由 *ldhB* 基因引起。Paula<sup>[2]</sup>研究发现乳酸乳球菌 MG1363 中的 *ldh*、*ldhB* 和 *ldhX* 基因发生表达,而 *hicD* 基因并未表达。

本文以乳酸乳球菌 KLDS4.0325 为出发菌株,之前对该菌株发酵乳酸的研究发现其产酸速率快,产酸量较高且仅产 L-乳酸。基于此,本文对该菌株高产 L-乳酸的内在机理进行研究,采用实时荧光定量 PCR 在转录水平上研究其 L-乳酸脱氢酶基因在菌体生长过程中的表达情况,为乳酸乳球菌高产 L-乳酸提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

乳酸乳球菌 KLDS4.0325 由东北农业大学教育部重点实验室工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC)提供。

#### 1.1.2 培养基

M17 培养基:大豆蛋白胨 5.0 g、蛋白胨 2.5 g、酪蛋白胨 2.5 g、酵母浸粉 2.5 g、牛肉粉 5.0 g、乳糖 5.0 g、抗坏血酸钠 0.5 g、 $\beta$ -甘油磷酸钠 19.0 g、硫酸镁 0.25 g,充分溶解后用蒸馏水定容至 1 L。121 °C, 15 min 灭菌(固体培养基在此基础上加琼脂 15 g/L)

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

RNAprep Pure Bacteria Kit、TIANScrip RT Kit 均购自 QIAGEN 公司;荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)购自 TaKaRa 公司;ABI7500 荧光定量 PCR 仪购自美国应用系统公司

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生长曲线的测定

将菌种活化后以 2% 的接种量接种于 M17 培养基中,30 °C 培养后划平板,挑取单菌落,液体培养基活化两代。取活化后的菌液按 2% 的比例接种到 5 mL 的 M17 培养基中,30 °C 培养 14 h,每隔 1 h 取样,以不含菌液的空白培养基作为对照,在波长 600 nm 处测定培养液的吸光度值(OD<sub>600</sub>),每组实验 3 个平行,取平均值。以 OD<sub>600</sub> 为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制生长曲线图。

#### 1.2.2 引物设计与合成

以 *16s rRNA* 作为内参基因。根据 NCBI 提供的乳酸乳球菌 KLDS4.0325 的 *16s rRNA*(GI:254971971)、*ldh*(GI: 17339086)、*ldhB*(GI: 17338023)、*ldhX*(GI: 17338785)的序列,采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 软件设计引物,具体见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

基因类别	基因名称	引物序列	产物 /bp	T <sub>m</sub> /°C
内参	<i>16s</i>	F: GGGGAGCAAACAGGATTAGA R: TGCGTTAGCTGCGATACAGA	97	81.5
基因	<i>ldh</i>	F: ACAACACCTTCAGCACCAACTA R: GGACAATATGGCGTAAGCGACT	65	81.5
目的基因	<i>ldhB</i>	F: TCCACCTACCGTCGTGT R: TTGGGAAACTTCTGGTCTTG	184	82.6
	<i>ldhX</i>	F: GTATCTTCTTGGTCGCATCA R: AGCGTTCCTGTCCCTATC	100	82.2

引物由华大技术有限公司合成,使用前用 ddH<sub>2</sub>O 稀释至浓度为 10 μmol/L, -20 °C 保存。

#### 1.2.3 RNA 提取

取不同生长阶段的菌体 1 mL, 12000 r/min 离心 2 min 收集菌体,仔细去除上清,用 20 mg/mL 的溶菌酶溶液 100 μL 彻底重悬菌体,37 °C 孵育 10 min。按照 RNA 提取试剂盒说明书依次提取 KLDS4.0325 不同生长阶段的 RNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳,观察 23 s 和 16 s 电泳条带,判断 RNA 的完整性。测定其 260 nm 吸光度,计算 RNA 浓度。

$$\text{RNA 浓度} = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数}$$

#### 1.2.4 cDNA 合成

按照反转录试剂盒说明书的方法进行反转录,得到的 cDNA 样本于 -20 °C 保存,用于实时荧光定量 PCR。其中反转录的 RNA 加入量为 2 μg,反转录终体积为 40 μL。

#### 1.2.5 实时荧光定量 PCR

使用 Takara 公司的 SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)试剂盒配制 PCR 反应液,反应体系: SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×) 10 μL; 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.8 μL; ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μL; 将反转录反应产物 cDNA 稀释 10 倍,取 2 μL; dH<sub>2</sub>O (灭菌蒸馏水) 6 μL,总体积为 20 μL。

使用 ABI 7500 快速实时定量 PCR 做实时荧光定量 PCR 试验,不同反应体系样品做 3 个重复。采用两步法 PCR 扩增标准程序: 预变性: 95 °C 30 s; PCR 反应: 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 循环 (40 次)。

分析各基因的 CT 值, 采用参照基因的  $2^{\Delta CT}$  法对目的基因的表达量进行评估。每个目的基因和内参基因在每次反应中, 不同样本重复 3 次, 最后取平均值。数据经 Excel 整理后, 用 SPSS19 软件进行方差分析,  $P < 0.05$  为显著差异,  $P < 0.01$  为差异极显著。

目的基因的相对量 =  $2^{\Delta Ct}$

$$\Delta Ct = Ct_x - Ct_0$$

注:  $Ct_x$ : 内参照基因的 Ct;  $Ct_0$ : 目的基因的 Ct 值; 目的基因相对于校正样本的表达量 = 实验组/校正组; 校正样本是任何被选做代表 1 倍目的基因表达量的样本。

### 1.2.6 扩增效率曲线

取一样品 cDNA 作为标准模板, 取  $2\mu\text{L}$  的 cDNA 稀释 10 倍作为最大浓度, 以该模板进行 4 次 4 倍稀释, 制成标准模板系列。自每个稀释模板中取样  $2\mu\text{L}$ , 加入总体积  $20\mu\text{L}$  的反应体系中, 行实时荧光定量 PCR, 得到目的基因和内参基因的扩增标准曲线, 每个浓度做 3 个平行。曲线回归系数大于 0.96, 表明 PCR 反应检测到的 Ct 值与样品 cDNA 拷贝数的对数值存在线性关系, 实验所得的扩增效率接近 100% 且相互间效率在 90%~105% 之间, 则在该实验条件下检测得到的结果可较好反映样品中待测基因的表达水平。

扩增效率:  $E = (10^{-1/\text{斜率}} - 1) \times 100\%$

### 1.2.7 数据分析

采用单因素方差分析(SPSS19), 比较菌株在不同生长阶段下 *ldh*、*ldhB*、*ldhX* 基因表达差异的显著性, \*表示显著 ( $p < 0.05$ ), \*\*表示极显著 ( $p < 0.01$ )。用标准差衡量平行实验的离散度, 试验数据以平均值 ± 标准差表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乳酸乳球菌 KLDS4.0325 生长曲线

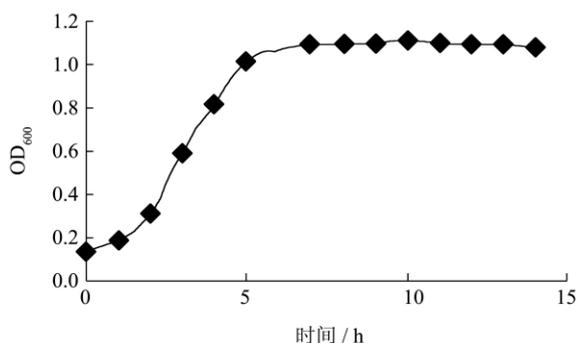


图1 乳酸乳球菌在 OD<sub>600</sub> 下的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Lactococcus lactis* cells plotted using the absorbance values at OD<sub>600</sub>

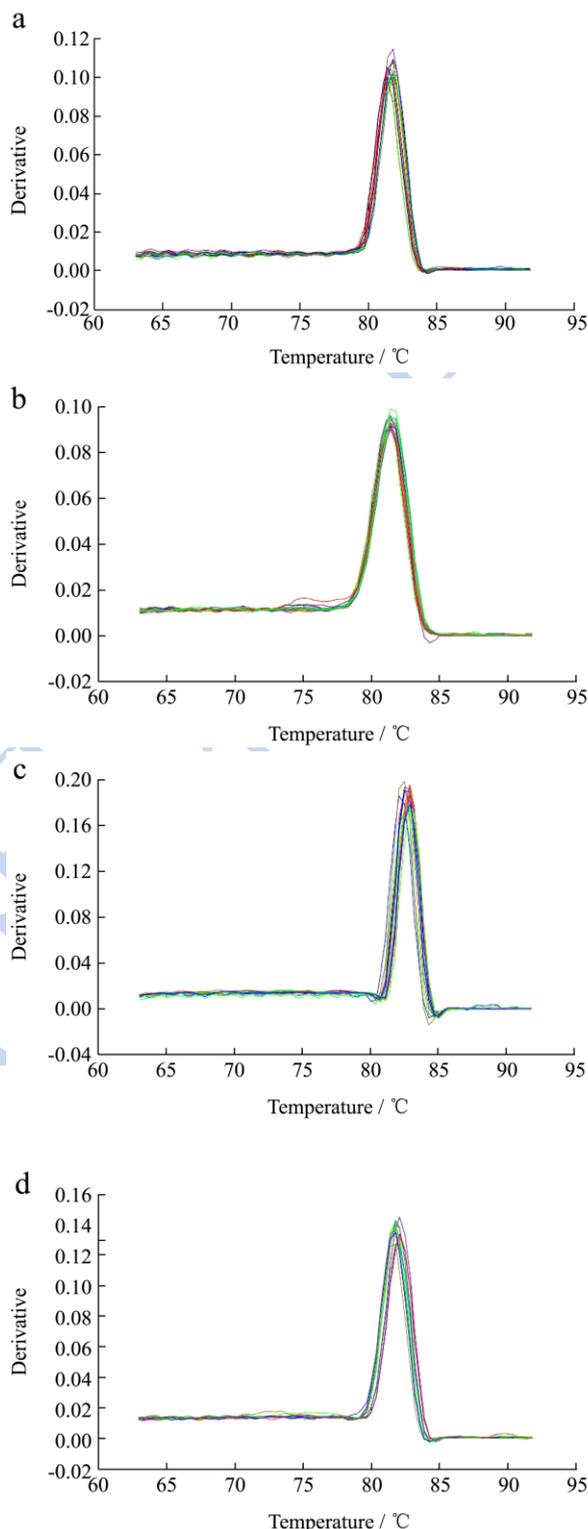


图2 乳酸乳球菌内参基因与目的基因的 PCR 产物的溶解曲线

Fig.2 Dissociation curves of the *Lactococcus lactis* reference and target genes

注: (a) *16s rRNA*, (b) *ldh*, (c) *ldhB*, (d) *ldhX*。

为了了解实验菌株 KLDS4.0325 的生长状况, 以便提取不同生长时期的菌体 RNA, 测定菌株的生长曲线。如图 1 所示, 该菌种生长力旺盛, 在 1 h 时进入

对数期, 6 h 时进入稳定期。这比一般乳酸乳球菌更早的进入稳定期, 说明该菌株生长速率较快。由于乳酸为次级代谢产物, 主要在稳定期开始积累, 因此选择稳定期的 6 h、9 h、12 h 菌体 cDNA 作为荧光定量 PCR 的模板进行下一步的研究。

### 2.2 溶解曲线分析

由于染料法中所用的染料会与所有的双链 DNA 相结合, 因此由引物二聚体、单链二级结构及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性, 因此检验引物的特异性的非常有必要的。通过分析溶解曲线能够很好地验证引物的特异性。由图 2 可以看出, 内参基因 (*16s rRNA*) 和目的基因 (*ldh*、*ldhB* 和 *ldhX*) 的溶解曲线为单一峰值, 而且峰线窄而尖, 说明引物特异性好, 扩增产物单一。

### 2.3 引物扩增效率的确定

实时荧光定量 PCR 所得内参基因 (*16s rRNA*) 和目的基因 (*ldh*、*ldhB* 和 *ldhX*) 的扩增曲线如图 2 所示。由图 2 可知, 内参基因 (*16s rRNA*) 和目的基因 (*ldh*、*ldhB* 和 *ldhX*) 的五个浓度梯度的扩增曲线重复性较好, 且 Ct 值间距均匀一致。

表 2 乳酸乳球菌实时荧光定量 PCR 扩增效率

Table 2 Amplification efficiency of the real-time RT-PCR of *Lactococcus lactis* reference and target genes

基因	扩增曲线方程	R <sup>2</sup>	扩增效率/%
<i>16s rRNA</i>	$y = -3.4686x + 16.874$	0.9993	94.6
<i>ldh</i>	$y = -3.369x + 31.127$	0.9970	98.5
<i>ldhB</i>	$y = -3.5506x + 30.058$	0.9993	91.3
<i>ldhX</i>	$y = -3.5589x + 35.38$	0.9937	91.0

以 cDNA 浓度的对数值为横坐标, 以 cDNA 浓度所对应的 Ct 值为纵坐标, 绘制扩增效率曲线。由此得出目的基因及内参基因的扩增效率见表 2。由表 2 可知, 目的基因与内参基因的扩增效率曲线的 R<sup>2</sup>>0.99, 说明曲线的相关性良好; 扩增效率均介于 90%~100% 之间, 扩增效率接近且接近 100%, 说明在该实验条件下所得的实验结果具有较高的可信度。扩增效率未达到 100% 可能是由于反应体系中存在抑制剂, 使得实际扩增效率低于 100%。*16s rRNA*、*ldh*、*ldhB* 和 *ldhX* 基因之间的扩增效率存在一定的差异性, 一方面是由于荧光定量 PCR 灵敏度高, 容易受到环境以及操作手法的影响, 从而导致扩增效率不同; 另一方面, 引物的特异性以及产物大小的不同对扩增效率都会产生一定的影响<sup>[10]</sup>。

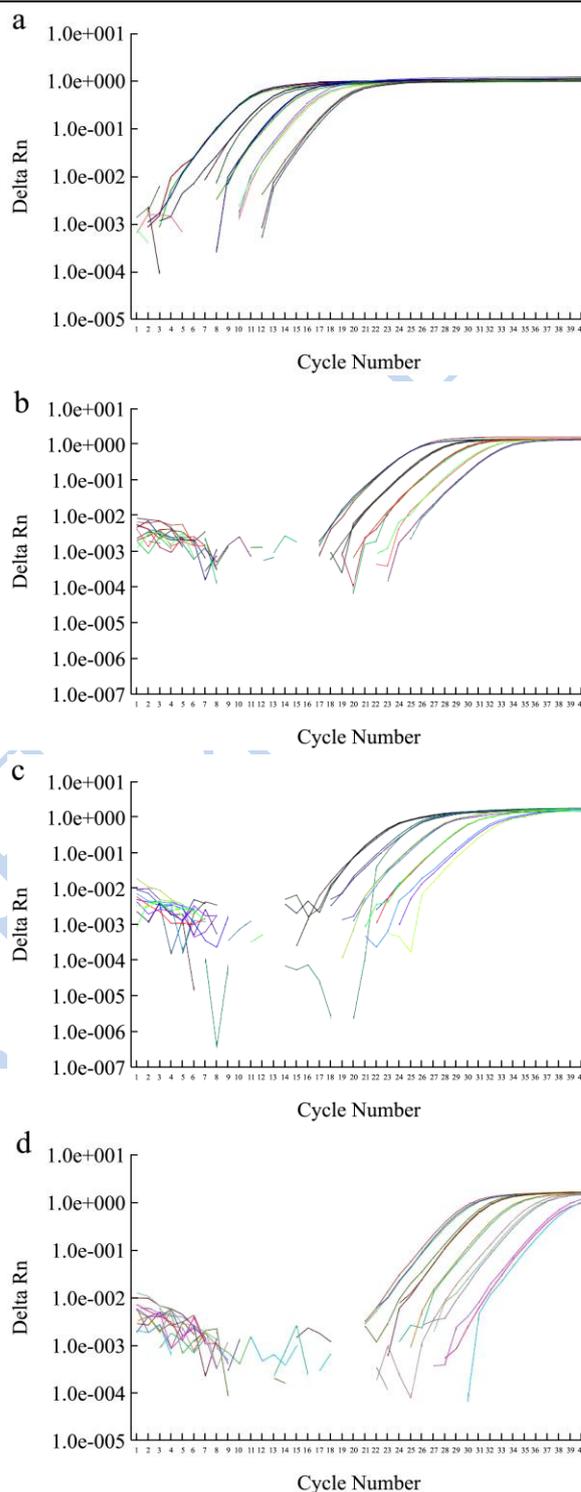


图 3 乳酸乳球菌内参基因与目的基因的扩增曲线

Fig.3 Amplification curve of the *Lactococcus lactis* reference and target genes

注: (a)*16s rRNA*, (b)*ldh*, (c) *ldhB*, (d)*ldhX*。

### 2.4 不同生长阶段 L-乳酸脱氢酶基因表达的动态变化规律

采用实时荧光定量 PCR 技术对乳酸乳球菌

KLDS4.0325 的 *ldh*、*ldhB* 和 *ldhX* 基因在生长过程中不同时间点的相对表达量进行了测定。结果显示, 随着时间的延长, 三个基因的表达量都有所增加; 在 6 h、9 h 时, *ldh* 基因的表达量最大, 依次是 *ldhB*、*ldhX*, 这说明在生长前期 *ldh* 对 L-乳酸的生成影响最大; 在 12 h 时, *ldhB* 基因的表达量最大, 依次是 *ldh*、*ldhX*, 这说明, 随着时间的延长 *ldhB* 对乳酸合成有更大的影响, 而 *ldh* 基因仍然对乳酸合成具有决定性的作用。 *ldhX* 基因在整个过程中, 表达量虽然有所增加, 但表达量不及 *ldh* 和 *ldhB* 基因。

可知, *ldh*、*ldhB* 和 *ldhX* 基因表达量都表现出增长的趋势。其中在 9 h 和 12 h 时, *ldh* 基因相对于 6 h 时的表达量有显著性的变化 ( $p < 0.05$ ) (如图 3a); 而 *ldhB*、*ldhX* 基因相对于 6 h 时的表达量有极显著的变化 ( $p < 0.01$ ) (如图 3a、b)。换言之, 随着培养时间的延长, *ldh* 基因的表达量增加幅度低于 *ldhB*、*ldhX* 基因。尽管如此, *ldh* 基因对 L-乳酸的合成仍然起到决定性的作用, 而 *ldhB*、*ldhX* 基因的表达量大幅度增加可能与某些因素的诱导有关系, 这还需要更进一步的深入研究。

表 3 乳酸乳球菌目的基因相对表达量比较

Table 3 Relative expression levels of *Lactococcus lactis* target genes

基因名称	培养时间/h	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct}$
<i>ldh</i>	6	-15.58±0.26	$2.04 \times 10^{-5}$
	9	-15.19±0.42	$2.68 \times 10^{-5}$
	12	-14.63±0.09	$3.93 \times 10^{-5}$
<i>ldhB</i>	6	-20.61±0.10	$6.25 \times 10^{-7}$
	9	-16.79±0.01	$8.82 \times 10^{-6}$
	12	-12.79±0.11	$1.24 \times 10^{-4}$
<i>ldhX</i>	6	-25.70±0.89	$2.05 \times 10^{-8}$
	9	-21.66±0.48	$3.01 \times 10^{-7}$
	12	-18.52±0.18	$2.88 \times 10^{-6}$

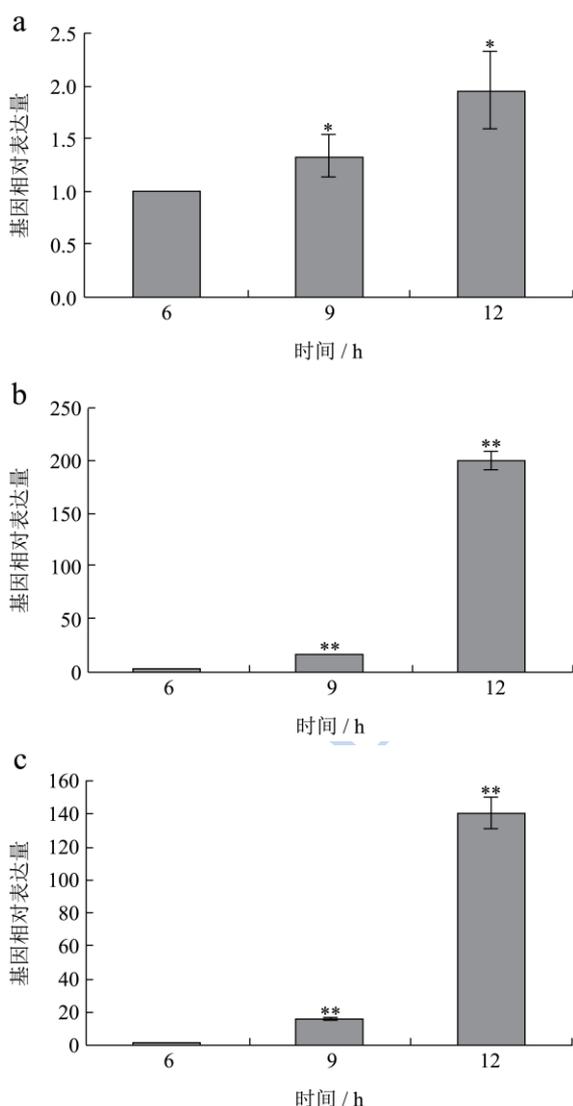


图 4 乳酸乳球菌不同生长期 *ldh*、*ldhB* 和 *ldhX* 相对表达量比较

Fig.4 Kinesis of the *ldh*, *ldhB*, *ldhX* gene expression during the different growth phase of *Lactococcus lactis*

注: a: *ldh*, b: *ldhB*, c: *ldhX*; 分别以 *ldh*、*ldhB* 和 *ldhX* 在 6h 的相对表达量为参照, 设置值为 1。

以 6 h 时的基因表达量为参照, 计算不同时间 *ldh*、*ldhB* 和 *ldhX* 的相对表达量倍数变化, 见图 3。由图 3

### 3 结论

3.1 本实验利用荧光定量 PCR 技术研究 L-乳酸脱氢酶基因的表达情况, 结果表明: 随着菌体的生长, 3 中 L-乳酸脱氢酶基因的表达呈现显著增长趋势。 *ldh* 基因在三个时间点的表达水平都比较高; *ldhB* 基因在 6 h 时基因表达量低于 *ldh* 基因, 而在 12 h 时, 表达量超过 *ldh* 基因; *ldhX* 基因在三个时间点的相对表达量最小。 *ldh*、*ldhB* 和 *ldhX* 基因对乳酸产量的贡献大小取决于这三种基因的表达量以及这三种基因编码的 L-乳酸脱氢酶的活力。本文对三种 L-乳酸脱氢酶基因的表达量进行了研究, 而它们各自编码的 L-乳酸脱氢酶的活力需要进一步的研究。 Paula 以乳酸乳球菌 MG1363 为母本构建乳酸脱氢酶缺陷菌株, 研究表明缺失 *ldh* 和 *ldhB* 基因的菌株以及缺失 *ldh*、*ldhB* 和 *ldhX* 的菌株在 pH 6.0 和 pH 7.2 并未检测到乳酸脱氢酶的活性; 缺失 *ldh* 基因的菌株仅在 pH 6.0 时检测到乳酸脱氢酶活性, 且活性是 LDH 的 1%, 此时体现的酶活即为 LDHB<sup>[2]</sup>。

3.2 目前关于 L-乳酸脱氢酶基因在乳酸乳球菌中的表达情况的研究较少。 Bongers<sup>[9]</sup> 研究显示, *Lactococcus lactis* NZ9000 中只有 *ldh* 基因表达, 而 *ldhB*、*ldhX* 并未表

达。Paula<sup>[2]</sup>研究发现乳酸乳球菌MG1363中的*ldh*、*ldhB*和*ldhX*基因发生表达,而*hicD*基因并未表达。Cao<sup>[11]</sup>研究表明菌株*L. lactis* ATCC19435中同时有*ldh*、*ldhB*和*ldhX*基因的表达。这些研究说明,乳酸乳球菌中L-乳酸脱氢酶基因的表达情况不尽相同。本实验对该领域的研究具有一定的扩充作用,为进一步研究乳酸乳球菌中的L-乳酸脱氢酶表达机制提供一定的理论基础。

### 参考文献

- [1] de Vos WM, Hugenholtz J. Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria [J]. Trends Biotechnol., 2004, 22(2): 72-79
- [2] Gaspar P, Neves A R, Gasson M J, et al. High yields of 2, 3-butanediol and mannitol in *Lactococcus lactis* through engineering of NAD(+) cofactor recycling [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2011, 77(19): 6826-6835
- [3] Gaspar P, Neves A R, Shearman C A, et al. The lactate dehydrogenases encoded by the *ldh* and *ldhB* genes in *Lactococcus lactis* exhibit distinct regulation and catalytic properties-comparative modeling to probe the molecular basis [J]. FEBS J., 2007, 274(22): 5924-5936
- [4] Madern D. Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family [J]. J. Mol. Evol., 2002, 54(6): 825-840
- [5] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. lactis IL1403 [J]. Genome. Res., 2001, 11(5): 731-753
- [6] Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363 [J]. J. Bacteriol., 2007, 189(8): 3256-3270
- [7] Siezen R J, Bayjanov J, Renckens B, et al. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. lactis KF147, a plant-associated lactic acid bacterium [J]. J. Bacteriol., 2010, 192(10): 2649-2650
- [8] Neves A R, Ventura R, Mansour N, et al. Is the glycolytic flux in *Lactococcus lactis* primarily controlled by the redox charge? Kinetics of NAD(+) and NADH pools determined in vivo by <sup>13</sup>C NMR [J]. J. Biol. Chem., 2002, 277(31): 28088-28098
- [9] Bongers R S, Hoefnagel M H, Starrenburg M J, et al. IS981-mediated adaptive evolution recovers lactate production by *ldhB* transcription activation in a lactate dehydrogenase-deficient strain of *Lactococcus lactis* [J]. J. Bacteriol., 2003, 185(15): 4499-4507
- [10] Zhao W, Li Y, Gao P, et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in gene expression levels of *Lactobacillus casei* Zhang [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2011, 38(9): 1279-1286
- [11] Cao R, Zeidan A A, Radstrom P, et al. Inhibition kinetics of catabolic dehydrogenases by elevated moieties of ATP and ADP-implication for a new regulation mechanism in *Lactococcus lactis* [J]. FEBS J., 2010, 277(8): 1843-1852